

Aus dem Zentralinstitut für Klinische Chemie und
Laboratoriumsdiagnostik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Friedrich Boege

Kardiale Myofibroblastendifferenzierung
– Rolle von Mitochondrien, Telomerase Reverse Transkriptase
und Thioredoxin-1

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Julia Rosen

2022

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. Judith Haendeler

Zweitgutachter: Prof. Dr. Axel Gödecke

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Rosen J, Jakobs P, Ale-Agha N, Altschmied J, Haendeler J (2020) Non-canonical functions of Telomerase Reverse Transcriptase – Impact on redox homeostasis. *Redox Biol.* 2020 Jul; 34: 101543.

Ale-Agha N, Jakobs P, Goy C, Zurek M, Rosen J, Dyballa-Rukes N, Metzger S, Greulich J, Von Ameln F, Eckermann O, Unfried K, Brack F, Grandoch M, Thielmann M, Kamler M, Gedik N, Kleinbongard P, Heinen A, Heusch G, Gödecke A, Altschmied J, Haendeler J (2021) Mitochondrial Telomerase Reverse Transcriptase Protects From Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Improving Complex I Composition and Function. *Circulation.* 2021 Dec 7; 144(23):1876-1890.

Zusammenfassung

Kardiale Fibroblasten sind unerlässlich für die Stabilität und Funktionalität des menschlichen Herzens nach einem Herzinfarkt. Entscheidend für den Erhalt der Herzfunktion sowie die Heilung im Infarktareal ist die Differenzierung kardialer Fibroblasten zu Myofibroblasten. Myofibroblasten sind charakterisiert durch die Bildung von Fasern von glattmuskulärem alpha Aktin (*alpha smooth muscle* Aktin, α SMA) welches sie bedingt kontraktile und dehnungsresistent macht. Die Differenzierung vom Fibroblasten zum Myofibroblasten scheint sowohl von intakten Mitochondrien als auch von der Menge an intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies abhängig zu sein. Ein Ziel dieser Arbeit war nachzuweisen, dass die Inhibition verschiedener Komplexe der mitochondrialen Atmungskette die Differenzierung vom kardialen Fibroblasten zum Myofibroblasten verhindert. Unlängst wurde das Protein Prohibitin 1 identifiziert, welches mit freien Matrixproteinen von Komplex I interagiert, und damit die Aktivität von Komplex I reduziert und die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies erhöht. Zwei wesentliche Regulatoren von mitochondrialem Prohibitin 1 und der Menge an reaktiven Sauerstoffspezies sind die Telomerase Reverse Transkriptase (TERT) und Thioredoxin-1 (Trx-1). In dieser Arbeit wurden daher auch die Effekte von TERT und Trx-1 auf die Myofibroblastendifferenzierung untersucht.

Es wurden zuerst kardiale Fibroblasten aus Wildtyp Mäusen isoliert, kultiviert und mittels Transformierendem Wachstumsfaktor beta 1 (*Transforming Growth Factor β 1*, TGF- β 1) zu Myofibroblasten differenziert. In diesem Modell wurde Komplex I der mitochondrialen Atmungskette spezifisch mittels Rotenon blockiert. Komplex V wurde spezifisch mit Oligomycin inhibiert. Im Anschluss wurde das α SMA-Niveau gemessen. Um die Rolle von Trx-1 zu ergründen, wurde das intrazelluläre Niveau von Trx-1 mittels lentiviraler Transduktion erhöht. Nach Stimulation mit TGF- β 1 wurde die α SMA Menge bestimmt. Kardiale Fibroblasten, welche über TERT ubiquitär verfügen, wurden im Vergleich zu Fibroblasten, welche lediglich im Mitochondrium TERT aufweisen oder vollständig TERT defizient sind, bezüglich der Expression und Proteinmenge an Prohibitin 1, der Komplex I Assemblierung und ihrer Reaktion auf den Telomerase Aktivator 65 (TA65), analysiert.

Werden die Komplexe I und V der mitochondrialen Atmungskette mittels Rotenon oder Oligomycin inhibiert, bilden sich trotz Stimulation mit TGF- β 1 keine α SMA-Fasern. Folglich ist die Differenzierung zum Myofibroblasten abhängig von einer intakten oxidativen Phosphorylierung. Trx-1 wirkt antioxidativ und senkt den Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies. Eine Steigerung von Trx-1 mittels Lentiviren hemmt die Bildung von α SMA. TA65 hingegen steigert die α SMA-Faserbildung in Anwesenheit von TERT. Ein Zusammenspiel zwischen Prohibitin 1 und der Lokalisation von TERT konnte ebenfalls nachgewiesen werden, da eine Erhöhung von mitochondrialer TERT die Menge an mitochondrialem Prohibitin 1 reduziert, und es dadurch zu einer verbesserten Assemblierung des Komplexes I der Atmungskette kommt.

Zusammenfassend ist die Myofibroblastendifferenzierung abhängig von Komplex I und V der mitochondrialen Atmungskette sowie der Degradation von Trx-1. Maßgeblichen Einfluss auf die Myofibroblastendifferenzierung hat die Menge an TERT im Mitochondrium, welche durch TA65 erhöht wird, was möglicherweise von klinischer Bedeutung sein kann.

Summary

Cardiac fibroblasts play an essential role after myocardial infarction, keeping up stability and functioning of the ventricle and initializing the healing process. They differentiate into myofibroblasts, which are characterized by fibers of alpha smooth muscle actin (α SMA) making them limitedly contractile and resistant to elongation. The myofibroblast differentiation seems to be dependent on intact mitochondria and the amount of intracellular reactive oxygen species. One objective of this work was to analyze the impact of the inhibition of complex I and complex V of the respiratory chain on myofibroblast differentiation. Recently the protein Prohibitin 1 was identified to interact with matrix subunits of complex I of the respiratory chain, which leads to reduced complex I activity and thus, increased reactive oxygen species. Two important regulators of the mitochondrial Prohibitin 1 amount and the reactive oxygen species levels are the Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) and Thioredoxin-1 (Trx-1), respectively. Therefore, the effects of TERT and Trx-1 on myofibroblast differentiation were analyzed.

First cardiac fibroblasts were isolated from wildtype mice, cultivated and stimulated with transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) to differentiate into myofibroblasts. Using this model complex I of the respiratory chain was specifically inhibited by rotenone. Complex V was specifically inhibited by oligomycin. Then α SMA was measured. To examine the role of Trx-1 its intracellular level was increased using a lentiviral approach. After treatment with TGF- β 1 the α SMA levels were measured. To investigate the role of TERT, cardiac fibroblasts isolated from mice with different genetic backgrounds were examined. Wildtype cardiac fibroblasts with ubiquitous TERT expression were compared to fibroblasts, which have TERT only in mitochondria and totally TERT deficient fibroblasts. In those cells the levels of Prohibitin 1, the complex I assembly and the effects of the telomerase activator-65® (TA65) were investigated.

When complex I or V of the respiratory chain are blocked with rotenone or oligomycin, respectively, cardiac fibroblasts are unable to build α SMA fibres after TGF- β 1 treatment. Thus, the myofibroblast differentiation is dependent on functional oxidative phosphorylation. Trx-1 acts antioxidative and lowers the level of reactive oxygen species inside the cell. Increasing Trx-1 by the lentiviral approach blocks the formation of α SMA fibres. On the contrary, TA65 boosts the α SMA synthesis in presence of TERT. An interplay between Prohibitin 1 and the localization of TERT was also determined, since an increase of mitochondrial TERT reduced the levels of mitochondrial Prohibitin 1 leading to an improved assembly of complex I of the respiratory chain.

In summary, the myofibroblast differentiation depends on functional complex I and complex V of the respiratory chain as well as on the degradation of Trx-1. Importantly, mitochondrial TERT improves the myofibroblast differentiation. The amount of mitochondrial TERT can be increased by TA65, which could be in the long run of clinical relevance.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxidsulfat
α SMA	<i>alpha smooth muscle</i> Aktin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Albumin Fraktion V
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	<i>complementary</i> DNA
cm	Zentimeter
C_t	<i>cycle threshold</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
CABG	<i>coronary artery bypass</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dH ₂ O	destilliertes Reinstwasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (Fötales Rinderserum)
g	Gramm
h	Stunde(n)
HBS	<i>Hepes Buffered Saline</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>
kDa	Kilodalton
ko	<i>knock out</i>
kg	Kilogramm
l	Liter
M	Molar
mito	mitochondrial

mM	Millimolar
min	Minute(n)
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	semi-quantitative <i>real-time</i> Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RIPA	Radioimmunprecipitation Assay
RIPC	<i>remote ischemic preconditioning</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate</i> Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunden
SNPs	<i>single nucleotide polymorphisms</i>
TA65	Telomerase Aktivator 65
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TERC	<i>telomerase RNA component</i>
TERT	<i>telomerase reverse transcriptase</i>
TGF-β1	<i>transforming growth factor-β 1</i>
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Trx-1	Thioredoxin-1
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume in volume</i>
wt	Wildtyp
w/v	<i>weight in volume</i>
Xg	x-fache der mittleren Erdbeschleunigung

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Epidemiologie kardiovaskulärer Erkrankungen	1
1.2	Myokardinfarkt auf zellulärer Ebene	2
1.3	Kardiale Fibroblasten nach Myokardinfarkt	3
1.4	Mitochondriale Atmungskette und oxidative Phosphorylierung	4
1.5	Prohibitine	5
1.6	Assemblierung von Komplex I	6
1.7	Redox-Homöostase	7
1.8	Thioredoxin-1	7
1.9	Telomerase Reverse Transkriptase	8
1.10	Telomerase Aktivator 65 (TA65)	9
1.11	Ziele der Arbeit	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Chemikalien, Puffer, Lösungen und Kits	11
2.2	Geräte	13
2.3	Tierexperimentelle Genehmigung	15
2.4	Zellbiologische Methoden	15
2.4.1	Herkunft der kardialen Fibroblasten	16
2.4.2	Kultivierung muriner kardialer Fibroblasten	16
2.4.3	Auftauen und Passagieren	17
2.4.4	Transduktion muriner kardialer Fibroblasten mit lentiviralen Vektoren	18
2.4.5	Transfektion von HEK293T-Zellen zur Produktion retroviraler Partikel	20
2.4.6	Konzentrierung der Viruspartikel	21
2.4.7	Bestimmung der Virustiter	21
2.4.8	Transduktion muriner kardialer Fibroblasten	21
2.5	Molekularbiologische Methoden	22

2.5.1	RNA Isolierung	22
2.5.2	Konzentrationsbestimmung im Nanodrop	23
2.5.3	Agarose-Gelelektrophorese	23
2.5.4	cDNA-Synthese.....	25
2.5.5	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	25
2.5.6	Semi-quantitative <i>real-time</i> Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR).....	26
2.5.7	PCR-Primerdesign und Primerliste	28
2.6	Proteinbiochemische Methoden	29
2.6.1	Zellyse	29
2.6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	30
2.6.3	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>) –.....	31
	Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.6.4	Immunoblot	33
2.7	Immunfluoreszenzfärbungen	35
2.7.1	Kultivieren der Zellen auf Deckgläschen	36
2.7.2	Immunfluoreszenzfärbung.....	36
2.7.3	Immunfluoreszenzaufnahmen	37
2.8	Statistik	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Einfluss von Komplex I und V der mitochondrialen Atmungskette auf die Myofibroblastendifferenzierung	38
3.1.1	Komplex I ist notwendig zur Bildung von α SMA-Fasern in kardialen Fibroblasten	40
3.1.2	Die ATP-Synthase ist notwendig zur Myofibroblastendifferenzierung .	41
3.1.3	Morphologisch zeigen kardiale Fibroblasten nach Rotenon- oder Oligomycin-Behandlung keine α SMA-Faserbildung.....	42
3.2	Einfluss der Telomerase Reverse Transkriptase (TERT) auf die Myofibroblastendifferenzierung ist atmungskettenabhängig	44

3.2.1	TERT Expression ist wesentlich für die Myofibroblastendifferenzierung .	44
3.2.2	Eine Einschränkung der mitochondrialen Atmungskette behindert die Myofibroblastendifferenzierung	46
3.3	Der Telomerase Aktivator 65 (TA65) induziert Myofibroblastendifferenzierung	50
3.3.1	TA65 steigert die α SMA-Faserbildung in Fibroblasten aus TERT wt...	51
3.3.2	Der Effekt von TA65 ist vollständig TERT abhängig	52
3.3.3	TA65 hat keinen zusätzlichen Effekt auf die Myofibroblastendifferenzierung in mito TERT Zellen	53
3.3.4	TA65 verstärkt in kardialen Fibroblasten TERT-abhängig die Differenzierung zu Myofibroblasten	54
3.3.5	TA65 ist nicht in der Lage, die Inhibition der mitochondrialen Atmungskette zu kompensieren	55
3.4	Die Lokalisation von TERT im Mitochondrium reduziert die mitochondrialen Prohibitin 1-Spiegel	61
3.4.1	TERT beeinflusst die Prohibitin 1 Proteinmenge in Fibroblasten	62
3.4.2	Die Lokalisation von TERT und Prohibitin 1 wirken sich auf die Verfügbarkeit der Untereinheiten von Komplex I aus	63
3.5	Thioredoxin-1 beeinflusst die Redox-Homöostase der Zelle und verringert die Bildung von Stressfasern	65
4	Diskussion	68
	Schlussfolgerungen	74
	Ausblick	74
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	77

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie kardiovaskulärer Erkrankungen

Global wie lokal betrachtet stellen kardiovaskuläre Erkrankungen einen großen Teil aller Todesursachen dar [3]. Mit 37 % waren im Jahr 2017 Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems die häufigste Todesursache in Deutschland. Ischämische Erkrankungen des Herzens und der akute Myokardinfarkt machen unter diesen den größten Teil aus [4, 5].

Aufgrund der besseren Versorgung, durch bessere Interventionsmöglichkeiten und Medikamente überleben immer mehr Menschen einen Herzinfarkt. Daraufhin durchläuft der Ventrikel physiologische und anatomische Veränderungen. Während des Herzinfarkts sind nicht nur Kardiomyozyten, sondern auch andere Zelltypen im Herzen, bspw. Fibroblasten, und interzelluläre Komponenten, bspw. Kollagenfasern, betroffen. Innerhalb eines Tages treten Nekrosen im Infarktareal auf und Kollagenfasern dünnen aus und degradieren. Nach drei bis vier Tagen infiltrieren Entzündungszellen und Makrophagen das nekrotische Gewebe. Kurz darauf, nach vier bis fünf Tagen, beginnt der Infarkt zu expandieren, wodurch es zu einer Wandverdünnung und lokalen Dilatation kommt. Währenddessen produzieren Fibroblasten Kollagen und lagern es dem Infarktareal an. Wenn genug Kollagen akkumuliert, bildet sich eine Narbe, die die weitere Expansion verhindert. Die progressive Dilatation, Hypertrophie und Verdünnung der Narbe verändern die Geometrie des Ventrikels. Diese Veränderungen werden in ihrer Gesamtheit als *ventricular remodeling* bezeichnet. Neben den akuten funktionalen Einschränkungen verschlechtert sich durch das *ventricular remodeling* auch die Prognose des Patienten [6].

Ventricular remodeling umschreibt komplexe Prozesse auf zellulärer wie anatomischer Ebene. Eine Konsensaussage des *International Forum on Cardiac Remodeling* fasst es folgendermaßen zusammen: „*the genomic expression resulting in molecular, cellular and interstitial changes that are manifested clinically as changes in size, shape, and function of the heart after cardiac injury*“ [7]. *Ventricular remodeling* betrifft das infarzierte wie das nicht-infarzierte Myokard. Einige dieser Vorgänge werden neurohormonell beeinflusst, was einen häufigen therapeutischen Angriffspunkt darstellt. Chronische neurohormonelle Stimulation verändert die kontraktile Funktion

der Kardiomyozyten u.a. durch eine Dysregulation des intrazellulären Calcium-Stoffwechsels [8]. Modifikationen in der Genexpression führen zu Umwandlungen der kontraktile Strukturen, bspw. des Myosins durch Herunterregulation von *alpha*-Ketten und Hochregulation von *beta*-Ketten [9]. Apoptose von Kardiomyozyten verstärkt nicht nur die Expansion und Ausdünnung im Infarktreal, sondern auch ein Rutschen der Zellen im nicht infarzierten Myokard, da Adhäsionen zu anderen Zellen und zur extrazellulären Matrix verloren gehen. Das Rutschen der Zellen unterstützt eine longitudinale Hypertrophie und Dilatation des linken Ventrikels. Die anatomischen Veränderungen des linken Ventrikels beeinflussen die Hämodynamik des Ventrikels kurzfristig nützlich, auf lange Sicht jedoch negativ. Durch die Dilatation werden enddiastolisches und endsystolisches Volumen gesteigert, was in einer Senkung des ventrikulären Füllungsdrucks und pulmonalvenösen Drucks resultiert. Anfangs von Vorteil, resultiert die fortschreitende Dilatation in gesteigerter Wandspannung, welche zu kompensatorischer Hypertrophie des Myokards führt. Die gleichzeitige Hypertrophie und Verdünnung des Myokards laufen darauf hinaus, dass das linksventrikuläre Volumen schneller zunimmt als die Myokardmasse. Dieses Ungleichgewicht resultiert in einer höheren Wandspannung, verminderten subendokardialen Perfusion und schließlich einer verminderten Ejektionsfraktion. Um diese und langfristige Folgen wie bspw. Herzinsuffizienz zu bekämpfen stehen verschiedene therapeutische Optionen zur Verfügung [10].

Die Akuttherapie des Herzinfarkts als Notfallintervention ist getrennt von der Nachsorge zu betrachten. In der Nachsorge ist das Vorbeugen weiterer thrombembolischer Ereignisse von hoher Priorität, ebenso wie eine Bewahrung der Lebensqualität. Neben invasiven Hilfsmitteln zur Aufrechterhaltung der linksventrikulären Funktion bspw. perkutane Koronarrevaskularisation, implantierbare Kardioverter-Defibrillatoren oder kardiale Resynchronisationstherapie, ist die pharmakologische Therapie von entscheidender Bedeutung [11]. Eingriffe in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System oder das beta-adrenerge System können langfristig die Mortalität und Morbidität senken [12].

1.2 Myokardinfarkt auf zellulärer Ebene

Auf zellulärer Ebene kommt es nach dem Myokardinfarkt innerhalb von wenigen Stunden nach Gefäßverschluss zu einem Absterben von Kardiomyozyten. Im Infarktreal, den angrenzenden Bereichen, aber auch Randbereichen gehen Zellen in

Apoptose, während im Infarktareal auch viele Nekrosen beobachtet wurden. Kardiomyozyten sind enddifferenzierte Zellen, die nicht proliferieren oder aus anderen Zellen nachdifferenzieren können. Die wichtigsten physiologischen Zelltypen im menschlichen Herzen neben Kardiomyozyten sind Endothelzellen, Fibroblasten und glatte Gefäßmuskelzellen. Die größte Zellpopulation mit 40 - 60 % aller Zellen im Herzen stellen die Fibroblasten dar [13]. Bereits unter physiologischen Bedingungen sind sie essentiell für die kardiale Funktionalität. Fibroblasten unterhalten das chemische, mechanische und elektrische Milieu durch Zell-Zell-Interaktionen sowie parakrine und autokrine Kommunikation. Sie bilden das Gerüst des Herzens indem sie die extrazelluläre Matrix organisieren, bspw. durch die Sekretion oder Degradation von extrazellulären Matrix-Proteinen wie Kollagenen. Sie sind der einzige Zelltyp im Herzen, der nicht über eine Basalmembran verfügt und sind in der Lage bedarfsabhängig zu proliferieren, migrieren und differenzieren. Während Fibroblasten häufig als flache, spindelförmige Zellen definiert wurden, ist inzwischen klar, dass ihre Morphologie stark variabel ist [13]. Werden sie durch einen Myokardinfarkt chemisch und mechanisch gereizt, verändern sie ihre Struktur und Aktivität maßgeblich. Durch Wachstum, bedingte Kontraktilität und Sekretion von Kollagenen können sie das Absterben der Kardiomyozyten zum Teil kompensieren und Post-Myokardinfarkt die Funktion des Herzens aufrechterhalten [14].

1.3 Kardiale Fibroblasten nach Myokardinfarkt

Fibroblasten im Infarktareal sind mechanischem Stress und chemischen Reizen wie bspw. *Transforming Growth Factor β -1* (TGF β -1) ausgesetzt. Als Reaktion auf diese Reize und um die Funktionsfähigkeit des Herzens zu gewährleisten, differenzieren sie zu Myofibroblasten. Auch Zellen endothelialen oder epithelialen Ursprungs können unter gegebenen Umständen zu Myofibroblasten differenzieren [15]. Der Myofibroblast wurde erstmals 1971 definiert durch Gabbiani [16]. Intrazellulär werden Stressfasern aus *alpha smooth muscle* Aktin (α SMA) gebildet und extrazellulär Matrixproteine sezerniert [17]. Charakteristisch für Myofibroblasten ist die Bildung dieser α SMA-Fasern, welche sie dehnungsresistent und bedingt kontraktile werden lassen [18, 19]. Ihrem Ursprung geschuldet weisen sie neben diesen kontraktilen Eigenschaften migratorische, proliferative und sekretorische Fähigkeiten auf. Myofibroblasten stabilisieren initial das Infarktareal und spielen anschließend eine entscheidende Rolle im *ventricular remodeling*. Im Narbenbereich sind sie verantwortlich für Synthese und

Degradation von Kollagen. Durch die Organisation des Kollagenumsatzes und eine gewisse Kontraktilität modulieren sie wesentlich das Narbengewebe [20, 21]. Die Narbenentwicklung und damit verbunden kardiale Fibrose sind entscheidende Einflussfaktoren für die Prognose. Patienten, die eine verstärkte Expansion des Infarkts aufwiesen, sind mit einer höheren Wahrscheinlichkeit an Herzinsuffizienz erkrankt. Myofibroblasten sind durch eine zirkuläre Anordnung am Infarkttrand und ihre kontraktilen Fähigkeiten in der Lage, die Narbenränder näher zusammen zu bringen und so einer Expansion und Dilatation entgegen zu wirken [22]. Persistierende Myofibroblasten haben jedoch an falscher Position nachteilige Effekte.

Zum einen können Myofibroblasten in einer verheilten Narbe bis zu 17 Jahre persistieren und Kollagene produzieren [23]. Weiterhin produzieren sie auch in Bereichen des Herzens, die nicht vom Infarkt betroffen sind Kollagene [15]. Dies führt zu kardialer interstitieller Fibrosierung, welche zu nachteiligen Strukturveränderungen (*adverse remodeling*) führt. *Adverse remodeling* ist mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert, wie bspw. Bluthochdruck, Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz [24, 25].

Myofibroblasten selbst und ihre Aktivität werden gesteuert durch mechanischen Stress, autokrine und parakrine Faktoren, vasoaktive Peptide (bspw. Angiotensin II), Wachstumsfaktoren (bspw. TGF β -1) und Hormone aus dem Blutkreislauf (bspw. Aldosteron). Außerdem wurde gezeigt, dass sie auf proinflammatorische Zytokine wie Tumor Nekrose Faktor (TNF) und Interleukine, die von Entzündungszellen ausgeschüttet werden, reagieren. Diese Faktoren modulieren ihre Proliferationsrate, Migrationsrate, sowie ihre Kapazität Kollagenvorläufer, Enzyme und matrizelluläre Proteine zu synthetisieren und sezernieren [15].

Eine Möglichkeit zu finden, kurze Zeit nach Infarkt die Myofibroblastendifferenzierung zu stimulieren, würde großes therapeutisches Potential eröffnen.

1.4 Mitochondriale Atmungskette und oxidative Phosphorylierung

Die Differenzierung vom kardialen Fibroblasten zum Myofibroblasten erfordert einen Anstieg der intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP). ATP wird hauptsächlich bei der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien generiert. Gleichzeitig produzieren die Mitochondrien einen entscheidenden Anteil der intrazellulären ROS und beeinflussen

maßgeblich die Redox-Homöostase der Zelle. Die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien scheint also eine Rolle in der Myofibroblastendifferenzierung zu spielen. Ob und wenn ja, welche Komplexe der Atmungskette einen Einfluss ausüben ist jedoch ungeklärt. Die oxidative Phosphorylierung umfasst eine Protonentransportkette, die an einer Reihe von Enzymkomplexen in der inneren Mitochondrienmembran stattfindet und in der ATP-Produktion an Komplex V mündet. Störungen der oxidativen Phosphorylierung konnten nicht nur mit Herzerkrankungen (bspw. Kardiomyopathie) assoziiert werden, sondern beeinträchtigen neben der ATP-Produktion die intrazelluläre Calcium-Homöostase und verändern die Redox-Balance [26].

Die mitochondriale Atmungskette besteht aus einer Reihe von Redox-Enzymen, die $\text{NADH}+\text{H}^+$ und FADH_2 als Substrate nutzen, um einen Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran aufzubauen. Komplex I, die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase, ist der größte und effektivste Komplex der Atmungskette. Die Energie, die durch den Elektronenfluss von Komplex I pro $\text{NADH}+\text{H}^+$ erzeugt wird, reicht aus um vier Protonen von der Matrix in den Intermembranraum zu pumpen. Komplex II pumpt keine Protonen direkt in den Intermembranraum, überträgt jedoch Protonen und Elektronen von FADH_2 auf Ubichinon, welches dann Komplex III und IV zur Energiegewinnung dient. Der Elektronenfluss der Komplexe III und IV erzeugt weniger Energie, sodass von diesen Komplexen nur je zwei Protonen pro Zyklus in den Intermembranraum gepumpt werden. Der Protonengradient über der inneren Mitochondrienmembran erzeugt eine elektrochemische Potentialdifferenz, bei deren Ausgleich Energie freigesetzt wird. Diesen Mechanismus nutzt die ATP-Synthase (Komplex V) um aus ADP und P_i den universalen Energieträger ATP zu synthetisieren. Insgesamt kann in der Atmungskette pro Molekül $\text{NADH}+\text{H}^+$ mehr ATP generiert werden als pro Molekül FADH_2 , was die Wichtigkeit von Komplex I für die Energieproduktion der Zelle erklärt [27].

1.5 Prohibitine

Prohibitine sind Proteine, die ubiquitär exprimiert werden und sich im Zytosol, dem Zellkern und den Mitochondrien befinden [28]. Je nach Lokalisation erfüllen sie verschiedene vielfältige Aufgaben innerhalb der Zelle [29]. Ihre Hauptfunktionen scheinen Prohibitine in den Mitochondrien zu erfüllen, wo sie an der inneren Membran ringförmige Komplexe bilden, die die mitochondriale Funktion beeinflussen [30]. Die

Regulation der mitochondrialen Funktionen ist ein komplizierter Vorgang, da Mitochondrien nicht nur durch oxidative Phosphorylierung die Zelle mit Energie versorgen, sondern auch essentielle Rollen in Redox-Homöostase, Apoptose und Überleben der Zelle spielen [31, 32]. In Zellen mit einem hohen Energieverbrauch konnte eine erhöhte Expression von Prohibitinen nachgewiesen werden. Prohibitine sind beteiligt an Aufbau und Aktivität der Atmungskette, mitochondrialer Biogenese, Netzwerk, Apoptose, Mitophagie und der Degradation von Komplexen der oxidativen Phosphorylierung [33]. Die Interaktion von Prohibitin-Komplexen mit ungebundenen Untereinheiten von Atmungskettenkomplexen deutet auf eine Chaperon ähnliche Aktivität der Prohibitine während der Biogenese der Atmungskette hin [34]. Es konnte gezeigt werden, dass Prohibitin mit Untereinheiten von Komplex I interagiert [34]. Möglicherweise schützt Prohibitin Komplex I-Untereinheiten vor der Assemblierung und dient auf diese Weise als *complex I assembly chaperone* [33-35].

1.6 Assemblierung von Komplex I

Die Biogenese von Komplex I umfasst die Assemblierung von 45 Untereinheiten, deren Gene auf dem nukleären oder mitochondrialen Genom liegen. Während davon ausgegangen wird, dass die Zusammensetzung der einzelnen Untereinheiten in aufeinander folgenden Schritten stattfindet, sind diese Prozesse noch nicht vollends verstanden. Strukturellen und phylogenetischen Daten zufolge verbinden sich einzelne Untereinheiten erst zu *modules* bevor diese sich weiter arrangieren. Definiert wurden bisher das *dehydrogenase module*, *hydrogenase module* und *proton translocation module*. Die Untereinheiten in der Membran und in dem sogenannten Matrixarm sind unterschiedlich, so stellen NDUFS3 und NDUFV2 Proteine des Matrixarms. NDUF A9 und NDUF B9 gehören beide zu den membranständigen Proteinen [36]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Suppression von NDUFS3 die generelle Komplex I-Funktionalität beeinträchtigt, nicht jedoch die nachgeschaltete Zusammensetzung anderer Untereinheiten. Diese Funktionseinschränkung von Komplex I, welcher den kritischen Startpunkt der mitochondrialen Elektronentransportkette darstellt, resultierte in einem metabolischen Wechsel der Energieproduktion der Zellen. Die Suppression von NDUFS3 korrelierte mit einer Hochregulation von Komplex III- und IV Untereinheiten, was auf eine Kompensation der Komplex I-Funktionseinschränkung und/oder mitochondrialen Stress hindeutet [37].

1.7 Redox-Homöostase

Ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Reduktion und Oxidation (Redox-Homöostase) zu halten ist wichtig für die Funktionalität und das Überleben jeder Zelle. Multiple intra- wie extrazelluläre Faktoren können das Verhältnis meist zugunsten oxidativer Faktoren aus dem Gleichgewicht bringen, wodurch oxidativer Stress entsteht. Um die intrazelluläre Redox-Homöostase aufrecht zu erhalten und oxidativen Stress zu vermeiden stehen oxidativen Faktoren antioxidative Systeme gegenüber. Zu den wichtigsten oxidativen Faktoren zählen reaktive Sauerstoffspezies - wie Superoxid (O_2^-) oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2), welche sowohl endogenen als auch exogenen Ursprungs sein können. Eine vermehrte mitochondriale Produktion oder ein gestörter Abbau derselben erhöhen u.a. den Ischämie/Reperfusionsschaden nach Herzinfarkt, Herzversagen oder diabetischer Kardiomyopathie nachteilig [26]. In den Mitochondrien selbst, wie auch im Rest der Zelle, stehen oxidativem Stress antioxidative Enzyme und Systeme gegenüber. Zu den wichtigsten Vertretern dieser Enzyme gehören die Katalase und die Superoxiddismutase. Entscheidende antioxidative Systeme sind ebenfalls die Thioredoxinsysteme und das Glutathionsystem [26, 38, 39].

1.8 Thioredoxin-1

Thioredoxin-1 (Trx-1) ist eine Oxidoreduktase, die ubiquitär in Säugetierzellen und prokaryotischen Zellen vorkommt. Das Thioredoxin-1-System besteht aus zwei Enzymen, der Thioredoxin-1-Reduktase und dem Trx-1. Die Thioredoxin-1-Reduktase reduziert oxidiertes Trx-1 unter Verwendung von NADPH [40]. Trx-1 ist ein wichtiges intrazelluläres Antioxidans, aber auch ein Signalmolekül [40]. Oxidativer Stress induziert die Expression von Trx-1 [41]. Trx-1 reduziert die durch oxidativen Stress entstandenen Disulfidbrücken in einer Vielzahl von Proteinen. Außerdem senkt Trx-1 im Zusammenspiel mit Peroxiredoxin die Menge an ROS, repariert DNA- und Proteinschäden und greift in Redox-sensitive Signalwege bspw. von *nuclear factor ,kappa light chain enhancer' of acitvated B-cells* (NF- κ B) und *activator protein 1* (AP-1) ein [41, 42]. Die durch ROS induzierten Schäden spielen eine entscheidende Rolle im Mechanismus und der Prognose von Reperfusionsschäden [43]. Wie bereits beschrieben (1.4) ist ein Anstieg von ROS notwendig für die Formation von α SMA-Fasern und die Differenzierung von kardialen Fibroblasten zu Myofibroblasten. Bisher ist jedoch nicht untersucht worden, ob eine Regulation von Trx-1 notwendig ist für die Myofibroblastendifferenzierung.

1.9 Telomerase Reverse Transkriptase

Der Telomerverkürzung wirkt das Enzym Telomerase entgegen. Die Telomerase ist ein Ribonukleoprotein und besteht aus zwei Untereinheiten, der RNA-Komponente *telomerase RNA component* (TERC) und der katalytischen Untereinheit *telomerase reverse transcriptase* (TERT) [44]. Während TERC in vielen Geweben zu finden ist, wird die Verfügbarkeit von TERT genauestens reguliert, weshalb davon ausgegangen wird, dass TERT der limitierende Faktor ist [45]. In Geweben mit hoher Zellteilungsrate, wie Tumorzellen, Stammzellen oder Keimzellen, wird typischerweise viel TERT gefunden, da es das Zellteilungspotential erhöht [46]. In den vergangenen Jahren konnte mehrfach nachgewiesen werden, dass TERT in vielen weiteren Geweben eine Rolle spielt und nicht nur seine kanonische Funktion der Telomerverlängerung erfüllt, sondern auch andere Aufgaben und Interaktionen innerhalb der Zelle hat [47, 48].

Die extranukleäre Aktivität von TERT kann Einfluss nehmen auf die Redox-Homöostase der Zelle, ihr Überleben, antiapoptotische und mitochondriale Funktionen, sowie weitere Signalwege [48, 49]. Diese Funktionen stehen u.a. in Verbindung mit Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems [50]. TERT ist essentiell für eine gesunde Entwicklung des Herzens und ihr Fehlen korreliert mit Anomalien und einer eingeschränkten Herzfunktion [51]. Reguliert wird die TERT-Aktivität transkriptional und posttranskriptional, sodass die Verfügbarkeit des Enzyms an die Anforderungen der Zelle angepasst wird [48, 49]. Genexpression, Proteinphosphorylierung und Protein-Protein-Interaktionen mit bspw. *heat shock proteins* (HSP) oder Akt1 kontrollieren die dynamische Verfügbarkeit des Enzyms [48, 49]. Ein wichtiger Einflussfaktor auf die TERT-Aktivität ist außerdem Translokation. Das Enzym wird sowohl mit einem C-terminalen nukleären Lokalisationssignal, als auch mit einem N-terminalen mitochondrialen Lokalisationssignal in das Zytosol synthetisiert [48, 52]. Was über die finale Lokalisation entscheidet, ist noch nicht ganz klar. Ist die Zelle in einem guten physiologischen Zustand finden sich ca. 10 - 20 % der zellulären TERT in den Mitochondrien [53]. Kommt es durch ROS zu oxidativem Stress wird durch Phosphorylierung an Tyrosin 707 die Translokation von TERT aus dem Kern ins Zytosol induziert und die Präsenz von TERT in den Mitochondrien steigt an [48, 49].

Welche Funktionen TERT im Mitochondrion erfüllt, ist noch nicht komplett aufgeklärt. Mitochondriale DNA verfügt nicht über Telomere, demnach muss TERT in diesem

Kompartiment nicht-telomerische Funktionen haben. Es konnte nachgewiesen werden, dass TERT die mitochondriale DNA vor Schaden schützt und die oxidative Phosphorylierung verbessert [48, 54]. TERT interagiert mit der mitochondrialen DNA direkt oder über weitere Proteine. Dabei konnten verschiedene Interaktionspositionen mit der mitochondrialen DNA nachgewiesen werden, die für die NADH:Ubiquinon Reduktase (Komplex I) der oxidativen Phosphorylierung kodieren [54]. Unter oxidativem Stress verbesserte ein vermehrtes Angebot von TERT die Aktivität von Komplex I und das mitochondriale Membranpotenzial [54, 55]. Außerdem wirkt TERT der Bildung von ROS in den Mitochondrien entgegen. In Endothelzellen verhinderte die Überexpression mitochondrialer TERT die durch H₂O₂ induzierte Apoptose [54]. Offensichtlich erfüllt TERT eine essentielle Rolle in den Mitochondrien und im Redox-Status der Zelle [48]. Dieses vielversprechende Enzym birgt möglicherweise hohes therapeutisches Potential, weshalb eine Steigerung seiner Aktivität in den Mitochondrien von hohem wissenschaftlichem Interesse ist [56]. Bereits in der traditionellen chinesischen Medizin wurde die Wurzel *Astragalus membranaceus* verwendet. Der Extrakt dieser Wurzel bewirkte eine Steigerung der Aktivität der Telomerase [57].

1.10 Telomerase Aktivator 65 (TA65)

Der Extrakt dieser Wurzel wurde im Jahr 2000 im Rahmen einer Untersuchung von Naturprodukten aus der traditionellen chinesischen Medizin als kleines chemisches Molekül zur Telomerase Aktivierung entdeckt und Telomerase Aktivator 65 (TA65) genannt [58]. TA65 wird seit 2008 durch *T.A. Sciences* als Nahrungsergänzungsmittel verkauft [59]. Verschiedene Studien in den letzten Jahren haben zeigen können, dass TA65 die Telomerase Aktivität und die Menge an TERT steigern kann [57].

Es wurde bis heute jedoch nicht untersucht, ob nukleäre oder mitochondriale TERT durch TA65 gesteigert wird. Sollte TA65 tatsächlich in der Lage sein, die Aktivität der mitochondrialen TERT zu steigern, so wäre eine Erhöhung der extranukleären Funktionen ebenfalls denkbar. Vor dem Hintergrund, dass TERT in Verbindung mit der Redox-Homöostase und oxidativen Phosphorylierung, aber auch kardiovaskulären Erkrankungen steht, hat dieser Zusammenhang hohe wissenschaftliche und klinische Relevanz.

1.11 Ziele der Arbeit

1. Welche Auswirkungen hat die Inhibition einzelner Komplexe der mitochondrialen Atmungskette auf die Differenzierungsprozesse des Myofibroblasten?
2. Welche Rolle spielt mitochondriale TERT in der Myofibroblastendifferenzierung?
3. Wo besteht der Zusammenhang zwischen TERT und Prohibitin 1?
4. Haben die Lokalisation von TERT und Prohibitin 1 Einfluss auf die Assemblierung von Komplex I der mitochondrialen Atmungskette?
5. Wie wirkt sich die Veränderung des Redox-Status der Zelle durch die lentivirale Überexpression von Thioredoxin-1 auf die Differenzierungsprozesse aus?

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Puffer, Lösungen und Kits

Feinchemikalien und Lösungsmittel wurden von Carl Roth, Karlsruhe bezogen.

Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterial	Firma
Acrylamide 4K – Solution (30 %) - Mix 29:1	PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt
Agarose Standard	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose, UltraPure	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte
Albumin Fraktion V, proteasefrei (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe
Amersham ECL™ start Western blotting detection reagent	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt
Bio-Rad Protein Assay Kit II	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen
Calcium Phosphate Transfection Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte
Chromatography Paper 3 mm	Labnet International, Inc., Edison, USA
Deckgläschen	Carl Roth, Karlsruhe
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Ethidiumbromid-Lösung, 1 % (w/v)	Carl Roth, Karlsruhe
Fötiales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte
Gel-Blotting-Papiere (GB005) Whatman®	Carl Roth, Karlsruhe
Gel Loading Dye, Blue (6X) für RNA	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte
IGEPAL® CA-630	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Low molecular weight DNA ladder	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
Medizinischer Röntgenfilm	Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf
Milchpulver Blotting Grade	Carl Roth, Karlsruhe
MyTaq™ HS DNA Polymerase	BioCat, Heidelberg
5x MyTaq™ reaction buffer	BioCat, Heidelberg

Natriumdodecylsulfat (SDS) Pellets	Carl Roth, Karlsruhe
Oligomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Parafilm®	Bemis Company, Inc., Oshkosh, USA
Pasteur Pipette	Hamilton Company, Reno, Nevada, USA
Penicillin Streptomycin-Mix (Pen Strep)	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte
Plastik-Halbmikroküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Prestained protein standard, Bio-Rad #161-0375	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen
Prolong Diamond Antifade Mountant	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte
Protease-Inhibitor Cocktail (EDTA-free, in DMSO 100x)	Bimake, München
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Blotting Membrane	GE Healthcare, Freiburg
QuickTiter™ Lentivirus Titer Kit (Lentivirus-associated HIV p24)	Cell Biolabs, Inc., San Diego, USA
RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Rotenon	EMD Millipore Corp., Burlington, USA
Röntgen-Entwickler und Fixierer-Lösungen	ADEFO, Neu-Isenburg
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
2x SYBR Green qPCR Master Mix	Bimake, München
T75 Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Telomerase Aktivator 65 (TA65)	T.A. Sciences Inc., New York, USA
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1), human	Pepro Tech, Hamburg
Tris-Base	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Carl Roth, Karlsruhe
Triton® X-100	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte
TRIzol™ Reagent	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte
0,5 % Trypsin-EDTA (10x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte
Tween®-20	Carl Roth, Karlsruhe
Vivacell 100 with PES membrane	Sartorius AG, Göttingen
6-well-Zellkulturplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen	TPP, Trasadingen, Schweiz

Zellspachtel	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhrchen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Ziegenserum (<i>normal goat serum</i>)	Merck KGaA, Darmstadt

2.2 Geräte

Typenbezeichnung	Firma
Analysenwaage CP 124 S	Sartorius AG, Göttingen
CO ₂ Inkubatoren, Heracell 150 und 240	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte
CO ₂ Begasungsbrutschrank	Binder GmbH, Tuttlingen
Elektrophorese Netzgeräte EV202	Peqlab, VWR Erlangen
PowerPac HC	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen
Eppendorf Einkanal-Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Flachbett-Gelelektrophorese-Kammer	Carl Roth, Karlsruhe Peqlab, VWR, Erlangen
Mikropipetten BioPette PLUS	Labnet International, Inc., Edison, USA
Mikroskop CKX31SF	Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg
Mini PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen
Neubauer (Zählkammer)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen
Orbitalschüttler IKA® HS 260 basic	IKA, Staufen
pH-Meter Seven Go	Mettler Toledo, Schwerzenbach, Schweiz
Röntgenkassetten	Carl Roth, Karlsruhe Dr. Goos-Suprema GmbH, Heidelberg
Spektralphotometer EMC-11-UV	Emclab, Duisburg
Spektralphotometer Nanodrop 2000c	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte
Thermocycler MyCycler™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen
Thermocycler Rotor-Gene Q	QIAGEN GmbH, Hilden
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Mini-Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen
Transfertank und Gelhalterungskassette	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen
UV-Transilluminator	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Vortex Mixer, Vortex Genie 2 und Vortex Mixer 7-2020	NeoLab® Migge, GmbH, Heidelberg
Waage Kern EW820-2NM	Kern & Sohn GmbH, Balingen

Zentrifugen Centrifuge 5424 R Heraeus Fresco 17 Mikro 22 R Rotina 420R	Eppendorf AG, Hamburg Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
--	--

Tabelle 1: Für die PCR verwendete Primer

Name	Sequenz in 5'→3' Richtung	Produkt	cDNA-Verdünnung
FLAG for2	CAAAGACGATGACGACAAGC	276 bp	1:5
hmTXN1 Ex04 rev1	GGCATGCATTTGACTTCAC		
hmRPL32 Ex02 for1	GTGAAGCCCAAGATCGTCAA	257 bp	1:25 (PCR) / 1:10 (qRT-PCR)
hmRPL32 Ex03 rev1	TTGTTGCACATCAGCAGCAC		
mPHB Ex06 for1	ACAGGTGGCTCAGCAGGAA	425 bp	1:10
mPHB Ex07 rev1	AGAAGTGTAACAATAAAAGCTTCGC		

Alle Primer wurden von Merck KGaA, Darmstadt, bezogen.

Tabelle 2: Liste der für Immunoblots verwendeten Antikörper

Antikörper	Lot	Spezies	Eingesetzte Verdünnung	Firma
anti α -smooth muscle Actin antibody	GR229528-1	Kaninchen	1:6.000	Abcam, Cambridge, UK
anti-Vimentin antibody [EPR3776]	GR145336-19	Kaninchen	1:100.000	Abcam, Cambridge, UK
NDUFA9 (clone20C11B11B11)	GR3268847-5	Maus	1:1.000	Abcam, Cambridge, UK
NDUFS3 (clone3F9DD2)	GR3270057-3	Maus	1:500	Abcam, Cambridge, UK

NDUFB9 (EPR15955-78)	GR3176410-7	Kaninchen	1:2.000	Abcam, Cambridge, UK
NDUFV2	00006404	Kaninchen	1:1.000	Proteintech, Manchester, UK
ECL™ anti-rabbit IgG, horseradish peroxidase- linked species-specific whole antibody (from donkey)	17106496	Esel	1:5.000	GE Healthcare, Freiburg
ECL™ anti-mouse IgG, horseradish peroxidase- linked whole antibody (from sheep)	17376630	Schaf	1:5.000	GE Healthcare, Freiburg

Tabelle 3: Für die Immunfluoreszenzfärbungen verwendete Antikörper

Antigen	Antikörper	Verdünnung
Vimentin	Vimentin Alexa Fluor 488-conj. (clone D21H3)	1:100 in 1 % (v/v) Ziegen Serum/PBS
α SMA	α -smooth muscle actin AF594-conj. (clone 1A4)	1:100 in 1 % (v/v) Ziegen Serum/PBS

2.3 Tierexperimentelle Genehmigung

Für die im Rahmen dieser Forschungsarbeit durchgeführten Experimente wurden Zellen aus Mäusen verwendet, für die unter folgendem Aktenzeichen des Landesamts für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz (LANUV) die Genehmigung vorliegt: AZ 84 - 02.05.50.15.023.

2.4 Zellbiologische Methoden

Alle durchgeführten zellbiologischen Methoden wurden unter den mikrobiologischen Sicherheitswerkbänken durchgeführt. Die verwendeten Chemikalien, Medien, Zusätze und Materialien wurden ausschließlich unter der Sicherheitswerkbank geöffnet und vor Gebrauch gegebenenfalls autoklaviert oder steril filtriert.

2.4.1 Herkunft der kardialen Fibroblasten

Die kardialen Fibroblasten wurden aus Herzen von Mäusen isoliert und zur Verfügung gestellt. Für die Versuche wurden Zellen aus Mäusen mit 3 unterschiedlichen Genotypen verwendet um die Rolle von Telomerase Reverse Transkriptase (TERT) zu untersuchen. Die Mäuse wurden so gezüchtet, dass die Tiere, die für die Zellisolierung verwendet wurden, entweder Geschwistertiere oder Cousins waren. Die drei Genotypen waren folgende:

1. Kardiale Fibroblasten, die aus Wildtyp stammen, werden als TERT Wildtyp Zellen (TERT wt) bezeichnet. TERT befindet sich in diesem Fall überall dort, wo es von Natur aus zu finden ist.

2. Als zweiter Genotyp wurden Mäuse gezüchtet, welche gar nicht über TERT verfügen. Die kardialen Fibroblasten aus diesen Mäusen werden als TERT Knock-Out Zellen (TERT ko) bezeichnet.

3. Der dritte Genotyp Mäuse enthält TERT nur in den Mitochondrien. Diese kardialen Fibroblasten werden als mitochondriale TERT Zellen (mito TERT) bezeichnet.

Die isolierten murinen kardialen Fibroblasten wurden in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Wurden sie für Versuche benötigt, konnten sie aufgetaut und in Kultur genommen werden.

2.4.2 Kultivierung muriner kardialer Fibroblasten

Initial wurden die Zellen aufgetaut. In Zellkulturflaschen konnten sie wachsen und wurden für die Routinekultivierung regelmäßig passagiert um einen Bestand an Zellen über wenige Wochen zu erhalten. Regelmäßiges Passagieren ist notwendig, da nach einer bestimmten Zeit, abhängig von der Proliferationsrate der Zellen, die Kulturoberfläche vollständig besiedelt ist und es zur Kontaktinhibition kommt und sich dadurch zelluläre Signalwege drastisch verändern.

2.4.3 Auftauen und Passagieren

Tabelle 4: Zusammensetzung der Medien und Lösungen zum Kultivieren der Zellen

Medium	Zusammensetzung
Komplett-Medium	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 1 % (v/v) Penicillin Streptomycin Mix (Pen Strep) 10 % (v/v) Fötale Kälberserum (Fetal Calf Serum, FCS)
Pen Strep	10.000 U/ml Penicillin 10.000 µg/ml Streptomycin
Trypsin-Lösung	10x Trypsin-EDTA mit <i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS) auf 1x verdünnt
10x Trypsin-EDTA	0,5 % (w/v) Trypsin 4,8 mM EDTA 145 mM NaCl

Die Zellen wurden aufgetaut und in 20 ml Komplett-Medium in einer T75-Flasche für 4 h bei 37 °C, 5 % CO₂ Gehalt und erhöhter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurde das Komplett-Medium gewechselt und die Zellen für 4 Tage inkubiert. Montags und freitags wurde passagiert, sodass die Wachstumsdauer sich auf drei oder vier Tage belief. Zuerst wurde das vorhandene Medium entfernt. Dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden 2 ml Trypsin-Lösung zugegeben. Durch das Trypsin rundeten die Zellen sich ab und lösten sich vom Flaschenboden. Um die Trypsin-Reaktion zu beschleunigen, wurde die Flasche für 2 min bei 37 °C inkubiert. Sobald zu beobachten war, dass ein Großteil der Zellen sich vom Boden der Flasche abgelöst sowie abgerundet hatte, wurden 8 ml Komplett-Medium hinzugefügt, was die Trypsin-Reaktion abstoppte. Die Zellsuspension in der Flasche wurde mehrfach resuspendiert, um die Zellen zu vereinzeln und in der Neubauer-Zählkammer zu zählen.

Für die Zellzahlbestimmung wurde ein Aliquot der Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. (**Abb. 1**) Es wurden alle Zellen in vier Großquadraten gezählt, der Durchschnitt errechnet und der Mittelwert mit 10⁴ multipliziert um die Zellzahl/ml zu erhalten. Anhand dieser konnte das passende Volumen an Zellsuspension für eine neue Passage mit definierter Zellzahl errechnet und in eine neue T75-Flasche gegeben werden. Anschließend wurde

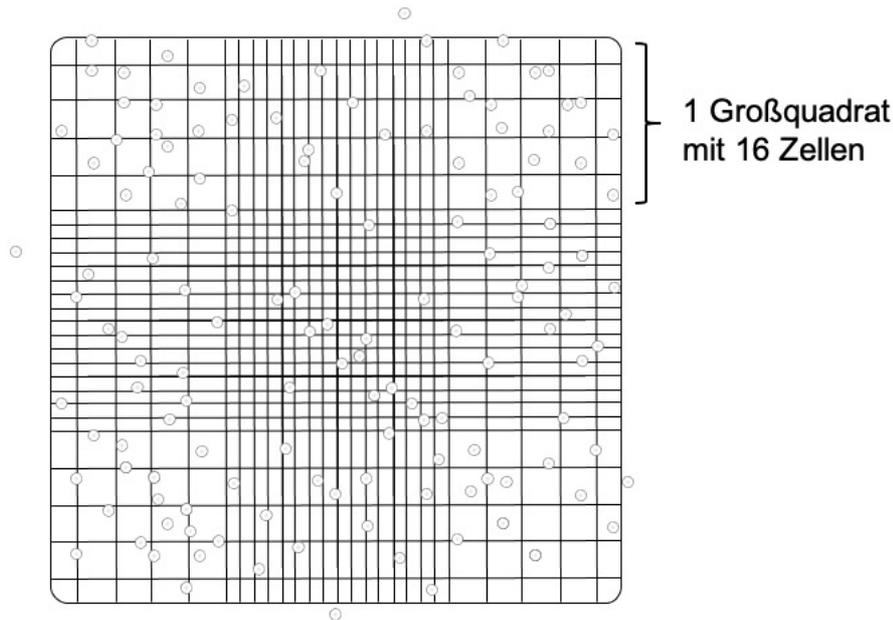


Abb. 1: Schematische Darstellung einer Neubauer-Zählkammer mit Zellen. Einzelne Bildelemente stammen von Servier Medical Art (<https://smart.servier.com>) und sind unter einer Creative Commons Attribution 3.0 Unported License für den unlimitierten, freien Gebrauch lizenziert.

die Flasche mit Komplett-Medium auf 10 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und bei 37 °C, 5 % CO₂ Gehalt und erhöhter Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Die Zellzahl/T75-Flasche war abhängig von der Wachstumsdauer und dem Genotyp. TERT ko Zellen sind weniger schnell gewachsen als die anderen Genotypen, weshalb sie in einer höheren Dichte ausgebracht wurden. Für die Routinekultivierung wurden folgende Zellzahlen verwendet:

TERT wt und mito TERT Zellen wurden, wenn sie für vier Tage wachsen konnten, mit 1×10^5 Zellen/Flasche ausgebracht. Für drei Tage Wachstum wurden sie mit $1,8 \times 10^5$ Zellen/Flasche ausgebracht.

TERT ko Zellen wurden für ein Wachstum von vier Tagen mit $1,5 \times 10^5$ Zellen/Flasche ausgebracht, für ein dreitägiges Wachstum wurden $2,8 \times 10^5$ Zellen/Flasche ausgebracht.

Für Versuche zur Myofibroblastendifferenzierung wurden die kardialen Fibroblasten unabhängig vom Genotyp auf 6 cm Zellkulturschalen mit 5×10^4 Zellen pro Schale ausgebracht.

2.4.4 Transduktion muriner kardialer Fibroblasten mit lentiviralen Vektoren
Die lentivirale Transduktion der Fibroblasten wurde aus verschiedenen Gründen genutzt. Zum einen lässt sich dieser Zelltyp nur relativ ineffizient transfizieren. Zum

anderen sichert die Transduktion eine permanente Expression der mit lentiviralen Expressionsvektoren eingebrachten Gene zu, da Lentiviren in das Wirtsgenom integrieren und die mit ihnen eingebrachte genetische Information somit auch bei Zellteilungen weitergegeben wird. Des Weiteren kann die Kopienzahl der integrierten Proviren über die *multiplicity of infection* (MOI) - das Verhältnis von Viruspartikeln zu Zielzellen - gesteuert werden.

Für die Virusproduktion wurden *human embryonal kidney 293T* (HEK293T) Zellen genutzt. Dazu wurden diese mit drei verschiedenen Plasmiden transfiziert, um die Komponenten, die für die Generierung der Viruspartikel notwendig sind zu exprimieren. Ein Plasmid, der sog. Transfervektor, enthielt die genetische Information für die RNA, welche in die Lentiviruspartikel verpackt werden sollte; dazu muss diese RNA ein sogenanntes *packaging signal* enthalten. Das zweite Plasmid, *psPAX2* ist ein Expressionsvektor das lentivirale *group specific antigen* (Gag) und die *polymerase reverse transcriptase* (Pol). Die Gag-Translationsprodukte sind Komponenten des viralen Capsids und der viralen Matrix. Pol als reverse Transkriptase wird nach einer Infektion für die Umschreibung des viralen RNA-Genoms in DNA benötigt. Das dritte Plasmid, *pVSV-G* dient der Expression des *Vesicular stomatitis virus protein G*, das als Hüllprotein genutzt wird und den Viren ermöglicht in jede Vertebraten-Zelle aufgenommen zu werden.

Für die Transfektion der HEK293T Zellen wurde die CaPO_4 Co-Präzipitation genutzt. Hierfür wurden die drei Plasmide in einer CaCl_2 Lösung aufgenommen und mit *Hepes Buffered Saline* (HBS) gemischt. HBS enthält Phosphat, so dass sich CaPO_4 Kristalle bilden, welche auch die Plasmide enthalten. Diese Co-Kristalle werden von den Zellen durch Endozytose aufgenommen. Nach Expression aller viraler Komponenten, entstehen die lentiviralen Partikel durch *self assembly* und werden von den HEK293T Zellen durch Knospung ins Medium abgegeben.

Das Virus-haltige Medium wurde gesammelt, die Virussuspension konzentriert, der Virustiter bestimmt und die Viren bis zur Transduktion bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.4.5 Transfektion von HEK293T-Zellen zur Produktion retroviraler Partikel

Tabelle 5: Zusammensetzung des Kulturmediums für HEK293T Zellen

Medium/Lösung	Zusammensetzung
HEK293T Kultur-Medium	DMEM 1 % (v/v) Pen Strep 10 % (v/v) Fötale Kälberserum (FCS; hitzeinaktiviert für 1 h bei 56 °C)

Am Tag vor der Transfektion wurden 4×10^6 Zellen pro Schale in insgesamt 6 10 cm-Zellkulturschalen ausgebracht. Dazu wurden die Zellen in den für die Routinekultur verwendeten T75-Flaschen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin-Lösung versetzt. Sobald die Zellen sich abgerundet und abgelöst hatten, wurde die Trypsin-Reaktion mit 8 ml Kultur-Medium gestoppt. Zur Zellzahlbestimmung wurde die Zellsuspension 1:3 verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben gezählt. Anhand der Zellzahl/ml konnte das passende Volumen an Zellsuspension für 4×10^6 Zellen/Zellkulturschale errechnet und diese ausgebracht werden. Die Zellen wurden mit 10 ml Kulturmedium/Zellkulturschale für 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂ Gehalt und erhöhter Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Für die Transfektion am Folgetag wurde der *Calcium Phosphate Transfection Kit* nach Herstellerangaben verwendet, dabei wurden pro 10 cm-Zellkulturschale die folgenden Plasmidmengen eingesetzt: 10 µg Transfervektor, 6,5 µg *psPAX2*, 3,5 µg *pVSV-G*.

Am Tag nach der Transfektion wurde das Kultur-Medium abgenommen und den Zellen 7 ml frisches Kultur-Medium zugegeben. Um die Viren zu ernten, wurde das Virus-haltige Kultur-Medium 24 h später abgenommen und bei 4 °C gelagert. Den Zellen wurden 7 ml neues Kultur-Medium hinzugegeben. Auch dieses wurde nach weiteren nach 24 h abgenommen, mit dem bereits vorhandenen Zellkulturüberstand vereinigt und weiterhin bei 4 °C gelagert. Die Zellen bekamen anschließend 10 ml Kultur-Medium, das erst 72 h später wieder gesammelt und mit den anderen Überständen vereinigt wurde. Das gesammelte Medium wurde 20 min bei 4.000 xg und 4 °C zentrifugiert, sodass größere Zelltrümmer pelletiert wurden. Der Virus-haltige Überstand wurde abgenommen und durch eine 0,45 µm

PVDF-Membran filtriert. Das Filtrat wurde aufkonzentriert, um Virussuspensionen mit höheren Titern zu erhalten.

2.4.6 Konzentrierung der Viruspartikel

Die Virussuspension wurde mittels Ultrafiltration unter Verwendung einer *Vivacell 100 with PES membrane* nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Ausschlussgrenze dieser Ultrafiltrationseinheit ist 100 kDa, so dass die Viruspartikel zurückgehalten werden. Die Filtrationseinheit wurde mit maximal 70 ml der Virussuspension befüllt und 30 min bei 2.000 xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Entfernung des Durchlaufs wurde dieser Schritt wiederholt, bis die gesamte Virussuspension aufkonzentriert war. Anschließend wurde die konzentrierte Virussuspension abgenommen, der Konzentrator mit Kultur-Medium nachgespült, dieses mit der Virussuspension vereinigt und in Aliquots bei -80 °C gelagert.

2.4.7 Bestimmung der Virustiter

Zur Bestimmung der Viruskonzentration wurde das QuickTiter Lentivirus Titer Kit (*Lentivirus-Associated HIV p24*) verwendet und nach Herstellerprotokoll gearbeitet. Hierfür wurde ein Aliquot der zu titrierenden Virussuspension aufgetaut und verschiedene Verdünnungen dieser Suspension analysiert. Bei jeder Titration wurde der p24 Standard mitgeführt und sowohl von den Proben als auch von dem Standard technische Duplikate gemessen. Die Virustiter wurden nach Herstellerangaben berechnet, wobei der infektiöse Titer nur mit einer Bandbreite zwischen einem kleinstmöglichen und einem höchstmöglichen Titer angegeben werden kann.

2.4.8 Transduktion muriner kardialer Fibroblasten

Tabelle 6: Zur Transduktion verwendete Medien und deren Zusammensetzung

Medium/Lösung	Zusammensetzung
Komplett-Medium	DMEM 1% (v/v) Pen Strep 10% (v/v) FCS
Polybren Stammlösung	8 mg/ml Hexadimethrinbromid in dH ₂ O, sterilfiltriert

Für die Transduktion wurden die kardialen Fibroblasten in einer Dichte von 5×10^4 Zellen pro 6 cm Zellkulturschale ausgebracht und für 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂ Gehalt und erhöhter Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Die Transduktion wurde mit einer MOI von 20 durchgeführt, als Grundlage für die Berechnung des hierfür benötigten Volumens der Virussuspension wurde der kleinstmögliche Titer aus der Titration angenommen. Für jede 6 cm Zellkulturschale wurden 1×10^6 Viren mit Komplett-Medium auf 4 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und 4 µl der Polybren Stammlösung hinzugefügt, da Polybren die Aufnahme der Viren in die Zellen erleichtert. Das Medium der Zellen wurde abgenommen, durch das Gemisch ersetzt und die Zellen für 4 h bei 37 °C, 5 % CO₂ Gehalt und erhöhter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Danach wurden pro Zellkulturschale 4 ml Komplett-Medium hinzugefügt und die Zellen für weitere 24 h inkubiert. Dann wurde das gesamte Medium entfernt, die Zellen mit DMEM ohne Zusätze 3 Mal gewaschen und 3 ml frisches Komplett-Medium zugegeben. Anschließend wurden die Zellen für weitere Behandlungen weiterkultiviert.

2.5 Molekularbiologische Methoden

Um die Auswirkungen der verschiedenen Behandlungen der kardialen Fibroblasten auf das Expressionsniveau bestimmter Gene zu untersuchen, wurde die semi-quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) genutzt. Hierzu wurde zunächst die gesamte zelluläre RNA isoliert und deren Konzentration bestimmt. Nach einer Qualitätskontrolle mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde die RNA in *complementary DNA* (cDNA) umgeschrieben, die dann als Matrize in die qRT-PCR eingesetzt wurde.

2.5.1 RNA Isolierung

Zellen, aus denen die RNA isoliert wurde, wurden mittels TRIzol abgelöst, die Suspension in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bis zur Aufbereitung bei -80 °C gelagert. Pro 6 cm Zellkulturschale wurden 600 – 700 µl TRIzol verwendet.

Zur RNA-Isolierung wurden die Proben in TRIzol bei Raumtemperatur aufgetaut. Dann wurden 300 µl Chloroform zugegeben, die Proben per Hand für 15 sec geschüttelt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden sie bei 4 °C und 12.000 xg für 15 min zentrifugiert. In der wässrigen Phase befand sich die

RNA, welche vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Es wurde das gleiche Volumen an 70 % (v/v) Ethanol zugegeben und vorsichtig gemischt. Die folgenden Schritte wurden nach dem Protokoll *Purification of Total RNA from Animal Cells Using Spin Technology* aus dem RNeasy Mini Handbook 10/2019 von Qiagen durchgeführt [60]. Maximal 700 µl des Gemischs wurden auf eine *RNeasy spin column* (Säule) von Qiagen überführt und bei 20 °C und 12.000 xg für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Gegebenenfalls wurde dieser Schritt wiederholt und die Säule mehrfach beladen und zentrifugiert, bis das gesamte Volumen die Säule durchlaufen hatte. Danach wurde nach dem Herstellerprotokoll vorgegangen, allerdings wurde die Säule vor der Elution 2 min trocken zentrifugiert und die RNA mit 25 µl RNase freiem Wasser eluiert. Die RNA-Lösung wurde bis zur spektralphotometrischen Konzentrationsbestimmung im Nanodrop auf Eis gekühlt und danach bei -80 °C gelagert.

2.5.2 Konzentrationsbestimmung im Nanodrop

Der Detektor musste zuerst mit RNase freiem Wasser kalibriert werden. Dann wurden 1,5 µl Probe auf den Detektor gegeben, das Absorptionsspektrum von 220 nm bis 350 nm aufgenommen und die Absorptionswerte bei 230 nm (A_{230}), 260 nm (A_{260}) sowie 280 nm (A_{280}) tabellarisch ausgegeben. Die RNA Konzentration berechnete sich aus A_{260} , wobei eine Absorption von 1 einer Konzentration von 40 ng/µl entspricht. Das Verhältnis A_{260}/A_{280} ist ein Indikator für die Reinheit der RNA; bei einem Wert von ~ 2,0 gilt diese generell als rein [61]. Zur erweiterten Qualitätskontrolle wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.5.3) untersucht, ob die isolierte RNA intakt und nicht durch DNA verunreinigt war.

2.5.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der elektrophoretischen Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe. Abhängig von der Größe der zu trennenden Nukleinsäuren wurden Gelmatrices mit unterschiedlichem Agaroseanteil genutzt. Zur Untersuchung von PCR-Produkten wurde 2 % (w/v) Agarose, zur Detektion von RNA 0,8 % (w/v) UltraPure Agarose verwendet. In den Gelen befand sich zudem der Interkalationsfarbstoff Ethidiumbromid, welcher sich in Nukleinsäuren einlagert und unter UV-Licht fluoresziert. Die Fluoreszenzemission wird durch die

Einlagerung in Nukleinsäuren um den Faktor 50-100 verstärkt, sodass sich DNA- und RNA-Moleküle deutlich vom Rest des Gels abheben.

Tabelle 7: Zur Agarose-Gelelektrophorese verwendete Reagenzien

Reagenz	Zusammensetzung
<i>DNA-Loading Dye (6x)</i>	0,1 % (w/v) Orange G 0,1 % (w/v) Xylencyanol 10 mM EDTA 10 mM Tris-HCl (pH 7,6) 40 % (v/v) Glycerin
<i>Gel loading Dye, Blue (6x)</i> (für RNA)	siehe Materialliste
Tris-Acetat EDTA (TAE)-Puffer (1x)	40 mM Tris-Base 1 mM EDTA 0,1 % (v/v) Essigsäure

Zur Herstellung der Agarose-Gele wurde die gewünschte Menge an Agarose in Tris-Acetat EDTA (TAE)-Puffer gekocht bis die Agarose vollständig gelöst war und die Agarose im flüssigen Zustand bei 56 °C verwahrt.

Zur Herstellung eines Gels wurde die flüssige Agarose in einen Flachbett-Gelschlitten gegossen, Ethidiumbromid aus einer 10 mg/ml Stammlösung zu einer Endkonzentration von 0,5 µg/µl zugegeben, gleichmäßig verteilt und ein Kamm eingesetzt. Nach Erstarren der Agarose wurde das Gel mit TAE-Puffer bedeckt und der Kamm gezogen. Den Proben wurden vor dem Laden mit 1/5 ihres Volumens *DNA-Loading Dye (6x)* bzw. *Gel Loading Dye, Blue (6X)* für die RNA-Proben zugegeben.

Parallel zu den Proben wurden als Größenstandards Gemische verschiedener DNA Fragmente, sogenannte DNA Leitern geladen. Für die PCR-Proben wurde die *GeneRuler Low Range DNA Ladder* verwendet, für die RNA-Proben die *GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder*. Die Elektrophorese wurde bei einer Feldstärke von 4-7 V/cm durchgeführt, bis die gewünschte Auftrennung erhalten wurde.

Anschließend an die Elektrophorese wurde das Gel im durchscheinenden UV-Licht auf einem Transilluminator betrachtet und fotografiert.

2.5.4 cDNA-Synthese

Abhängig von der isolierten Menge an RNA wurden zwischen 300 ng und 1 µg RNA zur cDNA-Synthese verwendet. Die reverse Transkription wurde mit dem *Qiagen QuantiTect Reverse Transcription Kit manual* exakt nach Herstellerangaben durchgeführt. Die fertige cDNA wurde bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

2.5.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der enzymatischen Vervielfältigung von DNA-Abschnitten mit Hilfe von zwei synthetisch hergestellten Oligonukleotiden, den sog. Primern. Die PCR umfasst nach einer initialen Denaturierung (*initial denaturation*) drei aufeinanderfolgende Reaktionsschritte, die als Zyklus zusammengefasst werden. Die Wiederholung dieser Reaktionszyklen führt zu einer exponentiellen Amplifikation eines DNA-Abschnitts, dessen Enden durch die beiden Primer bestimmt ist. Während der Denaturierung (*denaturation*) wird die Doppelstrang-DNA in Einzelstränge aufgetrennt. Anschließend folgt die *annealing* Phase, in welcher die beiden Primer an den Beginn und das Ende der zu amplifizierenden Sequenz der Einzelstrang-DNA binden. Während der *extension* Phase werden ausgehend von den Primern Nukleotide durch die DNA-Polymerase komplementär zu der Einzelstrang-DNA angelagert. Mit der *denaturation* beginnt der Replikations-Zyklus von neuem. Nach Abschluss der Amplifikationszyklen wird ein finaler *extension* Schritt durchgeführt.

Es wurde die MyTag™ HS DNA Polymerase, eine *hot start* Polymerase, und der dazugehörige *reaction buffer* benutzt. Für jedes zu untersuchende Transkript wurden zwei genspezifische Primer entworfen (2.5.7). Als Referenz (*housekeeping gene*) in den PCRs diente das Gen für das ribosomale Protein L32 (RPL32), ein Protein der großen Untereinheit der Ribosomen, dessen Expression sich in den kardialen Fibroblasten im Zug der unterschiedlichen Behandlungen nicht ändert. Pro Ansatz einer PCR-Reaktion wurden folgende Komponenten in der angegebenen Reihenfolge gemischt: 16,8 µl dH₂O, 6,0 µl 5x MyTag *reaction buffer*, 1 µl Primer 1 (10 µM), 1 µl Primer 2 (10 µM), 5,0 µl verdünnte cDNA und 0,2 µl DNA Polymerase (5 U/µl). Die Reaktionen hatten somit ein Gesamtvolumen von 30 µl. Die Verdünnung der eingesetzten cDNA richtete sich nach der Expressionsstärke des jeweiligen Gens und wurde in Vorversuchen empirisch

ermittelt (Tabelle 1). Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen in einem MyCycler von Bio-Rad durchgeführt:

1x	94 °C 5 min	<i>initial denaturation</i>
35x	94 °C 30 sec	<i>denaturation</i>
	60 °C 30 sec	<i>annealing</i>
	72 °C 20 sec	<i>extension</i>
1x	72 °C 5 min	<i>final extension</i>
1x	4 °C ∞	

Die *annealing* Temperatur ist abhängig von den Sequenzen der Primer, im vorliegenden Fall war die vorher experimentell ermittelte beste Temperatur für diese Phase 60 °C. Die *extension* Zeit ist abhängig von der Größe des PCR-Produktes, einem Richtwert folgend wird eine Minute pro 1000 bp benötigt. Da alle Produkte unter 350 bp groß waren, war eine Zeitspanne von 20 sec ausreichend.

Nach Ende der PCR wurde ein Aliquot jedes Reaktionsansatzes mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (2.5.3). Dadurch konnte das Vorhandensein des Amplifikationsprodukts nachgewiesen werden.

2.5.6 Semi-quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Die semi-quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) dient der relativen Quantifizierung von DNA und basiert auf der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion (2.5.5). Im Gegensatz zu dieser wird bei der qRT-PCR die Amplifikation in Gegenwart des DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffs SYBRgreen durchgeführt, dessen Fluoreszenz sich nach Bindung an doppelsträngige DNA um den Faktor 800 bis 1.000 erhöht. Die Messung der Fluoreszenz findet am Ende jedes Zyklus statt, dabei ist die Zunahme des Fluoreszenzsignals proportional zu der Menge des jeweiligen PCR-Produkts und kann damit als Maß für die Menge der spezifischen *template* DNA genutzt werden. Im Fall der Genexpressionsanalyse ist dies die aus der reversen Transkription gewonnene cDNA (2.5.4), welche die jeweilige RNA-Menge widerspiegelt. Der Zyklus, in dem das Fluoreszenzsignal einen vordefinierten Schwellenwert

übersteigt, wird als *cycle threshold* (C_t -Wert) bezeichnet. Die Erfassung der Fluoreszenz in Echtzeit erklärt den Namen *real-time* PCR.

Für jedes zu untersuchende Transkript wurden auch hier zwei genspezifische Primer entworfen (2.5.7). Als *housekeeping gene* in den qRT-PCRs diente RPL32 (2.5.5). Aus der Differenz zwischen dem C_t -Wert des *housekeeping* Gens und des jeweils untersuchten Gens wurde dessen relative Expression nach der ΔC_t -Methode berechnet [62]. Von jeder Probe wurde ein technisches Duplikat angefertigt. Proben, in denen die Differenz der C_t -Werte innerhalb dieses Duplikats größer als 0,5 war, wurden nicht berücksichtigt und erneut gemessen. In allen anderen Fällen wurde der Mittelwert des technischen Duplikats zur Berechnung der relativen Expression herangezogen.

Pro Ansatz einer qRT-PCR Reaktion wurden folgende Komponenten in der angegebenen Reihenfolge gemischt: 6 μ l dH₂O, je 1 μ l einer 10 μ M Lösung beider Primer, 10 μ l 2x SYBRgreen qPCR Master Mix und 2 μ l der cDNA Probe. Die Verdünnung der eingesetzten cDNA richtete sich nach der Expressionsstärke des jeweiligen Gens und wurde in Vorversuchen empirisch ermittelt.

Die qRT-PCR lief mit folgenden Parametern in einem Rotor-Gene Q Thermocycler:

1x	95 °C 7 min	<i>initial denaturation</i>
40x	95 °C 10 sec	<i>denaturation</i>
	66 °C 15 sec	<i>annealing</i>
	72 °C 20 sec	<i>extension</i>

Die experimentell ermittelte beste *annealing* Temperatur für die qRT-PCR war 66 °C. Da alle Amplifikationsprodukte der qRT-PCR unter 350 bp groß waren, war eine *extension* Zeit von 20 sec ausreichend (2.5.5).

Nach Abschluss der Amplifikation folgte eine Schmelzpunktanalyse, bei der die Temperatur in 0,2 °C Schritten von 50 °C auf 95 °C erhöht wurde. Hierbei wird wiederum die Fluoreszenz nach jedem Temperaturschritt gemessen und die erste Ableitung der Veränderung der Fluoreszenz mit der Temperatur ($-dF/dT$) aufgetragen. Ein scharfer *peak* in dieser Analyse zeigt an, dass ein homogenes Amplifikationsprodukt erzeugt wurde, er sagt allerdings nichts über dessen Größe

aus. Daher wurden alle Reaktionsprodukte noch mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.5.3) untersucht.

2.5.7 PCR-Primerdesign und Primerliste

Das Primerdesign für die semi-quantitative *real-time* PCR wurde online mithilfe des *Primer designing tool* des *National Center for Biotechnology Information* durchgeführt [63]. Zu Beginn wurde unter *PCR template* die *GenBank accession number* für das Transkript eingegeben, für dessen Nachweis Primer erstellt werden sollten. Im Anschluss wurden die Parameter auf der Webseite unter Verwendung der *Advanced parameters* definiert. Dabei sollte die Primergröße idealerweise zwischen 18 und 25 Nukleotiden liegen, das PCR-Produkt zwischen 80 und 250 Basenpaaren. Zudem sollten die Primer in unterschiedlichen Exons liegen, dass das entstehende Amplifikationsprodukt eindeutig einer cDNA zugeordnet werden kann und nicht ein Produkt der Amplifikation eines Abschnitts genomischer DNA sein kann. Außerdem wurde berücksichtigt, dass Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) in den Regionen, wo die Primer binden, ausgeschlossen wurden, um auf solchen SNPs beruhende Unterschiede in der Primerbindung zu vermeiden. Die Primer sollten auch in der Lage sein Splice-Varianten zu vervielfältigen. Daher wurden unter Verwendung der *Advanced parameters* die folgenden Parameter definiert - abgesehen von diesen Veränderungen wurden die Standard-Einstellungen der Webseite übernommen.

Primer Parameters:

PCR product size: Min 80, Max 250

Exon/intron selection:

Intron Inclusion: *Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA*

Intron length range: Min 1000, Max 1000000

Primer Pair Specificity Checking Parameters:

Database: *Genomes for selected organisms (primary refseq assembly only)*

Exclusion: *Exclude predicted RefSeq transcripts (accession with XM, XR prefix)*

Organism: Eingabe der Spezies, im Fall der vorliegenden Arbeit *Mus musculus* (taxid: 10090)

Allow splice variant: Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input)

Primer Parameters

Primer size: Min 18, Opt 20, Max 25

Primer GC content (%): Min 45, Max 55

SNP handling: Primer binding site may not contain known SNP

Aus den Ergebnissen der Webseite wurde das Primerpaar gewählt, welches den geringsten Grad an *Self complementarity* und *Self 3' complementarity* aufwies.

Für den Fall, dass sich mit den genannten Einstellungen keine Transkriptspezifischen Primer entwerfen ließen, wurden weitere Modifikationen vorgenommen. Ein solcher Fall wäre, dass Primer vorgeschlagen würden, welche aufgrund von Sequenzidentität ein gleichgroßes Fragment eines anderen Transkripts oder Gens amplifizieren könnten. In diesem Fall wurden zunächst Regionen aus dem zu untersuchenden Transkript ausgewählt, die keine derartigen Sequenzidentitäten aufweisen und dieser Bereich in der Eingabemaske unter *PCR Template* definiert. Gegebenenfalls wurden auch weniger stringente Maßstäbe an den GC Gehalt der Primer angelegt oder sogar der *Low complexity filter* unter *Primer Parameters* ausgeschaltet.

2.6 Proteinbiochemische Methoden

Die Analyse der Menge bestimmter intrazellulärer Proteine gibt weiteren Aufschluss über Zustände und Prozesse. Daher wurden die Zellen lysiert und mittels Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*) – Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt.

2.6.1 Zellyse

Zur Ernte wurden die Zellen in ihrem Medium und anschließend in PBS von den Zellkulturschalen abgeschabt. Die Zellen wurden durch mehrfaches Zentrifugieren und Resuspendieren in PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Nach

einem finalen Zentrifugierschritt wurden die trockenen Zellpellets bis zur Lyse bei -80 °C gelagert.

Tabelle 8: Zusammensetzung des zur Zelllyse verwendeten Puffers

Puffer	Zusammensetzung
Radioimmunprecipitation Assay (RIPA) - Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 % (v/v) IGEPAL CA-630 150 mM NaCl 0,1 % (w/v) SDS 0,5 % (w/v) Na-Desoxycholat 1 % (v/v) Protease-Inhibitor Cocktail (EDTA-free, in DMSO 100x)

Zur Lyse wurde das Zellpellet auf Eis aufgetaut. Dann wurde das doppelte Volumen an Radioimmunprecipitation Assay (RIPA)-Puffer inklusive Protease-Inhibitor Cocktail (RIPA+) zugegeben. Das Zellpellet wurde darin resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben bei 4 °C und 18.000 xg für 15 min zentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration in den Lysaten bestimmt.

2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford im Spektralphotometer gemessen. Die Methode beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie® Brilliant Blue G-250 Proteine bindet und sich dadurch sein Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Diese Änderung des Absorptionsmaximums ist abhängig von der Proteinkonzentration, sodass die Absorption bei 595 nm als Maß für die Proteinkonzentration genutzt werden kann. Zur Messung wurden 799 µl dH₂O, 200 µl Reagenz aus dem BioRad Protein Assay Kit II und 1 µl Proteinprobe bzw. RIPA-Puffer für die Referenzprobe in Plastik Halbmikroküvetten pipettiert. Dann wurde das Gemisch invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Vor jeder Messreihe wurde das Spektralphotometer mit der Referenzprobe auf Null gesetzt. Von jedem Lysat wurde ein technisches Duplikat gemessen und der Mittelwert als Proteinkonzentration jeder Probe errechnet [64].

2.6.3 Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*) –

Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden die Proteine nach ihrer Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Dazu wurde ein diskontinuierliches System verwendet, in welchem die Proteine durch ein Sammelgel und ein Trenngel liefen. Im Sammelgel (pH 6,8) wurden die Proben fokussiert und im Trenngel (pH 8,8) wurden sie anschließend aufgetrennt. Durch die Polymerisation einer Mischung von Acrylamid mit Bisacrylamid wurde ein dreidimensionales Netzwerk erzeugt, in welchem das Bisacrylamid Quervernetzungen zwischen den linear verlaufenden Acrylamid-Polymeren bildete. Die Porengröße des Netzwerks war abhängig von der Konzentration von Acrylamid. Je kleiner die Proteine (in kDa) sind, desto dichter muss das Netzwerk sein und desto höher die Acrylamid-Konzentration des Gels um eine adäquate Auftrennung der Proteine zu erreichen. Die Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid wurde durch Ammoniumperoxidsulfat (APS) induziert, welches spontan zerfiel und dabei freie Radikale bildete. Als Katalysator der Polymerisation und zur Radikalstabilisierung wurde Tetramethylethylendiamin (TEMED) verwendet. Die Proteine durchwanderten bei gleicher Ladungsdichte proportional zu ihrer Größe das SDS-Gel, da durch die Einlagerung von stöchiometrischen Mengen SDS (1,4 g SDS/g Protein) an die Proteine diese negativ geladen waren. Die Proteine hatten dadurch ein proportionales Verhältnis von Ladung zu Masse und die intrinsische Ladung wurde maskiert. Sie migrierten somit während der PAGE nur abhängig von ihrem molekularen Gewicht Richtung Anode.

Tabelle 9: Zusammensetzung der zur SDS-PAGE verwendeten Puffer

Puffer	Zusammensetzung
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Probenpuffer (5x)	312,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) 10 % (w/v) SDS 50 % (v/v) Glyzerin 250 mM DTT 0,05 % (w/v) Bromphenolblau

Tris-HCl (pH 6,8)	1 M Tris-HCl mit Ammoniumhydroxidlösung auf pH 6,8 einstellen
Tris-HCl (pH 8,8)	1,5 M Tris mit Salzsäure auf pH 8,8 einstellen

Tabelle 10: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

Komponente	Trenngel (10 %)	Sammelgel (5 %)
30% Acrylamid/Bisacrylamid-Mix (29:1)	10 % (v/v)	5 % (v/v)
Tris-HCl (pH 8,8)	390 mM	-
Tris-HCl (pH 6,8)	-	126 mM
SDS	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)
APS	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)
TEMED	0,04 % (v/v)	0,1 % (v/v)

Für die SDS-PAGE wurden Transfertanks und Gelhalterungskassetten von Bio-Rad verwendet, die zusammen im Folgenden als *SDS-PAGE module* bezeichnet werden.

Die Trenngel-Lösung wurde entsprechend hergestellt, nach Zufügen von TEMED rasch zwischen zwei Glasplatten mit definiertem Abstand gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das Isopropanol abgegossen, die Gelkante mit dH₂O gespült, vorsichtig getrocknet und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. In letzteres wurde ein Kamm eingesetzt, um die Proben auf das Gel laden zu können. Nachdem auch das Sammelgel auspolymerisiert war, konnten die Gele verwendet werden.

Die Gele wurden in die Gelhalterungskassetten gespannt, in den Transfertank eingesetzt und dieser mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Nachdem der Kamm gezogen war, wurden die Geltaschen von Gelresten gereinigt, indem sie vorsichtig mit SDS-Laufpuffer gespült wurden. Vor dem Laden wurden die Proben mit RIPA+ auf 8 µl aufgefüllt und mit 2 µl Probenpuffer gemischt. Die Proben wurden dann bei 95 °C für 5 min hitzedenaturiert, kurz zentrifugiert und in die Taschen des Gels geladen. Zu beiden Seiten der Proben wurden 2 oder 4 µl des Größenmarkers *Prestained*

protein standard geladen, welcher unterschiedlich farbmarkierte Proteine definierter Molekulargewichte enthält.

Das *SDS-PAGE module* wurde an die Stromversorgung angeschlossen und bei 8,4 V/cm der Gellauf gestartet. Die Proben durchquerten das Sammelgel und fokussierten sich dabei. Sobald sie ins Trenngel eintraten, was an einem Auftrennen des Markers zu erkennen war, wurde die Feldstärke auf 10,5 V/cm erhöht und die Elektrophorese nach 1,5 – 2 h beendet.

2.6.4 Immunoblot

Bei einem Immunoblot werden Proteine auf eine Membran übertragen, auf welcher sie im Anschluss durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion nachgewiesen werden können. Dazu wurde eine *Trans-Blot Cell* verwendet, in welche der Immunoblot (**Abb. 2**), gepolstert von Schwämmen, eingeklemmt wurde. Während des Blots wurde ein elektrisches Feld senkrecht zum Polyacrylamid-Gel angelegt, was dazu geführt hat, dass die Proteinbanden aus dem Gel und auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran gewandert sind. Dort blieben sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Das Muster der Proteinbanden nach der elektrophoretischen Auftrennung blieb erhalten. Anschließend wurden spezifische Proteine auf der PVDF-Membran durch entsprechende Antikörper identifiziert.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für das Immunoblotting

Puffer	Zusammensetzung
Transferpuffer	24 mM Tris 193 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween®-20 (TBS-T)	50 mM Tris 150 mM NaCl 5 mM KCl 0,1 % (v/v) Tween®-20 dH ₂ O
Blockpuffer	5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T
Antikörper-Puffer	1 % (w/v) Milchpulver in TBS-T

Zur Vorbereitung wurde die PVDF Membran für 90 sec in Methanol aktiviert und anschließend in dH₂O neutralisiert. Danach wurde die Membran, wie auch Whatman Filter-Papier sowie Schwämme in Transferpuffer äquilibriert.

Das Gel (2.6.3) wurde aus dem *SDS-PAGE module* ausgebaut und das Sammelgel verworfen. Das Trenngel wurde in Transferpuffer von der Glasplatte getrennt und darin äquilibriert. Anschließend wurde der Immunoblot wie in **Abb. 2** zusammengebaut und oben und unten von Schwämmen gepolstert in die *Trans-Blot Cell* eingesetzt.

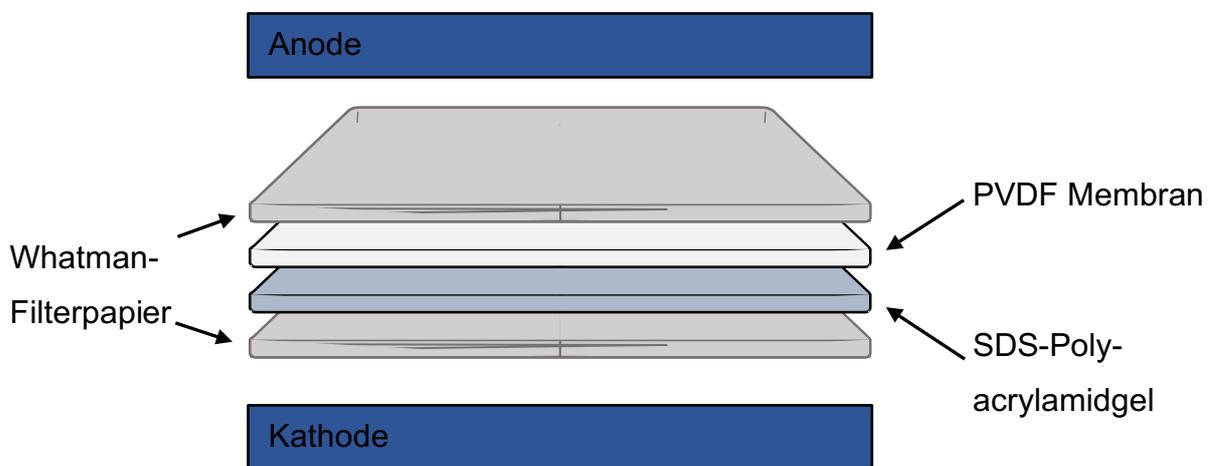


Abb. 2: Schematischer Aufbau des Immunoblots. Einzelne Bildelemente stammen von Servier Medical Art (<https://smart.servier.com>) und sind unter einer Creative Commons Attribution 3.0 Unported License für den unlimitierten, freien Gebrauch lizenziert [2].

Zum Transfer wurde der Blotting-Tank mit Transferpuffer gefüllt. Für 3 h wurden die Proteine im Eisbad bei 22,2 V/cm vom Gel auf die Membran transferiert.

Darauf folgte die Identifikation der Proteine durch spezifische Antikörperbindung. Der Blot wurde auseinandergelöst und für die Detektion mehrerer Proteine so zugeschnitten, dass sich jeweils ein Protein von Interesse auf einem Membranabschnitt befand. Um die nicht mit Protein besetzten Bereiche zu blockieren wurden die Membranabschnitte in Blockpuffer für 60 min bei Raumtemperatur in einem Orbitalschüttler bei 80 Upm geschwenkt und der Blockpuffer danach mit TBS-T abgespült. Anschließend erfolgte die Inkubation mit

dem in Antikörper-Puffer verdünnten Primärantikörper bei 60 Upm über Nacht bei 4 °C auf einem Orbitalschüttler.

Am folgenden Tag wurde überschüssiger Primärantikörper durch dreimaliges Waschen der Membranabschnitte für jeweils 10 min in TBS-T bei Raumtemperatur entfernt. Anschließend wurden die Membranabschnitte mit dem in Antikörper-Puffer verdünnten Sekundärantikörper für 2 h bei Raumtemperatur und 60 Upm schüttelnd inkubiert.

Die Membranabschnitte wurden wiederum dreimal in TBS-T jeweils für 15 min gewaschen, um überschüssigen Sekundärantikörper zu entfernen. Die nachzuweisenden Proteine auf den Membranabschnitten wurden mittels einer *Enhanced Chemiluminescence* (ECL) Reaktion detektiert. Das ECL-Reagenz enthält Luminol, welches in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid oxidiert, wodurch dann Lumineszenz entsteht. Die Meerrettichperoxidase des Sekundärantikörpers erzeugt Wasserstoffperoxid, die Lumineszenz entsteht folglich nur dort, wo Sekundärantikörper gebunden ist.

Die Lumineszenzsignale wurden mit Röntgenfilmen aufgenommen. Dazu wurden in absoluter Dunkelheit, welche durch Röntgenkassetten in einer Dunkelkammer gewährleistet wurde, Röntgenfilme auf die Membranabschnitte gelegt. Anschließend wurden die Röntgenfilme in der Entwicklerlösung entwickelt, diese mit dH₂O abgewaschen und schließlich in der Fixierlösung fixiert.

2.7 Immunfluoreszenzfärbungen

Die Immunfluoreszenzfärbungen dienen der Visualisierung von spezifischen Proteinen und ggf. der von ihnen gebildeten Strukturen in situ. Dafür wurden die Zellen auf Deckgläschen kultiviert und behandelt. Zur Färbung wurden die Zellen zunächst fixiert und permeabilisiert. Die Permeabilisierung der Zellmembran war notwendig, damit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper intrazelluläre Proteine binden konnten. Anschließend wurden die Immunfluoreszenzsignale mikroskopisch detektiert.

Tabelle 12: Zur Immunfluoreszenzfärbung verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Fixierlösung	4 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA) in PBS
Blockpuffer	3 % (v/v) Ziegenserum 0,3 % (v/v) Triton®-X-100 in PBS
Antikörper-Puffer	1 % (v/v) Ziegenserum in PBS
DAPI-Stammlösung	5 mg/ml 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in Dimethylformamid (DMF)

2.7.1 Kultivieren der Zellen auf Deckgläschen

Notwendig für die spätere mikroskopische Darstellung der Zellen mittels Immunfluoreszenz-Technik ist das Wachstum der Zellen auf Deckgläschen. Dazu wurden die kardialen Fibroblasten in 6-*well*-Platten mit eingelegten Deckgläschen mit $2,5 \times 10^4$ Zellen pro *well* ausgebracht. Anschließend wurden die Zellen behandelt.

2.7.2 Immunfluoreszenzfärbung

Vor der Fixierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in der Fixierlösung für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Fixierlösung abgesaugt und die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen.

Für die Permeabilisierung wurden die Zellen für 15 min bei Raumtemperatur in den *wells* in Blockpuffer inkubiert. Dabei blockiert das in diesem enthaltene Ziegenserum gleichzeitig unspezifische Bindungsstellen. Danach wurde der Blockpuffer entfernt und die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen.

Die Proteine von Interesse, α -Smooth Muscle Actin (α SMA) und Vimentin, wurden mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern nachgewiesen. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden lichtgeschützt durchgeführt, indem die 6-*well*-Platten in Aluminiumfolie eingeschlagen wurden. Die Zellen wurden mit den in Antikörper-Puffer verdünnten Antikörpern über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Antikörper-Lösung abgenommen und die Zellen zwei Mal mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen.

Um die Zellkerne anzufärben wurde der Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) verwendet. Die DAPI-Stammlösung wurde 1:10.000 in PBS zu einer Endkonzentration von 500 ng/ml verdünnt und die Proben für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die DAPI-Lösung abgenommen und die Zellen drei Mal je 5 min bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen. Als nächstes wurden die Zellen in Prolong Diamond Antifade Mountant auf Objektträgern eingebettet. Zur Aushärtung des Eindeckmittels wurden die Objektträger lichtgeschützt über Nacht bei Raumtemperatur gelagert und anschließend bei 4 °C aufbewahrt. Um die Deckgläschen luftdicht zu versiegeln, wurde nach der Aushärtung ein Streifen handelsüblicher durchsichtiger Nagellack am Rande der Deckgläschen aufgetragen.

2.7.3 Immunfluoreszenzaufnahmen

Für die mikroskopischen Immunfluoreszenzaufnahmen wurde der Zeiss Axio Observer.D1 mit einer angeschlossenen AxioCam MRm verwendet. Von allen Präparaten wurden je 10 Aufnahmen mit 400-facher Vergrößerung und identischen Belichtungszeiten an zufällig ausgewählten Stellen gemacht.

2.8 Statistik

Die Anzahl der biologischen Replikate ist in den Abbildungslegenden angegeben. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte \pm SEM. Die Normalverteilung der Datensätze wurde durch den Shapiro-Wilk-Test bestätigt und die Homogenität der Varianzen (von Mittelwerten) zwischen Gruppen durch den Levene-Test. Mittels beidseitiger, ungepaarter t-Tests von Rohdaten wurden Vergleiche von Datenpaaren vorgenommen. Mehrfachvergleiche wurden mittels one-way ANOVA mit post-hoc Tukey LSD Test durchgeführt. Die Probengrößen für die Experimente basierten auf den entsprechenden statistischen Tests für Datenanalysen und wurden mit G*Power Version 3.1.9.2 [65] berechnet. Das Signifikanzniveau (α -Fehler) und die Sensitivität (β -Fehler) wurden entsprechend auf 0,05 und 0,95 festgelegt.

3 Ergebnisse

Die Induktion der Myofibroblastendifferenzierung beruht auf der Behandlung mit *transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1), welches zu einem intrazellulären Anstieg von ROS und der Bildung von *alpha smooth muscle* Aktin (α SMA) führt. 2019 wurde ein Zellkulturmodell etabliert, in welchem primäre kardiale Fibroblasten aus Mausherzen isoliert und kultiviert wurden, um anschließend die Transdifferenzierung zu Myofibroblasten zu induzieren [66]. Im Anschluss daran wurde in dieser Arbeit der Einfluss einzelner Komplexe der mitochondrialen Atmungskette, des Telomerase Aktivators 65 (TA65) und der Überexpression antioxidativer Enzyme auf die Myofibroblastendifferenzierung untersucht. Dazu wurden primäre kardiale Fibroblasten isoliert, kultiviert und die Myofibroblastendifferenzierung induziert. In diesen Prozess wurde auf verschiedene Arten und Weisen eingegriffen. Rotenon, ein als Pestizid eingesetztes Molekül, inhibiert die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I). Oligomycin, ein toxisches antibiotisches Molekül, hemmt selektiv die ATP-Synthase (Komplex V). Mit Rotenon oder Oligomycin wurden in den kardialen Fibroblasten gezielt die Komplexe I und V der mitochondrialen Atmungskette inhibiert. Durch Zugabe von TA65 sollte der Einfluss einer verstärkten Aktivierung von TERT untersucht werden. Schließlich sollte durch lentivirale Transduktion die Menge an dem intrazellulären Antioxidans Thioredoxin-1 erhöht werden und dessen Einfluss auf die Myofibroblastendifferenzierung untersucht werden.

3.1 Einfluss von Komplex I und V der mitochondrialen Atmungskette auf die Myofibroblastendifferenzierung

Zur Untersuchung der Auswirkungen verschiedener Stimuli auf kardiale Fibroblasten und die Differenzierung zu Myofibroblasten wurden murine kardiale Fibroblasten nach erfolgreicher Isolation und Kultivierung (2.4.2) mit 5×10^4 Zellen in 6 cm Zellkulturschalen in 3 ml Komplett-Medium ausgebracht. Nach 24 h wurde das Komplett-Medium gegen 3 ml *Starving*-Medium ausgetauscht und die Zellen für 24 h inkubiert. *Starving*-Medium ist zusammengesetzt wie Komplett-Medium, enthält jedoch nur 1% (v/v) FCS. Nach der *Starvation* wurde mit TGF- β 1 die Myofibroblastendifferenzierung induziert. TGF- β 1 lag in 20 ng/ μ l Stammlösung vor. Das Lösungsmittel bestand aus dH₂O mit 0,1 % (w/v) Albumin Fraktion V (BSA) und 4 mM HCl. Zur Behandlung wurde die Stammlösung 1:10 in PBS

verdünnt und in der Zellkulturschale 1:1000 verdünnt, sodass eine finale Konzentration von 2 ng/ml erreicht wurde.

Die Behandlung mit Rotenon, Oligomycin und/oder TA65 fand 2 h nach der Behandlung mit TGF- β 1 statt. Da alle drei Substanzen in DMSO gelöst wurden, wurde als Lösungsmittel-Kontrolle DMSO bei den Kontroll-Zellen eingesetzt.

TA65 und Oligomycin wurden aus 10 mM Stammlösungen (in DMSO) zu Endkonzentrationen von 1 μ M zugegeben. Rotenon wurde aus einer 10 mM Stammlösung (in DMSO) zu einer Endkonzentration von 200 nM zugegeben. Anschließend an die Behandlungen wurden die Zellen für 48 h bei 37 °C, 5 % CO₂ Gehalt und erhöhter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die anschließenden Aufbereitungen der Zellen sind in einzelnen Kapiteln unter Material und Methoden aufgeführt.

3.1.1 Komplex I ist notwendig zur Bildung von α SMA-Fasern in kardialen Fibroblasten

Der semi-quantitative Nachweis der Proteinmenge von α SMA im Immunoblot zeigte einen deutlichen Einfluss von Rotenon auf die Myofibroblastendifferenzierung (**Abb. 3**). Durch TGF- β 1 konnte die Bildung von α SMA-Protein signifikant gesteigert werden. Die Behandlung mit Rotenon allein zeigte keinen Effekt auf das α SMA-Niveau, folglich konnte ausgeschlossen werden, dass Rotenon das basale α SMA-Niveau senkt. Die Inkubation mit TGF- β 1 und Rotenon sorgte für einen signifikant geringeren Anstieg der α SMA-Proteinmenge im Vergleich zu den mit TGF- β 1 behandelten Zellen (**Abb. 3**). Daraus geht hervor, dass ein funktionsfähiger Komplex I notwendig für die α SMA-Produktion und Myofibroblastendifferenzierung ist.

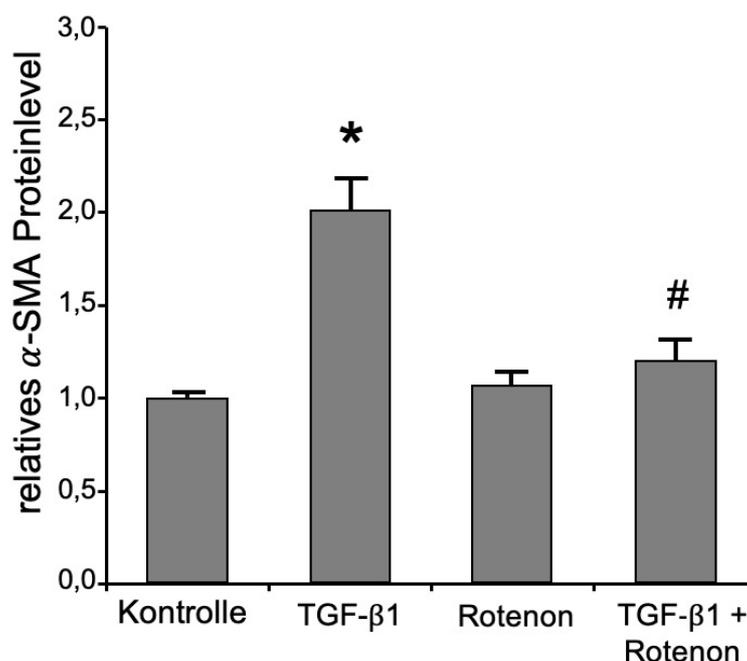


Abb. 3: Einfluss von Rotenon auf die α SMA-Proteinmenge. Primäre kardiale Fibroblasten wurden wie beschrieben kultiviert und mit TGF- β 1 und/oder Rotenon behandelt. Das Balkendiagramm zeigt die relativen Proteinlevel von α SMA nach den jeweiligen Behandlungen und semi-quantitativer Auswertung im Immunoblot. Der Mittelwert der unbehandelten Zellen wurde zu eins gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte über eine one-way ANOVA mit post-hoc Tukey LSD test. (n=7, *p<0,05 vs. Kontrolle, #p<0,05 vs. TGF- β 1)

3.1.2 Die ATP-Synthase ist notwendig zur Myofibroblastendifferenzierung

Analog zu Rotenon wurde während der Induktion der Myofibroblastendifferenzierung mittels TGF- β 1 Komplex V, die ATP-Synthase der mitochondrialen Atmungskette mit Oligomycin inhibiert. Wieder ließ sich beobachten, wie TGF- β 1 intrazellulär zu einem signifikanten Anstieg von α SMA-Protein führte, während Oligomycin allein keinen Effekt auf das α SMA-Niveau ausübte (**Abb. 4**). Wurden die beiden Behandlungen kombiniert, blieb die Hochregulation von α SMA-Protein aus. Oligomycin hemmt die Bildung von α SMA-Fasern in den kardialen Fibroblasten und verhindert somit die Differenzierung zu Myofibroblasten. Daraus lässt sich ableiten, dass eine funktionierende ATP-Synthase notwendig für die Myofibroblastendifferenzierung ist.

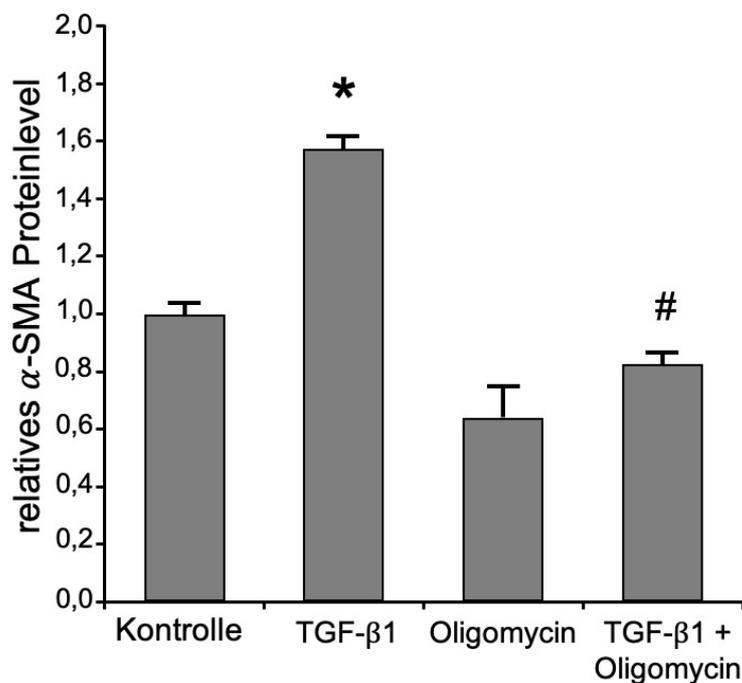
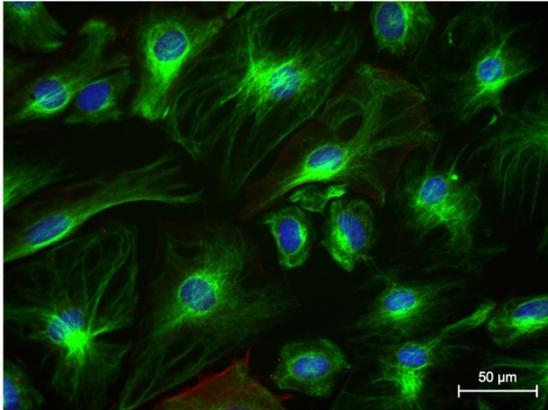


Abb. 4: Einfluss von Oligomycin auf die α SMA-Proteinmenge. Primäre kardiale Fibroblasten wurden wie beschrieben kultiviert und mit TGF- β 1 und/oder Oligomycin behandelt. Das Balkendiagramm zeigt die relativen Proteinlevel von α SMA nach den jeweiligen Behandlungen und semi-quantitativem Nachweis im Immunoblot. Der Mittelwert der unbehandelten Zellen wurde zu eins gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte über eine one-way ANOVA mit post-hoc Tukey LSD test. (n=4, *p<0,05 vs. Kontrolle, #p<0,05 vs. TGF- β 1)

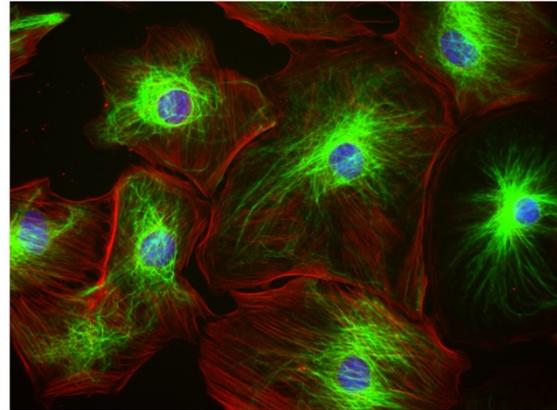
3.1.3 Morphologisch zeigen kardiale Fibroblasten nach Rotenon- oder Oligomycin-Behandlung keine α SMA-Faserbildung

Die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Zellen zeigen, dass TGF- β 1 die Bildung von α SMA-Fasern induziert (**Abb. 5**). Wurde in den Zellen mittels Rotenon Komplex I inhibiert, zeigte sich immunfluoreszenzmikroskopisch keine vermehrte Bildung von α SMA, selbst wenn die Bildung mit TGF- β 1 induziert wurde. Dasselbe Ergebnis ließ sich in den Zellen beobachten, die mit Oligomycin behandelt wurden. Auch hier konnte TGF- β 1 keine Bildung von α SMA-Fasern bewirken. Diese Beobachtungen spiegeln die proteinbiochemischen Daten wider, in welchen das α SMA-Proteinniveau entsprechend verringert war. Folglich untermauern die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen die Erkenntnis, dass für die Bildung von α SMA-Fasern und somit für die Differenzierung zum Myofibroblasten eine funktionsfähige mitochondriale Atmungskette notwendig ist.

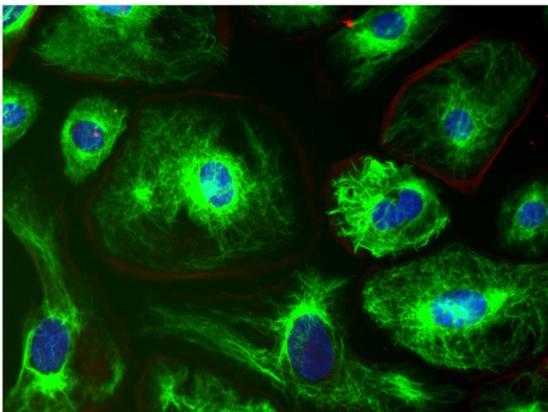
Kontrolle



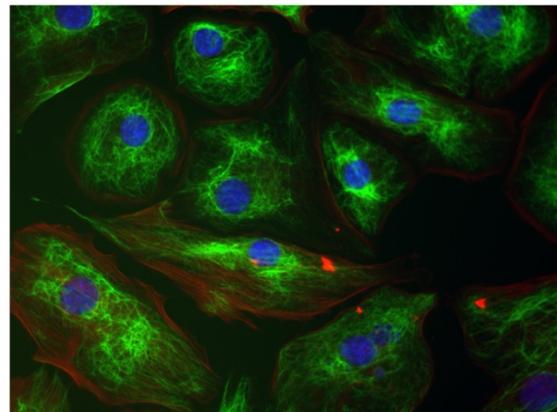
TGF-β1



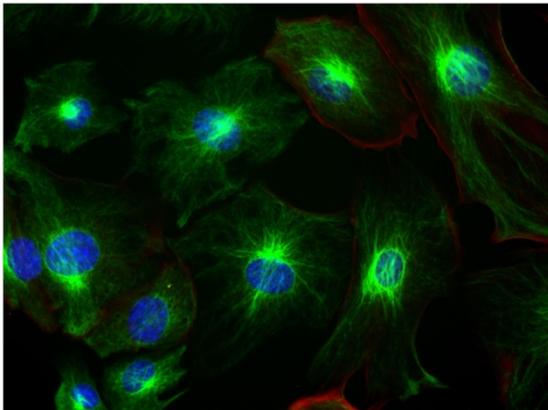
Rotenon



Rotenon + TGF-β1



Oligomycin



Oligomycin + TGF-β1

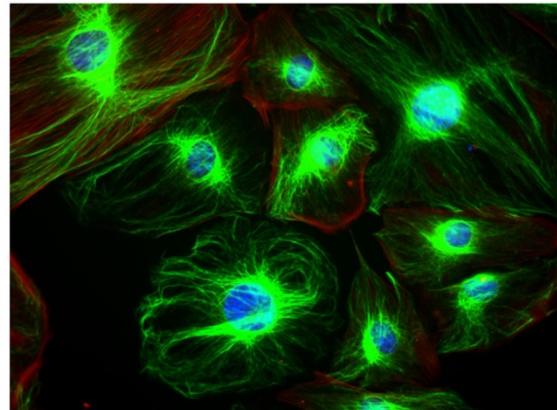


Abb. 5: Einfluss von Rotenon und Oligomycin auf die Myofibroblastendifferenzierung. Primäre kardiale Fibroblasten wurden kultiviert und mit TGF-β1, Rotenon und/oder Oligomycin behandelt. Zur Färbung wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden mit direkt gekoppelten Antikörpern alpha smooth muscle Aktin (α SMA, rot) und Vimentin (grün) angefärbt, sowie die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. Dann erfolgten fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der einzelnen Behandlungen. Hier abgebildet sind repräsentative Aufnahmen der unterschiedlichen Behandlungen.

3.2 Einfluss der Telomerase Reverse Transkriptase (TERT) auf die Myofibroblastendifferenzierung ist atmungskettenabhängig

Telomerase Reverse Transkriptase (TERT) und ihre intrazelluläre Lokalisation spielen eine wesentliche Rolle in der Myofibroblastendifferenzierung [66]. Die genauen Mechanismen der Einflussnahme sind noch nicht erforscht. Ob ein Zusammenhang zwischen der Lokalisation von TERT und der oxidativen Phosphorylierung besteht, wurde im Zellkulturmodell untersucht. Dazu wurden kardiale Fibroblasten aus Mausherzen unterschiedlichen genetischen Ursprungs isoliert. Die TERT ist sowohl im Zellkern als auch in den Mitochondrien lokalisiert. Kardiale Fibroblasten aus genetisch unveränderten Mäusen wiesen diesen Zustand auf und wurden als TERT Wildtyp (TERT wt) bezeichnet. Mäuse, welche gänzlich frei von TERT sind, wurden als TERT *knockout* (TERT ko) bezeichnet. Der dritte Genotyp, welcher in diesen Versuchen verwendet wurde, verfügte über TERT ausschließlich in den Mitochondrien und wurde dementsprechend als mitochondriale TERT (mito TERT) bezeichnet. Aus diesen drei Maus-Genotypen wurden kardiale Fibroblasten isoliert und für die Kultivierung aufbereitet [66]. In den drei Zellreihen TERT wt, TERT ko und mito TERT wurde, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, mit TGF- β 1 die Myofibroblastendifferenzierung induziert und mit Rotenon oder Oligomycin die oxidative Phosphorylierung inhibiert. Der Einfluss von Rotenon und Oligomycin auf die Myofibroblastendifferenzierung in den verschiedenen Genotypen wurde proteinbiochemisch im Immunoblot ausgewertet und immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellen gemacht.

3.2.1 TERT Expression ist wesentlich für die Myofibroblastendifferenzierung

Die an diesen Versuch anschließende semi-quantitative Analyse der α SMA-Proteinmenge offenbarte zwei relevante Erkenntnisse. Im TERT wt konnten die gleichen Verhältnisse wie in Kapitel 3.1 beschrieben beobachtet werden. Im TERT ko ergab weder die Behandlung mit TGF- β 1 einen signifikanten Anstieg von α SMA, noch wirkte sich die Blockade von Komplex I oder V auf die α SMA-Proteinbildung aus. Im mito TERT hingegen konnte mit TGF- β 1 ein signifikanter Anstieg von α SMA-Protein erreicht werden. Der erwartete Effekt wurde somit reproduziert. Die Blockade von Komplex I in diesen Zellen bewirkte, dass α SMA nicht signifikant hochreguliert wurde (**Abb. 6**). Die Blockade der ATP-Synthase zeigte einen ähnlichen Effekt. Die α SMA-Proteinmenge stieg nicht signifikant an, während Komplex V blockiert war (**Abb. 7**). Die mitochondriale TERT benötigt für ihren Effekt auf die α SMA-Produktion offenbar

eine funktionsfähige oxidative Phosphorylierung. Dies bedeutet, dass die von der Atmungskettenaktivität abhängige Myofibroblastendifferenzierung die Expression von TERT benötigt.

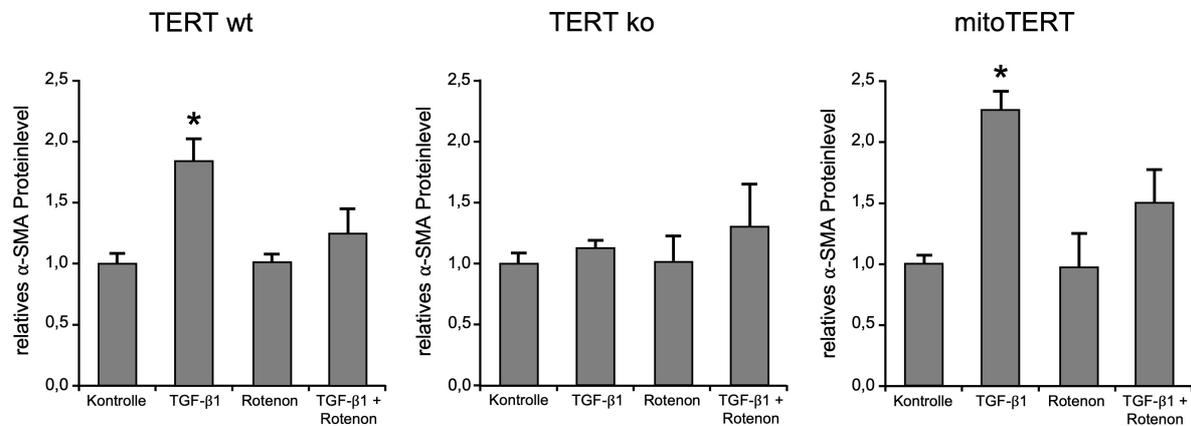


Abb. 6: Auswirkungen von Rotenon auf die α SMA-Proteinmenge. Kardiale Fibroblasten aus TERT wt, TERT ko und mito TERT wurden isoliert und kultiviert wie beschrieben. Mit TGF- β 1 wurde die Myofibroblastendifferenzierung induziert und mit Rotenon selektiv Komplex I der mitochondrialen Atmungskette inhibiert. Hier gezeigt sind die relativen Proteinmengen von α SMA. Jeweils der Mittelwert der unbehandelten Zellen wurde zu eins gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte über eine one-way ANOVA mit post-hoc Tukey LSD test. (TERT wt n=5, TERT ko n=3, mito TERT n=3, *p<0,05 vs Kontrolle)

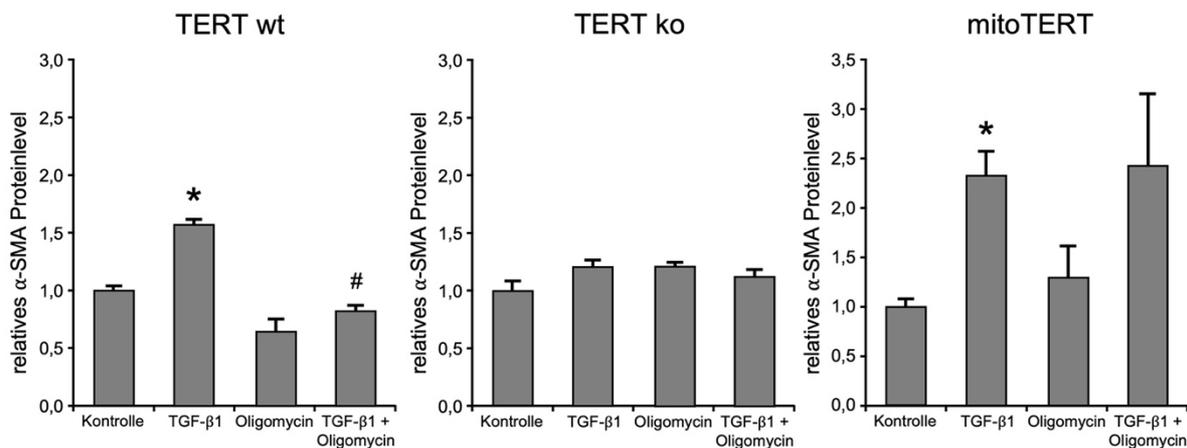


Abb. 7: Auswirkungen von Oligomycin auf die α SMA-Proteinmenge. Kardiale Fibroblasten aus TERT wt, TERT ko und mito TERT wurden isoliert und kultiviert wie beschrieben. Mit TGF- β 1 wurde die Myofibroblastendifferenzierung induziert und mit Oligomycin selektiv die mitochondriale ATP-Synthese inhibiert. Hier gezeigt sind die relativen Proteinmengen von α SMA. Jeweils der Mittelwert der unbehandelten Zellen wurde zu eins gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte über eine one-way ANOVA mit post-hoc Tukey LSD test. (TERT wt n=4, TERT ko n=3, mito TERT n=4, *p<0,05 vs Kontrolle, #p<0,05 vs TGF- β 1)

3.2.2 Eine Einschränkung der mitochondrialen Atmungskette behindert die Myofibroblastendifferenzierung

Die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der kardialen Fibroblasten spiegeln die Erkenntnisse der proteinbiochemischen Auswertung wider. In den TERT wt Zellen sorgt die Behandlung mit TGF- β 1 für eine deutliche α SMA-Faserbildung. Dies konnte in Fibroblasten aus TERT ko nicht mehr beobachtet werden. In mito TERT Zellen hingegen ließ sich die bereits nachgewiesene verstärkte Bildung von α SMA-Fasern auch immunfluoreszenzmikroskopisch nachweisen. Die Gegenüberstellung der Wirkung von TGF- β 1 auf die verschiedenen Genotypen ist in **Abb. 8** dargestellt. Die Ergebnisse reproduzieren die Erkenntnisse von 2019, dass mitochondriale TERT relevant für die Bildung von α SMA-Fasern ist [66].

Wie in **Abb. 9** zu sehen ist, scheint sich die Inhibition von Komplex I durch Rotenon in allen drei untersuchten Zellen auf das Zytoskelett auszuwirken. Die Zellen zeigen spinnengewebartige Vimentinfasern, die sich bei genauer Beobachtung vom unbehandelten Phänotyp unterscheiden. Rotenon allein ruft keine Synthese von α SMA-Fasern hervor. Wurde während der Induktion der α SMA-Faserbildung mit TGF- β 1 gleichzeitig Komplex I durch Rotenon blockiert, war eine α SMA-Faserbildung kaum bis gar nicht zu verzeichnen. Die Betrachtung der immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen legt nahe, dass die Zellen zwar den Reiz α SMA-Fasern zu bilden bekommen haben und sich daraufhin ausgedehnt haben, jedoch die Ausprägung des Myofibroblastenphänotyps während blockierter oxidativer Phosphorylierung nicht erreicht werden konnte.

Die Blockade von Komplex V hat ähnliche Auswirkungen wie die von Komplex I (**Abb. 10**). Es fallen ebenfalls leichte Veränderungen der Morphologie des Zytoskeletts auf. Oligomycin verhindert die Bildung von α SMA-Fasern und somit die Myofibroblastendifferenzierung in allen Genotypen. In den mito TERT Zellen fällt eine bedingte Volumenzunahme auf, jedoch wurde kein Myofibroblastenphänotyp ausgebildet. Es kommt nicht zur Ausbildung von α SMA-Fasern.

Die erhobenen proteinbiochemischen Daten und immunfluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen weisen darauf hin, dass mitochondriale TERT zur Ausbildung von α SMA-Fasern benötigt wird.

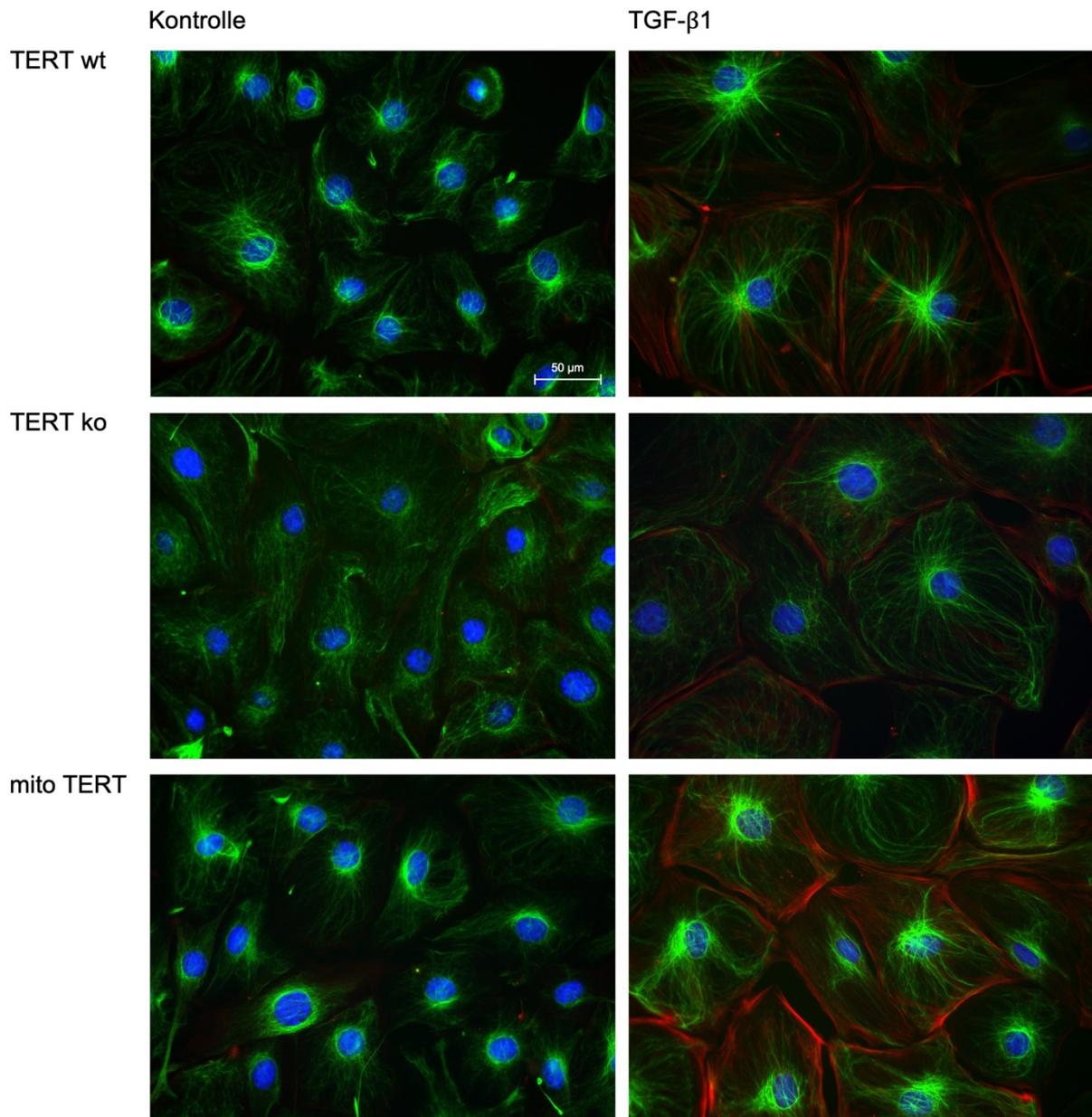


Abb. 8: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen muriner kardialer Fibroblasten +/- TGF- β 1. Kardiale Fibroblasten aus TERT wt, TERT ko und mito TERT wurden isoliert und kultiviert wie beschrieben und mit TGF- β 1 und DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen zur Färbung fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden mit direkt gekoppelten Antikörpern alpha smooth muscle Aktin (α SMA, rot) und Vimentin (grün) angefärbt, sowie die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. Dann erfolgten fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der einzelnen Behandlungen. Hier abgebildet sind repräsentative Aufnahmen der unterschiedlichen Behandlungen.

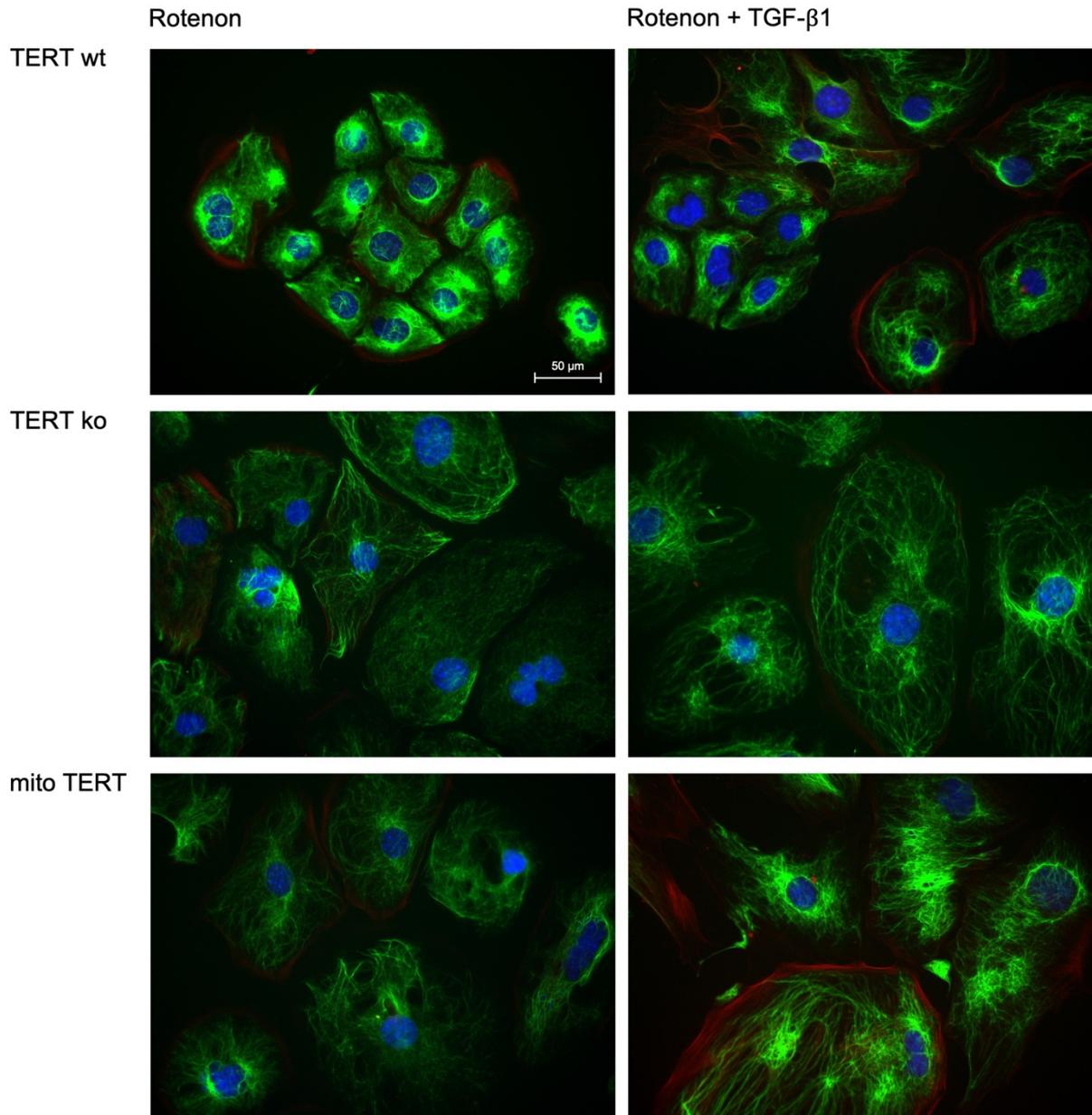


Abb. 9: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen muriner kardialer Fibroblasten +/- Rotenon +/- TGF- β 1. Kardiale Fibroblasten aus TERT wt, TERT ko und mito TERT wurden isoliert und kultiviert wie beschrieben und mit TGF- β 1 und Rotenon behandelt. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen zur Färbung fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden mit direkt gekoppelten Antikörpern alpha smooth muscle Aktin (α SMA, rot) und Vimentin (grün) angefärbt, sowie die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. Dann erfolgten fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der einzelnen Behandlungen. Hier abgebildet sind repräsentative Aufnahmen der unterschiedlichen Behandlungen.

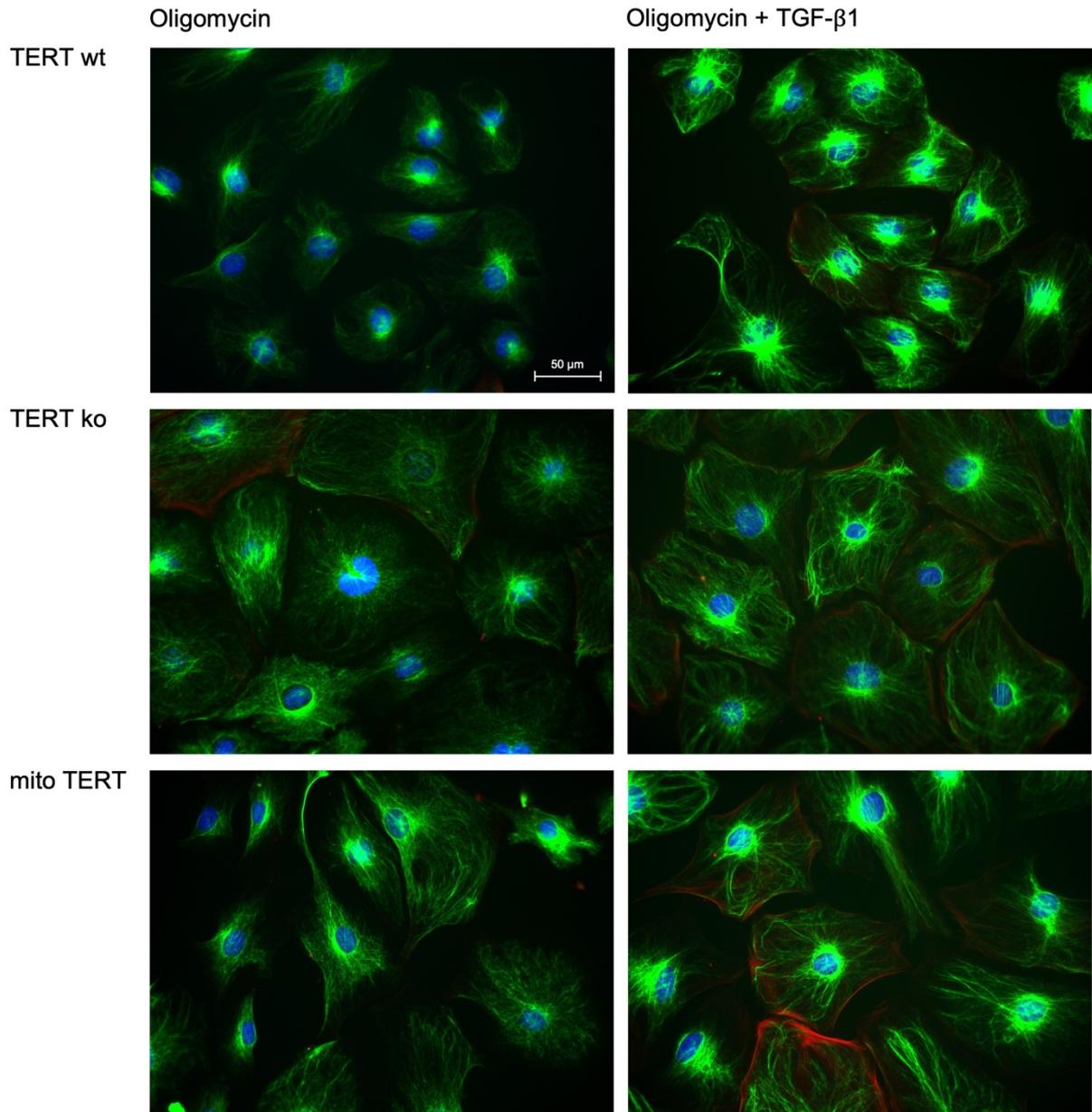


Abb. 10: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen muriner kardialer Fibroblasten +/- Oligomycin +/- TGF- β 1. Kardiale Fibroblasten aus TERT wt, TERT ko und mito TERT wurden isoliert und kultiviert wie beschrieben und mit TGF- β 1 und Oligomycin behandelt. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen zur Färbung fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden mit direkt gekoppelten Antikörpern alpha smooth muscle Aktin (α SMA, rot) und Vimentin (grün) angefärbt, sowie die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. Dann erfolgten fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der einzelnen Behandlungen. Hier abgebildet sind repräsentative Aufnahmen der unterschiedlichen Behandlungen.

3.3 Der Telomerase Aktivator 65 (TA65) induziert Myofibroblastendifferenzierung

Der Telomerase Aktivator 65 (TA65) wird aus der Wurzel des *Astragalus membranaceus* gewonnen und fand ursprünglich in der traditionellen chinesischen Medizin Anwendung. In den letzten Jahren gewann er zunehmend an Aufmerksamkeit als potentiell Nahrungsergänzungsmittel, das Zellalterung und Telomerverkürzung entgegenwirken soll. Bisher konnte noch nicht nachgewiesen werden, dass TA65 Telomere tatsächlich signifikant verlängern kann, jedoch konnte gezeigt werden, dass es generell gesundheitsfördernde Effekte hat [57]. In klinischen Studien wurden die Effekte von TA65 auf den menschlichen Körper und das kardiovaskuläre System untersucht und es zeigten sich positive Auswirkungen auf die Insulinsensitivität und Glukoseaufnahme [56, 67]. Aktuelle klinische Studien untersuchen die Auswirkungen von TA65 auf Patienten nach Herzinfarkt [68]. Es konnte gezeigt werden, dass Telomerase Aktivatoren die Effektivität von DNA-Reparaturprozessen steigern [59]. Die positiven Auswirkungen in der mito TERT Versuchsreihe [66] (3.2) waren Anlass zu untersuchen, ob eine Verstärkung von TERT durch TA65 Effekte auf die Myofibroblastendifferenzierung ausübt. Um die Rolle von TERT und TA65 in der Myofibroblastendifferenzierung und den Zusammenhang mit der oxidativen Phosphorylierung zu untersuchen, wurden Versuche in den in 3.2 beschriebenen Zellreihen unterschiedlicher Maus-Genotypen durchgeführt. Murine kardiale Fibroblasten aus TERT wt, TERT ko und mito TERT wurden wie beschrieben isoliert und kultiviert. 48 h nach dem Ausbringen der Zellen wurde wie beschrieben (3.1) mit TGF- β 1 die Myofibroblastendifferenzierung induziert. 2 h nach Beginn der TGF- β 1-Stimulation wurde eine Auswahl der Zellen mit TA65 behandelt. In anderen Zellen wurden mittels Rotenon oder Oligomycin die mitochondriale Atmungskette partiell inhibiert und gleichzeitig die Zellen mit TA65 stimuliert. Schließlich wurden die Auswirkungen dieser verschiedenen Stimuli auf die α SMA-Faserbildung analysiert, indem immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gemacht und proteinbiochemische Analysen durchgeführt wurden.

Da die Effekte von TGF- β 1 sowie der partiellen Inhibition der oxidativen Phosphorylierung durch Rotenon und Oligomycin auf die verschiedenen Genotypen bereits in Kapitel 3.1 und 3.2 beschrieben wurden, werden im Folgenden lediglich die Effekte von TA65 beschrieben und dargestellt.

3.3.1 TA65 steigert die α SMA-Faserbildung in Fibroblasten aus TERT wt

Die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Zellen aus TERT wt, welche mit TGF- β 1 und TA65 behandelt wurden zeigten starke Effekte auf die α SMA-Faserbildung (**Abb. 11**). TA65 allein hat keinen Einfluss auf die α SMA-Faserbildung. Die Zellen, die mit der Kombination aus TGF- β 1 und TA65 behandelt wurden, sind größer und es sind wesentlich mehr rot gefärbte α SMA-Fasern zu sehen. Die Stärke des Effekts wurde in Relation gesetzt zu den Effekten von mitochondrialer TERT und ist in diesem Zusammenhang vergleichbar stark. Daraus ableiten lässt sich die These, dass TA65 die Induktion der Myofibroblastendifferenzierung ähnlich potenzieren kann wie mitochondriale TERT. Für eine semi-quantitative Analyse wurden die Zellen zudem noch proteinbiochemisch analysiert (3.3.4).

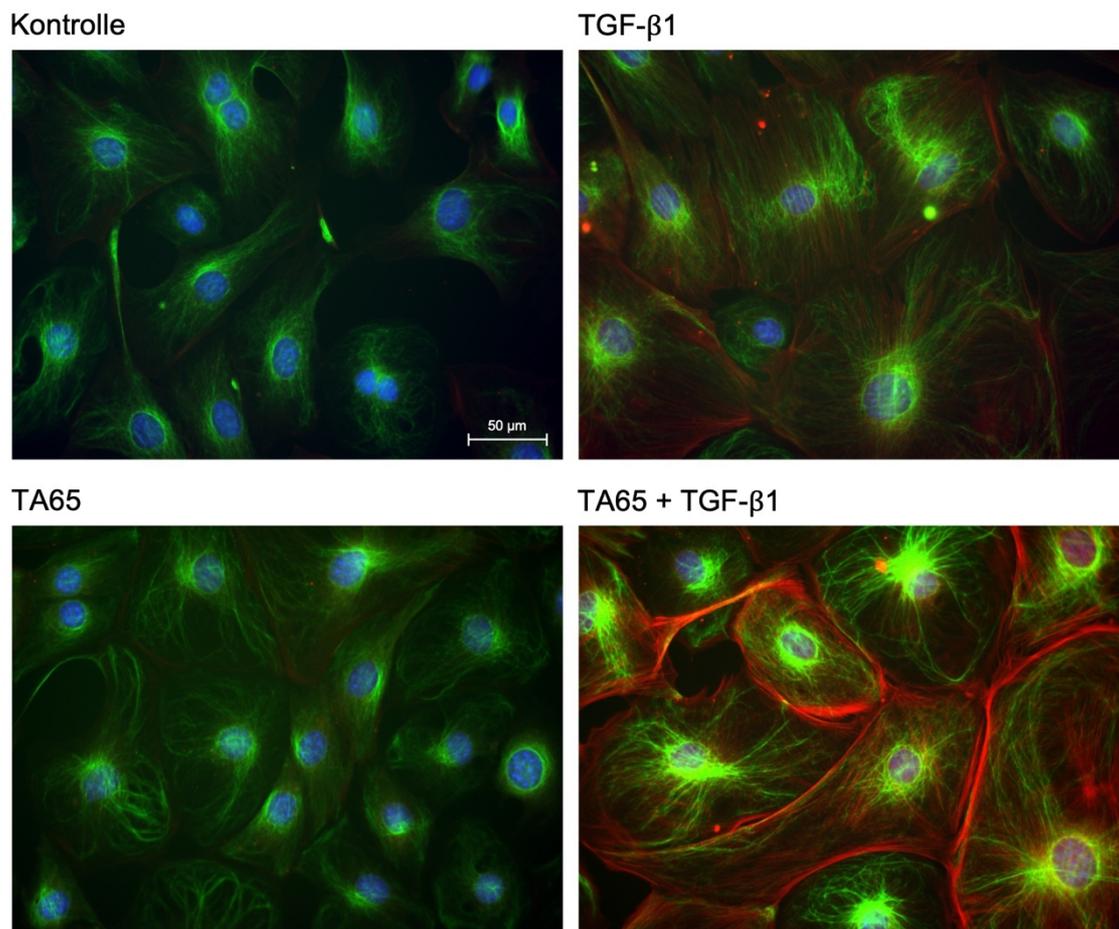


Abb. 11: TA65 steigert den Effekt von TGF- β 1 im TERT wt. Murine kardiale Fibroblasten aus TERT wt wurden isoliert und kultiviert wie beschrieben. 48 h nach Ausbringen der Zellen wurden diese mit TGF- β 1 behandelt, 2 h später wurden sie mit TA65 behandelt. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen zur Färbung fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden mit direkt gekoppelten Antikörpern alpha smooth muscle Aktin (α SMA, rot) und Vimentin (grün) angefärbt, sowie die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. Dann erfolgten fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der einzelnen Behandlungen. Hier abgebildet sind repräsentative Aufnahmen der unterschiedlichen Behandlungen.

3.3.2 Der Effekt von TA65 ist vollständig TERT abhängig

Die TERT ko Fibroblasten wurden ebenso wie die TERT wt Zellen behandelt, um die Effekte vergleichen zu können. 48 h nach dem Ausbringen wurden die Zellen mit TGF- β 1 behandelt und 2 h später mit TA65. Hier zu sehen sind die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der TERT ko Zellen nach weiteren 48 h Inkubation (**Abb. 12**). TA65 allein zeigt keinen Effekt auf die α SMA-Faserbildung der Zellen. Weder die Behandlung mit TGF- β 1 noch die Kombination von TGF- β 1 mit TA65 induzierte eine Myofibroblastendifferenzierung. Aus diesen Beobachtungen lässt sich ableiten, dass TA65 in Fibroblasten TERT-spezifisch wirkt. Es kann folglich ausgeschlossen werden, dass die Effekte in TERT wt und mito TERT Zellen durch bisher nicht bekannte Effekte von TA65 in der Zelle hervorgerufen werden.

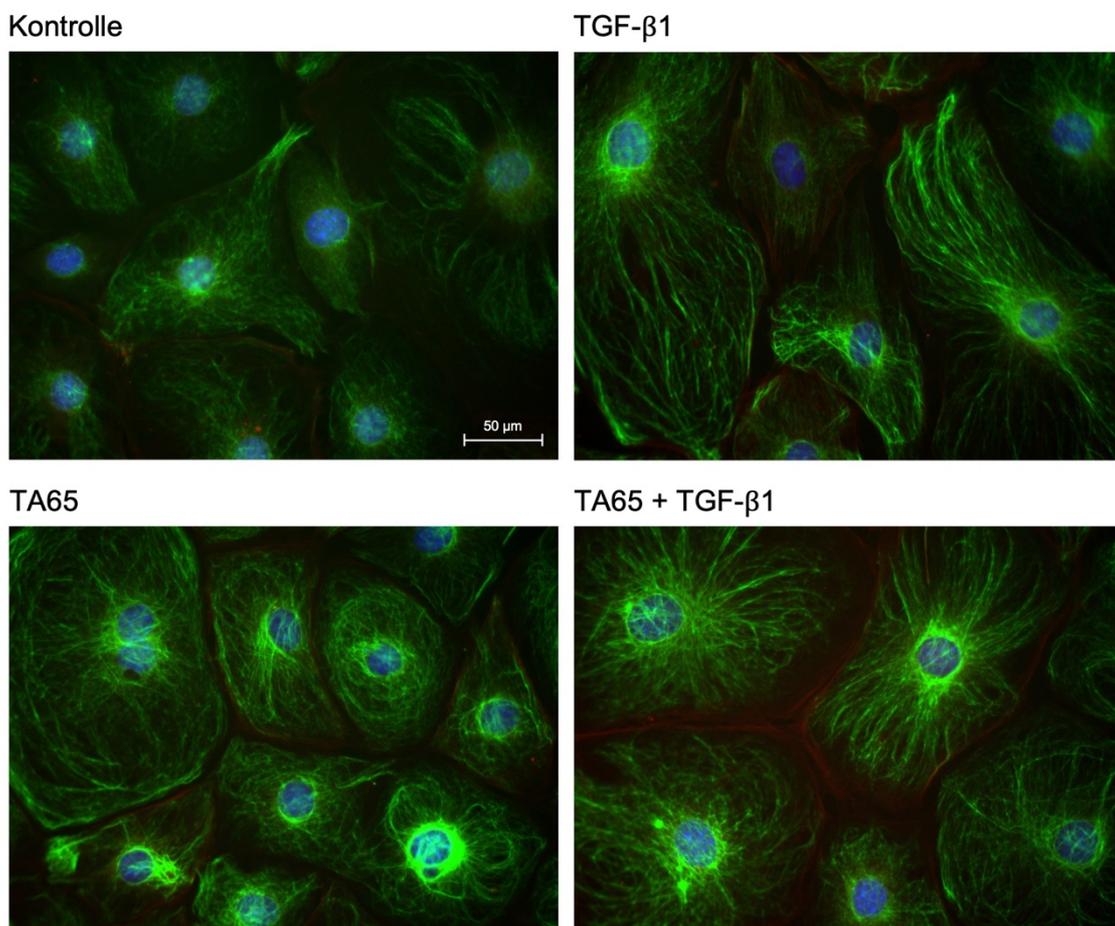


Abb. 12: TA65 hat keinen Einfluss auf die α SMA-Faserbildung im TERT ko. Murine kardiale Fibroblasten aus TERT ko wurden isoliert und kultiviert wie beschrieben. 48 h nach Ausbringen der Zellen wurden diese mit TGF- β 1 behandelt, 2 h später wurden sie mit TA65 behandelt. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen zur Färbung fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden mit direkt gekoppelten Antikörpern alpha smooth muscle Aktin (α SMA, rot) und Vimentin (grün) angefärbt, sowie die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. Dann erfolgten fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der einzelnen Behandlungen. Hier abgebildet sind repräsentative Aufnahmen der unterschiedlichen Behandlungen.

3.3.3 TA65 hat keinen zusätzlichen Effekt auf die Myofibroblastendifferenzierung in mito TERT Zellen

In den kardialen Fibroblasten aus mito TERT rief TGF- β 1 die in Kap. 3.2 bereits beschriebenen Effekte hervor. Die α SMA-Faserbildung ist intensiver und die Zellen größer im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, aber auch gegenüber den gleich behandelten Zellen aus TERT wt. Die alleinige TA65-Stimulation der kardialen Fibroblasten aus mito TERT löste keine α SMA-Faserbildung aus. Die kombinierte Stimulation mit TGF- β 1 und TA65 führte zur Ausbildung des Myofibroblastenphänotyps (**Abb. 13**). Ob TA65 in diesen Zellen die Bildung von α SMA

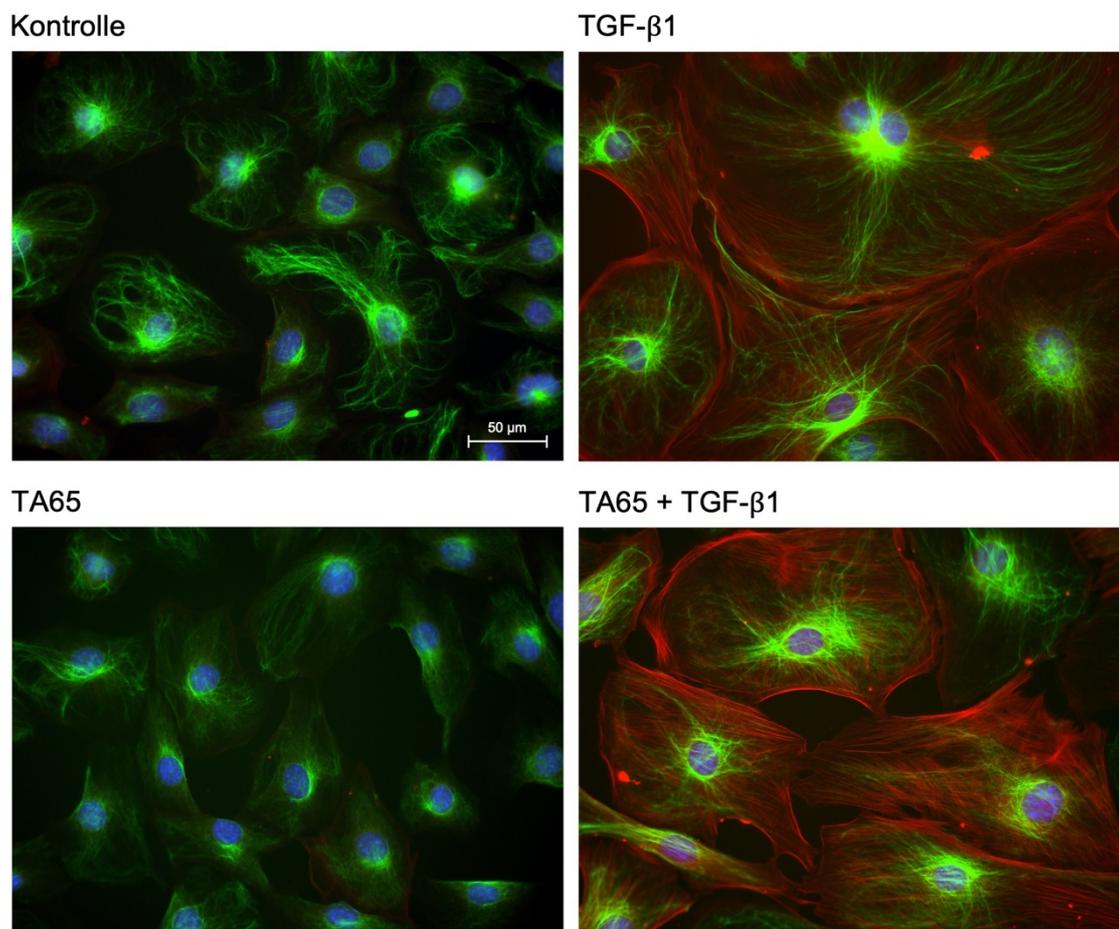


Abb. 13: TA65 zeigt im mito TERT keine Verstärkung der α SMA-Faserbildung. Murine kardiale Fibroblasten aus mito TERT wurden isoliert und kultiviert wie beschrieben. 48 h nach Ausbringen der Zellen wurden diese mit TGF- β 1 behandelt, 2 h später wurden sie mit TA65 behandelt. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen zur Färbung fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden mit direkt gekoppelten Antikörpern alpha smooth muscle Aktin (α SMA, rot) und Vimentin (grün) angefärbt, sowie die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. Dann erfolgten fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der einzelnen Behandlungen. Hier abgebildet sind repräsentative Aufnahmen der unterschiedlichen Behandlungen.

im Vergleich zu den mit TGF- β 1 behandelten Zellen weiter verstärken konnte, wurde dann zusätzlich semi-quantitativ im Immunoblot untersucht (3.3.4).

3.3.4 TA65 verstärkt in kardialen Fibroblasten TERT-abhängig die Differenzierung zu Myofibroblasten

Die semi-quantitativen Auswertungen im Immunoblot zeigen vergleichbare Ergebnisse wie in den immunfluoreszenzmikroskopischen Abbildungen aus Kapitel 3.3. Die Wirkungen von TA65 in den kardialen Fibroblasten sind TERT-spezifisch. Die TGF- β 1-induzierte Bildung von α SMA wird durch TA65 signifikant verstärkt. Dies zeigte sich in einer über 3-fach erhöhten Proteinmenge in den mit TA65 und TGF- β 1 behandelten Zellen (**Abb. 14**).

Mitochondriale TERT allein ist potent genug, auf Stimulation mit TGF- β 1 hin einen massiven Anstieg an α SMA-Protein zu verursachen und die Myofibroblastendifferenzierung zu induzieren. Eine weitere Verstärkung der α SMA Faserbildung durch TA65 ließ sich auch im mito TERT beobachten. Das basale Niveau an α SMA wird durch die Behandlung mit TGF- β 1 um ungefähr das 2-fache erhöht. Die zusätzliche Behandlung mit TA65 sorgte auch hier für einen signifikanten weiteren Anstieg von α SMA, wie im Balkendiagramm (**Abb. 14**) zu sehen ist. Im Vergleich zu Zellen aus TERT wt ist die Potenzierung des α SMA-Niveaus durch TA65 im mito TERT Genotyp fast gleich stark. Daraus lässt sich ableiten, dass für die potenzierenden Effekte von TA65 bezogen auf die α SMA-Faserbildung insbesondere mitochondriale TERT notwendig ist. Dies heißt im Umkehrschluss, dass TA65 mitochondriale TERT benötigt, um die α SMA-Faserbildung zu verstärken.

Die Zellen, die nicht über TERT verfügen, zeigten weder auf die Stimulation mit TGF- β 1, TA65, noch auf die Kombination der Stimuli Veränderungen im Proteinlevel von α SMA. Dies bestätigt, dass die Wirkung von TA65 TERT-spezifisch ist.

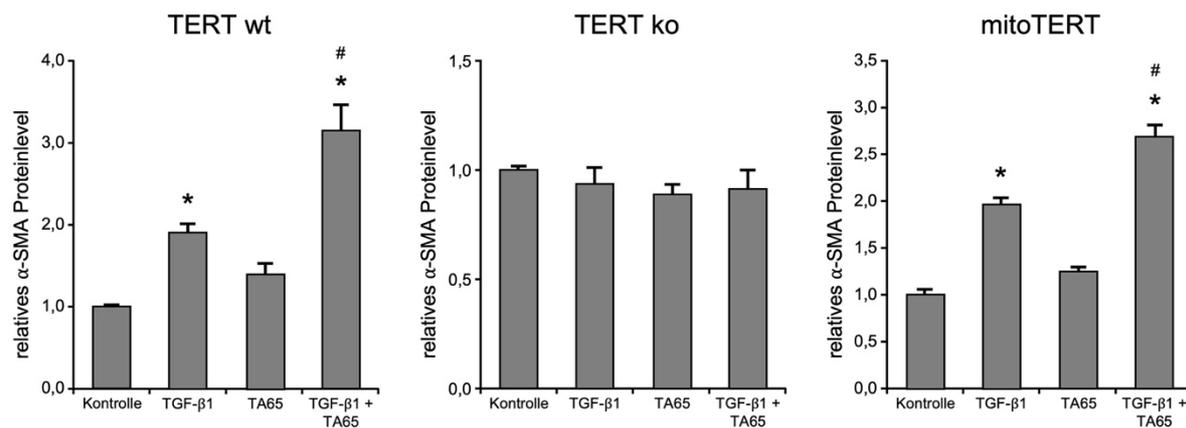


Abb. 14: Auf Proteinebene zeigt TA65 TERT-abhängige Effekte. Kardiale Fibroblasten aus TERT wt, mito TERT und TERT ko wurden isoliert und kultiviert wie beschrieben. Mit TGF- β 1 wurde die Myofibroblastendifferenzierung induziert. Zusätzlich wurden die Zellen mit TA65 stimuliert. Schließlich wurden die Zellen zur proteinbiochemischen Analyse aufbereitet. Hier dargestellt sind die relativen Proteinmengen von α SMA. Jeweils der Mittelwert der unbehandelten Zellen wurde zu eins gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte über one-way ANOVA mit post-hoc Tukey LSD test. (TERT wt n=5, TERT ko n=4, mito TERT n=4, *p<0,05 vs Kontrolle, #p<0,05 vs TGF- β 1)

Festhalten lässt sich, dass die Potenzierung von mitochondrialer TERT durch TA65 einen verstärkenden Effekt auf die TGF- β 1 induzierte α SMA-Produktion hat. Es kam zu einem ungefähr 2- bis 3-fach höheren Anstieg der α SMA-Proteinmenge und in den immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen war die α SMA-Faserbildung deutlich zu beobachten. Entscheidend für diese Prozesse ist die mitochondriale TERT.

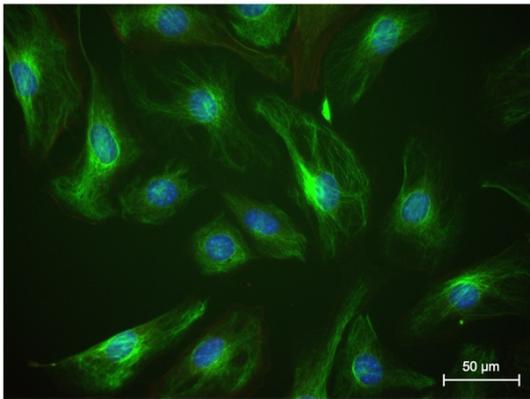
In Anbetracht dieser Erkenntnisse, stellte sich die Frage, ob TA65 potent genug wäre die durch Rotenon oder Oligomycin blockierte α SMA-Faserbildung aufzuheben.

3.3.5 TA65 ist nicht in der Lage, die Inhibition der mitochondrialen Atmungskette zu kompensieren

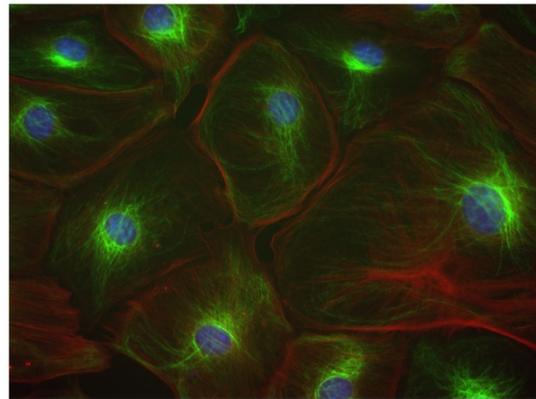
Kardiale Fibroblasten aus TERT wt und mito TERT wurden isoliert und kultiviert wie beschrieben und anschließend mittels TGF- β 1 die α SMA-Faserbildung induziert. Da in den Fibroblasten aus TERT ko TGF- β 1 die α SMA-Faserbildung nicht induzieren konnte (3.3.2), wurden diese Zellen nicht weiter untersucht. In diesen Zellen wurden 2 h später mittels Rotenon oder Oligomycin spezifisch Komplex I oder Komplex V inhibiert und gleichzeitig mit TA65 behandelt. In den immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigten sich folgende Effekte dieser kombinierten Behandlung (**Abb. 15, Abb. 16**).

Offensichtlich am stärksten ist wie erwartet die α SMA-Faserbildung in den Zellen, welche kombiniert mit TGF- β 1 und TA65 behandelt wurden. Werden die Zellen kombiniert mit TGF- β 1 und Rotenon oder Oligomycin behandelt, blockieren diese wie bereits beschrieben (3.2.2) die α SMA Faserbildung. Vergleicht man diese Zellen und die Zellen, welche zusätzlich mit TA65 stimuliert wurden in ihrem mikroskopischen Erscheinungsbild, so zeigen sich wenig bis keine α SMA-Fasern. Anhand der immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen kann man vermuten, dass TA65 nicht in der Lage ist, die Blockade der mitochondrialen Atmungskette zu kompensieren. Diese Beobachtungen passen zu den Erkenntnissen der vorherigen Kapitel, dass für die Myofibroblastendifferenzierung eine funktionierende oxidative Phosphorylierung notwendig ist und, da TA65 TERT-spezifisch wirkt, folglich bei gleichzeitiger Blockade der Atmungskette keinen Effekt ausüben kann. Festhalten lässt sich, dass TA65 bei blockierter Atmungskette keinen Effekt auf die Myofibroblastendifferenzierung hat.

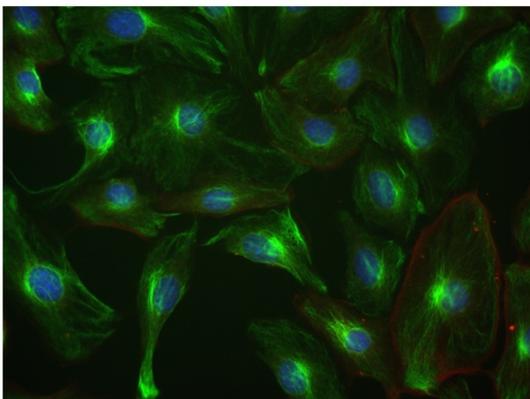
Kontrolle



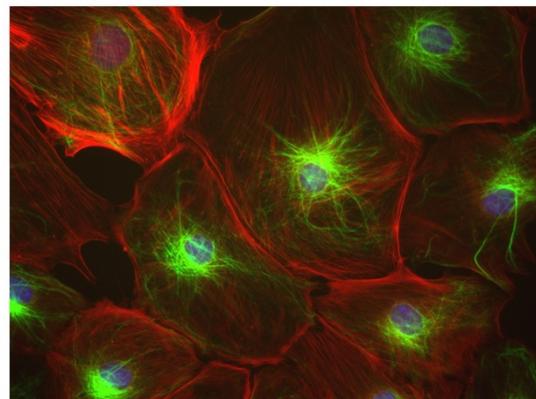
TGF-β1



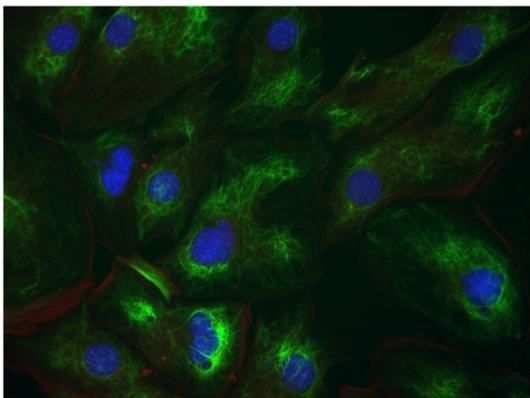
TA65



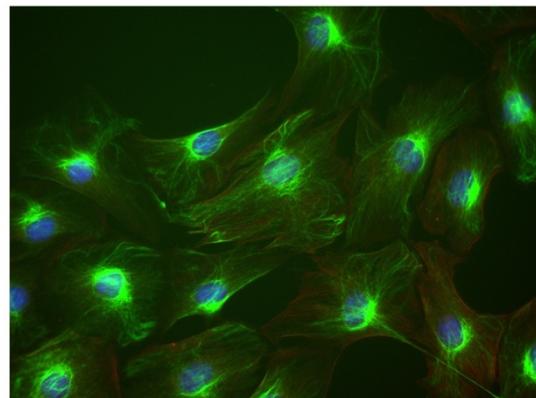
TA65 + TGF-β1



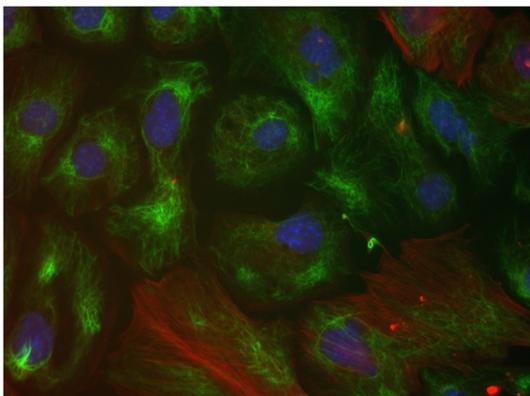
TGF-β1 + Rotenon



TGF-β1 + Oligomycin



TGF-β1 + Rotenon + TA65



TGF-β1 + Oligomycin + TA65

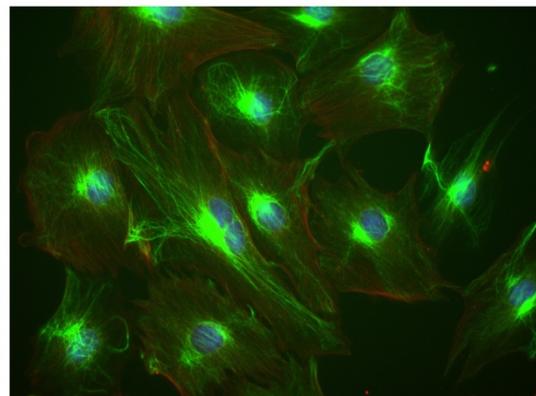
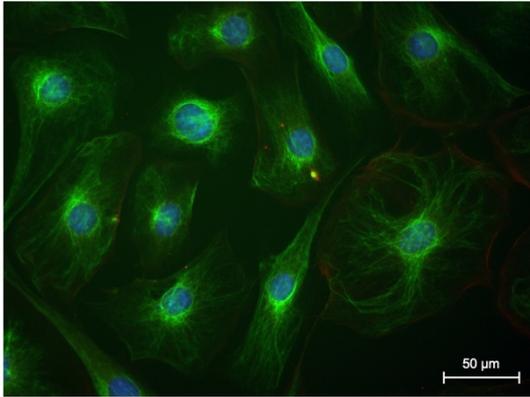
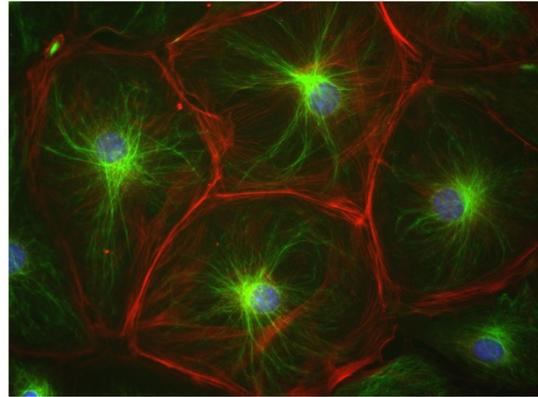


Abb. 15: TA65 ist nicht in der Lage die Inhibition der Atmungskette zu kompensieren. Murine kardiale Fibroblasten aus TERT wt wurden isoliert und kultiviert wie beschrieben. 48 h nach Ausbringen der Zellen wurden diese mit TGF- β 1 behandelt, 2 h später wurden sie mit Rotenon oder Oligomycin und zusätzlich mit TA65 behandelt. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen zur Färbung fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden mit direkt gekoppelten Antikörpern alpha smooth muscle Aktin (α SMA, rot) und Vimentin (grün) angefärbt, sowie die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. Dann erfolgten fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der einzelnen Behandlungen. Hier abgebildet sind repräsentative Aufnahmen der unterschiedlichen Behandlungen.

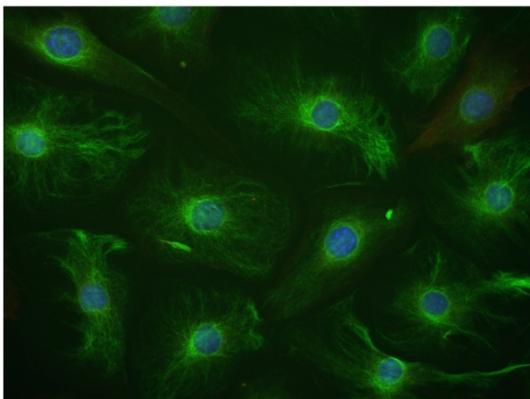
Kontrolle



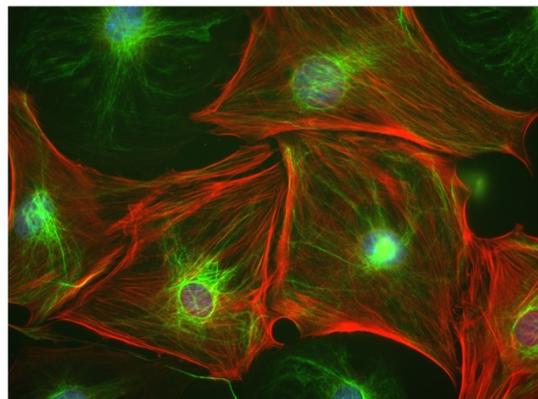
TGF-β1



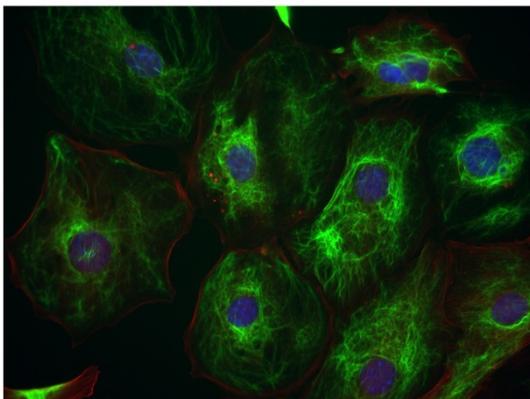
TA65



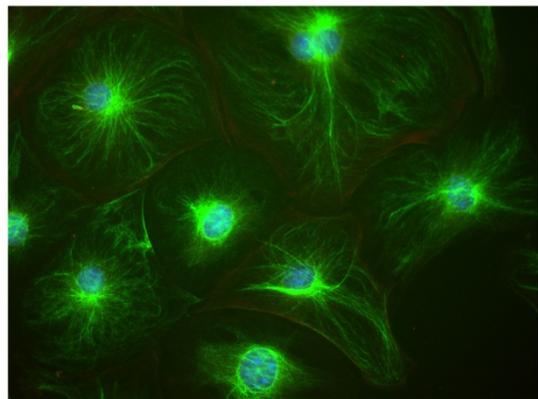
TA65 + TGF-β1



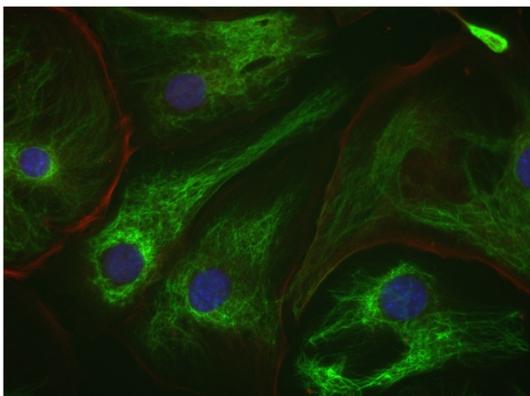
TGF-β1 + Rotenon



TGF-β1 + Oligomycin



TGF-β1 + Rotenon + TA65



TGF-β1 + Oligomycin + TA65

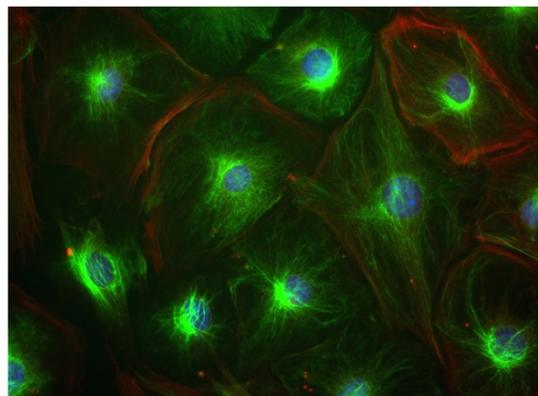


Abb. 16: TA65 ist auch in Zellen mit vermehrter Expression mitochondrialer TERT nicht in der Lage die Inhibition der mitochondrialen Atmungskette zu kompensieren. Murine kardiale Fibroblasten aus mito TERT wurden isoliert und kultiviert wie beschrieben. 48 h nach Ausbringen der Zellen wurden diese mit TGF- β 1 behandelt, 2 h später wurden sie mit Rotenon oder Oligomycin und zusätzlich mit TA65 behandelt. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen zur Färbung fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden mit direkt gekoppelten Antikörpern alpha smooth muscle Aktin (α SMA, rot) und Vimentin (grün) angefärbt, sowie die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. Dann erfolgten fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der einzelnen Behandlungen. Hier abgebildet sind repräsentative Aufnahmen der unterschiedlichen Behandlungen.

3.4 Die Lokalisation von TERT im Mitochondrium reduziert die mitochondrialen Prohibitin 1-Spiegel

Prohibitine sind Proteine, welche im Nukleus und in den Mitochondrien von Säugetier-Zellen lokalisiert sind und multiple Funktionen erfüllen. Prohibitin 1 wurde ursprünglich als antiproliferatives Protein identifiziert. Funktionseinschränkungen der Prohibitine konnten mit Alterung, proliferativen, degenerativen und metabolischen Erkrankungen assoziiert werden. Auf zellulärer Ebene führt ihr Abbau zu Proliferationsstörungen und einer verstärkten Apoptoseneigung. Nukleäre Prohibitine interagieren u.a. mit Transkriptionsfaktoren und Zellzyklus-Proteinen. In den Mitochondrien, wo Prohibitine ihre Hauptfunktionen zu haben scheinen, bilden sie Heterodimere und ringförmige Strukturen aus. Es konnte gezeigt werden, dass Prohibitine den Aufbau und die Aktivität der oxidativen Phosphorylierung, die Degradation von Komplexen der mitochondrialen Atmungskette und mitochondriale Netzwerke, Biogenese und Apoptose beeinflussen [33].

Zur genaueren Analyse der Mitochondrien im Herzen wurden durch die AG Haendeler aus Mäusen TERT wt, TERT ko und mito TERT die Herzen entnommen und deren Mitochondrien isoliert. Mittels 2D Gelelektrophorese und ESI-Qq-TOF Massenspektrometer wurden die Proteome der Mitochondrien untersucht. Bei der vergleichenden Analyse der Proteome wurde Prohibitin 1 als das Protein mit der stärksten Regulation zwischen den Genotypen identifiziert (Dr. Dyballa-Rukes, Dr. Metzger) [1].

Komplex I der mitochondrialen Atmungskette, die NADH-Dehydrogenase, ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und verfügt über einen Matrixteil und einen Membranteil, welche wiederum aus Untereinheiten aufgebaut sind. Unter normalen Umständen werden die Untereinheiten der Komplexe der mitochondrialen Atmungskette zusammengefügt und gewährleisten eine funktionsfähige oxidative Phosphorylierung. Komplex I nutzt NADH als Substrat. In Zellen, in denen Prohibitin vermehrt vorlag, ließ sich beobachten, dass die Untereinheiten für den Matrixarm der NADH-Dehydrogenase als einzelne Proteine stabilisiert wurden und daher nicht für die Assemblierung von Komplex I zur Verfügung standen. Dies führt zu einer Einschränkung der Funktion des Komplex I [69]. Gesteigerte mitochondriale Prohibitinlevel führen also zu einer Funktionseinschränkung von Komplex I.

Da Prohibitin 1 offenbar mit dem Vorhandensein und der Lokalisation von TERT in Verbindung steht, welches wiederum starken Einfluss auf die Myofibroblastendifferenzierung nimmt, wurde im Rahmen dieser Arbeit das Zusammenspiel dieser Komponenten untersucht. Es wurde die Proteinmenge der einzelnen Untereinheiten des Matrixarms und des Membranarms in den bereits beschriebenen drei Genotypen untersucht (3.2). *NDUFS3* (S3) und *NDUFV2* (V2) sind zwei Gene, welche für Untereinheiten des Matrixarms kodieren. *NDUFA9* (A9) und *NDUFB9* (B9) kodieren für Untereinheiten des Membranarms. Zunächst sollte untersucht werden, ob Prohibitin 1 auch auf RNA Ebene in den Zellen aus den drei Genotypen reguliert wurde.

3.4.1 TERT beeinflusst die Prohibitin 1 Proteinmenge in Fibroblasten

Es wurde RNA von TERT wt, TERT ko und mito TERT Zellen untersucht, um die Expression von Prohibitin 1 zu analysieren. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der RNA-Menge von Prohibitin 1 zwischen TERT wt, TERT ko und mito TERT. Also war die Expression von Prohibitin 1 in den drei untersuchten Genotypen gleich stark.

Danach wurde die Prohibitin 1 Proteinmenge im Immunoblot untersucht. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Proteinmenge von Prohibitin 1 in Fibroblasten aus TERT ko im Vergleich zu TERT wt Zellen (**Abb. 17**) [1]. Im Gegensatz dazu waren die Prohibitin 1 Mengen in mito TERT Fibroblasten signifikant erniedrigt (**Abb. 17**) [1]. Diese Ergebnisse bestätigten die Befunde aus der Massenspektrometrie und 2D Analyse.

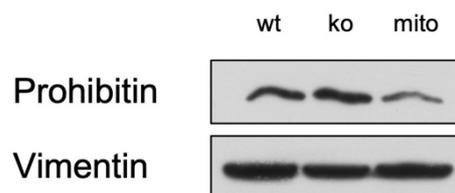


Abb. 17: Die Proteinmenge von Prohibitin ist TERT-abhängig. Murine kardiale Fibroblasten vom TERT wt, TERT ko und mito TERT wurden isoliert und kultiviert wie beschrieben. Anschließend wurden sie proteinbiochemisch aufbereitet und ein Immunoblot angefertigt. Hier gezeigt sind Aufnahmen des Immunoblots der Proteinmenge von Prohibitin im Verhältnis zu Vimentin nach Übertragung auf einen Röntgenfilm. Die proteinbiochemische Aufbereitung und der Immunoblot wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Philipp Jakobs angefertigt. Die Abbildung ist adaptiert aus Circulation, 2021 Dec 7, Ale-Agha et al [1].

3.4.2 Die Lokalisation von TERT und Prohibitin 1 wirken sich auf die Verfügbarkeit der Untereinheiten von Komplex I aus

Wie bereits erläutert, bestehen der Matrixanteil und der Membranarmanteil von Komplex I aus unterschiedlichen Untereinheiten. Repräsentativ wurden die Untereinheiten S3, V2, A9 und B9 auf ihre Proteinmengen untersucht. Da die Verhältnisse der Matrixanteile zu den Membranarmanteilen eine Aussage über die Aktivität des Komplex I darstellen [1, 69], wurden Immunoblots von allen 4 Untereinheiten durchgeführt und die Ratios von Matrix zu Membranarmanteilen gebildet. Kam es zu Verschiebungen im Angebot der einzelnen Untereinheiten veränderte sich das Verhältnis. In **Abb. 18** sind die Verhältnisse der Proteinmengen

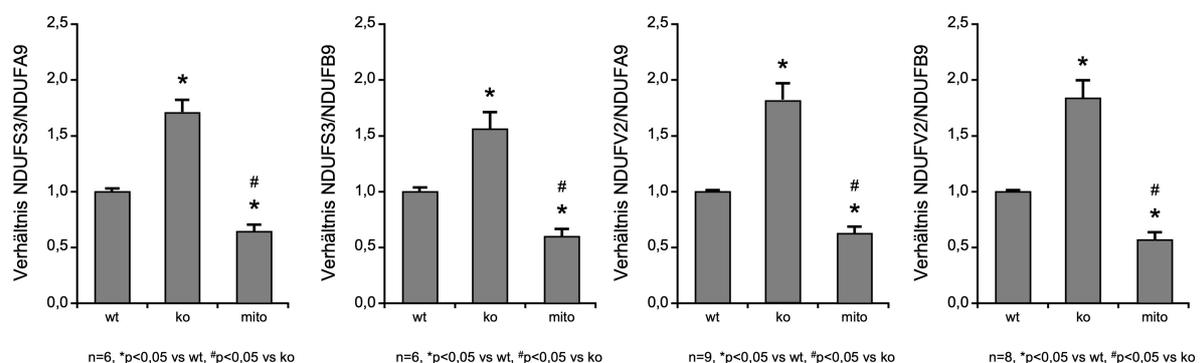


Abb. 18: Verhältnisse der Proteinmengen der Matrixanteile und Membranarmanteile der NDUF-Untereinheiten von Komplex I. Murine kardiale Fibroblasten wurden isoliert und kultiviert wie beschrieben. Die Zellen wurden ausgebracht und gehungert, jedoch nicht anderweitig behandelt. Anschließend wurden sie proteinbiochemisch aufbereitet und die Proteinlevel der einzelnen Untereinheiten NDUF-S3, -V2, -A9 und -B9 gemessen. Hier dargestellt sind die Verhältnisse der Matrixarmuntereinheiten S3 und V2 zu den Membranarmuntereinheiten A9 und B9. Jeweils der Mittelwert der TERT wt Zellen wurde zu eins gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte über eine one-way ANOVA mit post-hoc Tukey LSD test. Die proteinbiochemische Aufbereitung und Immunoblots wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Philipp Jakobs angefertigt. Die Abbildung ist adaptiert aus *Circulation*, 2021 Dec 7, Ale-Agha et al [1]. (NDUF3/NDUFA9 n=6, NDUF3/NDUFB9 n=6, NDUFV2/NDUFA9 n=9, NDUFV2/NDUFB9 n=8, *p<0,05 vs wt, #p<0,05 vs ko)

der Matrixanteile zu den Membranarmanteilen in den unterschiedlichen Genotypen abgebildet [1]. **Abb. 19** zeigt den dazugehörigen Immunoblot. Das Verhältnis von S3 und V2 zu A9 und B9 war in den TERT ko Zellen signifikant erhöht. Diese Veränderung bedeutet, dass die Matrix-Untereinheiten deutlich mehr vorhanden waren als die Membranarm-Untereinheiten. Dieses unausgeglichene Verhältnis könnte sich theoretisch darauf zurückführen lassen, dass die Matrix-Untereinheiten durch Prohibitin einzeln stabilisiert wurden, somit nicht zur Komplex-Assemblierung zur Verfügung standen. Im mito TERT war das Verhältnis in die gegensätzliche Richtung verschoben und im Vergleich zum TERT wt signifikant erniedrigt. In Verbindung mit der geringeren Menge an Prohibitin in diesem Genotyp, könnte es sein, dass hier

weniger einzelne Matrixarm-Untereinheiten extern stabilisiert wurden und somit mehr zur Komplex-Assemblierung zur Verfügung standen. Diese Ergebnisse sind vereinbar mit der These, dass durch das unterschiedliche Prohibitin 1-Angebot in den Genotypen die Assemblierung von Komplex I und somit die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette gesteuert wird [1, 69].

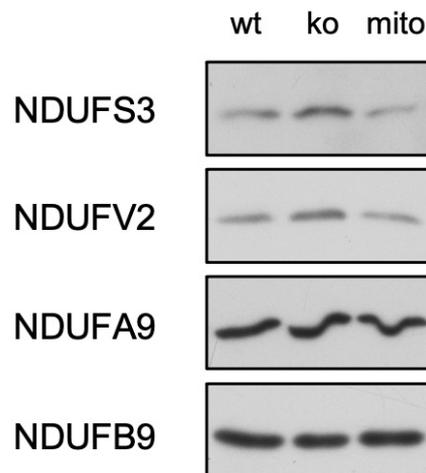


Abb. 19: Proteinmengen der NDUF-Untereinheiten von Komplex I im Immunoblot. Murine kardiale Fibroblasten TERT wt, TERT ko und mito TERT wurden isoliert und kultiviert wie beschrieben. Anschließend wurden die Proteinmengen einzelner Untereinheiten von Komplex I der mitochondrialen Atmungskette semi-quantitativ im Immunoblot nachgewiesen. NDUFS3 und NDUFV2 stellen Untereinheiten des Matrixarms dar, NDUFA9 und NDUFB9 sind Untereinheiten des Membranarms. Dargestellt sind die Immunoblots nach Übertragung auf einen Röntgenfilm. Die proteinbiochemische Aufbereitung und Immunoblots wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Philipp Jakobs angefertigt. Die Abbildung ist adaptiert aus Circulation, 2021 Dec 7, Ale-Agha et al [1].

3.5 Thioredoxin-1 beeinflusst die Redox-Homöostase der Zelle und verringert die Bildung von Stressfasern

Thioredoxin-1 (Trx-1) ist ein Protein, das aus 105 Aminosäuren besteht und eine Vielzahl von Interaktionspartnern in jeder Zelle des Körpers hat [70]. Es dient als Substrat für die Thioredoxin-1-Reduktase [71]. Trx-1 als wesentliches Reduktion/Oxidation (Redox)-regulierendes Protein schützt die Zelle nicht nur vor Radikalen und durch sie induzierte Schäden, sondern interferiert auch mit z.B. apoptotischen Signalwegen [40, 71, 72]. Trx-1 inhibiert die *apoptosis-signal regulating kinase (ASK) 1*, aktiviert Transkriptionsfaktoren und beeinflusst die Produktion von Desoxyribonukleotiden [72, 73]. Trx-1 verändert auch Zellwachstum und Zelldifferenzierung [74]. Vorherige Arbeiten der Arbeitsgruppe Haendeler konnten bereits zeigen, dass durch einen Anstieg der ROS erst Trx-1 degradiert werden muss, um die α SMA-Bildung zu induzieren [66]. Um die Fragestellung zu beantworten, ob eine Steigerung der Trx-1-Menge die α SMA-Bildung hemmt, wurden Trx-1 Lentiviren hergestellt (**Abb. 20**). Mittels lentiviraler Transduktion wurde eine dauerhaft erhöhte Expression von Trx-1 in murinen kardialen Fibroblasten aus TERT wt generiert. Dafür wurden diese Zellen mit dem Trx-1 Virus transduziert. Das so eingebrachte Trx-1 hat an seinem C-Terminus ein FLAG-Epitop (FLAG-Trx-1). Im Anschluss wurden die Zellen mit TGF- β 1 stimuliert und schließlich die Auswirkungen auf die α SMA-Proteinmenge analysiert. Zur Bestätigung des Erfolgs der Transduktion wurde die Expression von FLAG-Trx-1 auf RNA Ebene analysiert. Dazu wurde die gesamte RNA aus den Zellen isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Mittels PCR und anschließender Agarose-Gelelektrophorese wurde qualitativ nachgewiesen, dass das Transduktionsprodukt FLAG-Trx-1 in den Zellen tatsächlich exprimiert wurde. Exemplarisch dargestellt ist das Agarose-Gel in **Abb. 21**. Eine genaue Beschreibung der Vorgehensweise ist in Kapitel 2.4.4 ausführlich aufgeführt.

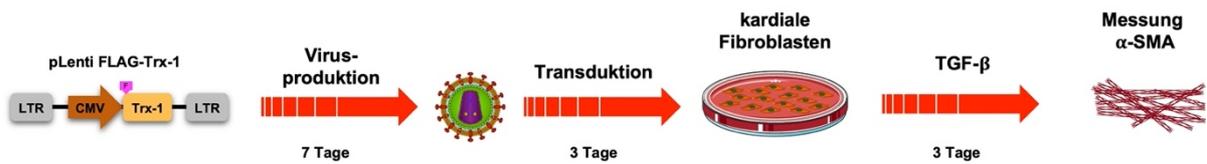


Abb. 20: Lentivirale Transduktion sorgt für vermehrte Expression von Trx-1 in kardialen Fibroblasten. Diese schematische Darstellung zeigt den zeitlichen Ablauf der lentiviralen Transduktion. Nach der Erstellung und Produktion des Virus, wurde dieser in murine kardiale Fibroblasten transduziert. Diese Zellen wurden dann mit TGF- β 1 behandelt. Schließlich wurde der Erfolg der Transduktion bestätigt und das α SMA-Proteinlevel semi-quantitativ im Immunoblot gemessen. Einzelne Bildelemente stammen von Servier Medical Art (<https://smart.servier.com>) und sind unter einer Creative Commons Attribution 3.0 Unported License für den unlimitierten, freien Gebrauch lizenziert [2].

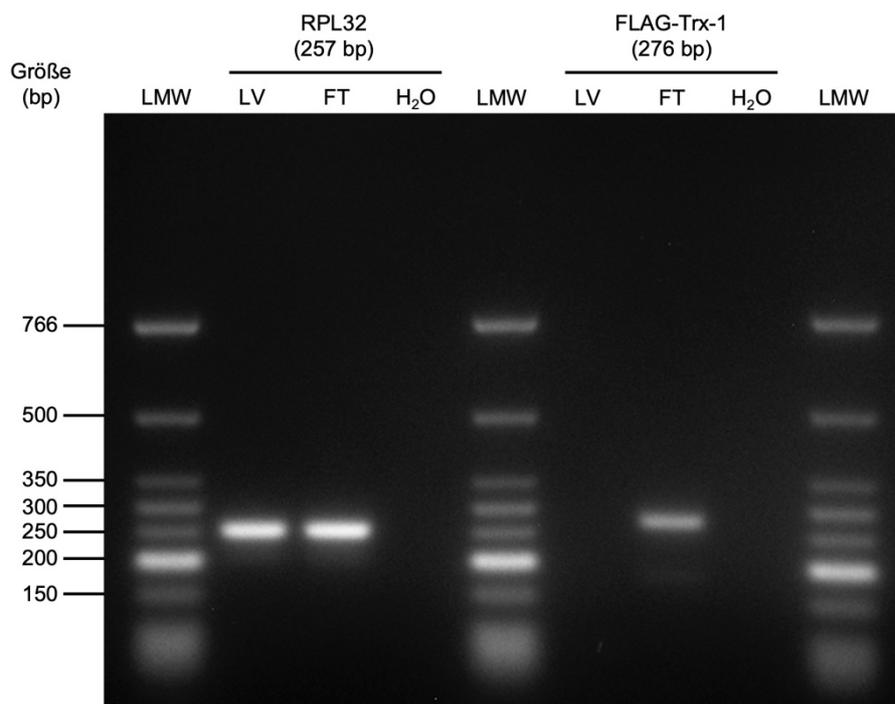


Abb. 21: Agarose Gelelektrophorese zum Nachweis des transduzierten FLAG-Trx-1. Murine kardiale Fibroblasten wurden nach lentiviraler Transduktion mit FLAG-Trx-1 oder Leervektor kultiviert und behandelt wie beschrieben. Anschließend wurde mittels PCR-Analyse die Expression des Transduktionsprodukts und RPL32 zum Vergleich überprüft. Hier dargestellt ist die Agarose-Gelelektrophorese der jeweiligen PCR-Produkte. (LMW=Low molecular weight DNA ladder, LV= Leervektor transduzierte Zellen, FT= FLAG-Tag transduzierte Zellen)

Semi-quantitative Analysen der α SMA-Proteinmenge im Immunoblot sollten Aufschluss über den Einfluss der vermehrten Trx-1-Expression auf die Myofibroblastendifferenzierung geben. Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die Trx-1-transduzierten Zellen mit Zellen verglichen, die exakt gleichbehandelt wurden, jedoch mit einem Leervektor transduziert worden waren. Auf Proteinebene konnte bestätigt werden, dass TGF- β 1 in den kardialen Fibroblasten mit Leervektor-Transduktion wie erwartet zu einer verstärkten Bildung von α SMA führte (**Abb. 22**). Im Vergleich dazu führte in den Trx-1-transduzierten Zellen die Stimulation mit TGF- β 1 nicht zu einer Hochregulation von α SMA (**Abb. 22**). Folglich hemmt eine Steigerung von Trx-1 die Bildung von α SMA-Fasern.

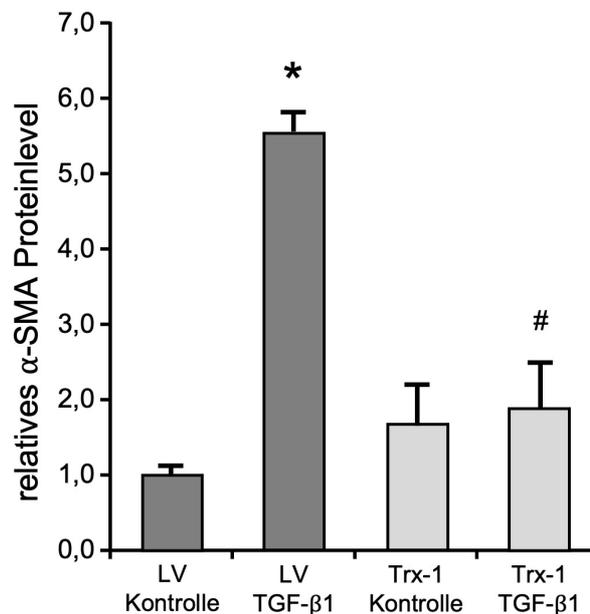


Abb. 22: Trx-1 Überexpression hemmt die α SMA-Bildung. Kardiale Fibroblasten wurden isoliert und kultiviert wie beschrieben. Eine Hälfte wurde mit dem Leervektor puro-Virus (LV) transduziert, die andere Hälfte mit dem Trx-1-Lentivirus (Trx-1). Anschließend wurden die Zellen mit TGF- β 1 behandelt. Hier dargestellt ist das relative α SMA-Proteinlevel nach proteinbiochemischer Aufbereitung und semi-quantitativer Analyse mittels Immunoblot. Die statistische Auswertung erfolgte über eine one-way ANOVA mit post-hoc Tukey LSD test. (n=4, *p<0,05 vs LV Kontrolle, #p<0,05 vs LV TGF- β 1)

4 Diskussion

Das Herz hat bereits in Ruhe eine hohe Sauerstoffextraktionsrate im Koronarsystem von 70 %. Ein höherer Bedarf an Sauerstoff kann somit nur über eine verstärkte Durchblutung ausgeglichen werden [75]. Die Energiegewinnung im Herzen nach einem Myokardinfarkt ist komplex und von vielen Faktoren abhängig. Der Abbruch der Sauerstoffversorgung bedeutet, dass die aerobe ATP-Synthese nicht stattfinden kann, welche für die Energieversorgung am effektivsten und wichtigsten ist. Sauerstoff ist elementar im finalen Schritt der aeroben Energiegewinnung, der oxidativen Phosphorylierung. Fehlt allerdings das entscheidende Molekül in diesem Prozess, akkumulieren die reduzierten Formen FADH_2 und $\text{NADH}+\text{H}^+$, wodurch die Stoffwechselwege beta-Oxidation, Glykolyse, Citratzyklus und Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex inhibiert werden. Ein Umstellen auf die anaerobe Energiegewinnung kann den Bedarf an ATP nicht langfristig abdecken, da sie wesentlich weniger effektiv arbeitet. Die Mitochondrien als wichtigste Energiequelle der Zelle haben in diesem Kontext also besondere Relevanz.

Im menschlichen Herzen sind nicht nur die Kardiomyozyten, sondern auch die Fibroblasten und Endothelzellen stark abhängig von der Aktivität der Mitochondrien. Insbesondere nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden ist die mitochondriale Aktivität von herausragender Bedeutung in Fibroblasten, welche zu Myofibroblasten differenzieren [1]. Myofibroblasten sind hauptverantwortlich für Reparaturprozesse und *extracellular matrix remodeling* in verletztem Gewebe [76]. Die Induktion der Myofibroblastendifferenzierung mittels TGF- β 1 führt zu einer Änderung des zellulären Energiehaushalts. Aktive Myofibroblasten sind bedingt kontraktile, reparieren zerstörtes Gewebe und synthetisieren und sezernieren gesteigert Proteine. Um von größtenteils inaktiven Fibroblasten in aktive Myofibroblasten zu differenzieren, ist Energie notwendig [77]. Der Anteil der Mitochondrien *mitochondrial content* steigt an, was an einem Anstieg der mitochondrialen Proteine, sowie der Expression spannungsabhängiger Kanäle und Adenin-Nukleotid-Transportern gemessen wurde. Die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette wird gesteigert, was an einem gesteigerten Sauerstoffverbrauch gemessen werden konnte [78]. Daher sind Mitochondrien von wesentlicher Bedeutung.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, spielt die Redox-Homöostase auch während der Myofibroblastendifferenzierung eine wesentliche Rolle. Eine Degradation

von Trx-1 ist Voraussetzung für die Bildung von α SMA-Fasern. Davon unabhängig ist dieses Antioxidans für die Funktionalität der Zelle jedoch von Bedeutung. Das Trx-1/Trx-1-Reduktase System schützt die Zelle vor Schäden, die durch reaktive Sauerstoffspezies induziert werden und zu malignen Entartungen führen können. Gleichzeitig weisen Analysen darauf hin, dass das System auch in einigen Tumoren eine Rolle spielt [79, 80]. Sind die Tumorzellen vermehrt oxidativem Stress ausgesetzt, konnte beobachtet werden, dass antioxidativ wirksame Proteine vermehrt produziert werden. Dieser Mechanismus wurde bisher in hepatozellulären Karzinomen, kolorektalen Tumoren, Lungentumoren, Pankreas-Karzinomen und Magenkarzinomen vermutet oder gezeigt [80]. Die Überexpression von Trx-1 korreliert mit einem vermehrten Tumorwachstum, welches entweder auf direkte Wachstumspromotion oder auf Apoptoseinhibition zurückzuführen ist. Zunehmend ist auch nachgewiesen worden, dass das Trx-1/Trx-1-System wichtig ist für das Tumorzell-Wachstum und die Tumorprogression, wie Angiogenese und Invasion im Rahmen der Metastasierung [81]. Dieses System als Angriffspunkt in der Tumorthherapie zu nutzen, liegt erstmal nahe. Da das Thioredoxin-System allerdings auch für gesunde Zellen überlebenswichtig ist, kann es nicht selbst als Angriffspunkt dienen. Die Medikamente müssten sich spezifisch gegen die Überexpression in den Tumorzellen richten, ohne den gesunden Zellen zu sehr zu schaden. Einige bereits zugelassene Zytostatika, bspw. Cisplatin, wirken auch auf das Trx-1/Trx-1-System, jedoch wird der zytostatische Effekt nicht über diesen Wirkmechanismus ausgelöst [82]. Möglicherweise sind Interaktionen mit diesem System für Effekte verantwortlich, deren Mechanismus bislang unbekannt ist. Ob das Trx-1/Trx-1-System in der Therapie von Tumoren oder anderen Erkrankungen in Zukunft eine Rolle spielen wird, bleibt äußerst fraglich, da es ubiquitär exprimiert wird und es elementar wichtig für die Redox-Homöostase und somit für das Überleben der Zelle ist.

Für die Redox-Homöostase kardialer Fibroblasten ist die Telomerase Reverse Transkriptase (TERT) ebenfalls von Bedeutung. Dieses Enzym hat seit seiner Entdeckung in der Infektiologie und Onkologie, aber auch in anderen internistischen Disziplinen wie Kardiologie an Bedeutung gewonnen. Eins der wichtigsten Erkenntnisse der vergangenen Jahre ist das Wissen um extranukleäre Aktivitäten von TERT [48, 49, 83]. Es konnte gezeigt werden, dass TERT nach der Synthese nicht nur in den Kern, sondern auch in die Mitochondrien transloziert [48, 53, 83]. Befindet sich

die Zelle in einem Zustand von erhöhtem oxidativem Stress, phosphoryliert die Src-Kinase TERT an Position Tyrosin 707, was zum Export aus dem Zellkern führt [47, 48]. Die Präsenz von TERT in den Mitochondrien steigt indessen unter diesen Bedingungen an [48, 55]. TERT interagiert mit der mitochondrialen DNA und schützt diese vor Schäden, die durch reaktive Sauerstoffspezies verursacht werden [48, 54]. Interaktionen mit der mitochondrialen Atmungskette konnten gezeigt werden, jedoch sind die genauen Prozesse noch nicht bekannt. 2009 wurde die Interaktion von TERT mit mitochondrialer DNA erstmals in Endothelzellen nachgewiesen. Die Erhöhung der mitochondrialen TERT Proteinmenge unter oxidativem Stress sorgte für eine signifikante Zunahme der Komplex I-Aktivität und eine Verbesserung des mitochondrialen Membranpotenzials [54, 55]. Dass TERT protektive Effekte im kardiovaskulären System hat, wurde auch in Kardiomyozyten und Endothelzellen nachgewiesen, wo mitochondriale TERT die Funktion der Mitochondrien verbessert, was bspw. für die Migration von Endothelzellen wesentlich ist [84]. Endothelzellmigration ist entscheidend für die Revaskularisierung von Gewebe nach Ischämie-Reperfusionsschäden [1]. Transgene Mäuse, die vermehrt TERT exprimieren zeigten ein verringertes Absterben von Kardiomyozyten [85]. Adeno-assoziierte Viren, die spezifisch Kardiomyozyten des Herzens ansteuern und dort die TERT-Expression erhöhen, führten in diesen Mäusen zu einer Verringerung der Infarktgröße, einer besseren ventrikulären Funktion und einem erhöhten Überleben [86]. Ob mitochondriale TERT oder nukleäre TERT für diese protektiven Effekte verantwortlich ist, wurde kürzlich von den Arbeitsgruppen Haendeler und Altschmied in neuen Mausmodellen, die diese Fragestellung beantworten können, untersucht. Diese neugenerierten Mausmodelle der Arbeitsgruppe Altschmied haben TERT nur im Nukleus (nucTERT) oder nur im Mitochondrium (mito TERT) auf anderweitig TERT-defizientem Hintergrund. Weitere Mäuse haben TERT überall (TERT wt) oder sind TERT-defizient (TERT ko). In diesen Mäusen wurden gezielt Ischämie-Reperfusionsschäden induziert. In den Herzen der Mäuse, welche nur über mitochondriale TERT verfügten, waren die Infarktgrößen kleiner, die Ejektionsfraktion größer, die Vaskularisierung im Randbereich des Infarkts besser und die Narbengröße kleiner im Vergleich zu TERT wt, nucTERT und TERT ko [1]. Es konnte hiermit bewiesen werden, dass die kardioprotektiven Effekte von TERT explizit auf mitochondriale TERT zurückzuführen sind. Bestätigt wurde diese Erkenntnis erstens dadurch, dass nukleäre TERT keine vergleichbaren Wirkungen hervorrufen konnte und zweitens selbst in den

TERT wt Mäusen der kardiale Zustand schlechter war als in den mito TERT Mäusen [1]. Theoretisch ließe sich einwenden, dass Mäuse vom mito TERT Genotyp generell eine verbesserte kardiale Funktion aufweisen. Um dies auszuschließen, wurden bereits vor der Induktion der Ischämie-Reperfusionsschäden das endsystolische Volumen, enddiastolische Volumen, Schlagvolumen und die Ejektionsfraktion von allen Genotypen im Vergleich gemessen. Da diese Parameter sich zwischen den Genotypen nicht unterschieden, darf davon ausgegangen werden, dass die mitochondriale TERT nach Ischämie-Reperfusionsschäden positiv wirkt [1].

Um die Anwendbarkeit dieses Wissens in der Klinik zu prüfen, wurde Gewebe aus dem rechten Herzhohr von Patient*innen untersucht, die eine *coronary artery bypass* (CABG-) Operation hatten und davor *remote ischemic preconditioning* (RIPC) erfahren haben. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte kardioprotektive Effekte von RIPC, welche anhand der Troponin-Werte bewiesen wurden [87]. Ob diese in Zusammenhang mit mitochondrialer TERT stehen, wurde mittels Proteinanalysen untersucht, welche ergaben, dass RIPC zu einer Steigerung von mitochondrialer TERT führte [1, 87]. Verfahren wie RIPC oder potentielle Pharmaka wie TA65, welche zu einer Steigerung mitochondrialer TERT führen, könnten in Zukunft von hoher klinischer Relevanz werden.

Das Molekül TA65 wird vor dem Hintergrund koronarer Herzerkrankung und *acute coronary syndrome* aktuell erforscht. Könnte man die Verfügbarkeit von TERT steigern und die Herzfunktion dadurch langfristig positiv beeinflussen, ließe sich möglicherweise die Morbidität und Mortalität des Krankheitsbildes beeinflussen. Kürzlich durchgeführte oder gegenwärtige Studien mit Menschen, denen TA65 verabreicht wird, untersuchen dieses klinische Potenzial [58, 68]. Eine tatsächliche Verlängerung der Telomere konnte bisher nicht nachgewiesen werden, jedoch wirkte sich TA65 positiv auf die Insulinsensitivität und Glukoseaufnahme aus [67]. Diese Effekte ließen sich insbesondere in nicht proliferierenden Geweben nachweisen, wozu auch das Myokard und das zentrale Nervensystem zählen. TA65 steigert die nicht nukleären Funktionen von TERT, die Insulinsensitivität nicht proliferierender Gewebe und die Aktivität von mitochondrialer TERT [1, 67, 88, 89]. Patienten könnten sowohl kurzfristig wie auch langfristig von einer Therapie mit TA65 profitieren. Einen wichtigen zu berücksichtigen Faktor stellt jedoch das Risiko für (maligne) Neoplasien dar. Tumore zählen zu den Geweben, in welchen TERT sehr häufig übermäßig exprimiert

wird. Die ersten Studien mit Proband*innen und Patient*innen wurden 2007 und in den darauf folgenden Jahren gestartet. Bislang wurden keine nachteiligen gesundheitlichen Wirkungen von TA65 beobachtet [58, 67]. Auch Mäuse, welche vermehrt über mitochondriale TERT verfügten, erschienen phänotypisch normal und es konnte keine Tendenz zu vermehrten Neoplasien beobachtet werden [1]. Über Langzeitfolgen, insbesondere Neubildungen und Kanzerogenität, lassen sich jedoch innerhalb einer so kurzen Zeitspanne noch keine tragfähigen Aussagen treffen. Eine jahrelange Begleitung der Proband*innen und Erfassung von Daten ist notwendig, um die Kanzerogenität und andere langfristige Nebenwirkungen von TA65 einschätzen zu können. Bis zum Ausschluss dieses Risikos ist die präventive Behandlung von Risikogruppen mit TA65 kritisch abzuwägen. Menschen ohne Indikation präventiv Medikamente zu verabreichen, wurde in der Vergangenheit bereits durchgeführt mit mehr oder minder schweren Folgen. Aus diesem Grund sollte auf eine primär präventive Einnahme von TA65 verzichtet werden.

Das Potenzial einer sekundär präventiven Einnahme von TA65 wurde in der 2019 begonnenen TACTIC Studie untersucht [90]. Einer Kohorte Patient*innen mit diagnostizierter koronarer Herzerkrankung, die ein *acute coronary syndrome* erlebt haben, wurde über einen Zeitraum von 12 Monaten zweimal täglich 8 mg TA65 gegeben, während die Kontrollgruppe ein Placebo-Präparat erhielt. Anschließend wurde unter anderem die Herzfunktion mittels Echokardiographie gemessen. Die Ergebnisse der Studie sind aktuell noch ausstehend, sollte das Molekül jedoch unmittelbar nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden eine hohe Effektivität zeigen, die mit einer geringen Nebenwirkungsrate einhergeht, birgt TA65 hohes therapeutisches Potenzial für zukünftige Patient*innen.

Die Betrachtung des mitochondrialen Energiestoffwechsels in Herzzellen ist von Bedeutung, da der Mechanismus der vorteilhaften Wirkung von mitochondrialer TERT noch nicht vollends ergründet ist. Die These, dass mitochondriale TERT über eine Regulation von mitochondrialem Prohibitin 1 die Assemblierung von Komplex I der Atmungskette verändert, wurde kürzlich näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ein vermehrtes Angebot von Prohibitin 1 die Balance zwischen den Untereinheiten von Komplex I stört [1]. Dadurch wird Komplex I in seiner Funktionalität eingeschränkt und es entstehen mehr reaktive Sauerstoffspezies. Vermindert mitochondriale TERT die Verfügbarkeit von Prohibitin 1, verbessert dies die Balance

der Untereinheiten von Komplex I und folglich die Komplex I-Assemblierung. Eine Verbesserung der Komplex I-Assemblierung und folglich verbesserte Energiegewinnung könnte die vorteilhaften Entwicklungen im infarzierten Ventrikel von mito TERT Mäusen erklären.

Kardiale Myofibroblasten sind im Kontext des Post-Myokardinfarkt-Geschehens und des *cardiac remodeling* generell differenziert zu betrachten. Während sie anfangs von essentieller Bedeutung für die Gewährleistung der Funktionalität des menschlichen Herzens sind, so führen sie langfristig potenziell zu negativen Auswirkungen. Das Gleichgewicht zwischen Produktion und Abbau von EZM-Proteinen ist sehr fragil und führt im verwundeten Herzen bei Abweichungen rasch zu Fibrosierung [76, 91]. Diese beeinflusst die Elastizität und symmetrische Aktivität des Ventrikels, welcher zunehmend versteift. Kardiale Fibrosierung und konsekutive Versteifung der Ventrikel verschlechtert die Belastungsfähigkeit der Patient*innen und ihre Prognose. In Zellkulturversuchen wurde die Expression von TGF- β 1 inhibiert bzw. blockiert, was zu einer dramatischen Reduktion der α SMA Fasern führte und simultan zu einer verminderten Kollagenproduktion und Fibrosierung [77]. Obwohl Myofibroblasten kurz nach dem Myokardinfarkt von essentieller Bedeutung für den Erhalt der Herzfunktion sind, bleibt weiter zu erforschen, wie sich eine Steigerung dieses Zelltyps im Menschen langfristig prognostisch auswirken würde.

Die durchgeführten Analysen zur Atmungskettenabhängigkeit der Myofibroblastendifferenzierung, während welcher mittels toxischer Substanzen Komplex I und V inhibiert wurden, dienen lediglich der Grundlagenforschung. Manipulationen an der zellulären Energiegewinnung haben eine lange Geschichte zu verzeichnen, insbesondere in Verbindung mit Fettverbrennung und Gewichtsreduktion. Toxische Stoffe wie bspw. 2,4-Dinitrophenol wurden als Mittel zur Gewichtsreduktion eingesetzt bzw. missbraucht und haben Menschen das Leben gekostet. Interventionen in mitochondriale Mechanismen zur Energiegewinnung an Lebewesen sind äußerst vorsichtig zu handhaben. Der Einsatz von Oligomycin und Rotenon in dieser Arbeit diente ausschließlich der Ergründung mitochondrialer Mechanismen und besitzt keine klinische Relevanz.

Schlussfolgerungen

Zusammenfassend ist eine funktionierende oxidative Phosphorylierung Voraussetzung für die Differenzierungsprozesse zur Induktion des Myofibroblasten. Der Einfluss von TERT auf die Myofibroblastendifferenzierung ist abhängig von der Wirkweise von TERT auf die Atmungskette. Wird die oxidative Phosphorylierung gehemmt, können kardiale Fibroblasten nicht zu Myofibroblasten differenzieren. Eine vollständig funktionsfähige mitochondriale Atmungskette ist folglich Voraussetzung für die Wundheilung im Infarktareal. Über eine post-translationale Beeinflussung der Verfügbarkeit von Prohibitin 1 verändert mitochondriale TERT das Gleichgewicht der Untereinheiten von Komplex I der Atmungskette. Liegt mehr mitochondriale TERT vor, sinkt die Verfügbarkeit von Prohibitin 1 und Komplex I funktioniert effektiver [1]. Konsekutiv steht der Zelle mehr Energie zur Verfügung. Lag mitochondriale TERT vermehrt vor, zeigte sich nach Ischämie-Reperfusionsschaden im Mausmodell eine verbesserte Herzfunktion und Wundheilung im Infarktareal [1]. Diese kardioprotektiven Effekte von mitochondrialer TERT im Menschen zu nutzen, könnte die Morbidität und Mortalität kardiovaskulärer Erkrankungen beeinflussen und stellt eine vielversprechende klinische Perspektive dar.

Ausblick

In der aktuellen klinischen Praxis erhalten Patient*innen nach Herzinfarkt mit Stent-Implantation standardmäßig eine duale Thrombozytenaggregationshemmung mittels P2Y₁₂-Inhibitor und Acetylsalicylsäure, sowie einen HMG-CoA-Reduktasehemmer. Diese Medikamente dienen insbesondere der Prävention eines erneuten kardiovaskulären Ereignisses. TA65, welches zu einer Erhöhung mitochondrialer TERT führt, wird aktuell in klinischen Studien untersucht [90]. Im Rahmen der 2019 begonnenen TACTIC Studie wurde Patient*innen nach *acute coronary syndrome* TA65 über 12 Monate verabreicht [90]. Ob die Einnahme tatsächlich die Herzfunktion der Proband*innen verbessern konnte, wird sich mit Veröffentlichung der Ergebnisse zeigen [90]. Sollte diese und andere Studien eine breite klinische Anwendbarkeit sowie gute Effektivität offenbaren, könnte TA65 zukünftig klinisch bedeutsam werden. Insbesondere die Progression extra-nukleärer Funktionen von TERT durch TA65 birgt hier protektives Potenzial. Bei vielen Patienten, die einen Herzinfarkt überlebt haben, erkranken im Laufe der Zeit ebenfalls die anderen Koronararterien, trotz guter medikamentöser Therapie. Diese große Hochrisikogruppe besser zu schützen, stellt

eine große klinische Herausforderung dar, in welcher TA65 zukünftig möglicherweise eine Rolle spielen wird.

Wundheilung und Narbenbildung im Herzen haben einen besonderen Stellenwert, da schnell eine stabile Narbe gebildet werden muss, um eine Ruptur des Ventrikels zu verhindern, das Gewebe aber nicht inhärent regenerationsfähig ist. Die Wichtigkeit der Myofibroblasten wurde in dieser Arbeit ausführlich dargelegt. Ein bisher wenig erforschter Zelltyp, der aus kardialen Fibroblasten differenziert und in Post-Myokardinfarkt Narben zu finden ist, ist der Matrifibrozyt. Untersuchungen von Molkentin et al zu den Differenzierungsstadien von Myofibroblasten in Mausherzen haben gezeigt, dass kardiale Fibroblasten bzw Myofibroblasten im infarzierten Myokard proliferieren können und drei Tage nach Myokardinfarkt ein Proliferationsmaximum erreichen [92]. Jedoch bleibt das Differenzierungsstadium des Myofibroblasten nicht langfristig bestehen, denn sieben bis zehn Tage nach Myokardinfarkt sinkt die Expression von α SMA bereits ab. Zwei Wochen und später ließ sich keine Expression von α SMA und keine Proliferation dieser Zellen mehr beobachten, ebenso wenig eine Transdifferenzierung zu Endothelzellen oder Leukozyten. Die Zellen waren jedoch weiterhin im infarzierten Areal zu finden und schienen eng mit dem Kollagenumsatz und der Narbenreifung zusammenzuhängen. Die Progression zu einem anderen Differenzierungsstadium und Zelltyp erschien am wahrscheinlichsten und um genaueres Verständnis zu erlangen und zukünftigen Forschungsbedarf aufzuzeigen, wurde umfangreiches *gene profiling* durchgeführt. 4 Wochen nach Myokardinfarkt wurde ein Genexpressionsprofil nachgewiesen, das ein einzigartiges Differenzierungsstadium repräsentierte. Am bemerkenswertesten war die Induktion von Genen, die der Entwicklung von Knochen, Bindegewebe, Knorpel und Sehnen unterliegen, bspw. *cartilage oligomeric matrix protein* (Comp) und *chondroadherin* (Chad). Auch in menschlichen Herzen konnte unter vergleichbaren Bedingungen eine Hochregulation dieser Gene in den Zellen des Narbengewebes nachgewiesen werden. Ein Abtöten dieser Zellen mittels Kryoverletzung resultierte in einer signifikant verringerten Herzfunktion zwei Wochen später. Matrifibrozyten könnten folglich funktionell wichtig sein für die Integrität und Stabilität der ausgereiften Narbe [92]. Die weitere Erforschung des Matrifibrozyten könnte somit von Relevanz für die langfristige Prognose der Patient*innen nach Myokardinfarkt sein, weshalb die

Etablierung eines *ex vivo* Modells, welches auch die weitere Differenzierung des Matrifibrozyten einschließt, von Vorteil wäre.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden im Zellkulturversuch die Wirkungen von TA65 auf murine kardiale Fibroblasten näher untersucht und im Verlauf die Frage formuliert, ob TA65 das Potenzial habe, trotz inhibierter oxidativer Phosphorylierung die Myofibroblastendifferenzierung zu verstärken (3.3.4). In immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von kardialen Fibroblasten, welche im Zellkulturversuch den entsprechenden Stimuli ausgesetzt wurden (3.3.5), zeigte sich, dass bei inhibierter oxidativer Phosphorylierung der Phänotyp des Myofibroblasten nicht ausgebildet werden kann. Wahrscheinlich kann TA65 die α SMA Faserbildung bei blockierter mitochondrialer Atmungskette nicht induzieren. Um diese mikroskopischen Beobachtungen zu verifizieren, bedarf es der semi-quantitativen Analyse des α SMA-Niveaus in den behandelten Zellen, was in Zukunft noch durchgeführt werden sollte.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Ale-Agha, N., et al., *Mitochondrial Telomerase Reverse Transcriptase Protects From Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Improving Complex I Composition and Function*. *Circulation*, 2021. **144**(23): p. 1876-1890.
2. Art, S.M., *Servier Medical Art*. smart.servier.com.
3. *Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017*. *Lancet*, 2018. **392**(10159): p. 1736-1788.
4. (Destatis), S.B., *Todesursachen nach Krankheitsarten 2017*. 2019, Statistisches Bundesamt (Destatis): <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/inhalt.html>.
5. (Destatis), S.B., *Häufigste Todesursachen 2017*. 2019, Statistisches Bundesamt (Destatis): <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/inhalt.html>.
6. Gajarsa, J.J. and R.A. Kloner, *Left ventricular remodeling in the post-infarction heart: a review of cellular, molecular mechanisms, and therapeutic modalities*. *Heart Fail Rev*, 2011. **16**(1): p. 13-21.
7. Cohn, J.N., R. Ferrari, and N. Sharpe, *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*, 2000. **35**(3): p. 569-82.
8. Lehnart, S.E., L.S. Maier, and G. Hasenfuss, *Abnormalities of calcium metabolism and myocardial contractility depression in the failing heart*. *Heart Fail Rev*, 2009. **14**(4): p. 213-24.
9. Miyata, S., et al., *Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart*. *Circ Res*, 2000. **86**(4): p. 386-90.
10. White, H.D., et al., *Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction*. *Circulation*, 1987. **76**(1): p. 44-51.
11. Ponikowski, P., et al., *2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. *European Heart Journal*, 2016. **37**(27): p. 2129-2200.
12. Dargie, H.J., *Effect of carvedilol on outcome after myocardial infarction in patients with left-ventricular dysfunction: the CAPRICORN randomised trial*. *Lancet*, 2001. **357**(9266): p. 1385-90.
13. Souders, C.A., S.L. Bowers, and T.A. Baudino, *Cardiac fibroblast: the renaissance cell*. *Circ Res*, 2009. **105**(12): p. 1164-76.
14. van Putten, S., Y. Shafieyan, and B. Hinz, *Mechanical control of cardiac myofibroblasts*. *J Mol Cell Cardiol*, 2016. **93**: p. 133-42.
15. van den Borne, S.W., et al., *Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts*. *Nat Rev Cardiol*, 2010. **7**(1): p. 30-7.
16. Gabbiani, et al., *Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction*. *Experientia*, 1971. **27**(5): p. 549-550.
17. Darby, I., O. Skalli, and G. Gabbiani, *Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing*. *Lab Invest*, 1990. **63**(1): p. 21-9.

18. Serini, G. and G. Gabbiani, *Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation*. Exp Cell Res, 1999. **250**(2): p. 273-83.
19. Powell, D.W., et al., *Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease*. Am J Physiol, 1999. **277**(1): p. C1-9.
20. Camelliti, P., T.K. Borg, and P. Kohl, *Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts*. Cardiovasc Res, 2005. **65**(1): p. 40-51.
21. Porter, K.E. and N.A. Turner, *Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling*. Pharmacol Ther, 2009. **123**(2): p. 255-78.
22. Gabbiani, G., et al., *Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function*. J Exp Med, 1972. **135**(4): p. 719-34.
23. Willems, I.E., et al., *The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars*. Am J Pathol, 1994. **145**(4): p. 868-75.
24. Schocken, D.D., et al., *Prevention of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association Councils on Epidemiology and Prevention, Clinical Cardiology, Cardiovascular Nursing, and High Blood Pressure Research; Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group; and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Group*. Circulation, 2008. **117**(19): p. 2544-65.
25. Opie, L.H., et al., *Controversies in ventricular remodelling*. Lancet, 2006. **367**(9507): p. 356-67.
26. Sack, M.N., et al., *Basic Biology of Oxidative Stress and the Cardiovascular System: Part 1 of a 3-Part Series*. J Am Coll Cardiol, 2017. **70**(2): p. 196-211.
27. Joachim Rassow, R.N., Karin Hauser, *Duale Reihe Biochemie*. Vol. 4. Auflage. 2016: Thieme.
28. Thuaud, F., et al., *Prohibitin ligands in cell death and survival: mode of action and therapeutic potential*. Chem Biol, 2013. **20**(3): p. 316-31.
29. Bavelloni, A., et al., *Prohibitin 2: At a communications crossroads*. IUBMB Life, 2015. **67**(4): p. 239-54.
30. Tatsuta, T., K. Model, and T. Langer, *Formation of membrane-bound ring complexes by prohibitins in mitochondria*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(1): p. 248-59.
31. Papa, S., et al., *The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria*. Adv Exp Med Biol, 2012. **942**: p. 3-37.
32. Estaquier, J., et al., *The mitochondrial pathways of apoptosis*. Adv Exp Med Biol, 2012. **942**: p. 157-83.
33. Signorile, A., et al., *Prohibitins: A Critical Role in Mitochondrial Functions and Implication in Diseases*. Cells, 2019. **8**(1).
34. Bourges, I., et al., *Structural organization of mitochondrial human complex I: role of the ND4 and ND5 mitochondria-encoded subunits and interaction with prohibitin*. Biochem J, 2004. **383**(Pt. 3): p. 491-9.
35. Steglich, G., W. Neupert, and T. Langer, *Prohibitins regulate membrane protein degradation by the m-AAA protease in mitochondria*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(5): p. 3435-42.
36. Vogel, R.O., et al., *Identification of mitochondrial complex I assembly intermediates by tracing tagged NDUF53 demonstrates the entry point of mitochondrial subunits*. J Biol Chem, 2007. **282**(10): p. 7582-90.
37. Suhane, S., et al., *Mitochondrial NDUF53 regulates the ROS-mediated onset of metabolic switch in transformed cells*. Biol Open, 2013. **2**(3): p. 295-305.
38. Haendeler, J., et al., *Cathepsin D and H₂O₂ stimulate degradation of thioredoxin-1: implication for endothelial cell apoptosis*. J Biol Chem, 2005. **280**(52): p. 42945-51.

39. Haendeler, J., et al., *Low doses of reactive oxygen species protect endothelial cells from apoptosis by increasing thioredoxin-1 expression*. FEBS Lett, 2004. **577**(3): p. 427-33.
40. Nordberg, J. and E.S. Arnér, *Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system*. Free Radic Biol Med, 2001. **31**(11): p. 1287-312.
41. Wei, S.J., et al., *Thioredoxin nuclear translocation and interaction with redox factor-1 activates the activator protein-1 transcription factor in response to ionizing radiation*. Cancer Res, 2000. **60**(23): p. 6688-95.
42. Lu, J. and A. Holmgren, *The thioredoxin antioxidant system*. Free Radic Biol Med, 2014. **66**: p. 75-87.
43. Zimmerman, B.J. and D.N. Granger, *Mechanisms of reperfusion injury*. Am J Med Sci, 1994. **307**(4): p. 284-92.
44. Ait-Aissa, K., et al., *Friend or foe? Telomerase as a pharmacological target in cancer and cardiovascular disease*. Pharmacol Res, 2016. **111**: p. 422-433.
45. Yang, C., et al., *A key role for telomerase reverse transcriptase unit in modulating human embryonic stem cell proliferation, cell cycle dynamics, and in vitro differentiation*. Stem Cells, 2008. **26**(4): p. 850-63.
46. Shay, J.W. and W.E. Wright, *Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase*. Carcinogenesis, 2005. **26**(5): p. 867-74.
47. Büchner, N., et al., *Well-known signaling proteins exert new functions in the nucleus and mitochondria*. Antioxid Redox Signal, 2010. **13**(4): p. 551-8.
48. Rosen, J., et al., *Non-canonical functions of Telomerase Reverse Transcriptase - Impact on redox homeostasis*. Redox Biol, 2020. **34**: p. 101543.
49. Haendeler, J., et al., *Regulation of telomerase activity and anti-apoptotic function by protein-protein interaction and phosphorylation*. FEBS Lett, 2003. **536**(1-3): p. 180-6.
50. Richardson, G.D., et al., *Telomerase expression in the mammalian heart*. Faseb j, 2012. **26**(12): p. 4832-40.
51. Borges, A. and C.C. Liew, *Telomerase activity during cardiac development*. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(10): p. 2717-24.
52. Beyer, A.M. and L.E. Norwood Toro, *Telomerase: Location, Location, Location?* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2018. **38**(6): p. 1247-1249.
53. Gordon, D.M. and J.H. Santos, *The emerging role of telomerase reverse transcriptase in mitochondrial DNA metabolism*. J Nucleic Acids, 2010. **2010**.
54. Haendeler, J., et al., *Mitochondrial telomerase reverse transcriptase binds to and protects mitochondrial DNA and function from damage*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(6): p. 929-35.
55. Ahmed, S., et al., *Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 7): p. 1046-53.
56. Harley, C.B., et al., *A natural product telomerase activator as part of a health maintenance program*. Rejuvenation Res, 2011. **14**(1): p. 45-56.
57. Bernardes de Jesus, B., et al., *The telomerase activator TA-65 elongates short telomeres and increases health span of adult/old mice without increasing cancer incidence*. Aging Cell, 2011. **10**(4): p. 604-21.
58. Salvador, L., et al., *A Natural Product Telomerase Activator Lengthens Telomeres in Humans: A Randomized, Double Blind, and Placebo Controlled Study*. Rejuvenation Res, 2016. **19**(6): p. 478-484.

59. Tsoukalas, D., et al., *Discovery of potent telomerase activators: Unfolding new therapeutic and anti-aging perspectives*. Mol Med Rep, 2019. **20**(4): p. 3701-3708.
60. RNeasy® Mini Handbook, QIAGEN, Editor. 2019: www.qiagen.com. p. 27-34.
61. Scientific, T.F., *T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers 260/280 and 260/230 Ratios*, in *NanoDrop products*, T.F. Scientific, Editor. 2020: Thermo Fisher Webpage.
62. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
63. (NCBI), N.C.f.B.I. *Primer-BLAST*. 2020 [cited 2019; A tool for finding specific primers]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.
64. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
65. Faul, F., et al., *G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences*. Behav Res Methods, 2007. **39**(2): p. 175-91.
66. Zurek, M.M., *Regulation der kardialen Myofibroblastendifferenzierung - Rolle von Thioredoxin-1*, in *Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik*. 2019, Heinrich Heine Universität.
67. Harley, C.B., et al., *A natural product telomerase activator as part of a health maintenance program: metabolic and cardiovascular response*. Rejuvenation Res, 2013. **16**(5): p. 386-95.
68. Heiss, C., I. Spyridopoulos, and J. Haendeler, *Interventions to slow cardiovascular aging: Dietary restriction, drugs and novel molecules*. Exp Gerontol, 2018. **109**: p. 108-118.
69. Miwa, S., et al., *Low abundance of the matrix arm of complex I in mitochondria predicts longevity in mice*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3837.
70. GeneCards®. THE HUMAN GENE DATABASE [cited 2021; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TXN>].
71. Schallreuter, K.U. and J.M. Wood, *The role of thioredoxin reductase in the reduction of free radicals at the surface of the epidermis*. Biochem Biophys Res Commun, 1986. **136**(2): p. 630-7.
72. Saitoh, M., et al., *Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1*. Embo j, 1998. **17**(9): p. 2596-606.
73. Holmgren, A., *Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems*. Antioxid Redox Signal, 2000. **2**(4): p. 811-20.
74. Zschauer, T.C., et al., *Interacting with thioredoxin-1--disease or no disease?* Antioxid Redox Signal, 2013. **18**(9): p. 1053-62.
75. Behrends, J., et al., *Duale Reihe Physiologie*. Duale Reihe Physiologie, 2021.
76. Baum, J. and H.S. Duffy, *Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about?* J Cardiovasc Pharmacol, 2011. **57**(4): p. 376-9.
77. Tomasek, J.J., et al., *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(5): p. 349-63.
78. Negmadjanov, U., et al., *TGF-β1-mediated differentiation of fibroblasts is associated with increased mitochondrial content and cellular respiration*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0123046.
79. Karlenius, T.C. and K.F. Tonissen, *Thioredoxin and Cancer: A Role for Thioredoxin in all States of Tumor Oxygenation*. Cancers (Basel), 2010. **2**(2): p. 209-32.

80. Kawahara, N., et al., *Enhanced coexpression of thioredoxin and high mobility group protein 1 genes in human hepatocellular carcinoma and the possible association with decreased sensitivity to cisplatin*. *Cancer Res*, 1996. **56**(23): p. 5330-3.
81. Mohammadi, F., et al., *The thioredoxin system and cancer therapy: a review*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2019. **84**(5): p. 925-935.
82. Tonissen, K.F. and G. Di Trapani, *Thioredoxin system inhibitors as mediators of apoptosis for cancer therapy*. *Mol Nutr Food Res*, 2009. **53**(1): p. 87-103.
83. Santos, J.H., J.N. Meyer, and B. Van Houten, *Mitochondrial localization of telomerase as a determinant for hydrogen peroxide-induced mitochondrial DNA damage and apoptosis*. *Hum Mol Genet*, 2006. **15**(11): p. 1757-68.
84. Spyridopoulos, I., et al., *Caffeine enhances endothelial repair by an AMPK-dependent mechanism*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(11): p. 1967-74.
85. Oh, H., et al., *Telomerase reverse transcriptase promotes cardiac muscle cell proliferation, hypertrophy, and survival*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(18): p. 10308-13.
86. Bär, C., et al., *Telomerase expression confers cardioprotection in the adult mouse heart after acute myocardial infarction*. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 5863.
87. Kleinbongard, P., et al., *Mitochondrial and Contractile Function of Human Right Atrial Tissue in Response to Remote Ischemic Conditioning*. *J Am Heart Assoc*, 2018. **7**(15): p. e009540.
88. Molgora, B., et al., *Functional assessment of pharmacological telomerase activators in human T cells*. *Cells*, 2013. **2**(1): p. 57-66.
89. Fernandez, M.L., et al., *TA-65, A Telomerase Activator improves Cardiovascular Markers in Patients with Metabolic Syndrome*. *Curr Pharm Des*, 2018. **24**(17): p. 1905-1911.
90. Maier, R., et al., *Telomerase Activation to Reverse Immunosenescence in Elderly Patients With Acute Coronary Syndrome: Protocol for a Randomized Pilot Trial*. *JMIR Res Protoc*, 2020. **9**(9): p. e19456.
91. Rohani, M.G. and W.C. Parks, *Matrix remodeling by MMPs during wound repair*. *Matrix Biol*, 2015. **44-46**: p. 113-21.
92. Fu, X., et al., *Specialized fibroblast differentiated states underlie scar formation in the infarcted mouse heart*. *J Clin Invest*, 2018. **128**(5): p. 2127-2143.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei dieser Forschungsarbeit unterstützt haben.

Bei Prof. Dr. Jojo Haendeler und Prof. Dr. Yogi Altschmied möchte ich mich herzlich bedanken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben haben, diese spannenden Themen zu untersuchen und für die ausgesprochen gute Betreuung.

Der gesamten Arbeitsgruppe (Philipp, Nilo, Fee, Olaf, Flo, Kirsten, Kathrin, Nadine, Jan, Fiona, Dennis und Pia) möchte ich herzlich danken für die tolle Unterstützung und Hilfe im Labor sowie während der Anfertigung dieser Arbeit. Insbesondere für viel Spaß und Freude während der Promotionszeit möchte ich der ganzen AG danken.

Ohne meine Familie (Anja, Michael und Felix) und Freunde wäre es nie so weit gekommen, weshalb ihnen mein besonderer Dank gilt.