Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

Der Einfluss von IGF-1 auf die Differenzierung muriner kardialer Fibroblasten

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Nils Rollersbroich

2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:
Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker
Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke
Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Flögel

Zusammenfassung

Ein Myokardinfarkt verursacht häufig Umbauprozesse im Herzen, welche eine Herzinsuffizienz nach sich ziehen können. Es gibt Hinweise darauf, dass der insulinähnliche Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) kardioprotektive Eigenschaften besitzt. So konnten wir in einem Mausmodell zeigen, dass eine IGF-1-Behandlung in den ersten Tagen nach einem Myokardinfarkt zu einer verbesserten Pumpfunktion des Herzens im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe führte. Dieser Effekt wurde durch myeloide Zellen hervorgerufen. Neben der funktionellen Verbesserung war auch die Größe der Infarktnarbe durch IGF-1 signifikant reduziert. Da Fibroblasten maßgeblich an der Narbenbildung beteiligt sind, stellt sich die Frage, ob IGF-1 einen direkten oder indirekten, Makrophagen-vermittelten Effekt auf die Fibroblastendifferenzierung besitzt.

Um dies zu untersuchen, wurden zunächst kardiale Fibroblasten aus Mäusen isoliert und anschließend für eine Dauer von 11 Tagen kultiviert. Der Differenzierungsgrad der Fibroblasten wurde mithilfe der Durchflusszytometrie sowie der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion untersucht, wobei *α-smooth muscle actin* (α-SMA) bzw. ACTA2 als Marker differenzierter Fibroblasten verwendet wurden. In einer ersten Serie wurde zunächst das Differenzierungsverhalten von Fibroblasten in Abhängigkeit von unterschiedlichen Kultivierungsmedien untersucht. Als Positivkontrolle zeigte der *transforming growth factor beta* (TGF-β) eine starke Stimulation der Fibroblastendifferenzierung, indem er die α-SMA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe um ca. 40% steigerte. Der direkte Effekt von IGF-1 auf die Differenzierung von Fibroblasten wurde in einer zweiten Serie untersucht. Hierbei zeigte sich eine Verringerung der α-SMA-Expression in der mit IGF-1 behandelten Gruppe um 23%, was auf eine Unterdrückung des Differenzierungsprozesses durch IGF-1 hindeutet. Um den indirekten, Makrophagen-vermittelten Effekt von IGF-1 zu untersuchen, wurden Zellkulturüberstände IGF-1-polarisierter M2-Makrophagen zu den isolierten Fibroblasten hinzugegeben. Hierbei gab es keine Hinweise auf eine Beeinflussung der Fibroblastendifferenzierung.

Im *in-vivo*-Modell verursachte die Verabreichung von IGF-1 eine signifikante Abnahme des Myofibroblastenanteils im Infarktherzen. Die Ergebnisse aus den *in-vitro*-Versuchen konnten daher im *in-vivo*-Modell bestätigt werden. Immunhistologisch konnten vorerst allerdings keine Rückschlüsse auf die Lokalisierung der Myofibroblastenpopulation geschlossen werden.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass es deutliche Hinweise auf eine Inhibierung der Fibroblastendifferenzierung durch die Behandlung mittels IGF-1 *in vitro* gibt. Ein

indirekter, Makrophagen-vermittelter IGF-1-Effekt auf den Differenzierungsprozess von Fibroblasten konnte nicht festgestellt werden. Im Infarktherzen bewirkt IGF-1 eine signifikante Verringerung des Myofibroblastenanteils.

Summary

Myocardial infarction often causes various remodeling processes within the heart, which can ultimately lead to heart failure. There is evidence that insulin-like growth factor 1 (IGF-1) has cardioprotective properties. In the past, we were able to show that IGF-1 treatment led to an improved cardiac function of the murine heart in the first days after myocardial infarction. This effect was mediated by myeloid cells. In addition to the functional improvement, IGF-1 significantly reduced the scar size as well. Since fibroblasts are decisively involved in scar formation, the question arises whether IGF-1 has a direct or indirect, macrophage-mediated effect on fibroblast differentiation.

To investigate this, cardiac fibroblasts were first isolated from mice and then cultured for 11 days. The degree of differentiation of the fibroblasts was examined using flow cytometry and quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR), using α-smooth muscle actin (α-SMA) and ACTA2 as markers of differentiated fibroblasts. In a first series, the differentiation behaviour of fibroblasts was examined in dependence of various culture media. As positive control, the transforming growth factor beta (TGF-β) showed a potent stimulation of fibroblast differentiation by increasing the α-SMA expression by approx. 40% compared to the control group. The direct effect of IGF-1 on the differentiation of fibroblasts was examined in a second series. A pronounced reduction of the α-SMA expression in the IGF-1-treated group by approx. 23% could be shown, indicating a suppression of the differentiation process in fibroblasts. In order to investigate the indirect, macrophage-mediated effect of IGF-1, cell culture supernatants of IGF-1 polarized M2-macrophages were added to the isolated fibroblasts. No signs of any influence on the differentiation of fibroblasts could be found.

In the *in vivo* model, the administration of IGF-1 caused a significant decrease in the proportion of myofibroblasts in the infarcted heart. The results from the *in-vitro*-model could therefore be confirmed in the *in vivo* model. For the time being, no conclusions could be drawn about the localization of the myofibroblast population by immunohistological analysis.

In conclusion it can be said, that there is strong evidence of the inhibitory properties of IGF-1 concerning the fibroblast differentiation *in vitro*. An indirect, macrophage-mediated IGF-1 effect on the differentiation process of fibroblasts could not be found. In the infarcted heart, IGF-1 causes a significant reduction in the proportion of myofibroblasts.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
α-SMA	Alpha-Smooth Muscle Actin
AK	Antikörper
Assay-Medium	DMEM, 10 % FBS, 1 % GlutaMax, 1 % Pen/Strep
BSA	Bovines Serumalbumin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EMT	Epithelial – mesenchymal transition
EPDC	Epicardial derived cell
FACS	Fluorescence-activated cell scanning/sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum
FR	FACS-Röhrchen
FSC	Forward scatter
FVD	Fixable Viabilty Dye
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
High-FBS-Medium	DMEM, 20 % FBS, 1 % GlutaMAX, 1 % Pen/Strep
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL	Interleukin
INF-γ	Interferon gamma
Low-FBS-Medium	DMEM, 1 % FBS, 1 % GlutaMAX, 1 % Pen/Strep
MFI	Mean fluorescence intensity
NGS	Normal Goat Serum
PBS	Phosphate Buffer Saline
PBS (++)	PBS / 1 % Penicillin/Streptomycin / 2 µM CaCl2
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
Pol	Polarisierungsmedium
p38i	p38 Mitogen-aktivierter Proteinkinase Inhibitor
RNA	Ribonukleinsäure (*Ribonucleic acid*)
RT	Raumtemperatur
SSC	Sideward scatter
Sup	Supernatant
TGF-β	Transforming growth factor - β
q-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Remodeling 2

1.1.1 Funktion von Immunzellen nach einem Myokardinfarkt 5

1.1.2 Makrophagen 6

1.1.3 Fibroblasten 7

1.1.4 Klinische Konsequenzen einer Myokardfibrose 11

1.2 Der insulinähnliche Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) 11

1.3 Ziele der Arbeit 13

2 Material und Methoden 15

2.1 Laborgeräte und Zubehör 15

2.2 Softwareprogramme 16

2.3 Chemikalien 17

2.4 Puffersysteme und weitere Lösungen 17

2.5 Kits 18

2.6 Spezifische Reagenzien in der Zellkultur 18

2.7 Antikörper 19

2.8 Primer 20

2.9 Statistik 20

2.10 Mäuse 20

2.11 Organpräparation 21

2.12 Zellkultur (allgemeine Fibroblastenkultivierung) 21

2.13 Analysemethoden 23

2.13.1 Immunhistochemische Färbung in der Zellkultur 23

2.13.2 Durchflusszytometrie 24

2.13.3 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) 27

2.14 Versuchsprotokolle in der Zellkultur 30

2.14.1.1 Serie 1: Differenzierungsverhalten von Fibroblasten in Abhängigkeit unterschiedlicher Kultivierungsmedien 31
2.14.1.2 Zellkulturzeitreihe 32
2.14.2 Serie 2: Einfluss von IGF-1 auf die Differenzierung von Fibroblasten 33
2.14.3 Serie 3: Effekt von M1-, M2- und IGF-1-polarisierten Makrophagen-überständen auf die Differenzierung von Fibroblasten 34
2.15 Untersuchung des Einflusses von IGF-1 auf den Myofibroblastenanteil in Infarktherzen 36
2.16 Färbung histologischer Kryostat-Schnitte infarzierter Herzen 36
3 Ergebnisse 38
3.1 Immunhistochemische Färbung von (Myo-) Fibroblasten 38
3.2 Differenzierungsverhalten kultivierter Fibroblasten 39
3.2.1 FACS – Auswertung der 1. Serie 39
3.2.2 qPCR – Auswertung der 1. Serie 42
3.2.3 Untersuchung einer möglichen Korrelation der α-SMA-Expression von Fibroblasten mit der Kultivierungsdauer 43
3.3 Einfluss von IGF-1 auf die Differenzierung von Fibroblasten 46
3.3.1 FACS – Auswertung der 2. Serie 46
3.3.2 qPCR – Auswertung der 2. Serie 47
3.4 Der Effekt von Überständen M1-, M2- und IGF-1-polarisierter Makrophagen auf die Differenzierung von Fibroblasten 48
3.4.1 FACS – Auswertung der 3. Serie 48
3.4.2 qPCR – Auswertung der 3. Serie 49
3.5 *In-vivo*-Untersuchung von Infarktherzen 51
3.5.1 *In-vivo*-Untersuchung mittels FACS-Analyse 51
3.5.2 *In-vivo*-Untersuchung mittels immunhistochemisch gefärbter Kryostat-Schnitte 53
4 Diskussion 55
4.1 IGF-1 inhibiert die Fibroblastendifferenzierung *in vitro* 55
4.2 Keine Hinweise auf eine indirekte, Makrophagen-vermittelte Beeinflussung der Fibroblastendifferenzierung durch IGF-1 57

4.3 IGF-1 verringert den Myofibroblastenanteil im Infarktherzen 61
4.4 Fibroblastendifferenzierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen 63
4.5 Besonderheiten während des Arbeitens mit Fibroblasten 65
4.6 Schlussfolgerungen 67
5 Literatur- und Quellenverzeichnis 69
6 Danksagung 77

1 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen weltweit die führende Todesursache dar. Laut der World Health Organization (WHO) starben im Jahr 2016 schätzungsweise 17,9 Million Menschen an Herzkreislauferkrankungen, was 31% aller Todesfälle weltweit entspricht. 85% dieser Todesfälle sind auf Herzinfarkte oder Schlaganfälle zurückzuführen (World Health Organization, 2017). In Deutschland betrugen die Kosten zur Behandlung ischämisch bedingter Herzkrankheiten im Jahr 2015 6,788 Milliarden Euro und zur Behandlung von Herzinsuffizienzen 5,277 Milliarden Euro (Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2015). Die häufigsten Nebendiagnosen der Patienten, die vollstationär aufgrund eines akuten Myokardinfarktes aufgenommen waren, stellen unter anderem die chronische ischämische Herzkrankheit, essenzielle (primäre) Hypertonie, Dyslipidämie, Herzinsuffizienz und Diabetes mellitus 2 dar (Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2018a). Trotz der Tatsache, dass sowohl die absolute Anzahl der Verstorbenen in Folge eines Herzinfarktes als auch seine relative Häufigkeit stets weiter abnehmen, liegt der Myokardinfarkt seit Jahren mit ca. 46.000 Fällen (Stand 2018) an zweiter Stelle aller Todesursachen in Deutschland (Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2018b, Statistisches Bundesamt, 2018).

Unterschiedliche Faktoren, zu denen Nikotin- und Alkoholkonsum, verringerte physische Aktivität und eine ungesunde Diät gehören, tragen maßgeblich zu einer Steigerung des Cholesterolspiegels und des Blutdrucks bei (World Health Organization, 2017, Nabel & Braunwald, 2012). Die hieraus resultierende systemische Fetteinlagerung in der Tunica intima von Arterien, auch Atherosklerose genannt, birgt die Gefahr einer Thrombosierung bzw. Embolisierung der Blutgefäße. Hierbei verlegt der Thrombus die Arterie, was mit einer Ischämie bis hin zur Nekrose des Gewebes, das von diesem Blutgefäß mit Sauerstoff versorgt wird, einhergeht. Folge hiervon können, je nach Lokalisation, Schlaganfälle, Lungenembolien oder Herzinfarkte sein. Tritt der Verschluss (eines Teils) einer Arterie in den Koronararterien auf, so führt dies zum Absterben des Myokards, das im Versorgungsgebiet der Arterie liegt. Die hierdurch bewirkte Infarzierung und schließlich Fibrosierung des Gewebes hat mehrere Konsequenzen für den Organismus. Zum einen ist die Pumpfunktion des Herzens durch eine verringerte Kontraktilität und mitunter asynchrone Kontraktion des Herzmuskels beeinträchtigt, zum anderen kann die Modifizierung der Reizleitung innerhalb des abgestorbenen Gewebes zu teilweise letalen Herzrhythmusstörungen führen (Azevedo et al., 2016). Außerdem hat der Verlust des Stützgewebes eine Abnahme der Wanddicke sowie eine Zunahme der Ausdehnung des Infarktgebietes zur Folge, was in einer Dilatation des Ventrikels

resultieren kann (Zornoff et al., 2009, Azevedo et al., 2016). Diese akute Veränderung wird auch Infarktexpansion genannt (Hochman & Bulkley, 1982), welche zu einer Verschiebung von Volumen- und Druckbelastung führen kann (Azevedo et al., 2016). Hierbei kann es zu einer Schubverzerrung (*strain*) innerhalb des gesamten Myokards während der Systole kommen, wodurch sekundär auch das Grenzgebiet, das die Narbe umgibt („*Border Zone*“) und das der Narbe entfernte Gebiet („*Remote*“), welches nicht ischämisch war, geschädigt werden. Das Myokard unterzieht sich also diversen direkten und indirekten funktionellen und kompositionellen Veränderungen in Folge eines Infarktes. Dieser Prozess wird auch „*Remodeling*“ genannt und kann in einigen Fällen eine Herzinsuffizienz nach sich ziehen (Zornoff et al., 2009). Eine solche Herzinsuffizienz kann große Folgen für die Lebensqualität des Patienten haben, denn die verminderte Leistung des Herzens sorgt für eine Beeinträchtigung der Kondition und Ausdauer. Es fällt den Betroffenen schwerer, alltägliche Dinge zu erledigen, geschweige denn sich körperlich zu belasten. In ernsteren Fällen kann es zu einer Dekompensation des Herzens bzw. des gesamten Organismus kommen, bei der eine stationäre Behandlung unausweichlich ist. Dies führt zu einer zunehmenden Invalidität und erklärt, weshalb 40 % aller wegen Herzinsuffizienz hospitalisierten Patienten nach einem Jahr versterben (Liu & Eisen, 2014). Ein frühzeitiger Eingriff in den Remodelingprozess in Folge eines Myokardinfarktes ist daher von großem klinischen Interesse.

1.1 Remodeling

Die Symptomatik und Prognose eines Patienten nach einem Myokardinfarkt sind neben der medizinischen Akutbehandlung auch stark abhängig von dem Vermögen des Herzmuskels, kompensatorisch auf den Gewebeschaden zu reagieren. Dieser Heilungsprozess wurde von Judith Hochman und Bernadine Buckley erstmals im Jahre 1982 als „Remodeling“ beschrieben (Hochman & Bulkley, 1982). Sie definierten diesen Begriff als Resorption von nekrotischem Gewebe, Deposition von Granulationsgewebe und Formung einer Narbe, wobei die hämodynamische Beeinträchtigung vermutlich stärker von dem indirekt durch den Infarkt betroffenen Herzgewebe (Border Zone und Remote) abhängig sein soll als von dem eigentlich infarzierten Myokard (Hochman & Bulkley, 1982). Im Laufe der Jahre und mit zunehmendem Interesse an diesem Forschungsgebiet entwickelte sich die Definition dieses Begriffs immer weiter. Janice Pfeffer war die erste Forscherin, die den Remodelingprozess so beschrieb, wie er noch heute im klinischen Alltag Verwendung findet, nämlich als Zunahme des linksventrikulären Volumens nach durchgemachtem Myokardinfarkt, was eine

ventrikuläre Funktionsstörung nach sich ziehen kann (Pfeffer et al., 1985, Pfeffer & Braunwald, 1990). Da der Begriff in unterschiedlichen Zusammenhängen Verwendung fand, wurde im Jahre 2000 ein Konsensus eines internationalen Forums zum Thema Remodeling veröffentlicht, in dem der Umbau des Herzens als eine Gruppe molekularer, zellulärer und interstitieller Veränderungen definiert wurde. Klinisch manifestiert sich dies als Veränderung der Größe, Form und Funktion des Herzens infolge der Gewebeschädigung (Cohn et al., 2000). Schon zu dieser Zeit wurde dieser Vorgang in adaptive/physiologische und maladaptive/pathologische Prozesse unterteilt. Die adaptive Komponente des Heilungsprozesses des Herzens nach einem Akutschaden ermöglicht einen Erhalt der Herzfunktion in Abhängigkeit von Druck- oder Volumenbelastung (Azevedo et al., 2016, Heusch et al., 2014). Manchmal kommt es allerdings zu unzureichenden oder übermäßigen und somit pathologischen Kompensationsmechanismen. In diesem Falle kann sich die ursprünglich kompensatorische Reparationsphase zu einem nachteiligen Phänomen entwickeln und auf lange Sicht eine beeinträchtigte Herzfunktion und somit eine schlechtere Prognose nach sich ziehen (Gaudron et al., 1993). Wann genau dieser Übergang von physiologischer Kompensierung hin zur (pathologischen) Dekompensation des Herzmuskelgewebes stattfindet, variiert vermutlich stark zwischen den einzelnen Individuen und der Ausprägung des Herzinfarktes (Cohn et al., 2000).

Der komplexe Remodelingprozess wird klinisch oftmals als rein pathologischer Mechanismus dargestellt, obwohl dieser primär die Funktionalität des Herzens trotz starker Beeinträchtigung durch Schädigung des Myokards gewährleisten soll (Cohn et al., 2000). Trotz einiger therapeutischer Errungenschaften der letzten Jahre, wie zum Beispiel die schnelle Reperfusion oder die Gabe von *Angiotensin-Converting-Enzyme* (ACE) -Hemmern, ist die Mortalität als Folge der intrakardialen Veränderungen nach einem Myokardinfarkt weiterhin hoch. Das weitere Erforschen der pathophysiologischen Mechanismen, die bei diesem Remodelingprozess eine Rolle spielen, ist daher im Hinblick auf die Entwicklung neuer therapeutischer bzw. medikamentöser Behandlungsstrategien von großer Bedeutung. Hierbei soll die Umformung des Gewebes als Reaktion auf den Schaden nicht gänzlich vereitelt werden, da die kompensatorische Neustrukturierung für den Erhalt der Herzfunktion wichtig ist. Es gilt eher die überschüssige patho(-physio-)logische Komponente weitestgehend zu unterdrücken, um insgesamt ein Optimum zwischen Remodellierung und gleichzeitigem Erhalt des ursprünglichen Herzgewebes zu bewirken (Cohn et al., 2000).

Am Remodeling beteiligte Prozesse

Wie bereits beschrieben, umfasst das Remodeling ein komplexes Zusammenspiel aus unterschiedlichen strukturellen, interstitiellen, zellulären, molekularen und genetischen Komponenten (Azevedo et al., 2016, Heusch et al., 2014). Im Wesentlichen lässt sich diese Umstrukturierung des Myokards infolge eines Herzinfarktes in drei Phasen unterteilen.

Während der sogenannten pro-inflammatorischen Phase werden sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem als Reaktion auf den Gewebeschaden aktiviert (Azevedo et al., 2016, Frieler & Mortensen, 2015). Der nekrotische Zelltod führt zur Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen durch residente Immun- und Nicht-Immunzellen. Hierdurch migrieren Leukozyten, Neutrophile und von Monozyten abgeleitete Makrophagen in das Infarktgebiet (Epelman et al., 2015). Neutrophile Granulozyten und Makrophagen sind hierbei für die Entfernung von toten Zellen und Matrixbestandteilen verantwortlich. Außerdem sezernieren sie Zytokine und Wachstumsfaktoren, was zu einer Ausprägung eines stark vaskularisierten Granulationsgewebes führt (Epelman et al., 2015, Frieler & Mortensen, 2015). Pro-inflammatorische Mediatoren induzieren zusätzlich die Reexpression von fötalen Genen, zelluläres Wachstum, die Aktivierung von Metalloproteasen, die Proliferation von Fibroblasten und die Apoptose bzw. Hypertrophie von Kardiomyozyten, womit eine erste akute Remodellierung des Herzgewebes eingeleitet wird (Azevedo et al., 2016, Mann, 2015, Cohn et al., 2000). Die spezifischere adaptive Immunantwort, in der vor allem dendritische Zellen und regulatorische T- und B-Zellen eine wichtige Rolle spielen, bewirkt darüber hinaus ein weiteres Fortschreiten des Remodelingprozesses (Mann, 2015).

Diese initiale Entzündungsphase, die ca. 1-3 Tage andauert, wird gefolgt von einer Proliferationsphase, die durch die Apoptose von Immunzellen und die Proliferation, Migration und Transdifferenzierung von Fibroblasten zu kontraktilen Myofibroblasten unter dem Einfluss von *transforming growth factor beta* (TGF-β) gekennzeichnet ist (Talman & Ruskoaho, 2016).

Während der darauffolgenden Reifungsphase proliferieren bzw. maturieren Myofibroblasten und Endothelzellen, was in einer reparativen Myokardfibrose und Angiogenese endet (Epelman et al., 2015). Anti-inflammatorische Zytokine und profibrotische Faktoren, wie zum Beispiel TGF-β, sind hierbei von großer Bedeutung (Ma et al., 2017, Frieler & Mortensen, 2015). Die Fibrose dient hierbei der akuten Stabilisierung des ischämischen bzw. bereits nekrotischen Myokards. Die zelluläre

Umstrukturierung der Ventrikelwand gewährleistet eine Aufrechterhaltung der Pumpfunktion, jedoch ist diese auch mit einem signifikant erhöhten Volumen des linken Ventrikels verbunden (Cohn et al., 2000).

Beim kardialen Remodeling handelt es sich also um ein hochkomplexes Zusammenspiel aus unterschiedlichsten Prozessen, die bis zum heutigen Tag noch nicht vollständig erforscht und verstanden sind. Aufgrund ihrer besonderen Beteiligung an der Narbenbildung bzw. Fibrosierung des Herzgewebes nach einem Herzinfarkt soll im Folgenden die Funktion von Immunzellen, insbesondere der Makrophagen, sowie von Fibroblasten näher erläutert werden.

1.1.1 Funktion von Immunzellen nach einem Myokardinfarkt

Residente und rekrutierte Immunzellen reagieren schon vor der Hypertrophie und dem Remodeling auf eine Schädigung des Herzgewebes und persistieren während des gesamten Reparationsmechanismus im Interstitium des Myokards. Sie koordinieren das Verhalten von Kardiomyozyten- und Nicht-Kardiomyozyten während und nach einem Herzinfarkt. Nicht nur die Funktion des Muskelgewebes ist unmittelbar von Immunzellen abhängig, sondern auch die Narbenbildung und interstitielle Fibrose, welche die Herzfunktion beeinflussen (Frieler & Mortensen, 2015).

In Säugetierherzen wird sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem, bei einer Gewebeverletzung infolge einer Infektion, Ischämie oder einer hämodynamischen Überlastung aktiviert. Residente kardiale Immunzellen erkennen mithilfe ihrer Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors* (PRRs)) pathogenassoziierte molekulare Muster (*pathogen associated molecular patterns* (PAMPs)) oder schädigungsassoziierte molekulare Muster (*damage associated molecular patterns* (DAMPs)) und werden auf diese Weise stimuliert (Epelman et al., 2015). Mittlerweile ist bekannt, dass kardiale PRRs auch Bestandteile erkennen, die von sterbenden oder verletzten Myokardzellen freigesetzt werden. Die apoptotischen oder nekrotisierenden Zellen setzen ihren zytosolischen Inhalt in den Extrazellularraum frei, wodurch eine zügige Entzündungsreaktion durch extra- und intrazelluläre PRRs ausgelöst wird (Sangiuliano et al., 2014). Der zeitliche Verlauf dieser Entzündungsreaktion ist unabhängig von der spezifischen Ursache der Gewebe- bzw. Zellverletzung und bemerkenswert konsistent. Hierbei erfolgt innerhalb der ersten 24 Stunden eine schnelle Einwanderung von Neutrophilen und anschließend auch Monozyten/Makrophagen in das verletzte Gewebe (Epelman et al., 2015). Während der ersten Tage koordinieren die in dem Infarktgebiet befindlichen Makrophagen den

Entzündungsprozess, Proteolyse, Phagozytose, Angiogenese und Kollagendeposition im Granulationsgewebe. Nach zwei bis drei Wochen nimmt die Zahl der Makrophagen stark ab und es entwickelt sich eine Narbe (Nahrendorf et al., 2007). Diese Entzündungsreaktion wird als "sterile Entzündung" bezeichnet, sofern die Entzündung nach einer Gewebeverletzung in Abwesenheit eines bekannten Pathogens auftritt (Epelman et al., 2015).

1.1.2 Makrophagen

Makrophagen stellen eine wichtige Immunzellpopulation für die Vermittlung und Modulation des Remodelingprozesses dar. Sie sind spezialisierte mononukleäre Phagozyten, die sich schon in der frühen Embryonalentwicklung in allen Geweben befinden (Epelman et al., 2014). Sie bleiben dem Gewebe hauptsächlich durch Selbsterneuerung und nicht durch Monozytenrekrutierung aus der Zirkulation erhalten (Hashimoto et al., 2013). Bei entzündlichen Prozessen oder einer Gewebeschädigung geben apoptotische Gewebeneutrophile chemotaktische Signale ab, welche Monozyten aus dem Blut und Makrophagen innerhalb des Gewebes anziehen (Soehnlein et al., 2009). Die Gewebemakrophagen sind nun in der Lage, die Neutrophilenpopulation mittels Phagozytose zu regulieren. Hierbei verringern die Makrophagen außerdem ihre Sekretion von IL-23, wodurch der Spiegel des pro-inflammatorischen Zytokins IL-17a sinkt und infolgedessen weniger Neutrophile im Knochenmark gebildet werden (Aggarwal et al., 2003, Stark et al., 2005). Neben der Senkung von IL-23 steigern Makrophagen, die Neutrophile phagozytiert haben, darüber hinaus ihre Produktion an anti-inflammatorischen Zytokinen (Fadok et al., 1998). Die Phagozytose von Neutrophilen und anderen nekrotischen Elementen durch residente oder rekrutierte Makrophagen spielt daher eine wichtige Rolle während der Entzündungshemmung und Wundheilung und wurde erstmals im späten 19. Jahrhundert durch Ilya Metchnikoff in primitiven Organismen beschrieben. (Nahrendorf et al., 2007, Metchnikoff, 1880). Hierbei ist noch unklar, zu welchen Anteilen embryonal abgeleitete residente Makrophagen bzw. rekrutierte Monozyten/Makrophagen für die Aufrechterhaltung der Gewebehomöostase im Herzen verantwortlich sind (Epelman et al., 2015).

Ein Verlust der Makrophagenpopulation aufgrund eines Mangels an Transkriptions- oder Wachstumsfaktoren führt zu einer erhöhten Mortalität und Wachstumsstörungen (McKercher et al., 1996, Wiktor-Jedrzejczak et al., 1990). Außerdem führt dies zu Anomalien, die sich auf den Umbau und das Wachstum komplexer vaskulärer und neuronaler Netzwerke auswirken (Nucera et al., 2011, Arnold & Betsholtz, 2013). Neben

der wachstumsfördernden Funktion haben Makrophagen auch eine wichtige und allgemeinere Rolle bei der Beseitigung seneszierender Zellen während der Embryonalentwicklung (Munoz-Espin et al., 2013, Storer et al., 2013). Verursacht man eine nicht-selektive Depletion aller Makrophagen, führt dies in primitiven Organismen und jungen Säugetieren zu einer Beeinträchtigung des Gewebewachstums und ihrer Fähigkeit zur Regeneration (Aurora et al., 2014). Neben ihren regenerativen Funktionen können sie auch pathologische Prozesse vermitteln. Eine übermäßige Makrophagenexpansion während einer ischämischen Verletzung beeinträchtigt zum Beispiel die Heilung des Gewebes (Panizzi et al., 2010). Zusammengenommen legen diese Erkenntnisse nahe, dass Makrophagen evolutionär konservierte Funktionen besitzen, die das Gewebewachstum sowohl während der Homöostase als auch nach einer Verletzung unterstützen (Tauber, 2003). Auch die Wechselwirkungen zwischen Immunzellen und anderen Nicht-Kardiomyozyten spielen im Regenerationsprozess eine wichtige Rolle und geben der Immunreaktion in Folge einer Herzschädigung eine besondere Komplexität (Epelman et al., 2015).

1.1.3 Fibroblasten

Undifferenzierte Fibroblasten im gesunden Herzen

Während der Embryonalentwicklung des Herzens durchlaufen einige Epithelzellen des Epikards den sogenannten epithelialen-mesenchymalen-Übergang (*epithelial-mesenchymal-transition (EMT)*). Die hieraus entstandenen Epikard-abgeleiteten Zellen (*epicardium derived cells (EPDC's)*) gelangen über das Subepikardium ins Myokard und differenzieren daraufhin zu unterschiedlichen Zelltypen. Hierzu gehören Fibroblasten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Kardiomyozyten (Smits et al., 2018). Der Großteil der kardialen Fibroblasten findet seinen Ursprung in epikardialen Zellen, die Minderheit entwickelt sich aus Endothelzellen (Ali et al., 2014, Cai et al., 2008). Von allen kardialen Zellen machen Fibroblasten nach Endothelzellen (~ 45 %) und Kardiomyozyten (~ 30 %) mit ca. 11 % die dritthäufigste Zellpopulation aus. Von allen Nicht-Kardiomyozyten stellen sie eine Population von weniger als 20 % dar (Pinto et al., 2016).

In einem unbelasteten adulten Herzen werden alte und apoptotische Fibroblasten durch proliferierende, bereits im Gewebe vorhandene residente Fibroblasten ausgetauscht (Ma et al., 2017). Als dünne Stränge liegen sie zwischen den Herzmuskelzellen und regulieren die Bildung von extrazellulärer Matrix (EZM). Auf diese Weise wird die strukturelle Integrität des Herzens gewährleistet (Talman & Ruskoaho, 2016). Die EZM

ist außerdem essenziell für die mechanische, elektrische und chemische Signaltransduktion während der Entwicklung, Alterung und Umgestaltung des Herzgewebes. Sie reguliert mehrere Zellfunktionen, einschließlich Überleben, Proliferation, Migration, Adhäsion, Differenzierung und Genexpression (Bowers et al., 2010). Fibroblasten sind in inaktiver Form als Fibrozyten im Herzgewebe vorhanden und exprimieren unter anderem das Filamentprotein Vimentin, welches häufig als Marker für Fibroblasten in unterschiedliche Analysemethoden wie der Durchflusszytometrie oder immunhistochemischen Färbung Verwendung findet (Ma et al., 2017, Lüllmann-Rauch, 2009).

Differenzierung zu Myofibroblasten und ihre Funktion im Infarktherzen

Durch den Verlust der Gewebeintegrität während bzw. nach einem Myokardinfarkt sind kardiale Fibroblasten mechanischem Stress ausgesetzt. Dies führt, zusammen mit der Ausschüttung von Hormonen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen durch inflammatorische Zellen wie Mastzellen, Makrophagen und Neutrophilen, zur Induktion einer Fibroblastenproliferation, einer Migration von Fibroblasten in das geschädigte Gewebe sowie deren Transdifferenzierung zu kontraktilen, EZM-produzierenden Myofibroblasten (Hinz, 2016, van den Borne et al., 2010). Neben residenten Fibroblasten, die die Hauptquelle für Myofibroblasten darstellen, können diese außerdem aus Zellen (Fibrozyten), welche dem Knochenmark entstammen, (Haudek et al., 2006, Krenning et al., 2010) sowie aus Epithelzellen (Cai et al., 2008), Endothelzellen (Zeisberg et al., 2007), Perizyten (Diaz-Flores et al., 2009), Monozyten (Krenning et al., 2010) und glatten Muskelzellen differenzieren (Lajiness & Conway, 2014). Im gesunden Myokard befinden sich keine Myofibroblasten (Talman & Ruskoaho, 2016).

Myofibroblasten weisen Charakteristika sowohl von Fibroblasten als auch von glatten Muskelzellen auf. Sie exprimieren neben Vimentin nämlich auch das kontraktile *α-smooth muscle actin* (α-SMA), wodurch sie im Stande sind, im Gewebe zu migrieren und Wundränder für eine schnellere Wundheilung aktiv aneinander zu bringen (Talman & Ruskoaho, 2016). Im Falle eines Herzinfarktes wirkt deren Fähigkeit zur Kontraktion einer möglichen Dilatation der Narbe, aber auch einer Dilatation des gesamten Ventrikels, entgegen (van den Borne et al., 2010, Shinde et al., 2017). α-SMA kann als Myofibroblastenmarker eingesetzt werden, allerdings ist zu beachten, dass auch glatte Muskelzellen und Perizyten α-SMA exprimieren (Zeisberg & Kalluri, 2010, Ma et al., 2012). Zusätzlich exprimieren Myofibroblasten hohe Mengen an Kollagen III und Kollagen I, Fibronektin, Laminin und dem matrizellulären Protein Periostin (van den Borne et al., 2010, Ma et al., 2012). Diese Komponenten der EZM sorgen für die

Stabilisierung des Gewebes, die es benötigt, um die ischämisch bedingte Zellnekrose und daher Schwächung des Zellverbandes zu kompensieren. Außerdem sind sie elementar für die Kommunikation zwischen kardialen Fibroblasten und anderen Zelltypen, wie Kardiomyozyten oder Endothelzellen (Frangogiannis, 2012). Die strukturelle Veränderung des Myokards nach einem Herzinfarkt führt zu veränderten mechanischen Belastungen während des Herzzyklus, wodurch es auch im Remote-Gebiet zur Deposition von EZM durch (Myo-) Fibroblasten kommen kann. Dies kann zu einer Versteifung des Herzmuskelgewebes führen und Grundlage für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz darstellen (van den Borne et al., 2010).

TGF-β-vermittelte Fibroblastendifferenzierung

Einer der bestbeschriebenen Stimulatoren der Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten ist der *transforming growth factor* (TGF) - *β* (Humeres et al., 2016, Baranyi et al., 2019, Phan, 2008, Hung et al., 2013). Es handelt sich hierbei um ein multifunktionales Peptid, das in den meisten Geweben in inaktiver Form vorkommt. Viele biologische Prozesse wie die Embryonalentwicklung, Zellwachstum und -differenzierung, Zellproliferation, Apoptose, Matrixdeposition und Immunantwort können durch dieses Zytokin reguliert werden (Bujak & Frangogiannis, 2007). In Folge eines Herzinfarktes wird TGF-β von Immunzellen und residenten Fibroblasten ausgeschüttet, woraufhin es die Kardiomyozyten- und Nicht-Kardiomyozytenfunktion moduliert und eine Kardiomyozytenhypertrophie fördert. Außerdem induziert es die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, welche wiederum eine Fibrose nach sich zieht (Bujak & Frangogiannis, 2007, Frieler & Mortensen, 2015).

Ein wichtiger Signalweg in der Fibroblastendifferenzierung stellt der kanonische TGF-β-assoziierte SMAD-Signalweg dar (Phan, 2008). Hierbei wird die Signalübertragung durch die Stimulation des Heterodimers aus TGF-βR1/ALK5 und TGF-βR2 mittels TGF-β vermittelt (Lighthouse & Small, 2016). Das intrazelluläre SMAD2/3-Protein wird hierbei phosphoryliert und aktiviert, woraufhin es mit SMAD4 interagiert und schließlich während der sogenannten Kernlokalisierung in den Zellkern eingeschleust wird. Dort bindet der Proteinkomplex an SMAD-Bindungselemente und aktiviert diese in den Promotoren der Zielgene (Zawel et al., 1998, Massague et al., 2005). Zu diesen Zielgenen gehören Col1a, ACTA2 und Tagln, die für Kollagen Typ alpha I, α-SMA und Transgelin codieren (Lighthouse & Small, 2016). Die inhibitorischen SMADs 6/7 oder der *Kruppel-like transcription factor* KLF15 verhindern die SMAD2/3/4-Akkumulation, wodurch die Zielgene nicht exprimiert werden können (Derynck, 1998, Imamura et al., 1997, Wang et al., 2008). Im Gegensatz hierzu induziert Angiotensin II die Expression

von KLF5, welches anschließend die Expression von TGF-β einleitet und somit die Signalvermittlung über den kanonischen TGF-β-Signaltransduktionsweg stimuliert (Shindo et al., 2002). Kardiale Fibroblasten, die aus SMAD3-defizienten Tieren isoliert wurden, sekretieren weniger Kollagen und weisen weniger ACTA2-positive Stressfasern im Vergleich zu Fibroblasten aus Kontrolltieren auf (Dobaczewski et al., 2010). Darüber hinaus schwächt der Verlust von SMAD3 das fibrotische Remodeling im Infarktmodel bei Mäusen ab (Bujak et al., 2007). Der Differenzierungsprozess von Fibroblasten kann allerdings nicht gänzlich über den SMAD-Signalweg unterdrückt werden, da die TGF-β-Aktivität neben dem kanonischen Signalweg auch über den nicht-kanonischen, p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Signalweg, welcher SMAD unabhängig ist, vermittelt werden kann (Derynck & Zhang, 2003, Molkentin et al., 2017).

p38 MAPK-vermittelte Fibroblastendifferenzierung

Der p38 MAPK Signalweg wird auch ohne exogene Gabe durch TGF-β reguliert, da dieses Zytokin ebenfalls endogen sezerniert wird und eine parakrine und autokrine Wirkung aufweist (Derynck & Zhang, 2003). Hierbei stimuliert der aktivierte Transmembranrezeptor den TGF-β-aktivierte Kinase / MAPK/Erk Kinase 1 – Komplex (TAK1/MEKK1). Dieser Komplex kann wiederum andere Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) aktivieren, einschließlich *extracellular-signal regulated kinases* (ERK) 1/2, c-Jun-N-terminale Kinasen (JNK) über MKK4 und p38 (MAPK14) über MKK3/6 (Bakin et al., 2002, Derynck & Zhang, 2003). Insbesondere TAK1 und p38α sind durch die Induktion der Kollagen- und α-SMA-Expression an der Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten beteiligt (Talman & Ruskoaho, 2016, Molkentin et al., 2017). Der Stellenwert dieses nicht-kanonischen Signalwegs im Vergleich zum kanonischen Signalweg im Hinblick auf die Fibroblastendifferenzierung ist noch nicht eindeutig erforscht (Frangogiannis, 2014). Da beide Signalwege miteinander interagieren, ist es nicht möglich, durch Inhibition einer der beiden Pathways die Fibroblastendifferenzierung vollständig zu unterdrücken (Molkentin et al., 2017, Engel et al., 1999).

1.1.4 Klinische Konsequenzen einer Myokardfibrose

(Myo-) Fibroblasten nehmen eine wichtige Rolle im Remodelingprozess nach einem Herzinfarkt ein und tragen so zum Funktionserhalt des Myokards bei. Allerdings birgt sowohl eine unzureichende als auch eine übermäßige Fibrosierung des Myokards eine Gefahr für das Herz und den gesamten Organismus. Im Falle einer unzureichenden Narbenbildung besteht die Gefahr einer Dilatation des Ventrikels und einer sich hieraus entwickelnden systolischen Herzinsuffizienz. Zudem könnte die Ventrikelwand rupturieren, was einen plötzlichen Tod nach sich ziehen kann. Dahingegen kann eine übermäßige Fibrose eine Versteifung bzw. beeinträchtigte Nachgiebigkeit (Compliance) des Herzens bewirken, was sowohl eine diastolische als auch eine systolische Herzinsuffizienz hervorrufen könnte. Außerdem entsteht durch das gebildete Substrat in Form einer Narbe im Herzmuskel eine mögliche Quelle für teils letale Herzrhythmusstörungen, wie z. B. einer Reentry-Tachykardie oder Kammerflimmern (Azevedo et al., 2016). Das Maß der Fibrosierung ist ein Prädiktor für die Mortalität bei Patienten mit Herzfunktionsstörungen (Aoki et al., 2011).

1.2 Der insulinähnliche Wachstumsfaktor 1 (IGF-1)

Ein möglicher therapeutischer Ansatz zur Verbesserung der Herzfunktion nach einem Myokardinfarkt ist die Unterdrückung pathologischer Remodelingprozesse, welche die Entstehung einer Herzinsuffizienz vorantreiben. Ein möglicher Kandidat ist der insulinähnliche Wachstumsfaktor 1 (IGF-1), für den in früheren Studien kardioprotektive Effekte beschrieben wurden (Troncoso et al., 2014). Im Mausmodell führte eine dreitägige subkutane Behandlung mit IGF-1 nach einem Myokardinfarkt im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zu einer verbesserten kardialen Pumpfunktion und einer reduzierten Größe der Infarktnarbe (Heinen et al., 2019).

IGF-1 ist ein pleiotropes wachstumsförderndes Peptid, das bei Stimulation durch das Wachstumshormon (*growth hormone* (GH)) hauptsächlich in der Leber produziert wird (Schmid, 1995). Es hat eine Masse von 7,6 kDa, besteht aus 70 Aminosäuren und ist zu 50 % homolog mit Insulin (Troncoso et al., 2014, Conti et al., 2011). Auch andere Gewebe, wie z. B. das Myokard und das Endothel, exprimieren neben dem IGF-1-Rezeptor auch den insulinähnlichen Wachstumsfaktor selbst. Er wirkt daher sowohl parakrin als auch autokrin (Le Roith et al., 2001). IGF-1 ist ein Hauptregulator des postnatalen, somatischen Wachstums und vermittelt viele der Wirkungen des Wachstumshormons (GH). Bei gesunden Erwachsenen im Alter von 40 Jahren liegt der zirkulierende IGF-1-Spiegel bei ca. 68-226 ng/ml (Higashi et al., 2019). Nach der

Freisetzung in den Kreislauf wird IGF-1 an spezifische IGF-Bindungsproteine (IGFBPs) gebunden (Palmen et al., 2001). Dieser Komplex hindert IGF-1 entweder daran, an den Insulinrezeptor zu binden oder er moduliert die IGF-1-Bindung an den IGF-1-Rezeptor (IGF1R) (Allard & Duan, 2018). Der IGF1R wird unter anderem in Endothelzellen, Makrophagen und glatten Muskelzellen exprimiert (Higashi et al., 2019).

Die durch IGF-1 induzierte Signalübertragung hat vaskuläre und kardioprotektive Wirkungen (Troncoso et al., 2014). Dabei verursacht IGF-1 hauptsächlich über den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K) -Pfad im Gefäßsystem mehrere endotheliale Schutzmechanismen (Conti et al., 2011). Dazu gehören eine Vasodilatation durch Stimulierung der Stickstoffmonoxidproduktion (Izhar et al., 2000), Plaquestabilisierung (von der Thusen et al., 2011), sowie anti-apoptotische (Li et al., 2003), blutplättchenhemmende (Conti et al., 2011) und entzündungshemmende Effekte (Spies et al., 2001). Neben diesen gefäßprotektiven Wirkungen hat IGF-1 auch diverse Effekte auf Kardiomyozyten unter physiologischen und pathologischen Bedingungen: Es erhöht ihre Kontraktilität durch eine gesteigerte intrazelluläre Bereitstellung von Kalzium und Expression von kontraktilen Proteinen (Freestone et al., 1996, Castellano et al., 2009), reguliert den Stoffwechsel (Castellano et al., 2009), erhöht die Proteinsynthese (Bell & McDermott, 2000), fördert die Hypertrophie in Geweben mit hohem Energiebedarf (Duerr et al., 1995), verhindert kardiale Autophagie (Troncoso et al., 2012) und hemmt die Apoptose (Saetrum Opgaard & Wang, 2005). In Verbindung mit mehreren anderen wachstumsfördernden Peptiden wie VEGF und FGF-1/2 stimuliert IGF-1 außerdem die Angiogenese (Palmen et al., 2001, Kluge et al., 1995).

Erhöhte IGF-1-Spiegel, verursacht durch eine gesteigerte lokale Expression oder nach exogener Verabreichung, verbessern die Herzleistung sowohl im gesunden als auch im infarzierten Herzen (Palmen et al., 2001). Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass IGF-1 indirekte Auswirkungen auf das Herz-Kreislauf-System hat, indem es die Insulinsensitivität erhöht (Sesti et al., 2005, Yakar et al., 2001). Auch bei einer Herzinsuffizienz im Tiermodell verbessert die therapeutische Verabreichung von GH und IGF-1 die Herzleistung (Cittadini et al., 1997, Duerr et al., 1995, Yang et al., 1995). Ein verringerter IGF-1-Spiegel ist dahingegen mit einem erhöhten Risiko auf die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert (Ungvari & Csiszar, 2012). Diese Erkenntnis konnte auch in einer aktuellen Humanstudie bestätigt werden (Obradovic et al., 2019). Große klinische Studien, welche die kardioprotektiven Effekte einer IGF-1-Behandlung nach einem Herzinfarkt oder während der Entstehung einer Herzinsuffizienz im Menschen untersuchen, wurden bisher noch nicht ausgeführt.

Einfluss von IGF-1 auf die Narbenbildung

In einem Mausmodell, in dem das Propeptid IGF1-Ea herzspezifisch überexprimiert wurde, konnte nach einer dauerhaften Okklusion der *left anterior descending* (LAD) Arterie eine Reduktion der Narbengröße nachgewiesen werden (Santini et al., 2007). Da eine chronische Überexpression im Herzen im klinischen Alltag keine realisierbare therapeutische Maßnahme darstellt, hat unsere Arbeitsgruppe den Effekt einer dreitägigen exogenen Behandlung mittels IGF-1 auf den Remodelingprozess nach einem Myokardinfarkt an Mäusen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Narbengröße durch die Gabe von IGF-1 nach einer Woche um 37 % verringert wurde im Vergleich zu Kontrollherzen, die mit BSA behandelt wurden (Heinen et al., 2019). Da Fibroblasten maßgeblich an der Narbenbildung als Folge einer Gewebeschädigung beteiligt sind, lässt dies vermuten, dass die Behandlung eines Herzinfarktes mittels IGF-1 mit einer Veränderung der Fibroblastenaktivierung und somit einer Modulation des Remodelingprozesses einhergeht. Daher wird in dieser Arbeit der direkte Effekt von IGF-1 auf die Fibroblastendifferenzierung und Narbenbildung untersucht. Ein möglicher indirekter Effekt von IGF-1 könnte auf einer Monozyten- bzw. Makrophagen-vermittelten Modulation der Entzündungsreaktion beruhen, denn Heinen et al. haben zum einen gezeigt, dass der protektive IGF-1-Effekt über myeloide Zellen vermittelt wird, und zum anderen, dass Makrophagen *in vitro* unter dem Einfluss von IGF-1 einen anti-inflammatorischen (M2-artigen) Phänotyp ausprägen (Heinen et al., 2019). Da Immunzellen neben Fibroblasten ebenfalls eine wesentliche Rolle im Remodelingprozess einnehmen, könnte dieser Polarisierungsmechanismus eine bedeutende Wirkung auf die Fibroblastendifferenzierung haben.

1.3 Ziele der Arbeit

Auf Grundlage unserer Vorarbeiten, dass IGF-1 eine Verringerung der Narbengröße im Herzen einer Maus sieben Tage nach der Induktion eines Herzinfarktes bewirkt (Heinen et al., 2019), stellen sich folgende Fragen:

- Gibt es einen direkten Einfluss von IGF-1 auf das Differenzierungsverhalten muriner kardialer Fibroblasten *in vitro* und/oder *in vivo*?
- Gibt es einen indirekten, Makrophagen-vermittelten Einfluss von IGF-1 auf das Differenzierungsverhalten muriner kardialer Fibroblasten *in vitro*?

Hierzu soll im Rahmen dieser Arbeit zunächst eine Methode zur Isolierung und Kultivierung von murinen kardialen Fibroblasten aus adulten Mäusen etabliert werden.

Zusätzlich ist es erforderlich, Methoden zur Charakterisierung dieser Zellpopulation zu etablieren, da eine Unterscheidung zwischen undifferenzierten Fibroblasten und differenzierten Myofibroblasten zur Beantwortung der Fragen notwendig ist. Dies soll auf Proteinniveau mithilfe der Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell scanning* (FACS-Analyse)) und auf Genniveau mithilfe der *realtime-Polymerase Chainreaction* (q-PCR) bewerkstelligt werden. Um einen visuellen Eindruck des Differenzierungsverhaltens der Fibroblasten *in vitro* und innerhalb des Infarktherzens *in vivo* zu erhalten, sollen außerdem immunhistochemische Färbungen von kultivierten Zellen bzw. Kryostatschnitten durchgeführt werden. Im Anschluss an die Methodenetablierungen zur Isolierung und Charakterisierung der Zielpopulation gilt es zunächst *in vitro* zu untersuchen, ob IGF-1 einen direkten Einfluss auf die Fibroblastendifferenzierung hat. In diesem Zellkulturmodell soll außerdem der Effekt von Überständen IGF-1-polarisierter Makrophagen auf die Differenzierung von Fibroblasten untersucht werden. Schlussendlich sollen die *in-vitro*-Ergebnisse auch *in vivo* mithilfe des Infarktmodells verifiziert werden. Die immunhistochemische Färbung von Kryostatschnitten von Infarktherzen soll dabei Aufschluss über die Lokalisation von (Myo-) Fibroblasten innerhalb des Myokards geben.

2 Material und Methoden

2.1 Laborgeräte und Zubehör

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte und Zubehör

Laborgerät	Hersteller (Land): Produktbezeichnung
Deckgläschen	Marienfeld Superior (Deutschland): High Precision, Ø12mm, No. 1.5H
Eismaschine	Ziegra (Deutschland): ZBE 70-35
Eppendorf-Röhrchen	Eppendorf (Deutschland): Safe-Lock Tubes 2,0 ml. Protein LoBind Tubes 0,5 ml
FACS-Gerät	BD Bioscience (USA): BD FACSCanto II
FACS-Röhrchen	Falcon, a Corning Brand (USA): 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube 12x75 mm style
Falcons	Greiner Bio-One (Österreich): Cellstar Tubes 15 ml & 50 ml
Gewebeschneider	Cavey Laboratory Engineering Co. Ltd. (Großbritannien): McIlwain Tissue Chopper
Inkubator	Biometra (Deutschland): OV3 Thermo Scientific (USA): Heracell VIOS 250i CO2 Incubator
Kühl- bzw. Gefrierschränke	Liebherr (Schweiz): GNP 3056 Premium NoFrost (-20 °C) Liebherr (Schweiz): ProfiLine GKv 4310 (4 °C) Thermo Scientific (USA): Revco UxF 40086V (-80 °C)
Magnetrührer	IKA (Deutschland): IKAMAG RCT
Mikroreaktionsplatte	Life Technologies (USA): MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate (0.1 mL)
Mikroskope	Keyence (Japan): BZ-9000 Zeiss (Deutschland): Axiovert35 + AxioCam MRc, ID 03
Objektträger	Marienfeld Superior (Deutschland): ~76x26x1 mm Objektträger
Parafilm	Bemis Company (USA): Parafilm „M“
PCR-Cycler	Eppendorf (Deutschland): Mastercycler nexus gradient
PCR-Maschine	Applied Biosystems (USA): StepOnePlus Real-Time PCR System
Pipetten	Gilson (USA): PIPETMAN Classic P10-P1000 (1µl-1000µl)
Pipettierhilfe	Hirschmann (Deutschland): Pipetus
Präzisionswaagen	Kern (Deutschland): PCB1000-2 Sartorius (Deutschland): BP 121 S

Schüttler	Edmund Bühler (Deutschland): Kombischüttler KL-2 Eppendorf (Deutschland): Thermomixer comfort
Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific (USA): Safe 2020 1.8
Spektralphotometer	PEQLAB (Deutschland): ND-1000 Spectrophotometer
Vortexer	Heidolph (Deutschland): Reax top Scientific Industries (Großbritannien): Vortexer-Genie 2
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH (Deutschland): Schüttelwasserbad 1083
Zählkammer	Labor Optik (Großbritannien): Neubauer Zählkammer
Zellkulturschalen	TPP (Schweiz): Zellkulturschale 100 (60,1 cm^2) TPP (Schweiz): Zellkulturschale 40 (9,2 cm^2)
Zellkultur Titerplatten	Greiner Bio-One (Österreich): Cellstar Cell Culture Multiwell Plates (6 Kalotten) TPP (Schweiz): Zellkultur Testplatte (24 Kalotten)
Zentrifugen	Eppendorf (Deutschland): Centrifuge 5402 Heraeus Instruments (Belgien): Biofuge fresco, Megafuge 1 Roth (Deutschland): Rotilabo-Mini-Zentrifuge Uni-fuge VWR (USA): Mega Star 1.6R VWR (USA): PCR Plate Spinner

2.2 Softwareprogramme

Tabelle 2: Verwendete Softwareprogramme

Softwareprogramm	Hersteller
BD FACSDiva	BD Biosciences
BZ-II-Analyzer	Keyence Japan
Excel 2016	Microsoft Corporation
GraphPad PRISM 6	GraphPad Software, Inc.
ImageJ-win64	Wayne Rasband (NIH)
NanoDrop 1000 Operating Software (2017)	Thermo Fisher Scientific
PowerPoint 2016	Microsoft Corporation
StepOne Software v2.3	Life Technologies

2.3 Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Albumin Fraction V (pH 7,0)	PanReac AppliChem
Calciumchlorid	Merck
Chloroform	Merck
DAPI Fluoromount – G	SouthernBiotech
EDTA	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat (Dihydrat)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Ethanol (ROTIPURAN)	Roth
Fetal Bovine Serum	Thermo Fisher Scientific
Guanidiniumthiocyanat (TRIzol Reagent)	Life Technologies
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumchlorid	VWR Chemicals
Normal Goat Serum	Vector Laboratories
Paraformaldehyd	Aldrich Chemistry
RNase-Free Water	Quiagen
Saponin	Roth
Triton	SIGMA

2.4 Puffersysteme und weitere Lösungen

Tabelle 4: Verwendete Puffersysteme und weitere Lösungen mit entsprechender Zusammensetzung

Puffersystem	Zusammensetzung
Assay-Medium	DMEM, 10 % FBS, 1 % GlutaMax, 1 % Pen/Strep
Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose (DMEM)	4500 mg/L Glukose, Natrium, Pyruvat und Natrium-bicarbonat, ohne L-Glutamin
FACS-Puffer	PBS (pH 7,5) 2 mM EDTA 0,5 % BSA

High-FBS-Medium	DMEM, 20 % FBS, 1 % GlutaMAX, 1 % Pen/Strep
Low-FBS-Medium	DMEM, 1 % FBS, 1 % GlutaMAX, 1 % Pen/Strep
PBS (pH 7,5)	2,7 mM Kaliumchlorid (KCl) 2 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) 137 mM NaCl 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)
PBS (++) (sterilisiert)	PBS (pH 7,5), 1 % Pen/Strep, 2 µM $CaCl_2$
S-EDTA	0,7 mM EDTA 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8 mM Na_2HPO_4 1,5 mM KH_2PO_4
Verdauungspuffer	PBS (++), 1 U/ml Collagenase NB 8 Broad Range

2.5 Kits

Tabelle 5: Verwendete kommerziell erhältliche Kits

Kit	Hersteller
Fix & Perm Cell Permeabilization Kit	Thermo Fisher Scientific
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x)	Thermo Scientific
qPCR-Blue- CYBR-Master-Mix-High-ROX	primaQUANT
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen

2.6 Spezifische Reagenzien in der Zellkultur

Tabelle 6: In der Zellkultur verwendete spezifische Reagenzien

Reagenzien in der Zellkultur	Artikel#	Hersteller
Collagenase NB 8 Broad Range	S1745601	Nordmark Biochemicals
Collagenase Type I (265 U/mg)	LS004197	Worthington Biochemical
DNase I	10104159001	Roche Diagnostics GmbH
GlutaMax-I	35050-038	Life Technologies
Human Insuline-like Growth Factor 1	130-093-887	Miltenyi Biotech
Lipopolysaccharid	L2630	SIGMA
Murine Interferon gamma	315-05	SIGMA
p38 MAPK Inhibitor (SB 203580)	559389	EMD Millipore Corporation
Penicillin Streptomycin	15140122	Life Technologies

Recombinant Human Interleukin-4	200-04	PeproTech
Recombinant Human Transforming Growth Factor-β1 (HEK293 derived)	100-21	PEPROTECH
Trypsin-EDTA Solution	T3924	Sigma-Aldrich

2.7 Antikörper

Tabelle 7: Für immunhistochemische Färbungen verwendete Antikörper

Antikörper – Farbe	Klon	Verdünnung	Artikel#	Hersteller
Anti-alpha smooth muscle Actin antibody – Alexa Fluor 594	1A4	1:100	ab202368	Abcam
Vimentin XP Rabbit mAb – Alexa Fluor 488	D21H3	1:100	9854	Cell Signaling Technology

Tabelle 8: Für durchflusszytometrische Analysen verwendete Antikörper

Antikörper – Farbe	Klon	Verdünnung	Artikel#	Hersteller
Anti-Alpha-Smooth Muscle Actin – Alexa Fluor 488	1A4	1:100	53-9760-82	Invitrogen, eBioscince™
Anti-Feeder – PE, mouse (MEFSK4)	RMV-7	1:100	130-120-166	Mitenyi Biotec
CD16/32 Purified anti-mouse (Rat IgG2a λ)	93	1:20	B264872	BioLegend®
CD31 anti mouse (Rat IgG2a κ) – PerCP/Cy5.5	390	1:100	102420	Biolegend®
CD45 Rat Anti-Mouse – BV510	30-F11	1:100	563891	BD Biosciences
Donkey anti-rabbit IgG – Alexa Fluor 647	Poly4064	1:1000	406414	Biolegend®
Fixable Viability Dye – eFluor 780		1:1000	60-0865-14	Invitrogen
Vimentin XP Rabbit mAb – Alexa Fluor 647	D21H3	1:200	9856S	Cell Signaling Technology

Vimentin XP Rabbit mAb (unconjugated)	D21H3	1:50	5741S	Cell Signaling Technology

2.8 Primer

Tabelle 9: Verwendete Primer für quantitative Polymerase-Kettenreaktionen

Primer	Sequenz (5‘ – 3‘)	Hersteller
β-Actin – Forward	GATGTATGAAGGCTTTGGTC	Sigma-Aldrich
β-Actin – Reverse	TGTGCACTTTTATTGGTCTC	Sigma-Aldrich
ACTA2 – Forward	CATCTTTCATTGGGATGGAG	Sigma-Aldrich
ACTA2 – Reverse	TTAGCATAGAGATCCTTCCTG	Sigma-Aldrich
POSTN – Forward	CCATTAACGAATCAAGATGG	Sigma-Aldrich
POSTN – Reverse	AACTTGTTTGGCAGAATCAG	Sigma-Aldrich

2.9 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Softwareprogramms GraphPad PRISM 6 (GraphPad PRISM Software, Inc.). Innerhalb jeder Gruppe stellt jeder Datenpunkt ein biologisches Replikat dar. Die Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Ein ungepaarter t-Test wurde verwendet, um die unterschiedlichen Behandlungskonditionen miteinander zu vergleichen. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert.

2.10 Mäuse

Im Rahmen der Versuche wurden drei bis vier Monate alte männliche C57BL/6J Mäuse verwendet. Die Tiere wurden in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bei 20 – 22 °C und einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Die Organentnahme erfolgte nach der Genehmigung der ZETT (Organisationsnummer O16/04). Die Infarktversuche waren gemäß § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (LANUV) genehmigt. Die Referenznummer der Tierversuchsgenehmigung lautet: G401/17.

2.11 Organpräparation

Nach Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation wurde der Thorax eröffnet, das Herz entnommen und in *phosphate buffer saline* (PBS) (++) überführt. Nachdem die Atria samt Atrioventrikularklappen von den Ventrikeln entfernt wurden, wurde das Blut mithilfe von zwei Pinzetten sorgfältig aus den Ventrikeln massiert. Schlussendlich wurden die Herzkammern in frischem PBS (++) in der Sicherheitswerkbank mit einer Schere in ca. 1 mm große Würfel zerteilt. Die Gewebestückchen wurden zur weiteren Zellisolierung in gleichen Teilen auf zwei sterile 2 Milliliter (ml) Eppendorf-Röhrchen verteilt.

2.12 Zellkultur (allgemeine Fibroblastenkultivierung)

Nachdem die Ventrikel zerteilt und auf zwei 2 ml Eppendorf-Röhrchen verteilt wurden, wurde jeweils 1 ml frisch angesetzter Verdauungspuffer hinzugegeben. Die Röhrchen wurden für 15 Minuten bei 37 °C und 300 Umdrehungen pro Minute (*rpm*) auf einer Heiz-Misch-Platte geschüttelt, wobei die Röhrchen zusätzlich alle 5 Minuten manuell geschwenkt wurden, um das Pellet zu lösen. Der erste Überstand wurde vorsichtig aspiriert und verworfen. Zu der restlichen Gewebesuspension wurde jeweils 1 ml Verdauungspuffer hinzugegeben und erneut für 15 Minuten bei 37 °C geschüttelt. Der Überstand wurde nun in jeweils zwei neue Eppendorf-Röhrchen überführt, woraufhin jeweils 1 ml *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit 20 % *fetal bovine serum* (FBS), 1 % GlutaMAX und 1 % Penicillin/Streptomycin zu den Überständen hinzugegeben wurde, um die Kollagenaseaktivität zu stoppen. Die beiden Eppendorf-Röhrchen wurden anschließend für 5 Minuten bei 400 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets wurden im oben genannten Medium, von jetzt an High-FBS-Medium genannt, resuspendiert und auf Eis gestellt. Parallel hierzu wurden zu den zwei übrig gebliebenen Zellpellets, welche nach dem Schütteln und Aspirieren des Überstandes in den Eppendorf-Röhrchen zurückgeblieben waren, jeweils 1 ml Verdauungspuffer hinzugegeben und wieder bei 37 °C für 15 Minuten geschüttelt. Auch in diesem Schritt wurden die Röhrchen zusätzlich alle 5 Minuten manuell geschwenkt, um das Pellet besser im Verdauungspuffer zu lösen. Dieser (Verdauungs-) Vorgang wurde so lange wiederholt, bis das gesamte Gewebe gelöst war. Währenddessen wurden 5 ml High-FBS-Medium auf eine 60,1 cm^2 Petrischale gegeben und für ca. 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Schlussendlich wurde dieses Medium aspiriert und die auf Eis gestellten Zellsuspensionen auf die vorbereitete Petrischale gegeben. Diese wurde für zwei Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Aus der Literatur ist

bekannt, dass Fibroblasten innerhalb von ca. 90 Minuten an die Oberfläche der Petrischale adhärieren (Stellato et al., 2019). Die nicht-adhärenten Zellen wurden vorsichtig aspiriert und verworfen. Daraufhin wurde die Platte zweimal behutsam mit 5 ml vorgewärmtem Assay-Medium gewaschen und danach in diesem Medium (10 ml) für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert. Nach 24 Stunden erfolgte ein erneuter Mediumwechsel, nachdem die Petrischale zweimal mit 5 ml vorgewärmten Assay-Medium gespült wurde. Zu diesem Zeitpunkt lassen sich bereits vereinzelt Fibroblasten unter dem Mikroskop erkennen.

Am vierten Tag nach der Isolierung der Zellen fand ein weiterer Mediumwechsel statt. An Tag 7 wurden die Zellen, nachdem sie zweimal mit 5 ml S-EDTA gewaschen wurden, für drei bis fünf Minuten trypsinisiert und auf diese Weise von der Petrischale gelöst. Die Trypsinaktivität wurde durch das Hinzugeben von Assay-Medium gestoppt. Nach fünfminütigem Zentrifugieren bei 200 x g wurde das Pellet in 1 ml Assay-Medium resuspendiert. Mithilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl pro Milliliter ermittelt, um die Zellen im weiteren Versuchsverlauf in entsprechender Konzentration zur weiteren Kultivierung auf neue 60,1 cm^2 Petrischalen, 6- oder 24-Well-Titerplatten zu verteilen. Auf Petrischalen mit einer Fläche von 60,1 cm^2 erwiesen sich 300.000 Zellen als optimale Zellzahl zur Kultivierung über 7 Tage. Bei 6- bzw. 24-Well Platten wurden 50.000 bzw. ca. 10.000 Zellen pro Well ausplattiert.

Die Fibroblasten wurden in der ersten Passage während der ersten 24 Stunden in Assay-Medium kultiviert, um adhärieren und proliferieren zu können. Daraufhin wurde das Medium gewechselt und die weitere Kultivierung erfolgte in unterschiedlichen Behandlungskonditionen. Dabei beinhaltete jedes Well einer 6-Well-Titerplatte 2 ml Kulturmedium zuzüglich möglicher Substanzen zur Differenzierung der Zellen. 11 Tage nach Isolierung der Fibroblasten wurden schließlich alle Zellen geerntet, um diese im weiteren Verlauf mithilfe einer immunhistochemischen Färbung, Durchflusszytometrie oder Polymerase-Kettenreaktion zu untersuchen.

2.13 Analysemethoden

2.13.1 Immunhistochemische Färbung in der Zellkultur

Um die isolierten murinen kardialen Fibroblasten mithilfe einer immunhistochemischen Färbung visualisieren zu können, wurden diese in der ersten Passage auf kleinen Deckgläschen (High Precision, Ø12mm, No. 1.5H), die sich in den einzelnen Wells einer 24-Well-Titerplatte befanden, kultiviert. Jedes Well beinhaltete 0,5 ml Zelllösung (ca. 10.000 Zellen/Well). Die Kultivierungs- und Behandlungskonditionen entsprachen denen der ersten Versuchsreihe, welche im Kapitel „Versuchsprotokolle in der Zellkultur“ (Kapitel 2.14.1.1) näher beschrieben wird.

Am elften Tag nach der Fibroblastenisolierung wurden die Zellen schließlich mit zwei Antikörpern markiert. Hierzu wurde das Medium aspiriert, verworfen und die Deckgläschen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 15 Minuten mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) (250 µl/Well) fixiert. Die Fibroblasten wurden erneut einmal kurz und zweimal 10 Minuten mit PBS gewaschen, woraufhin 250 µl des Permeabilisierungs- und Blockierungspuffers (3 % *Normal Goat Serum* (NGS) in PBS/Triton (0,3 %)) für weitere 15 Minuten in jedes Well hinzugegeben wurde. Das NGS legt sich über die Zellmembran, wodurch Antigene bedeckt werden und somit eine unspezifische Bindung der Antikörper reduziert wird. Das Triton permeabilisiert die Zellmembran und ermöglicht so eine intrazelluläre Färbung. Die Zellen wurden erneut einmal kurz und einmal 10 Minuten mit PBS gewaschen. Jetzt wurden die Deckgläschen einzeln mit 2 Pinzetten vorsichtig aus den Wells genommen, das PBS entfernt und schlussendlich auf Parafilm in eine Petrischale gelegt. Unter dem Parafilm befand sich mit VE-Wasser getränktes Filterpapier, um ein feuchtes Milieu zu erzeugen. 25 µl der Antikörperlösung (Antikörper (1:100) in PBS/Triton (0,3 %) + 1 % NGS) wurden auf jedes Deckgläschen gegeben. Da die verwendeten Antiköper Anti-Alpha Smooth Muscle Actin (Alexa Fluor 594) und Vimentin XP Rabbit mAb (Alexa Fluor 488 Conjugate) bereits an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt waren, mussten in diesem Protokoll keine sekundären Antikörper eingesetzt werden. Die Deckgläschen wurden über Nacht bei 4 °C in einer Dunkelkammer inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang (einmal kurz und zweimal 15 Minuten mit PBS) wurden die Deckgläschen mit 7 µl DAPI Fluoromount – G eingedeckt und zum Aushärten erneut über Nacht bei 4 °C inkubiert. Mithilfe des Keyence Mikroskops BZ-9000 und der Software BZ-II-Analyzer konnten nun sich in (Myo-)Fibroblasten befindliche Vimentin-, *alpha-Smooth Muscle Actin*- (α-SMA) und Nucleus-Elemente detektiert und auf diese Weise ein visueller Eindruck der Zellpopulation gewonnen werden (siehe Abb. 4).

Die folgenden Software-Einstellungen wurden verwendet, um die Zellfluoreszenz der Fibroblasten zu dokumentieren:

Tabelle 10: Verwendete Einstellungen im BZ-II-Analyzer-Programm zur Analyse der Zellfluoreszenz von antikörpermarkierten (Myo-) Fibroblasten

Antikörper	Vergrößerung	Belichtungszeit	Lookup-table settings
Anti-α-SMA (rot)	4x // 20x	1,3 Sek. // 1,4 Sek.	Shadow: 18 // 11 Highlight: 200 // 200 Gamma: 1,0 // 1,0
Vimentin XP Rabbit mAb (grün)	4x // 20x	1,3 Sek. // 1,4 Sek.	Shadow: 11 // 7 Highlight: 200 // 200 Gamma: 1,0 // 1,0
DAPI Fluoromount – G (blau)	4x // 20x	11 Sek. // 5 Sek.	Shadow: 37 // 49 Highlight: 200 // 200 Gamma: 1,0 // 1,0

2.13.2 Durchflusszytometrie

Probenvorbereitung

Nachdem die Zellen 11 Tage lang in der Zellkultur kultiviert und behandelt wurden, wurden diese mit S-EDTA gewaschen und für drei bis fünf Minuten trypsinisiert. Die hieraus entstandenen Zellsuspensionen wurden in FACS-Röhrchen (FR) gegeben und bei 200 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 2 ml kaltem FACS-Puffer resuspendiert, woraufhin sie für 7 Minuten bei 4 °C und 300 x g zentrifugiert wurden (fortan ‚waschen' genannt). Der Überstand wurde verworfen und die Pellets wurden in jeweils 100 µl PBS resuspendiert. Daraufhin wurde 1 µl *Fixable Viability Dye* – eFluor 780 (FVD) im Verhältnis 1:10 hinzugegeben. Außerdem wurden 5 µl Fc-block in die FR gegeben, welche später noch mit mindestens einem Antikörper markiert werden sollten. Die Proben wurden für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach einem Waschvorgang wurden die Überstande verworfen und die Pellets in jeweils 100 µl FACS-Puffer resuspendiert. Daraufhin wurden Antikörper gegen extrazelluläres CD31 anti mouse – PerCP/Cy5.5, CD45 Rat Anti-Mouse – BV510 und Anti-Feeder – PE in einer Verdünnung von 1:100 zu den Zellen hinzugegeben. Die Proben wurden gevortext und für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschvorgang, nach welchem der Überstand verworfen und die Pellets in jeweils 100 µl FACS-Puffer resuspendiert wurden. Jetzt wurden jeweils 100 µl Fix & Perm Medium A hinzugegeben, wonach die Proben für 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln inkubiert wurden. Nach wiederholtem Waschen,

dieses Mal mit jeweils 3 ml FACS-Puffer, wurden die Pellets in 100 µl Fix & Perm Medium B resuspendiert. Daraufhin wurden die intrazellulären Antikörper Vimentin XP Rabbit mAb (unconjugated) (1:50) bzw. Vimentin XP Rabbit mAb – Alexa Fluor 647 (1:200) und Anti-Alpha-Smooth Muscle Actin – Alexa Fluor 488 (1:100) hinzugegeben. Nach 20-minütiger Inkubation im Dunkeln bei RT wurden die Proben erneut gewaschen und in jeweils 100 µl FACS-Puffer resuspendiert. Wenn der unkonjugierte Antikörper verwendet wurde, wurde das Pellet nicht in FACS-Puffer, sondern nochmals in Reagenz B gelöst und der sekundäre Antikörper, in diesem Fall Donkey anti-rabbit – Alexa Fluor 647, in einer Verdünnung von 1:1000 für 15 Minuten hinzugegeben. Abschließend wurden die Proben gewaschen und in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert.

Messdurchführung

Die unterschiedlichen Zellsuspensionen konnten nun mithilfe der von Hulett et al. beschriebenen Durchflusszytometrie analysiert werden (Hulett et al., 1969). Die Untersuchung erfolgte an einem *fluorescence-activated cell scanning* (FACS) -Gerät. Hierbei strömen die Zellen hintereinander durch eine dünne Messkammer, die sogenannte Flusszelle („Flow Cell“), auf welche ein oder mehrere Laserstrahlen gerichtet sind. Je nach Zelltyp findet beim Durchtritt der Zelle durch den Laserstrahl eine unterschiedliche Streuung des Lichtes statt. Sensoren nehmen diese Lichtbrechung war und können darüber hinaus auch (Auto-) Fluoreszenz detektieren. Das Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter* (FSC)) gibt hierbei Auskunft über die Größe der Zellen, während das Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter* (SSC)) ein Maß für die Granularität, die Größe und Struktur des Zellkerns und die Vesikelmenge innerhalb der Zelle darstellt. Zur spezifischeren Detektion von Subpopulationen wurden Zellen außerdem sowohl extra- als intrazellulär mit fluoreszierenden monoklonalen Antikörpern markiert.

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde das Softwareprogramm BD FACSDiva (BD Bioscience) verwendet. In Abbildung 1 ist ein Beispiel eines Auswertungsvorganges einer Zellprobe wiedergegeben (*gating scheme*). Hierbei wurde zuallererst die Zellgröße und Granularität bestimmt, wodurch Zelldebris und Zellcluster von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden konnten. Mithilfe des Markers FVD konnten zunächst die lebenden von den abgestorbenen Zellen unterschieden werden. Daraufhin war es möglich, die Zielpopulation von anderen Zelltypen, wie zum Beispiel Leukozyten (CD45+) oder Endothelzellen (CD31+), abzugrenzen. Da die MEFSK4- und Vimentin-positiven Fibroblasten mit dem Antikörper Anti-Alpha-Smooth Muscle Actin

markiert waren, konnte nun die *mean fluorescence intensity* (mittlere Fluoreszenzintensität (MFI)) von *α-Smooth Muscle Actin* (α-SMA) der gesamten Fibroblastenpopulation ermittelt werden. Die Stärke bzw. Höhe der MFI gibt dabei an, wie häufig der fluoreszierende Antikörper an die α-SMA-Bestandteile der Fibroblasten binden und somit durch einen Laser in der Durchflusszytometrie stimuliert werden konnten. Hierdurch erhält man Aufschluss über den Differenzierungsgrad von Fibroblasten, da sich differenzierende bzw. differenzierte (Myo-) Fibroblasten mehr α-SMA-Filamente exprimieren als undifferenzierte Fibroblasten und somit eine höhere MFI aufweisen. Die MFI, die im FACS-Gerät ermittelt wird, hat keine Maßeinheit.

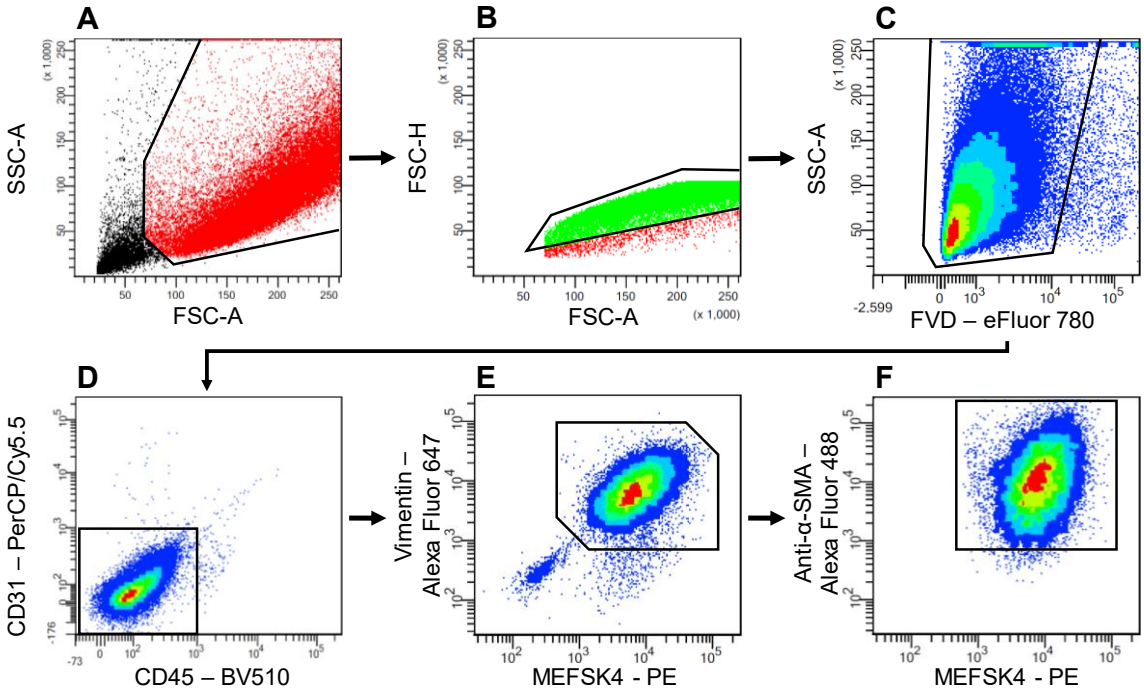


Abb. 1: Beispiel einer systematischen Auswertung einer Zellprobe mithilfe des BD FACSDiva-Programms. **A** Zelldebris und Zellcluster (hier in schwarz) wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. **B** Zelldubletten (hier in rot) wurden von der Auswertung exkludiert. **C** Fixable Viability Dye-negative (lebende) Zellen, wurden inkludiert. **D** CD31+ Endothelzellen und CD45+ Leukozyten wurden exkludiert. **E** MEFSK4- und Vimentin-positive Zellen wurden zur weiteren Analyse ausgewählt. Diese Zellpopulation spiegelt die Zielzellen, hier Fibroblasten, wider. **F** Zellen, die mit dem intrazellulären Antikörper anti-α-SMA markiert worden waren, wurden selektiert. Die MFI von α-SMA dieser Population gibt Aufschluss über den Differenzierungsgrad der Fibroblasten.

2.13.3 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

RNA-Isolierung

Um Ribonukleinsäure (RNA) aus kultivierten Fibroblasten zu isolieren, wurde zuerst das Zellkulturmedium aspiriert und verworfen, woraufhin 1 ml Guanidiniumthiocyanat (TRIzol) in jedes Well einer 6-Well-Titerplatte gegeben wurde. Während einer zweiminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde eine vollständige Dissoziation erreicht. Daraufhin wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers von der Oberfläche der einzelnen Wells gelöst und die entstandene Zellsuspension in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Unter dem Abzug wurden 0,2 ml Chloroform pro 1 ml TRIzol hinzugegeben. Die Lösung wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, nachdem sie geschüttelt und gevortext worden war. Nach 15-minütigem Zentrifugieren bei 16.000 rpm und 4 °C wurde die obere wässrige Phase, welche die RNA enthält, vorsichtig auf neue Eppendorf-Röhrchen transferiert. Unter dem Abzug wurden nun 0,5 ml Isopropanol (2-Propanol) zu der Wasserphase gegeben. Nachdem die Proben gevortext und für 10 Minuten bei 20 °C inkubiert worden waren, wurden diese für 10 Minuten bei 16.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets wurden in jeweils 1 ml 75-prozentigem Ethanol resuspendiert. Die Lösung wurde daraufhin erneut gevortext und für 10 Minuten bei 16.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Ethanol wurde verworfen, woraufhin das RNA-Pellet an der Luft für 2-5 Minuten bei 50 °C getrocknet wurde. Hierbei darf das Pellet nicht vollständig austrocknen, um eine vollständige Löslichkeit der RNA zu gewährleisten. Jeweils 20 µl RNase-freies Wasser wurden auf die Pellets gegeben, bevor diese auf einem Hitzeblock für 5 Minuten bei 55 °C und 800 rpm inkubiert wurden. Nachdem die Proben gevortext und kurz zentrifugiert worden waren, wurden diese auf Eis gegeben, woraufhin die RNA-Konzentration bestimmt werden konnte.

RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentration wurde mithilfe der NanoDrop 1000 Operating Software und dem ND-1000 Spectrophometer bestimmt. Hierbei wurde 1 µl aus einer Probe mit RNA-Lösung auf den Messsockel gegeben. Der Tropfen wird zwischen Sockel und Probenhalter festgehalten, welche Licht emittieren. Über die Messung der Lichtabsorption innerhalb der Probe kann die RNA-Konzentration bestimmt werden. RNA absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 260 Nanometer (nm). Durch eine Berechnung des Verhältnisses der Lichtabsorption der Wellenlängen 260 nm und 280 nm kann die Reinheit der RNA ermittelt werden, wobei ein Wert zwischen 1,8 und 2,0 allgemein als „rein“ anerkannt wird.

Gewinnung von cDNA

Mithilfe des QuantiTect Reverse Transcription Kits wurde jeweils 1 µg RNA pro Probe zu komplementärer DNA (cDNA) transkribiert. Hierzu wurde die RNA in den folgenden Schritten so verdünnt, dass die Konzentration 1 µg RNA pro 20 µl Reaktionsvolumen betrug. Um mögliche genomische DNA (gDNA)-Rückstände zu eliminieren, wurde gDNA *wipeout buffer* mitsamt der mRNA und RNase freiem Wasser in Eppendorf-Röhrchen gegeben, welche kurz gevortext und zentrifugiert wurden. Daraufhin wurden die Proben im Mastercycler nexus gradient für 2 Minuten auf 42 °C erhitzt und wieder auf 4 °C abgekühlt. Dann wurde zu den Proben jeweils 1 µl Reverse-Transcriptase Master Mix, *Reverse-Transcriptase Buffer* und *Reverse-Transcriptase Primer Mix* hinzugegeben. Nachdem die Eppendorf-Röhrchen zum wiederholten Male kurz gevortext und zentrifugiert worden waren, wurde diese erneut im Mastercycler für 20 Minuten bei 42 °C und für 3 Minuten bei 95 °C inkubiert, um die reverse Transkriptase zu inaktivieren. Daraufhin wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt, um diese entweder direkt für eine Polymerase-Kettenreaktion weiterverwenden zu können oder bei -80 °C zu lagern.

Probenauswertung

Die qPCR ist ein Verfahren zur Detektion und Vervielfältigung bzw. Amplifikation von Desoxyribonukleinsäure (DNA). Während sich wiederholenden Zyklen, in denen die DNA auf 95 °C bzw. 60 °C erhitzt und abgekühlt wird, wird die Anzahl der DNA-Stränge verdoppelt und auf diese Weise potenziert. In einer quantitativen Echtzeit-PCR ist die Amplifikation mit einer Fluoreszenzintensitätsmessung nach jedem Zyklus verbunden. Fluoreszierende Reportermoleküle sind entweder unspezifische DNA-Doppelstrang-bindende Sonden (*probes)* (z. B. SYBR Green) oder fluoreszenzmarkierte genspezifische Primer (z. B. TaqMan). In dieser Arbeit wurde SYBR Green verwendet.

Bevor eine qPCR ausgeführt werden konnte, musste zu 1 µl cDNA neben 7,2 µl RNase-freiem Wasser und 10 µl Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix auch 1,8 µl der verwendeten Primer (*forward* (0,45 µM) und *reverse* (0,45 µM)) in jedes Well einer 96-Well-Mikroreaktionsplatte hinzugegeben werden. Der Master Mix (MM) beinhaltet Maxima Hot Start Taq DNA-Polymerase und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) in einem optimierten PCR-Puffer. Für die Amplifikation des Gens, welches für α-SMA codiert, wurden die Primer ACTA2 verwendet. Für die Amplifikation des Gens, welches für Periostin codiert, wurden die Primer POSTN verwendet. Als interner Standard wurde β-Actin gewählt (siehe auch Tabelle 9). Die Primer-Spezifität wurde validiert, indem am Ende eines jeden qPCR-Laufes eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt wurde. Der Schmelzpunkt eines Amplikons wird durch seine Länge und Nukleotidkomposition bestimmt. Als Schmelzpunkt des Amplikons ist die Temperatur definiert bei der 50 % der

Fragmente denaturiert sind. Beim Erhitzen denaturieren die Doppelstränge, die interkalierten SYBR Green-Fluorophore werden freigesetzt und das Fluoreszenzsignal geht verloren. Der Schmelzpunkt ist durch den Wendepunkt der Fluoreszenz/Temperatur- Kurve definiert, bzw. als Maximum in der dF/dt- Kurve. Wenn alle Amplikons zu Beginn der Analyse gleich sind, gibt es nur ein solches Maximum, was darauf hinweist, dass nur das richtige Transkript amplifiziert wurde. Jede Reaktion wurde als Duplikat angefertigt und mit β-Actin als Referenzgen verglichen. Außerdem wurde eine Wasser- sowie eine Negativkontrolle auf jede Mikroreaktionsplatte zur Auswertung hinzugegeben.

Die Fluoreszenzauslesung erfolgte mithilfe des StepOnePlus Real-Time PCR Systems, welches die Fluoreszenz mit der Zyklusnummer für jede Probe verrechnet. Die folgende Einstellung für die Genamplifikation wurde verwendet: Erster Zyklus bei 95 °C für 10 Minuten (Aktivierung der Taq-Polymerase), gefolgt von 40 Zyklen bei 95 °C für 15 Sekunden (Denaturierung der DNA durch Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen) und 60 °C für 60 Sekunden (Primerhybridisierung an das 3‘-Ende der Gensequenz, auch *Annealing* genannt). Während der sogenannten Elongation bindet die DNA-Polymerase an die Primer und koppelt die im Mastermix befindlichen dNTPs, sodass ein komplementärer Strang entsteht und die Gensequenz in jedem Zyklus verdoppelt wird. Die Spezifität der Amplikons wurde mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse verifiziert, beginnend mit 95 °C für 15 Sekunden, dann 60 °C für 60 Sekunden. Danach wurde die Temperatur alle 15 Sekunden um 0,3 °C erhöht, bis die Endtemperatur von 90 °C erreicht wurde.

Daraufhin muss ein Schwellenwert bestimmt werden, der über der Hintergrundfluoreszenz und innerhalb der linearen Phase aller Proben liegt. Der Wert, bei dem eine Probe diese Schwelle erreicht, wird Schwellenzyklus (*cycle threshold,* Ct) genannt. Dadurch, dass die gemessene Fluoreszenzintensität bzw. der Ct-Wert mit der exponentiell vervielfältigten DNA korreliert, lässt sich rückschlüssig die initiale Menge des Zielgens (in diesem Fall ACTA2 bzw. POSTN), welches sich zum Zeitpunkt der Lyse und somit am Ende der individuellen Behandlung der zu untersuchenden Proben in den Zellen befand, ermitteln.

Um quantitativ Zielgene in einer qPCR analysieren zu können, wurde die sogenannte X_0-Methode, welche von Thomsen et al. im Jahre 2010 beschrieben wurde, verwendet (Sasse et al., 2003). Diese Methode liefert zusätzliche Informationen über das Transkriptexpressionslevel und ermöglicht außerdem eine Berechnung der Standardabweichung.

Eine PCR-Amplifikation erfolgt der Gleichung:

$$X_n = X_0 \times (1 + E_{amp})^n$$

In dieser Gleichung entspricht X_0 der anfänglichen Menge an Zieltranskripten in einer Probe. X_n entspricht einem manuell eingestellten Schwellenwert (threshold) innerhalb der linearen Phase der Amplifikation. 'n' (auch als Ct-Wert bekannt) entspricht dem Zyklus, bei welchem das amplifizierte Zieltranskript den definierten Schwellenwert X_n erreicht. Der X_n-Wert wird also als Konstante gewählt und aus dem gemessenen Ct-Wert kann der X_0-Wert relativ zur Konstanten X_n ermittelt werden. E_{amp} entspricht der Effizienz der PCR-Reaktion. Diese lag bei ca. 100 %. Da die Werte von 'n' und X_n gemessen werden, kann die Gleichung nach X_0 aufgelöst werden:

$$X_0 = X_n / 2^n$$

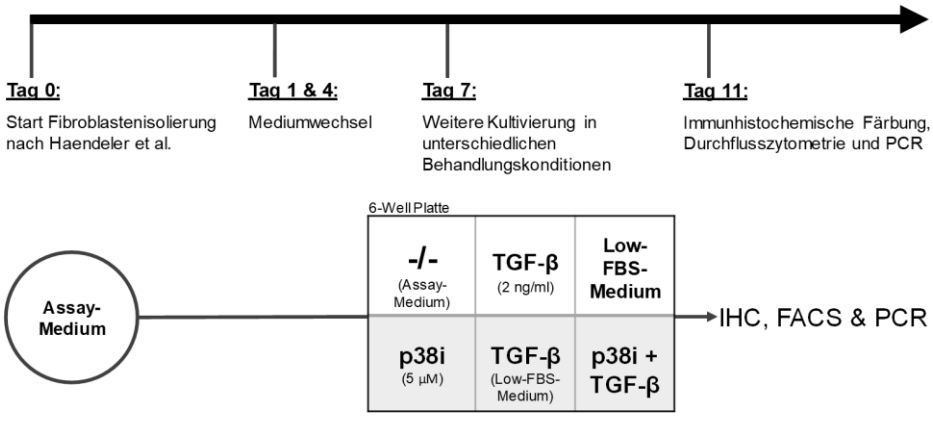
Um Unterschiede zwischen zwei Behandlungskonditionen feststellen zu können, wurde der X_0-Wert des Zieltranskripts ACTA2 bzw. POSTN durch den X_0-Wert des Referenztranskripts β-Actin derselben Probe geteilt. Danach ist es möglich die Transkriptexpression unterschiedlich behandelter Gruppen zu einem bestimmten Zeitpunkt miteinander zu vergleichen.

2.14 Versuchsprotokolle in der Zellkultur

Die zentralen Fragen dieser Arbeit wurden hauptsächlich in Zellkulturexperimenten untersucht, wobei diese in drei experimentellen Serien durchgeführt wurden. Zunächst sollte das *in-vitro*-Modell etabliert bzw. validiert werden. Hierzu wurde in der ersten Versuchsreihe (Serie 1) überprüft, ob es gelungen ist, murine kardiale Fibroblasten zu isolieren und zu kultivieren und diese Zellpopulation durch verschiedene Auswertungsmethoden wie der Durchflusszytometrie, der PCR oder der immunhistochemischen Färbung zu detektieren. Außerdem sollte sichergestellt werden, dass es möglich ist, die Differenzierung von undifferenzierten Fibroblasten zu differenzierten Myofibroblasten zu induzieren. Hierzu wurde TGF-β verwendet. Darüber hinaus wurde eine Zellkulturzeitreihe angefertigt, um eine Aktivierung der Zellen durch den Kultivierungsprozess zu untersuchen. In der zweiten Serie galt es dann den direkten IGF-1-Effekt auf die Fibroblastendifferenzierung zu untersuchen. Abschließend wurde auch der indirekte, Makrophagen-vermittelte Effekt von IGF-1 auf die Differenzierung von Fibroblasten in einer dritten Versuchsreihe untersucht. Im Folgenden werden die einzelnen Serien genauer beschrieben.

2.14.1.1 Serie 1: Differenzierungsverhalten von Fibroblasten in Abhängigkeit unterschiedlicher Kultivierungsmedien

In der ersten Versuchsreihe (Serie 1) wurden die Fibroblasten zuerst, wie unter Kapitel 2.12 beschrieben, isoliert und eine Woche lang kultiviert. Die Kontrollgruppe wurde in Assay-Medium (10 % FBS) kultiviert. Um zunächst das Stimulierungspotential der Fibroblasten zu untersuchen, wurden 2 ng/ml *transforming growth factor β* (TGF-β) als Positivkontrolle eingesetzt. Außerdem fanden zur weiteren Behandlung 5 µM in Assay-Medium gelöster p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) – Inhibitor (im Folgenden auch p38i genannt) und Low-FBS-Medium (1 % FBS) Verwendung, um eine mögliche Unterdrückung der Fibroblastendifferenzierung zu bewirken. Darüber hinaus wurde untersucht, ob diese beiden Konditionen, d. h. Low-FBS-Medium und p38 MAPK-Inhibitor, Einfluss auf die TGF-β vermittelte Stimulierung der Fibroblasten nehmen. Die genaue Abfolge und Zusammenstellung der Behandlungskonditionen lassen sich aus Abbildung 2 entnehmen. Ein Teil der Zellen wurde unter gleichen Bedingungen auf kleinen Deckgläschen (Ø12mm) in einer 24-Well-Titerplatte kultiviert, um diese später mithilfe einer immunhistochemischen Färbung untersuchen zu können. Die eigentliche Analyse der unterschiedlichen Differenzierungsgrade der Fibroblasten wurde mithilfe einer Durchflusszytometrie bzw. einer quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) an Tag 11 nach Fibroblastenisolierung durchgeführt.



Behandlungskonditionen	Tag 7	Tag 8	Tag 9 – Tag 11
-/- (Assay-Medium)	Assay-Medium	Assay-Medium	
TGF-β (Assay-Medium)	Assay-Medium	Assay-Medium	TGF-β – Injektion
Low-FBS-Medium	Assay-Medium	Low-FBS-Medium	
p38i (Assay-Medium)	Assay-Medium	p38i-Medium	
TGF-β (Low-FBS-Medium)	Assay-Medium	Low-FBS-Medium	TGF-β – Injektion
p38i + TGF-β (Assay-Medium)	Assay-Medium	Assay-Medium	p38i-Medium + TGF-β – Injektion

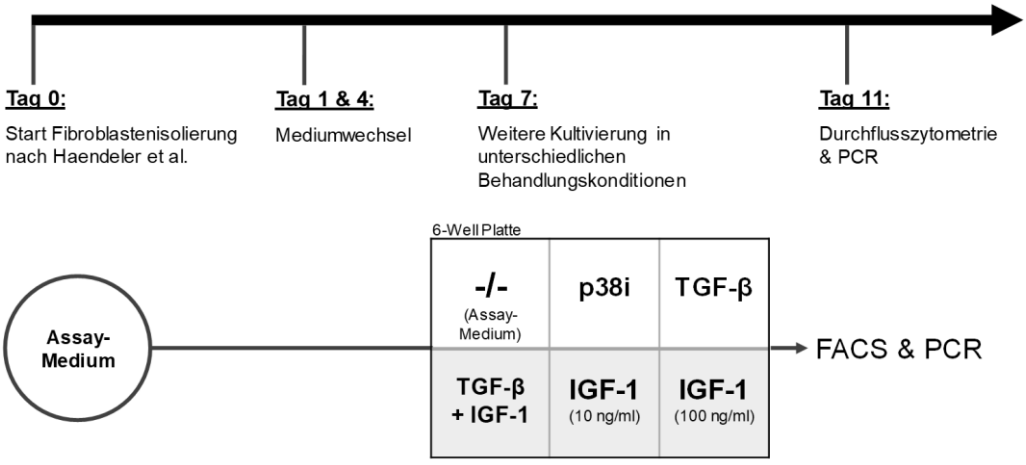
Abb. 2: Schematische Darstellung der ersten Versuchsreihe in der Zellkultur. Im oberen Teil der Abbildung wird mithilfe einer Zeitleiste die grobe Abfolge der Handlungsschritte in dieser Serie vom Beginn des Versuchs bis hin zur Analyse mit unterschiedlichen Methoden wiedergegeben. Im mittleren Teil ist zu sehen, wie die verschiedenen Behandlungskonditionen auf eine 6-Well-Titerplatte verteilt wurden und im unteren Teil ist die genaue Behandlung in den einzelnen Wells in der ersten Passage bis hin zur Auswertung dargestellt.

2.14.1.2 Zellkulturzeitreihe

Im weiteren Verlauf der ersten Serie sollte untersucht werden, ob die α-SMA-Expression in Kontrollzellen durch den alleinigen Kultivierungsprozess beeinflusst wird oder ob diese dem physiologischen Wert im Herzen einer lebenden Maus entsprechen. Hierzu wurden Fibroblasten aus gesunden Mäuseherzen nach einem etablierten Protokoll gewonnen (Pinto et al., 2016). Dabei wurde das Herz mithilfe eines Tissue Choppers in 1 Millimeter große Würfel zerteilt und in ein 15 ml Falcon mit 5 ml Kollagenaselösung gegeben. Die Kollagenaselösung bestand aus 8,5 mg (450 U/ml) Collagenase Type I und 90 µl DNase (60 U/ml) gelöst in 5 ml HBSS. Das Röhrchen wurde insgesamt 45 Minuten bei 37 °C inkubiert und leicht geschüttelt. Während der Inkubation, nach jeweils 15 Minuten, wurde die Zellsuspension in einer 10 ml Pipette 12-mal auf- und abpipettiert. Nach der Inkubation wurde die Zelllösung in einer 1 ml Pipettenspitze 30-mal auf- und abpipettiert und daraufhin durch einen 100 µM Filter gegeben. Die Zellsuspension wurde anschließend 1 Minute bei 50 x g und 4 °C zentrifugiert, wonach der Überstand vorsichtig abpipettiert und durch einen 40 µM Filter in ein neues Falcon transferiert wurde. Dieses wurde erneut für 10 Minuten bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde schließlich verworfen und das Pellet in 2 ml PBS gelöst. Nun konnten die Zellen entweder direkt mittels einer FACS-Analyse untersucht werden oder vorher in der Zellkultur für 2 bzw. 24 Stunden kultiviert werden, um Aufschluss darüber zu erhalten, wie schnell die Fibroblasten während des Kultivierungsprozesses differenzieren und α-SMA exprimieren. In der FACS-Analyse wurden Fibroblasten als CD31-negative, CD45-negative und MEFSK-4-positive Zellen definiert.

2.14.2 Serie 2: Einfluss von IGF-1 auf die Differenzierung von Fibroblasten

In der zweiten Serie wurden die Fibroblasten zunächst, wie unter Kapitel 2.12 beschrieben, isoliert und kultiviert. In dieser Versuchsreihe wurde der Effekt von IGF-1 auf die Differenzierung von Fibroblasten untersucht. Hierbei wurde IGF-1 sowohl in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (10 ng/ml und 100 ng/ml) als auch in Kombination mit TGF-β zur Behandlung der Zellen verwendet. Da 100 ng IGF-1 in 100 µl Polarisierungsmedium gelöst waren, musste zu den anderen Wells für eine valide Auswertung ebenfalls im entsprechenden Verhältnis Polarisierungsmedium hinzugegeben werden, um einen unbeabsichtigten Effekt ebendieses ausschließen zu können. Das Polarisierungsmedium bestand aus *very low endotoxin* - DMEM, 3 % Lipopolysaccharid (LPS) freiem fetalen Kälberserum (FCS), 1 M 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) und 1 % Penicillin/Streptomycin. Außerdem wurden dieser Serie erneut 5 µM p38i und 2 ng/ml TGF-β als Behandlungsgruppen hinzugefügt. In Abbildung 3 werden die einzelnen Kultivierungsschritte genau dargestellt, wobei die zusätzliche Gabe von Polarisierungsmedium als „Vehicle-Injektion“ bezeichnet wird. An Tag 11 nach Isolierung der Zellen wurden die unterschiedlich behandelten Fibroblasten mithilfe einer Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) bzw. einer qPCR analysiert und ausgewertet.



Behandlungskonditionen	Tag 7	Tag 8	Tag 9 – Tag 11	
-/- (Assay-Medium)	Assay-Medium	Assay-Medium		Vehicle-Injektion
p38i (5 µM)	Assay-Medium	p38i-Medium		Vehicle-Injektion
TGF-β (2 ng/ml)	Assay-Medium	Assay-Medium	TGF-β – Injektion	& Vehicle-Injektion
TGF-β (2 ng/ml) + IGF-1 (10 ng/ml)	Assay-Medium	Assay-Medium	TGF-β- + IGF-1-	& Vehicle-Injektion
IGF-1 (10 ng/ml)	Assay-Medium	Assay-Medium	IGF-1 – Injektion	& Vehicle-Injektion
IGF-1 (100 ng/ml)	Assay-Medium	Assay-Medium	IGF-1 – Injektion	

Abb. 3: Schematische Darstellung der zweiten Versuchsreihe in der Zellkultur. In dieser Versuchsreihe wurde neben dem p38 MAPK-Inhibitor und TGF-β auch der Effekt von IGF-1 auf die Fibroblastendifferenzierung untersucht.

2.14.3 Serie 3: Effekt von M1-, M2- und IGF-1-polarisierten Makrophagenüberständen auf die Differenzierung von Fibroblasten

In der dritten Versuchsreihe wurden die Fibroblasten, wie zuvor beschrieben, isoliert und anschließend für sieben Tage kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen in der ersten Passage an Tag 7 nach der Isolierung für zwei Tage in Assay-Medium kultiviert. In früheren Versuchen der Arbeitsgruppe wurden aus Knochenmark stammende hämatopoetische Stammzellen für 7 Tage in Medium, welches *macrophage colony stimulating factor* (M-CFS) enthielt, kultiviert. Die hieraus resultierenden Makrophagen wurden anschließend für 2 Tage mittels LPS/Interferon-gamma (INF-γ) (M1 Polarisation), Interleukin-4 (IL-4) (M2 Polarisation) oder IGF-1 polarisiert. Die hierbei entstandenen Überstände (*Supernatants (Sup)*) Sup M1, Sup M2 und Sup IGF-1 wurden eingefroren und im Rahmen dieser Serie an Tag 9 zu den Zellen gegeben, um den Effekt ebendieser auf die Differenzierung von Fibroblasten zu untersuchen. Da in den Überständen nicht mehr genug Serum enthalten ist, würden die Fibroblasten bei einer Kultivierung in ausschließlich diesem Nährmedium absterben. Daher wurden die Kulturmedien der einzelnen Konditionen aus 70 % Assay-Medium und 30 % Supernatant (Sup), und folglich auch 30 % Polarisierungsmedium (Pol) zusammengesetzt. Das Kürzel „Pol“ beschreibt in Tabelle 11 solche Konditionen, welche Polarisierungsmedium zuzüglich der hier oben genannten Polarisierungssubstanzen enthielten, während das Kürzel „Sup“ die Behandlung von Fibroblasten mit den unterschiedlich polarisierten Makrophagenüberständen aus früheren Versuchen der Arbeitsgruppe beschreibt. Außerdem wurde eine der Gruppen ausschließlich mit Assay-Medium und IL-4 behandelt. Die exakte Behandlung aller Zellproben kann Tabelle 11 entnommen werden. An Tag 11 nach Isolierung der Fibroblasten wurden die unterschiedlich behandelten Zellen mithilfe einer FACS-Analyse bzw. einer qPCR analysiert und ausgewertet. Vor der Auswertung mittels Durchflusszytometrie wurden die Laser-Einstellungen in dieser Serie verändert, um die einzelnen Messwerte im Streudiagramm besser auslesen zu können. Hierdurch konnten die Ergebnisse besser analysiert werden. Allerdings sind die absoluten Werte nun nicht mehr direkt mit denen aus vorangegangenen Versuchen vergleichbar.

Tabelle 11: Darstellung der acht Behandlungskonditionen der 3. Serie und deren Kultivierung ab Tag 7 bis Tag 11.

Serie 3: Behandlungskonditionen	Tag 7 – Tag 8	Tag 9 – Tag 11
Assay – Medium	Assay-Medium	1,4 ml Assay-Medium 0,6 ml Polarisierungsmedium
Pol M1 IFN-γ/LPS	Assay-Medium	1,4 ml Assay-Medium 0,6 ml Polarisierungsmedium 0,6 ng/ml IFN-γ 3 ng/ml LPS
Sup M1 IFN-γ/LPS	Assay-Medium	1,4 ml Assay-Medium 0,6 ml Supernatant M1
Pol M2 IL-4	Assay-Medium	1,4 ml Assay-Medium 0,6 ml Polarisierungsmedium 9 ng/ml IL-4
Sup M2 IL-4	Assay-Medium	1,4 ml Assay-Medium 0,6 ml Supernatant M2
Pol IGF-1	Assay-Medium	1,4 ml Assay-Medium 0,6 ml Polarisierungsmedium 3 ng/ml IGF-1
Sup IGF-1	Assay-Medium	1,4 ml Assay-Medium 0,6 ml Supernatant IGF-1
IL-4	Assay-Medium	2 ml Assay-Medium 10 ng/ml IL-4

„Pol M1“ bzw. „Pol M2“ steht für Medium, welches zur Polarisierung von Makrophagen zu inflammatorischen M1 bzw. anti-inflammatorischen M2 Phenotypen verwendet wird. „Sup M1“, „Sup M2“ und „Sup IGF-1“ beschreibt Assay-Medium, welches zu einem Drittel mit den Überständen von M1-, M2- oder IGF-1-polarisierten Makrophagen angereichert wurden.

2.15 Untersuchung des Einflusses von IGF-1 auf den Myofibroblastenanteil in Infarktherzen

Zur weiteren Analyse der Fibroblastendifferenzierung *in vivo* wurden Basal- bzw. Infarktherzen mit IGF-1 bzw. BSA behandelt und anschließend untersucht. Hierzu wurden durch Dr. Rianne Nederlof und Dr. André Spychala Herzinfarkte bei Mäusen induziert. In diesem murinen Ischämie-/Reperfusionsmodell wurden die Tiere mithilfe eines 2-prozentigen Isoflurangemisches narkotisiert, um daraufhin den *Ramus interventricularis anterior* (*left anterior descending artery (LAD)*) für 45 Minuten ligieren zu können. Perioperativ wurde das Analgetikum Temgesic subkutan verabreicht. Zum Ende der Ischämie erhielten die Mäuse einen IGF-1 bzw. BSA-Bolus. Zudem wurde eine osmotische Minipumpe subkutan implantiert, die über drei Tage IGF-1 oder BSA abgab. Das genaue Versuchsprotokoll ist unter Heinen et al. publiziert (Heinen et al., 2019). Am fünften Tag nach Induktion des Infarktes wurden die Herzen entnommen und mithilfe einer FACS-Analyse untersucht. Hierzu wurden die Herzen nach einem etablierten Protokoll entnommen und enzymatisch dissoziiert (vergl. Kapitel 2.14.1.2) (Pinto et al., 2016). Die Zellen konnten schließlich durchflusszytometrisch untersucht werden. In der FACS-Analyse dieser *in-vivo*-Experimente wurden Fibroblasten als CD31-negative, CD45-negative und MEFSK-4-positive Zellen definiert.

2.16 Färbung histologischer Kryostat-Schnitte infarzierter Herzen

Um einen visuellen Eindruck des Differenzierungsverhaltens von Fibroblasten innerhalb des Infarktherzens und im Besonderen der Infarktnarbe zu erhalten, wurden histologische Kryostat-Schnitte infarzierter Herzen gefärbt und untersucht. Alexandra Zimmerhofer, Tengis Tschaidse und Johannes Boy fertigten im Rahmen anderer Arbeiten native, 8 µm Kryostat-Schnitte von gesunden Mäuseherzen und Mäuseherzen fünf Tage nach Induktion eines Infarktes an. Diese wurden auf Objektträgern fixiert und bei -20 °C gelagert. Zur weiteren Untersuchung innerhalb dieser Arbeit wurden die histologischen Schnitte aufgetaut, mit einem Fettstift umrandet und 10 Minuten mit 250 µl Paraformaldehyd (4 %) fixiert. Daraufhin wurden sie einmal kurz und zweimal 10 Minuten in einer Küvette mit PBS gewaschen. Hierauf folgte das 20-minütige Permeabilisieren mit 0,5 % Triton in PBS, woraufhin erneut einmal kurz und zweimal 10 Minuten mit PBS gewaschen wurde. Anschließend wurden unspezifische Kopplungsstellen für Antikörper mithilfe von 10 % Normal Goat Serum in

PBS/Saponin (2 %) für 2 Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Ca. 70 - 100 µl der Antikörperlösung (Antikörper (1:100) in PBS/Saponin (0,2 %) + 2 % NGS) wurden auf jeden Schnitt gegeben. Da die verwendeten Antiköper Anti-Alpha Smooth Muscle Actin (Alexa Fluor 594) und Vimentin XP Rabbit mAb (Alexa Fluor 488 Conjugate) bereits an einen fluoreszierenden Farbstoff gebunden waren, mussten in diesem Protokoll keine sekundären Antikörper verwendet werden. Die histologischen Schnitte wurden über Nacht bei 4 °C in einer Dunkelkammer inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang im Dunkeln (einmal kurz und dreimal 15 Minuten mit PBS) wurden die Schnitte mit 9 µl DAPI Fluoromount – G eingedeckt und zum Aushärten erneut über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen mit Nagellack umrandet, sodass das DAPI nicht zwischen Objektträger und Deckgläschen entweichen kann. Mithilfe des Keyence Mikroskops BZ-9000 und der Software BZ-II-Analyzer konnten nun sich in (Myo-)Fibroblasten befindliche Vimentin-, *alpha-Smooth Muscle Actin*- (α-SMA) und Nucleus-Elemente detektiert und auf diese Weise ein visueller Eindruck des Myokards von Infarktherzen im Vergleich zu gesundem Herzgewebe gewonnen werden.

3 Ergebnisse

3.1 Immunhistochemische Färbung von (Myo-) Fibroblasten

Um einen ersten visuellen Eindruck von Fibroblasten und ihrem Differenzierungsprozess zu erhalten, wurden diese mit den Differenzierungsmarkern Anti-α-SMA (Alexa Fluor 594) und Vimentin (Alexa Fluor 488) angefärbt. Um zu überprüfen, ob die Fibroblastendifferenzierung stimuliert werden kann und die α-SMA-Expression zunimmt, wurde TGF-β als Positivkontrolle eingesetzt. In Abbildung 4 sind exemplarisch Fibroblasten abgebildet, die entweder mit Assay-Medium oder mit TGF-β behandelt wurden. Dabei werden sowohl die Einzelaufnahmen der Fibroblasten gezeigt, in welchen entweder α-SMA, Vimentin oder die Zellkerne dargestellt werden, als auch ein zusammengesetztes Bild (*Overlay*), das sich aus den drei Einzelaufnahmen zusammenfügen lässt. Zellen, die ausschließlich Vimentin-positiv sind, stellen undifferenzierte Fibroblasten dar, während Zellen, die zusätzlich α-SMA-positiv sind, sich bereits in unterschiedlichen Phasen der Differenzierung zu Myofibroblasten befinden. Während der Untersuchung von in der Zellkultur kultivierten Fibroblasten mithilfe eines Fluoreszenzmikroskopes fielen subjektiv keine unterschiedlichen Rotintensitäten und somit α-SMA-Expressionswerte der zwei Behandlungskonditionen auf. Die überwiegende Mehrheit der Zellen scheint schon in der Kontrollgruppe α-SMA-Expression aufzuweisen, während die mit TGF-β behandelten Zellen kein zusätzliches α-SMA exprimieren. Eine klare Abgrenzung von undifferenzierten zu differenzierten Fibroblasten geht aus den Aufnahmen anhand der Färbung und/oder Morphologie der Zellen also nicht hervor. Es entstand allerdings der Eindruck, dass die Fluoreszenzintensität von Vimentin negativ mit der von α-SMA korreliert.

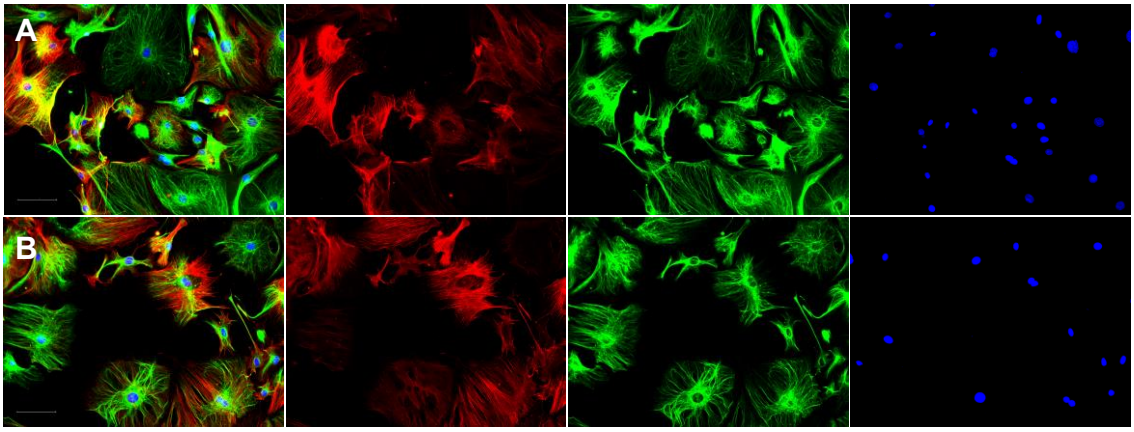


Abb. 4: Beispielaufnahmen immunhistochemisch gefärbter Fibroblasten in der Zellkultur. Zu sehen ist ein zusammengefügtes Foto (*Overlay*) und die drei Einzelaufnahmen der Fibroblasten in 20-facher Vergrößerung, welche entweder mit **A** Assay-Medium (Kontrollgruppe) oder **B** TGF-β (Positivkontrolle) behandelt wurden. Die α-SMA-Filamente sind rot gefärbt, Vimentin grün und die Nuklei blau. Der Maßstab, der in den Overlayfotos zu sehen ist, entspricht einer Länge von 1000 µm.

Trotz technisch gut gelungener Färbung der Zellen erwies sich eine aussagekräftige, quantitative und objektivierbare Auswertung als schwierig, da die Fibroblasten morphologisch sehr heterogen sind. Ein undifferenzierter Fibroblast kann um ein Vielfaches größer sein als ein differenzierter Myofibroblast, wodurch die Analyse von Pixelverhältnissen in Abhängigkeit der Zellzahl zur Bestimmung des durchschnittlichen Differenzierungsgrades ungeeignet war. Hinzu kommt, dass die Fluoreszenzintensität der markierten Zellen trotz strikter Einhaltung des Protokolls variieren konnte. Außerdem proliferierten die Zellen in Abhängigkeit der Behandlungskondition unterschiedlich stark. Hierdurch kann eine Aufnahme bei einem überwachsenen Objektgläschen überbelichtet sein, was eine Auswertung weiter erschwert. Eine valide und reproduzierbare Quantifizierung mittels einer immunhistochemischen Färbung schien in dieser Arbeit daher nicht realisierbar. Darum fand dieses Verfahren zur Färbung von Fibroblasten, die in der Zellkultur kultiviert wurden, keine weitere Verwendung. Zur besseren quantitativen Analyse des Differenzierungsprozesses von Fibroblasten wurden weitere Methoden wie die Durchflusszytometrie und qPCR eingesetzt.

3.2 Differenzierungsverhalten kultivierter Fibroblasten

3.2.1 FACS – Auswertung der 1. Serie

In dieser ersten Versuchsreihe galt es zunächst einen ersten Eindruck des Differenzierungsverhaltens der Fibroblasten in Abhängigkeit unterschiedlicher Kultivierungsmedien zu gewinnen. Es sollte insbesondere die Frage geklärt werden, ob eine Zu- bzw. Abnahme der Zelldifferenzierung in diesem System bewirkt werden kann. Die unbehandelte Kontrollgruppe weist hierbei eine mittlere α-SMA-MFI von 31610 (± 6816) auf (siehe Abb. 5). Um zu überprüfen, ob in diesem *in-vitro*-Modell eine verstärkte Fibroblastendifferenzierung induziert werden kann, wurde TGF-β während der Kultivierung zu den Zellen gegeben. Dabei verursacht die Gabe dieser Substanz eine signifikante Steigerung der MFI von α-SMA um den Faktor 1,63 (51584, ± 5073, $p = 0{,}0005$), was darauf hindeutet, dass die isolierten und kultivierten Fibroblasten ein Differenzierungspotenzial zu Myofibroblasten haben. Da es in der immunhistochemischen Färbung und im Rahmen dieser durchflusszytometrischen Analyse Hinweise darauf gibt, dass die Kontrollgruppe bereits zu einem gewissen Teil α-SMA exprimiert (siehe Kapitel 3.1), wurde überprüft, ob der Differenzierungsgrad der Kontrollgruppe mittels Low-FBS-Medium oder p38 MAPK-Inhibitor reduziert und somit eine artifizielle Differenzierung in Folge des Kultivierungsprozesses unterdrückt werden kann. Die mit Low-FBS-Medium behandelten Zellen unterscheiden sich in ihrem

Differenzierungsgrad allerdings nicht von der Kontrollgruppe, wohingegen der p38 MAPK-Inhibitor einen deutlichen Trend zu einer Reduktion der α-SMA-MFI (um ca. 21 %, nicht signifikant) bewirkt. Um die Frage zu beantworten, ob das Low-FBS-Medium bzw. der p38 MAPK-Inhibitor einen Effekt auf die TGF-β-vermittelte Stimulation von Fibroblasten haben, wurden diese beiden Konditionen außerdem in Kombination mit TGF-β zu der Versuchsreihe hinzugefügt. Das Low-FBS-Medium hat dabei keinen Effekt auf die TGF-β-vermittelte Stimulation der Fibroblastendifferenzierung im Vergleich zu der Versuchsgruppe, die lediglich mit TGF-β, das in Assay-Medium gelöst war, behandelt wurde (p = 0,164). Auffällig dahingegen ist, dass die Gruppe, welche mit TGF-β und p38 MAPK-Inhibitor behandelt wurde, eine signifikant geringere MFI von α-SMA aufweist, als die Gruppe, welche ausschließlich mit TGF-β behandelt wurde (p = 0,037).

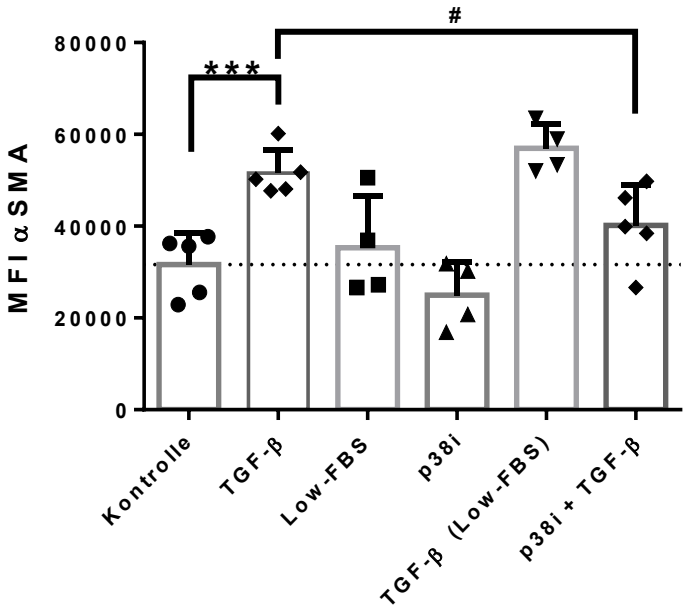


Abb. 5: Differenzierungsverhalten kultivierter Fibroblasten in Abhängigkeit unterschiedlicher Kultivierungsmedien. Wiedergabe der *mean fluorescence intensity* (MFI) von α-SMA (y-Achse) nach der Analyse von unterschiedlich behandelten Fibroblasten mithilfe einer Druchflusszytometrie. Auf der x-Achse befinden sich sechs verschiedene Behandlungskonditionen. *** p = 0,0005, # p = 0,0372

Schlussfolgernd lässt sich also sagen, dass die Fibroblasten nach elftägiger Kultivierung bereits ein gewisses α-SMA-Expressionsniveau aufweisen. Ob dieser Effekt durch die Kultivierung selbst bedingt ist oder ob Fibroblasten auch unter physiologischen *in-vivo*-Bedingungen teilweise differenziert sind, wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit untersucht (siehe Kapitel 3.2.3). TGF-β stimuliert in beiden Fällen (auch gelöst in Low-

FBS-Medium) deutlich die α-SMA-Expression und ist somit als Positivkontrolle zur Feststellung des Differenzierungspotenzials von Fibroblasten geeignet. Außerdem kann festgehalten werden, dass Low-FBS-Medium als Einzelbehandlung oder in Kombination mit TGF-β keinen Einfluss auf die MFI von α-SMA hat. Daher wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit ausschließlich das Assay-Medium mit einer Serumkonzentration von 10 % FBS als Grundmedium verwendet, welches auch in der Literatur als Kultivierungsmedium dient (Stellato et al., 2019, Baranyi et al., 2019, Shinde et al., 2017, Tomasek et al., 2013). Der p38 MAPK-Inhibitor unterdrückt signifikant die TGF-β-initiierte α-SMA-Expression und bewirkt auch als Einzelbehandlung eine deutliche, wenngleich nicht signifikante Verringerung der α-SMA-Expression von Fibroblasten im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Da in den immunhistochemischen Färbungen der Fibroblasten der Eindruck entstand, dass einzelne Zellen mit mehr α-SMA-Filamenten weniger Vimentin ausprägen und vice versa, wurde in dieser Versuchsreihe auch eine mögliche Korrelation zwischen den MFI's von α-SMA und Vimentin untersucht. Abbildung 6 zeigt, dass es keine Korrelation zwischen den Fluoreszenzwerten gibt. Der MFI-Wert von Vimentin wurde daher in den nachfolgenden Versuchen nicht weiter untersucht.

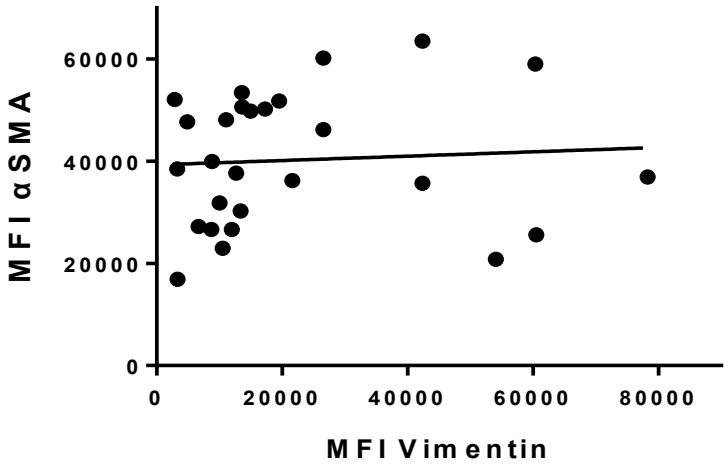


Abb. 6: Verhältnis zwischen den MFI's von α-SMA und Vimentin aus den sechs Behandlungskonditionen der ersten Serie. Auf der y-Achse ist die MFI von α-SMA dargestellt, auf der x-Achse die von Vimentin.

3.2.2 qPCR – Auswertung der 1. Serie

Um die zentralen Ergebnisse aus der FACS-Analyse in einem zweiten Ansatz zu überprüfen, wurden vier der sechs Konditionen mithilfe einer qPCR analysiert (siehe Abb. 7). Es wurde sowohl die Expression des Transkripts ACTA2, das für α-SMA codiert, als auch die von POSTN, das für Periostin codiert, untersucht. Beide Transkripte werden in der Literatur als Marker für differenzierte (Myo-) Fibroblasten verwendet. Die Verhältnisse der unterschiedlichen Transkriptexpressionen der einzelnen Behandlungskonditionen unterscheiden sich zwischen den beiden Genen nur unwesentlich. Die Gabe von TGF-β führt zu einem starken Anstieg der Transkriptexpression um 64 % (p = 0,0069) für ACTA2 bzw. 104 % (p = 0,0279) für POSTN im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Behandlung mittels Low-FBS-Medium führt zu keiner Veränderung der Transkriptexpressionswerte. Eine gleichzeitige Inhibition des p38 MAPK-Signalweges mit der Stimulierung des kanonischen TGF-β-assoziierten SMAD-Signalweges (p38i + TGF-β) führt zu einer deutlichen, wenngleich nicht signifikanten Reduktion der ACTA2- und POSTN-Expression um 21 % bzw. 19 % im Vergleich zu der ausschließlich mit TGF-β behandelten Gruppe.

Da das Low-FBS-Medium sowohl auf Protein- als auch auf Genniveau keinen Einfluss auf die Differenzierung von Fibroblasten nimmt, fand diese Behandlungskondition in nachfolgenden Versuchen keine weitere Verwendung.

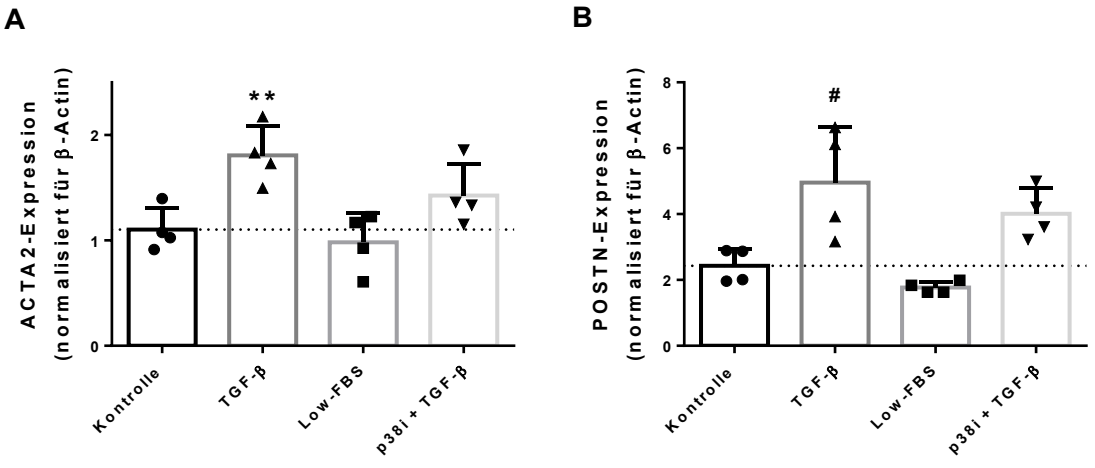


Abb. 7: Wiedergabe der Transkriptexpression von **A** ACTA2, welches für α-SMA codiert und **B** POSTN, welches für Periostin codiert, nach der Analyse von unterschiedlich behandelten Fibroblasten mithilfe einer quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR). Auf der x-Achse befinden sich jeweils vier verschiedene Behandlungskonditionen, während auf der y-Achse die Transkriptexpression dargestellt wird. ** p = 0,0069 (Kondition vs. Kontrolle),
p = 0,0279 (Kondition vs. Kontrolle)

3.2.3 Untersuchung einer möglichen Korrelation der α-SMA-Expression von Fibroblasten mit der Kultivierungsdauer

Um zu untersuchen, ob es sich bei den α-SMA-MFI's der Kontrollgruppen in den vorangegangenen Serien um erhöhte Basalwerte durch den alleinigen Kultivierungsprozess handelt, oder ob diese dem physiologischen Wert im Herzen einer lebenden Maus entsprechen, wurde eine Zeitreihe zur Analyse der Fibroblastendifferenzierung in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer erstellt. Hierzu wurden erneut Fibroblasten aus Mäuseherzen isoliert. Die Zellen wurden anschließend entweder direkt mittels einer FACS-Analyse auf ihre α-SMA-Expression untersucht oder vor der Auswertung zunächst für 2 bzw. 24 Stunden kultiviert. Im Rahmen anderer Versuche geschah die Isolierung nach dem Protokoll von Pinto et al. (siehe auch Kapitel 2.14.1.2) (Pinto et al., 2016). Da die Isolierung von Fibroblasten in den bisherigen Versuchsreihen dieser Arbeit nach Ale-Agha et al. (Ale-Agha et al., 2018) erfolgte, wurden zur Ermittlung der Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse kardiale Fibroblasten nach dem Protokoll von Ale-Agha et al. isoliert und die Zellen für zwei Stunden kultiviert. Die daraus ermittelte MFI von α-SMA ist mit den MFI-Werten von den Zellen, die nach Pinto et al. isoliert und zwei Stunden kultiviert wurden, vergleichbar.

In Abbildung 8 wird der Differenzierungsprozess anhand der α-SMA-Expression in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer exemplarisch dargestellt. Zellen, die CD31-negativ, CD45-negativ und MEFSK-4-positiv waren, wurden als undifferenzierte Fibroblasten definiert. Exprimieren diese Fibroblasten zusätzlich α-SMA, differenzieren sie zu einem myofibroblastären Phänotyp. Bei der Betrachtung der Streudiagramme fällt auf, dass Fibroblasten, welche direkt nach der Isolierung aus dem Herzen analysiert wurden, so gut wie keine α-SMA-positiven Bestandteile aufweisen. Nur vereinzelt konnten direkt nach der Isolierung Anti-α-SMA markierte Zellen detektiert werden. Deutlich ist, dass Fibroblasten, die 2 bzw. 24 Stunden kultiviert wurden, stets mehr α-SMA exprimieren. Es ist also eine Verschiebung der gesamten Zellpopulation in Richtung α-SMA-positiveren Fibroblasten zu beobachten. Interessanterweise nimmt in diesen Zellen ebenfalls die MEFSK-4-Expression zu, sodass auch dieses Protein bei der Kultivierung vermehrt gebildet wird.

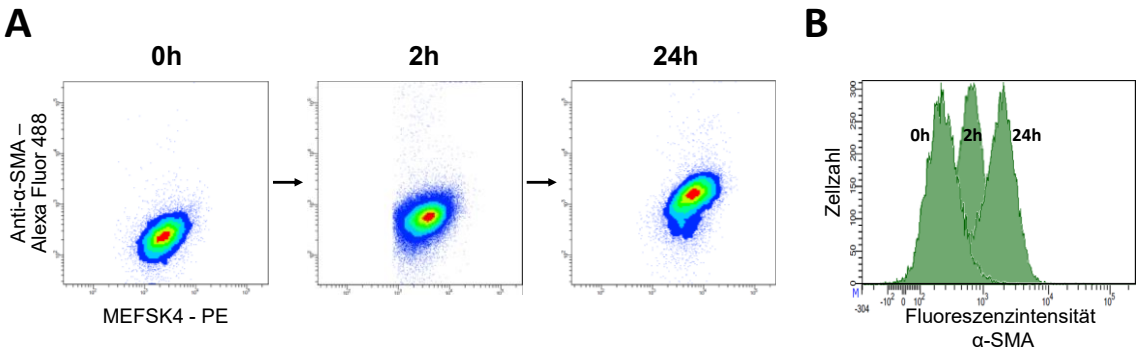


Abb. 8: Exemplarische Darstellung der Untersuchung des Differenzierungsprozesses von Fibroblasten in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer. Die Zellen wurden entweder direkt nach der Isolierung (0h), nach 2-stündiger oder nach 24-stündiger Kultivierung mittels einer Durchflusszytometrie analysiert. **A** Wiedergabe der Fibroblastenpopulation in Abhängigkeit ihres Stimulierungspotenzials im Streudiagramm. **B** Darstellung der Verschiebung der Fluoreszenz-intensiät von α-SMA im Histogramm.

Die Ergebnisse aller untersuchten Herzen werden in Abbildung 9 wiedergegeben. Die mittlere α-SMA-MFI aller getesteten Fibroblastenpopulationen liegt unmittelbar nach der Isolierung bei 405,5 (± 27,62), während sie sich nach zwei Stunden mit einer MFI von 872,5 (± 176,1) verdoppelt und nach 24 Stunden bei 2096 (± 698,8) liegt. Während Fibroblasten direkt nach der Isolierung also so gut wie kein α-SMA exprimieren, lässt sich bereits nach einem Kultivierungstag eine Verfünffachung der α-SMA-Expression nachweisen.

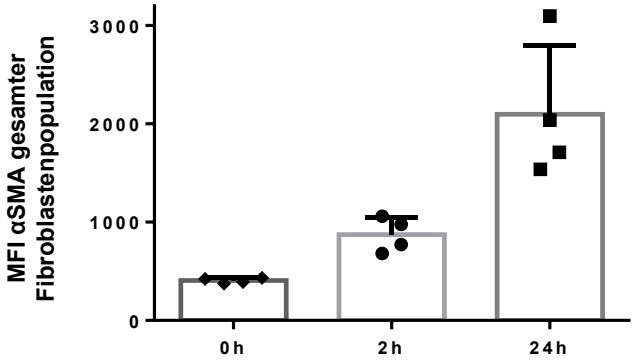


Abb. 9: Zeitreihe zur Untersuchung der Fibroblastendifferenzierung in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer. Auf der y-Achse wird die MFI von α-SMA der gesamten Fibroblastenpopulation, also von undifferenzierten Fibroblasten zuzüglich differenzierter Myofibroblasten, wiedergegeben. Auf der x-Achse sind Fibroblasten dargestellt, welche entweder direkt nach der Isolierung (0h) oder nach 2- bzw. 24-stündiger Kultivierung mithilfe einer Durchflusszytometrie analysiert wurden.

Es lässt sich also schlussfolgern, dass es sich bei den α-SMA-MFI's der Kontrollgruppe aus dem vorangegangenen Experiment (Kapitel 3.2.1) bereits um erhöhte Basalwerte handelt, die der Kultivierung zuzuschreiben sind. Fibroblasten scheinen in dieser Zeit ohne weiteres Zutun graduell zu einem myofibroblastären Phänotyp zu differenzieren. Obwohl die α-SMA-Expression unter Kulturbedingungen also kontinuierlich zunimmt, konnte in der ersten Versuchsreihe dieser Arbeit dennoch gezeigt werden, dass die Fibroblasten der Kontrollgruppe nicht vollständig differenziert sind und weiterhin ein Differenzierungspotenzial aufweisen, wie die Ergebnisse der TGF-β-Behandlung zeigen. Daher wurde auch in der folgenden Serie die α-SMA-MFI als Marker für das Differenzierungsverhalten von Fibroblasten verwendet.

3.3 Einfluss von IGF-1 auf die Differenzierung von Fibroblasten

3.3.1 FACS – Auswertung der 2. Serie

Da die Narbengröße nach einem Herzinfarkt durch die Gabe von IGF-1 reduziert werden konnte, wurde in dieser Versuchsreihe die direkte Wirkung von IGF-1 auf den Differenzierungsprozess von Fibroblasten untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit zwei unterschiedlichen IGF-1-Konzentrationen behandelt. Die Kontrollgruppe hat eine mittlere α-SMA-MFI von 43918 ± 13054 (siehe Abb. 10). Die mit IGF-1 behandelten Gruppen weisen eine verringerte α-SMA-MFI im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. In einer Konzentration von 10 ng/ml reduziert IGF-1 die MFI von α-SMA um ca. 23 % im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Behandlung mittels 100 ng/ml IGF-1 hat einen unwesentlich schwächeren Effekt auf die Verringerung der Fluoreszenzintensität. Beide Ergebnisse erweisen sich allerdings in der statistischen Analyse als nicht signifikant. Darüber hinaus beeinflusst IGF-1 (10 ng/ml) den stark stimulierenden Effekt von TGF-β im Vergleich zu der Gruppe, die ausschließlich mit TGF-β behandelt wurde, nicht. Die Behandlung mittels TGF-β als Positivkontrolle führt erneut zu einer signifikanten Zunahme der MFI von α-SMA im Vergleich zur Kontrollgruppe (p = 0,002). Da die Behandlung mittels p38 MAPK-Inhibitor in der ersten Serie dieser Arbeit eine deutliche Unterdrückung der Fibroblastendifferenzierung bewirkte, die statistische Analyse aber bei einer geringen n-Zahl keine Signifikanz zeigte, wurde die Behandlungsgruppe dieser Versuchsreihe abermals hinzugefügt. Die „p38i"-Gruppe weist nun im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion der mittleren Fluoreszenzintensität auf (p = 0,0279).

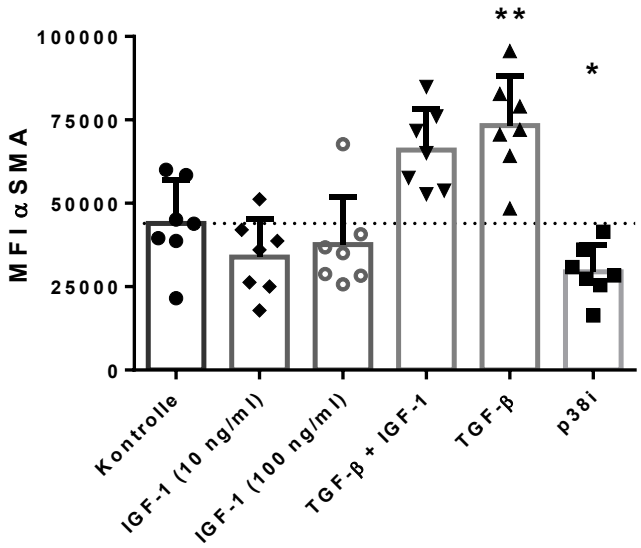


Abb. 10: Einfluss von IGF-1 auf die Fibroblastendifferenzierung. Auf der y-Achse befindet sich die MFI von α-SMA, während auf der x-Achse die verschiedenen Behandlungsgruppen dargestellt werden. * p = 0,0279, ** p = 0,002 (Kondition vs. Kontrolle)

3.3.2 qPCR – Auswertung der 2. Serie

Analog zur ersten Serie sollten die FACS-Ergebnisse auch in dieser Versuchsreihe durch eine zweite Analysemethode bestätigt werden. Daher wurde eine qPCR von allen in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Behandlungskonditionen ausgeführt. In Abbildung 11 wird die Transkriptexpression von ACTA2 und POSTN wiedergeben. Die Expression von ACTA2 befindet sich in den beiden Behandlungsgruppen, welche mit 10 ng/ml bzw. 100 ng/ml IGF-1 behandelt wurden, ungefähr auf dem gleichen Niveau wie bei der Kontrollgruppe. IGF-1 hat auch auf Genniveau keinen Einfluss auf den TGF-β-vermittelten Effekt. Die Zellen, welche ausschließlich mit TGF-β behandelt wurden, weisen erneut eine signifikante Steigerung der ACTA2-Expression auf (p = 0,0003). Die mit p38 MAPK-Inhibitor behandelte Gruppe zeigt in der qPCR keine Verringerung der Transkriptexpression auf, wie man aufgrund der Ergebnisse aus der Durchflusszytometrie hätte vermuten können.

Die POSTN-Expression unterscheidet sich von der ACTA2-Expression dahingehend, dass die Transkriptexpression durch die Behandlung mit IGF-1 in einer Konzentration von 10 ng/ml bzw. 100 ng/ml signifikant gesteigert wird, nämlich um den Faktor 2,7 (p = 0,0013) bzw. 1,7 (p = 0,0373). IGF-1 verursacht außerdem auch in Kombination mit TGF-β eine weitere Steigung der POSTN-Expression im Vergleich zu Fibroblasten, die ausschließlich mit TGF-β behandelt wurden (p = 0,0631).

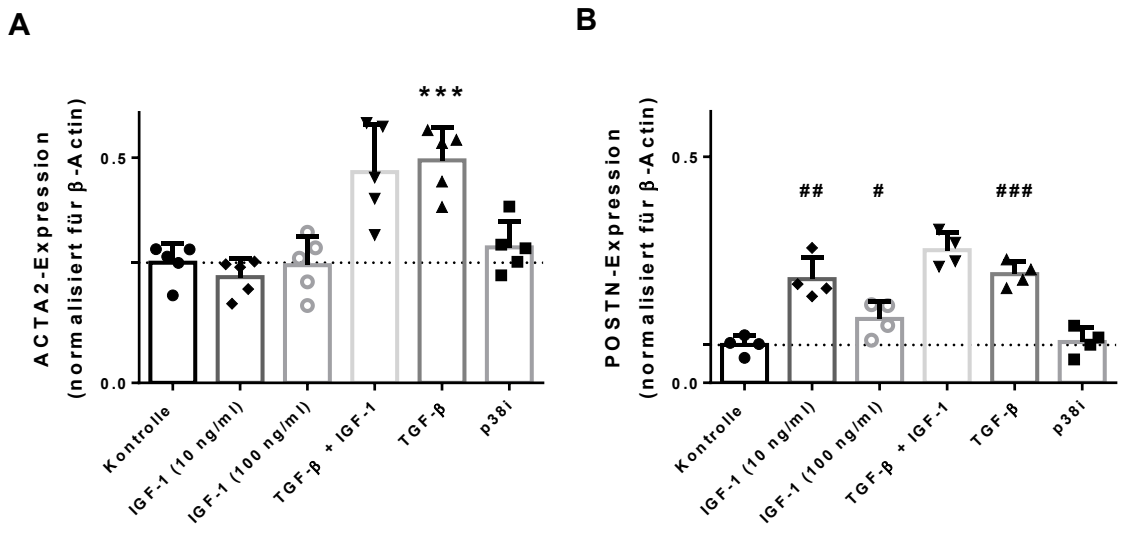


Abb. 11: Darstellung der Transkriptexpression von **A** ACTA2 und **B** POSTN nach der Analyse von unterschiedlich behandelten Fibroblasten mithilfe einer qPCR. Auf der x-Achse befinden sich jeweils sechs verschiedene Behandlungskonditionen, während auf der y-Achse die Transkriptexpression dargestellt wird. *** p = 0,0003 (Kondition vs. Kontrolle),
p = 0,0001, ## p = 0,0013, # p = 0,0373 (Kondition vs. Kontrolle)

3.4 Der Effekt von Überständen M1-, M2- und IGF-1-polarisierter Makrophagen auf die Differenzierung von Fibroblasten

3.4.1 FACS – Auswertung der 3. Serie

In Ergänzung zur 2. Serie, in welcher ein möglicher direkter Effekt von IGF-1 auf die Fibroblastendifferenzierung untersucht wurde, soll in der 3. Serie ein indirekter, Makrophagen-vermittelter Effekt auf die α-SMA-Expression muriner kardialer Fibroblasten untersucht werden. Hierzu wurden Überstände von Makrophagen, die im Vorhinein unterschiedlich polarisiert wurden, zu den kultivierten Fibroblasten hinzugegeben. „Pol“ steht in Abbildung 12 für Fibroblasten, welche zu einem gewissen Teil mit Medium, das zur Polarisierung von Makrophagen verwendet wird, behandelt wurden. „Sup“ steht für Überstände (*supernatants*) von unterschiedlich polarisierten Makrophagen, die zu einem gewissen Teil zu den Fibroblasten hinzugegeben wurden. Für die genaue Zusammensetzung der Konditionen und den Versuchsverlauf dieser Serie siehe Kapitel 2.14.3. Eine Polarisationsgruppe stellt hierbei die Kontrolle der Versuchsgruppe dar, welche mit dem entsprechenden Überstand bereits polarisierter Makrophagen behandelt wurde (bspw. Sup M1 vs. Pol M1). Da die im Polarisierungsmedium enthaltenen Substanzen bereits einen Effekt auf die Differenzierung von Fibroblasten ausüben könnten, wurde in dieser Serie mit einem doppelten Kontrollgruppenansatz gearbeitet. Hierbei enthält die „Kontrolle“ keine Polarisierungssubstanzen oder parakrine Faktoren aus Makrophagenüberständen.

Bevor die einzelnen Ergebnisse präsentiert werden, ist es wichtig sich zu vergegenwärtigen, dass die Laser-Einstellungen aus dieser Serie aus bereits genannten Gründen nicht mit denen aus den vorherigen Versuchen übereinstimmen (siehe Kapitel 2.14.3). Die absoluten MFI-Werte können daher nicht direkt mit denen aus den ersten beiden Serien verglichen werden.

Die mit M1-Überstand behandelten Fibroblasten zeigen eine signifikante Reduktion der MFI von α-SMA ($p = 0{,}0031$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Abb. 12). Fibroblasten, welche lediglich mit M1-Polarisierungsmedium behandelt wurden, weisen dahingegen fast den gleichen MFI-Wert wie die Kontrollgruppe auf. Dies spricht für einen inhibierenden Effekt des M1-Überstandes auf die Fibroblastendifferenzierung. Sowohl die Polarisierungsmedien als auch die Überstände der M2- und IGF-1-Gruppen inhibieren signifikant die α-SMA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Allerdings lässt sich kein Unterschied in der Wirkung zwischen dem Polarisierungsmedium und dem Überstand innerhalb einer Gruppe feststellen (Pol M2 vs. Sup M2 & Pol IGF-1 vs. Sup IGF-1). Dies spricht dafür, dass es die im Polarisierungsmedium und Überstand

enthaltenen Polarisierungssubstanzen IL-4 (M2) und IGF-1 selbst sind, welche die Fibroblastendifferenzierung unterdrücken. Daher wurde eine Kondition, die ausschließlich mit Assay-Medium und 10 ng/ml IL-4 behandelt wurde, zu dieser Versuchsreihe hinzugefügt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe bewirkt diese Behandlung eine signifikante Verringerung der MFI von α-SMA um 34,8 % (p = 0,0001), was auf den direkten, inhibierenden Effekt von IL-4 auf die Fibroblastendifferenzierung hindeutet. Außerdem auffällig ist der inhibierende Effekt von IGF-1, denn schon das Medium, das lediglich Polarisierungsmedium und IGF-1 enthielt, führt zu einer Reduktion der α-SMA-Expression um ca. 24 %, während der Überstand von IGF-1 polarisierten Makrophagen keine zusätzliche Verringerung der MFI nach sich zieht. Auch in diesem Fall lässt sich daraus schließen, dass der Effekt dem IGF-1 selbst zuzuschreiben ist. Während in der zweiten Serie bereits ein deutlicher Trend in Richtung einer Verringerung der α-SMA-MFI nachgewiesen werden konnte, lies sich in dieser Versuchsreihe ein signifikanter Effekt der „Pol IGF-1"-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen (p = 0,0028).

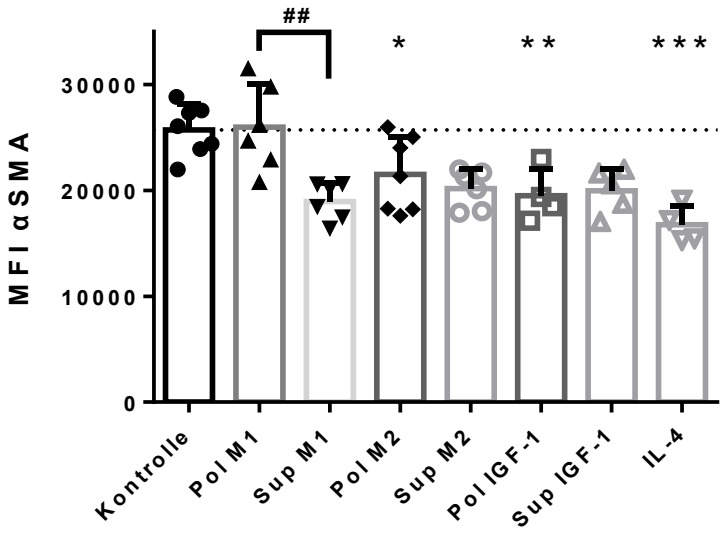


Abb. 12: Der Effekt von Überständen unterschiedlich polarisierter Makrophagen auf die Expression von α-SMA in Fibroblasten. Auf der y-Achse befindet sich die MFI von α-SMA, während auf der x-Achse die verschiedenen Behandlungsgruppen dargestellt werden.
* p = 0,0228, ** p = 0,0028, *** p = 0,0001 (Kondition vs. Kontrolle), ## p = 0,0031

3.4.2 qPCR – Auswertung der 3. Serie

Da es technisch nicht möglich war, fünf Behandlungskonditionen (in Dubletten) in einer 96-Well-Mikroreaktionsplatte auf die Trankskriptexpression von ACTA2 bzw. POSTN zu untersuchen, wurden die unterschiedlichen Gruppen so aufgeteilt, dass jeweils zwei Konditionen auf einmal mit der Kontrollgruppe verglichen werden konnten (siehe

Abb. 13). Die Kontrollgruppe bestand dabei immer aus den gleichen vier Versuchsproben. TGF-β verursacht erneut eine signifikante Steigerung der Transkriptexpression von ACTA2 (p = 0,0035) und auch die POSTN-Expression wird durch diese Substanz signifikant stimuliert (p = 0,0252). Der Überstand von M1-polarisierten Makrophagen (Sup M1) hat dahingegen auf Genniveau keine Veränderung der beiden Transkriptexpressionswerte zur Folge. Auch IGF-1 gelöst in Polarisierungsmedium oder 10 ng/ml IL-4 in Assay-Medium haben, im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der Durchflusszytometrie, keinen Einfluss auf die ACTA2-Expression von Fibroblasten. Betrachtet man für diese beiden Konditionen dahingegen die Transkriptexpression von POSTN, fällte eine tendenzielle Steigerung ebendieser in der mit IGF-1-Polarisierungsmedium behandelten Gruppe auf und eine signifikante Zunahme des mittleren Expressionswertes in IL-4 behandelten Fibroblasten (p = 0,0041).

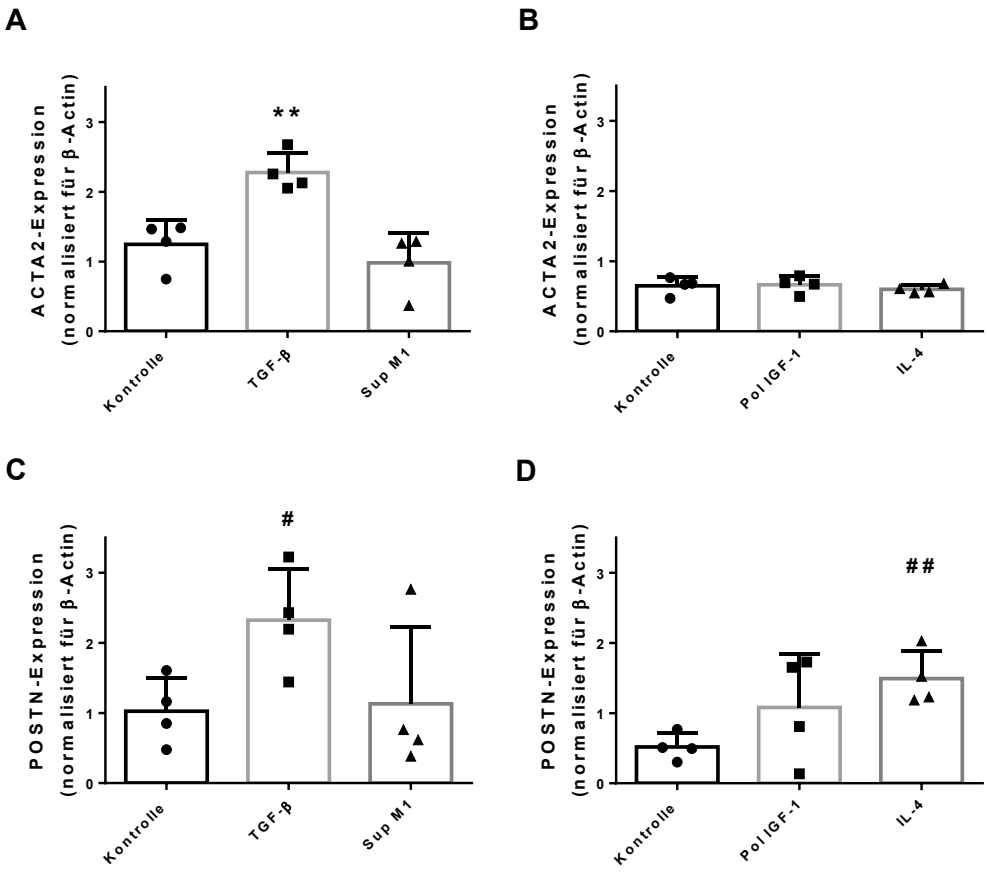


Abb. 13: Darstellung der Transkriptexpression von ACTA2 (**A**, **B**) und POSTN (**C**, **D**) von unterschiedlich behandelten Fibroblasten mithilfe einer qPCR. Auf der x-Achse befinden sich pro Graph jeweils zwei unterschiedliche Behandlungskonditionen und eine Kontrollgruppe, während auf der y-Achse die Transkriptexpression dargestellt wird.
** p = 0,0035 (Kondition vs. Kontrolle), # p = 0,0252, ## p = 0,0041 (Kondition vs. Kontrolle)

3.5 *In-vivo*-Untersuchung von Infarktherzen

3.5.1 *In-vivo*-Untersuchung mittels FACS-Analyse

In einem neuen Versuchsansatz galt es zunächst zu untersuchen, ob die Induktion eines Infarktes im direkten Vergleich zu Herzen ohne Infarkt (Basalherzen) zu einer gesteigerten Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten führt. Während in Basalherzen so gut wie keine α-SMA-exprimierenden (Myo-) Fibroblasten detektiert werden konnten (siehe Abb. 8), fällt in Infarktherzen nun deutlich eine zusätzliche Myofibroblastenpopulation auf. Fibroblasten, welche zuvor aus Infarktherzen isoliert wurden, lassen sich nun erstmals in zwei Subpopulationen unterteilen, nämlich in (undifferenzierte) Fibroblasten und differenzierte Myofibroblasten (siehe Abb. 14, A).

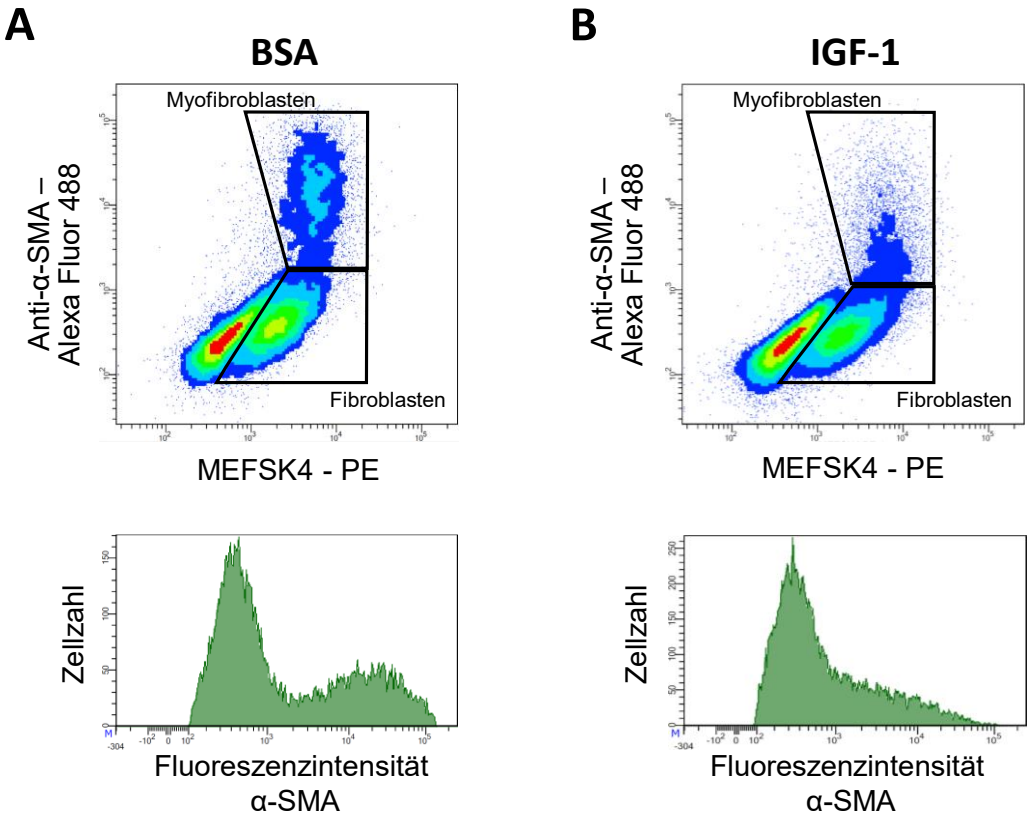


Abb. 14: Exemplarische Darstellung eines Streudiagramms und Histogramms eines **A** mit BSA behandelten Infarktherzens und **B** mit IGF-1 behandelten Infarktherzen zur Untersuchung des Myofibroblastenanteils mithilfe einer Durchflusszytometrie.

Darüber hinaus wurde im Kontext dieser Versuchsreihe untersucht, ob die Behandlung eines Infarktherzens mittels IGF-1 den Myofibroblastenanteil im Vergleich zu Infarktherzen, die mit BSA behandelt wurden, verringern kann. Hierzu wurde die Gesamtheit der Fibroblasten in Abhängigkeit ihrer α-SMA-Expression in zwei Gruppen unterteilt, nämlich in Fibroblasten und Myofibroblasten (siehe Abb. 14). Auf diese Weise konnte der prozentuale Anteil von Myofibroblasten in Relation zur gesamten Fibroblastenpopulation ermittelt werden. Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, bewirkt die Behandlung von Infarktherzen mittels IGF-1 eine signifikante Reduktion des Myofibroblastenanteils um 23,6 % im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche mit BSA behandelt wurde ($p = 0{,}044$). *In vivo* scheint IGF-1 daher den Differenzierungsprozess von Fibroblasten nach einem Myokardinfarkt signifikant zu reduzieren. Somit konnte die zuvor ermittelte Wirkung von IGF-1 auf die Fibroblastendifferenzierung aus den *in-vitro*-Versuchen auch im Infarktmodell bestätigt werden.

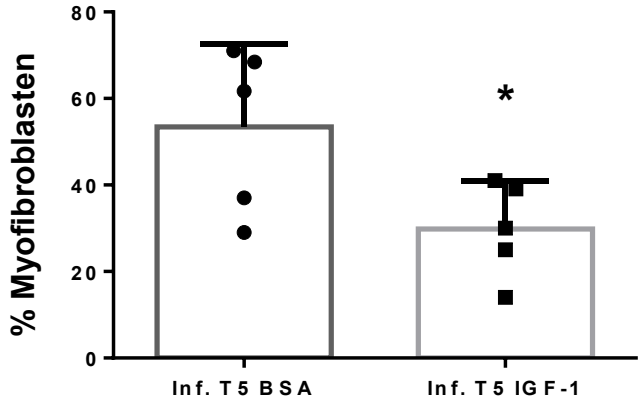


Abb. 15: Untersuchung des Myofibroblastenanteils in murinen Infarktherzen in Abhängigkeit der Behandlung. Nach Induktion eines Infarktes wurden die Herzen für drei Tage entweder mit BSA oder mit IGF-1 behandelt und am fünften Tag mittels einer Durchflusszytometrie analysiert. * $p = 0{,}044$ (Behandlung vs. Kontrolle)

3.5.2 *In-vivo*-Untersuchung mittels immunhistochemisch gefärbter Kryostat-Schnitte

Aus den vorangegangenen Experimenten dieser Arbeit wurde deutlich, dass Fibroblasten direkt nach ihrer Isolierung aus gesunden Herzen so gut wie kein α-SMA exprimieren (vergl. Abb. 8). Induziert man jedoch einen Infarkt, konnte mithilfe der Durchflusszytometrie eine deutlich abgrenzbare, α-SMA-positive (Myo-) Fibroblastenpopulation dargestellt werden (siehe Abb. 14, A). Daher liegt die Vermutung nahe, dass diese neue Myofibroblastenpopulation im Narbengebiet angesiedelt sein könnte. Eine alternative Hypothese wäre, dass die Infarzierung eine Zunahme der Wandspannung im Remote-Gebiet zur Folge hat, wodurch es in diesem Teil des Myokards kompensatorisch zu einer gesteigerten Fibroblastenproliferation bzw. -differenzierung kommen könnte. Dies wirft die Frage auf, ob die α-SMA-exprimierenden Myofibroblasten im Myokard lokalisiert werden können. Hierzu wurden histologische Kryostat-Schnitte von einem Basalherzen ohne Infarkt und von Herzen fünf Tage nach Infarkt angefertigt und während einer immunhistochemischen Färbung mit Antikörpern markiert (siehe Abb. 16). Wenn man nun mithilfe eines Fluoreszenzmikroskopes das Remote-Gebiet des Basal- und Infarktherzens betrachtet, erkennt man viele Nuclei ungefärbter Zellen und vereinzelt Endothelzellen, welche aufgrund ihrer intrazellulären α-SMA-Komponenten ebenfalls rot koloriert sind. Zwischen den Zellen liegen dünne grüne Strukturen, die vermutlich Vimentin aus Fibroblasten widerspiegeln. Das Narbengebiet des Infarktherzens dahingegen ist überraschenderweise nicht, wie im Vorhinein angenommen, durch einen hohen Myofibroblastenanteil rot gefärbt. Das Gegenteil ist der Fall, die Narbe selbst ist ausschließlich grün, während die Border Zone, also das Grenzgebiet, das die Narbe umgibt, rot gefärbt ist. Außerdem gibt es keine Hinweise darauf, dass sich vermehrt Myofibroblasten im Remote-Gebiet befinden. Das der Narbe entfernte Gebiet gleicht in seiner zellulären Komposition dem gesunden Myokard des Basalherzens ohne Infarkt (vergl. Abb. 16, A & B). Die rötliche Färbung der ventralen Seite des linken Ventrikels des Infarktherzens (siehe Abb. 16, B) könnte auf einen Gewebeschaden durch die Operation bzw. die Exposition des Herzgewebes an die Außenluft zurückzuführen sein.

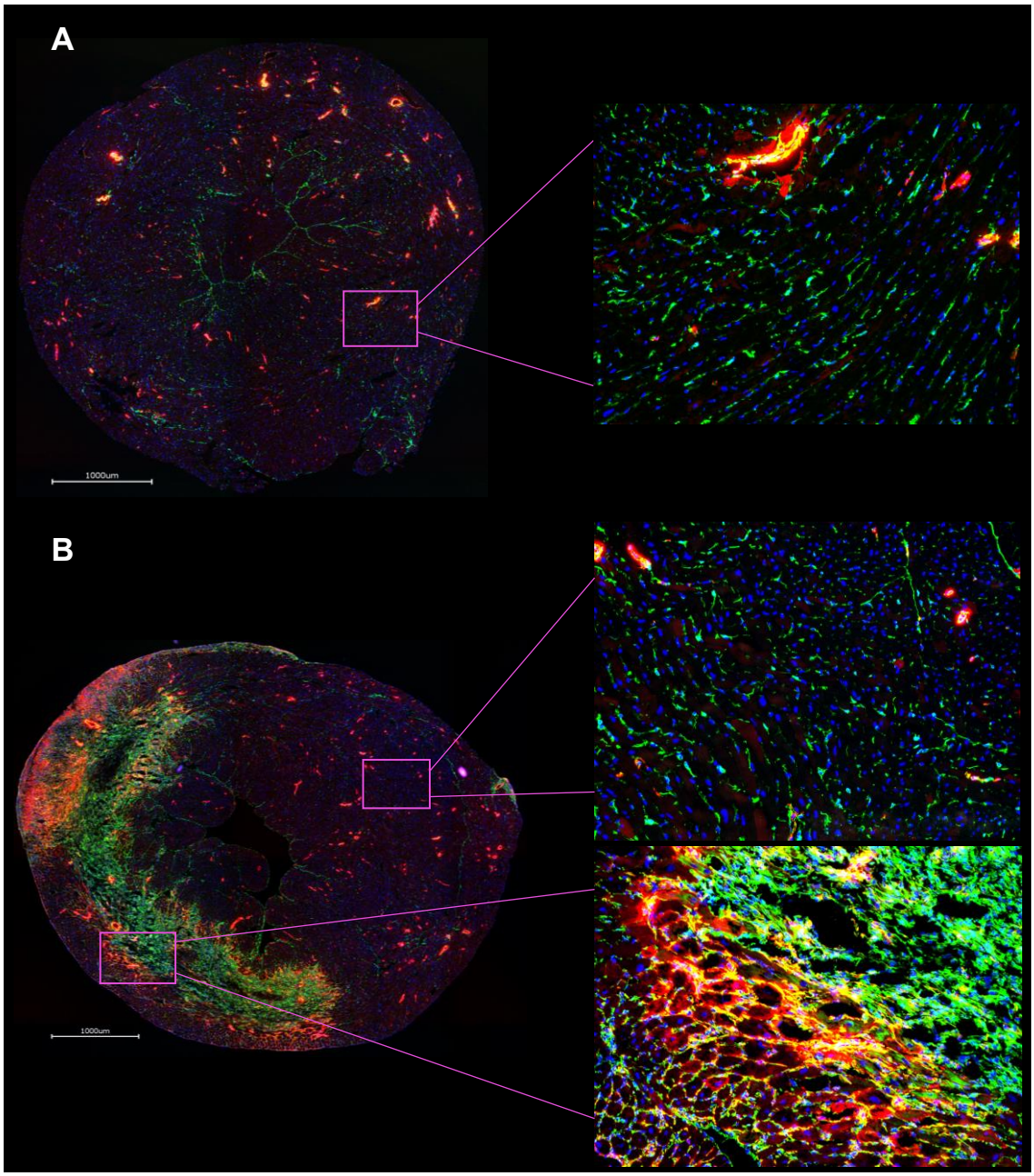


Abb. 16: Antiköper markierte Kryostat-Schnitte von **A** einem Basalherzen ohne Infarkt und **B** einem Herzen 5 Tage nach Induktion eines Myokardinfarktes. In blau sind die Nuclei aller Zellen abgebildet, Vimentin wurde mit einem grün-fluoreszierenden und α-SMA mit einem rot-fluoreszierenden Antikörper markiert. Die vergrößerten Bildausschnitte sind in 20-facher Vergrößerung aufgenommen worden.

4 Diskussion

Für den insulinähnlichen Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) wurden sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen kardioprotektive Effekte beschrieben (Troncoso et al., 2014, Buerke et al., 1995), wobei die anti-apoptotischen und entzündungshemmenden Eigenschaften von IGF-1 die Infarktgröße zu verringern und die linksventrikuläre Remodellierung nach einem Myokardinfarkt zu verbessern scheinen (Conti et al., 2011). Wie genau IGF-1 den Remodelingprozess moduliert, ist dabei noch unklar. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine IGF-1-Gabe zu einer Reduktion der Narbengröße nach einem Herzinfarkt führt (Heinen et al., 2019). Da (Myo-) Fibroblasten als wichtige Mediatoren der Fibrosierung nach einem Myokardinfarkt gelten, stellt sich die Frage, ob die Reduktion der Narbengröße auf eine direkte oder indirekte Beeinflussung des Differenzierungsprozesses von kardialen Fibroblasten durch IGF-1 zurückzuführen ist. Um den Einfluss von IGF-1 im Hinblick auf die Fibroblastendifferenzierung in adulten Mäuseherzen zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit murine kardiale Fibroblasten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (unter Basal- und Infarktbedingungen) untersucht. Die wesentlichen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- IGF-1 inhibiert die Fibroblastendifferenzierung *in vitro*.
- Es gibt deutliche Hinweise auf einen inhibierenden Einfluss von IGF-1 auf die TGF-β-initiierte Differenzierung von Fibroblasten.
- Aus dem Versuchsansatz dieser Arbeit ergeben sich keine Hinweise auf eine indirekte, Makrophagen-vermittelte Beeinflussung der Fibroblastendifferenzierung durch IGF-1.
- Eine IGF-1-Therapie nach einem akuten Myokardinfarkt führt zu einer Reduktion des Myofibroblastenanteils *in vivo*.

4.1 IGF-1 inhibiert die Fibroblastendifferenzierung *in vitro*

Die Behandlung muriner kardialer Fibroblasten mittels IGF-1 verringert in den Zellkulturversuchen dieser Arbeit deutlich die α-SMA-Expression, was auf eine Reduktion der Transdifferenzierung zu Myofibroblasten hindeutet. Obwohl bekannt ist, dass Fibroblasten den IGF-1-Rezeptor (IGF1R) exprimieren und auf diesen Stimulus reagieren können, liegen über die Rolle von IGF-1 bei der Fibrose nur wenige endgültige Informationen vor (Sell et al., 1993). Interessanterweise ergeben sich Hinweise aus der

Literatur, dass IGF-1 unterschiedliche Effekte auf die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten ausübt. In einer Studie von Chetty et al. verdoppelten humane fetale Fibroblasten aus der Lunge die Synthese von α-SMA, nachdem diese mit IGF-1-behandelt worden waren (Chetty et al., 2006). In einer anderen Studie zeigten IGF-1-behandelte humane Colonfibroblasten ebenfalls einen leichten, aber dennoch signifikanten Anstieg der α-SMA-Expression (Simmons et al., 2002). Im Gegensatz dazu wurde die α-SMA-Expression in primären menschlichen Hornhautfibroblasten durch IGF-1 nicht beeinflusst (Izumi et al., 2006). Ein interessanter Befund der Arbeitsgruppe von Sarenac et al. war, dass IGF-1 die Kernlokalisierung von SMAD3 in humanen Keratozyten inhibiert (Sarenac et al., 2016). Durch diese Unterdrückung des TGF-β-assoziierten SMAD-Signalweges konnte eine weitere Transdifferenzierung zu Myofibroblasten verhindert werden. Der direkte Vergleich der genannten Studien mit den Ergebnissen dieser Arbeit gestaltet sich allerdings als schwierig, da Fibroblasten verschiedener Spezies, Organe und Entwicklungsstadien untersucht wurden und diese offenbar unterschiedlich auf IGF-1 reagieren (Diaz-Araya et al., 2003). In einer rezenten Studie von Farbehi et al. wurden 30.000 individuelle Zellen aus gesunden und verletzten Mäuseherzen mithilfe einer Einzelzell-RNA-Sequenzierung untersucht. Dabei wurden acht Fibroblastenpopulationen definiert, und es ist deutlich zu erkennen, in welch unterschiedlichem Maße diese Subpopulationen ACTA2, welches einen Marker für Myofibroblasten darstellt, exprimieren (Farbehi et al., 2019). Es wäre daher möglich, dass diese Untergruppen innerhalb ein und derselben Fibroblastenpopulation individuell auf die Behandlung mittels IGF-1 reagieren. Dazu kommt, dass auch die Matrixeigenschaften der Kultivierungsplatte einen Einfluss auf die Fibroblastendifferenzierung mittels IGF-1 zu nehmen scheinen. Während IGF-1 in einer Studie von Hung et al. bei der Kultivierung auf einem steifen Substrat zu keiner Veränderung der Transkriptexpression von ACTA2 oder Genexpression von α-SMA in murinen pulmonalen Fibroblasten beitrug, induzierte es dahingegen die ACTA2-Expression unter weichen extrazellulären Matrixbedingungen (Hung et al., 2013). Da Fibroblasten darüber hinaus aus einer Vielzahl an Vorläuferzellen entspringen können (siehe Einleitung) und diese außerdem in Abhängigkeit des (patho-) physiologischen Kontexts unterschiedliche Funktionen aufweisen, ist ein direkter Vergleich derartig dynamischer und komplexer Wirkungsmechanismen unter vereinfachten Zellkulturbedingungen nur bedingt möglich. Wie Fibroblasten im interstitiellen Zellverband auf einen exogenen Stimulus wie IGF-1 reagieren, kann sich daher nur im *in-vivo*-Modell zeigen.

Neben dem direkten Effekt von IGF-1 auf die Fibroblastendifferenzierung wurde in dieser Arbeit auch der Einfluss von IGF-1 auf das Differenzierungsverhalten von TGF-β-stimulierten Fibroblasten untersucht. Hierbei zeigte sich ein deutlicher Trend dahingehend, dass IGF-1 zu einer Inhibierung der TGF-β-initiierten Differenzierung von Fibroblasten führt. Dies könnte als Hinweis darauf gewertet werden, dass IGF-1 nicht nur unter normalen Kulturbedingungen, sondern auch unter Stimulationsbedingungen einen inhibierenden Effekt auf die Fibroblastendifferenzierung hat. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung zu Simmons et al., die festgestellt haben, dass die α-SMA-Expression durch die kombinierte Behandlung mittels IGF-1 und TGF-β in geringem Maße unterdrückt wird im Vergleich zu der Zellgruppe, die ausschließlich mit TGF-β behandelt wurde (Simmons et al., 2002, Hung et al., 2013). Demgegenüber hatte IGF-1 in einer Studie van Hung et al. keinen Einfluss auf die TGF-β-vermittelte Fibroblastendifferenzierung (Hung et al., 2013).

Die große Variabilität in den Befunden der verschiedenen Arbeitsgruppen durch methodische Unterschiede in den *in-vitro*-Modellen erschwert die Übertragbarkeit auf die Ergebnisse dieser Arbeit. Außerdem scheint es eine Vielzahl an Subpopulationen von Fibroblasten zu geben, die ihrerseits individuell ACTA2 exprimieren. Die Untersuchung der α-SMA-Expression nach dem Kultivierungsprozess ist eine vereinfachte Methode, um den Differenzierungsvorgang von Fibroblasten zu untersuchen. Dennoch führt die direkte Behandlung muriner kardialer Fibroblasten mittels IGF-1 im Versuchsmodell dieser Arbeit deutlich und ausnahmslos zu einer Verringerung der α-SMA-Expression. Zusätzlich konnte kongruent zu diesen Ergebnissen eine Verringerung des Myofibroblastenanteils im Infarktherzen nach IGF-1-Behandlung festgestellt werden. Das *in-vitro*-Modell scheint daher durchaus als erstes vereinfachtes Testsystem dienen zu können.

4.2 Keine Hinweise auf eine indirekte, Makrophagen-vermittelte Beeinflussung der Fibroblastendifferenzierung durch IGF-1

Neben neutrophilen Granulozyten, Epithelzellen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren beeinflussen auch Makrophagen die Fibrose, indem sie auf den Differenzierungsprozess von Fibroblasten zu Myofibroblasten einwirken (Baranyi et al., 2019). Unsere Arbeitsgruppe konnte in einem Mausmodell zeigen, dass die verbesserte Pumpfunktion des Herzens nach dreitägiger Behandlung mit IGF-1 nach einem Myokardinfarkt über myeloide Zellen vermittelt wird. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Makrophagen unter dem Einfluss von IGF-1 *in vitro* einen anti-inflammatorischen bzw. reparativen,

M2-artigen Phänotyp ausprägen. Die IGF-1-Behandlung trug außerdem signifikant zur Verringerung der Narbengröße nach dem Myokardinfarkt bei. Da diese Verringerung nicht in der akuten, sondern erst in der subakuten Phase eine Woche nach Induktion des Herzinfarktes beobachtet werden konnte, obwohl IGF-1 bereits vier Tage vor Auswertung der Narbengröße nicht mehr verabreicht wurde (Heinen et al., 2019), stellt sich nun die Frage, ob die Reduktion der Narbengröße durch IGF-1 womöglich indirekt über myeloide Zellen, im Besonderen durch Makrophagen, vermittelt bzw. beeinflusst wird. Die Polarisierung der Makrophagen mittels IGF-1 könnte möglicherweise mit einer Veränderung des Zytokinsekretionsprofils durch neu entstandene M2-Makrophagen einhergehen und eine Inhibierung der Fibroblastendifferenzierung nach sich ziehen. Es scheint nämlich wahrscheinlich, dass kardiale Fibroblasten in Abhängigkeit des Zytokinmilieus, in dem sie sich befinden, verschiedene Funktionen ausüben können und somit in unterschiedlichem Maße Einfluss auf die Narbenbildung nehmen (Humeres et al., 2016).

In der Ergebnisauswertung dieser Arbeit gibt es keine Hinweise auf eine indirekte, Makrophagen-vermittelte Beeinflussung der Fibroblastendifferenzierung durch IGF-1, denn Zellüberstände IGF-1-polarisierter (M2-) Makrophagen verändern die α-SMA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht. Auch Überstände mittels IL-4 polarisierter M2-Makrophagen haben keinen Einfluss auf die Fibroblasten-differenzierung. Auffälligerweise gelten M2-artige Makrophagen in der Literatur allgemein als Mediatoren der Transdifferenzierung zu Myofibroblasten (O'Rourke et al., 2019, Witherel et al., 2019). Dies würde gegen die Hypothese sprechen, dass M2-artige Makrophagen zur Verringerung der Narbenbildung beitragen. Bei genauerer Literaturrecherche fällt allerdings auf, dass der Makrophagen-Phänotyp mehr Plastizität aufzeigt als bisher angenommen. Während sich das M1/M2-Paradigma als vorläufige Unterteilung der Immunzellen als nützlich erweist, repräsentiert diese Klassifikation lediglich zwei Extreme eines Kontinuums aktivierter Zustände (O'Rourke et al., 2019). Die M2-Makrophagen lassen sich in verschiedene Subgruppen unterteilen (Hesketh et al., 2017). Zum Beispiel werden M2a-Makrophagen durch IL-4 und IL-13 induziert und weisen einen vorwiegend entzündungshemmenden Phänotyp auf, der hohe Mengen an IL-10- und IL-1-Rezeptorantagonisten zur Dämpfung der Entzündungsreaktion sekretiert. M2b-Makrophagen zeigen dahingegen sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften und produzieren IL-1β, Tumornekrosefaktor α (TNFα) und IL-6 sowie IL-10 als Reaktion auf eine LPS-Stimulation. M2c-Makrophagen werden durch IL-10 induziert und sezernieren hohe Mengen an TGF-β (O'Rourke et al., 2019). Da die Makrophagen in dieser Arbeit unter anderem mithilfe von IL-4 zu M2-artigen

Makrophagen polarisiert worden sind, könnte man aus obigen Erkenntnissen schließen, dass hierdurch ein anti-inflammatorischer M2a-Phänotyp induziert wurde. Es könnte spekuliert werden, dass IGF-1-polarisierte Makrophagen ebenfalls einen M2a-Phänotyp ausprägen, da die Überstände ebendieser vergleichbare Effekte zu denen der IL-4-polarisierten Makrophagenüberstände in Bezug auf die Fibroblastendifferenzierung erzielen. Eine solche M2a-Polarisierung durch IGF-1 könnte im Infarktmodell zu einer Verringerung der Narbengröße durch eine vorzeitige Eindämmung der Entzündungsreaktion führen. Allerdings ist die Festlegung der Makrophagensubphänotypen, wie bereits erwähnt, abhängig vom individuellen Zytokinsekretionsprofil, welches in dieser Arbeit nicht untersucht wurde. Da also nicht bekannt ist, um welche speziellen Subphänotypen es sich bei den IL-4- und IGF-1-polarisierten Makrophagen handelt, gestaltet sich eine fundierte Interpretation der Ergebnisse als schwierig. Dazu kommt, dass es sich bei den Experimenten dieser Arbeit um vereinfachte *in-vitro*-Versuche handelt, die zwar den Einfluss der durch Makrophagen sezernierten Zytokine auf die Fibroblastendifferenzierung untersuchen, nicht aber die komplexe Wechselwirkung zwischen Immunzellen und Fibroblasten im lebenden Organismus widerspiegeln. Ein optimierter Versuchsansatz könnte hierbei eine kombinierte Anzucht von Makrophagen zusammen mit Fibroblasten in einer Co-Kultur darstellen. Ob eine Makrophagenpolarisierung mittels IGF-1 im Infarktmodell im direkten Zusammenhang mit einer Reduktion der Narbengröße steht, könnte eine interessante Fragestellung in zukünftigen Arbeiten darstellen.

Interessanterweise hat die direkte Behandlung von Fibroblasten mittels IL-4 in dieser Arbeit eine signifikante Reduktion der α-SMA-Expression zur Folge, obwohl IL-4 als ein pro-fibrotisches Zytokin bekannt ist (Atamas, 2002, Humeres et al., 2016). Diverse Studien haben gezeigt, dass IL-4 *in vitro* die α-SMA-Expression von Fibroblasten unterschiedlicher Ursprungsgewebe induziert (Saito et al., 2003, Mattey et al., 1997, Hashimoto et al., 2001, Mattyasovszky et al., 2017). Es ist möglich, dass die gefundenen Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und anderen Studien auf Unterschieden in den experimentellen Ansätzen (Dosierung der verwendeten Polarisierungssubstanzen, Versuchsmodell, Organismus, Zielorgan usw.) zurückzuführen sind. Es erscheint darüber hinaus wahrscheinlich, dass der entwicklungsbedingte Hintergrund von Fibroblasten (Alter, Ursprung etc.) die Reaktion auf ein bestimmtes Zytokinmilieu beeinflusst (Diaz-Araya et al., 2003). Auch die Dauer der Zytokinexposition ist maßgeblich an dem Wirkungsausmaß beteiligt (Mann, 2003). Dass die Umbauprozesse auf so unterschiedliche Weise beeinflusst werden, hebt die dynamische Komplexität des Remodeling nach einem Myokardinfarkt hervor.

Die Behandlung von Fibroblasten mittels M1-polarisierter Makrophagenüberstände führt in dieser Arbeit zu einer signifikanten Unterdrückung der Fibroblastendifferenzierung. Die mit LPS und IFN-γ polarisierten M1-Makrophagen sezernieren die pro-inflammatorischen Zytokine TNFα, IL-1β und IL-6 (Hesketh et al., 2017). TNFα (Wang et al., 2014, Liu et al., 2009) und IL-1β (Bronnum et al., 2013, Palmer et al., 1995) unterdrücken dabei die Fibroblastenproliferation und inhibieren zusätzlich die TGF-β-vermittelte Myofibroblastendifferenzierung. Außerdem aktivieren diese Zytokine residente Fibroblasten, die ihrerseits IL-1β und IL-6 produzieren und auf diese Weise die Entzündungsreaktion verstärken (O'Rourke et al., 2019). Die durch IL-6 aktivierten Fibroblasten sorgen darüber hinaus für die Freisetzung von Matrix Metalloproteasen (MMPs), wodurch Matrixbestandteile und Zelldebris beseitigt werden können (O'Rourke et al., 2019). Es gibt allerdings auch Hinweise darauf, dass IL-6 zu einer Fibroblastenproliferation und Myofibroblastendifferenzierung beiträgt (Wang et al., 2016, Zhou et al., 2015). Da manche der Immunzellen den Phänotyp von sowohl M1- als auch M2-Makrophagen teilen (Hesketh et al., 2017), sezernieren diese oftmals Zytokine beider Makrophagen-Subpopulation. Hierdurch gibt es in der Literatur vermehrt widersprüchliche Aussagen über die pro- und anti-inflammatorischen Eigenschaften einzelner Zytokine. Insgesamt lässt sich festhalten, dass M1-Makrophagen durch ihr Zytokinsekretionsprofil zwar in geringem Maße die anti-inflammatorische Reaktion beeinflussen, hauptsächlich aber den pro-inflammatorischen Prozess nach einer Gewebeschädigung vermitteln.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Überstände IGF-1-polarisierter M2-Makrophagen keinen Einfluss auf die Fibroblastendifferenzierung haben. Auch Überstände mittels IL-4-polarisierter M2-Makrophagen beeinflussen die Fibroblastendifferenzierung nicht. Überstände M1-polarisierter Makrophagen unterdrücken dahingegen signifikant die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Ob diese Wechselwirkungen auch *in-vivo* zu erkennen sind, muss sich noch in zukünftigen Versuchen herausstellen, da bereits gezeigt wurde, dass auch Fibroblasten selbst Einfluss auf die Polarisierung von Makrophagen nehmen (Humeres et al., 2016, Lu et al., 2020).

4.3 IGF-1 verringert den Myofibroblastenanteil im Infarktherzen

Murine kardiale Fibroblasten werden in den *in-vitro*-Versuchen aus ihrer nativen extrazellulären Matrix und ihrem zellulären Verband isoliert. Natürliche Zellmatrixwechselwirkungen und nicht-fibroblastäre Mediatoren der Fibroblastendifferenzierung, auf welche unter anderem IGF-1 seine Wirkungen entfalten könnte, fehlen in einem solchen *in-vitro*-Modell (Hung et al., 2013). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass schon der alleinige Kultivierungsprozess Einfluss auf den Differenzierungsgrad der Fibroblasten nimmt (siehe Kapitel 3.2.3), während im gesunden Herzen so gut wie keine Myofibroblasten enthalten sind (Talman & Ruskoaho, 2016). Daher gilt es die Erkenntnisse aus den *in-vitro*-Versuchen anhand des *in-vivo*-Modells zu verifizieren, um sich der tatsächlichen (patho-) physiologischen Situation im lebenden Organismus anzunähern.

Nach der Induktion eines Herzinfarktes ist nach fünf Tagen eine erhebliche Zunahme des Myofibroblastenanteils im Vergleich zu Herzen ohne Infarkt zu erkennen. Dies könnte für ihre Beteiligung am Remodelingprozess sprechen, z. B. an der Bildung der Infarktnarbe oder an der Ausbildung einer diffusen Fibrose im Remote-Gebiet des Myokards durch eine veränderte Wandspannung infolge des Infarktes. In der Zellkultur zeichnete sich bereits ein deutlich inhibierender Effekt von IGF-1 auf die Fibroblastendifferenzierung ab. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die *in vitro* nachgewiesene Inhibierung des SMAD-Signalweges durch IGF-1 darstellen (Sarenac et al., 2016), wodurch die TGF-β-vermittelte Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten unterdrückt wird. Auch im Infarktmodell dieser Arbeit konnte IGF-1 den Myofibroblastenanteil im Vergleich zur Kontrollgruppe, die mit BSA behandelt wurde, verringern. Ob es einen kausalen Zusammenhang zwischen der Reduktion des Myofibroblastenanteils durch IGF-1 mit der gezeigten Verringerung der Narbengröße gibt, könnte in zukünftigen Arbeiten untersucht werden.

Da Myofibroblasten große Mengen an α-SMA exprimieren (Ma et al., 2017), liegt die Vermutung nahe, dass durch eine prozentuale Zunahme dieses Zelltyps während bzw. nach einem Herzinfarkt auch eine gesteigerte Expression von α-SMA innerhalb des Myokards und womöglich der Narbe bewirkt wird. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden histologische Kryostatschnitte von gesunden und infarzierten Mäuseherzen angefertigt und schließlich immunhistochemisch untersucht. Auffälligerweise konnte, gemessen an der α-SMA-Expression, keine Beteiligung von Myofibroblasten an der Narbenbildung gezeigt werden. Das Infarktgebiet schien dahingegen Vimentin-positiv zu sein, was für einen hohen Anteil an undifferenzierten Fibroblasten sprechen könnte. In

früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe ist allerdings aufgefallen, dass die Narbe auch ohne Verwendung eines Vimentin-Antikörpers eine Grünfärbung aufwies, was möglicherweise auf autofluoreszierende Eigenschaften apoptotischer Kardiomyozyten zurückzuführen sein könnte. Auch Willems et al. konnten vier bis sechs Tage nach Infarkt keine α-SMA-positiven, nicht-vaskulären spindelförmigen Zellen (Myofibroblasten) im Infarktgebiet humaner Herzen nachweisen. Das inflammatorische Infiltrat erwies sich dahingegen ebenfalls als deutlich Vimentin-positiv (Willems et al., 1994). Eine weitere interessante Entdeckung war, dass viel α-SMA in Zellen innerhalb des Grenzgebietes der Narbe (*Border Zone*) detektiert werden konnte. Dabei könnte die Größe dieser Zellen darauf hindeuten, dass es sich um Kardiomyozyten und nicht um Fibroblasten handelt. Es gibt Hinweise darauf, dass nach Schädigung des Herzmuskels fetale Signalwege reaktiviert werden, wodurch α-SMA in Kardiomyozyten exprimiert wird (Lighthouse & Small, 2016, Eppenberger-Eberhardt et al., 1990). Dies würde die größeren, α-SMA-positiven Zellen in der *Border Zone* erklären. Hierbei besteht allerdings kein Zusammenhang mit der in dieser Arbeit nachgewiesenen Steigerung der α-SMA-Expression nach einem Herzinfarkt, da die erhöhten mittleren Fluoreszenzintensitäten von α-SMA innerhalb der FACS-Analyse Fibroblasten-spezifisch sind. Das dem Infarkt entfernte Gebiet (Remote) glich visuell dem des gesunden Kontrollherzens. Auch hier konnte also keine gesteigerte Expression von α-SMA festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung für die genannten Befunde wäre, dass die α-SMA-exprimierenden Myofibroblasten zwar im Gewebe vorhanden sind (wie in der FACS-Analyse in Kapitel 3.5.1 bestätigt wurde), diese allerdings nicht in ihrem interstitiellen Zellverband immunhistochemisch visualisiert werden können, wobei die Ursache hierfür unbekannt ist.

Unsere Arbeitsgruppe hat nachgewiesen, dass eine dreitätige IGF-1-Behandlung zu einer signifikanten Verringerung der Narbengröße führt (Heinen et al., 2019). Neben einer möglichen direkten Inhibierung der Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten durch IGF-1 könnte man auch über weitere Wirkungsmechanismen dieses Wachstumsfaktors auf die Narbenbildung spekulieren. So könnte die Reduktion der Narbengröße auf den anti-apoptotischen (Kurmasheva & Houghton, 2006, Buerke et al., 1995) und entzündungshemmenden Eigenschaften (Conti et al., 2011) von IGF-1 beruhen. Hierbei könnte die Entzündungsreaktion möglicherweise vorzeitig beendet werden, wodurch weniger Zellen im Infarktgebiet absterben (Heinen et al., 2019), die Fibrose früher eingeleitet würde und auf diese Weise die Infarktexpansion unterdrückt werden könnte. IGF-1-polarisierte Makrophagen könnten mit ihrem reparativen M2-Phänotyp zu diesem Prozess beitragen. Schließlich sind es Makrophagen, welche die

Entzündungsreaktion innerhalb der ersten Tage vermitteln (Nahrendorf et al., 2007), in denen auch die Infarktherzen unserer Arbeitsgruppe mit IGF-1 behandelt wurden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Behandlung mittels IGF-1 zur Verringerung des Myofibroblastenanteils im Infarktherzen beiträgt. Inwieweit die Reduktion der Narbengröße auf dieser Verringerung des Myofibroblastenanteils und/oder einer myeloiden Immunantwort infolge einer IGF-1-Behandlung beruht, müsste in zukünftigen Versuchen näher untersucht werden.

4.4 Fibroblastendifferenzierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen

Low-FBS-Medium hat keinen Einfluss auf α-SMA-Expression

Es gibt Hinweise darauf, dass ein Kultivierungsmedium mit wenig Serum möglicherweise zu einer Unterdrückung des Differenzierungsprozesses von Fibroblasten führen könnte. Dies ist im Kontext dieser Arbeit von Interesse, da hierdurch ein möglichst breites Differenzierungsspektrum zwischen den mittels TGF-β differenzierten Myofibroblasten und undifferenzierten Fibroblasten geschaffen würde. Auf diese Weise könnte eine maximale Auslenkung des Testsystems untersucht werden. Des Weiteren ließe sich hierdurch eine artifizielle Fibroblastendifferenzierung durch den Kultivierungsprozess unterdrücken, wodurch sich die Zellen hinsichtlich ihrer α-SMA-Expression weniger von den Fibroblasten im lebenden Herzen unterschieden. Allerdings bewirkte ein serumarmes Kulturmedium sowohl nach der Analyse mittels Durchflusszytometrie als auch mittels qPCR keine Unterdrückung der Fibroblastendifferenzierung. Fibroblasten, die mit Low-FBS-Medium (1 % FBS) behandelt wurden, zeigten in dieser Arbeit keine Veränderung der α-SMA-MFI im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche mit Assay-Medium (10 % FBS) behandelt wurde. Baranyi et al. untersuchten ebenfalls den Einfluss verschiedener Serumkonzentrationen auf die α-SMA-Expression von Fibroblasten. Diese Arbeitsgruppe kultivierte Fibroblasten unterschiedlicher Ursprungsorgane für 48 Stunden jeweils mit 0 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 4 % und 10 % FBS. Interessanterweise ließ sich in keines der Ursprungsorgane eine Korrelation zwischen der FBS-Konzentration im Kulturmedium und der α-SMA-Expression nachweisen (Baranyi et al., 2019). FBS scheint also unterschiedliche Auswirkungen auf die Fibroblastendifferenzierung zu haben, je nachdem aus welchem Organ die Fibroblasten isoliert wurden. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich des Einflusses von FBS auf die Fibroblastendifferenzierung mit Forschungsarbeiten, welche Fibroblasten anderer

Zielorgane untersuchten, ist also gering. Ein möglicher Effekt der FBS-Konzentration auf die Fibroblastendifferenzierung muss daher für jedes Organ einzeln geprüft werden. Da in dieser Arbeit kein Unterschied zwischen dem Assay-Medium, das 10 % FBS beinhaltet, und dem Low-FBS-Medium gefunden werden konnte, und zur Kultivierung von Fibroblasten hauptsächlich mit einer Serumkonzentration von 10 % FBS gearbeitet wird (Stellato et al., 2019, Baranyi et al., 2019, Shinde et al., 2017, Tomasek et al., 2013), fand Low-FBS-Medium im weiteren Verlauf dieser Arbeit keine Verwundung mehr. Fortan diente Assay-Medium als Basismedium.

p38 MAPK-Inhibitor hemmt Fibroblastendifferenzierung

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, stellt der nicht-kanonische p38 MAPK-Signalweg einen wichtigen Bestandteil des kardialen Remodelingprozesses dar. Diverse Stimuli, wie der Myokardinfarkt (Shimizu et al., 1998), Druckbelastung (Fischer et al., 2001) und eine Ischämie- und Reperfusionssituation (Ma et al., 1999) erhöhen die p38 MAPK-Aktivität. Die Inhibierung dieses Signalweges ist dabei seit geraumer Zeit von klinischem Interesse, da die Unterdrückung der p38 MAPK zu einer Abschwächung der kardialen Fibrose und einer verbesserten Herzfunktion führt (Molkentin et al., 2017, Talman & Ruskoaho, 2016, Kompa et al., 2008, See et al., 2004). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte während der Kultivierung muriner kardialer Fibroblasten zusammen mit dem p38 MAPK-Inhibitor eine deutlich verminderte α-SMA-Expression und somit Inhibierung des Differenzierungsprozesses von Fibroblasten im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Im Rattenmodell anderer Studien konnte der p38 MAPK-Inhibitor ebenfalls die α-SMA-Expression in Fibroblasten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* unterdrücken (See et al., 2004, Kompa et al., 2008). Sowohl in dieser Arbeit als in den genannten Studien gelang es jedoch nicht, die Fibroblastendifferenzierung durch die alleinige Inhibierung von p38 MAPK gänzlich zu unterbinden. Dies könnte entweder auf eine unvollständige Inhibierung dieses Signalweges zurückzuführen sein oder darauf, dass die α-SMA-Expression neben dem nicht-kanonischen, p38 MAPK-abhängigen Signalweg auch durch den kanonischen, TGF-β-assoziierten SMAD-Signalweges vermittelt wird (siehe Einleitung).

p38 MAPK-Inhibitor wirkt exogener TGF-β-Stimulation entgegen

In Vorversuchen, welche in dieser Arbeit nicht aufgeführt sind, konnte der p38 MAPK-Inhibitor den Differenzierungsprozess von Fibroblasten während der 11-tägigen Kultivierung bereits unterdrücken. Dies warf die Frage auf, ob und in welchem Maße der p38 MAPK-Inhibitor auch einer exogenen Stimulation durch TGF-β entgegenwirken

kann. Die Inhibierung der p38 MAPK führte in dieser Arbeit zu einer Reduktion der TGF-β-induzierten α-SMA-Expression von Fibroblasten im Vergleich zu Fibroblasten, die ausschließlich mit TGF-β behandelt wurden. Auch die Transkriptexpression von ACTA2 wurde deutlich verringert, wenngleich sich dies im ungepaarten t-Test als nicht signifikant erwies. Sowohl die α-SMA- als auch die ACTA2-Expression von Fibroblasten, die mit p38 MAPK-Inhibitor und TGF-β behandelt wurden, weisen dabei allerdings durchgehend einen erhöhten Wert im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe auf. Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass lediglich einer der beiden für die TGF-β-vermittelte Wirkung verantwortlichen Signalwege inhibiert wurde, nämlich der nicht-kanonische, p38 MAPK-abhängige Signalweg (Bakin et al., 2002). Obwohl der kanonische, SMAD-abhängige Signalweg in der Literatur als dominanter Signalweg in der TGF-β-vermittelten Signaltransduktion diskutiert wird (Frangogiannis, 2014), suggerieren die Ergebnisse dieser Versuchsreihe einen nicht unwesentlichen Beitrag des nicht-kanonischen, SMAD-unabhängigen Signalweges in der Fibroblastendifferenzierung. Wie genau und zu welchen Anteilen die beiden Signalwege zur Transdifferenzierung beitragen, ist unklar (Frangogiannis, 2014, Dobaczewski et al., 2010).

4.5 Besonderheiten während des Arbeitens mit Fibroblasten

α-SMA-exprimierende Fibroblasten wurden in dieser Arbeit, genau wie in vielen anderen Studien auch, als Myofibroblasten definiert (Phan, 2008, Stellato et al., 2019, Baranyi et al., 2019, Shinde et al., 2017, Darby et al., 1990, Hung et al., 2013). Hierbei ist es wichtig zu erwähnen, dass sich *in vitro* undifferenzierte Fibroblasten nicht eindeutig von differenzierten Myofibroblasten abgrenzen lassen. Ein Fibroblast exprimiert nach Stimulation stets mehr α-SMA, wodurch er im Laufe der Zeit graduell einen myofibroblastären Phänotyp annimmt. Da in der Auswertung der Zellkulturversuche immer die gesamte Fibroblastenpopulation, also undifferenzierte Fibroblasten und differenzierte Myofibroblasten, auf ihre mittlere Fluoreszenzintensität untersucht wurde, lassen sich dennoch Rückschlüsse auf das Differenzierungsverhalten dieser Zellpopulation in Abhängigkeit unterschiedlicher Behandlungen ziehen. Zum besseren Verständnis werden die Fibroblasten in dieser Arbeit (sowie in der Literatur) meist dennoch kategorisch in die beiden genannten Subpopulationen unterteilt.

Während der Untersuchung der Fibroblasten mittels einer Durchflusszytometrie fiel auf, dass diese nach elftägiger Kultivierung um ein Vielfaches mehr α-SMA exprimierten als direkt nach der Isolierung der Zellen. Daher wurde in einer Zeitreihe untersucht, ob und

wie schnell unbehandelte Fibroblasten α-SMA exprimieren (siehe Kapitel 3.2.3). Tatsächlich differenzierten Fibroblasten ohne weiteres Zutun während des Kultivierungsprozesses. Auch andere Arbeitsgruppen haben diesen Effekt beobachtet. Baranyi et al. und Cieslik et al. stellten während der *in-vitro*-Kultivierung eine spontane Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten fest, unabhängig von der Mediumkomposition und dem Serumgehalt (Baranyi et al., 2019, Cieslik et al., 2011). Die Matrix, auf der die Fibroblasten kultiviert werden, scheint hierbei eine wichtige Rolle zu spielen. In einer Studie von Shinde et al. exprimierten isolierte kardiale Fibroblasten in einer Kunststoffkulturschale bedeutend mehr α-SMA im Vergleich zu Fibroblasten, die auf einem Kollagengitter kultiviert wurden (Shinde et al., 2017). Auch Hung et al. zeigten, dass die Aktivierung muriner pulmonaler Fibroblasten durch mechanische Eigenschaften der Matrix moduliert werden kann (Hung et al., 2013). Da sich *in vivo* so gut wie keine Myofibroblasten im gesunden Myokard befinden (Talman & Ruskoaho, 2016), müssen die *in-vitro*-Ergebnisse auch vor diesem Hintergrund diskutiert werden. Die Effekte verschiedener Behandlungen können *in vitro* noch immer untersucht werden, allerdings spiegelt der α-SMA-Wert der Kontrollgruppen bereits einen erhöhten Referenzwert wider. Es wäre wünschenswert, den Differenzierungsprozess in der Zellkultur so zu inhibieren, dass die kardialen Fibroblasten möglichst kein α-SMA exprimieren, bevor sie mit diversen Zytokinen behandelt werden. Auf diese Weise würde eine vergleichbare Ausgangssituation bezüglich des Differenzierungsgrades mit Fibroblasten im gesunden Herzgewebe *in vivo* geschaffen werden. In zukünftigen Versuchen könnte sich hierbei eine Kultivierung auf einem Kollagengitter als vorteilhaft erweisen. Außerdem ist es möglich, die α-SMA-Expression mithilfe eines p38 MAPK-Inhibitor teilweise zu unterdrücken (siehe Kapitel 3.2.1 & 3.3.1). Allerdings ist es keiner Arbeitsgruppe bisher gelungen, einen erhöhten Basalwert von α-SMA in der Zellkultur gänzlich zu eliminieren. Eine unmittelbare Behandlung von Fibroblasten nach ihrer Isolierung ist nur bedingt möglich, da diese ohne jeglichen Zellkontakt sehr fragil sind und schnell absterben. Sie benötigen einige Tage, um zu proliferieren und die Petrischale konfluent zu bewachsen. Da es im Infarktmodell zu einer deutlichen Transdifferenzierung eines Teils der Fibroblastenpopulation zu Myofibroblasten kommt und IGF-1 diesen Differenzierungsprozess, ähnlich wie in den *in-vitro*-Versuchen dieser Arbeit, unterdrückt, kann das *in-vitro*-Modell dieser Arbeit offensichtlich dennoch als vereinfachtes Testsystem zur Untersuchung möglicher Effekte unterschiedlicher Behandlungen dienen.

Neben ACTA2 wurde durch andere Arbeitsgruppen auch POSTN (Periostin) als Marker für aktivierte Myofibroblasten eingesetzt (Kanisicak et al., 2016, Ma et al., 2017). Auch

in dieser Arbeit wurde die Transkriptexpression von POSTN, welches für Periostin codiert, untersucht. Im stimulierten Testsystem führte die Behandlung von Fibroblasten mittels TGF-β zu einer erhöhten Expression sowohl von POSTN als auch von ACTA2. Auffällig bei der Ergebnisauswertung war allerdings, dass die Expression von POSTN durch die Behandlung mittels IGF-1 und IL-4 stimuliert wurde, wohingegen die gleiche Behandlung keine Veränderung der ACTA2-Expression zur Folge hatte. Anders als bei ACTA2 wurde die Ausprägung von POSTN nicht auf Proteinniveau mittels einer Durchflusszytometrie untersucht. Hierdurch lassen sich die Diskrepanzen zwischen den Transkriptexpressionswerten von ACTA2 und POSTN nur schwer einordnen.

Farbehi et al. haben gezeigt, dass sich Fibroblasten in eine Vielzahl von Subpopulationen unterteilen lassen, welche die gleichen Gene unterschiedlich stark ausprägen. Laut dieser Arbeitsgruppe exprimieren Myofibroblasten „ACTA2 und/oder POSTN“. Dies impliziert, dass die Differenzierung zu Myofibroblasten nicht zwangsläufig mit einer gesteigerten Expression sowohl von ACTA2 als auch von POSTN einhergeht (Farbehi et al., 2019). Die teilweise divergenten Transkriptexpressionswerte der beiden Myofibroblastenmarker dieser Arbeit könnten daher möglicherweise auf eine Fibroblastenpopulation zurückzuführen sein, die als Reaktion auf IGF-1 und IL-4 vermehrt POSTN exprimiert. Ob POSTN schlussendlich auch zu einem Protein translatiert wird und auf diese Weise zu einem myofibroblastären Phänotyp beiträgt, müsste in weiterführenden Versuchen mittels einer FACS-Analyse untersucht werden.

Eine weitere Auffälligkeit in der Ergebnisauswertung dieser Arbeit sind die teilweise unterschiedlichen Transkript- und Genexpressionswerte. Beispielsweise trägt IGF-1 deutlich zu einer Verringerung der Genexpression von α-SMA bei, während sich dies nur bedingt in der Transkriptexpression von ACTA2, das für α-SMA codiert, abzeichnet. Auch der p38 MAPK-Inhibitor unterdrückt die α-SMA-Expression, stimuliert allerdings tendenziell die ACTA2-Expression. Mögliche Erklärungen hierfür könnten eine verminderte Translation des vorhandenen Transkripts oder eine veränderte Geschwindigkeit des Proteinumsatzes sein. Hierbei handelt es sich allerdings um Spekulationen, die in weiterführenden Arbeiten genauer untersucht werden könnten.

4.6 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass IGF-1 den Differenzierungsprozess von Fibroblasten zu Myofibroblasten reduzieren kann. Zum einen verringerte IGF-1 die α-SMA-Expression unter *in-vitro*-Zellkulturbedingungen, zum

anderen führte eine IGF-1-Behandlung im *in-vivo*-Mausmodell mit Myokardischämie und Reperfusion zu einer Verringerung des Myofibroblastenanteils im Vergleich zur Kontrollgruppe.
Der Effekt von IGF-1 scheint nicht durch eine indirekte Wirkung auf Makrophagen hervorgerufen zu werden, sondern eher auf einer direkten Wirkung auf Fibroblasten zu beruhen.
Insgesamt unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit die potenzielle Relevanz von IGF-1 als therapeutische Option nach einem Myokardinfarkt.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M. H., de Sauvage, F. J. & Gurney, A. L. 2003. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem,* 278**,** 1910-4.

Ale-Agha, N., Goy, C., Jakobs, P., Spyridopoulos, I., Gonnissen, S., Dyballa-Rukes, N., Aufenvenne, K., von Ameln, F., Zurek, M., Spannbrucker, T., Eckermann, O., Jakob, S., Gorressen, S., Abrams, M., Grandoch, M., Fischer, J. W., Kohrer, K., Deenen, R., Unfried, K., Altschmied, J. & Haendeler, J. 2018. CDKN1B/p27 is localized in mitochondria and improves respiration-dependent processes in the cardiovascular system-New mode of action for caffeine. *PLoS Biol,* 16**,** e2004408.

Ali, S. R., Ranjbarvaziri, S., Talkhabi, M., Zhao, P., Subat, A., Hojjat, A., Kamran, P., Muller, A. M., Volz, K. S., Tang, Z., Red-Horse, K. & Ardehali, R. 2014. Developmental heterogeneity of cardiac fibroblasts does not predict pathological proliferation and activation. *Circ Res,* 115**,** 625-35.

Allard, J. B. & Duan, C. 2018. IGF-Binding Proteins: Why Do They Exist and Why Are There So Many? *Front Endocrinol (Lausanne),* 9**,** 117.

Aoki, T., Fukumoto, Y., Sugimura, K., Oikawa, M., Satoh, K., Nakano, M., Nakayama, M. & Shimokawa, H. 2011. Prognostic impact of myocardial interstitial fibrosis in non-ischemic heart failure. -Comparison between preserved and reduced ejection fraction heart failure. *Circ J,* 75**,** 2605-13.

Arnold, T. & Betsholtz, C. 2013. The importance of microglia in the development of the vasculature in the central nervous system. *Vasc Cell,* 5**,** 4.

Atamas, S. P. 2002. Complex cytokine regulation of tissue fibrosis. *Life Sci,* 72**,** 631-43.

Aurora, A. B., Porrello, E. R., Tan, W., Mahmoud, A. I., Hill, J. A., Bassel-Duby, R., Sadek, H. A. & Olson, E. N. 2014. Macrophages are required for neonatal heart regeneration. *J Clin Invest,* 124**,** 1382-92.

Azevedo, P. S., Polegato, B. F., Minicucci, M. F., Paiva, S. A. & Zornoff, L. A. 2016. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq Bras Cardiol,* 106**,** 62-9.

Bakin, A., Rinehart, C., Tomlinson, A. & Arteaga, C. 2002. p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFb-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. *Journal of Cell Science,* 115.

Baranyi, U., Winter, B., Gugerell, A., Hegedus, B., Brostjan, C., Laufer, G. & Messner, B. 2019. Primary Human Fibroblasts in Culture Switch to a Myofibroblast-Like Phenotype Independently of TGF Beta. *Cells,* 8.

Bell, D. & McDermott, B. J. 2000. Contribution of de novo protein synthesis to the hypertrophic effect of IGF-1 but not of thyroid hormones in adult ventricular cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem,* 206**,** 113-24.

Bowers, S. L., Banerjee, I. & Baudino, T. A. 2010. The extracellular matrix: at the center of it all. *J Mol Cell Cardiol,* 48**,** 474-82.

Bronnum, H., Eskildsen, T., Andersen, D. C., Schneider, M. & Sheikh, S. P. 2013. IL-1beta suppresses TGF-beta-mediated myofibroblast differentiation in cardiac fibroblasts. *Growth Factors,* 31**,** 81-9.

Buerke, M., Murohara, T., Skurk, C., Nuss, C., Tomaselli, K. & Lefer, A. M. 1995. Cardioprotective effect of insulin-like growth factor I in myocardial ischemia followed by reperfusion. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 92**,** 8031-5.

Bujak, M. & Frangogiannis, N. G. 2007. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res,* 74**,** 184-95.

Bujak, M., Ren, G., Kweon, H. J., Dobaczewski, M., Reddy, A., Taffet, G., Wang, X. F. & Frangogiannis, N. G. 2007. Essential role of Smad3 in infarct healing and in the pathogenesis of cardiac remodeling. *Circulation,* 116**,** 2127-38.

Cai, C. L., Martin, J. C., Sun, Y., Cui, L., Wang, L., Ouyang, K., Yang, L., Bu, L., Liang, X., Zhang, X., Stallcup, W. B., Denton, C. P., McCulloch, A., Chen, J. & Evans, S. M. 2008. A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature,* 454**,** 104-8.

Castellano, G., Affuso, F., Conza, P. D. & Fazio, S. 2009. The GH/IGF-1 Axis and Heart Failure. *Curr Cardiol Rev,* 5**,** 203-15.

Chetty, A., Cao, G. J. & Nielsen, H. C. 2006. Insulin-like Growth Factor-I signaling mechanisms, type I collagen and alpha smooth muscle actin in human fetal lung fibroblasts. *Pediatr Res,* 60**,** 389-94.

Cieslik, K. A., Trial, J. & Entman, M. L. 2011. Defective myofibroblast formation from mesenchymal stem cells in the aging murine heart rescue by activation of the AMPK pathway. *Am J Pathol,* 179**,** 1792-806.

Cittadini, A., Grossman, J. D., Napoli, R., Katz, S. E., Stromer, H., Smith, R. J., Clark, R., Morgan, J. P. & Douglas, P. S. 1997. Growth hormone attenuates early left ventricular remodeling and improves cardiac function in rats with large myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol,* 29**,** 1109-16.

Cohn, J. N., Ferrari, R. & Sharpe, N. 2000. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol,* 35**,** 569-82.

Conti, E., Musumeci, M. B., De Giusti, M., Dito, E., Mastromarino, V., Autore, C. & Volpe, M. 2011. IGF-1 and atherothrombosis: relevance to pathophysiology and therapy. *Clin Sci (Lond),* 120**,** 377-402.

Darby, I., Skalli, O. & Gabbiani, G. 1990. Alpha-Smooth Muscle Actin Is Transiently Expressed by Myofibroblasts during Experimental Wound-Healing. *Laboratory Investigation,* 63**,** 21-29.

Derynck, R. 1998. SMAD proteins and mammalian anatomy. *Nature,* 393**,** 737-9.

Derynck, R. & Zhang, Y. E. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature,* 425**,** 577-84.

Diaz-Araya, G., Borg, T. K. & Lavandero, S. 2003. IGF-1 modulation of rat cardiac fibroblast behavior and gene expression is age-dependent. *Cell Communication & Adhesion*.

Diaz-Flores, L., Gutierrez, R., Madrid, J. F., Varela, H., Valladares, F., Acosta, E., Martin-Vasallo, P. & Diaz-Flores, L., Jr. 2009. Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol Histopathol,* 24**,** 909-69.

Dobaczewski, M., Bujak, M., Li, N., Gonzalez-Quesada, C., Mendoza, L. H., Wang, X. F. & Frangogiannis, N. G. 2010. Smad3 signaling critically regulates fibroblast phenotype and function in healing myocardial infarction. *Circ Res,* 107**,** 418-28.

Duerr, R. L., Huang, S., Miraliakbar, H. R., Clark, R., Chien, K. R. & Ross, J., Jr. 1995. Insulin-like growth factor-1 enhances ventricular hypertrophy and function during the onset of experimental cardiac failure. *J Clin Invest,* 95**,** 619-27.

Engel, M. E., McDonnell, M. A., Law, B. K. & Moses, H. L. 1999. Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J Biol Chem,* 274**,** 37413-20.

Epelman, S., Lavine, K. J. & Randolph, G. J. 2014. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity,* 41**,** 21-35.

Epelman, S., Liu, P. P. & Mann, D. L. 2015. Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair. *Nat Rev Immunol,* 15**,** 117-29.

Eppenberger-Eberhardt, M., Flamme, I., Kurer, V. & Eppenberger, H. M. 1990. Reexpression of α-smooth muscle actin isoform in cultured adult rat cardiomyocytes. *Developmental Biology,* 139**,** 269-278.

Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y. & Henson, P. M. 1998. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest,* 101**,** 890-8.

Farbehi, N., Patrick, R., Dorison, A., Xaymardan, M., Janbandhu, V., Wystub-Lis, K., Ho, J. W., Nordon, R. E. & Harvey, R. P. 2019. Single-cell expression profiling reveals dynamic flux of cardiac stromal, vascular and immune cells in health and injury. *Elife,* 8.

Fischer, T. A., Ludwig, S., Flory, E., Gambaryan, S., Singh, K., Finn, P., Pfeffer, M. A., Kelly, R. A. & Pfeffer, J. M. 2001. Activation of cardiac c-Jun NH(2)-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases with abrupt changes in hemodynamic load. *Hypertension,* 37**,** 1222-8.

Frangogiannis, N. G. 2012. Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease. *Physiol Rev,* 92**,** 635-88.

Frangogiannis, N. G. 2014. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol,* 11**,** 255-65.

Freestone, N. S., Ribaric, S. & Mason, W. T. 1996. The effect of insulin-like growth factor-1 on adult rat cardiac contractility. *Mol Cell Biochem,* 163-164**,** 223-9.

Frieler, R. A. & Mortensen, R. M. 2015. Immune cell and other noncardiomyocyte regulation of cardiac hypertrophy and remodeling. *Circulation,* 131**,** 1019-30.

Gaudron, P., Eilles, C., Kugler, I. & Ertl, G. 1993. Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Potential mechanisms and early predictors. *Circulation,* 87**,** 755-63.

Gesundheitsberichterstattung des Bundes. 2015. *Krankheitskosten in Mio. € für Deutschland* [Online]. Available: http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=3&p_aid=27260078&nummer=63&p_sprache=D&p_indsp=6026&p_aid=17253846 [Accessed 05.06.2020].

Gesundheitsberichterstattung des Bundes. 2018a. *Ausgewählte Hauptdiagnosen und ihre 10 häufigsten Nebendiagnosen der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern* [Online]. Available: http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=i&p_aid=27260078&nummer=663&p_sprache=D&p_indsp=6025&p_aid=31356330 [Accessed 05.06.2020].

Gesundheitsberichterstattung des Bundes. 2018b. *Sterbefälle für die häufigsten Todesursachen (ab 1998)* [Online]. Available: http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=3&p_aid=47393515&nummer=516&p_sprache=D&p_indsp=-&p_aid=41532419 [Accessed 05.06.2020].

Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M. B., Leboeuf, M., Becker, C. D., See, P., Price, J., Lucas, D., Greter, M., Mortha, A., Boyer, S. W., Forsberg, E. C., Tanaka, M., van Rooijen, N., Garcia-Sastre, A., Stanley, E. R., Ginhoux, F., Frenette, P. S. & Merad, M. 2013. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity,* 38**,** 792-804.

Hashimoto, S., Gon, Y., Takeshita, I., Maruoka, S. & Horie, T. 2001. IL-4 and IL-13 induce myofibroblastic phenotype of human lung fibroblasts through c-Jun NH2-terminal kinase-dependent pathway. *J Allergy Clin Immunol,* 107**,** 1001-8.

Haudek, S. B., Xia, Y., Huebener, P., Lee, J. M., Carlson, S., Crawford, J. R., Pilling, D., Gomer, R. H., Trial, J., Frangogiannis, N. G. & Entman, M. L. 2006. Bone marrow-derived fibroblast precursors mediate ischemic cardiomyopathy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 103**,** 18284-9.

Heinen, A., Nederlof, R., Panjwani, P., Spychala, A., Tschaidse, T., Reffelt, H., Boy, J., Raupach, A., Godecke, S., Petzsch, P., Kohrer, K., Grandoch, M., Petz, A., Fischer, J. W., Alter, C.,

Vasilevska, J., Lang, P. & Godecke, A. 2019. IGF1 Treatment Improves Cardiac Remodeling after Infarction by Targeting Myeloid Cells. *Mol Ther,* 27**,** 46-58.

Hesketh, M., Sahin, K. B., West, Z. E. & Murray, R. Z. 2017. Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing. *Int J Mol Sci,* 18.

Heusch, G., Libby, P., Gersh, B., Yellon, D., Bohm, M., Lopaschuk, G. & Opie, L. 2014. Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *Lancet,* 383**,** 1933-43.

Higashi, Y., Gautam, S., Delafontaine, P. & Sukhanov, S. 2019. IGF-1 and cardiovascular disease. *Growth Horm IGF Res,* 45**,** 6-16.

Hinz, B. 2016. The role of myofibroblasts in wound healing. *Curr Res Transl Med,* 64**,** 171-177.

Hochman, J. S. & Bulkley, B. H. 1982. Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study. *Circulation,* 65**,** 1446-50.

Hulett, H. R., Bonner, W. A., Barrett, J. & Herzenbe.La 1969. Cell Sorting - Automated Separation of Mammalian Cells as a Function of Intracellular Fluorescence. *Science,* 166**,** 747-9.

Humeres, C., Vivar, R., Boza, P., Munoz, C., Bolivar, S., Anfossi, R., Osorio, J. M., Olivares-Silva, F., Garcia, L. & Diaz-Araya, G. 2016. Cardiac fibroblast cytokine profiles induced by proinflammatory or profibrotic stimuli promote monocyte recruitment and modulate macrophage M1/M2 balance in vitro. *J Mol Cell Cardiol*.

Hung, C. F., Rohani, M. G., Lee, S. S., Chen, P. & Schnapp, L. M. 2013. Role of IGF-1 pathway in lung fibroblast activation. *Respir Res,* 14**,** 102.

Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M. & Miyazono, K. 1997. Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature,* 389**,** 622-6.

Izhar, U., Hasdai, D., Richardson, D. M., Cohen, P. & Lerman, A. 2000. Insulin and insulin-like growth factor-I cause vasorelaxation in human vessels in vitro. *Coron Artery Dis,* 11**,** 69-76.

Izumi, K., Kurosaka, D., Iwata, T., Oguchi, Y., Tanaka, Y., Mashima, Y. & Tsubota, K. 2006. Involvement of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 in corneal fibroblasts during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci,* 47**,** 591-8.

Kanisicak, O., Khalil, H., Ivey, M. J., Karch, J., Maliken, B. D., Correll, R. N., Brody, M. J., SC, J. L., Aronow, B. J., Tallquist, M. D. & Molkentin, J. D. 2016. Genetic lineage tracing defines myofibroblast origin and function in the injured heart. *Nat Commun,* 7**,** 12260.

Kluge, A., Zimmermann, R., Munkel, B., Mohri, M., Sack, S., Schaper, J. & Schaper, W. 1995. Insulin-Like Growth-Factor-I Is Involved in Inflammation Linked Angiogenic Processes after Microembolisation in Porcine Heart. *Cardiovascular Research,* 29**,** 407-415.

Kompa, A. R., See, F., Lewis, D. A., Adrahtas, A., Cantwell, D. M., Wang, B. H. & Krum, H. 2008. Long-term but not short-term p38 mitogen-activated protein kinase inhibition improves cardiac function and reduces cardiac remodeling post-myocardial infarction. *J Pharmacol Exp Ther,* 325**,** 741-50.

Krenning, G., Zeisberg, E. M. & Kalluri, R. 2010. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J Cell Physiol,* 225**,** 631-7.

Kurmasheva, R. T. & Houghton, P. J. 2006. IGF-I mediated survival pathways in normal and malignant cells. *Biochim Biophys Acta,* 1766**,** 1-22.

Lajiness, J. D. & Conway, S. J. 2014. Origin, development, and differentiation of cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol,* 70**,** 2-8.

Le Roith, D., Bondy, C., Yakar, S., Liu, J. L. & Butler, A. 2001. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev,* 22**,** 53-74.

Li, Y., Higashi, Y., Itabe, H., Song, Y. H., Du, J. & Delafontaine, P. 2003. Insulin-like growth factor-1 receptor activation inhibits oxidized LDL-induced cytochrome C release and apoptosis via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt signaling pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 23**,** 2178-84.

Lighthouse, J. K. & Small, E. M. 2016. Transcriptional control of cardiac fibroblast plasticity. *J Mol Cell Cardiol,* 91**,** 52-60.

Liu, L. & Eisen, H. J. 2014. Epidemiology of heart failure and scope of the problem. *Cardiol Clin,* 32**,** 1-8, vii.

Liu, X., Kelm, R. J., Jr. & Strauch, A. R. 2009. Transforming growth factor beta1-mediated activation of the smooth muscle alpha-actin gene in human pulmonary myofibroblasts is inhibited by tumor necrosis factor-alpha via mitogen-activated protein kinase kinase 1-dependent induction of the Egr-1 transcriptional repressor. *Mol Biol Cell,* 20**,** 2174-85.

Lu, H., Chen, R., Barnie, P. A., Tian, Y., Zhang, S., Xu, H., Chakrabarti, S. & Su, Z. 2020. Fibroblast transdifferentiation promotes conversion of M1 macrophages and replenishment of cardiac resident macrophages following cardiac injury in mice. *Eur J Immunol,* 50**,** 795-808.

Lüllmann-Rauch, R. 2009. Histologie. Stuttgart: Georg Thieme.

Ma, X. L., Kumar, S., Gao, F., Louden, C. S., Lopez, B. L., Christopher, T. A., Wang, C., Lee, J. C., Feuerstein, G. Z. & Yue, T. L. 1999. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation,* 99**,** 1685-91.

Ma, Y., Halade, G. V. & Lindsey, M. L. 2012. Extracellular matrix and fibroblast communication following myocardial infarction. *J Cardiovasc Transl Res,* 5**,** 848-57.

Ma, Y., Iyer, R. P., Jung, M., Czubryt, M. P. & Lindsey, M. L. 2017. Cardiac Fibroblast Activation Post-Myocardial Infarction: Current Knowledge Gaps. *Trends Pharmacol Sci,* 38**,** 448-458.

Mann, D. L. 2003. Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. *Annu Rev Physiol,* 65**,** 81-101.

Mann, D. L. 2015. Innate immunity and the failing heart: the cytokine hypothesis revisited. *Circ Res,* 116**,** 1254-68.

Massague, J., Seoane, J. & Wotton, D. 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev,* 19**,** 2783-810.

Mattey, D. L., Dawes, P. T., Nixon, N. B. & Slater, H. 1997. Transforming growth factor beta 1 and interleukin 4 induced alpha smooth muscle actin expression and myofibroblast-like differentiation in human synovial fibroblasts in vitro: modulation by basic fibroblast growth factor. *Ann Rheum Dis,* 56**,** 426-31.

Mattyasovszky, S. G., Mausbach, S., Ritz, U., Langendorf, E., Wollstadter, J., Baranowski, A., Drees, P., Rommens, P. M. & Hofmann, A. 2017. Influence of the anti-inflammatory cytokine interleukin-4 on human joint capsule myofibroblasts. *J Orthop Res,* 35**,** 1290-1298.

McKercher, S. R., Torbett, B. E., Anderson, K. L., Henkel, G. W., Vestal, D. J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A. J., Wu, G. E., Paige, C. J. & Maki, R. A. 1996. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *Embo Journal,* 15**,** 5647-5658.

Metchnikoff, I. 1880. *Über die intracelluläre Verdauung bei Coelenteraten*.

Molkentin, J. D., Bugg, D., Ghearing, N., Dorn, L. E., Kim, P., Sargent, M. A., Gunaje, J., Otsu, K. & Davis, J. 2017. Fibroblast-Specific Genetic Manipulation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase In Vivo Reveals Its Central Regulatory Role in Fibrosis. *Circulation,* 136**,** 549-561.

Munoz-Espin, D., Canamero, M., Maraver, A., Gomez-Lopez, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodriguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M. & Serrano, M. 2013. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell,* 155**,** 1104-18.

Nabel, E. G. & Braunwald, E. 2012. A tale of coronary artery disease and myocardial infarction. *N Engl J Med,* 366**,** 54-63.

Nahrendorf, M., Swirski, F. K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J. L., Libby, P., Weissleder, R. & Pittet, M. J. 2007. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med,* 204**,** 3037-47.

Nucera, S., Biziato, D. & De Palma, M. 2011. The interplay between macrophages and angiogenesis in development, tissue injury and regeneration. *Int J Dev Biol,* 55**,** 495-503.

O'Rourke, S. A., Dunne, A. & Monaghan, M. G. 2019. The Role of Macrophages in the Infarcted Myocardium: Orchestrators of ECM Remodeling. *Front Cardiovasc Med,* 6**,** 101.

Obradovic, M., Zafirovic, S., Soskic, S., Stanimirovic, J., Trpkovic, A., Jevremovic, D. & Isenovic, E. R. 2019. Effects of IGF-1 on the Cardiovascular System. *Curr Pharm Des,* 25**,** 3715-3725.

Palmen, M., Daemen, M. J. A. P., Bronsaer, R., Dassen, W. R. M., Zandbergen, H. R., Kockx, M., Smits, J. F. M., van der Zee, R. & Doevendans, P. A. 2001. Cardiac remodeling after myocardial infarction is impaired in IGF-1 deficient mice. *Cardiovascular Research,* 50**,** 516-524.

Palmer, J. N., Hartogensis, W. E., Patten, M., Fortuin, F. D. & Long, C. S. 1995. Interleukin-1 beta induces cardiac myocyte growth but inhibits cardiac fibroblast proliferation in culture. *J Clin Invest,* 95**,** 2555-64.

Panizzi, P., Swirski, F. K., Figueiredo, J. L., Waterman, P., Sosnovik, D. E., Aikawa, E., Libby, P., Pittet, M., Weissleder, R. & Nahrendorf, M. 2010. Impaired infarct healing in atherosclerotic mice with Ly-6C(hi) monocytosis. *J Am Coll Cardiol,* 55**,** 1629-38.

Pfeffer, J. M., Pfeffer, M. A. & Braunwald, E. 1985. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res,* 57**,** 84-95.

Pfeffer, M. A. & Braunwald, E. 1990. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation,* 81**,** 1161-72.

Phan, S. H. 2008. Biology of fibroblasts and myofibroblasts. *Proc Am Thorac Soc,* 5**,** 334-7.

Pinto, A. R., Ilinykh, A., Ivey, M. J., Kuwabara, J. T., D'Antoni, M. L., Debuque, R., Chandran, A., Wang, L., Arora, K., Rosenthal, N. A. & Tallquist, M. D. 2016. Revisiting Cardiac Cellular Composition. *Circ Res,* 118**,** 400-9.

Saetrum Opgaard, O. & Wang, P. H. 2005. IGF-I is a matter of heart. *Growth Horm IGF Res,* 15**,** 89-94.

Saito, A., Okazaki, H., Sugawara, I., Yamamoto, K. & Takizawa, H. 2003. Potential action of IL-4 and IL-13 as fibrogenic factors on lung fibroblasts in vitro. *Int Arch Allergy Immunol,* 132**,** 168-76.

Sangiuliano, B., Perez, N. M., Moreira, D. F. & Belizario, J. E. 2014. Cell death-associated molecular-pattern molecules: inflammatory signaling and control. *Mediators Inflamm,* 2014**,** 821043.

Santini, M. P., Tsao, L., Monassier, L., Theodoropoulos, C., Carter, J., Lara-Pezzi, E., Slonimsky, E., Salimova, E., Delafontaine, P., Song, Y. H., Bergmann, M., Freund, C., Suzuki, K. & Rosenthal, N. 2007. Enhancing repair of the mammalian heart. *Circ Res,* 100**,** 1732-40.

Sarenac, T., Trapecar, M., Gradisnik, L., Rupnik, M. S. & Pahor, D. 2016. Single-cell analysis reveals IGF-1 potentiation of inhibition of the TGF-beta/Smad pathway of fibrosis in human keratocytes in vitro. *Sci Rep,* 6**,** 34373.

Sasse, A., Wallich, M., Ding, Z., Goedecke, A., Schrader, J. 2003. Coxsackie-and-adenovirus receptor mRNA expression in human heart failure. *The Journal of Gene Medicine,* 5, 876-82.

Schmid, C. 1995. Insulin-like growth factors. *Cell Biol Int,* 19**,** 445-57.

See, F., Thomas, W., Way, K., Tzanidis, A., Kompa, A., Lewis, D., Itescu, S. & Krum, H. 2004. p38 mitogen-activated protein kinase inhibition improves cardiac function and attenuates left ventricular remodeling following myocardial infarction in the rat. *J Am Coll Cardiol,* 44**,** 1679-89.

Sell, C., Ptasznik, A., Chang, C. D., Swantek, J., Cristofalo, V. J. & Baserga, R. 1993. IGF-1 receptor levels and the proliferation of young and senescent human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun,* 194**,** 259-65.

Sesti, G., Sciacqua, A., Cardellini, M., Marini, M. A., Maio, R., Vatrano, M., Succurro, E., Lauro, R., Federici, M. & Perticone, F. 2005. Plasma concentration of IGF-I is independently associated with insulin sensitivity in subjects with different degrees of glucose tolerance. *Diabetes Care,* 28**,** 120-5.

Shimizu, N., Yoshiyama, M., Omura, T., Hanatani, A., Kim, S., Takeuchi, K., Iwao, H. & Yoshikawa, J. 1998. Activation of mitogen-activated protein kinases and activator protein-1 in myocardial infarction in rats. *Cardiovasc Res,* 38**,** 116-24.

Shinde, A. V., Humeres, C. & Frangogiannis, N. G. 2017. The role of alpha-smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis,* 1863**,** 298-309.

Shindo, T., Manabe, I., Fukushima, Y., Tobe, K., Aizawa, K., Miyamoto, S., Kawai-Kowase, K., Moriyama, N., Imai, Y., Kawakami, H., Nishimatsu, H., Ishikawa, T., Suzuki, T., Morita, H., Maemura, K., Sata, M., Hirata, Y., Komukai, M., Kagechika, H., Kadowaki, T., Kurabayashi, M. & Nagai, R. 2002. Kruppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling. *Nat Med,* 8**,** 856-63.

Simmons, J. G., Pucilowska, J. B., Keku, T. O. & Lund, P. K. 2002. IGF-I and TGF-beta1 have distinct effects on phenotype and proliferation of intestinal fibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,* 283**,** G809-18.

Smits, A. M., Dronkers, E. & Goumans, M. J. 2018. The epicardium as a source of multipotent adult cardiac progenitor cells: Their origin, role and fate. *Pharmacol Res,* 127**,** 129-140.

Soehnlein, O., Lindbom, L. & Weber, C. 2009. Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment. *Blood,* 114**,** 4613-23.

Spies, M., Nesic, O., Barrow, R. E., Perez-Polo, J. R. & Herndon, D. N. 2001. Liposomal IGF-1 gene transfer modulates pro- and anti-inflammatory cytokine mRNA expression in the burn wound. *Gene Ther,* 8**,** 1409-15.

Stark, M. A., Huo, Y., Burcin, T. L., Morris, M. A., Olson, T. S. & Ley, K. 2005. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity,* 22**,** 285-94.

Statistisches Bundesamt. 2018. *Todesursachenstatistik Deutschland* [Online]. Available: https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?sequenz=tabelleErgebnis&selectionname=23211-0002#abreadcrumb [Accessed 05.06.2020].

Stellato, M., Czepiel, M., Distler, O., Blyszczuk, P. & Kania, G. 2019. Identification and Isolation of Cardiac Fibroblasts From the Adult Mouse Heart Using Two-Color Flow Cytometry. *Front Cardiovasc Med,* 6**,** 105.

Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M. C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J. & Keyes, W. M. 2013. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell,* 155**,** 1119-30.

Talman, V. & Ruskoaho, H. 2016. Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration. *Cell Tissue Res,* 365**,** 563-81.

Tauber, A. I. 2003. Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nat Rev Mol Cell Biol,* 4**,** 897-901.

Tomasek, J. J., Haaksma, C. J., Schwartz, R. J. & Howard, E. W. 2013. Whole animal knockout of smooth muscle alpha-actin does not alter excisional wound healing or the fibroblast-to-myofibroblast transition. *Wound Repair Regen,* 21**,** 166-76.

Troncoso, R., Ibarra, C., Vicencio, J. M., Jaimovich, E. & Lavandero, S. 2014. New insights into IGF-1 signaling in the heart. *Trends Endocrinol Metab,* 25**,** 128-37.

Troncoso, R., Vicencio, J. M., Parra, V., Nemchenko, A., Kawashima, Y., Del Campo, A., Toro, B., Battiprolu, P. K., Aranguiz, P., Chiong, M., Yakar, S., Gillette, T. G., Hill, J. A., Abel, E. D., Leroith, D. & Lavandero, S. 2012. Energy-preserving effects of IGF-1 antagonize starvation-induced cardiac autophagy. *Cardiovasc Res,* 93**,** 320-9.

Ungvari, Z. & Csiszar, A. 2012. The emerging role of IGF-1 deficiency in cardiovascular aging: recent advances. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci,* 67**,** 599-610.

van den Borne, S. W., Diez, J., Blankesteijn, W. M., Verjans, J., Hofstra, L. & Narula, J. 2010. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nat Rev Cardiol,* 7**,** 30-7.

von der Thusen, J. H., Borensztajn, K. S., Moimas, S., van Heiningen, S., Teeling, P., van Berkel, T. J. & Biessen, E. A. 2011. IGF-1 has plaque-stabilizing effects in atherosclerosis by altering vascular smooth muscle cell phenotype. *Am J Pathol,* 178**,** 924-34.

Wang, B., Haldar, S. M., Lu, Y., Ibrahim, O. A., Fisch, S., Gray, S., Leask, A. & Jain, M. K. 2008. The Kruppel-like factor KLF15 inhibits connective tissue growth factor (CTGF) expression in cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol,* 45**,** 193-7.

Wang, J. H., Zhao, L., Pan, X., Chen, N. N., Chen, J., Gong, Q. L., Su, F., Yan, J., Zhang, Y. & Zhang, S. H. 2016. Hypoxia-stimulated cardiac fibroblast production of IL-6 promotes myocardial fibrosis via the TGF-beta1 signaling pathway. *Lab Invest,* 96**,** 839-52.

Wang, X. W., Yu, Y. & Gu, L. 2014. Dehydroabietic acid reverses TNF-alpha-induced the activation of FOXO1 and suppression of TGF-beta1/Smad signaling in human adult dermal fibroblasts. *Int J Clin Exp Pathol,* 7**,** 8616-26.

Wiktor-Jedrzejczak, W., Bartocci, A., Ferrante, A. W., Jr., Ahmed-Ansari, A., Sell, K. W., Pollard, J. W. & Stanley, E. R. 1990. Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 87**,** 4828-32.

Willems, I. E., Havenith, M. G., De Mey, J. G. & Daemen, M. J. 1994. The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars. *Am J Pathol,* 145**,** 868-75.

Witherel, C. E., Abebayehu, D., Barker, T. H. & Spiller, K. L. 2019. Macrophage and Fibroblast Interactions in Biomaterial-Mediated Fibrosis. *Adv Healthc Mater,* 8**,** e1801451.

World Health Organization. 2017. *Cardiovascular diseases (CVDs)* [Online]. Available: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds) [Accessed 05.06.2020].

Yakar, S., Liu, J. L., Fernandez, A. M., Wu, Y., Schally, A. V., Frystyk, J., Chernausek, S. D., Mejia, W. & Le Roith, D. 2001. Liver-specific igf-1 gene deletion leads to muscle insulin insensitivity. *Diabetes,* 50**,** 1110-8.

Yang, R., Bunting, S., Gillett, N., Clark, R. & Jin, H. 1995. Growth hormone improves cardiac performance in experimental heart failure. *Circulation,* 92**,** 262-7.

Zawel, L., Le Dai, J., Buckhaults, P., Zhou, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. & Kern, S. E. 1998. Human Smad3 and Smad4 Are Sequence-Specific Transcription Activators. *Molecular Cell,* 1**,** 611-617.

Zeisberg, E. M. & Kalluri, R. 2010. Origins of cardiac fibroblasts. *Circ Res,* 107**,** 1304-12.

Zeisberg, E. M., Tarnavski, O., Zeisberg, M., Dorfman, A. L., McMullen, J. R., Gustafsson, E., Chandraker, A., Yuan, X., Pu, W. T., Roberts, A. B., Neilson, E. G., Sayegh, M. H., Izumo, S. & Kalluri, R. 2007. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med,* 13**,** 952-61.

Zhou, J., Jiang, K., Ding, X., Fu, M., Wang, S., Zhu, L., He, T., Wang, J., Sun, A., Hu, K., Chen, L., Zou, Y. & Ge, J. 2015. Qiliqiangxin inhibits angiotensin II-induced transdifferentiation of rat cardiac fibroblasts through suppressing interleukin-6. *J Cell Mol Med,* 19**,** 1114-21.

Zornoff, L. A., Paiva, S. A., Duarte, D. R. & Spadaro, J. 2009. Ventricular remodeling after myocardial infarction: concepts and clinical implications. *Arq Bras Cardiol,* 92**,** 150-64.

6 Danksagung

Eine große Zahl von Menschen hat zu dieser Arbeit beigetragen, allen voran Prof. Dr. Axel Gödecke, der mich während der gesamten Zeit am Institut überaus freundlich und engagiert betreut hat. Die immerwährende Unterstützung, die vielen förderlichen Ratschläge sowie die stets geöffnete Tür sind alles andere als selbstverständlich. Ich wertschätze sehr, dass es mir ermöglicht wurde, solange am Institut bleiben zu dürfen, um den Großteil meiner Arbeit ohne Unterbrechung abschließen zu können.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Ulrich Flögel für das Zweitgutachten dieser Dissertation bedanken.

Rianne Nederlof und André Heinen standen mir zu jeder Zeit (auch am Wochenende) mit Rat und Tat zur Seite und halfen mir sowohl im Labor als auch mit vielen nützlichen Einwänden und Verschlägen zu Stil und Darstellung meiner Arbeit. Auch die netten Gespräche und die gute Atmosphäre außerhalb der Arbeitszeit weiß ich sehr zu schätzen.

So manche spaßigen und hierdurch möglicherweise weniger produktiven Tage im Büro verdanke ich euch, Sophia und Alex. Ihr habt den Laboralltag abwechslungsreicher gemacht und wart tolle Weggefährtinnen.

Für das Anlernen von Labortechniken, die stetige Hilfsbereitschaft und den freundschaftlichen Umgang möchte ich mich bei André, Susanne, Steffi, Thomas, Priya, Lisa, Astrid, Anne, Olesia, Selina und insbesondere bei Julia und Daniela bedanken. Eure Betreuung und Unterstützung hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und das Fundament für eine schöne Zeit am Institut gelegt.

Danken möchte ich darüber hinaus Sandra Berger und Janett Schindler für die organisatorische Hilfe rund um mein Promotionsvorhaben.

Niloofar Ale-Agha aus dem Leibniz-Institut für Umweltmedizinische Forschung unter der Leitung von Prof. Dr. Judith Haendeler unterstützte mich während der Methodenetablierung zur Isolation von murinen kardialen Fibroblasten.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die mir durch ihre uneingeschränkte Unterstützung Rückhalt auf dem Weg zum erfolgreichen Abschluss meines Studiums und der Promotion gegeben haben.

(Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von September 2019 bis Dezember 2021 am Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke angefertigt.)