

Aus dem
Institut für Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jens W. Fischer

**Untersuchung des Einflusses von CEMIP
(Cell migration-inducing and hyaluronan-binding protein)
auf die kardiale Fibroblasten-Antwort
nach akutem Myokardinfarkt**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Theresa Hube
aus Düsseldorf

Düsseldorf, Juli 2024

Aus dem Institut für Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jens W. Fischer

Gedruckt mit der Genehmigung der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

Prof. Dr. rer. nat. Jens W. Fischer

Prof. Dr. rer. nat. Jörg Breitzkreutz

Tag der mündlichen Prüfung: 01.10.2024

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Akuter Myokardinfarkt als Todesursache in Deutschland und weltweit	1
1.2 Der Myokardinfarkt.....	1
1.3 Fibroblasten Antwort nach Myokardinfarkt.....	12
1.4 Endoplasmatisches Retikulum (ER)	14
1.5 Unfolded protein response (UPR).....	15
1.6 ER-Stress in der Pathophysiologie des Myokardinfarktes.....	16
1.7 ER-Stressoren.....	16
1.8 Apoptose	18
1.9 Zielsetzung	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Tierhaltung und Tierversuche.....	21
2.2 Echokardiografie	24
2.3 <i>In-vitro</i> Experimente	25
2.4 <i>Cemip</i> Deletion durch 4-Hydroxytamoxifen	32
2.5 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer <i>Realtime</i> -PCR	32
2.6 Migrations-Assay.....	35
2.7 ER-Stress Experimente	36
2.8 Histologische Analysen	39
2.9 Statistik	41
3 Ergebnisse.....	42
3.1 <i>Cemip</i> mRNA Hochregulierung post kardialer Ischämie/Reperfusion	42
3.2 Validierung des <i>Cemip Knock-outs</i>	44
3.3 Einfluss verschiedener Stimulationsfaktoren auf die <i>Cemip</i> mRNA Expression in kardialen Fibroblasten	44
3.4 Versuche an <i>Cemip</i> -defizienten murinen kardialen Fibroblasten mittels siRNA	49
3.5 Genexpressionsanalyse von <i>Cemip</i> -defizienten murinen kardialen Fibroblasten unter TGF- β 1 Zugabe.....	52
3.6 ER-Stress Experimente	54
3.7 Untersuchung des Migrationsverhaltens <i>Cemip</i> -defizienter muriner kardialer Fibroblasten	61
3.8 Analyse der Narbenbildung und Herzfunktion.....	63

3.9	Echokardiografie des Herzens zur Bestimmung der Herzfunktion	67
3.10	Untersuchung der postischämischen Gewebeumbildung	69
4	Diskussion	70
4.1	Hyaluronsäure im akuten Myokardinfarktgeschehen	71
4.2	<i>Cemip</i> mRNA Expression nach TGF- β 1 Stimulation.....	72
4.3	Myofibroblasten Phänotyp in <i>Cemip</i> defizienten kardialen Fibroblasten nach TGF- β 1 Stimulation	73
4.4	<i>Cemip</i> mRNA Expression unter Thapsigargin Behandlung.....	75
4.5	Einfluss von Thapsigargin auf <i>Cemip</i> -defiziente kardiale Fibroblasten	75
4.6	<i>Cemip</i> Deletion führt zu erhöhter Apoptoserate in kardialen Fibroblasten unter ER-Stress.....	76
4.7	<i>Cemip</i> Deletion führt zu verstärkter Migration in kardialen Fibroblasten <i>ex-vivo</i> ...	77
4.8	Verschlechterte Herzfunktion in <i>Cemip</i> defizienten Mäusen post I/R.....	78
4.9	Vergrößerte Narbengröße in <i>Cemip</i> -defizienten Mäusen 21 d post MI	79
4.10	Limitierung und Ausblick	81
5	Zusammenfassung.....	83
6	Summary.....	84
7	Abbildungsverzeichnis	85
8	Tabellenverzeichnis	87
9	Literaturverzeichnis	88
10	Poster Präsentationen	101

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
ACE	<i>Angiotensin-converting enzyme</i>
ACTA2	Actin alpha 2
ADP	Adenosindiphosphat
ATF6	<i>Activating transcription factor 6</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
α -SMA	<i>α-smooth muscle actin</i> , α glattes Muskelaktin
ATP	Adenosintriphosphat
BCL 2	<i>B-cell-lymphoma-2</i>
BiP	<i>Binding immunoglobulin protein</i>
BMP-7	<i>Bone morphogenetic protein 7</i>
CCL	CC-Motiv-Chemokinligand
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CEMP	<i>Cell migration-inducing and hyaluronan-binding protein</i>
CTHRC1	<i>Collagen triple helix repeat-containing protein 1</i>
cTn	Kardiales Troponin
d	Tag
Da	Dalton
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i> , Zerstörungssassoziierte molekulare Muster
DAPT	<i>Dual Antiplatelet Therapy</i> , Duale Plättchen Therapie
DGK	Deutsche Gesellschaft für Kardiologie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DPBS	<i>Dulbeccos Phosphate buffered saline</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	Enddiastolisches Volumen
EKG	Elektrokardiogramm
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation
ESV	Endsystolisches Volumen
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	<i>Fluorescence activated cell scanning</i> , Durchflusszytometrie
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> , fetales Kälberserum
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GRP 78	<i>Glucose-Regulated Protein 78</i>
h	Stunde
HA	<i>Hyaluronan</i> , Hyaluronsäure

HBSS	<i>Hanks balanced salt</i>
HF	Herzinsuffizienz
HSP	Hitzeschockprotein
HYBID	<i>Hyaluronan Binding Protein Involved in Hyaluronan Depolymerization</i>
I/R	Ischämie/Reperfusion
IL	Interleukin
IRE	Inositol-requiring enzyme
Kg	Kilogramm
KO	<i>Knockout</i>
LAD	<i>Left anterior descending artery</i> , linke vordere absteigende Arterie
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
LDL	Low Density Lipoprotein
LMW	Low-molecular-weight
LV	<i>Left ventricle</i> , linker Ventrikel
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
mg	Milligramm
MI	Myokardinfarkt
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	<i>Messenger Ribonukleinsäure</i>
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
Nm	Nanometer
NSTEMI	<i>Non-ST-segment elevation myocardial infarction</i> , Nicht-ST-Hebungs-Infarkt
PbH	Parallel beta-helix
PCI	Perkutane Koronarintervention
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PERK	Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase
POSTN	Periostin
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> , Quantitative Polymerasenkettenreaktion
PS	Penicillin-Streptomycin
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
S	Sekunde
SD	<i>Standard deviation</i> , Standardabweichung
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
STEMI	<i>ST-segment elevation myocardial infarction</i> , ST-Hebungs-Infarkt
TGFβ	<i>Transforming growth factor β</i> , transformierender Wachstumsfaktor β
TLR	<i>Toll-like receptor</i> , toll-ähnlicher Rezeptor
TNFα	Tumornekrosefaktor α
U	<i>Unit</i> , Einheit

UPR	<i>Unfolded protein response</i>
µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar
w	Wochen
WH	<i>whole heart</i> , ganzes Herz
WT	Wildtyp
XBP1	<i>X-box binding protein</i>
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

1 Einleitung

1.1 Akuter Myokardinfarkt als Todesursache in Deutschland und weltweit

Laut statistischem Bundesamt liegt der akute Myokardinfarkt (MI) auf Platz vier der häufigsten Todesursachen in Deutschland mit insgesamt 46.608 Fällen im Jahr 2022. (1)

Insgesamt nehmen Krankheiten des Herzkreislaufsystems mit 358.218 Fällen 2022 und damit 33,6 % weiterhin den größten Anteil an Todesursachen in Deutschland ein. In die Gruppe der Herz-Kreislaferkrankungen fallen dabei die chronisch ischämische Herzkrankheit mit 77.773 Fällen (21,7 %), der akute MI (13,0 %), gefolgt von der Herzinsuffizienz mit 37.570 Fällen (10,5 %) welche unter anderem als eine Folge des MIs auftritt. (2)

Zu den Risikofaktoren für das Entstehen von Herz-Kreislauf-Erkrankungen gehören sowohl die Hypertonie sowie weitere kardiometabolische Risiken wie Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus Typ 2, Adipositas, als auch ein inaktiver Lebensstil, Rauchen, hohes Alter, Stress und genetische Prädisposition. (3) Viele dieser Risikofaktoren wurden in den letzten Jahrzehnten durch einen fortschreitenden westlichen Lebensstil verstärkt. Die medizinische Behandlung vor allem von Folgeschäden ischämischer Herzkrankheiten bleibt bis heute problematisch, eine kausale Therapie ist meist unmöglich, so dass häufig nur symptomatisch behandelt werden kann.

1.2 Der Myokardinfarkt

Der MI bezeichnet eine akute Myokardschädigung durch eine Unterversorgung des Herzens mit Sauerstoff und Nährstoffen auf Grund einer Ischämie. (4)

Klinisch muss der akute MI von anderen Krankheitsbildern wie beispielsweise Koronarspasmus, Koronare Embolie, Myokarditis oder Kardiomyopathie abgegrenzt werden. Die von der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) herausgegebene Definition lautet: „Die klinische Definition des MI bezeichnet das Vorliegen einer akuten Myokardschädigung, gekennzeichnet durch abnorme kardiale Biomarker in Zusammenhang mit Hinweisen auf akute Myokard-Ischämie“. (4)

Am häufigsten ist der MI vom Typ 1.

Beim MI vom Typ 1 liegt die Ursache in einer Ruptur oder Erosion eines atherosklerotischen Plaques. Atherosklerose bezeichnet die krankhafte Einlagerung von Cholesterin und seinen Estern (vorwiegend LDL), sowie anderen Fetten in die Intima arterieller Blutgefäße. Die Atherosklerose tritt vor allem an den Herzkranzgefäßen, an der Aufzweigung der Halsschlagader, aber auch den großen Beinarterien auf. Es handelt sich hierbei um ein chronisch entzündliches Krankheitsgeschehen mit progredientem Verlauf. (5)

Beim möglichen Einreißen (Ruptur) atherosklerotischer Plaques kommt es dann zu einer Aktivierung der Gerinnungskaskade und einer lokalen Thrombozytenaktivierung, welche zu einer Thrombusbildung im betroffenen Gefäß führt, nachfolgend wird das Gefäß oder bei Ablösung eine weiter distal gelegene Arterie verschlossen. Aus dem geschilderten Geschehen resultieren dann je nach Lokalisation medizinische Notfälle wie Herzinfarkt oder auch Apoplex. (6) Die Symptomatik des MIs zeichnet sich durch einen plötzlich auftretenden, starken Schmerz im Brustbereich aus, der Schmerz strahlt vorwiegend linksseitig aus und kann sich patientenindividuell bis in die Schultern, Arme, den Unterkiefer, den Rücken und Oberbauch ausdehnen. (7) Die lebensbedrohliche Situation wird oft begleitet von Schweißausbrüchen, als auch Übelkeit und Erbrechen. (8) Klinisch zeigt sich der MI neben der Symptomatik in einem Nachweis von kardialen Troponin (cTn) im Plasma, welches ebenfalls Aussagen über das Ausmaß des Infarktes und dessen Prognose zulässt. (9) (10) Kardiales Troponin wird in Kardiomyozyten gebildet und bei einer Herzmuskel-Verletzung in das Blut abgegeben. cTn tritt in drei Unterformen auf: cTn T, cTn C und cTn I. cTn I kommt dabei allein im Myokard und nicht im Skelettmuskel vor, was es zum aussagekräftigsten Marker macht. Zur Diagnostik des MIs werden außerdem weitere Parameter wie Q-Wellen Abnormalitäten oder abweichend Herzwandbewegungen herangezogen. EKG-Veränderungen werden zusätzlich hinzugezogen um eine Unterscheidung von STEMI (*ST-elevation myocardial infarction*) beziehungsweise NSTEMI (*Non-ST-elevation myocardial infarction*) machen zu können. (11) Die Akuttherapie des MIs besteht in einer Gefäßeröffnung mittels perkutaner Koronarintervention (PCI) und einer antithrombotischen Therapie zur Verhinderung weiterer Gefäßverschlüsse. Patienten, die einer primären PCI unterzogen werden, sollten gleichzeitig eine *Dual Antiplatelet Therapy*, kurz DAPT, erhalten, welche sich aus einer Kombination von Aspirin und einem P2Y₁₂-Hemmer zusammensetzt, sowie ein parenterales Antikoagulans wie beispielsweise unfractioniertes Heparin. (11) Zudem sollte eine Schmerztherapie mit beispielsweise Morphin oder Piritramid intravenös erfolgen. Glyceroltrinitrat kann mit 0,4-0,8 mg per oral

als Spray oder Zerbeißkapsel sowie 2-6 mg/kgKG/h intravenös gegeben werden. Es kommen außerdem β -Blocker wie beispielsweise Metoprolol, in der Regel ebenfalls intravenös, zum Einsatz. Sauerstoff ist zudem bei hypoxischen Patienten mit arterieller Sauerstoffsättigung (SaO_2) $< 90\%$ indiziert. Als Routinegabe wird Sauerstoff nicht empfohlen, solange die Sauerstoffsättigung bei dem Patienten über 90 % beträgt. Angst ist eine natürliche Reaktion auf den Schmerz und die Atemnot, welcher Patienten während eines Herzinfarktes ausgesetzt sind. Die Sympathikus-Aktivierung steigert den Sauerstoffbedarf des Herzens dadurch weiter. (12) Um den Patienten zu beruhigen sollte ein mildes Beruhigungsmittel wie ein Benzodiazepin daher immer in Betracht gezogen werden. Anschließend folgt der umgehende Transport in ein Krankenhaus mit Herzkatheterlabor, die Reperfusionstherapie erfolgt dann in der Klinik. Die Wiedereröffnung der verschlossenen Koronararterie ist dabei so schnell wie möglich durchzuführen und sollte spätestens innerhalb von 2 h nach der EKG-Diagnose erfolgen. Bei der perkutanen koronaren Intervention (PCI) wird entweder eine Ballondilatation oder eine Stenteinlage durchgeführt um das verschlossene Gefäß wieder dem Blutfluss zugänglich zu machen. Eine präklinische Thrombolyse ist dann indiziert, wenn eine PCI nicht innerhalb von 2 h möglich ist. Hierbei erfolgt die Thrombolyse mit Fibrinolytika. (13) Während die Akuttherapie des MIs mittlerweile sehr weit fortgeschritten ist, stellen die chronischen Folgen nach wie vor eine Herausforderung dar.

Bis heute gibt es kaum Therapieansätze, welche die problematischen Gewebeumbauprozesse als auch die auf einen MI potentiell folgende Herzinsuffizienz verhindern können. Um die Herzfunktion aufrecht erhalten zu können, kommt es nach dem Absterben der Kardiomyozyten zur Ausbildung von Narbengewebe, welches hauptsächlich von Fibroblasten beziehungsweise Myofibroblasten produziert wird. Dieses Gewebe verhindert das Rupturieren des Herzmuskels, ist allerdings weder in der Lage eine kontrahierende Funktion noch eine Weiterleitung von elektrischen Signalen (Reizweiterleitung) auszuüben.

Das Herz ist somit in seiner Struktur und Funktion irreversibel eingeschränkt. Die andauernde Überlastung des Herzens kann im weiteren Verlauf zu einer Hypertrophie der verbliebenen Kardiomyozyten führen, was häufig in der Folge zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz führt.

Durch die unterbrochene Erregungsweiterleitung am Narbengewebe stellen Arrhythmien eine weitere Komplikation und mögliche Folgeerscheinung des Herzinfarktes dar. (14)

Das Wissen über Umbauprozesse der kardialen Matrix stellt auf Grund dieser Folgeerscheinungen einen grundlegenden Ansatz für mögliche therapeutische Interventionen dar. Die Grundlagenforschung verbindet hier die Suche nach Angriffspunkten für mögliche Pharmaka mit der klinischen Medizin.

1.2.1 Phasen des Myokardinfarktes

Der Verlauf nach einem MI lässt sich in verschiedene übergeordnete Phasen unterteilen: (15)

1. Die inflammatorische Phase
2. Die proliferative Phase
3. Die Reifungs- /Heilungsphase

Die Regeneration des Herzens nach einem MI ergibt sich aus einer komplexen Abfolge von pathophysiologischen Prozessen. Diese wird durch eine Entzündungsreaktion und die Infiltration von Immunzellen eingeleitet. In dieser Phase werden geschädigte Zellen und extrazelluläre Matrixbestandteile phagozytiert und beseitigt. Die akute inflammatorische Phase dauert etwa ein bis zwei Tage bei Mäusen und bis zu vier Tage bei Menschen. (16)

Auf die Initiierung der inflammatorischen Phase folgt ab Tag zwei der Übergang zu proliferativen Prozessen. Eine rechtzeitige Auflösung der Entzündungsreaktion ist dann der entscheidende nächste Schritt für die Regeneration des Herzen post MI. Um eine optimale Heilung zu gewährleisten, muss hier ein Gleichgewicht erreicht werden. Eine Entzündungsphase, die zu lange anhält, da sie nach myokardialer Schädigung nicht aufgelöst wird, kann zu anhaltenden Gewebeschäden führen. Gleichzeitig ist eine anfängliche Entzündungsreaktion, sowie die Rekrutierung von Immunzellen für reparative Prozesse unerlässlich. Nach der inflammatorischen Phase setzt eine proliferative Phase ein, die von einer Aktivierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, sowie einer starken Proliferation dieser Zellen gekennzeichnet ist. Als endogener protektiver Mechanismus wird in den ersten Stunden und Tagen nach MI Hyaluronan synthetisiert. Hyaluronan spielt eine wichtige Rolle in der koordinierten Fibroblasten-, Makrophagen- und T-Zell-Antwort. (17) (18)

In der sich anschließenden Reifungs-/Heilungsphase wird diese EZM zu einer reifen Narbe umgewandelt, zudem setzt eine Neovaskularisation des Gewebes ein. (19).

1.2.2 Die inflammatorische Phase

Die Sauerstoffunterversorgung aufgrund des Verschlusses eines herzversorgenden Gefäßes führt bereits nach wenigen Sekunden zu einer Abnahme der oxidativen Phosphorylierung. Dies führt zu einem Mangel an Adenosintriphosphat (ATP). Als Reaktion darauf wird vermehrt auf die anaerobe Glykolyse zur Energieproduktion zurückgegriffen, welche den Bedarf jedoch nicht ausreichend decken kann. Infolgedessen kommt es zu einer Verringerung der kontraktilen Funktion und einer Akkumulation von Endprodukten der Glykolyse wie beispielsweise Laktat. Aus dem ATP-Mangel resultiert eine Anhäufung von Adenosindiphosphat (ADP), was die Aktivierung der Adenylatkinase und den Abbau zu Adenosinmonophosphat (AMP) zur Folge hat. Ein Großteil des unterversorgten Myokards kann nach 15 bis 20 Minuten Ischämie nicht mehr gerettet werden, da Kardiomyozyten irreversibel geschädigt wurden. (20) Rund 40 bis 60 Minuten nach Ischämie-Beginn verlangsamen sich die Stoffwechselvorgänge. Durch den hohen Laktatgehalt in den Zellen verringert sich der pH-Wert und verschiebt sich das osmotische Gleichgewicht, was zu einem Anschwellen der kardialen Zellen führt. (21) Während des Untergangs von Zellen werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Entzündungsmediatoren freigesetzt, darunter ATP, Interleukin-1 α (IL-1 α), IL-6, Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) sowie mitochondriale DNA, welche weitere Immunzellen in das geschädigte Myokard rekrutieren.

In der Frühphase nach einem MI spielt die EZM bereits eine wesentliche Rolle, da Zytokine und Chemokine in ihr gebunden werden. Die Nekrose der Kardiomyozyten initiiert eine Degradation der EZM durch Matrixmetalloproteasen (MMP), was zur Freisetzung der gebundenen Faktoren führt. Diese Faktoren beeinflussen zusammen mit den Matrixfragmenten selbst die Aktivierung der Endothelzellen. (22) Dies führt zu erhöhter Gefäßpermeabilität und dem Austritt von Plasmabestandteilen in den Extrazellulärraum. In der Region der abgestorbenen Kardiomyozyten bildet sich eine vorübergehende Matrix, um die Herzintegrität aufrechtzuerhalten. Die eingeleitete Reperfusion des ischämischen Gebiets führt zu einer erneuten Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen, birgt jedoch auch das Risiko eines Reperfusionsschadens. Dieser entsteht durch den plötzlichen Zustrom von Immunzellen und ROS.

Die Freisetzung von so genannten *Damage-associated molecular patterns* (DAMPs) zu welchen unter anderem ATP, mitochondriale DNA als auch freigesetzte RNA gehören, löst eine weitere inflammatorische Reaktionsabfolge aus. Diese vermittelt unter anderem Apoptose Reaktionen von Kardiomyozyten durch Toll-like-Rezeptoren (TLRs) und die Rekrutierung von Leukozyten in die Infarktzone. Dies führt zur Ausschüttung von Zytokinen,

mitochondrialer Dysfunktion durch eine Kalziumüberladung, einer weiteren Freisetzung von ROS, sowie zur Bildung von *NLR family pyrin domain containing 3-* (NLRP3-) Inflammasomen. (23) Inflammasome stellen große zytoplasmatische Proteinkomplexe dar. Diese vermitteln die Aktivierung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β und IL-18 aus kardialen Fibroblasten sowie die Caspase-1-abhängige Apoptose von Kardiomyozyten. Das vorrangige Zytokin, das die proinflammatorische Reaktion nach einem akuten MI vermittelt, ist Interleukin-1 (IL-1). In Experimenten konnte gezeigt werden, dass IL-1 α von geschädigten Kardiomyozyten freigesetzt wird.

IL-6 wird nach einer akuten Ischämie/Reperfusion des Myokards sowohl in proinflammatorischer als auch in entzündungshemmender Weise freigesetzt. (24) Ebenfalls zu den Zytokinen gehört die Gruppe der Chemokine, die als Reaktion auf oben genannte entzündungsfördernde Mediatoren freigesetzt werden und eine bedeutende Rolle bei der Rekrutierung von Monozyten, Neutrophilen und Lymphozyten spielen. *Monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1) gehört zu den Chemokinen welches im infarzierten Herzen rasch hochreguliert wird und als starkes *Chemoattractant* für weitere Immunzellen fungiert. (25)

Monozyten, die im Knochenmark und in der Milz entstehen, gelangen nach einem MI ins Blut und werden in zwei Phasen in das geschädigte Myokard rekrutiert. In der ersten Phase dominieren entzündliche Ly-6C^{high}-Monozyten, die etwa am dritten bis vierten Tag nach dem MI ihren Höhepunkt erreichen. Die zweite Phase wird von entzündungshemmenden Ly-6C^{low}-Monozyten dominiert, die etwa am siebten Tag nach dem MI ihren Höhepunkt erreichen. Die infiltrierenden Monozyten differenzieren sich dann zu M1-Makrophagen, die für die Entfernung von Zelltrümmern aus der Infarktzone verantwortlich sind. Anschließend initiieren, von M1-Makrophagen freigesetzte Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren wie *Transforming growth factor β* (TGF- β) die Reparaturphase, die von M2-Makrophagen dominiert wird. (26)

Die Auflösung der Entzündungsreaktion und der Übergang zur proliferativen Phasen ist im Anschluss für eine erfolgreiche Heilung nach MI und die Ausbildung einer stabilen Narbe essentiell.

1.2.3 Die proliferative Phase

Die proliferative Phase nach MI findet innerhalb von 2–7 Tagen bei Mäusen und 4–14 Tagen beim Menschen statt. (16) Nach der proinflammatorischen Reaktion eines akuten MIs ermöglicht die entzündungshemmende Reparaturphase die Auflösung der Entzündung und die Einleitung der proliferativen Phase. Es gibt mehrere Mechanismen, die an diesem Prozess beteiligt sind:

Monozyten differenzieren sich in dendritische Zellen, welche durch eine Aktivierung von CD4⁺-Leukozyten unter anderem Umbauprozessen (*Remodeling*) des Herzens post MI entgegensteuern.

Die Ausschüttung von IL-4 und IL-13 durch T-Helferzellen induziert den *Switch* zu antiinflammatorischen M2-Makrophagen (M2-Polarisation). (27) Dies führt zur Sekretion entzündungshemmender und profibrotischer Zytokine wie IL-10 und TGF- β . Diese Zytokine zeigen eine antiinflammatorische Reaktion und fördern die Gewebereparatur durch Aktivierung von kardialen Fibroblasten. Die Myofibroblasten-Transdifferenzierung gehört ebenfalls zu den kennzeichnenden Faktoren der proliferativen Phase. Myofibroblasten sind in der proliferativen Phase durch ihre proliferative Aktivität, ihre Migration durch das provisorische Matrixnetzwerk und Synthese der extrazellulären Matrix die prägendste Zellart in dieser Phase. (28) (29) Der Übergang in die proliferative Phase der Infarktheilung ist ebenfalls durch die Infiltration aktivierter Myofibroblasten in Grenzregionen des Infarktes gekennzeichnet. TGF- β wird im infarzierten Myokard exprimiert und ist entscheidend an dieser Transdifferenzierung beteiligt. Studien deuten darauf hin, dass die TGF- β 1-induzierte Myofibroblastenkonversion sowohl über den *Suppressor of mother against decapentaplegic* (Smad)-abhängigen (30) als auch über Smad-unabhängige Signalwege vermittelt werden kann. (31) Die proliferative Phase ist außerdem durch Veränderungen im extrazellulären Matrixnetzwerk gekennzeichnet. Mehrere Studien belegen, dass Myofibroblasten die Hauptquelle extrazellulärer Matrixproteine in der Heilung nach MI sind. (29) Neben großen Mengen struktureller Matrixproteine (wie Kollagene und Fibronectin), lagern sich aber auch matrizelluläre Proteine ab und modulieren den EZM Stoffwechsel durch die Expression von MMPs und ihren Inhibitoren. Die Zusammensetzung der EZM spielt zudem eine entscheidende Rolle bei der Regulierung phänotypischer Veränderungen der Fibroblasten während der proliferativen Phase. (32)

1.2.4 Die Heilungs-/Reifungsphase

Auf die proliferative Phase nach MI folgt die Reifungsphase, in welcher die EZM quervernetzt wird und sich eine reife Narbe ausbildet. Die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren geht in dieser Phase zurück, dafür findet eine Aktivierung inhibitorischer STOP-Signale zur Beendigung von TGF- β - und Angiotensin-II-Signalwegen statt. (26)

Die starke Matrixsyntheseaktivität und Proliferation der Myofibroblasten verringern sich in dieser Phase deutlich und die Myofibroblasten nehmen den so genannten Matrifibroblasten Phänotyp an. Die Fibroblasten zeigen hier eine Homöostase in ihrer EZM-Produktion, so nimmt die EZM-Produktion in der Heilungsphase deutlich ab, ist jedoch dauerhaft höher als im basalen Herzen. Da eine leicht erhöhte EZM-Produktion notwendig ist, um die Integrität der Narbe aufrechtzuerhalten. Diese Aufrechterhaltung erfordert eine konstante Rückmeldung an die Fibroblasten, welche die EZM-Produktion an die Bedürfnisse der reifenden Narbe anpassen. (32)

Das CXC-Chemokin Interferon- γ -induzierbares Protein 10 (IP)-10/CXCL10 hemmt in dieser Phase die Fibroblasten Migration durch einen Proteoglykan-vermittelten Signalweg und trägt somit zur räumlichen Eindämmung der fibrotischen Reaktion bei. (33) Das Gleichgewicht zwischen entzündlicher und reparativer Phasen hat einen signifikanten Einfluss auf die Qualität der Narbe und das *Remodeling* nach MI. Die Narbe muss ausreichend stabil sein um einen Ersatz von Kardiomyozyten im nekrotischen Bereich durch ein fibrotisches Gewebe zu gewährleisten und eine Ruptur der Ventrikelwand zu vermeiden. Gleichzeitig ist eine interstitielle Fibrose sowohl in der Infarkttrandzone als auch im umgebenden Myokard als Folge einer unvollständig aufgelösten Entzündungsreaktion eine problematische Folgeerscheinung nach MI. Fibrotische Veränderungen im Myokard können die ventrikuläre Struktur und systolisch-diastolische Funktion beeinflussen und so zu einer ischämischen Herzinsuffizienz (HF) führen. (34)

1.2.5 Cell migration–inducing protein (CEMIP)

Informationen über das Gen *Cell migration inducing protein (Cemip)* wurden erstmals 1999 mit, bis dahin noch unbekannter Funktion veröffentlicht. (35) 2003 wurde CEMIP erstmals durch Forschungsarbeiten an genetischem Material von Patienten mit erblich bedingter Taubheit in Zusammenhang gebracht. (36) Durch die Analyse komplementärer DNA (cDNA) von Genen des Innenohrs konnte erstmals bestätigt werden, dass Mutationen im *Cemip*-Gen die Ursache erblich bedingter Taubheit sein könnten. Das kodierende Gen für

CEMIP befindet sich auf Chromosom 15q25.1. Es enthält die genetische Information für ein 153-kDa-Protein mit 1.361 Aminosäuren. (37)

CEMIPs Molekülstruktur ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es konnten in den letzten Jahren allerdings die funktionellen Domänen größtenteils entschlüsselt werden. So ist bekannt, dass CEMIP in seiner Struktur ein Signalpeptid mit einer Anzahl von 30 Aminosäuren aufweist, gefolgt von einer G8-Domäne, zwei GG-Domänen, vier Parallel beta-helix (PbH1-) Domänen und sieben Glykosylierungsstellen (siehe Abbildung 1). Zudem beinhaltet es eine Sequenz, die es CEMIP möglich macht sich im ER zu verankern und eine Interaktion mit dem Hitzeschockprotein A5 (HSPA5), auch bekannt als Binding immunoglobulin protein (BiP) einzugehen. (38)

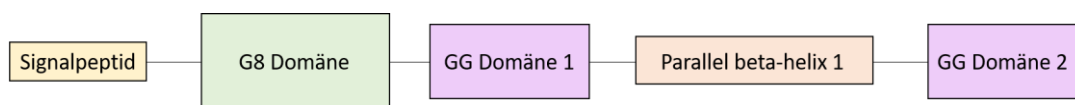


Abbildung 1: Schematische Darstellung der CEMIP Sekundärstruktur

CEMIP weist in seiner Struktur ein Signalpeptid mit einer Anzahl von 30 Aminosäuren auf. Darauf folgt eine G8-Domäne, zwei GG-Domänen, vier Parallel beta-helix (PbH1-) Domänen und sieben Glykosylierungsstellen. Darüber hinaus enthält es eine Sequenz, die es CEMIP ermöglicht, sich im endoplasmatischen Retikulum (ER) zu verankern.

Modifiziert nach Spataro et al. (39)

CEMIP, auch als KIAA1199 oder Hyaluronan-bindendes Protein (HYBID) bekannt, wurde nach seiner ursprünglichen Entdeckung in der Cochlea später ebenfalls in verschiedenen Organen, vor allem in der Haut und im Knorpel, nachgewiesen. Zusätzlich konnte sekretorisches CEMIP im Serum identifiziert werden (40) Zellulär befindet sich CEMIP vor allem am ER, was durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt werden konnte. (40) 2013 wurde festgestellt, dass CEMIP eine entscheidende Rolle bei der Migration und Invasion von Krebszellen spielt. Als Mechanismus für die durch CEMIP beobachtete erhöhte Zellmigration, wird eine Interaktion mit BiP beschrieben. Diese Interaktion führt zur Freisetzung von Kalzium aus dem ER in den Intrazellulärraum. Die Erhöhung des zytosolischen Kalziums führt dann zur Aktivierung der Proteinkinase C alpha (PKC α), was letztendlich eine verstärkte Zellmigration zur Folge hat (siehe auch Abschnitt 4.6).

Forschungsarbeiten zu CEMIP haben sich in den letzten Jahren vor allem auf Krebszellen und Tumor-Modelle konzentriert. Hier spielt CEMIP eine entscheidende Rolle bei der Proliferation und Metastasierung verschiedener Krebsarten. Die Expression von CEMIP kann aber auch durch andere Erkrankungen wie Infektionen oder verschiedene inflammatorische Prozesse beeinflusst werden. Derzeit laufen klinische Studien mit

Medikamenten, die auf einem antikörpervermitteltes anti-CEMIP Funktionsprinzip beruhen um das Tumorwachstum oder die Metastasierung zu supprimieren. Doch obwohl die entscheidende Rolle von CEMIP bei der Förderung der Tumormigration und -invasion bekannt ist, bleibt der genaue molekulare Mechanismus noch unklar. Forschungsarbeiten zu CEMIP in nicht-neoplastischen Erkrankungen, einschließlich Infektionen, Fibrose und der Aktivierung von Immunzellen, insbesondere bei entzündlicher Osteoarthritis (OA), rückten in den letzten Jahren ebenfalls zunehmend in den Fokus. Es wurden außerdem die Regulationsmechanismen von CEMIP untersucht. (36)

Namensgebend für CEMIP ist die Fähigkeit zur Hyaluronsäure (HA) Depolymerisation. CEMIP spaltet HA indem es das Makromolekül durch eine Hydrolyse der 1->4 Bindung zwischen N-Acetyl-beta-D-Glucosamin und D-Glukuronsäure in Molekülketten einer durchschnittlichen Masse von 17.9 kDa abbaut. (41) Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass ein *Knockout* der bekannten Hyaluronidasen den HA Abbau nicht vollständig zum Erliegen bringen kann, woraufhin CEMIP als eins der verantwortlichen Enzyme der HA Depolymerisation identifiziert werden konnte. Das Protein wird in verschiedenen Fibroblastensubtypen exprimiert und ist an unterschiedlichen Krankheitsgeschehen beteiligt. (42) Studien haben gezeigt, dass CEMIP im infarzierten Herzen vor allem von aktivierten Fibroblasten (Myofibroblasten) exprimiert wird, die *Cemip* Genexpression als auch Protein Expression liegt dabei signifikant über der von ruhenden Fibroblasten. (43)

Die genaue Rolle von CEMIP in der Pathophysiologie des MIs und sein Potenzial als therapeutisches Ziel sind bis heute jedoch weitgehend unerforscht.

1.2.6 Fibroblasten

Fibroblasten stellen einen Zelltyp dar, der seinen Ursprung im mesenchymalen Gewebe hat und nahezu in allen Geweben und Organen vorkommt. Sie wurden erstmals 1858 von Rudolf Virchow entdeckt, welcher sie als "Spindelzelle des Bindegewebes" bezeichnete. (44) Ihre Hauptfunktion besteht in der Produktion der EZM und der Wundheilung. Die EZM ist ein Netzwerk aus Proteinen und anderen Molekülen, welche den Raum zwischen Zellen in einem Gewebe ausfüllt (Bindegewebsmatrix), das perizelluläre Mikromillieu bedingt und sogar an transmembranären Strukturen beteiligt ist. Somit hat die EZM sowohl strukturelle, zellbiologische als auch signalgebende Funktion. Fibroblasten sind aktiv an der Synthese verschiedener Matrixproteine beteiligt, darunter Kollagen, Elastin, Fibronektin und Proteoglykane. (45) Nach ihrer Synthese werden die Matrixproteine von den Fibroblasten in den extrazellulären Raum befördert. Dieser Prozess basiert auf Exozytose, bei dem die

produzierten Proteine in Vesikeln verpackt werden, die Vesikel verschmelzen anschließend mit der Zellmembran und der Inhalt wird in den Extrazellulärraum abgegeben. Im Extrazellulärraum werden die Matrixproteine zu einem dreidimensionalen Netzwerk zusammengefügt. Fibroblasten übernehmen in diesem Schritt die kovalente Vernetzung, Proteinglykosylierung und auch Proteolyse durch Sekretion modifizierender Enzyme wie Lysyloxidase, Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und MMP-Inhibitoren (MMPis). (46)

Die EZM unterliegt einem dauerhaften Auf- und Abbau, um die Struktur des Gewebes entsprechend den sich ändernden Anforderungen anzupassen. Fibroblasten übernehmen aber auch weitreichende andere Aufgaben. Neben ihrer Rolle der EZM-Produktion und der Regulation der lokalen Fibrose haben Fibroblasten auch metabolischen Einfluss. Sie geben unter anderem Wachstumsfaktoren und Metabolite ab, um Entzündungsreaktion und Geweberegeneration in Zusammenarbeit mit Immunzellen zu fördern. Zudem stellen sie Progenitorzellen für verschiedene andere Zelltypen dar. Es wurde unter anderem gezeigt, dass ruhende Fibroblasten als Vorläuferzellen für mesenchymale Linien wie Adipozyten fungieren können. (45) Fibroblasten Linien sind somit als plastisch anzusehen. Verletzungen und der Einfluss von Zytokinen wie beispielsweise TGF- β aktivieren Fibroblasten. (47). Myofibroblasten kennzeichnen sich durch eine erhöhte Produktion von EZM-Proteinen, darunter verschiedene Arten von Kollagen aus. Zudem exprimieren sie kontraktile Proteine wie α -Aktin der glatten Muskulatur (α SMA auch genannt ACTA2), was ihnen die Fähigkeit verleiht in einem verletzten Bereich zu kontrahieren und den Wundverschluss somit zu fördern. (48) Myofibroblasten können dabei als Reaktion auf verschiedene Signalwege entstehen, darunter wie bereits beschrieben über den TGF β , aber auch über den *Wingless-Int-1* (WNT)- und *Platelet-derived growth factor* (PDGF)Signalweg, sowie in begrenztem Ausmaß auch durch Zytokine wie Tumornekrosefaktor α (TNF α), IL-1 und IL-6. Diese Faktoren wirken auf ruhende, geweberesidente Fibroblasten, welche als Hauptprogenitorzellen der Myofibroblasten dienen. Es können aber auch andere, bereits spezialisierte mesenchymale Zellen einen Phänotyp-Wechsel eingehen und Myofibroblasten erzeugen. So ist ein Beispiel die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT), welche in der Lunge stattfinden kann. Hierbei handelt es sich um einen Prozess, bei welchem, Epithelzellen ihre typische Zellpolarität verlieren und sich in mesenchymale Zellen umwandeln. Im Herzen können auf diese Weise Fibroblasten aus epikardialen und endokardialen Epithelzellen, beziehungsweise aus dem Endothel (EndMT) entstehen. (49)

Während die Funktion der Myofibroblasten während einer akuten Verletzung essentiell ist,

kann eine andauernde Aktivierung wie zum Beispiel bei chronischer kardialer Überlastung oder anhaltender Entzündungsreaktion zu einer übermäßigen EZM-Produktion führen, welche eine diffuse Fibrose zur Folge haben kann. (50) Kardiale Fibroblasten sind zudem in der Lage mechanischen Stress über mechanosensitive Rezeptoren, Ionenkanäle und auch Integrine wahrzunehmen und daraufhin intrazelluläre, fibrogene Kaskaden beispielsweise als Reaktion auf eine andauernde Drucküberlastung zu aktivieren und so zur Fibrose des Herzens beizutragen. Fibroblasten tragen außerdem zur Immunantwort bei indem sie den EZM-Abbau und die Fragmentierung über die Sekretion von verschiedenen Enzymen fördern. So bindet das von Fibroblasten depolymerisierte HA mit niedrigem Molekulargewicht (*Low-molecular-weight* hyaluronan = LMW-HA), an den Toll-like Rezeptor 2/4 (TLR2/4) und kann so die Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer (NF- κ B)-vermittelte proinflammatorische Zytokin Produktion fördern. (51)

1.3 Fibroblasten Antwort nach Myokardinfarkt

Fibroblasten spielen eine entscheidende Rolle bei der Wundheilung, der Bildung von Narbengewebe und auch dem *Remodeling* des Herzens nach MI. Nach einer ischämischen Verletzung des Herzens durchlaufen kardiale Fibroblasten verschiedene morphologische Phasen: In der Entzündungsphase tragen Fibroblasten zur Entzündungsreaktion bei. Neben der Produktion von Zytokinen und Chemokinen wird vermutet, dass Fibroblasten durch die Produktion von Proteasen zum Abbau der beschädigten Matrix im infarzierten Herzen beitragen. Hypoxische Bedingungen und Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 und TNF- α induzieren die Synthese und Freisetzung von MMPs durch kardiale Fibroblasten (52). Die frühe matrixabbauende Wirkung von Fibroblasten während der Entzündungsphase nach Infarkt fördert die Beseitigung beschädigter Matrixproteine. Darüber hinaus kann die Induktion membrangebundener MMPs auf der Oberfläche von kardialen Fibroblasten die Mobilisierung und Migration von Fibroblasten erleichtern. (53)

In der Proliferativen Phase erfolgt dann die Aktivierung der Zellen und die intensive Proliferation, gefolgt von einer Differenzierung zu Myofibroblasten (bis hin zu Tag 7 post MI). Diese Differenzierung wird wie bereits beschrieben hauptsächlich durch TGF- β 1 aber auch durch das Zytokin CC-Chemokinligand 2 (CCL2) induziert. Durch die Expression von α -SMA weisen die Myofibroblasten einen kontraktilen Phänotyp auf, der dem glatter Muskelzellen ähnelt. Wichtige Marker sind hier neben α -SMA (auch genannt ACTA2) auch Matrixproteine wie Periostin (POSTN) und *Collagen Triple Helix Repeat Containing 1* (CTHRC1). (54)

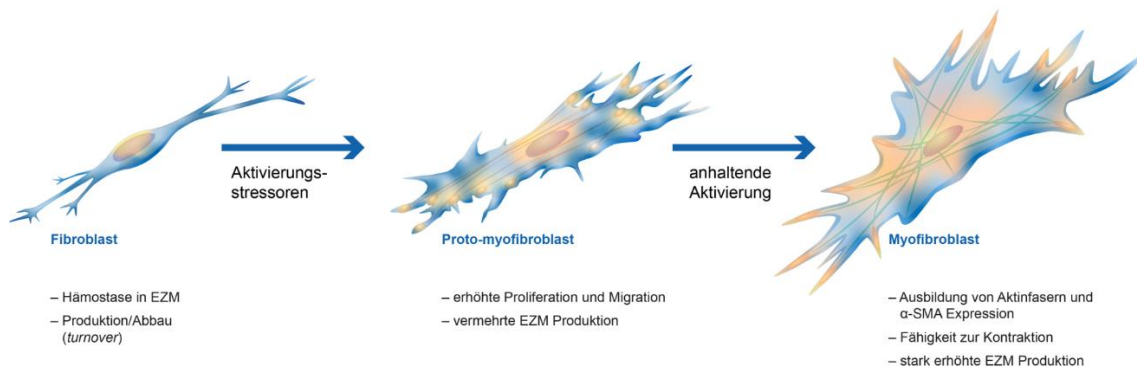


Abbildung 2: Fibroblasten Aktivierung

Die schrittweise Transformation von Fibroblasten zu Myofibroblasten, beginnend mit dem ruhenden Fibroblasten, über den Proto-Myofibroblasten, bis hin zum voll ausgebildeten Myofibroblasten ist ein Prozess der durch verschiedene Aktivierungsstressoren ausgelöst werden kann. Der Fibroblast ist zuständig für die Homöostase der extrazellulären Matrix im gesunden Gewebe, der Proto-Myofibroblast entwickelt sich als Folge von Aktivierungsstressoren, bei anhaltender Aktivierung entsteht der Myofibroblast welcher sich vor allem durch Ausbildung von Aktinfasern und α -Smooth Muscle Actin (α -SMA) auszeichnet.

Modifiziert nach Tai Y et al. (55)

Die Myofibroblasten produzieren in der Proliferationsphase nach Infarkt erhebliche Mengen EZM insbesondere Kollagen I, Kollagen III, HA und Fibronectin, was das Herz in seiner mechanischen Integrität aufrechterhält. Es wird parallel eine antiinflammatorische Reaktion eingeleitet, indem von den Fibroblasten ein Gegenspieler eine MMP, der *Tissue inhibitor of metalloproteinase* (TIMP) sezerniert wird, was den Matrixabbau und damit die Entzündungsreaktion unterdrückt. In den Tagen 7-10 erfolgt eine deutliche Verringerung der Zellteilung und der Myofibroblastenaktivierung. Zu diesem Zeitpunkt ist eine vollständige Narbe aus kollagenreicher extrazellulärer Matrix gebildet, die durch kovalente Quervernetzung der Bestandteile stabilisiert wird. Das Narbengewebe führt zu erhöhter Steifheit des Ventrikels und beeinflusst die mechanischen und signaltransduzierenden Eigenschaften. Eine Inaktivierung der Myofibroblasten und eine Auflösung der stark gesteigerten EZM Produktion ist somit unerlässlich um fibrotische Folgeerscheinungen zu verhindern. Ungefähr 10 Tage nach Infarkt wandeln sich die Myofibroblasten in so genannte Matrifibrozyten um. (56) Matrifibrozyten sind in ihrem Erscheinen von den Myofibroblasten abzugrenzen, da sie Gene exprimieren, die mit dem Knochen- und Knorpelumbau assoziiert werden, wie beispielsweise *Cartilage Intermediate Layer Protein 2* (Cilp2) und auch *Cartilage oligomeric matrix protein* (Comp). Matrifibroblasten treten somit vorwiegend in der Reifungsphase nach MI auf, sie produzieren deutlich weniger EZM und sind in ihrer Proliferationsrate weitestgehend ruhenden Fibroblasten ähnlich.

1.4 Endoplasmatisches Retikulum (ER)

Das ER ist eine Zellstruktur, die eine wichtige Rolle bei der Proteinsynthese und dem Abbau von Lipiden spielt, zudem dient es als Kalziumspeicher für die Zelle. (57) Bei der Proteinbiosynthese stellt die Transkription der DNA-Sequenz den ersten Schritt dar. Sie findet im Nukleus der Zelle statt und schreibt die DNA-Sequenz eines Gens in eine *messenger* RNA (mRNA) um. Die mRNA wird daraufhin in das Zytoplasma freigesetzt, wo die Translation am ER erfolgt. Bei diesem Prozess wird die mRNA-Sequenz in die Aminosäuresequenz eines Proteins übersetzt. Dazu bindet zuerst die kleine ribosomale Untereinheit an die mRNA. Ein Initiator-tRNA-Molekül, bindet dann an das Startcodon der mRNA (AUG). Anschließend lagert sich die große ribosomale Untereinheit an und bildet das vollständige Ribosom. Die Translation endet, wenn das Ribosom auf ein Stopcodon (UAA, UAG oder UGA) trifft. (58) Nach der Translation durchlaufen Proteine zudem posttranslationale Modifikationen, zu welchen die Phosphorylierung, Glykosylierung oder Lipidierung sowie das Falten der Proteine in ihre dreidimensionale Struktur gehören.

1.4.1 ER-Stress

ER-Stress bezeichnet einen auf Zellen einwirkenden Stress, der durch eine Ansammlung von fehlgefalteten Proteinen durch das ER entsteht.

Die Proteostase ist entscheidend für das Überleben von Zellen, da ein Ungleichgewicht mit verschiedenen Krankheiten assoziiert ist, darunter metabolische, neurodegenerative, onkologische und kardiovaskuläre Syndrome. (59) Das ER spielt außerdem eine zentrale Rolle als Organelle in der Qualitätskontrolle für die synthetisierten Proteine und beschränkt den Austritt von ausschließlich korrekt gefalteten Proteinen aus den Vesikeln. (60) Dieses Kontrollsystem, zu denen Chaperone, ATPasen, Glukosereguliertes Protein 94 (Grp94) und BiP (ein Mitglied der Hsp70-Familie) gehören, sind für die Erhaltung der Proteostase essentiell. Ist die physiologische Funktion des ER gestört und die Zelle nicht in der Lage, diese wiederherzustellen, spricht man von ER-Stress. ER-Stress kann durch verschiedene Faktoren verursacht werden, einschließlich eines erhöhten Bedarfs an Proteinsynthese, Störungen im Kalziumhaushalt oder anderen Umweltfaktoren. Die Zelle reagiert auf ER-Stress mit einer Schutzreaktion welche als *Unfolded protein response* (UPR), bezeichnet wird.

1.5 Unfolded protein response (UPR)

Der sogenannte Unfolded Protein Response (UPR) hat das Ziel, die Zelle vor schädlichen Auswirkungen des ER-Stresses zu schützen und die normale Funktion des ERs wiederherzustellen. (61) Der erste Schritt dieses Mechanismus stellt die Erkennung von Fehlern in der PBS dar. Wenn Proteine nicht korrekt gefaltet werden oder es zu einem Ungleichgewicht zwischen der Proteinsynthese und der Kapazität des ER kommt, erkennt die Zelle diesen Zustand als ER-Stress. Der nächste Schritt ist die Aktivierung von verschiedenen Signalwegen. Die UPR wird durch drei Hauptsignalwege vermittelt, die durch Transmembranproteine initiiert werden, zu diesen zählen PERK (Protein Kinase RNA-like ER Kinase), IRE1 (Inositol-Requiring Enzyme 1) und ATF6 (Activating Transcription Factor 6). (62)

Als Folge werden zelluläre Prozesse aktiviert, ein Schritt ist hierbei dabei die Reduktion der Proteinsynthese. Über die Aktivierung der Membranrezeptoren, ATF6, IRE1 und PERK, werden Transkriptionsfaktoren von Chaperonen, wie z. B. BiP, oder eIF2 α aktiviert, deren Expression eine Hemmung der Synthese neuer Proteine zur Folge haben. Der PERK-Signalweg führt beispielsweise zur Phosphorylierung des Faktors eIF2 α , welcher für die Initiierung der Translation verantwortlich ist, was folglich die allgemeine Proteinsynthese reduziert. (57) Ein weiterer Mechanismus ist die Erhöhung der Faltungskapazität, durch den IRE1-Signalweg. Über diesen Signalweg wird das X-box binding protein 1 (XBP1) aktiviert, ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von Genen steigert, die die Faltungskapazität des ER erhöhen und gleichzeitig den Abbau von fehlerhaften Proteinen fördern. Der ER-assoziierten Abbau (ERAD) durch den IRE1-Signalweg erfolgt dabei durch das im Zytosol befindliche Proteasom. Gleichzeitig können Proteine über diesen Signalweg auch durch Autophagie abgebaut werden indem sie intrazellulär in Vesikeln eingeschlossen und dort durch Enzyme aus Lysosomen verdaut werden. Die Aktivierung von ATF6 führt zudem über den Golgi-Apparat zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die die Expression einer Reihe von Genen steuern, zu welchen unter anderem XBP1 gehört welches die Faltungskapazität des ER wie bereits beschrieben erhöht. (62)

Insgesamt sollen die Reaktionen der Zelle auf den ER-Stress dazu beitragen, die Homöostase in der PBS der Zelle wiederherzustellen. Wenn der ER-Stress jedoch andauert, reicht der UPR-Schutzmechanismus häufig nicht aus, was zu Zellschäden und auch zum programmierten Zelltod (Apoptose) führen kann. ER-Stress-induzierte Apoptose wird dabei mit einer Reihe von Krankheiten in Verbindung gebracht, darunter auch Ischämie/Reperfusionsschäden. (63)

1.6 ER-Stress in der Pathophysiologie des Myokardinfarktes

ER-Stress spielt eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des MIs und trägt wesentlich zu dem Überleben der kardialen Zellen bei. Während eines MIs wird die Kapazität des ERs zur Proteinbiosynthese durch den Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen stark beeinträchtigt, gleichzeitig kommt es besonders in der Heilungsphase zu einem erhöhten Bedarf an Proteinen, diese Dysbalance löst in den durch Ischämie betroffenen kardialen Zellen erheblichen ER-Stress aus. (64)

Ist der ER-Stress anhaltend, wie es bei einem MI der Fall ist, kann die UPR proapoptotische Signalwegen einleiten, was zu Apoptose führt. Dieser Mechanismus ist für das Ausmaß des Zelltods und die Größe des Infarktgebiets im Herzen maßgeblich, was auf die potenzielle therapeutische Bedeutung der Modulation des ER-Stresses in der Pathophysiologie des MIs hinweist. (65)

1.7 ER-Stressoren

In-vitro lässt sich eine Induktion von ER-Stress durch die Anwendung von den ER-Stressoren Thapsigargin und Tunicamycin an isolierten, kultivierten Zellen realisieren.

Die Anwendung dieser Substanzen erlaubt es die Aktivierung des *Unfolded Protein Response (UPR)* und deren Auswirkungen auf die Zellviabilität zu untersuchen. Die durch Thapsigargin und Tunicamycin induzierte ER-Stress-Modellierung bietet somit einen Ansatz, um pathophysiologische Prozesse, die zur Zellschädigung und -dysfunktion während eines MIs führen können *in-vitro* nachzuahmen.

1.7.1 Thapsigargin

Thapsigargin ist ein Diterpenoid, das erstmals aus der Pflanze *Thapsia garganica* isoliert wurde und als Modulator des ER bekannt ist.

Es wird häufig eingesetzt, um ER-Stress zu induzieren oder auch als Folge des kumulierten ER-Stresses Apoptose auszulösen. Aufgrund seiner Fähigkeit Apoptose in Zellen einzuleiten, wird Thapsigargin auch als potenzielles Pharmakon in der Krebstherapie erforscht. Thapsigargin gehört zu den Sesquiterpenlactonen und wirkt, indem es die SERCA-Pumpen hemmt, die für den Rücktransport von Kalziumionen in das ER verantwortlich sind. Diese Hemmung führt zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration im Zytosol. (66)

Thapsigargin diffundiert in das ER und bindet intraretikulär an die SERCA. Es inhibiert die Aktivität der SERCA-Pumpe, indem es an die katalytische Stelle bindet, an welcher normalerweise die Bindung von ATP (Adenosintriphosphat) erfolgt. (67)

Durch die Hemmung der Pumpaktivität verhindert Thapsigargin den Rücktransport von Kalziumionen aus dem Zytoplasma in das endoplasmatische Retikulum. Dies führt zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Dieser hat wiederum Auswirkungen auf verschiedene, zelluläre Prozesse. (68) Insgesamt führt die Hemmung der SERCA-Pumpen durch Thapsigargin zu einem dysregulierten Kalziumhaushalt in der Zelle. Kalzium dient im ER außerdem als Cofaktor für Chaperone, welche für die Proteinfaltung verantwortlich sind. Durch die Hemmung der SERCA erschöpfen die endoplasmatischen Kalziumspeicher und Kalzium fehlt als prosthetische Gruppe für die Reaktionsabfolge der Proteinfaltung. (69)

1.7.2 Tunicamycin

Tunicamycin gehört zur Gruppe der Antibiotika. Es hemmt die N-Glykosylierung von Proteinen und damit die posttranslationale Modifikation. Tunicamycin enthält eine Aminozuckereinheit, die aus einem Hexosezucker namens N,N'-Diacetyl-Chitobiose besteht. Diese Einheit ermöglicht es Tunicamycin an sein Zielenzym UDP-N-Acetylglucosamin-Dolichylphosphat-N-Acetylglucosaminphosphotransferase (GPT) zu binden. (70) Dadurch beeinträchtigt Tunicamycin die finale Proteinfaltung und führt zur Akkumulation ungefalteter Proteine im endoplasmatischen Retikulum (ER).

Die Wirkung von Tunicamycin auf die Glykosylierung macht es zu einem ER-Stress Induktor. Dieser induzierte ER-Stress kann zu verschiedenen zellulären Antworten führen, darunter die Aktivierung der UPR und die Initiation der Apoptose. Die Fähigkeit zur Apoptoseeinleitung macht Tunicamycin ebenfalls zu einem potentiellen Therapeutikum in der onkologischen Forschung. (70) Tunicamycin wird außerdem in der Grundlagenforschung eingesetzt, um die Auswirkungen von ER-Stress auf zelluläre Prozesse zu untersuchen, insbesondere in Bezug auf die Proteinfaltung und posttranslationale Glykosylierung.

1.8 Apoptose

Die Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, ist ein Prozess, der dazu dient, beschädigte oder nicht mehr benötigte Zellen zu eliminieren. Es gibt mehrere Wege, die zur Initiierung der Apoptose führen können.

Die wichtigsten apoptotischen Signalwege sind dabei folgende:

1. Extrinsischer Weg (Rezeptor-vermittelter Weg):

Externe Signale, die durch spezifische Rezeptoren, so genannte *Death*-Rezeptoren auf der Zelloberfläche vermittelt werden, können Apoptose auslösen. Ein bekanntes Beispiel ist der Fas-Ligand, der an den Fas-Rezeptor bindet.

Die Aktivierung von genannten Rezeptoren führt nachfolgend zur Rekrutierung von Adapterproteinen und zur Bildung des *Death-Inducing Signaling Complex* (DISC). Dieser Komplex aktiviert die Initiator-Caspasen, insbesondere Caspase-8, die dann die Effektor-Caspasen aktivieren und den apoptotischen Prozess einleiten.

2. Intrinsischer Weg (Mitochondrialer Weg):

Interne Stresssignale, wie z. B. DNA-Schäden oder ER-Stress, können die mitochondriale Integrität beeinträchtigen, was zu einer mitochondrialen Dysregulation führt. Infolge dieser wird Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt und führt zusammen mit anderen Proteinen zur Bildung eines apoptosomalen Proteinkomplexes.

Dieser Proteinkomplex aktiviert die Initiator-Caspasen, insbesondere Caspase-9, welche dann Effektor-Caspasen aktivieren und die Apoptose der Zelle einleiten.

3. Endoplasmatisches Retikulum (ER)-Stress-induzierter Weg: (71)

ER-Stress kann zu einer Aktivierung von IRE1 führen, was wiederum den c-Jun N-terminalen Kinase (JNK)-Signalweg aktiviert. Dieser Signalweg kann anschließend Apoptose induzieren.

Durch den ER-Stress erfolgt eine proteolytische Spaltung von Caspase-12 (C-12) in der Maus und Caspase-4 (C-4) beim Menschen. Sowohl die murine als auch die humane Caspase sind auf der zytoplasmatischen Seite der ER-Membran lokalisiert. (72) Es gibt auch Hinweise auf eine Interaktion zwischen dem ER und den Mitochondrien. Der apoptotische Signalweg, der von den Mitochondrien initiiert wird, ist in Säugetierzellen von großer Bedeutung und unterliegt einer starken Regulation durch Proteine der BCL-

2-Familie. Die pro-apoptotischen Mitglieder BAX und BAK werden durch verschiedene apoptotische Stimuli aktiviert, was zu ihrer Oligomerisierung und Insertion in die äußere mitochondriale Membran führt und in Folge Cytochrom c freisetzt. (73) Cytochrom c bindet im Anschluss an Apaf-1 und Caspase-9 (C-9), was zur Aktivierung von C-9 und zu einer Aktivierung von Caspase-3 (C-3) und Caspase-7 (C-7) und im Folgenden zum Zelltod führt. Arbeiten mit BAX/BAK-defizienten Mäusen zeigen zudem, dass BAX/BAK auch im ER lokalisiert sind und als Reaktion auf ER-Stress aktiviert werden können, was zu einem Kalziummangel in der Zelle und zur Aktivierung der (murinen) Caspase 12 (C-12) führt. (74)

4. Granzym-B-vermittelter Weg (Über zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen):

Bei dem Granzym-B-vermittelten Weg setzen zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen Perforin Granzym B frei. Granzym B kann anschließend die Apoptose über den mitochondrialen Aktivierungsweg oder über die Aktivierung von Caspase-3 initiieren.

Die apoptotischen Wege sind oft miteinander verbunden und können durch verschiedene interne und externe Signale aktiviert werden. Die feine Regulation der Apoptose ist hierbei entscheidend für die Aufrechterhaltung der Homöostase im Organismus und die Vermeidung von Tumorzell-Entstehung.

1.9 Zielsetzung

In Deutschland bleiben kardiovaskuläre Erkrankungen nach wie vor die häufigste Todesursache. Ein großer Anteil dieser Todesfälle ist auf eine entstehende Herzinsuffizienz als Folge eines MIs zurückzuführen, die durch kardialer Umbauprozesse (*Remodeling* des Herzens) auftritt. Während die Akuttherapie des MIs weit fortgeschritten ist, gibt es nur begrenzte Behandlungsstrategien, die auf die Bildung von Narbengewebe und die langfristigen Umbauprozesse des Herzens abzielen. Das detaillierte Verständnis der Myokardschädigung und der Heilungsprozesse nach einem Infarkt sind daher von entscheidender Bedeutung. Die Grundlagenforschung bietet somit die Basis für die Entdeckung neuer therapeutischer Ansätze, um Heilung und Prognose von MI Patienten langfristig zu verbessern. Das *Cell migration-inducing and hyaluronan-binding protein* (CEMIP) wurde dabei als eines der Proteine identifiziert, welches nach MI stark hochreguliert wird. Seine Rolle im MI Geschehen und Heilungsprozess bleibt allerdings unerforscht. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher die Untersuchung der Funktion von CEMIP im MI am Mausmodel.

2 Material und Methoden

2.1 Tierhaltung und Tierversuche

Tierversuche wurden unter den Genehmigungen der Landesbehörde für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen unter den Aktenzeichen 81-02.04.2020.A289 und 81-02.04.2022.A341 durchgeführt. Alle Organentnahmen liefen unter dem Aktenzeichen 2023-0038 O4/02. Die Qualifikation zur Durchführung von Tätigkeiten im Zusammenhang mit Tierversuchen wurden durch den Kurs nach FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*) erlangt. Die Zucht und Haltung der Tiere erfolgte in Räumlichkeiten der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) am Universitätsklinikum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die Tiere wurden einem 12-stündigen Tag/Nacht-Rhythmus ausgesetzt und hatten während dieser Zeit freien Zugang zu entkeimtem Wasser sowie Haltungsfutter (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Mit Ausnahme der Tiere, die für die Isolation von kardialen Fibroblasten verwendet wurden, wurden männliche Tiere im Alter von 10-14 Wochen für Untersuchung der Ischämie/Reperfusion (I/R) verwendet, Tamoxifen wurde bei diesen Tieren ab einem Alter von 6 Wochen appliziert.

2.1.1 Verwendete Mauslinie

Es wurde eine CAGG-Cre-ER^{TM+/-} Cemip^{fl/fl} Mauslinie generiert, welche unter der internen Linien Nummer 9425 lief. Hierzu wurde eine Mauslinie, die eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase unter einem CAGG *Promoter* exprimiert (B6.Cg-Tg(CAG-Cre/Esr1*)5Amc/J), mit einer Linie, in welcher das *Cemip*-Allel loxP-flankiert vorliegt gekreuzt. Die CAGG-Cre^{+/-}-ERTM-Linie ist kommerziell erhältlich und wurde ursprünglich von Jackson Laboratory bezogen um anschließend in der ZETT mit der Cemip^{fl/fl}-Linie verpaart zu werden.

Es handelt sich bei der Linie um einen induzierbaren *Knock-out*. Den Tieren wurde daher für die Induktion des *Knock-outs* im Alter von sechs bis acht Wochen an fünf aufeinander folgenden Tagen 1 mg Tamoxifen (Merck, Darmstadt, Deutschland), gelöst in Erdnussöl intraperitoneal injiziert. Durch die Tamoxifen Gabe kann der Zeitpunkt der Deletion somit gewählt werden.

Die CAGG-Cre-ER^{TM+/-} Cemip^{fl/fl} Linie wurde auf einen C57BL/6J-Hintergrund zurück

gekreuzt. Für alle Experimente wurden, abgesehen von den Zellkultur-Experimenten, männliche, CAGG-Cre-ER^{TM+/-}-Cemip^{fl/f} Mäuse (*Cemip knockout* = KO-Mäuse) verwendet.

Als Kontrollen dienten CAGG-Cre-ER^{TM-/-}-Cemip^{fl/f} Mäuse (Wildtypiere = WT), welche in der Linie mit gezüchtet wurden. So wurden für die Experimente vorwiegend echte Wurfgeschwister verwendet um die Vergleichbarkeit der Tiere untereinander weiter zu erhöhen. In diesen Kontrolltieren wird die Cre nicht exprimiert wie in den KO-Tieren, sodass das loxP-flankierte Allel durch Tamoxifen-Applikation nicht herausgeschnitten wird. Zu Beginn der Experimente mussten außerdem CAGG-Cre-ER^{TM+/-}-Cemip^{wt/wt} Mäuse eingesetzt werden. Bei dieser Kontrollgruppe transloziert die Cre-Rekombinase nach Tamoxifen-Applikation zwar in den Zellkern, schneidet aber kein Gen heraus, da keine loxP Sequenzen vorhanden sind. Somit wird das *Cemip*-Gen hier nicht herausgeschnitten.

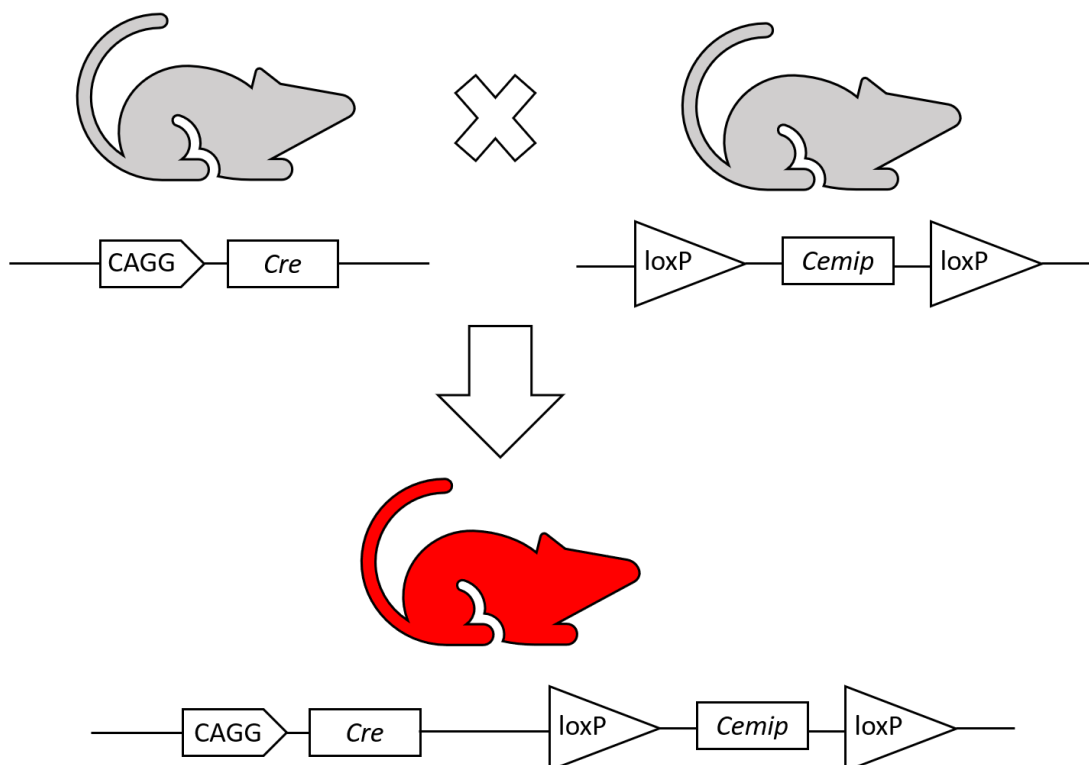


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Generierung der *Cemip*-defizienter Mäuse

Um die *Cemip*-defiziente Mauslinie zu generieren wurde eine Mauslinie, die eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase unter einem CAGG *Promoter* exprimiert (B6.Cg-Tg(CAG-Cre/Esr1*)5Amc/J) mit einer Linie, in welcher das *Cemip*-Allel loxP-flankiert vorliegt, gekreuzt.

2.1.2 Induktion der Ischämie und Reperfusion

Um einen MI am Mausmodel zu untersuchen, wurde bei den Mäusen eine Ischämie und Reperfusion (I/R) induziert. Die Methode ist in zwei Schritte unterteilt: Die Vor-OP, die drei Tage vor der Einleitung der Ischämie durchgeführt wird, mit Platzierung der Ligatur an der linken vorderen absteigenden Koronararterie, *Left anterior descending artery* (LAD) für die Ischämie-Einleitung, sowie die tatsächliche Induktion der Ischämie. Die Aufteilung ermöglicht es, die Ischämie mit geschlossenem Thorax durchzuführen (*Closed chest Model*), was der pathophysiologischen Situation näherkommt als die Ischämie mit geöffnetem Thorax. Zudem wird die durch die Öffnung des Thorax verursachte Verletzung und nachfolgende Inflamationsreaktion minimal gehalten. (75) (76)

Die Operationen wurden von Frau Dr. Simone Gorressen durchgeführt.

2.1.3 Ligatur-Anlage

Vor Beginn der Ligatur-Anlage wurde den Tieren 0,05-0,1 mg/kg KG (Körpergewicht) Buprenorphin verabreicht. Die Anlage der Ligatur erfolgte unter Narkose mit Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (10 mg/kg Körpergewicht) intraperitoneal. Nach suffizienter Anästhesie wurde das Versuchstier intubiert und anschließend auf dem Rücken liegend auf einem beheizten Operationstisch fixiert. Die Beatmung erfolgte mit sauerstoffangereicherter Raumluft (O₂ 40 %) sowie 1-2 % Vol. Isofluran. Die Haut wurde desinfiziert und der Thorax mittels lateraler Thorakotomie eröffnet. Unter Verwendung eines Operationsmikroskops erfolgte die Präparation des Herzens und das Umschlingen der proximalen linken Koronararterie mit einem Prolenefaden.

Die beiden Enden des Fadens wurden durch einen PE-Schlauch geführt. Der Thorax wurde zugezogen und die Enden des Prolenefadens wurden rechts und links neben den Verschlussknoten nach außen geführt. Anschließend wurde auf der rechten Seite des Thorax eine Tasche unter der Haut präpariert und der Faden in die Hauttasche platziert. Die Haut wurde anschließend durch eine Naht verschlossen. Während des gesamten Eingriffs wurde die Körpertemperatur mittels rektaler Temperaturmessung verfolgt und konstant bei 37 bis 38 °C gehalten. Nach Beenden der Operation wurde die Isoflurannarkose ausgeleitet, die Maus wurde daraufhin noch weitere Minuten beatmet. Sobald die Reflexe der Maus wieder erkennbar waren, wurde die Extubation durchgeführt. Die Maus wurde anschließend weiter warmgehalten, bis sie sich von der Narkose erholt hatte. Für die postoperative Analgesie erhielten die Tiere Buprenorphin im Trinkwasser (0,009 mg/ml). Zudem wurden dreimal täglich 0,05-0,1 mg/kg Buprenorphin subkutan

appliziert, wobei die erste Gabe bei Ausleiten der Isofluran-Narkose erfolgte. Die postoperative Analgesie wurde über drei Tage weitergeführt. Es erfolgte ebenfalls eine tägliche Begutachtung der Tiere bis zur Induktion der Ischämie.

2.1.4 Ischämie-Induktion

Drei Tage nach der Vor-OP wurde die kardiale Ischämie unter geschlossenem Thorax induziert. Bevor die Ischämie eingeleitet wurde, erhielten die Tiere bereits 0,05-0,1 mg/kg Buprenorphin zur Analgesie.

Die Narkoseeinleitung erfolgte mithilfe einer Inhalations-Narkosekammer, die mit sauerstoffangereicherter Raumluft (O₂ 40 % und 3 % Vol. Isofluran) verwendet wurde. Sobald eine ausreichende Narkosetiefe erreicht war, wurde das Versuchstier auf dem Rücken auf einem beheizten Operationstisch fixiert und mittels einer Maske beatmet. Die Isofluran-Konzentration wurde angepasst, um sicherzustellen, dass die Atemfrequenz des Tieres zwischen 80 und 120 Atemzügen pro Minute lag. Die Körpertemperatur wurde kontinuierlich über eine rektale Sonde gemessen und konstant bei 37 bis 38 °C gehalten. Nach Desinfektion der Haut wurden die EKG-Elektroden angebracht.

Zur Induktion der Ischämie wurden die unter der Haut platzierten Prolenefäden herausgezogen. Diese Fäden wurden seitlich befestigt und an Magnethaltern angebracht. Die Ischämie wurde induziert, indem leichter Zug an den Magnethaltern ausgeübt wurde. Die erfolgreiche Induktion wurde durch Kontrolle der ST-Hebung im EKG (Basic Data Acquisition Software, Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA) gewährleistet. Die Ischämie wurde unter fortlaufender Überwachung der Narkosetiefe mit Isofluran für 45 Minuten aufrechterhalten. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Fäden abgeschnitten und so die Reperfusion eingeleitet. Die Haut wurde nach Beenden des Eingriffs wieder durch eine Naht verschlossen. Die Isofluran-Narkose wurde beendet, die Maus verblieb daraufhin noch einige Minuten unter Beatmung, bis die Narkose abklang.

2.2 Echokardiografie

Zur Untersuchung der kardialen Funktion wurden die Tiere sowohl vor der Ligatur-Anlage (*Baseline* Messung) als auch 24 h, 1 w, 2 w und 3 w post I/R echokardiografisch untersucht. Für die Echokardiographie wurde dabei ein hochauflösendes Ultraschallgerät in Verbindung mit einem 18-38 MHz Schallkopf (Vevo3100 oder Vevo 2100, VisualSonics Inc., Toronto, Ontario, Kanada) verwendet. Die gesamte echokardiographische Untersuchung an den Mäusen erfolgte unter Isofluran-Narkose (3% Vol. zur Einleitung und 1,5-2% Vol.

zur Aufrechterhaltung).

Die Herzfrequenz und ein Elektrokardiogramm der Tiere wurden während der echokardiografischen Messungen aufgezeichnet. Die Körpertemperatur wurde durch rektale Temperaturmessung überwacht und auf 36,5-37,5 °C gehalten. Vor Beginn der Messung wurde das Fell der Tiere im Thoraxbereich mit Haarentfernungscreme entfernt und ein Aquasonic 100 Gel (Parker Laboratories, Fairfield, NJ) auf den Thorax aufgetragen. Die echokardiografische Untersuchung umfasste die parasternale Aufnahme der langen als auch der kurzen Achse des linken Ventrikels. Hieraus wurden linksventrikuläres endsystolisches und enddiastolisches Volumen abgeleitet. Basierend auf den ermittelten Volumina wurden die linksventrikuläre Auswurffraktion, das Herzauswurfvolumen, das Schlagvolumen und die fraktionale Flächenänderung berechnet. Zur Beurteilung der Wanddicke und Ausdehnung der Kammern wurden zudem M-Mode-Aufnahmen des linken Ventrikels erstellt. Durch die Lokalisation des Schallkopfes über dem Apex konnte außerdem die Vierkammeransicht und somit der Blutfluss durch die Mitralklappe dargestellt werden.

Alle echokardiografischen Untersuchungen und Auswertungen erfolgten durch Frau Dr. Simone Gorressen.

2.3 *In-vitro* Experimente

2.3.1 Fibroblasten Isolation und Kultivierung

2.3.1.1 Langendorff-Methode

Die Langendorff Methode kann als retrograde Perfusion unter anderem auch zur Isolation von kardialen Zellen verwendet werden und stellt dahingehend eine etablierte Methode dar. (77) (17)

Zur Isolation kardialer Fibroblasten wurden die Mäuse im Alter von 12-16 Wochen, durch Anflutung von 30 % CO₂ euthanasiert und anschließend mit 70% Isopropanol desinfiziert. Der Thorax wurde eröffnet, das Herz wurde anschließend mit Heparin-Lösung (B. Braun SE, Melsungen, Deutschland) unter Zuhilfenahme einer *Butterfly* Kanüle 3 Minuten gespült. Das Herz wurde anschließend entnommen und in PBS (Gibco® Life Technologies, Paisley, UK) überführt, dort wurde es über die Aorta an einer Kanüle befestigt. Die Kanüle wurde anschließend am Langendorff-Perfusionssystem aufgehängt und die Herzen mit einer enzymatischen Verdauung bestehend aus Kollagenase I und DNase (beides Gibco Life

Technologies, Paisley, UK) in HBSS (Gibco Life Technologies, Paisley, UK) Lösung durch retrograde Perfusion verdaut. Die genaue Zusammensetzung der Verdauungslösung ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Nach der Perfusion wurden die Herzen zerkleinert und für 10 Minuten bei 39 °C in ihrer Perfusionslösung inkubiert. Die resultierende Suspension wurde durch einen 100-µm- und 40-µm-Filter filtriert und anschließend bei 800 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in DMEM (5,5 mmol/l Glucose ergänzt mit 10 % FBS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin – alle Reagenzien von Gibco® Life Technologies, Paisley, UK) resuspendiert und in einer 100 mm Petrischale (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich) ausgesät. Nach 4 h Inkubationszeit erfolgte der erste Mediumwechsel, um Zelltrümmer und Überreste zu entfernen. Ein weiterer Waschschrift wurde nach 24 h durchgeführt, dazu wurde das Medium abgesaugt, die adhären Zellen wurden dann mit frischem Medium durch auf- und abpipettieren von toten Zellen und Zellresten befreit. Das Medium wurde anschließend abermals abgesaugt und mit 10 ml frischem Medium (DMEM 5,5 mmol/l Glukose ergänzt mit 10 % FBS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) ersetzt. Nach weiteren 72 Stunden wurden die Zellen für das jeweilige Experiment unter Verwendung von Trypsin-EDTA (Gibco® Life Technologies, Paisley, UK) subkultiviert zu Passage 1. Alle verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem CO₂-Inkubator bei 5% CO₂ und 37 °C.

2.3.1.2 Mincing Methode

Zur Isolation muriner kardialer Fibroblasten wurden hier ebenfalls Mäuse, im Alter von 8-12 Wochen, durch Anflutung von 30 % CO₂ euthanasiert, anschließend mit 70% Isopropanol desinfiziert, der Thorax wurde eröffnet, das Herz wurde anschließend mit Heparin-Lösung (B. Braun SE, Melsungen, Deutschland) 3 min gespült. Das Herz wurde entnommen und in Dulbecco's phosphate buffered saline DPBS (Gibco® Life Technologies, Paisley, UK) überführt und vorsichtig manuell ausgepumpt.

In einer Zellkulturschale wurde das Herzen in etwa 1 mm³ große Stücke geschnitten (Mincing). Die Herzstücke wurden dann in Kollagenase I in HBSS (beides von Gibco Life Technologies, Paisley, UK) Lösung bei 39 °C unter Rotation inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend durch einen 100-µm- und 40-µm-Filter filtriert und bei 800 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in DMEM (5,5 mmol/l Glucose, ergänzt mit 10 % FBS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin)

aufgenommen und in einer 100mm Petrischale (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich) ausgesät. Verwendete Puffer und Lösungen sind ebenfalls in Tabelle 1 aufgeführt. Die weitere Kultivierung erfolgte wie unter 2.3.1.1 beschrieben.

Tabelle 1: Verwendete Puffer und Lösungen der Zellisolation und Zellkultur

Puffer/Medium	Zusammensetzung	Hersteller
Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)	2.67 mM KCl 1.47 mM KH_2PO_4 137.93 mM NaCl 8.06 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Gibco Life Technologies, Paisley, UK
Hank's balanced salt solution (HBSS)	1,26 mM CaCl_2 0,49 mM MgCl_2 0,41 mM MgSO_4 5,3 mM KCl 0,44 mM KH_2PO_4 4,17 mM NaHCO_3 137,39 mM NaCl 0,34 mM NaH_2PO_4 5,55 mM Glukose	Gibco Life Technologies, Paisley, UK
Enzymatische Verdaulösung	450 U/ml Kollagenase I 60 U/mL DNase I in HBSS	Eigene Herstellung
Heparin/PBS Lösung	0,4 % Heparin (5000 I.E./ml) in DPBS	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
DMEM 10 %	DMEM 10 % FBS 100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin	Gibco Life Technologies, Paisley, UK
DMEM 1 %	DMEM 1 % FBS 100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin	Gibco Life Technologies, Paisley, UK

2.3.2 Stimulation kardialer Fibroblasten

Um die Auswirkung unterschiedlicher Versuchsbedingungen auf die *Cemip* mRNA Expression zu untersuchen wurden kardiale Fibroblasten *ex-vivo* mit verschiedenen Substanzen stimuliert oder unter zu untersuchenden, definierten Bedingungen kultiviert.

Primäre kardiale Fibroblasten wurden dafür über die Langendorff-Methode isoliert, die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und nach 72 h Wachstumszeit zu Passage P1 subkultiviert. Nach Subkultivierung wurden die Fibroblasten in Hungermedium (DMEM 5,5 mmol/l Glukose ergänzt mit 1 % FBS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) überführt um eine Synchronisierung des Zellzyklus zu erreichen. 24 h nach Hungermedium Zugabe wurden die Zellen anschließend mit verschiedenen Reagenzien (siehe Tabelle 2) für 24 h (wenn nicht anders angegeben) behandelt. Nach Ablauf der Behandlungsdauer wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden mit DPBS (siehe Tabelle 1) gespült und mit TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, US) lysiert um die RNA anschließend mittels Phenol-/Chloroform-Extraktion zu gewinnen. Neben verschiedenen Reagenzien wurden die Zellen außerdem für 24 h und 72 h einer Hypoxie unterzogen. Hierfür wurden die Zellen in einer Petrischale in eine Hypoxie Kammer (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) überführt, welche einen O₂ Gehalt von 1 % über die gesamte Messdauer gewährleistete (Gaszusammensetzung: 1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂).

Außerdem wurde der Einfluss von Glukosemangel auf die Zellen und deren mRNA Expressionsmuster untersucht. Die Zellen wurden dazu in Passage P1 in ein glukosearmes Medium (DMEM, ohne Glucose von Gibco® Life Technologies, Paisley, UK) überführt und darin für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend wie bereits beschrieben mit TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, US) lysiert und einer Genexpressionsanalyse unterzogen.

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien in der Zellkultur

Reagenz	Finale Konzentration [ng/ml]	Katalognummer	Hersteller
Humaner rekombinater Transforming growth factor - β 1 (TGF- β 1)	10	100-21	Thermo Fisher scientific, Massachusetts, US
Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)	20	315-01A	Thermo Fisher scientific, Massachusetts, US
Interleukin-1 (IL-1)	10	211-11B	Thermo Fisher scientific, Massachusetts, US
Hyper-IL-6 (Fusionsprotein mit dem löslichen Interleukin-6- Rezeptor)	10	216-16	Thermo Fisher scientific, Massachusetts, US
Thapsigargin	650	T9033-1MG	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pirfenidon	1000	16524284	Thermo Fisher scientific, Massachusetts, US
Bone morphogenetic protein 7 (BMP-7)	1nM	354-BP-010/CF	R&D Systems, Minneapolis, US
Humanes rekombinantes Relaxin 2	100	130-15	Thermo Fisher scientific, Massachusetts, US
Humanes rekombinantes Relaxin 3	100	130-10	Thermo Fisher scientific, Massachusetts, US

2.3.3 *Cemip* Deletion in kardialen Fibroblasten mittels *Small interfering RNA*

Um eine *Cemip*-Deletion *ex-vivo* zu erzielen, wurden kardiale Fibroblasten von wildtypischen Mäusen einer Transfektion mit *Small interfering RNA* (siRNA) gegen *Cemip* unterzogen. Bei siRNA handelt es sich um Ribonukleinsäure-Sequenzen aus 20 bis 25 Basenpaaren, die an komplementäre einzelsträngige RNA-Moleküle binden und auf diese Weise deren Proteinbiosynthese unterbinden können. Hier wurde eine siRNA gegen die *Cemip* mRNA Sequenz verwendet um die Genexpression gezielt zu beeinflussen und eine *Cemip*-Deletion in den Zellen zu erreichen. Kardiale Fibroblasten wurden dazu aus C57BL/6J Mäusen unter Verwendung der Langendorff-Methode isoliert und wie unter 2.3.1 beschrieben kultiviert. Die Zellen wurden anschließend zu Passage P1 subkultiviert, in welcher die Transfektion der siRNA erfolgte. Sechs Stunden vor Transfektion wurden das Medium zu antibiotikafreiem Medium gewechselt, in welchem die Transfektion im Anschluss stattfand.

Um eine optimale Transfektionseffizienz zu erreichen musste außerdem sichergestellt werden, dass die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 60–80% aufwiesen. Das Lipofectamin-Reagenz (Life Technologies, Carlsbad, US) wurde mit Opti-MEM (Medium mit reduziertem Serumgehalt von Gibco® Life Technologies, Paisley, UK) verdünnt. Das Reagenzgemisch wurde 2 bis 3 Sekunden lang homogenisiert, um eine ausreichende Vermischung sicherzustellen. Die siRNA als auch die Negativ-Kontrolle (beides Qiagen, Venlo, Niederlande) wurden in Opti-MEM-Medium in einem separaten Eppendorf-Röhrchen verdünnt. Die verdünnte siRNA/Negativ-Kontrolle wurde anschließend zu dem Falcon mit dem Lipofectamin-Opti-MEM Reagenzgemisch hinzugefügt, wobei ein Verhältnis von 1:1 zwischen den beiden Komponenten eingehalten wurde. Der siRNA/Negativ-Kontrolle-Reagenzkomplex wurde anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Der siRNA/Negativ-Kontrolle-Reagenzkomplex wurde den Zellen hinzugefügt. Die Zellen wurden dann für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Der *Knock-out* wurde anschließend über Genexpressionsanalyse mittels quantitativer *Realtime*-PCR validiert. Es wurden vier verschiedene siRNAs getestet (siehe Tabelle 3), von welchen anschließend eine ausgewählt und in Folgeexperimenten verwendet wurde. Es wurde zudem eine Positivkontrolle zur Etablierung verwendet.

Alle nachfolgenden Experimente vergleichen die siRNA-Gruppe (*Cemip*-KO) mit der Negativ Kontrolle als Kontrollgruppe, um die Versuchsbedingungen und damit Einflüsse auf die Zellen möglichst gleich zu halten. Die Negativ Kontrolle besteht aus einer siRNA, die

keine Zielsequenz im untersuchten Genom hat. Sämtliche Schritte der Transfektion werden für die Kontrollgruppe und die Versuchsgruppe identisch durchgeführt.

Alle verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 3 aufgeführt. Finale Konzentrationen finden sich in Tabelle 4.

Tabelle 3: Verwendete Reagenzien der siRNA vermittelten *Cemip*-Deletion

Reagenz	Bezeichnung laut Hersteller	Katalognummer	Hersteller
Negativkontrolle: (Non-silencing RNA)	Neg. Control siRNA 20 nmol (Cat No.)	1027281	Qiagen, Venlo, Niederlande
Positivkontrolle	AllStars Mm/Rn Cell Death Control	1027415	Qiagen, Venlo, Niederlande
siRNA Testkit	FlexiTube GeneSolution GS80982 for Cemip	1027416	Qiagen, Venlo, Niederlande
Ausgewählte siRNA	Predesigned siRNA directed against Mouse Cemip	1027418	Qiagen, Venlo, Niederlande
Transfektionsreagenz	Lipofectamin	13778150	Life Technologies, Carlsbad, US
Transfektionsmedium	OptiMem	31985062	Gibco® Life Technologies, Paisley, UK

Tabelle 4: Verwendete Konzentrationen für die siRNA vermittelte *Cemip*-Deletion

Negativkontrolle: (Non-silencing RNA)	10 nM
Positivkontrolle	10 nM
siRNA Testkit	10 nM
siRNA (<i>clone 1</i>)	10 nM
Transfektionsreagenz	0,02 µl/ml

2.4 *Cemip* Deletion durch 4-Hydroxytamoxifen

Der *Cemip* Knock-out wurde außerdem nach Etablierung der *CAGG-Cre-ER^{TM+/-}Cemip^{fl/fl}* Zuchtlinie *ex-vivo* unter Verwendung von 4-Hydroxytamoxifen in isolierten kardialen Fibroblasten induziert. Hierzu wurden kardiale Fibroblasten aus Mäusen der Zuchtlinie 9425 unter Verwendung der Mincing Methode isoliert und anschließend kultiviert (siehe unter 2.3.2). Die Zellen wurden dann in Passage P1 für 24 h mit 500 nM 4-Hydroxytamoxifen (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) behandelt.

2.5 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer *Realtime*-PCR

Zur Untersuchung der Genexpression wurden die Zellen mit TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, US) lysiert und Ribonukleinsäure (RNA) extrahiert, zu cDNA umgeschrieben und mittels qPCR untersucht. Zur Untersuchung der *Cemip* mRNA Expression post MI (siehe Abschnitt 3.1) im Herzwewebe wurden die Herzen entnommen, der infarzierte Bereich des linken Ventrikels wurde abgetrennt und ebenfalls in einer Genexprerssionsanalyse untersucht.

Die Herzen der Tiere zur Untersuchung der *Cemip* mRNA Expression post I/R wurden von Dr. Anne Petz und Dr. Daniel Gorski entnommen.

2.5.1 RNA-Isolation aus kultivierten Fibroblasten

Zur Isolation der RNA wurden 1 ml des TRIzol- (Life Technologies, Carlsbad, US) Zelllysates mit 200 µl Chloroform versetzt und invertiert. Die Proben wurden anschließend 10 min bei 15000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde dann in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Das Volumen wurde 1:1 mit Isopropanol 100 % verdünnt und anschließend vortexiert. Die Proben inkubierten daraufhin 10 min bei Raumtemperatur und wurden im nächsten Schritt 30 min bei 15000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

Der Überstand wurde dann vorsichtig abgesaugt. Auf das entstandene Pellet wurde 1 ml Ethanol 75 % geben. Die Proben wurden abermals 10 min bei 15000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand nochmals vorsichtig abgesaugt. Die isolierte RNA wurde dann 1 bis 2 min im Heizblock bei 65°C getrocknet. Zur Lösung der RNA wurden 20 µl RNase-freies Wasser auf die Probe gegeben und 5 min bei 65 °C und 950 rpm im Inkubator geschüttelt. Die Reinheit und Konzentration der RNA wurde am Nano Drop One (Thermo Fisher scientific, Massachusetts, US) bestimmt. Anschließend wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

2.5.2 cDNA-Synthese

Für das Umschreiben der mRNA in cDNA wurden 1000 ng der isolierten mRNA eingesetzt. Unter Verwendung des QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande) wurde die cDNA nach Herstellerprotokoll synthetisiert. Zur Entörung der genomischen DNA wurden 2 µl *Wipe-Buffer* zu jeder Probe mit jeweils 1 µg RNA hinzugefügt. Die Proben wurden daraufhin im *Mastercycler*-Gerät (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für 2 Minuten bei 42 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben auf einer Kühlsteckplatten (-20 °C) gekühlt. Der Mastermix (bestehend aus Puffer, Reverser Transkriptase und Primer) wurde hinzugegeben. Die Proben wurden erneut in das *Mastercycler*-Gerät gestellt. Es erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten bei 42 °C und anschließend für 3 Minuten bei 95 °C zur Inaktivierung der Reaktion. Schließlich wurden 100 µl MilliQ-Wasser zu jeder Probe gegeben.

2.5.3 Quantitative *Realtime*-PCR

In der qPCR-Analyse wurde der Platinum™ SYBR™ Green qPCR SuperMix-UDG (Life Technologies, Eugene, OR, USA) in Kombination mit dem StepOnePlus™ Real-Time-PCR System (Life Technologies, Eugene, OR, USA) verwendet. Für die Reaktion wurde

eine Mischung aus Polymerase, SYBRTM Green, dNTPs und Puffer zusammen mit cDNA und den entsprechenden Primern (jeweils in einer Konzentration von 0,625 µM) eingesetzt. Jede Probe wurde in Duplikaten vermessen. Die relative Genexpression wurde unter Verwendung der korrigierten $\Delta\Delta C(t)$ -Methode bestimmt, wobei GAPDH/18S als interne Kontrolle dienten. Für die Sequenzen der verwendeten Primer siehe Tabelle 5.

Tabelle 5: Sequenzen aller verwendeter Primer

Gen	forw-Primer 5' → 3'	rev-Primer 5' → 3'
<i>Cemip</i> (KO)	5'TCACTATCTCAGGGGGAGGAAA	5'CCTCAAAGGGCAAAGGGCA
<i>Cemip</i>	5'ATCCGATCGGGATAGCAGGA	5'AGCTGCGCAGTTGATGAGAT
<i>Postn</i>	5'CTGAAAAACAGACTCGGGAA	5'AAACTCTGTGGTCTGGCCTCTGGG
<i>Cthrc1</i> V1-3	5'GCTCGGTCTCTTCCTTGTGC	5'TGCTGGTCCTTGTAGACACATT
<i>Acta2</i>	5'CAGGCATGGATGGCATCAATCAC	5'ACTCTAGCTGTGAAGTCAGTGTGC
<i>Col1a1</i>	5'CAGGCTGGTGTGATGGGATT	5'AAACCTCTCTCGCCTCTTGC
<i>Dcn</i>	5'TAAAAGGTCGTGAAAATACAT	5'GAAGTCAAATAAGCCTCTCTG
<i>Vcan</i> pan 2.0	5'ATGGGATTGAAGACACTCAGGA	5'CTGCCCTGTAGTGAAACA
<i>Hspa5</i>	5'TTCAGCCAATTATCAGCAAACCTCT	5'TTTTCTGATGTATCCTCTTCACCACT
<i>Creld2</i>	5'AAGTTCAACCAGGGGATGGC	5'TCTCCAGAAGCCGGATCTCA
<i>Manf</i>	5'GCCAGGAGACTGTGAAGTTTGT	5'CTTTGCCTCTTGCTTCACGG

<i>Ddit3</i>	5'CCACCACACCTGAAAGCAGAA	5'AGGTGAAAGGCAGGGACTCA
<i>Xbp1-s</i>	5'CTGAGTCCGAATCAGGTGCAG	5'GTCCATGGGAAGATGTTC
<i>Vegfa</i>	5'AGCTTCCTACAGCACAGCAG	5'TGAGAGGTCTGGTTCCCGAA
<i>Hif1-α</i>	5'TGACGGCGACATGGTTTACA	5'ACTGGGCCATTTCTGTGTGT
<i>Perk</i>	5'TCTTGGTTGGGTCTGATGAAT	5'GATGTTCTTGCTGTAGTGGGGG
<i>Atf4</i>	5'GCATGCTCTGTTTCGAATGGA	5'CCAACGTGGTCAAGAGCTCAT

2.6 Migrations-Assay

Um Unterschiede zwischen *Cemip*-defizienten murinen kardialen Fibroblasten gegenüber *Cemip* exprimierenden Fibroblasten zu untersuchen wurden kardiale Fibroblasten aus 12-16 Wochen alten C57BL/6J Tieren mittels Mincing Methode isoliert und kultiviert. Die Zellen wurden in *Culture-Inserts* (Culture-Insert 2 Well in μ -Dish 35 mm von ibidi GmbH, Gräfelfing, Deutschland) ausgesät. Es wurden 27.500 Zellen in 70 μ l Medium pro *Insert* Seite ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit *Cemip* siRNA beziehungsweise mit der Negativ Kontrolle transfiziert. Die Zellen wurden anschließend für 24 h in Hungermedium inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die *Inserts* entfernt, sodass eine definierte zellfreie Lücke von 500 μ m entstand. Eine Aufnahme der entstandenen zellfreien Fläche wurde direkt nach Entfernen der *Inserts* unter dem Mikroskop ZEISS Axio.Vert (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland) aufgenommen. Diese diente als Referenzwert für die Auswertung. Pro biologischem N wurden 2 Replikate analysiert. Die Aufnahmen wurden nach 6, 12 und 24 h wiederholt. Anschließend wurde die zellfreie Fläche mittels ImageJ (National Institute of Health) gemessen und der prozentuale Anteil über die Zeit berechnet. Es wurde der Mittelwert beider Replikate für die anschließende Auswertung verwendet.

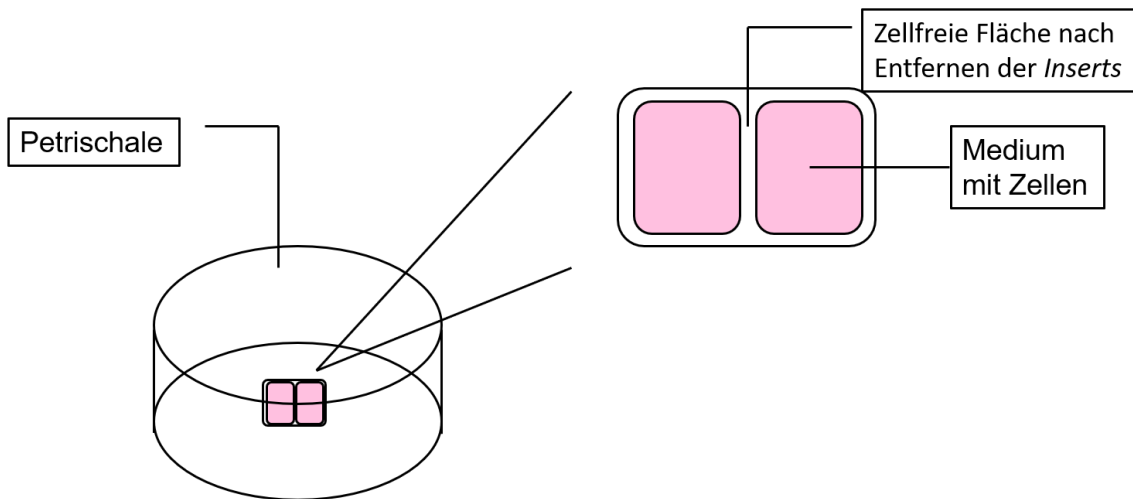


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Migrations-Assays.

Murine kardiale Fibroblasten wurden aus 12-16 Wochen alten C57BL/6J Tieren mittels *Mincing*-Methode isoliert und kultiviert. 27.500 Zellen wurden in 70µl Medium pro Insert Seite ausgesät. Die Inserts wurden entfernt, sodass eine definierte zellfreie Fläche zwischen beiden Zelllayern entstand, die zellfreie Fläche wurde nach 0 h (Referenzwert), 6 h, 12 h und 24 h unter dem Mikroskop aufgenommen.

2.7 ER-Stress Experimente

Um den Einfluss von ER-Stress auf kardiale Fibroblasten zu untersuchen wurden primäre kardiale Fibroblasten mittels *Minicing*-Methode isoliert, kultiviert und mit den ER-Stressoren Thapsigargin und Tunicamycin (siehe Abschnitt 1.7.1) behandelt. Die Zellen wurden anschließend sowohl mittels Genexpressionsanalyse untersucht als auch in ihrer Viabilität mittels Durchflusszytometrie und Resazurin Färbung charakterisiert.

Zur Untersuchung der Viabilität wurde ein Annexin V Assay durchgeführt. Zuvor wurden verschiedene Konzentrationen an Thapsigargin/Tunicamycin an den Zellen getestet, um eine optimale Konzentration für die Untersuchung der Zellen zu gewährleisten.

2.7.1 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie (*Fluorescence activated cell scanning* (FACS)) wurde zur Untersuchung der Apoptose von kardialen Fibroblasten verwendet. Die Messungen erfolgten an einem BD LSR Fortessa™ Cell Analyser.

Die Datenauswertung erfolgte mit Hilfe der FlowJo™ Software (BD Franklin Lakes, NJ,

USA). Alle verwendeten Puffer-Lösungen und Reagenzien sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Verwendete Substanzen in der Durchflusszytometrie

Substanz	Zusammensetzung	Katalognummer	Hersteller
PE/Cyanine7 Annexin V	-	640950	Thermo Fisher scientific, Massachusetts, US
7-AAD	-	A1310	Thermo Fisher scientific, Massachusetts, US
Isotone FACS Trägerflüssigkeit	Wasser (97,8 %), Natriumchlorid Kaliumchlorid, Kaliumphosphat monobasisch Dinatriumhydrogen- phosphat 2- Phenoxyethanol Natriumfluorid	342003	BD Bioscience, San Jose, CA, US
Annexin Binding buffer	0.1 M Hepes-Puffer pH 7,4 (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinyl)- ethansulfonsäure) 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl ₂	422201	Biolegend, San Diego, US
Cell staining buffer	PBS FBS NaN ₃	420201	Biolegend, San Diego, US

2.7.2 Annexin V Färbung apoptotischer Zellen

Murine kardiale Fibroblasten wurden aus C57BL/6J Mäusen mittels *Mincing*-Methode isoliert, kultiviert und mit 6,5 ng/ml Thapsigargin behandelt. Nach Erreichen der gewählten Behandlungsdauer wurde der Annexin Assay durchgeführt um den Anteil an apoptotischen gegenüber lebenden aber auch bereits nekrotischen Zellen zu bestimmen. Dazu wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 2 ml DPBS gewaschen, DPBS wurde anschließend entfernt. Es wurden 4 ml Accutase (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) hinzu pipettiert und bei 37°C inkubiert, bis die Zellen sich ablösten. Anschließend wurden 4 ml DMEM (+ 10% FBS und 1% PS) hinzugefügt und vorsichtig auf- und abpipettiert um weitere Zellen vom Petrischalen-Boden abzulösen. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon überführt und für 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden mit kaltem *Cell staining buffer* (Biolegend, San Diego, US) gewaschen und erneut

für 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgesaugt und der Waschvorgang ein weiteres Mal wiederholt. Der Überstand wurde anschließend wieder entfernt und die Zellen in *Annexin Binding buffer* (Biolegend, San Diego, US) zu einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml resuspendiert.

Im Anschluss wurden 100 µl der Zellsuspension in ein 5 ml Teströhrchen überführt. Es wurden 0,5 µl des Fluorochrom-konjugierten Annexin V (Thermo Fisher scientific, Massachusetts, US) und 0,1 µl 7-AAD (Thermo Fisher scientific, Massachusetts, US) hinzugefügt. Um ein fehlerfreies Pipettieren zu ermöglichen wurde 7-AAD zuvor in verdünnt, sodass 1 µl pipettiert werden konnten. Die Zellsuspension wurde sanft vortexiert und 15 Minuten lang bei Raumtemperatur (25 °C) im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurde zu jedem Teströhrchen 400 µl *Annexin Binding buffer* pipettiert. Die Analyse erfolgte anschließend am Durchflusszytometrie Gerät BD LSR Fortessa™ Cell Analyser und die Auswertung mittels FlowJo-Software wie unter 2.7.1 beschrieben.

2.7.3 Resazurin Färbung

Murine kardiale Fibroblasten wurden zur Untersuchung ihrer Viabilität mit Hilfe des Farbstoffs Resazurin untersucht.

Die chemische Struktur von Resazurin besteht aus einem heterozyklischen System, das in seiner oxidativen Form eine schwach blaue Farbe aufweist. Wenn lebende Zellen mit Resazurin in Kontakt kommen, reduzieren sie den Farbstoff zu seiner fluoreszierenden Form, Resorufin, durch metabolische Prozesse wie die mitochondrialen Atmungskette und den NADH/NADPH-Stoffwechsel. Resorufin zeigt dann eine intensiv rosa bis rote Farbe, sowie eine Fluoreszenz die proportional zur metabolischen Aktivität der Zellen ist. Der Farbstoff ist nicht toxisch für die Zellen und wird dem Medium hinzugefügt. Die Zellen wurden zur Analyse auf eine 24-Wellplate ausgesät und für 1 h mit Resazurin bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Intensität der Fluoreszenz (560/590nm) als auch die Absorption (bei 570nm) gemessen. Die Messungen wurden mit dem Microplate-Reader Synergy Mx (BioTek Instruments, Vermont, US) durchgeführt.

2.8 Histologische Analysen

Zur Untersuchung der murinen Herzen post MI wurden die Herzen der Tiere 3 Wochen nach Infarkt entnommen und histologisch untersucht. Nach Erreichen der Reperfusionszeit erfolgte die schmerzfreie Euthanasie der Tiere. Das Herz wurde entnommen und von angrenzenden Gefäßen, wie der Aorta, der Lungenarterie und der oberen Hohlvene befreit. Das Herz wurde in DPBS transferiert um es von restlichem Blut zu befreien. Anschließend wurde es für 24 Stunden in einer 4 % Formaldehydlösung (ROTI® Histofix 4 %, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gelagert um es zu fixieren. Die Herzen wurden im Anschluss dehydratisiert und konnten dann in Paraffin eingebettet werden. Die eingebetteten Herzen wurden daraufhin mithilfe eines Rotationsmikrotoms (RM2255, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) in Schnitte von 5 µm geschnitten. Jedes Herz wurde in aufeinanderfolgende Ebenen bestehend aus 50 µm geschnitten, wobei die erste Ebene als am Apex des Herzens beginnend definiert wurde und die letzte Ebene als Klappenebene des Herzens. Zwischen den Ebenen wurden jeweils 300 µm verworfen. Die resultierenden Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und dann über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und am darauffolgenden Tag für 60 Minuten bei 60°C in einem Inkubator hitzefixiert. Zu Beginn jeder Färbung wurden die Schnitte durch eine absteigende Ethanol Reihe entparaffiniert. Dazu wurden die Proben in drei aufeinanderfolgenden Schritten jeweils 15 Minuten in Roticlear® (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte nacheinander für jeweils 2 Minuten in 100 %, 95 % und 75 % Ethanol inkubiert.

Tabelle 7: Nicht-kommerziell verwendete Lösungen für histologische Färbungen

Lösung	Zusammensetzung
Gomori Färbelösung	0,4 % (m/V) Chromotrop 2 R 0,3 % (m/V) Anilinblau 1 % (V/V) Eisessig 0,8 % Phosphorwolframsäure in destilliertem Wasser
Celestine Blau Lösung	5 % (m/V) $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 0,5 % (m/V) Celestine Blau 14 % (V/V) Glycerol in destilliertem Wasser
Picrosiriusrot Lösung	0,1 % (m/V) Siriusrot in gesättigter Pikrinsäurelösung

2.8.1 Gomori Trichrom Färbung

Alle Ebenen der Herzen wurden mittels Gomori-Trichrom-Färbung gefärbt. Bei dieser Färbetechnik werden Muskelfasern in Rot, Zellkerne in Schwarz und die kollagenhaltige Matrix in Blau dargestellt. Vor der Färbung wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert und rehydratisiert. Dies erfolgte wie bereits beschrieben durch zweimaliges 15-minütiges Inkubieren in Roticlear®, gefolgt von jeweils zweimal 5 Minuten Inkubation in absolutem Ethanol, 95 % Ethanol, 70 % Ethanol und destilliertem Wasser. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Inkubation in Bouin's Lösung (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) bei 58 °C im Wasserbad. Nach einer 5-minütigen Spülung mit fließendem Leitungswasser wurde die Färbung mit Weigert's Eisenhämatoxylin-Lösung (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) für 5 Minuten durchgeführt, gefolgt von einer erneuten 5-minütigen Spülung mit Leitungswasser. Daraufhin erfolgte eine 25-minütige Inkubation in der Gomori-Färbelösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 7), gefolgt von einer weiteren Spülung mit Leitungswasser. Danach erfolgte die zweimalige 2-minütige Differenzierung in 0,5 % Essigsäure. Abschließend wurden die Schnitte zweimal für 2 Minuten in Ethanol 70 %, einmal in Ethanol 69 %, zweimal in Ethanol absolut und zweimal in Roticlear® entwässert, bevor sie mit ROTI®Mount eingedeckt wurden. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung von ImageJ.

Die Gomori Trichrom Färbung wurde von Angelika Pastuschka durchgeführt.

2.8.2 Picrosiriusrot Färbung

Zur Färbung von Kollagen mit Picrosiriusrot wurden die Schnitte gemäß den Vorgaben in Abschnitt 2.8 zunächst entparaffiniert und rehydratisiert. Nach dem Waschen mit DPBS erfolgte eine einminütige Inkubation in destilliertem Wasser, gefolgt von einer siebenminütigen Inkubation in einer Celestine-Blau-Lösung (siehe Tabelle 7). Anschließend erfolgte eine Differenzierung durch kurzes Eintauchen in 1 % Salzsäure, woraufhin die Schnitte für 5 Minuten in Leitungswasser gebläut wurden. Danach wurden sie in die Picrosiriusrot-Färbelösung überführt (siehe Tabelle 7) und für 30 Minuten gefärbt. Die Schnitte wurden anschließend mit Ethanol 70 %, Ethanol 95 % und Ethanol absolut für je 2 Minuten sowie mit Roticlear® für 5 Minuten entwässert, bevor sie mit ROTI®Mount eingedeckt wurden. Mikroskopische Aufnahmen wurden anschließend sowohl im einfachen Durchlicht als auch im polarisierten aufgenommen, die Auswertung erfolgte mittels Bildverarbeitungsprogramm ImageJ (National Institute of Health).

2.8.3 Durchlichtmikroskopie

Es wurden Durchlichtaufnahmen der Schnitte sowohl von der Gomori Trichrom als auch von der Picrosiriusrot Färbung angefertigt. Bei der Gomori Trichrom Färbung stellte sich gesundes Gewebe rot dar, während infarziertes Gewebe blau erschien. Bei der Picrosiriusrot Färbung stellt sich gesundes Herzgewebe gelb dar, wobei Kollagen rot angefärbt wird. Für alle Aufnahmen wurde das Keyence Mikroskop BZ-X800 (Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland) verwendet.

2.8.4 Polarisationsmikroskopie

Die Schnitte der Picrosiriusrot Färbung wurden zusätzlich in linear polarisiertem Licht aufgenommen. Im polarisierten Licht erscheinen Kollagenfasern vom Typ I gelb-orange und vom Typ III grün. Die Aufnahmen erfolgten auch hier mit dem Keyence Mikroskop BZ-X800.

2.9 Statistik

Die statistische Analyse sämtlicher Auswertungen erfolgte unter Verwendung von GraphPad Prism, Version 9.4.1 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Alle *in-vivo*-Daten repräsentieren biologisch und technisch unabhängige Replikate und werden als Durchschnittswert plus/minus Standardabweichung (SD) angegeben. Ebenso handelte es sich bei allen *in-vitro*-Daten um technisch unabhängige Replikate, dargestellt ebenfalls als Mittelwert plus/minus SD. Alle Datensätze wurden durch die ROUT (*Robust regression and Outlier removal Test*) Methode auf Ausreißer hin überprüft (Q = 1%), statistische Ausreißer wurden dann von der Analyse ausgeschlossen. Zusätzlich wurden alle Datensätze mit dem D'Agostino & Pearson Test auf Normalverteilung getestet. Bei Vergleichen von normalverteilten, experimentellen Gruppen wurde der ungepaarte, zweiseitige Student's t-Test angewendet. Für nicht normalverteilte Daten oder Gruppen $n < 8$ kamen der nicht parametrische, ungepaarte, zweiseitige Mann-Whitney U-Test zum Einsatz. Für multifaktorielle Analysen wurde eine statistische Analyse mittels *OneWay* ANOVA (*One-Way Analysis of Variance*) durchgeführt, wenn zuvor eine Normalverteilung statistisch nachgewiesen werden konnte. War die Annahme der Normalverteilung nicht erfüllt, wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test für multifaktorielle Analysen durchgeführt. Zum Vergleich mehrerer Gruppen über einen Zeitverlauf wurde der *TwoWay* ANOVA-Test verwendet. Bei allen Tests wurde ein p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet. Bei den angegebenen n-Zahlen repräsentiert jedes n ein einzelnes Tier.

3 Ergebnisse

3.1 *Cemip* mRNA Hochregulierung post kardialer Ischämie/Reperfusion

Als Ausgangspunkt für die vorliegende wissenschaftliche Arbeit wurde untersucht, wie die *Cemip* mRNA Expression post MI im Herzgewebe reguliert ist. Mäuse des Stammes C57BL/6J wurden dazu im Alter von 12 Wochen einer Schein-Operation oder einer I/R-Operation unterzogen. Das Herz der Tiere wurde 24 h, 72 h, 1 w, 2 w und 3w nach Infarkt entnommen, anschließend wurde der infarzierte Bereich des linken Ventrikels abgetrennt und einer Genexpressionsanalyse unterzogen.

Die *Cemip* mRNA Expression zeigt im infarzierten Bereich des linken Ventrikel einen signifikanten Anstieg post I/R, mit einem maximalen Wert 72 h nach Infarkt verglichen mit den Schein-Kontrollen (24 h). Die *Cemip* mRNA Expression steigt zu diesem Zeitpunkt auf einen mittleren Wert von 20,0 dargestellt als Vielfaches der Kontrolle. Die mRNA Expression sinkt anschließend wieder auf ein nicht signifikantes Niveau drei Wochen nach Infarkt (siehe Abbildung 5 B).

Cemip wird in infarzierten Herzen somit signifikant hochreguliert, das Maximum der mRNA Expression fällt dabei in den Übergang von der inflammatorischen zur proliferativen Phase.

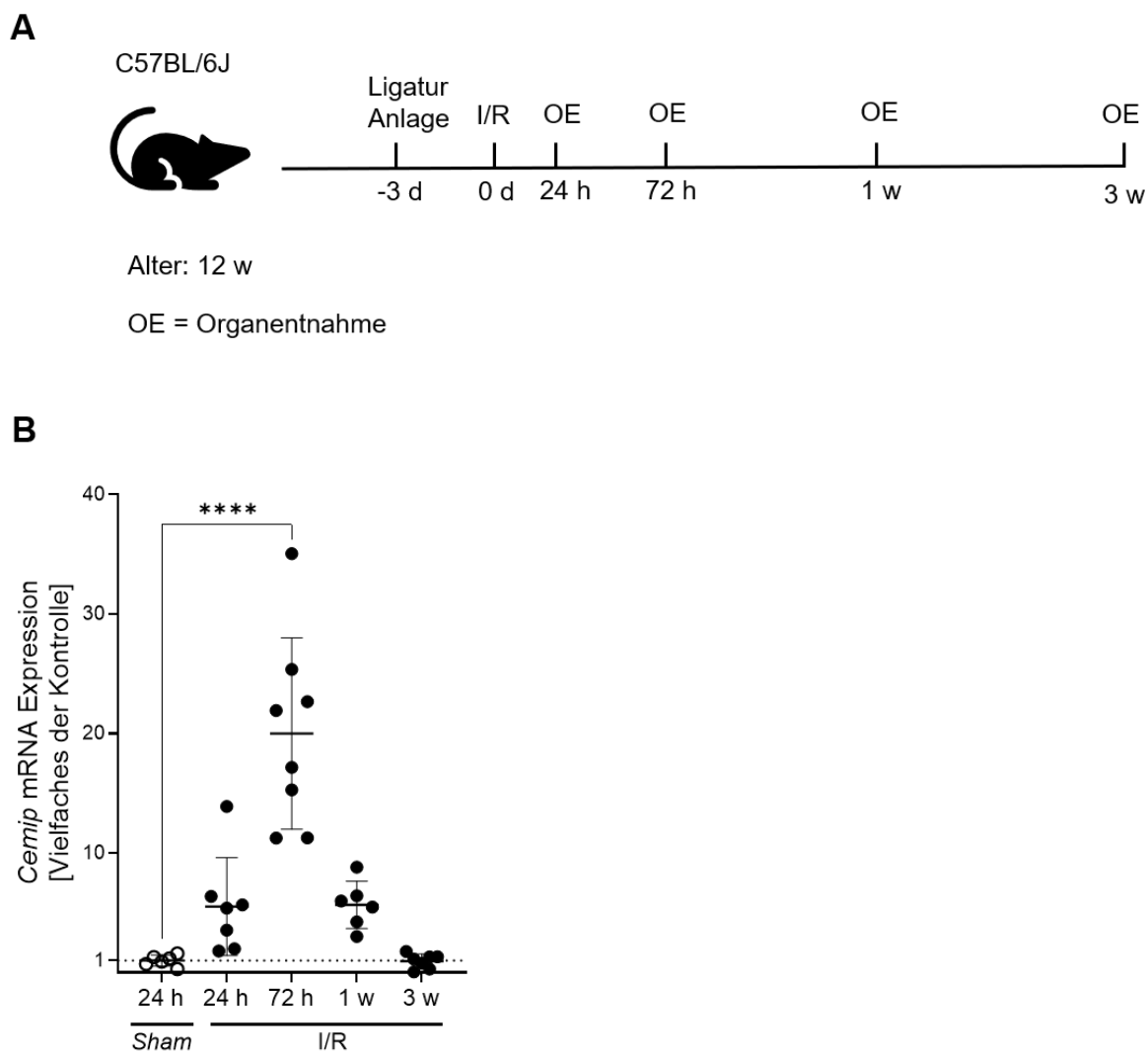


Abbildung 5: Cemip mRNA Expression im infarzierten Herzen.

C57BL/6J-Mäuse erhielten im Alter von 12 Wochen die Ligatur Anlage und drei Tage danach I/R (Infarkt/Reperfusion). Die Herzen wurden 24 h, 72 h, 1 w, und 3 w post I/R entnommen. Der linke Ventrikel des infarzierten Bereichs wurde in der Genexpressionsanalyse untersucht. **A.** Schematischer Versuchsaufbau, **B.** Cemip-mRNA-Expression, ausgedrückt als Vielfaches der Kontrolle. Zur Analyse der mRNA-Expression wurde GAPDH als interne Kontrolle verwendet. Die Daten repräsentieren den Mittelwert $\pm$ SD; n = 6-8, Kruskal-Wallis-Test, Dunn's multiple comparisons test, **** P < 0,0001.

3.2 Validierung des *Cemip* Knock-outs

Zur Validierung des verwendeten Tiermodells und zum Nachweis einer ausreichenden Defizienz von *Cemip*, wurden kardiale Fibroblasten aus weiblichen Mäusen der Linie 9425 mit den Genotypen CAGG-Cre-ER^{TM+/-} *Cemip*^{fl/fl} und CAGG-Cre-ER^{TM-/-} *Cemip*^{fl/fl} isoliert und kultiviert. Die Zellen wurden anschließend für 24 h mit 4-Hydroxy-Tamoxifen behandelt und anschließend einer Genexpressionsanalyse unterzogen. Hierbei zeigte sich eine signifikante Reduktion der *Cemip* mRNA Expression in den Zellen aus CAGG-Cre-ER^{TM+/-} *Cemip*^{fl/fl} isolierten Tieren gegenüber Zellen der CAGG-Cre-ER^{TM-/-} *Cemip*^{fl/fl} Tiere, was die Effektivität des genetischen *Cemip* Knock-outs (KO) bestätigte. Die *Cemip* mRNA Expression wurde im Mittel auf 0,24 angegeben als Vielfaches der Kontrolle gesenkt.

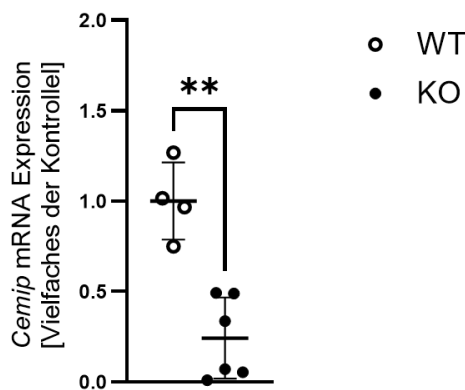


Abbildung 6: *Cemip* mRNA Expression in murinen kardialen Fibroblasten.

Die Fibroblasten wurden mittels Mincing Methode isoliert und in DMEM 1g/L Glukose, 10% FBS und 1% Penicillin-Streptomycin kultiviert, anschließend 24 h gehungert und 24 h mit 4-Hydroxytamoxifen behandelt. Gezeigt ist die *Cemip* mRNA Expression als Vielfaches der Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SD; n=4-6, Mann Whitney test; ** P < 0.01.

3.3 Einfluss verschiedener Stimulationsfaktoren auf die *Cemip* mRNA Expression in kardialen Fibroblasten

Zur Untersuchung der *Cemip* mRNA Expression unter verschiedenen Bedingungen wurden kardiale Fibroblasten aus C57BL/6J Mäusen mittels Langendorff Methode isoliert, kultiviert und anschließend für 24 h (wenn nicht anders angegeben) mit den in Tabelle 8 aufgeführten Substanzen behandelt beziehungsweise der gewählten Versuchsbedingung ausgesetzt. Die Zellen wurden anschließend in TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, US) lysiert, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Genexpression wurde mittels *Realtime*-PCR

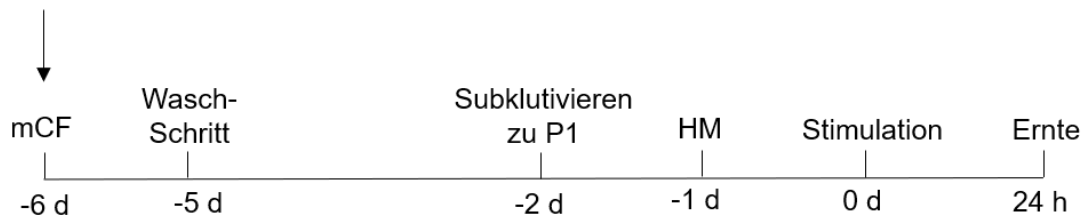
analysiert. Abbildung 7 B-D zeigt die mRNA Expression von *Cemip*, *Postn* und *Cthrc1* unter TNF- α , IL-1, Hyper-IL-6 (Fusionsprotein des löslichen Interleukin-6 Rezeptors und Interleukin-6) sowie Thapsigargin Behandlung. *Cemip* zeigt hier eine signifikant verringerte Expression unter Thapsigargin Zugabe. Abbildung 7 E-G zeigt eine erneute Serie bei welcher ebenfalls die mRNA Expression der Gene *Cemip*, *Postn* und *Cthrc1* untersucht wurde. Hier wurden neben TGF- β 1 auch antifibrotische Substanzen getestet wie Pirfenidon, *Bone morphogenetic protein 7* (BMP-7) sowie Relaxin 2 und 3. Allein TGF- β 1 zeigte eine signifikante Auswirkung auf die *Cemip* mRNA Expression. So war *Cemip* 24 h nach TGF- β 1-Zugabe signifikant reduziert, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. *Cthrc1* zeigte als Aktivierungsmarker für Fibroblasten unter TGF- β 1-Zugabe eine signifikante Hochregulierung verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Alle anderen Substanzen zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die *Cemip* Expression. Die *Cemip* mRNA Expression wurde ebenfalls an isolierten kardialen Fibroblasten untersucht, welche einer Hypoxie ausgesetzt wurden (Daten nicht gezeigt), hier zeigten sich nach 24 h als auch nach 72 h keine signifikanten Auswirkungen auf die *Cemip* mRNA Expression (siehe Tabelle 8). Es wurde außerdem die Auswirkung von Glukose-Mangel auf die *Cemip* Expression in Fibroblasten untersucht. Dazu wurden isolierte Zellen mit 0% Glukose Medium (DMEM, ohne Glucose von Gibco® Life Technologies, Paisley, UK) für 24 h, 48 h und 72 h behandelt. Hier zeigte sich ebenfalls keine signifikante Änderung in der *Cemip* mRNA Expression (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 8: *Cemip* mRNA Expression unter verschiedenen Versuchsbedingungen

Bedingung	Konzentration [ng/ml]	<i>Cemip</i> mRNA Expression
TGF- β 1	10	↓
TNF- α	20	ns
IL-1	10	ns
Hyper-IL-6	10	ns
Thapsigargin	650	↓
Hypoxie (alle Zeitpunkte)		ns
0% Glucose (alle Zeitpunkte)		ns
Pirfenidone	1000	ns
BMP-7	1nM	ns
Relaxin 2	100	ns
Relaxin 3	100	ns

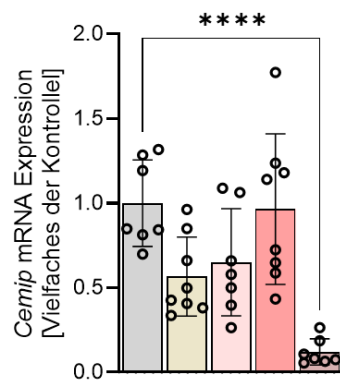
A

Langendorff

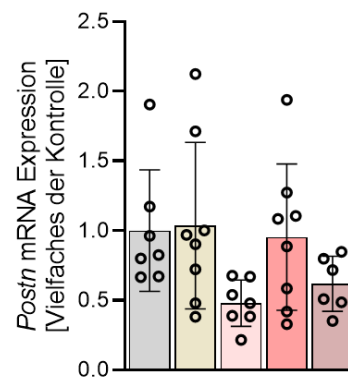


HM = Hungermedium

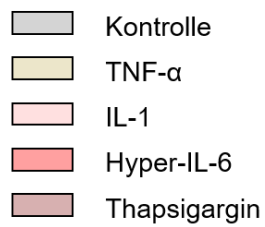
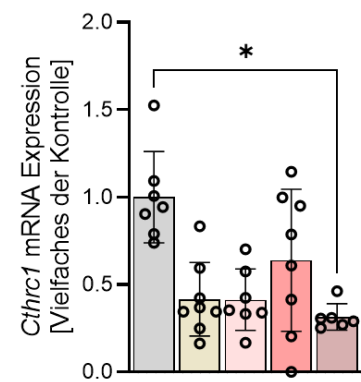
B



C



D



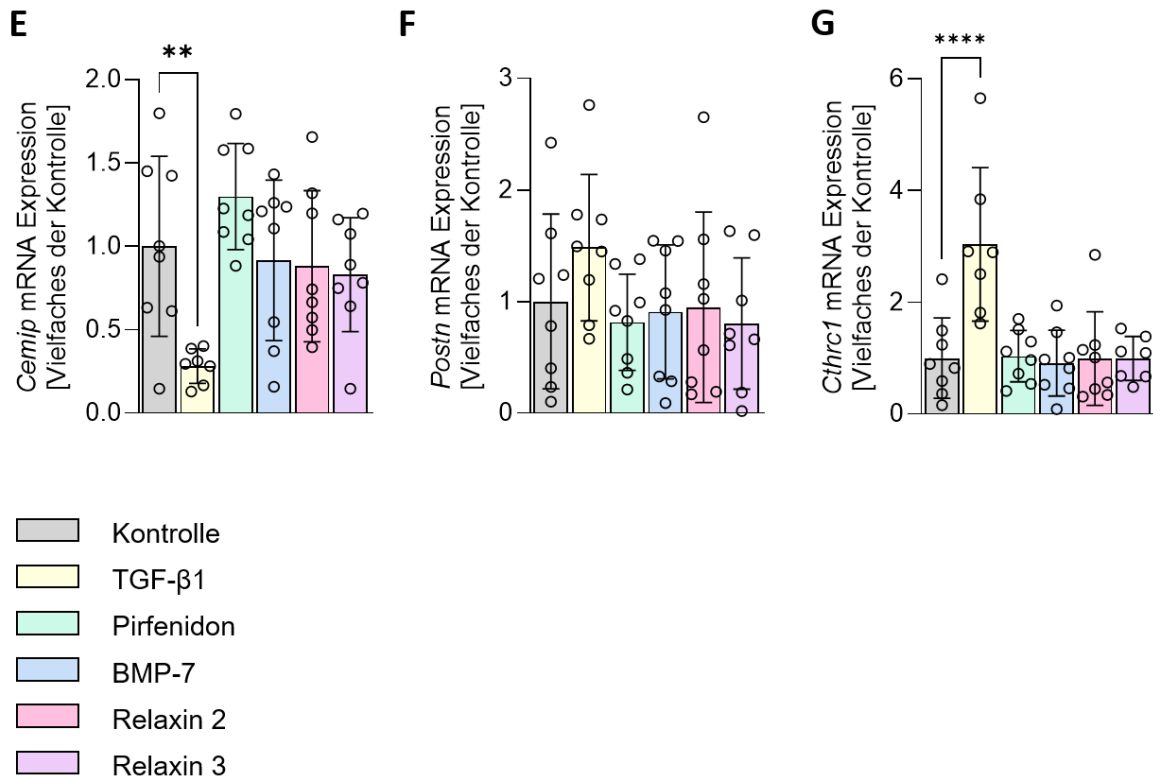


Abbildung 7: Analyse der *Cemip* mRNA Expression in murinen kardialen Fibroblasten unter verschiedenen Bedingungen.

Primäre kardiale Fibroblasten wurden aus 12–16 Wochen alten C57BL/6J-Mäusen isoliert und mit DMEM (1 g/L Glucose, 10 % FBS und 1 % PS) kultiviert, für 24 h gehungert (DMEM 1 g/L Glucose, 1 % FBS und 1 % PS) und anschließend für 24 h mit den Substanzen TGF- β 1 [10ng/ml], TNF- α [20ng/ml], IL-1 [10ng/ml], Hyper-IL-6 [10ng/ml] und Thapsigargin [650ng/ml] behandelt (**B-D**). In einer zweiten Serie wurden die Zellen in einem gleichen Versuchsaufbau mit TGF- β 1 [10ng/ml], Pirfenidon [1000ng/ml], BMP-7 [1nM], Relaxin 2 [100ng/ml] und Relaxin 3 [100ng/ml] behandelt (**E-G**). **A.** Schematischer Versuchsaufbau. **B.** *Cemip*-mRNA-Expression. **C.** *Postn*-mRNA-Expression. **D.** *Cthrc1*-mRNA-Expression. **E.** *Cemip*-mRNA-Expression. **F.** *Postn*-mRNA-Expression. **G.** *Cthrc1*-mRNA-Expression. Alle mRNA Expressionen sind ausgedrückt als Vielfaches der Kontrolle. Zur Analyse der mRNA-Expression wurde 18S als interne Kontrolle verwendet. Die Daten repräsentieren den Mittelwert $\pm$ SD; n = 6-8, Kruskal-Wallis-Test, Dunn's multiple comparisons test. * P < 0,05; ** P < 0,01; **** P < 0,0001.

3.4 Versuche an *Cemip*-defizienten murinen kardialen

Fibroblasten mittels siRNA

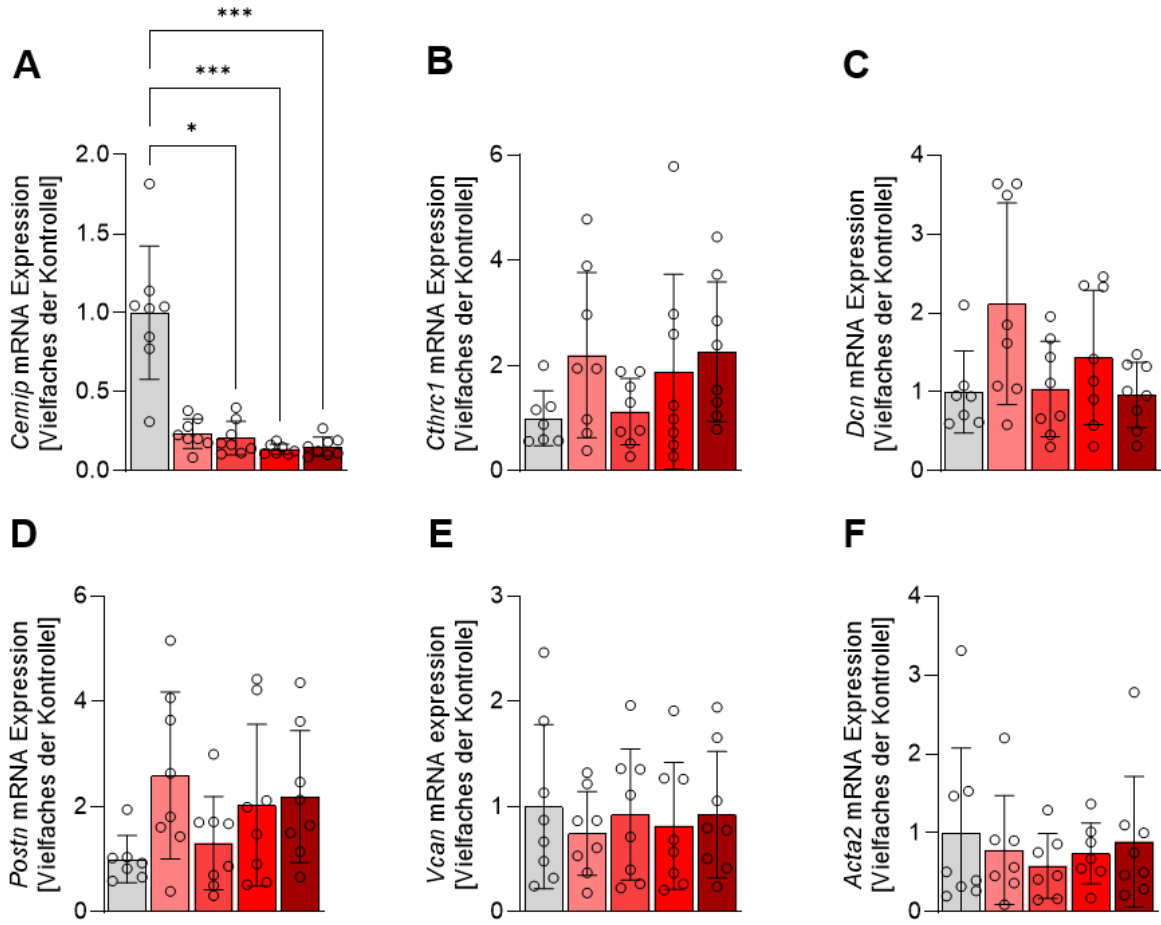
Murine kardiale Fibroblasten wurden unter Verwendung der Mincing Methode aus 12-16 Wochen alten C57BL/6J Mäusen isoliert und kultiviert. Die Zellen wurden anschließend subkultiviert zu Passage P1, in welcher die Transfektion mit der gegen *Cemip* gerichteten siRNA, wie unter 2.3.5 beschrieben erfolgte.

3.4.1 Genexpressionsanalyse von *Cemip*-defizienten murinen kardialen

Fibroblasten

Um den Phänotypen der *Cemip*-defizienten kardialen Fibroblasten gegenüber *Cemip*-exprimierenden Fibroblasten und eine erfolgreiche *Cemip*-Deletion zu untersuchen wurde eine Genexpressionsanalyse nach erfolgter Transfektion durchgeführt. Hierbei wurden vier verschiedene siRNAs (Qiagen, Venlo, Niederlande) getestet. Die Zellen wurden dazu nach Transfektion 24 h gehungert, anschließend mit TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, US) lysiert und mittels quantitativer Echtzeit-PCR analysiert. Die *Cemip* mRNA Expression zeigte hier wie erwartet eine signifikante Reduktion (siehe Abbildung 8) gegenüber der Negativ-Kontrolle bei allen vier verwendeten siRNAs. Zusätzlich wurde die Expression weiterer Gene wie beispielsweise *Postn*, *Acta2* als Fibroblasten Aktivierungsmarker oder *Hspa5* und *Creld2* als ER-Stress-Marker untersucht.

Durch die *Cemip*-Deletion alleine konnten keine signifikanten Unterschiede in den untersuchten Genexpressionsmustern zwischen *Cemip*-defizienten kardialen Fibroblasten und *Cemip*-exprimierenden Fibroblasten (Negativ Kontrolle) festgestellt werden (siehe Abbildung 8).



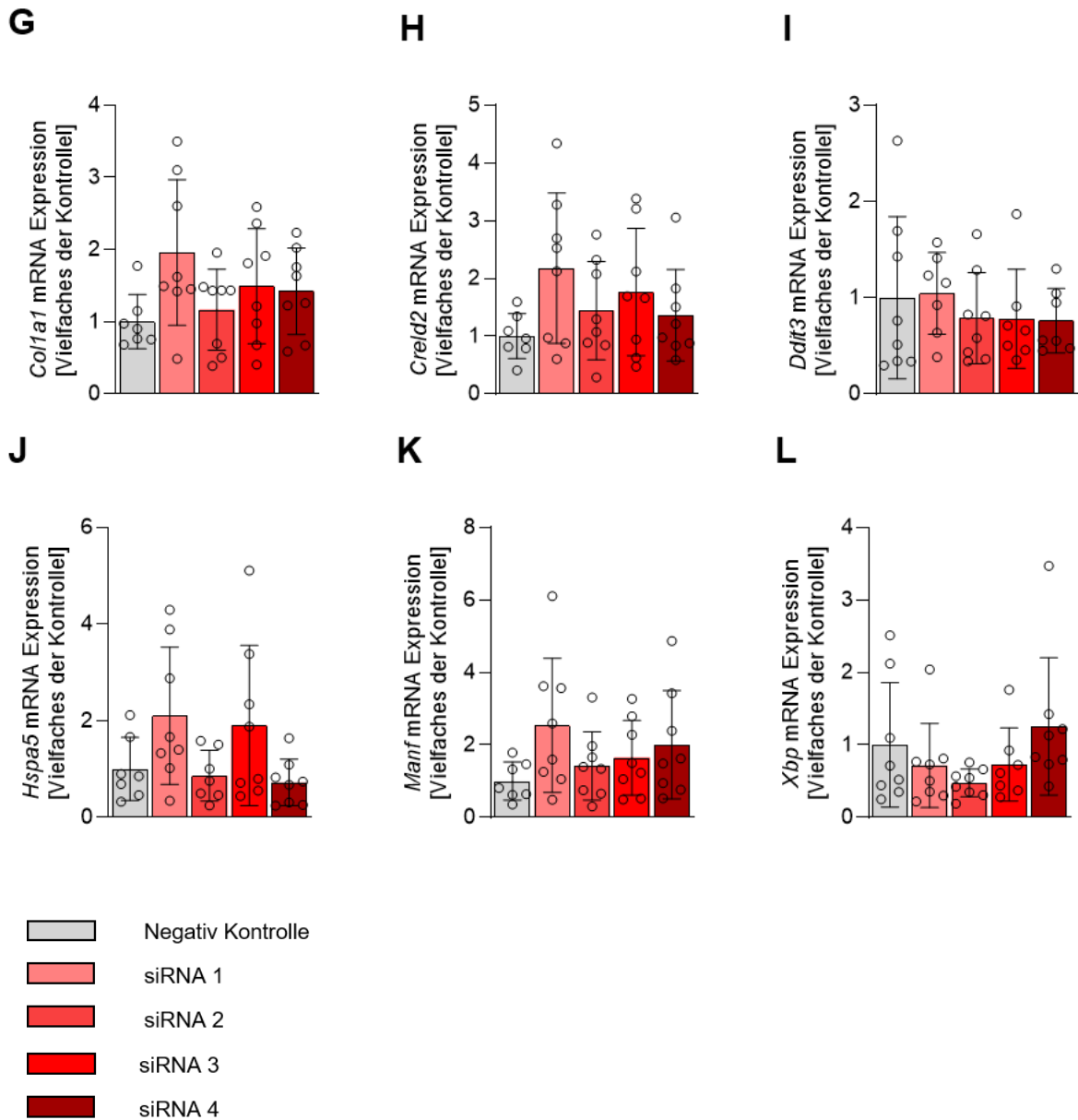


Abbildung 8: Analyse von Genexpressionsmustern in *Cemip*-defizienten murinen kardialen Fibroblasten

Primäre kardiale Fibroblasten wurden aus 12–16 Wochen alten C57BL/6J-Mäusen isoliert, mit DMEM (1 g/L Glucose, 10 % FBS und 1 % PS) kultiviert, dann subkultiviert, anschließend mit *Cemip* siRNA 1-4 [10 nM] transfiziert und 24 h gehungert (DMEM 1 g/L Glucose, 1 % FBS und 1 % PS). **A-L.** *Cemip/Cthrc1/Dcn/Postn/Vcan/Acta2/Col1a1/Crel2/Ddit3/Hspa5/Manf/Xbp1* mRNA Expression, alle ausgedrückt als Vielfaches der Kontrolle. Für die Analyse der mRNA-Expression wurde 18S als interne Kontrolle verwendet. Die Daten stellen den Mittelwert $\pm$ SD dar; n = 8, Kruskal-Wallis-Test, Dunn's multiple comparisons test, * P < 0,05; *** P < 0,001.

3.5 Genexpressionsanalyse von *Cemip*-defizienten murinen kardialen Fibroblasten unter TGF- β 1 Zugabe

Um Unterschiede zwischen *Cemip*-defizienten kardialen Fibroblasten gegenüber *Cemip*-exprimierenden Fibroblasten zu identifizieren wurde eine Genexpressionsanalyse nach erfolgter Transfektion mit *Cemip* siRNA und anschließender TGF- β 1 [10ng/ml] Behandlung durchgeführt. Hier wurde nur noch eine der zuvor getesteten siRNAs verwendet (siehe Tabelle 3). Die kardialen Fibroblasten wurden nach erfolgter Transfektion 24 h gehungert und anschließend für 3 h, 6 h und 24 h mit TGF- β 1 [10ng/ml] inkubiert. Die *Cemip* mRNA-Expression zeigte auch hier eine signifikante Reduktion, bei allen drei Zeitpunkten unter Behandlung mit *Cemip* siRNA.

Des Weiteren wurden hier vor allem Fibroblasten-Aktivierungsmarker wie *Postn*, *Acta2* und *Cthrc1* untersucht, da ein möglicher Unterschied in der Antwort auf TGF- β 1 zwischen den *Cemip*-defizienten und -exprimierenden Fibroblasten analysiert werden sollte. Hier zeigten sich signifikante Unterschiede sowohl nach 3 stündiger als auch nach 24 stündiger TGF- β 1-Inkubation (siehe Abbildung 9). Nach 3-stündiger TGF- β 1 Inkubation zeigte sich eine signifikant geringere *Acta2* mRNA Expression in *Cemip*-defizienten Fibroblasten gegenüber der Negativ-Kontrolle, was auf eine verminderte Aktivierung der Zellen hindeutet. Nach 24 h zeigte sich ein genau gegenteiliger Effekt, hier war eine signifikant höhere mRNA Expression bei *Cthrc1* in den *Cemip*-defizienten Fibroblasten gegenüber der Negativ Kontrolle erkennbar, was auf eine erhöhte Aktivierung und einen Phänotypen-Wechsel hin zum Myofibroblasten hindeutet.

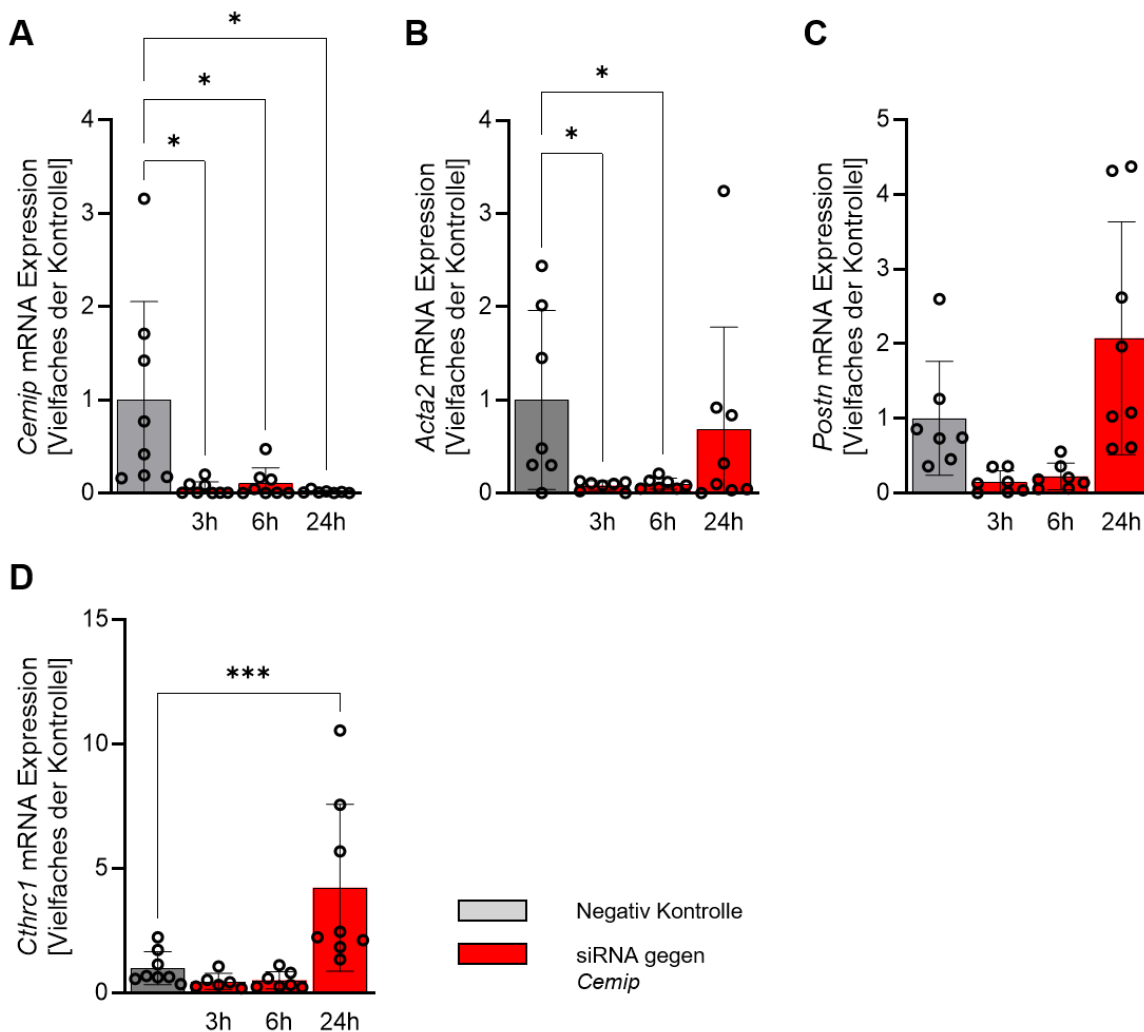


Abbildung 9: Analyse von Genexpressionsmustern in *Cemip*-defizienten murinen kardialen Fibroblasten unter TGF- β 1 Behandlung.

Primäre kardiale Fibroblasten wurden aus 12–16 Wochen alten C57BL/6J-Mäusen isoliert, mit DMEM (1 g/L Glucose, 10 % FBS und 1 % PS) kultiviert, dann subkultiviert, anschließend mit *Cemip* siRNA [10 nM] transfiziert und 24 gehungert (DMEM 1 g/L Glucose, 1 % FBS und 1 % PS) und für 3 h, 6 h und 24 h mit TGF- β 1 [10 ng/ml] behandelt. **A.** *Cemip* mRNA Expression, **B.** *Acta2* mRNA Expression, **C.** *Postn* mRNA Expression, **D.** *Cthrc1* mRNA Expression, alle ausgedrückt als Vielfaches der Kontrolle. Für die Analyse der mRNA-Expression wurde 18S als interne Kontrolle verwendet. Die Daten stellen den Mittelwert $\pm$ SD dar; n = 8, Kruskal-Wallis-Test, Dunn's multiple comparisons test, * P < 0,05; *** P < 0,001.

3.6 ER-Stress Experimente

Um mögliche Einflüsse von CEMIP auf den ER-Haushalt und den Einfluss von ER-Stress auf die *Cemip* mRNA Expression zu analysieren, wurden murine kardiale Fibroblasten mit chemischen ER-Stressoren behandelt.

Hierzu wurde neben Thapsigargin ein weiterer ER-Stressor untersucht, Tunicamycin, welcher einen von Thapsigargin abweichenden ER-Stress auslösenden Mechanismus aufweist (siehe unter 1.7.1). Tunicamycin zeigte im Gegensatz zu Thapsigargin jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die *Cemip* mRNA Expression (siehe Abbildung 10).

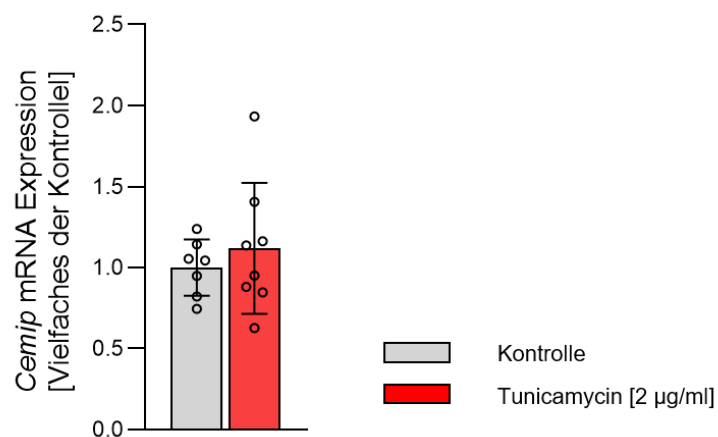


Abbildung 10: Analyse der *Cemip* mRNA Expression in murinen kardialen Fibroblasten unter Tunicamycin Behandlung.

Primäre kardiale Fibroblasten wurden aus 12–16 Wochen alten C57BL/6J-Mäusen isoliert und mit DMEM (1 g/L Glucose, 10 % FBS und 1 % PS) kultiviert, für 24 h gehungert (DMEM 1 g/L Glucose, 1 % FBS und 1 % PS) und anschließend für 24 h mit Tunicamycin [2 µg/ml] behandelt. Gezeigt ist die *Cemip* mRNA-Expression. Zur Analyse der mRNA-Expression wurde 18S als interne Kontrolle verwendet. Die Daten repräsentieren den Mittelwert $\pm$ SD; n = 7-8, Mann Whitney test.

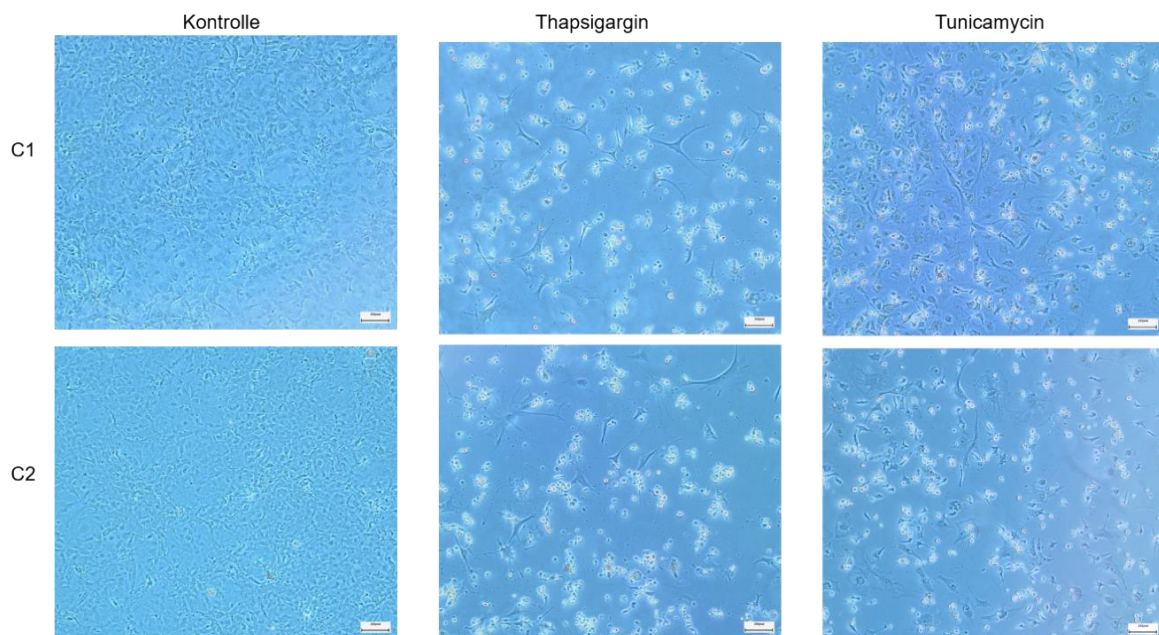
3.6.1 Untersuchung der Apoptose Induktion durch ER-Stress an murinen kardialen Fibroblasten

Um die Auswirkungen von ER-Stress auf murine kardiale Fibroblasten zu untersuchen, wurden die kardialen Fibroblasten aus 12-16 Wochen alten Mäusen des Stammes C57BL/6 isoliert und kultiviert. Die Zellen wurden anschließend mit zwei verschiedenen Konzentrationen Thapsigargin oder Tunicamycin behandelt und über einen Zeitraum von 72 h mikroskopiert. Für Thapsigargin wurden die Konzentrationen C1 = 650 ng/ml (1 μ M), C2 = 3250 ng/ml (5 μ M) und für Tunicamycin die Konzentrationen C1 = 2 μ g/ml, C2 = 10 μ g/ml gewählt.

Nach 72 h wurde die Viabilität der Zellen gemessen. Hierzu wurde der unter 2.7.3 beschriebene Viabilitätsfarbstoff Resazurin verwendet. Bereits mikroskopisch zeigten sich erste Anzeichen von Zellstress ab 24 h. Nach 72 h war ein deutliches Ablösen der Zellen vom Petrischalen Boden und Apoptose der Zellen zu erkennen (siehe Abbildung 11 A).

Diese Beobachtung spiegelte sich teils auch in der nachfolgenden Fluoreszenz-Messung am *Microplate Reader* wieder. Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion des Fluoreszenzsignals und damit eine stark verminderte Viabilität in den mit Thapsigargin behandelten Zellen (siehe Abbildung 11 B). Obwohl die Viabilität unter Tunicamycin-Behandlung ebenfalls beeinträchtigt schien, zeigte sich hier keine signifikante Reduktion der Viabilität von Tunicamycin behandelten Zellen gegenüber der Kontrolle.

A



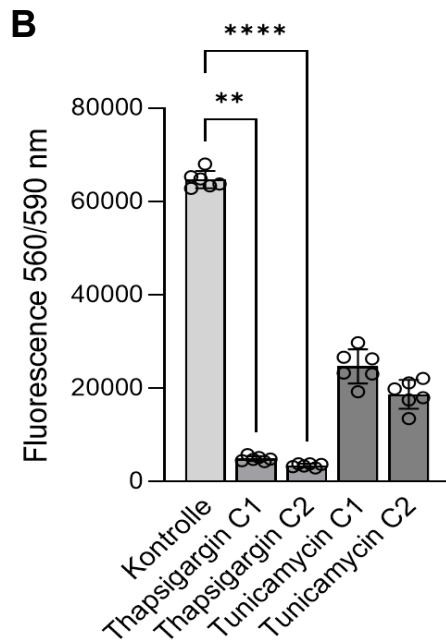


Abbildung 11: Untersuchung der Apoptose Induktion durch ER-Stress an murinen kardialen Fibroblasten

Murine kardiale Fibroblasten, isoliert aus 12-16 Wochen alten C57BL/6J Tieren wurden unter Zugabe von Thapsigargin C1 = 1 μ M, C2 = 5 μ M oder Tunicamycin C1 = 2 μ g/ml, C2 = 10 μ g/ml für 72 h untersucht. **A.** Repräsentative Aufnahmen 72 h nach Thapsigargin/Tunicamycin Zugabe gegenüber Kontrolle (unbehandelt). **B.** Fluoreszenz (560/590) Messung 72 h nach Thapsigargin/Tunicamycin Zugabe. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SD; n=6; Kruskal-Wallis-Test, Dunn's multiple comparisons test, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$.

3.6.2 Genexpressionsanalyse von *Cemip*-defizienten murinen kardialen Fibroblasten unter Thapsigargin Behandlung

Um weitere potentielle Unterschiede zwischen *Cemip*-defizienten murinen kardialen Fibroblasten und der Kontrollgruppe zu untersuchen und dadurch mögliche zelluläre Einflüsse von CEMIP aufzudecken, wurden die Zellen nach *Cemip*-siRNA Transfektion mit dem ER-Stressor Thapsigargin behandelt. Hierzu wurden kardiale Fibroblasten aus 12-16 Wochen alten C57BL/6J-Mäusen der Linie isoliert und kultiviert. Die Zellen wurden wie bereits unter 2.3.5 beschrieben anschließend transfiziert, für 24 h gehungert und dann in DMEM (10% FBS, 1% PS) mit Thapsigargin behandelt, um einen durch Serumdeprivation erzeugten ER-Stress auf die Zellen zu vermeiden.

Die *Cemip* mRNA Expression zeigte hier abermals eine signifikante Reduktion (siehe Abbildung 12 A), sodass eine erfolgreiche Transfektion bestätigt werden konnte. Zudem

wurden verschiedene ER-Stress Marker wie beispielsweise *Perk*, *Atf4*, *Hspa5* in ihrer mRNA Expression untersucht. Hier zeigte sich eine signifikante Erhöhung der *Perk* mRNA Expression in *Cemip*-defizienten Zellen gegenüber der Negativ-Kontrolle (siehe Abbildung 12 C). PERK ist eine Transmembranprotein-Kinase, welche eine wichtige Rolle im UPR-Signalweg spielt. PERK kann dabei verschiedene UPR-Folgesignalwege und bei kumuliertem ER-Stress auch die Apoptose der Zelle einleiten.

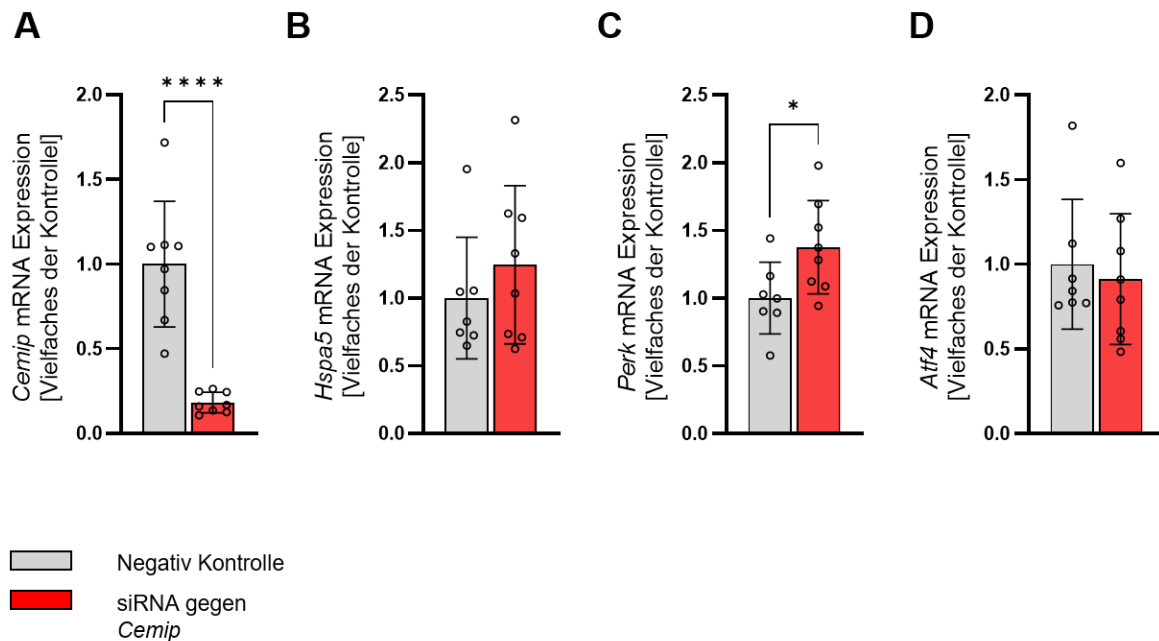


Abbildung 12: Genexpressionsanalyse *Cemip*-defizienter muriner kardialer Fibroblasten nach Thapsigargin Behandlung.

Die mRNA Expression wurde in *Cemip*-defizienten murinen kardialen Fibroblasten, isoliert aus 12-16 Wochen alten C57BL/6J Tieren, 24 h nach Thapsigargin Behandlung untersucht. **A.** *Cemip* mRNA Expression, **B.** *Hspa5* mRNA Expression, **C.** *Perk* mRNA Expression, **D.** *Atf4* mRNA Expression, alle ausgedrückt als Vielfaches der Kontrolle. Für die Analyse der mRNA-Expression wurde 18S als interne Kontrolle verwendet. Zur Analyse der mRNA-Expression wurde 18S als interne Kontrolle verwendet. Die Daten repräsentieren den Mittelwert $\pm$ SD; n = 6-8, Mann Whitney test; * P < 0,05, **** P < 0.0001.

3.6.3 Untersuchung der Apoptose Induktion durch ER-Stress an *Cemip*-defizienten murinen kardialen Fibroblasten

Um mögliche Folgen einer *Cemip*-Deletion für die Zellen zu untersuchen wurden murine, kardiale Fibroblasten mit *Cemip* siRNA transfiziert und mit Thapsigargin behandelt. Da kumulativer ER-Stress auch zur Induktion von Apoptose führen kann, sollten nun die

Auswirkungen auf das Überleben der kardialen Fibroblasten analysiert werden. Da die *Cemip* mRNA Expression in vorherigen Experimenten ausschließlich auf Thapsigargin reagierte und eine erhöhte *Perk*-Expression in *Cemip*-defizienten kardialen Fibroblasten nachgewiesen werden konnte, wurde hier ausschließlich mit Thapsigargin weitergearbeitet.

Um die optimale Thapsigargin-Konzentration für eine frühe Apoptose-Reaktion zu finden und *off-target* Effekte in den Experimenten zu vermeiden, wurden verschiedene Thapsigargin Konzentrationen für 6 h und 24 h an primären murinen kardialen Fibroblasten getestet. Hierzu wurde ebenfalls der bereits beschriebene Farbstoff Resazurin verwendet. Tabelle 9 zeigt die verwendeten Thapsigargin-Konzentrationen zu beiden Zeitpunkten. Murine kardiale Fibroblasten wurden aus acht 12-16 Wochen alten C57BL/6J Tieren isoliert. Die Zellen wurden anschließend für die Untersuchung *gepoolt* und mit Thapsigargin (0,001 μ M bis 10 μ M) behandelt. Nach 6 h/24 h Thapsigargin Behandlung erfolgte die Zugabe von Resazurin, die Zellen wurden danach für eine 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ mit dem Farbstoff inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung am *Microplate-Reader* wie unter 2.7.3 beschrieben, pro Konzentration und Zeitpunkt wurden drei Replikate gemessen.

Es zeigte sich vor allem beim 24 h Zeitpunkt eine klare Reduktion der Viabilität mit steigender Thapsigargin-Konzentration (siehe Abbildung 13). Basierend auf der Viabilitätskurve wurde 0,01 μ M = 6,5 ng/ml als Konzentration und der 24 h Zeitpunkt für nachfolgende Experimente ausgewählt.

Tabelle 9: Finale Thapsigargin Konzentrationen

Thapsigargin Konzentrationen (6 h und 24 h)	
0,001 μ M	0,65ng/ml
0,01 μ M	6,5ng/ml
0,1 μ M	65ng/ml
1 μ M	650ng/ml
10 μ M	6500ng/ml

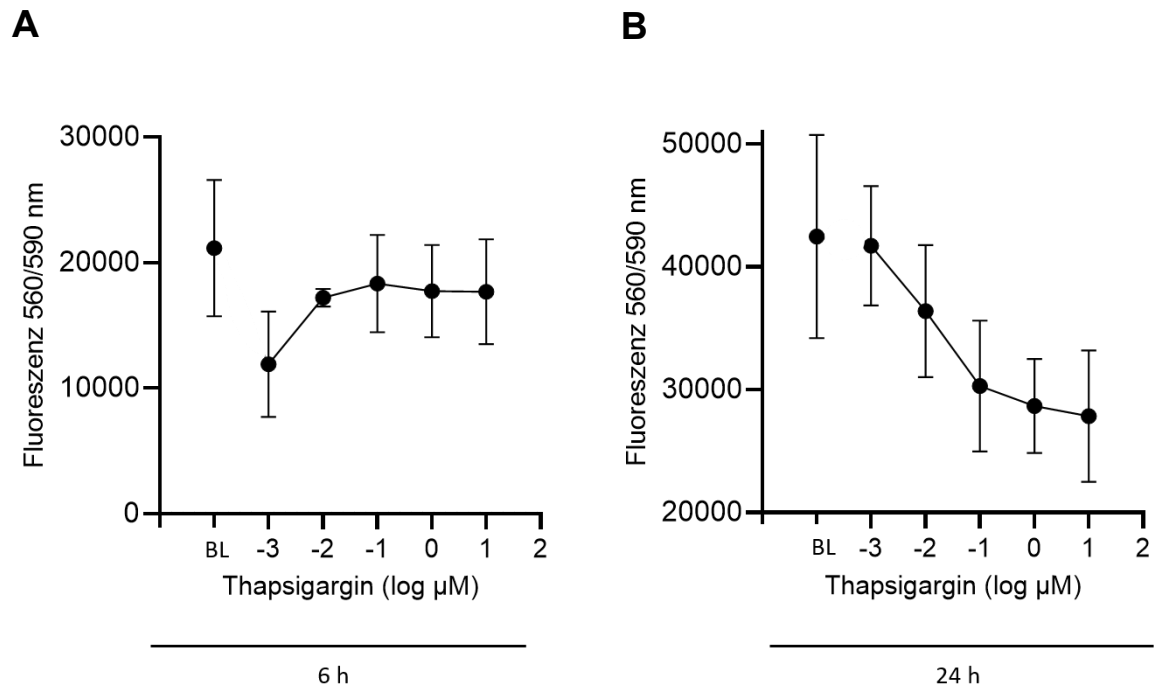


Abbildung 13: Untersuchung der Viabilität an murinen kardialen Fibroblasten unter Behandlung verschiedener Thapsigargin Konzentrationen.

Murine kardiale Fibroblasten wurden aus acht C57BL/6J Mäusen im Alter von 12-16 Wochen isoliert und anschließend *gepoolt*. Die Zellen wurden nach Zugabe von Thapsigargin für 6 h und 24 h durch Zugabe von Resazurin untersucht. **A.** Fluoreszenz (560/590) Messung 6 h nach Thapsigargin Zugabe. **B.** Fluoreszenz (560/590) Messung 24 h nach Thapsigargin Zugabe. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SD; $n=3$ (technisch unabhängige Replikate).

3.6.4 Annexin V Apoptose Assay

Um einen potentiellen Einfluss von CEMIP auf das Überleben der kardialen Fibroblasten unter erhöhtem ER-Stress zu untersuchen wurden kardiale Fibroblasten aus 12-16 Wochen alten C57BL/6J Tieren mittels *Mincing*-Methode isoliert, kultiviert und mit *Cemip* siRNA transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h gehungert und in DMEM (10% FBS, 1% PS) mit 6,5 ng/ml Thapsigargin behandelt. Die Zellen wurden wie unter 2.7.2 beschrieben mit Fluorochrom-konjugiertem (PE/Cyanin-7) Annexin V und 7-AAD gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

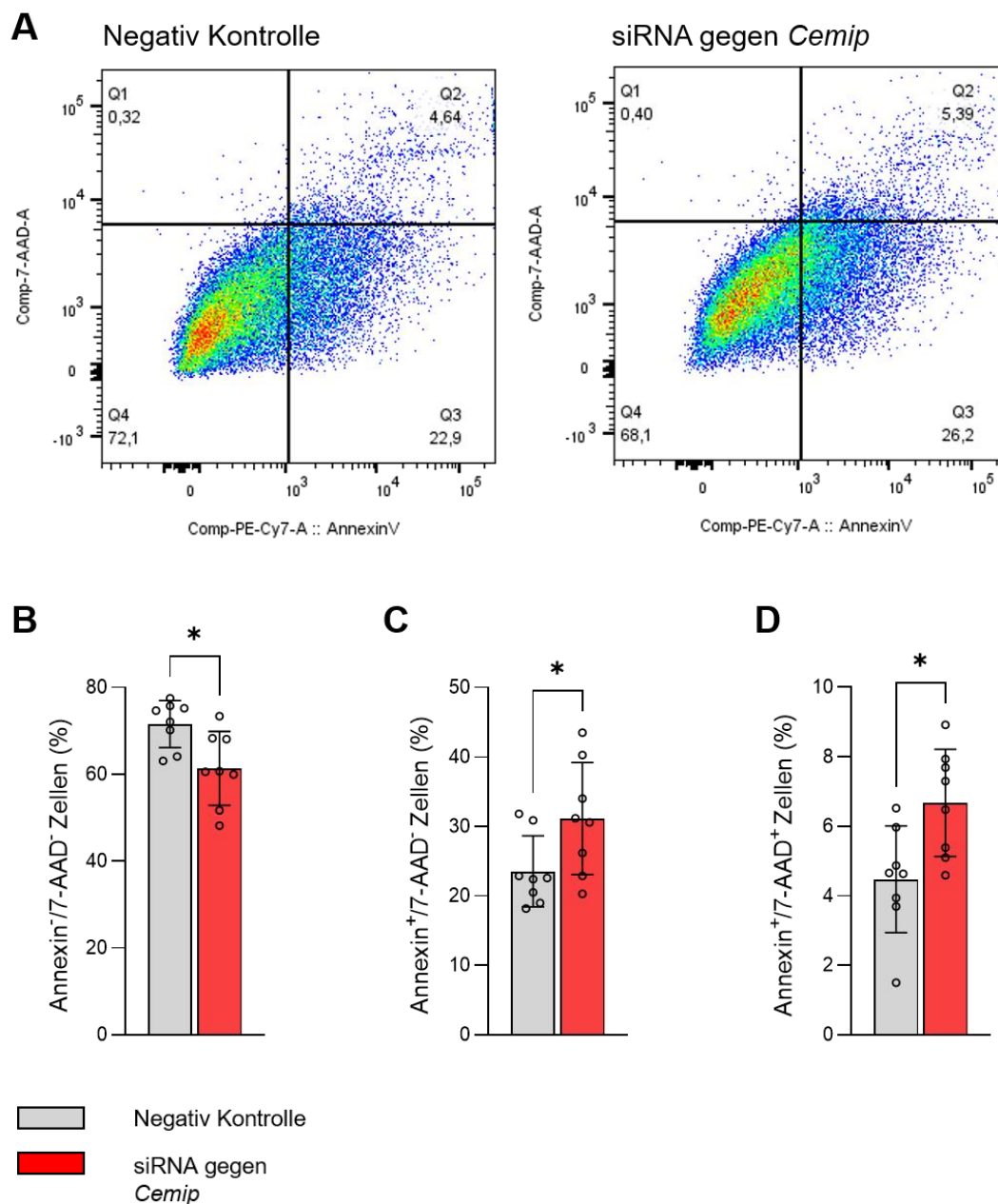


Abbildung 14: Durchflusszytometrische Analyse muriner kardialer Fibroblasten mittels Annexin V Färbung.

Murine kardialen Fibroblasten wurden 24 h nach Thapsigargin [6,5 ng/ml] Zugabe mit Fluorochrom-konjugiertem (PE/Cyanin-7) Annexin V und 7-AAD gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. **A.** Repräsentatives *Gating*-Schema. **B.** Relativer Anteil lebender Zellen. **C.** Relativer Anteil früh apoptotischer Zellen (Annexin⁺/7-AAD⁻). **D.** Relativer Anteil nekrotischer Zellen (Annexin⁺/7-AAD⁺). Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SD; n=8; Unpaired t-test; * P < 0,05.

Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Viabilität in der Negativ-Kontrolle gegenüber der siRNA Gruppe (siehe Abbildung 14 B). Hier liegt der Anteil lebender Fibroblasten im Mittel bei 71,6 % in der Kontrollgruppe gegenüber 61,4 % in der siRNA-Gruppe. Kongruent dazu zeigte sich eine signifikant größere früh apoptotische Fibroblasten Population (Annexin⁺/7-AAD⁻) in den *Cemip*-defizienten Zellen gegenüber der Negativ-Kontrolle mit einem Mittelwert von 31,1 % gegenüber 23,5 % (siehe Abbildung 14 C). Zudem ist der Anteil an nekrotischen Zellen (Annexin⁺/7-AAD⁺) in den *Cemip* defizienten Zellen ebenfalls signifikant erhöht (siehe Abbildung 14 D) mit einem Anteil von 6,7 % im Mittel gegenüber 4,5 % in der Negativ-Kontrolle. Es zeigt sich also eine erhöhte Zellsterblichkeit in *Cemip*-defizienten Zellen durch Thapsigargin ausgelösten ER-Stress.

3.7 Untersuchung des Migrationsverhaltens *Cemip*-defizienter muriner kardialer Fibroblasten

Um funktionelle Unterschiede *Cemip*-defizienter muriner, kardialer Fibroblasten zu untersuchen, wurde das Migrationsverhalten untersucht. Dazu wurden kardiale Fibroblasten aus 12-16 Wochen alten C57BL/6J Mäusen mittels *Mincing*-Methode isoliert, kultiviert und in *Culture-Inserts* wie unter 2.6 beschrieben ausgesät. Die Zellen wurden mit *Cemip* siRNA transfiziert und 24 h gehungert. Die *Inserts* wurden anschließend entfernt und mikroskopische Aufnahmen der dadurch entstandenen zellfreien Fläche gemacht. Die Aufnahmen wurden nach 6 h, 12 h und 24 h wiederholt. Die zellfreie Fläche wurde relativ zur Basis (0 h entsprechend 100 %) berechnet.

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in den gemessenen Flächen nach 12 h als auch nach 24 h (siehe Abbildung 15). Die relative zellfreie Fläche der *Cemip*-defizienten Fibroblasten ist sowohl bei 12 h als auch bei 24 h signifikant kleiner im Vergleich zur zellfreien Fläche der Negativ-Kontrolle (siehe Abbildung 15 C und D), was für ein erhöhtes Migrations- und/oder Proliferations-Verhalten der *Cemip*-defizienten Zellen spricht. So beträgt die zellfreie Fläche in der Kontroll-Gruppe nach 12 h im Mittel noch 55,3 % und in der siRNA Gruppe 52,1 %. Nach 24 h ist die Differenz größer, hier zeigt sich ein Mittelwert an zellfreier Fläche von 23,5 % in der Negativ Kontrolle gegenüber 17,6 % in den *Cemip* defizienten Fibroblasten.

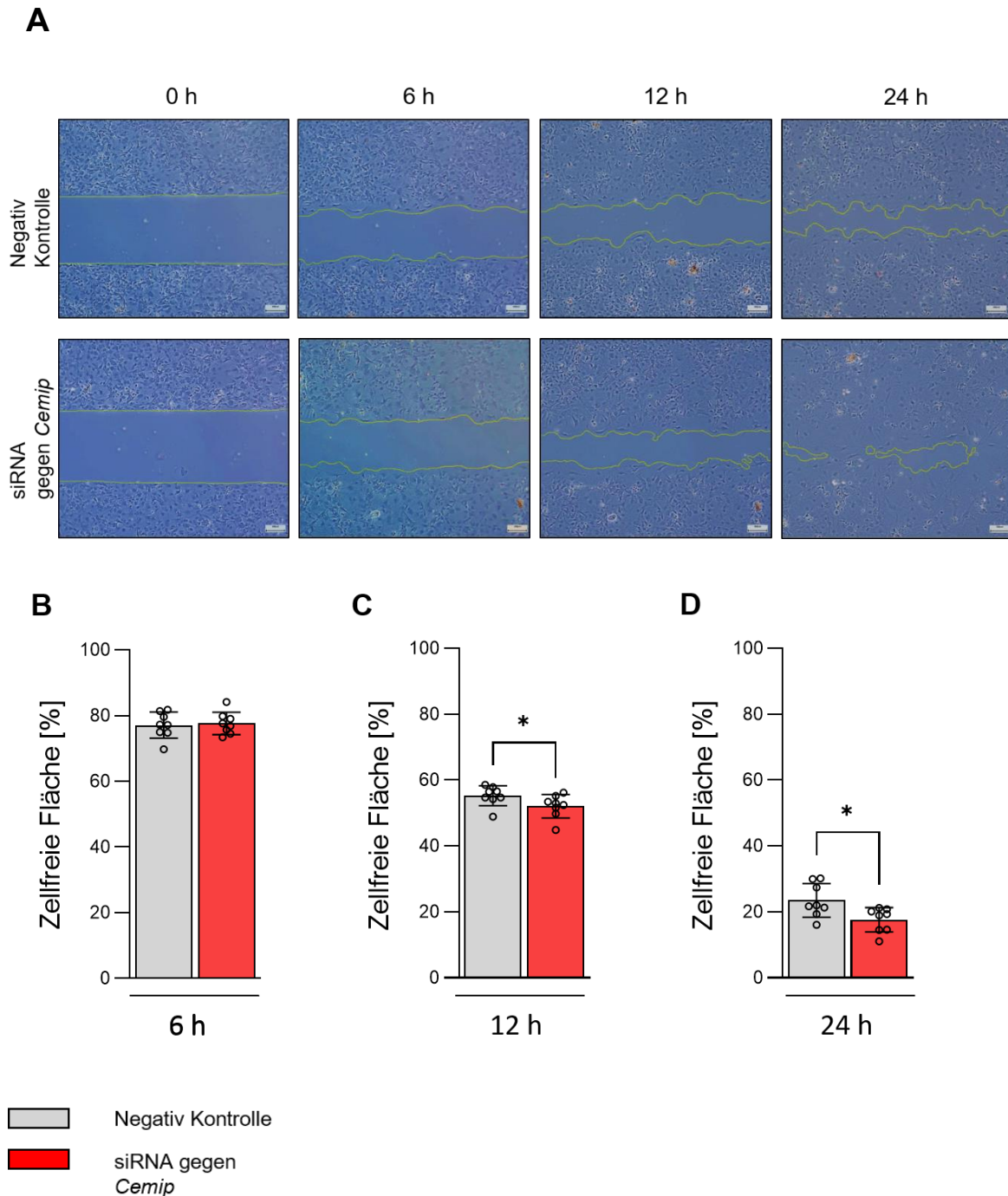


Abbildung 15: Untersuchung des Migrationsverhaltens *Cemip*-defizienter muriner kardialer Fibroblasten.

Kardiale Fibroblasten wurden aus 12-16 Wochen alten C57BL/6J Mäusen mittels *Mincing*-Methode isoliert, kultiviert und in *Culture-Inserts* ausgesät. Die Zellen wurden mit *Cemip* siRNA transfiziert. Die Zellen wurden 24 h gehungert, die Inserts wurden entfernt und mikroskopische Aufnahmen zu den Zeitpunkten 0 h, 6 h, 12 h und 24 h gemacht. **A.** Repräsentative Aufnahmen 0 h, 6 h, 12 h und 24 h nach Entfernen der *Culture-Inserts*. **B.** Relative zellfreie Fläche 6 h nach Entfernen der *Inserts* bezogen auf 0 h. **C.** Relative zellfreie Fläche 12 h nach Entfernen der *Inserts* bezogen auf 0 h. **D.** Relative zellfreie Fläche 24 h nach Entfernen der *Inserts* bezogen auf 0 h. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SD; n=8; Unpaired t-test; * $P < 0,05$.

3.8 Analyse der Narbenbildung und Herzfunktion

3.8.1 Histologische Bestimmung von Narbengröße und Kollagendichte 21 d nach Infarkt

Um einen Einfluss von CEMIP auf die kardiale Heilung nach MI auch *in-vivo* zu beurteilen, wurden die Herzen von *Cemip*-defizienten (*Cemip* KO) und Wildtyp (WT)-Mäusen 21 d nach Infarkt untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Narbengröße als auch Kollagengehalt der Herzen 21 d nach I/R analysiert. Die Herzen wurden dabei bis zur Klappenebene geschnitten und bis eine Ebene vor Klappenebene ausgewertet. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der ausgewerteten Ebenen in *Cemip*-defizienten Mäusen gegenüber-*Cemip* exprimierenden Mäusen (siehe Abbildung 16 C).

Die Herzen wurden mittels Gomori Trichrom gefärbt um deren Narbengröße zu ermitteln. Hier zeigte sich eine signifikant größere Narbe in den *Cemip*-defizienten Tieren, bezogen auf das gesamte Herz (siehe Abbildung 16 B).

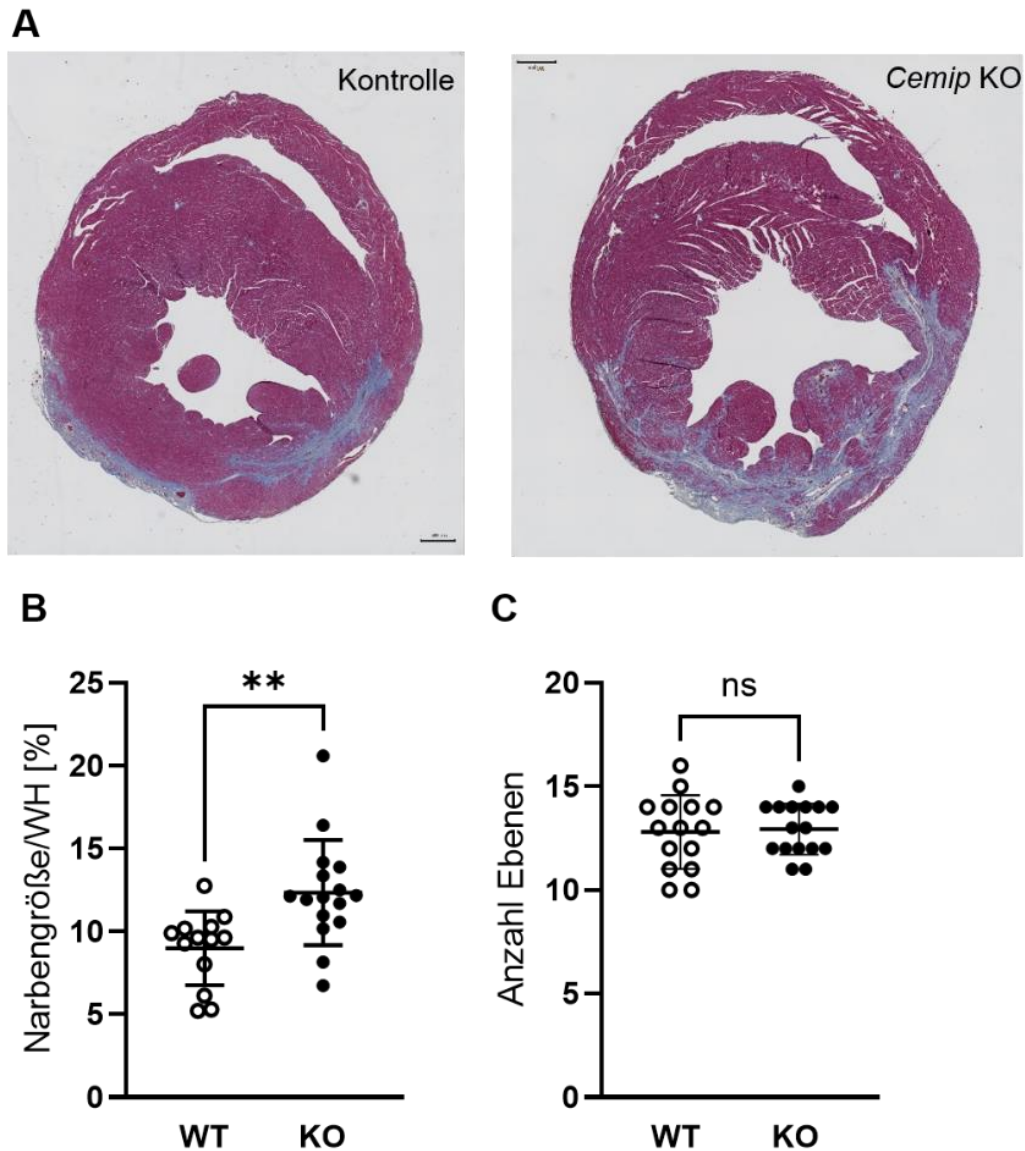


Abbildung 16: Bestimmung der Narbengröße 21 d nach Infarkt mittels Gomori Trichrom Färbung.

Herzen von *Cemip*-KO und Wildtyp (WT)-Mäusen wurden 21 d nach Infarkt mittels Gomori Trichrom gefärbt und die Narbengröße ermittelt. Histologisch zeigt sich Narbengewebe blau-grau, während gesundes Gewebe rot erscheint. **A.** Repräsentative Bilder der gefärbten Herzen. **B.** Quantifizierung der Narbengröße als Mittelwert der Messung von allen Ebenen bis eine Ebene vor Klappenebene, angegeben als Flächenprozent des gesamten Herzens (*Whole heart* = WH). **C.** Anzahl der ausgewerteten Ebenen. Der Maßstabsbalken entspricht 0,5 mm. Die Daten repräsentieren den Mittelwert $\pm$ SD, Unpaired t-test; ** $p < 0,01$.

Zur weiteren Charakterisierung der Kollagendichte und Struktur wurde neben der Gomori Trichrom Färbung an den Herzen der Tiere 21 d nach Infarkt auch die Picrosiriusrot-Rot Färbung durchgeführt. Der hier verwendete Farbstoff lagert sich an Kollagenfasern an, in der Färbung zeigen sich diese dadurch rot in Kontrast zu gesundem Gewebe welches gelb erscheint. (siehe Abbildung 17 A). Die Auswertung der Picrosiriusrot-Rot Färbung erfolgte ebenfalls über ImageJ (National Institute of Health).

Die Picrosiriusrot-Rot Färbung zeigte ebenfalls eine signifikant größere Narbe bezogen auf das gesamte Herz, sowie einen signifikant erhöhten Kollagen Gehalt (siehe Abbildung 17 B und C).

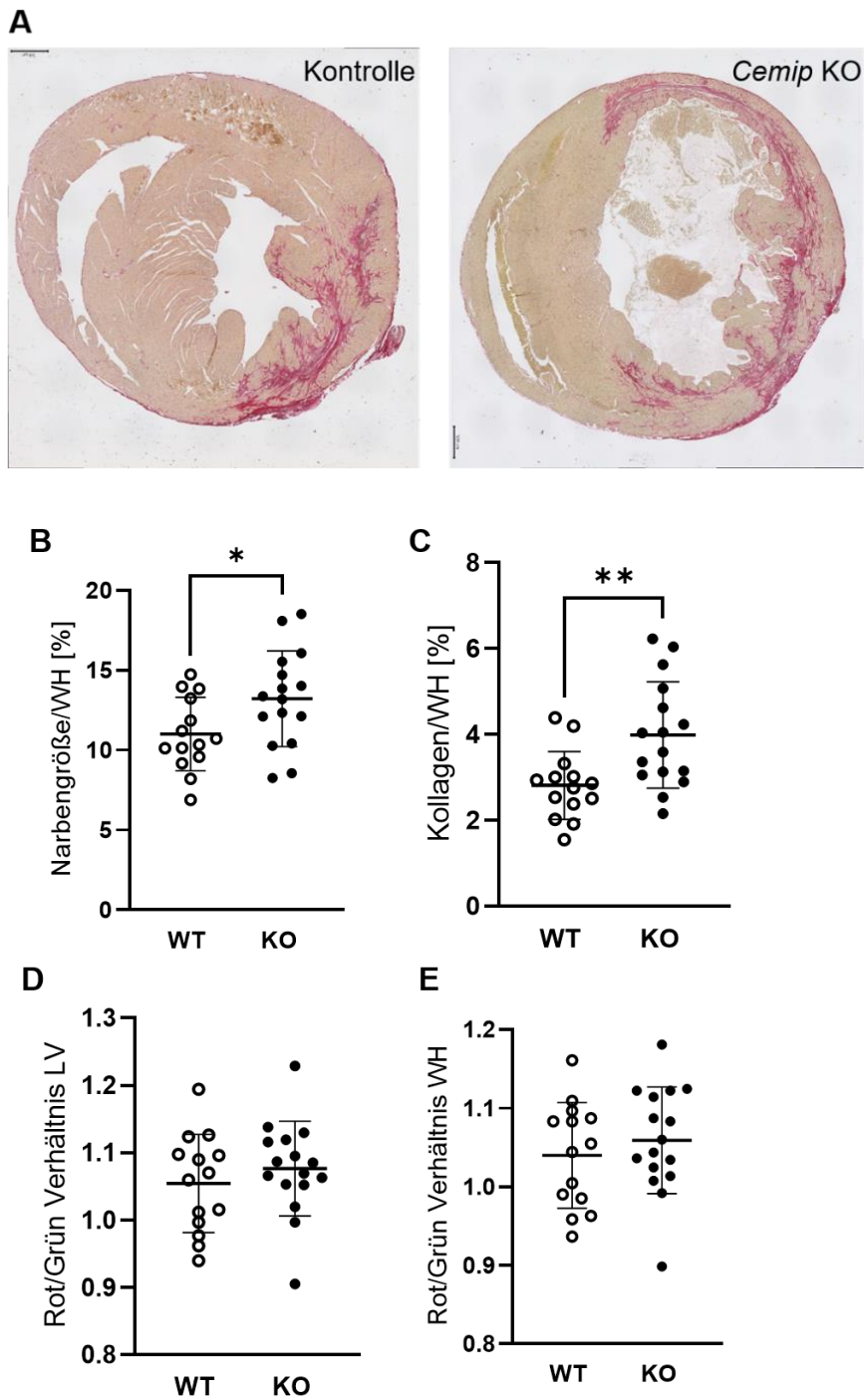


Abbildung 17: Narbengrößen und Kollagen Gehalt in Picrosiriusrot-Rot gefärbten Herzen 21 d nach Infarkt.

A. Repräsentative Bilder der Picrosiriusrot-Färbung 21 d post I/R. **B.** Quantifizierung der Narbengröße als Mittelwert der Messung von allen Ebenen bis zur Klappenebene, angegeben als Flächenprozent des gesamten Herzens (WH) **C.** Kollagengehalt als Mittelwert der Messung von allen Ebenen bis zur Klappenebene angegeben als Flächenprozent des gesamten Herzens (WH) **D.** Rot/Grün Verhältnis als Mittelwert der Messung von allen Ebenen bis zur Klappenebene, angegeben für den linken Ventrikel (LV) und **E.** das gesamte Herz (WH). $n = 14-16$. Der Maßstabsbalken entspricht 0,5 mm. Die Daten repräsentieren den Mittelwert $\pm$ SD, Unpaired t-test, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Die Picrosiriusrot-Rot-Färbung ermöglicht zusätzlich die Beurteilung der Packungsdichte der Kollagenfasern über das Rot/Grün Verhältnis. Hier wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen *Cemip* defizienten Tieren und *Cemip* exprimierenden Tieren festgestellt (siehe Abbildung 17 D und E).

3.9 Echokardiografie des Herzens zur Bestimmung der Herzfunktion

Neben der histologischen Untersuchung der Herzen, erfolgte bis zu 3 Wochen nach Infarkt eine echokardiographische Untersuchung der Herzfunktion. Dazu wurden vor der Infarkt Induktion die basalen Herzparameter Werte erhoben. Die Messungen nach Infarkt erfolgten 24 h, 7, 14 und 21 d nach operativer Infarkt Induktion (siehe Abbildung 18 A). Als Messparameter wurden die Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) als auch das Endsystolische Volumen (ESV) und Enddiastolische Volumen (EDV) betrachtet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass *Cemip*-defiziente Mäuse eine verschlechterte kardiale Funktion nach MI aufweisen. So zeigte sich bei diesen Tieren über den gesamten Zeitverlauf eine signifikant geringere LVEF nach Infarkt und damit eine schlechtere Auswurfleistung des Herzens gegenüber WT-Mäusen (siehe Abbildung 18 B). Kongruent dazu zeigte sich ein signifikant erhöhtes ESV als auch EDV nach Infarkt bei den *Cemip*-defizienten Tieren (siehe Abbildung 18 C und D). Die Ergebnisse deuten somit auf eine verschlechterte Herzfunktion auf Grund von einer Dilatation des *Cemip*-defizienten Herzens hin.

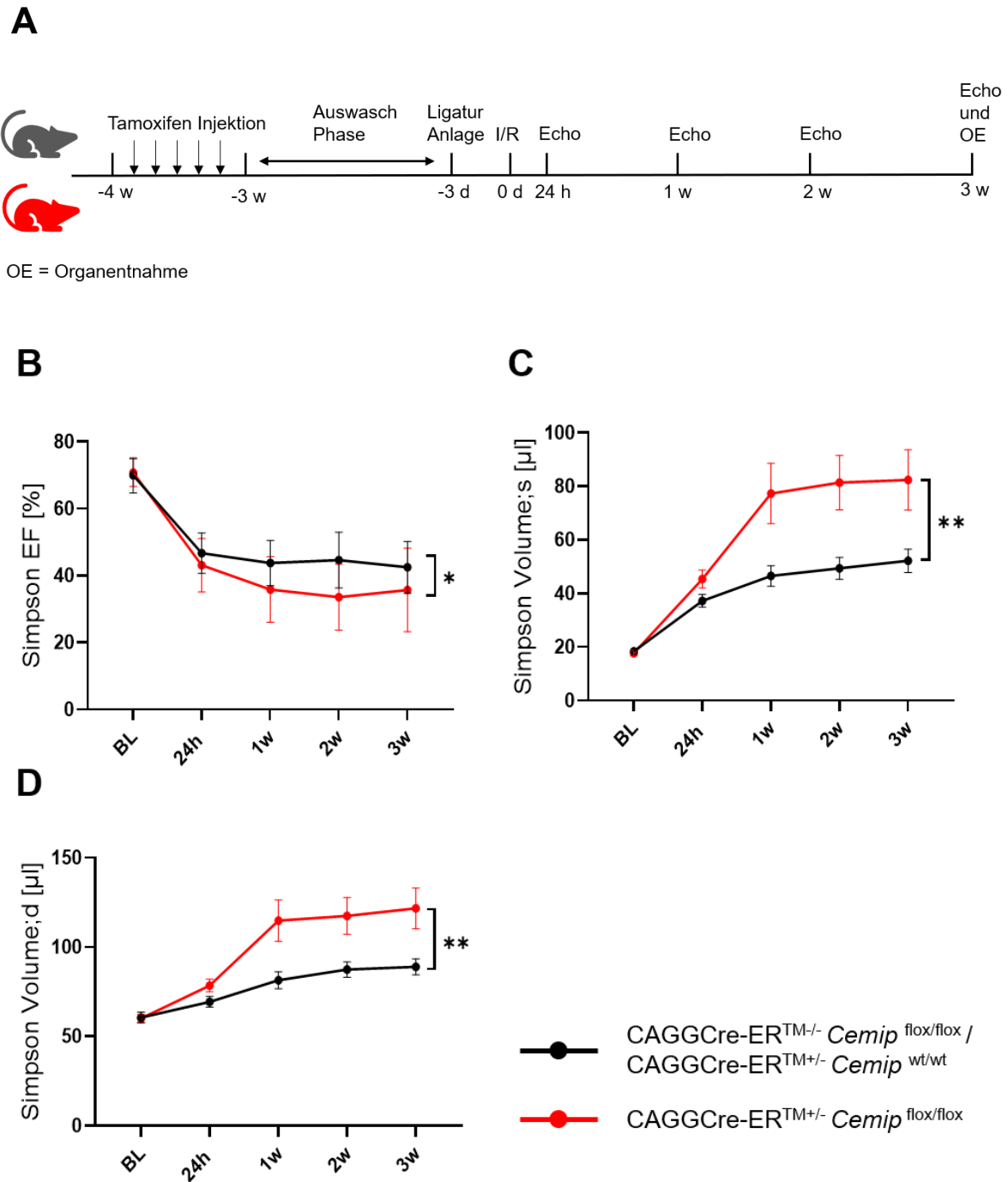


Abbildung 18: Zeitverlauf echokardiographisch bestimmter kardialer Funktionsparameter bis zu 21 d nach Infarkt.

Die Herzfunktion von *Cemip*-defizienten Tieren (*Cemip* KO) und Wildtyptieren (WT) wurde basal (BL) und bis zu drei Wochen nach Infarkt untersucht. **A.** Schematischer Versuchsaufbau. **B.** Bestimmung der linksventrikulären Ejektionsfraktion [%]. **C.** Bestimmung des absoluten endsystolischen Volumens im linken Ventrikel [μl]. **D.** Bestimmung des absoluten enddiastolischen Volumens im linken Ventrikel [μl]. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD; n=16, 18; * P < 0,05, ** P < 0,01.

Die Daten wurden von Dr. Simone Gorressen erhoben und ausgewertet.

3.10 Untersuchung der postischämischen Gewebeumbildung

3.10.1 Bestimmung der Herzgewichte

Nach einem Herzinfarkt unterliegt das Herzgewebe verschiedenen metabolischen Prozessen. Neben der Bildung einer Narbe im infarzierten Bereich, treten auch Modifikationen im verbliebenen gesunden Gewebe auf. Hierbei können beispielsweise kardiomyozytäre Zellen eine kompensatorische Hypertrophie aufweisen. Daher wurde im Rahmen der Organentnahme routinemäßig das Herzgewicht aller untersuchten Tiere ermittelt. Die Gesamtgewichte der Herzen wurden durch Wägung bestimmt und anschließend auf das Körpergewicht normalisiert (siehe Abbildung 19).

Hier zeigten sich signifikant höhere Herzgewichte in der *Cemip*-KO Gruppe sowohl im absoluten Herzgewicht als auch im Herzgewicht bezogen auf das Körpergewicht (siehe Abbildung 19 B und C). Dies könnte, wie bereits durch die echokardiographisch bestimmten Parameter (siehe Abschnitt 3.9) auf eine Dilatation der *Cemip*-defizienten Herzen hindeuten, bei welcher sich die Herzen post I/R hypertrophisch entwickeln.

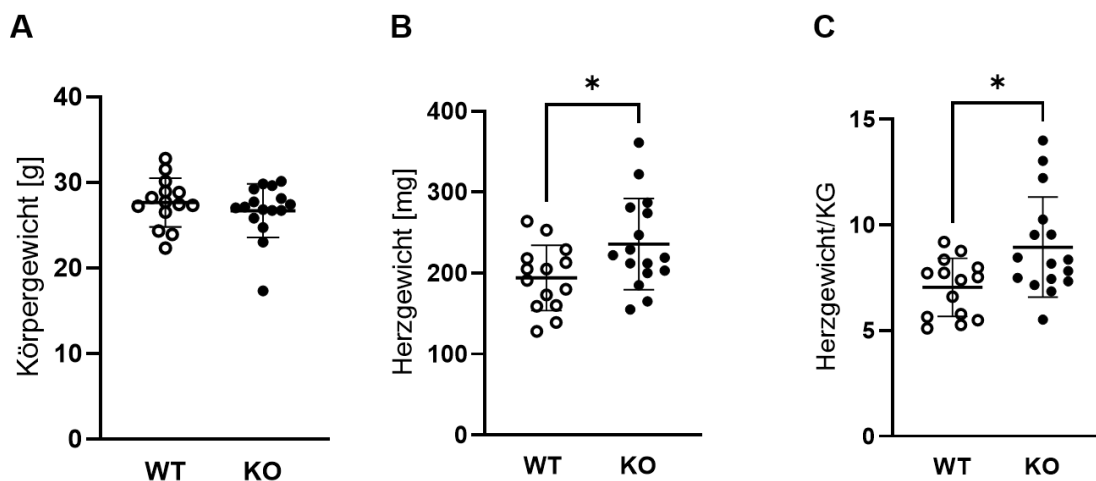


Abbildung 19: Erhöhte Herzgewichte bei *Cemip*-KO Mäusen 21 d post I/R.

Die Masse der Herzen *Cemip*-defizienter Tiere (*Cemip* KO) und Wildtyp-Mäuse (WT) wurde 21 d nach Infarkt durch Wägung bestimmt. **A.** Absolute Körpergewichte *Cemip* defizienter Mäuse (KO) gegenüber *Cemip* exprimierenden Mäusen (WT) **B.** Absolute Herzgewichte **C.** Verhältnis von Herzmasse [mg] zu Körpergewicht [g]. n = 14-16. Die Daten repräsentieren den Mittelwert $\pm$ SD, Mann Whitney test; * P < 0,05.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung von CEMIP auf den kardialen Heilungsprozess nach MI untersucht. Hierzu wurden bei *Cemip*-defizienten Mäusen als auch bei Wildtyp-Tieren als Kontrollgruppe eine kardiale Ischämie mit nachfolgender Reperfusion in einem *closed-chest* Model operativ induziert. Im Anschluss wurden Herzfunktionsparameter analysiert, während auf zellulärer Ebene, (*ex vivo*) mechanistische Untersuchungen durchgeführt wurden.

Trotz aktueller Therapieansätze ist ein *Remodeling* des Herzens weiterhin bei vielen MI-Patienten nicht zu vermeiden. Pathologisches *Remodeling* stellt dabei einen kritischen Schritt in der Progression von Herzinsuffizienz dar, welche viele Patienten nach einem MI entwickeln. Obwohl ACE-Hemmer (Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten), Beta-Blocker und Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonisten einen Effekt auf das *Remodeling* nach MI in Studien zeigen konnten, bleibt ihre Wirksamkeit immer noch unzureichend. Der akute MI und seine Folgen stellen demnach weiterhin eine erhebliche Herausforderung dar. Im gesamten Heilungsprozess nach MI spielen kardiale Fibroblasten hier eine zentrale Rolle. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass CEMIP an der Aktivierung und dem Verhalten kardialer Fibroblasten maßgeblich beteiligt ist und demnach das *Remodeling* entscheidend beeinflusst. Die beobachtete Hochregulation von *Cemip* mRNA Expression im infarzierten Herzen zeigt seinen Höhepunkt nach 72 Stunden, was in der Übergangsphase von der inflammatorischen zur proliferativen Phase nach MI liegt. Eigene Forschungsarbeiten (Daten nicht gezeigt) deuten darauf hin, dass *Cemip* vorwiegend von aktivierten Fibroblasten, den Myofibroblasten exprimiert wird. Die Hochregulation von CEMIP könnte in diesem Kontext eine adaptive Reaktion sein, um die Differenzierung und/oder das Überleben von Fibroblasten zu fördern und eine effiziente Narbenbildung im Herzen nach Infarkt zu gewährleisten.

4.1 Hyaluronsäure im akuten Myokardinfarktgeschehen

Die EZM sichert die dreidimensionale Struktur des Herzens, welche unter anderem Funktion und Erhalt der zellulären Organisation gewährleistet. Darüber hinaus bildet die EZM ein stabiles *Mikroenvironment* für Kardiomyozyten als auch andere kardiale Zellen. Bei ischämischen Verletzungen wird ebenfalls die EZM durch freigesetzte ROS und MMPs geschädigt. Es wird dann ein Auf- und Umbau der EZM eingeleitet, welcher die *de novo* Synthese von EZM-Komponenten beinhaltet und so die Vernetzung der Kollagenmatrix und die Stabilisierung der Infarktnarbe sichert. Ein andauerndes *Remodeling*, kann allerdings in interstitieller Fibrose münden, welche die kontraktile Funktion des Herzens beeinträchtigt.

Es ist somit unerlässlich die Ursachen für chronisches *Remodeling* post MI zu verstehen. Eine wichtige Komponente des EZM-Systems ist in diesem Zusammenhang HA und dessen Interaktionspartner. HA ist ein Glykosaminoglykan, welches aus dem Disaccharid D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-Glucosamin als sich wiederholender Grundbaustein besteht. HA wird von den HA-Synthasen (HAS) 1–3 synthetisiert und interagiert unter anderem mit CD44 und RHAMM (Receptor of HA-Mediated Motility). (78) Es ist bekannt, dass HA die Immunantwort signifikant mit beeinflusst und die Aktivierung von Fibroblasten hinzu Myofibroblasten nach MI fördern kann.

In Arbeiten von Petz et al. konnte somit durch *Has2* KO Mäuse gezeigt werden, dass eine erhöhte HA-Synthese zur Heilung nach einem Infarkt beiträgt. *Has2*-defiziente Mäuse wiesen in diesen Forschungsarbeiten eine signifikant schlechtere hämodynamische Funktion post MI auf. (17) Es zeigte sich in diesen Mäusen zudem eine erhöhte Apoptose von Makrophagen *in-vivo* und *in-vitro*. Zudem waren α -SMA positive Zellen im geschädigten Myokard und in der Randzone post MI reduziert, was auf eine verminderte Myofibroblasten Aktivierung hindeutet, welche sich *in-vitro* bestätigen ließ. *Has2*-defiziente Fibroblasten waren zudem schlechter in der Lage, Kollagen-Gele *in-vitro* zu kontrahieren. (17)

In Arbeiten von Piroth et al. wurde an *Has3*-KO-Mäusen ebenfalls eine beeinträchtigte Herzfunktion festgestellt, was sich in einer reduzierten Ejektionsfraktion post MI zeigte. (18) Hier wurde eine signifikante Abnahme der CD4-T-Zellen in den Herzen der *Has3*-KO-Mäuse 7 d nach MI nachgewiesen. *Has3*-defiziente kardiale T-Zellen waren zudem in ihrer Apoptoserate signifikant erhöht.

Im Gegensatz zu *Has2*- oder *Has3*-defizienten Tieren wurde in *Has1*-defizienten Mäuse nach I/R kein spezifischer Phänotyp festgestellt. (17)

In früheren Forschungsarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte zudem ein Einfluss des, nach MI ausgeschütteten Zytokins IL-6 auf die HA Expression festgestellt werden. In Arbeiten von Müller et al. wurde so durch den Einsatz eines IL-6-Antikörpers, vorübergehend die Expression von HAS 1 und 2 erhöht, was zur Bildung einer HA-reichen Matrix unmittelbar nach MI bei den Mäusen führte. Sie konnten außerdem *in-vitro* zeigen, dass durch IL-6 induzierte HAS1 und 2 in murinen kardialen Fibroblasten einen myofibroblastischen Phänotyp in den Zellen hervorruft. (79) *In-vivo* reduzierte die Blockade von IL-6 die HA-Matrix Bildung nach MI in der Randzone und es zeigte sich eine verminderte Anzahl an α -SMA positiven Myofibroblasten. Darüber hinaus führte die Behandlung von Mäusen mit dem IL-6-Antikörper zu einer reduzierten kardialen Ejektionsfraktion 3 w post MI.

Außerdem wurde die Rolle von CD44 als HA assoziierter Rezeptor bei der Infarktheilung unter Verwendung eines Mausmodells von der Arbeitsgruppe unter Frangogiannis untersucht. (80) Hier zeigten *CD44* defiziente Tiere eine verstärkte Infiltration von Neutrophilen und Makrophagen im Herzen sowie eine erhöhte Expression von proinflammatorischen Zytokinen post MI. Die immunologischen Veränderungen bei *CD44* defizienten Mäusen waren mit einem verstärkten dilatativen *Remodeling* des betroffenen Ventrikels verbunden. CD44-vermittelte Interaktionen scheinen somit kritisch an der Infarktheilung beteiligt zu sein. (80)

CEMIP zählt als Hyaluronidase ebenfalls zu den HA modifizierenden Molekülen und rückte in den letzten Jahren in den Fokus der Forschung. CEMIPs Rolle nach MI und dessen Einfluss auf die EZM und Fibroblasten Antwort blieben bis heute weitgehend unerforscht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CEMIP nach MI signifikant hochreguliert wird und entscheidend an der Fibroblasten Antwort post MI beteiligt ist.

Der Einfluss von CEMIP auf die kardiale Heilung wird in den folgenden Abschnitten eingehend diskutiert.

4.2 *Cemip* mRNA Expression nach TGF- β 1 Stimulation

TGF- β ist ein Zytokin, welches unter anderem Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose und EZM-Produktion (81) (82), reguliert. TGF- β spielt demnach eine zentrale Rolle im Wundheilungsprozess und auch bei der Narbenbildung post MI. An isolierten kardialen Fibroblasten konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die *Cemip* mRNA Expression durch TGF- β 1 signifikant runter reguliert wird. Obwohl *Cemip* primär von

aktivierten Fibroblasten, den Myofibroblasten exprimiert wird, scheint eine Stimulation der Fibroblasten mit dem Wachstumsfaktor *ex-vivo* die Expression *Cemips* nicht zu erhöhen, sondern im Gegenteil, zu vermindern.

In veröffentlichten Forschungsarbeiten zeigen sich gegensätzliche Ergebnisse in der *Cemip* mRNA Expression unter TGF- β Behandlung. So veröffentlichen Deroyer et al. eine Hochregulierung *Cemips* unter TGF- β Behandlung in Chondrozyten über den Alk5/PAI-1 Signalweg, (83) Nagaoka et al. zeigten hingegen eine verminderte mRNA Expression in dermalen Fibroblasten. (84) Die *Cemip* mRNA Regulation scheint demnach zellspezifisch zu sein. Die in dieser Arbeit beobachtete, verminderte *Cemip* mRNA Expression in kardialen Fibroblasten unter TGF- β 1 Behandlung deckt sich mit den Beobachtungen von Nagaoka et al. in dermalen Fibroblasten. Nagaoka et al. verwendeten bei ihren Forschungsarbeiten ebenfalls eine Konzentration von 10 ng/ml TGF- β 1 über einen Untersuchungszeitraum von 8 h und 24 h, was sich weitestgehend mit den Versuchsbedingungen der vorliegenden Arbeit von 10 ng/ml TGF- β 1 und 6 h, als auch 24 h Inkubation deckt.

In anderen Forschungsarbeiten konnte gezeigt werden, dass CEMIP in der Lage ist Fibroblasten zu aktivieren und somit fibrotische Reaktionen zu induzieren. (36) Es ist demnach möglich, dass die beobachtete Runterregulierung *Cemips* durch TGF- β Teil eines negativen Feedback-Mechanismus ist, der eine Überaktivierung von Myofibroblasten verhindert und somit eine übermäßige Narbenbildung nach Infarkt vorbeugt. Ein Fehlen von *Cemip* unter gleichzeitiger Aktivierung könnte demnach eine kompensatorische, überschießende Reaktion in den Fibroblasten hervorrufen, welche sich in einer signifikant höheren Aktivierungsmarker Expression zeigt (siehe Abbildung 9). Diese Hypothese wird im nächsten Abschnitt weitergehend diskutiert.

4.3 Myofibroblasten Phänotyp in *Cemip* defizienten kardialen Fibroblasten nach TGF- β 1 Stimulation

Um die Hypothese einer verstärkten Fibroblasten Aktivierung unter *Cemip* Deletion zu testen, wurden murine kardiale Fibroblasten mit *Cemip*-siRNA behandelt und anschließend mit TGF- β 1 inkubiert (siehe Abschnitt 3.5).

Cemip-defiziente kardiale Fibroblasten zeigten im Gegensatz zur Negativ Kontrolle eine signifikant erhöhte Expression von Aktivierungsmarkern wie *Cthrc1*, 24 h nach TGF- β 1 Stimulation. Wie bereits beschrieben wird hier ein negatives Feedback durch CEMIP

vermutet, welches bei *Cemip*-Deletion eine verstärkte Aktivierung der Fibroblasten hervorruft, indem das negative Feedback ausgeschaltet wird. Eine Aktivierung der Fibroblasten allein durch *Cemip*-Deletion konnte allerdings nicht festgestellt werden. Es zeigten sich somit keine signifikanten Veränderungen im Genexpressionsmuster in *Cemip* defizienten kardialen Fibroblasten gegenüber der Negativ Kontrolle (siehe Abbildung 8). Die Fibroblasten scheinen demnach einen Reiz zu benötigen welcher die Myofibroblasten-Differenzierung initiiert.

Interessanter Weise zeigte sich in *Cemip*-defizienten kardialen Fibroblasten 3 h und 6 h nach TGF- β 1 Zugabe aber auch ein gegenteiliger Effekt. So war die *Acta2* mRNA Expression zu diesen Zeitpunkten signifikant verringert gegenüber der Kontrollgruppe, was für eine verringerte Aktivierung der Zellen spricht. Eine längerfristige Exposition zu TGF- β 1 scheint allerdings eine Überaktivierung in den Fibroblasten hervorzurufen.

Eine Tendenz in Richtung eines Myofibroblasten-Phänotyps konnte auch in anderen Arbeiten gezeigt werden. So konnte eine vermehrte Fibroblasten-Aktivierung auch in Arbeiten von Schmaus et al. an murinen embryonalen Fibroblasten durch *Cemip* Deletion festgestellt werden. (85) Schmaus et al. konnten zudem zeigen, dass *Cemip* durch sulfatierte HA selektiv reguliert wird. Unter Behandlung von sulfatierter HA zeigte sich hier eine *Cemip* Reduktion, welche die gleichen Effekte zur Folge hatte wie eine künstlich erzeugte Deletion des Gens. So konnte auch unter diesen Versuchsbedingungen eine Tendenz zur Myofibroblasten-Differenzierung beobachtet werden. Myofibroblasten zeichnen sich generell besonders durch ihre erhöhte EZM Produktion, erhöhtes Migrationsverhalten und erhöhte Resistenz gegenüber Zellstress aus. (86) (87)

CEMIP scheint in dieser Fibroblasten-Transdifferenzierung eine essentielle Rolle zu spielen. Als ein möglicher zu Grunde liegender Mechanismus wurde CEMIPs Hyaluronidase Aktivität diskutiert, welche HA in Spaltungsprodukte einer Masse von 35 bis 50 kDa abbaut. Diese, so genannten *intermediate-sized* (Int)-HA Fragmente sind an verschiedenen Zellstoffwechselvorgängen und -funktionen beteiligt (88), wie beispielsweise eine proinflammatorische Antwort in Entzündungsgeschehen. (89) Ob diese Hyaluronidase Aktivität allerdings auch *ex-vivo*, also außerhalb der EZM die beobachtete Myofibroblasten Differenzierung begründen kann bleibt fraglich.

Da CEMIP nicht nur von den Zellen sezerniert wird, sondern auch intrazellulär lokalisiert vorliegt, muss ebenfalls ein intrazellulärer Mechanismus in Betracht gezogen werden. CEMIP liegt intrazellulär vor allem am ER vor, es wird daher auch ein Einfluss von CEMIP

auf das ER über eine Interaktion mit ER-assoziierten Proteinen oder die Kalzium Ausschüttung postuliert, welche eine Transdifferenzierung der Zellen zur Folge haben könnte.

Der Einfluss von CEMIP auf den Kalzium Haushalt wird in Abschnitt 4.7 weitergehend diskutiert.

4.4 *Cemip* mRNA Expression unter Thapsigargin Behandlung

Da CEMIP bereits in anderen Forschungsarbeiten mit ER-Stress und auch dem *UPR* in Verbindung gebracht werden konnte (90), wurde die *Cemip* mRNA Expression in murinen kardialen Fibroblasten *ex-vivo* unter ER-Stress untersucht.

Es konnte eine signifikante Reduktion von *Cemip* mRNA in kardialen Fibroblasten unter Behandlung des ER-Stressors Thapsigargin gezeigt werden (siehe Abbildung 7 B). Interessanterweise konnte keine Reaktion auf den ER-Stressor Tunicamycin gezeigt werden (siehe Abbildung 10). Thapsigargin und Tunicamycin zeigen dabei einen sehr unterschiedlichen Mechanismus, welcher zu ER-Stress in den Zellen führt: Thapsigargin induziert ER-Stress durch die Hemmung der SERCA-Pumpe, was zu einer Depletion der Kalziumspeicher im ER führt. Kalzium wird im ER für die Proteinfaltung mit Hilfe der Chaperone Calnexin und Calreticulin benötigt, welche kalziumabhängig fungieren. Zudem ist Kalzium als sekundärer Botenstoff an verschiedenen zellulären Signaltransduktionswegen beteiligt. *Cemip* könnte demnach besonders auf die verminderte Kalzium-Konzentration im ER oder die erhöhte Kalziumkonzentration im Zytosol reagieren. *Cemip* selber interagiert mit dem ER, indem es mit BiP einen Komplex formt.

Kumulierter ER-Stress kann außerdem zum Zelltod führen. So konnte in Zellkulturexperimenten gezeigt werden, dass Thapsigargin zu einer verminderten Viabilität der kardialen Fibroblasten führt (siehe Abbildung 11). Die Auswirkungen einer *Cemip* Deletion auf das Überleben nach Thapsigargin Behandlung werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

4.5 Einfluss von Thapsigargin auf *Cemip*-defiziente kardiale Fibroblasten

In *Cemip*-defizienten Fibroblasten zeigte sich 24 h nach Thapsigargin-Behandlung eine signifikant erhöhte *Perk* mRNA Expression gegenüber der Kontrollgruppe. PERK ist eine Protein Kinase, welche als Antwort auf ER-Stress den *UPR* aber auch, bei nicht

überwindbarem ER-Stress die Apoptose der Zelle einleiten kann. So führt eine Phosphorylierung durch PERK von eIF2 α zu einer Induktion von ATF4, was zur Wiederherstellung der Zellhomöostase beitragen soll, hält der ER-Stress jedoch an, induziert PERK die Apoptose der Zelle unter anderem über die Induktion von *CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein* (CHOP). (91) Eine Hochregulierung von *Perk* in *Cemip*-defizienten Zellen, wie sie in dieser Arbeit beobachtet wurde, könnte demnach auf eine erhöhte Zellstresssensitivität hindeuten, die die Zellen anfälliger für eine ER-Stress induzierte Apoptose macht.

Der Einfluss von *Cemip* auf die Apoptoserate kardialer Fibroblasten unter ER-Stress wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

4.6 *Cemip* Deletion führt zu erhöhter Apoptoserate in kardialen Fibroblasten unter ER-Stress

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *Cemip*-defiziente Fibroblasten eine erhöhte Apoptoserate gegenüber der Kontrollgruppe unter Thapsigargin Behandlung zeigen. Es wurde 24 h nach Thapsigargin Zugabe sowohl eine größere früh apoptotische Zellpopulation in der durchflusszytometrischen Analyse als auch eine größere nekrotische Zellpopulation in den *Cemip*-defizienten Zellen gegenüber der Negativ-Kontrolle (siehe Abbildung 14) festgestellt. Kongruent dazu zeigte sich ein größerer Anteil lebender Zellen in der Kontrollgruppe unter Thapsigargin induziertem ER-Stress. Eine *Cemip*-Deletion scheint die Zellen also anfälliger für ER-Stress und damit ER-Stress induzierte Apoptose zu machen. Es ist demnach davon auszugehen, dass CEMIP eine protektive Rolle in kardialen Fibroblasten spielt, indem es die Zellen gegen ER-Stress-induzierte Apoptose schützt. Interessanterweise gibt es Hinweise darauf, dass eine Resistenz gegenüber Zellstress wichtig für das Überleben kardialer Zellen und somit auch das *Outcome* nach MI ist. (92)

CEMIP könnte demnach das Überleben der kardialen Fibroblasten unter extremen Stressbedingungen während MI wie beispielsweise Hypoxie, Nährstoffmangel, hohem Laktat Gehalt und pH Verschiebung sichern und so entscheidend das Ausmaß des Myokardschadens beeinflussen. *Ex-vivo* konnte allerdings kein Einfluss von Hypoxie oder Glukose Mangel auf die *Cemip* mRNA Expression in murinen kardialen Fibroblasten festgestellt werden. Ob ein Unterschied zwischen *Cemip*-defizienten Zellen und WT-Zellen in ihrer Resistenz gegenüber Zellstress wie Hypoxie oder Glukose Mangel besteht Bedarf weitergehender Forschungsarbeiten.

Ergebnisse, welche belegen, dass CEMIP in der Lage ist Apoptose in Zellen zu unterbinden, finden sich bis dato vorwiegend in der onkologischen Forschung. Zahlreiche Untersuchungen unterstreichen hier den Einfluss von CEMIP auf das Überleben der Tumorzellen. (93) (90) (94) (95) (96) Als mögliche Mechanismen werden hier CEMIPs Interaktion mit dem *AMP-activated protein kinase* (AMPK) Signalweg, mit dem EGFR (*epidermal growth factor receptor*)-Signalweg und dem Semaphorin 3A/Plexin 2A-Signalweg genannt, welche alle Proliferation, Überleben oder Apoptose der Zelle induzieren können. (97)

Welcher Mechanismus in kardialen Fibroblasten die entscheidende Rolle spielt oder ob es sich um ein Zusammenspiel verschiedener Signalwege handelt, bleibt weiterhin offen.

4.7 *Cemip* Deletion führt zu verstärkter Migration in kardialen Fibroblasten ex-vivo

Entgegen der Erwartung zeigte sich in *Cemip*-defizienten kardialen Fibroblasten nach 12 h und 24 h eine verstärkte Migration im Vergleich zur Negativ Kontrolle (siehe Abbildung 15). CEMIPs Fähigkeit Migration in Zellen zu induzieren ist in Tumorzellen umfassend erforscht worden. (38) (98) (99) (100)

Verschiedene Mechanismen werden dabei diskutiert. Zum einen wird die Auflockerung der EZM durch die Hyaluronidase Aktivität CEMIPs und damit auch das Ablösen der Tumorzellen aus dem Primärtumor (Metastasierung) als ein möglicher Mechanismus postuliert. Zum anderen werden mehrere intrazelluläre Signalwege durch CEMIP beeinflusst. So haben Studien gezeigt, dass CEMIP den Wnt/ β -Catenin-Signalweg aktivieren kann, welcher durch Expression seiner Zielproteine wie MMP-2, MMP-7, Cyclin D1 und c-Myc die Migration der Zelle induziert. (101) Ein weiterer Mechanismus beschreibt die Destabilisierung der Mikrotubuli als einen Migrations-fördernden Prozess. Experimente haben gezeigt, dass ein Komplex bestehend aus CEMIP, *Protein phosphatase 2A catalytic subunit* α (PP2A C α) und Protein phosphatase 2A (PP2A B56 γ) gebildet werden kann. Dieser Komplex ist in der Lage, die Methylierung von PP2A C α zu induzieren, was eine Aktivierung der Phosphatase PP2A zur Folge hat. Diese erhöhte Aktivität führt zur Dephosphorylierung von Stathmin, einem Mikrotubuli-destabilisierenden Phosphoprotein. Unphosphoryliertes Stathmin bindet an Tubulin-Dimere, wodurch die Stabilität der Mikrotubuli verringert und eine Migration der Zellen begünstigt wird. (97)

Darüber hinaus wurde ein Kalzium abhängiger Mechanismus von Evensen *et al.*

festgestellt. Ihre Ergebnisse zeigen eine durch CEMIP induzierte Kalzium-Freisetzung aus dem ER was zu erhöhten intrazellulären Kalzium-Spiegeln in der Zelle führte. Laut Evensen *et al.* fungiert Kalzium dann als *second messenger*, welcher die zelluläre Migration auslöst. (38)

In der vorliegenden Arbeit wurde die Migration von kardialen Fibroblasten *ex-vivo* unter Verwendung von *Culture-Inserts* untersucht (siehe Abschnitt 2.6). Die Migration konnte demnach nur auf einer zweidimensionalen Fläche und nicht im dreidimensionalen Gewebe analysiert werden. Zudem handelt es sich bei den gewählten Versuchsbedingungen um einen Migrations-/Proliferations-assay, da kein Wachstumsinhibitor verwendet wurde. Laut Schmaus *et al.* ist die Proliferation bei *Cemip*-defizienten Fibroblasten gegenüber *Cemip*-exprimierenden Fibroblasten verringert. (85) Basierend auf dieser Annahme, muss die Migration und nicht die Proliferation in dem Experiment der vorliegenden Arbeit der Grund für die signifikant verringerte zellfreie Fläche bei *Cemip*-defizienten Fibroblasten sein und deutet damit auf eine erhöhte Migration dieser Zellen gegenüber der Kontrolle hin. Die Ergebnisse sind zudem zu zwei Zeitpunkten (12 h und 24 h) kohärent (siehe Abbildung 15). Das erhöhte Migrationsverhalten der isolierten kardialen Fibroblasten unter *Cemip*-KO lässt sich möglicherweise durch die beobachteten Myofibroblasten-Phänotypen erklären. So zeigte eine *Cemip*-Deletion zusammen mit TGF- β 1 Stimulation eine gesteigerte Aktivierungsmarker-Expression (siehe Abbildung 9). Myofibroblasten zeichnen sich unter anderem durch ihr gesteigertes Migrationsverhalten aus. (86) Die nötige Aktivierung der Zellen kann in diesem Experiment durch ein Entfernen der *Culture-Inserts* und damit einer leichten Verletzung der Zellen durch einen Abriss von den *Inserts* erklärt werden. *Cemip*-defiziente Fibroblasten würden demnach eine stärkere Myofibroblasten-Aktivierung zeigen als die Kontrolle und demnach schneller migrieren. Ob das gewählte Model jedoch auf *in-vivo* Bedingungen übertragbar ist bleibt fraglich und bedarf weiterer Untersuchungen, welche die Migration in einer dreidimensionalen Matrix (EZM) als auch die Proliferation berücksichtigen sollte.

4.8 Verschlechterte Herzfunktion in *Cemip* defizienten Mäusen post I/R

Es zeigte sich, dass *Cemip*-defiziente Mäuse eine signifikant geringere LVEF und damit eine schlechtere Auswurfleistung des Herzens post MI im Vergleich zu den WT-Mäusen aufweisen. Dies deutet auf eine beeinträchtigte systolische Funktion hin. Das Herz kompensiert die verminderte LVEF post MI typischerweise über eine linksventrikuläre

Hypertrophie und eine ventrikuläre Dilatation. Dies zeigt sich ebenfalls im ESV als auch im EDV, welche bei den *Cemip*-KO Mäusen signifikant erhöht sind. Es handelt sich folglich um eine verstärkte Dilatation in *Cemip* defizienten Tieren post MI. Diese Volumenvergrößerungen sind charakteristisch für eine chronisch erhöhte Wandspannung im Ventrikel auf Grund von reduzierter Pumpleistung. Das verbleibende gesunde Myokard versucht die Funktionsverluste des infarzierten Gewebes zu kompensieren. Anfangs stellt diese adaptive Reaktion die Aufrechterhaltung der Herzfunktion trotz Myokardschaden sicher, langfristig führt es jedoch zu einer maladaptiven Dilatation des linken Ventrikels. Die Ventrikelwand verdickt sich zunächst, mit der Zeit dehnen sich die Ventrikel dann aus, was zu einer Erhöhung der diastolischen und systolischen Volumina führt. Die beobachteten erhöhten Herzgewichte bei *Cemip*-KO Mäusen korrelieren mit diesen Beobachtungen indem die Herzgewichte sowohl in ihrer absoluten als auch relativen Masse bezogen auf das Körpergewicht erhöht sind. Die Wägung wurde hier mit Herzen, gefüllt mit PBS durchgeführt was die erhöhten Gewichte erklärt. Die Leergewichte der Herzen lägen ansonsten bei einem dilatativen Phänotypen unter denen der Kontrollgruppe durch das größere Ventrikel Volumen und die ausgedehnte, verdünnte Herzmuskelwand.

Die verminderte LVEF post MI in den *Cemip*-defizienten Tieren könnte eine Folge erhöhten Myokardschadens in der KO-Gruppe sein. So könnte die erhöhte Sterberate der Fibroblasten in den KO Tieren eine schlechtere Heilung post I/R begründen. Zudem werden durch den im Myokardinfarktgeschehen beschriebenen ER-Stress und die damit einhergehende Apoptose vermehrt Zytokine und andere Entzündungsmediatoren ausgeschüttet. Diese Reaktion ist durch die erhöhte Apoptoserate von *Cemip*-defizienten Zellen in den KO-Tieren wahrscheinlich verstärkt. Die übermäßige Entzündungsreaktion könnte das Myokard weiter schädigen und die Heilung ebenfalls nachteilig beeinflussen.

4.9 Vergrößerte Narbengröße in *Cemip*-defizienten Mäusen 21 d post MI

In den *Cemip*-defizienten Tieren zeigte sich 21 d nach Infarkt eine signifikant größere Narbe als in der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 16 B und 17 B). Dieses Ergebnis wurde sowohl in der Gomori-Trichrom als auch in der Picrosiriusrot-Rot Färbung bestätigt. Es zeigte sich zusätzlich ein signifikant erhöhter Kollagen Gehalt in den KO-Tieren 3 Wochen post MI (siehe Abbildung 17 C). Die Zusammensetzung des Kollagens, welche sich aus den Kollagentypen Typen I und III ergibt (Rot/Grün Verhältnis), zeigte sich in den Tieren als nicht verändert.

Die erhöhte Apoptoserate in *Cemip*-defizienten Fibroblasten mag zunächst im Widerspruch zu einem erhöhten Kollagengehalt in den Herzen der *Cemip*-defizienten Mäuse stehen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Differenzierung der Fibroblasten in einen Myofibroblasten-Phänotyp nach Aktivierung durch TGF- β 1, welcher nach MI ausgeschüttet wird und die proliferative Phase einleitet. Fibroblasten differenzieren durch TGF- β 1 zu Myofibroblasten in dieser Phase und zeichnen sich durch eine erhöhte Kollagenproduktion aus. *Ex-vivo* konnte hier gezeigt werden, dass diese Aktivierung und Differenzierung zu Myofibroblasten in *Cemip*-defizienten Zellen 24 h nach TGF- β 1 Stimulation signifikant erhöht ist (siehe Abbildung 9).

Überträgt man die *ex-vivo* Ergebnisse auf das *in-vivo* Mausmodell, würde das bedeuten, dass *Cemip*-KO Tiere nach Infarkt eine erhöhte Fibroblasten Aktivierung vorweisen und die diese mehr Kollagen produzieren als die Kontroll-Tiere. (102) Eine größere Myofibroblasten Population in den *Cemip*-defizienten Tieren könnte demnach eine Erklärung für den erhöhten Kollagengehalt 21 d post MI sein. Ein erhöhter Kollagengehalt könnte außerdem eine Folge von erhöhtem Zelltod in *Cemip*-defizienten Tieren sein. So ist es möglich, dass eine größere Narbe auf Grund verstärkter Apoptoserate und damit einhergehend einer stärkeren Entzündungsreaktion gebildet werden muss. Es könnte also eine kompensatorische Antwort der *Cemip*-defizienten Tiere auf die verminderte Stressresistenz sein, die von den übrigen Myofibroblasten übernommen wird, welche den apoptotischen Teil nach MI mit EZM ersetzen müssen.

4.10 Limitierung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CEMIP im Heilungsprozess nach einem akuten MI eine entscheidende Rolle spielt.

Die Verwendung von Tiermodellen, insbesondere von Mäusen, erlaubt hierbei zwar Einblicke in pathophysiologische Prozesse, welche in Säugern hohe Ähnlichkeit aufweisen, die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen ist allerdings dennoch nur bedingt möglich. Da CEMIP multifunktionellen Aufgaben nachkommt, die sowohl zelluläres Verhalten als auch die Modulation der EZM betreffen, konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden, über welche Mechanismen CEMIP die Infarktheilung genau moduliert. Die vorgelegte Arbeit zeigt dabei zwei interessante Richtungen, deren weiterführende Untersuchung als sinnvoll erachtet wird. Zum einen wurde nachgewiesen, dass CEMIP in der Pathophysiologie des ER-Stresses involviert ist und zum anderen, dass CEMIP in der Entwicklung und Aktivierung der Fibroblasten eine Rolle spielt.

Nicht vollständig übertragbar auf die *in-vivo* Situation sind außerdem die Versuche an isolierten kardialen Fibroblasten. Die verwendete 2-dimensionale Kultivierung der Fibroblasten kann demnach nicht die komplexe 3-dimensionale Struktur der EZM im Herzen nachbilden. Zudem ist fraglich in wie weit die isolierten Fibroblasten auf dem Boden der Petrischale bereits aktiviert werden. Der entdeckte Myofibroblasten Phänotyp *Cemip*-defizienter Fibroblasten basiert in dieser Arbeit allein auf Aktivierungsmarkern welche genexpressionsanalytisch nachgewiesen wurden. Für eine genauere Charakterisierung dieses Phänotyps bedarf es demnach weitergehender Forschung welche nicht nur die mRNA Expression berücksichtigen sollte und auch eine bessere Übertragbarkeit auf die physiologische Situation im Herzen gewährleisten sollte.

Eine weitere Limitation zeigt sich in dem gewählten KO-Model, welches *Cemip* global deletiert. Um einen möglichen Einfluss auf andere CEMIP exprimierende Organe auszuschließen, sollte demnach ein Fibroblasten-spezifischer KO in Betracht gezogen werden oder eine *Cemip* Deletion allein im Herzen.

Als offene Frage bleibt die klinische Bedeutung und ein potentieller therapeutischer Nutzen von CEMIP nach MI. Ob CEMIP als therapeutisches Ziel in Frage kommt bleibt demnach kontrovers, da das Protein vor allem in neoplastischen Krankheitsgeschehen ein Problem darstellt, indem es die Apoptose der Tumorzellen unterbindet und sie somit resistent gegenüber Chemotherapeutika macht. Laut unserer Ergebnisse scheint eine erhöhte *Cemip*-Expression in den kardialen Fibroblasten nach Infarkt kardioprotektiv zu sein,

während eine übersteigerte *Cemip*-Expression in anderen Krankheitsgeschehen pathologisch sein kann. CEMIP weist also eine sehr kontextabhängige Funktion im jeweiligen Krankheitsspektrum auf, welche es definitiv weiter zu erforschen gilt um eine präzise und sichere Therapie mit CEMIP als *Target* nach MI zu erwägen.

5 Zusammenfassung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen zählen weiterhin zu den führenden Todesursachen in Deutschland, wobei der akute MI und dessen Folgeerscheinungen einen großen Anteil davon ausmachen. In dieser Arbeit wurde die Rolle und Funktion des *Cell Migration inducing and hyaluronan binding Proteins* (CEMIPs) im Heilungsprozess nach MI untersucht. Wir konnten zeigen, dass *Cemip* in murinen infarzierten Herzen signifikant hochreguliert wird, mit einem Höhepunkt nach 72 h post I/R. CAGG-Cre-ERTM^{+/-} *Cemip*^{fl/fl} (*Cemip*-KO) Tiere wurden einer operativ induzierten, kardialen Ischämie/Reperfusion unterzogen und bis zu 3 Wochen echokardiographisch untersucht. Die Herzen wurden nach dieser Zeitspanne entnommen und histologisch analysiert. Im Vergleich zu Kontrolltieren zeigten die *Cemip*-KO Tiere eine signifikant verschlechterte Herzfunktion, was sich in einer verminderten Ejektionsfraktion als auch in erhöhten endsystolischen und enddiastolischen Volumen zeigte. Die Herzen der *Cemip*-KO Tiere zeigten zudem 21 d post I/R eine signifikant größere Narbe und einen höheren Kollagen-Gehalt. Es wurden außerdem murine kardiale Fibroblasten isoliert, um *Cemip* ex-vivo zu untersuchen. Die *Cemip*-mRNA Expression zeigte hier eine signifikante Reduktion nach TGF-β1 und nach Thapsigargin-Behandlung. *Cemip* wurde außerdem ex-vivo mit Hilfe von siRNA in murinen kardialen Fibroblasten deletiert. *Cemip*-defiziente Zellen zeigten hier nach 24 stündiger TGF-β1 Behandlung eine signifikant höhere Expression von Aktivierungsmarkern wie *Cthrc1*, was auf einen Phänotypen-Wechsel hin zu Myofibroblasten schließen lässt.

Um die Funktion CEMIPs während ER-Stress und einen potentiellen Einfluss auf das Überleben der Zellen nach Infarkt zu untersuchen, wurde ein Annexin V Apoptose Assay durchgeführt. Hier zeigte sich eine verstärkte Apoptose in *Cemip*-defizienten Fibroblasten gegenüber der Kontrollgruppe. Zudem wurde das Migrationsverhalten von *Cemip*-defizienten kardialen Fibroblasten ex-vivo untersucht. Es zeigte sich eine signifikant gesteigerte Migration in den *Cemip*-defizienten Fibroblasten in einem flächenbasierten Migrations-assay was möglicherweise auf die erhöhte Myofibroblasten-Aktivierung in *Cemip*-KO Zellen zurück zu führen ist.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CEMIP entscheidend an der kardialen Heilung post MI beteiligt ist, indem es die Fibroblasten Aktivierung und auch das Überleben dieser Zellen maßgeblich beeinflusst.

6 Summary

Cardiovascular diseases continue to be one of the leading causes of death in Germany, with acute myocardial infarction and its consequences accounting for a large proportion of them. The aim of this thesis was to investigate the role and function of cell migration inducing and hyaluronan binding protein (CEMIP) in the healing process after myocardial infarction. We showed that *Cemip* is significantly upregulated in murine infarcted hearts, peaking after 72 h post-I/R. CAGG-Cre-ERTM^{+/-} *Cemip*^{fl/fl} (*Cemip*-KO) animals underwent surgical ischemia/reperfusion and were examined echocardiographically for up to 3 weeks. The hearts were removed after this period and investigated histologically. Compared to control mice, *Cemip*-KO mice showed significantly impaired cardiac function, as evidenced by reduced ejection fraction as well as increased end-systolic and end-diastolic volumes. Furthermore, *Cemip*-KO hearts also showed a significantly increased scar size and higher collagen content 3 weeks post I/R.

Murine cardiac fibroblasts were also isolated to examine *Cemip* mRNA *ex-vivo*. Here, *Cemip* mRNA expression levels showed a significant reduction after TGF- β 1 and after thapsigargin treatment. *Cemip* was also deleted *ex-vivo* using siRNA on murine cardiac fibroblasts. In this experiment *Cemip*-deficient cells showed significantly higher expression of activation markers such as *Cthrc1* after 24 hours of TGF- β 1 treatment, suggesting a phenotype switch to myofibroblasts by *Cemip* deletion.

To investigate the influence of CEMIP on ER stress and the potential influence on cell survival after infarction, an Annexin V apoptosis assay was performed. Here, increased apoptosis was shown in *Cemip*-deficient fibroblasts compared to the control group.

In addition, migration behavior of *Cemip*-deficient cardiac fibroblasts was investigated *ex-vivo* using an area-based migration assay. Significantly increased migration in *Cemip*-deficient fibroblasts was shown, which may be due to the increased myofibroblast activation in *Cemip*-KO cells.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der CEMIP Sekundärstruktur.....	9
Abbildung 2: Fibroblasten Aktivierung.....	13
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Generierung der Cemip-defizienter Mäuse..	22
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Migrations-Assays.	36
Abbildung 5: <i>Cemip</i> mRNA Expression im infarzierten Herzen.	43
Abbildung 6: <i>Cemip</i> mRNA Expression in murinen kardialen Fibroblasten.....	44
Abbildung 7: Analyse der Cemip mRNA Expression in murinen kardialen Fibroblasten unter verschiedenen Bedingungen.....	48
Abbildung 8: Analyse von Genexpressionsmustern in <i>Cemip</i> -defizienten murinen kardialen Fibroblasten.....	51
Abbildung 9: Analyse von Genexpressionsmustern in Cemip-defizienten murinen kardialen Fibroblasten unter TGF- β 1 Behandlung.....	53
Abbildung 10: Analyse der Cemip mRNA Expression in murinen kardialen Fibroblasten unter Tunicamycin Behandlung.....	54
Abbildung 11: Untersuchung der Apoptose Induktion durch ER-Stress an murinen kardialen Fibroblasten.....	56
Abbildung 12: Genexpressionsanalyse Analyse Cemip-defizienter muriner kardialer Fibroblasten nach Thapsigargin Behandlung.	57
Abbildung 13: Untersuchung der Viabilität an murinen kardialen Fibroblasten unter Behandlung verschiedener Thapsigargin Konzentrationen.	59
Abbildung 14: Durchflusszytometrische Analyse muriner kardialer Fibroblasten mittels Annexin V Färbung.	60
Abbildung 15: Untersuchung des Migrationsverhaltens <i>Cemip</i> -defizienter muriner kardialer Fibroblasten.....	62

Abbildung 16: Bestimmung der Narbengröße 21 d nach Infarkt mittels Gomori Trichrom Färbung.	64
Abbildung 17: Narbengrößen und Kollagen Gehalt in Picrosiriusrot-Rot gefärbten Herzen 21 d nach Infarkt.	66
Abbildung 18: Zeitverlauf echokardiographisch bestimmter kardialer Funktionsparameter bis zu 21 d nach Infarkt.	68
Abbildung 19: Erhöhte Herzgewichte bei <i>Cemip</i> -defizienten Mäusen 21 d post I/R.	69

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Puffer und Lösungen der Zellisolation und Zellkultur	27
Tabelle 2: Verwendete Reagenzien in der Zellkultur	29
Tabelle 3: Verwendete Reagenzien der siRNA vermittelten <i>Cemip</i> -Deletion.....	31
Tabelle 4: Verwendete Konzentrationen für die siRNA vermittelte <i>Cemip</i> -Deletion	32
Tabelle 5: Sequenzen aller verwendeter Primer.....	34
Tabelle 6: Verwendete Substanzen in der Durchflusszytometrie.....	37
Tabelle 7: Nicht-kommerziell verwendete Lösungen für histologische Färbungen.....	39
Tabelle 8: <i>Cemip</i> mRNA Expression unter verschiedenen Versuchsbedingungen.....	46
Tabelle 9: Finale Thapsigargin Konzentrationen	58

9 Literaturverzeichnis

1. **Statistisches Bundesamt.** Sterbefälle (absolut, Sterbeziffer, Ränge, Anteile) für die 10/20/50/100 häufigsten Todesursachen (ab 1998). Gliederungsmerkmale: Jahre, Region, Alter, Geschlecht, ICD-10. [Online] [Zitat vom: 16. 05. 2024.]
2. **Statistisches Bundesamt.** Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen. [Online] [Zitat vom: 16. 05. 2024.] <https://www.destatis.de/DE/Themen/GesellschaftUmwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html>.
3. **Robert Koch Institut.** Herz-Kreislauf Erkrankungen. [Online] [Zitat vom: 16. 05. 2024.] https://www.rki.de/DE/Content/GesundAZ/H/Herz_Kreislauf_Erkrankungen/Herz_Kreislauf_Erkrankungen_node.html.
4. **DGK.** ESC Pocket Guidelines. Vierte Definition des Myokardinfarktes. Version 2018.
5. **University of Virginia Health System.** Fundamental beliefs about atherosclerosis overturned. Complications of artery-hardening condition are number one killer worldwide. *ScienceDaily*. [Online] [Zitat vom: 16. 05. 2024 (englisch).]
6. **WHO.** The top 10 causes of death. [Online] [Zitat vom: 16. 05. 2024 (englisch).]
7. **F. van de Werf, D. Ardissino u. a.** Management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. The Task Force on the Management of Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *European heart journal*. [Online] Band 24, Nr. 1, Januar 2003, S. 28–66. PMID 12559937.
8. **e.V., Deutsche Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung.** Kardiologie. *Springer Medizin Verlag GmbH, ein Teil von Springer Nature - all rights reserved 2019*. [Online] 2019, 13: 337-345. <https://doi.org/10.1007/s12181-019-00343-6>.
9. **Tanaka, H., Abe, S., Yamashita, T., Arima, S., Saigo, M., Nakao, S., Toda, H., Nomoto, K., and Tahara, M.** Serum levels of cardiac troponin I and troponin T in estimating myocardial infarct size soon after reperfusion. *Coron Artery Dis*. [Online] 1997. 8(7): p. 433-9. doi: 10.1097/00019501-199707000-00005. PMID: 9383604.
10. **Mohammad, M.A., Koul, S., Smith, J.G., Noc, M., Lang, I., Holzer, M., Clemmensen, P., Jensen, U., Engstrom, T., Arheden, H., James, S., Lindahl, B., Metzler, B., and Erlinge, D.** Predictive Value of High-Sensitivity Troponin T for Systolic Dysfunction and

Infarct Size (Six Months) After ST-Elevation Myocardial Infarction. *Am J Cardiol.* [Online] 2018. 122(5): p. 735-743. doi: 10.1016/j.amjcard.2018.05.005. Epub 2018 Jun 5. PMID: 30049462.

11. **ESC Scientific Document Group 2017.** ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of. *European Heart Journal.* [Online] 07. January 2018, Volume 39, Issue 2: p. 119-177. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx393>.

12. **Erdmann, Erland.** *Klinische Kardiologie.* s.l. : Springer Verlag. 7. Auflage.

13. **R., Larsen.** Akutes Koronarsyndrom (ACS) und akuter Myokardinfarkt. Anästhesie und Intensivmedizin für die Fachpflege. [Online] 14. Juni 2016: 680-90 (german). doi: 10.1007/978-3-662-50444-4_50. PMCID: PMC7531525.

14. **ESC Scientific Document Group.** ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes: Developed by the task force on the management of acute coronary syndromes of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal.* [Online] 7. October 2023, Volume 44, Issue 38, p. 3720-3826.

15. **Kain V, Prabhu SD, Halade GV.** Inflammation revisited: inflammation versus resolution of inflammation following myocardial infarction. Basic research in cardiology. [Online] 2014; 109:444. doi: 10.1007/s00395-014-0444-7. Epub 2014 Sep 24. PMID: 25248433.

16. **Zhao W, Zhao J, Rong J.** Pharmacological Modulation of Cardiac Remodeling after Myocardial Infarction. *Oxid Med Cell Longev.* [Online] 30. December 2020:8815349. doi: 10.1155/2020/8815349. PMID: 33488934; PMCID: PMC7790555.

17. **Petz A, Grandoch M, Gorski DJ, Abrams M, Piroth M, Schneckmann R, Homann S, Müller J, Hartwig S, Lehr S, Yamaguchi Y, Wight TN, Gorressen S, Ding Z, Kötter S, Krüger M, Heinen A, Kelm M, Gödecke A, Flögel U, Fischer JW.** Cardiac Hyaluronan Synthesis Is Critically Involved in the Cardiac Macrophage Response and Promotes Healing After Ischemia Reperfusion Injury. *Circ Res.* [Online] 2019 May 10;124(10):1433-1447. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313285. PMID: 30916618.

18. **Piroth M, Gorski DJ, Hundhausen C, Petz A, Gorressen S, Semmler D, Zabri H, Hartwig S, Lehr S, Kelm M, Jung C, Fischer JW.** Hyaluronan synthase 3 is protective after cardiac ischemia-reperfusion by preserving the T cell response. *Matrix Biol.* [Online]

2022 Sep;112:116-131. doi: 10.1016/j.matbio.2022.08.008. Epub 2022 Aug 23. PMID: 35998871.

19. **Panizzi P, Swirski FK, Figueiredo JL, Waterman P, Sosnovik DE, Aikawa E, Libby P, Pittet M, Weissleder R, Nahrendorf M.** Impaired infarct healing in atherosclerotic mice with Ly-6C(hi) monocytosis. *Journal of the American College of Cardiology*. [Online] 2010; 55:1629–38. doi: 10.1016/j.jacc.2009.08.089. PMID: 20378083; PMCID: PMC2852892.

20. **Murry CE, Jennings RB, Reimer KA.** Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. [Online] November 1986; 74(5):1124-36. doi: 10.1161/01.cir.74.5.1124. PMID: 3769170.

21. **Jennings RB, Murry CE, Steenbergen C Jr, Reimer KA.** Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation*. [Online] September 1990; 82(3 Suppl):II2-12. PMID: 2394018.

22. **NG, Frangogiannis.** The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling. *J Clin Invest*. [Online] 1. May 2017; 127(5):1600-1612. doi: 10.1172/JCI87491. Epub 2017 May 1. PMID: 28459429; PMCID: PMC5409799.

23. **M., Takahashi.** Role of NLRP3 Inflammasome in Cardiac Inflammation and Remodeling after Myocardial Infarction. *Biol Pharm Bull*. [Online] 2019; 42(4):518-523. doi: 10.1248/bpb.b18-00369. PMID: 30930410.

24. **Gwechenberger M, Mendoza LH, Youker KA, Frangogiannis NG, Smith CW, Michael LH, Entman ML.** Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation*. [Online] 2. February 1999; 99(4): 546-51. doi: 10.1161/01.cir.99.4.546. PMID: 9927402.

25. **Kumar AG, Ballantyne CM, Michael LH, Kukielka GL, Youker KA, Lindsey ML, Hawkins HK, Birdsall HH, MacKay CR, LaRosa GJ, Rossen RD, Smith CW, Entman ML.** Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in the small veins of the ischemic and reperfused canine myocardium. *Circulation*. [Online] 1997; 95: 693–700. doi: 10.1161/01.cir.95.3.693. PMID: 9024159.

26. **Prabhu SD, Frangogiannis NG.** The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res*. [Online] 24. June 2016; 119(1): 91-112. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303577. PMID: 27340270; PMCID: PMC4922528.

27. **Kim Y, Nurakhayev S, Nurkesh A, Zharkinbekov Z, Saparov A.** Macrophage Polarization in Cardiac Tissue Repair Following Myocardial Infarction. *Int J Mol Sci.* [Online] 8. March 2021; 22(5): 2715. doi: 10.3390/ijms22052715. PMID: 33800220; PMCID: PMC7962533.

28. **Chen W, Frangogiannis NG.** Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochim Biophys Acta.* . [Online] 2013 Apr;1833(4):945-53. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.08.023. Epub 2012 Sep 7. PMID: 22982064; PMCID: PMC3541439.

29. **Squires CE, Escobar GP, Payne JF, Leonardi RA, Goshorn DK, Sheats NJ, et al.** Altered fibroblast function following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* [Online] 2005; 39: 699–707. doi: 10.1016/j.yjmcc.2005.07.008. PMID: 16111700.

30. **Dobaczewski M, Bujak M, Li N, Gonzalez-Quesada C, Mendoza LH, Wang XF, Frangogiannis NG.** Smad3 signaling critically regulates fibroblast phenotype and function in healing myocardial infarction. *Circ Res.* [Online] 6. August 2010;107(3):418-28. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.216101. Epub 2010 Jun 3. PMID: 20522804; PMCID: PMC2917472.

31. **Wang S, Wilkes MC, Leof EB, Hirschberg R.** Imatinib mesylate blocks a non-Smad TGF-beta pathway and reduces renal fibrogenesis in vivo. *Faseb J.* [Online] 2005 ;19: 1–11. doi: 10.1096/fj.04-2370com. PMID: 15629889.

32. **Daseke MJ 2nd, Tenkorang MAA, Chalise U, Konfrst SR, Lindsey ML.** Cardiac fibroblast activation during myocardial infarction wound healing: Fibroblast polarization after MI. *Matrix Biol.* [Online] September 2020; 91-92: 109-116. doi: 10.1016/j.matbio.2020.03.010. Epub 2020 May 21. PMID: 32446909; PMCID: PMC7434699.

33. **Saxena A, Bujak M, Frunza O, Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Lu B, Gerard C, Frangogiannis NG.** CXCR3-independent actions of the CXC chemokine CXCL10 in the infarcted myocardium and in isolated cardiac fibroblasts are mediated through proteoglycans. *Cardiovasc Res.* [Online] 2014; 103: 217–27. doi: 10.1093/cvr/cvu138. Epub 2014 Jun 1. PMID: 24891401; PMCID: PMC4148609.

34. **Scalise RFM, De Sarro R, Caracciolo A, Lauro R, Squadrito F, Carerj S, Bitto A, Micari A, Bella GD, Costa F, Irrera N.** Fibrosis after Myocardial Infarction: An Overview on Cellular Processes, Molecular Pathways, Clinical Evaluation and Prognostic Value. *Med Sci*

(Basel). [Online] 1. March 2021; 9(1): 16. doi: 10.3390/medsci9010016. PMID: 33804308; PMCID: PMC7931027.

35. **Nagase T, Ishikawa K, Kikuno R, Hirose M, Nomura N, Ohara O.** Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XV. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res.* [Online] 29. October 1999; 6(5): 337-45. doi: 10.1093/dnares/6.5.337. PMID: 10574462.

36. **Liu Y, Hu G, Li Y, Kong X, Yang K, Li Z, Lao W, Li J, Zhong J, Zhang S, Leng Y, Bi C, Zhai A.** Research on the biological mechanism and potential application of CEMIP. *Front Immunol.* [Online] 18. August 2023; 14: 1222425. doi: 10.3389/fimmu.2023.1222425. PMID: 37662915; PMCID: PMC10471826.

37. **Michishita E, Garcés G, Barrett JC, Horikawa I.** Upregulation of the KIAA1199 gene is associated with cellular mortality. *Cancer Lett.* [Online] 28. July 2006; 239(1): 71-7. doi: 10.1016/j.canlet.2005.07.028. Epub 2005 Sep 12. PMID: 16157444.

38. **Evensen NA, Kucsu C, Nguyen HL, Zarrabi K, Dufour A, Kadam P, et al.** Unraveling the role of KIAA1199, a novel endoplasmic reticulum protein, in cancer cell migration. *J Natl Cancer Inst.* [Online] 2013; 105(18): 1402–16. doi: 10.1093/jnci/djt224. Epub 2013 Aug 29. PMID: 23990668; PMCID: PMC3776264.

39. **Spataro S, Guerra C, Cavalli A, Sgrignani J, Sleeman J, Poulain L, Boland A, Scapozza L, Moll S, Prunotto M.** CEMIP (HYBID, KIAA1199): structure, function and expression in health and disease. *FEBS J.* [Online] August 2023; 290(16): 3946-3962. doi: 10.1111/febs.16600. Epub 2022 Sep 5. PMID: 35997767.

40. **Abe S, Usami S, Nakamura Y.** Mutations in the gene encoding KIAA1199 protein, an inner-ear protein expressed in Deiters' cells and the fibrocytes, as the cause of nonsyndromic hearing loss. *J Hum Genet.* [Online] 2003; 48(11): 564–70. doi: 10.1007/s10038-003-0079-2. PMID: 14577002.

41. **Yoshida H, Nagaoka A, Nakamura S, Tobishi M, Sugiyama Y, Inoue S.** N-Terminal signal sequence is required for cellular trafficking and hyaluronan-depolymerization of KIAA1199. *FEBS Lett.* [Online] 3. January 2014; 588(1): 111-6. doi: 10.1016/j.febslet.2013.11.017. Epub 2013 Nov 20. PMID: 24269685.

42. **Deroyer, C., Charlier, E., Neuville, S. et al.** CEMIP (KIAA1199) induces a fibrosis-like process in osteoarthritic chondrocytes. *Cell Death Dis* 10. [Online] 103, 2019. doi:

10.1038/s41419-019-1377-8. PMID: 30718510; PMCID: PMC6362103.

43. **Owenier C, Hesse J, Alter C, Ding Z, Marzooq A, Petzsch P, Köhrer K, Schrader J.** Novel technique for the simultaneous isolation of cardiac fibroblasts and epicardial stromal cells from the infarcted murine heart. *Cardiovasc Res.* [Online] 2020 Apr 1;116(5):1047-1058. doi: 10.1093/cvr/cvz193. PMID: 31504244.

44. **R., Virchow.** Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. *A. Hirschwald.* [Online] 1858.

45. **Plikus MV, Wang X, Sinha S, Forte E, Thompson SM, Herzog EL, Driskell RR, Rosenthal N, Biernaskie J, Horsley V.** Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell.* [Online] 22. July 2021; 184(15): 3852-3872. doi: 10.1016/j.cell.2021.06.024. PMID: 34297930; PMCID: PMC8566693.

46. **Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z.** Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* [Online] 1. December 2011; 3(12): a005058. doi: 10.1101/cshperspect.a005058. PMID: 21917992; PMCID: PMC3225943.

47. **Fu X, Khalil H, Kanisicak O, Boyer JG, Vagnozzi RJ, Maliken BD, Sargent MA, Prasad V, Valiente-Alandi I, Blaxall BC, Molkentin JD.** Specialized fibroblast differentiated states underlie scar formation in the infarcted mouse heart. *J Clin Invest.* [Online] 1. May 2018; 128(5): 2127-2143. doi: 10.1172/JCI98215. Epub 2018 Apr 16. PMID: 29664017; PMCID: PMC5957472.

48. **van Putten S, Shafieyan Y, Hinz B.** Mechanical control of cardiac myofibroblasts. . *J Mol Cell Cardiol.* [Online] April 2016; 93: 133-42. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.11.025. Epub 2015 Nov 24. PMID: 26620422.

49. **Gittenberger-de Groot AC, Vrancken Peeters MP, Mentink MM, Gourdie RG, Poelmann RE.** Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions. *Circ Res.* [Online] 82, 1998, 1043–1052. doi: 10.1161/01.res.82.10.1043. PMID: 9622157.

50. **NG., Frangogiannis.** Cardiac fibrosis. *Cardiovasc Res.* 2021 May 25;117(6):1450-1488. [Online] 25. May 2021; 117(6): 1450-1488. doi: 10.1093/cvr/cvaa324. PMID: 33135058; PMCID: PMC8152700.).

51. **Lee-Sayer SS, Dong Y, Arif AA, Olsson M, Brown KL, Johnson P.** The where, when,

how, and why of hyaluronan binding by immune cells. *Front Immunol.* [Online] 14. April 2015; 6:150. doi: 10.3389/fimmu.2015.00150. PMID: 25926830; PMCID: PMC4396519.

52. **Saxena A., Chen W., Su Y., Rai V., Uche O.U., Li N., Frangogiannis N.G.** IL-1 Induces Proinflammatory Leukocyte Infiltration and Regulates Fibroblast Phenotype in the Infarcted Myocardium. *J. Immunol.* [Online] 2013;191:4838–4848. doi: 10.4049/jimmunol.1300725. Epub 2013 Sep 27. PMID: 24078695; PMCID: PMC3822582.

53. **Hanna A., Shinde A.V., Li R., Alex L., Humeres C., Balasubramanian P., Frangogiannis N.G.** Collagen denaturation in the infarcted myocardium involves temporally distinct effects of MT1-MMP-dependent proteolysis and mechanical tension. *Matrix Biol.* [Online] 2021;99:18–42. doi: 10.1016/j.matbio.2021.05.005. Epub 2021 May 25. PMID: 34048934; PMCID: PMC8591556.

54. **Ma, Y., Iyer, R.P., Jung, M., Czubryt, M.P., and Lindsey, M.L.** Cardiac Fibroblast Activation Post-Myocardial Infarction: Current Knowledge Gaps. *Trends Pharmacol Sci.* [Online] 2017; 38(5): p. 448-458. doi: 10.1016/j.tips.2017.03.001. Epub 2017 Mar 29. PMID: 28365093; PMCID: PMC5437868.

55. **Tai Y, Woods EL, Dally J, Kong D, Steadman R, Moseley R, Midgley AC.** Myofibroblasts: Function, Formation, and Scope of Molecular Therapies for Skin Fibrosis. *Biomolecules.* [Online] 23. July 2021; 11(8): 1095. doi: 10.3390/biom11081095. PMID: 34439762; PMCID: PMC8391320.

56. **Fu X., Khalil H., Kanisicak O., Boyer J.G., Vagnozzi R.J., Maliken B.D., Sargent M.A., Prasad V., Valiente-Alandi I., Blaxall B.C., et al.** Specialized fibroblast differentiated states underlie scar formation in the infarcted mouse heart. *J. Clin. Investig.* [Online] 2018; 128: 2127–2143. doi: 10.1172/JCI98215. Epub 2018 Apr 16. PMID: 29664017; PMCID: PMC5957472.

57. **Senft D, Ronai ZA.** UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem Sci.* [Online] 2015 Mar;40(3):141-8. doi: 10.1016/j.tibs.2015.01.002. Epub 2015 Feb 2. PMID: 25656104; PMCID: PMC4340752.

58. **Harding HP, Zhang Y, Ron D.** Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature.* [Online] 1999 Jan 21;397(6716):271-4. doi: 10.1038/16729. PMID: 9930704.

59. **Balch, W. E., Morimoto, R. I., Dillin, A. & Kelly, J. W.** Adapting proteostasis for disease

intervention. *Science* 319. [Online] 2008, 916–919. doi: 10.1126/science.1141448. PMID: 18276881.

60. **Hurtley, S. M. et al.** Interactions of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein (BiP). *J. Cell Biol.* 108. [Online] 1989, 2117–2126. doi: 10.1083/jcb.108.6.2117. PMID: 2738090; PMCID: PMC2115615.

61. **Shiraishi H, Okamoto H, Yoshimura A, Yoshida H.** ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1. *J Cell Sci.* [Online] 1. October 2006; 119(Pt 19): 3958-66. doi: 10.1242/jcs.03160. Epub 2006 Sep 5. PMID: 16954146.

62. **Liu Z, Lv Y, Zhao N, Guan G, Wang J.** Protein kinase R-like ER kinase and its role in endoplasmic reticulum stress-decided cell fate. *Cell Death Dis.* [Online] 2015 Jul 30;6(7):e1822. doi: 10.1038/cddis.2015.183. PMID: 26225772; PMCID: PMC4650730.

63. **Xu, C., Bailly-Maitre, B. and Reed, J. C.** Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J. Clin. Invest.* 115. [Online] 2005, 2656-2664. doi: 10.1172/JCI26373. PMID: 16200199; PMCID: PMC1236697.

64. **Jin T, Lin J, Gong Y, Bi X, Hu S, Lv Q, Chen J, Li X, Chen J, Zhang W, Wang M, Fu G.** iPLA2 β Contributes to ER Stress-Induced Apoptosis during Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Cells.* [Online] 9. Jun 2021; 10(6):1446. doi: 10.3390/cells10061446. PMID: 34207793; PMCID: PMC8227999.

65. **Mainali N, Li X, Wang X, Balasubramaniam M, Ganne A, Kore R, Shmookler Reis RJ, Mehta JL, Ayyadevara S.** Myocardial infarction elevates endoplasmic reticulum stress and protein aggregation in heart as well as brain. *Mol Cell Biochem.* [Online] 3. November 2023. doi: 10.1007/s11010-023-04856-3. Epub ahead of print. PMID: 37922111.

66. **Quynh Doan NT, Christensen SB.** Thapsigargin, Origin, Chemistry, Structure-Activity Relationships and Prodrug Development. *Curr Pharm Des.* [Online] 2015; 21(38):5501-17. doi: 10.2174/1381612821666151002112824. PMID: 26429715.

67. **Christensen SB, Simonsen HT, Engedal N, Nissen P, Møller JV, Denmeade SR, Isaacs JT.** From Plant to Patient: Thapsigargin, a Tool for Understanding Natural Product Chemistry, Total Syntheses, Biosynthesis, Taxonomy, ATPases, Cell Death, and Drug Development. *Prog Chem Org Nat Prod.* [Online] 2021; 115:59-114. doi: 10.1007/978-3-030-64853-4_2. PMID: 33797641.

68. **Krebs J, Agellon LB, Michalak M.** Ca(2+) homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* [Online] 2015 Apr 24;460(1):114-21. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.004. PMID: 25998740.
69. **Mekahli D, Bultynck G, Parys JB, De Smedt H, Missiaen L.** Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* [Online] 2011 Jun 1;3(6):a004317. doi: 10.1101/cshperspect.a004317. PMID: 21441595; PMCID: PMC3098671.
70. **Banerjee S, Ansari AA, Upadhyay SP, Mettman DJ, Hibdon JR, Quadir M, Ghosh P, Kambhampati A, Banerjee SK.** Benefits and Pitfalls of a Glycosylation Inhibitor Tunicamycin in the Therapeutic Implication of Cancers. *Cells.* [Online] 2024 Feb 25;13(5):395. doi: 10.3390/cells13050395. PMID: 38474359; PMCID: PMC10930662.
71. **Li J, Lee B, Lee AS.** Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *J Biol Chem.* [Online] 17. March 2006; 281(11): 7260-70. doi: 10.1074/jbc.M509868200. Epub 2006 Jan 6. PMID: 16407291.
72. **Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, Manabe T, Yamagishi S, Bando Y, Imaizumi K, Tsujimoto Y, Tohyama M.** Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol.* [Online] 10. May 2004; 165(3): 347-56. doi: 10.1083/jcb.200310015. Epub 2004 May 3. PMID: 15123740; PMCID: PMC2172196.
73. **Ferri KF, Kroemer G.** Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol.* [Online] November 2001; 3(11): E255-63. doi: 10.1038/ncb1101-e255. PMID: 11715037.
74. **Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, Korsmeyer SJ.** BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science.* [Online] 4. April 2003; 300(5616): 135-9. doi: 10.1126/science.1081208. Epub 2003 Mar 6. PMID: 12624178.
75. **Nossuli TO, Lakshminarayanan V, Baumgarten G, Taffet GE, Ballantyne CM, Michael LH, Entman ML.** A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* [Online] 2000 Apr;278(4):H1049-55. doi: 10.1152/ajpheart.2000.278.4.H1049. PMID: 10749697.
76. **Gorressen S, Stern M, van de Sandt AM, Cortese-Krott MM, Ohlig J, Rassaf T,**

Gödecke A, Fischer JW, Heusch G, Merx MW, Kelm M. Circulating NOS3 modulates left ventricular remodeling following reperfused myocardial infarction. *PLoS One*. [Online] 2015 Apr 14;10(4):e0120961. doi: 10.1371/journal.pone.0120961. PMID: 25875863; PMCID: PMC4397096.

77. **Gorski DJ, Petz A, Reichert C, Twarock S, Grandoch M, Fischer JW.** Cardiac fibroblast activation and hyaluronan synthesis in response to hyperglycemia and diet-induced insulin resistance. *Sci Rep*. [Online] 2019 Feb 12;9(1):1827. doi: 10.1038/s41598-018-36140-6. PMID: 30755628; PMCID: PMC6372628.

78. **Fischer, JW.** Role of hyaluronan in atherosclerosis: Current knowledge and open questions. *Matrix Biol*. [Online] 2019 May;78-79:324-336. doi: 10.1016/j.matbio.2018.03.003. Epub 2018 Mar 3. PMID: 29510229.

79. **Müller J, Gorressen S, Grandoch M, Feldmann K, Kretschmer I, Lehr S, Ding Z, Schmitt JP, Schrader J, Garbers C, Heusch G, Kelm M, Scheller J, Fischer JW.** Interleukin-6-dependent phenotypic modulation of cardiac fibroblasts after acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. [Online] 2014;109(6):440. doi: 10.1007/s00395-014-0440-y. Epub 2014 Sep 19. PMID: 25236954.

80. **Huebener P, Abou-Khamis T, Zymek P, Bujak M, Ying X, Chatila K, Haudek S, Thakker G, Frangogiannis NG.** CD44 is critically involved in infarct healing by regulating the inflammatory and fibrotic response. *J Immunol*. [Online] 2008 Feb 15;180(4):2625-33. doi: 10.4049/jimmunol.180.4.2625. PMID: 18250474.

81. **N., Frangogiannis.** Transforming growth factor- β in tissue fibrosis. *J Exp Med*. [Online] 2020 Feb 13;217(3):e20190103. doi: 10.1084/jem.20190103. PMID: 32997468; PMCID: PMC7062524.

82. **Eickelberg O, Köhler E, Reichenberger F, Bertschin S, Woodtli T, Erne P, Perruchoud AP, Roth M.** Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF- β 1 and TGF- β 3 doi: 10.1152/a. *Am J Physiol*. [Online] 1999 May;276(5):L814-24. doi: 10.1152/ajplung.1999.276.5.L814. PMID: 10330038.

83. **Deroyer C, Charlier E, Neuville S, Malaise O, Gillet P, Kurth W, Chariot A, Malaise M, de Seny D.** CEMIP (KIAA1199) induces a fibrosis-like process in osteoarthritic chondrocytes. *Cell Death Dis*. [Online] 4. February 2019; 10(2): 103. doi: 10.1038/s41419-019-1377-8. PMID: 30718510; PMCID: PMC6362103.

84. **Nagaoka A, Yoshida H, Nakamura S, Morikawa T, Kawabata K, Kobayashi M, Sakai S, Takahashi Y, Okada Y, Inoue S.** Regulation of Hyaluronan (HA) Metabolism Mediated by HYBID (Hyaluronan-binding Protein Involved in HA Depolymerization, KIAA1199) and HA Synthases in Growth Factor-stimulated Fibroblasts. *J Biol Chem.* [Online] 25. December 2015; 290(52): 30910-23. doi: 10.1074/jbc.M115.673566. Epub 2015 Oct 30. PMID: 26518873; PMCID: PMC4692219.

85. **Schmaus A, Rothley M, Schreiber C, Möller S, Roßwag S, Franz S, Garvalov BK, Thiele W, Spataro S, Herskind C, Prunotto M, Anderegg U, Schnabelrauch M, Sleeman J.** Sulfated hyaluronic acid inhibits the hyaluronidase CEMIP and regulates the HA metabolism, proliferation and differentiation of fibroblasts. *Matrix Biol.* [Online] May 2022; 109: 173-191. doi: 10.1016/j.matbio.2022.04.001. Epub 2022 Apr 8. PMID: 35405271.

86. **Sugiyama A, Hirano Y, Okada M, Yamawaki H.** Endostatin Stimulates Proliferation and Migration of Myofibroblasts Isolated from Myocardial Infarction Model Rats. *Int J Mol Sci.* [Online] 2018 Mar 6;19(3):741. doi: 10.3390/ijms19030741. PMID: 29509663; PMCID: PMC5877602.

87. **D'Urso M, Kurniawan NA.** Mechanical and Physical Regulation of Fibroblast-Myofibroblast Transition: From Cellular Mechanoreponse to Tissue Pathology. *Front Bioeng Biotechnol.* [Online] 2020 Dec 22;8:609653. doi: 10.3389/fbioe.2020.609653. PMID: 33425874; PMCID: PMC7793682.

88. **Ghazi K, Deng-Pichon U, Warnet JM, Rat P.** Hyaluronan fragments improve wound healing on in vitro cutaneous model through P2X7 purinoreceptor basal activation: role of molecular weight. *PLoS One.* [Online] 2012; 7(11): e48351. doi: 10.1371/journal.pone.0048351. Epub 2012 Nov 16. PMID: 23173033; PMCID: PMC3500239.

89. **Stern R, Asari AA, Sugahara KN.** Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol.* [Online] 2006 Aug;85(8):699-715. doi: 10.1016/j.ejcb.2006.05.009. Epub 2006 Jul 5. PMID: 16822580.

90. **Banach A, Jiang YP, Roth E, Kuscu C, Cao J, Lin RZ.** CEMIP upregulates BiP to promote breast cancer cell survival in hypoxia. *Oncotarget.* [Online] 2. July 2019; 10(42): 4307-4320. doi: 10.18632/oncotarget.27036. PMID: 31303964; PMCID: PMC6611512.

91. **Rozpedek W, Pytel D, Mucha B, Leszczynska H, Diehl JA, Majsterek I.** The Role of the PERK/eIF2 α /a44/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic

Reticulum Stress. *Curr Mol Med.* [Online] 2016;16(6):533-44. doi: 10.2174/1566524016666160523143937. PMID: 27211800; PMCID: PMC5008685.

92. **He J, Liu D, Zhao L, Zhou D, Rong J, Zhang L, Xia Z.** Myocardial ischemia/reperfusion injury: Mechanisms of injury and implications for management (Review). *Exp Ther Med.* [Online] 2022 Jun;23(6):430. doi: 10.3892/etm.2022.11357. Epub 2022 May 6. PMID: 35607376; PMC.

93. **Liu B, Li X, Wang D, Yu Y, Lu D, Chen L, Lv F, Li Y, Cheng L, Song Y, Xing Y.** CEMIP promotes extracellular matrix-detached prostate cancer cell survival by inhibiting ferroptosis. *Cancer Sci.* [Online] June 2022; 113(6): 2056-2070. doi: 10.1111/cas.15356. Epub 2022 Apr 15. PMID: 35363929; PMCID: PMC9207355.

94. **Domanegg K, Sleeman JP, Schmaus A.** CEMIP, a Promising Biomarker That Promotes the Progression and Metastasis of Colorectal and Other Types of Cancer. *Cancers (Basel).* [Online] 18. October 2022; 14(20): 5093. doi: 10.3390/cancers14205093. PMID: 36291875; PMCID: PMC9600181.

95. **Li L, Yan LH, Manoj S, Li Y, Lu L.** Central Role of CEMIP in Tumorigenesis and Its Potential as Therapeutic Target. *J Cancer.* [Online] 20. July 2017; 8(12): 2238-2246. doi: 10.7150/jca.19295. PMID: 28819426; PMCID: PMC5560141.

96. **Yu Y, Liu B, Li X, Lu D, Yang L, Chen L, Li Y, Cheng L, Lv F, Zhang P, Song Y, Xing Y.** ATF4/CEMIP/PKC α promotes anoikis resistance by enhancing protective autophagy in prostate cancer cells. *Cell Death Dis.* [Online] 10. January 2022; 13(1): 46. doi: 10.1038/s41419-021-04494-x. PMID: 35013120; PMCID: PMC8748688.

97. **Miao X, Wang Y, Miao Z, Pan H.** A comprehensive review of the progress of cell migration inducing hyaluronidase 1. *Medicine (Baltimore).* [Online] 25. November 2022; 101(47): e31610. doi: 10.1097/MD.00000000000031610. PMID: 36451490; PMCID: PMC9704909.

98. **Cheng J, Zhang Y, Wan R, Zhou J, Wu X, Fan Q, He J, Tan W, Deng Y.** CEMIP Promotes Osteosarcoma Progression and Metastasis Through Activating Notch Signaling Pathway. *Front Oncol.* [Online] 26. July 2022; 12: 919108. doi: 10.3389/fonc.2022.919108. PMID: 35957875; PMCID: PMC9361750.

99. **Li L, Shen X, Mo X, Chen Z, Yu F, Mo X, Song J, Huang G, Liang K, Luo Z, Mao N, Yang J.** CEMIP-mediated hyaluronan metabolism facilitates SCLC metastasis by activating

TLR2/c-Src/ERK1/2 axis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* [Online] June 2023; 1870(5): 119451. doi: 10.1016/j.bbamcr.2023.119451. Epub 2023 Mar 15. PMID: 36931608.

100. **Hua Q, Zhang B, Xu G, Wang L, Wang H, Lin Z, Yu D, Ren J, Zhang D, Zhao L, Zhang T.** CEMIP, a novel adaptor protein of OGT, promotes colorectal cancer metastasis through glutamine metabolic reprogramming via reciprocal regulation of β -catenin. *Oncogene.* [Online] November 2021; 40(46): 6443-6455. doi: 10.1038/s41388-021-02023-w. Epub 2021 Oct 4. PMID: 34608265.

101. **Xue Q, Wang X, Deng X, Huang Y, Tian W.** CEMIP regulates the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis through the WNT-beta-catenin signaling pathway. *Biochem Cell Biol.* [Online] April 2020; 98(2): 249-257. doi: 10.1139/bcb-2019-0249. Epub 2020 Mar 24. PMID: 32207314.

102. **Skrbic B, Engebretsen KV, Strand ME, Lunde IG, Herum KM, Marstein HS, Sjaastad I, Lunde PK, Carlson CR, Christensen G, Bjørnstad JL, Tønnessen T. T.** Lack of collagen VIII reduces fibrosis and promotes early mortality and cardiac dilatation in pressure overload in mice. *Cardiovasc Res.* [Online] 2015 Apr 1;106(1):32-42. doi: 10.1093/cvr/cvv041. Epub 2015 Feb 17. PMID: 25694587.

10 Poster Präsentationen

Theresa Hube, Rebekka Schneckmann, Simone Gorressen, Katharina Bottermann, Lennart Gebert, Angelika Pastuschka, Anne Petz, Daniel J. Gorski, Fischer J.W.

Cell Migration Inducing Protein (Cemip) deletion worsens cardiac outcome after cardiac ischemia/reperfusion in mice

Die 90. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK), 2024, Mannheim

Lebenslauf

Person

Name	Theresa Hube
Geburtsdatum	04.11.1994
Geburtsort	Düsseldorf
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Promotion

01/2021 – heute	Institut für Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf Doktorvater: Professor Dr. Jens W. Fischer Thema: „Untersuchung des Einflusses von CEMIP (Cell migration-inducing and hyaluronan-binding protein) auf die kardiale Fibroblasten-Antwort nach akutem Myokardinfarkt“.
-----------------	---

Studium

10/2020	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Erteilung der Approbation als Apothekerin
05/2020 – 10/2020	Pharmaziepraktikum, Invite Research BAYER, Leverkusen
11/2019 – 04/2020	Pharmaziepraktikum, Paracelsus-Apotheke Düsseldorf
10/2019	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
03/2017	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
04/2014 – 10/2019	Studium der Pharmazie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Schule

07/2005 – 07/2013	Pascal-Gymnasium, Grevenbroich
06/2001 -07/2005	Katholische Grundschule, Grevenbroich

Danksagung

Ich möchte diese Gelegenheit nutzen, um meinen tiefsten Dank an all jene auszusprechen, die mich während der Erstellung meiner Dissertation unterstützt und begleitet haben. Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Jens W. Fischer, dessen Leitung und Fachkenntnis unerlässlich für die Fertigstellung dieser Arbeit waren. Sein Vertrauen in meine Forschungsarbeit und die Freiheit eigenen experimentellen Ideen und Forschungsrichtungen folgen zu dürfen, haben meine akademische und persönliche Entwicklung maßgeblich beeinflusst.

Ebenso bin ich Prof. Dr. Jürgen Breitreutz für seine persönliche Expertise und Erfahrung sowie sein Engagement als mein zweiter Gutachter dankbar. Seine Lösungsansätze haben in schwierigen Phasen die Richtung gewiesen die ich brauchte. Mein aufrichtiger Dank geht auch an Dr. Rebekka Schneckmann für ihre Rolle in der Projektleitung in der finalen Phase. Ihre Fachkenntnis, Anleitung und auch mentale Unterstützung waren besonders in der Endphase meiner Promotion von unschätzbarem Wert. Ich möchte ebenfalls Dr. Simone Gorressen meinen Dank aussprechen für die tatkräftige Unterstützung bei allen Tierversuchen und ihre Expertise bei allen tierversuchsspezifischen Fragestellungen sowie ihr unermüdlicher Einsatz im Bereich der Dokumentation der Tierversuche. Ebenso möchte ich Dr. Katharina Bottermann meine Dankbarkeit aussprechen. In einer Zeit, in der uns die Umstände vor große Herausforderungen stellten, hat sie die Koordination aller Doktoranden übernommen. Ihre Rolle in dieser kritischen Phase hat maßgeblich zum Fortschritt jedes Einzelnen von uns beigetragen. Besonders für das erste Jahr meiner Promotion möchte ich zudem Dr. Daniel Gorski und Dr. Anne Petz danken, für ihr Engagement mich anzulernen und mir die notwendigen Fähigkeiten und das Wissen zu vermitteln. Ihr fachspezifisches *know-how* und ihre Bereitschaft, ihr Wissen zu teilen, waren für mich in dieser initialen Phase meiner akademischen Laufbahn von großem Wert und haben das Projekt langfristig geprägt. Ein weiterer Dank gilt meinen Kolleginnen Marina Vidakovic, Peggy Marra-Mann und Maria Nadine Bräuer, die durch ihre große fachliche Expertise im Labor integraler Bestandteil des Projektes waren.

Darüber hinaus danke ich von Herzen Petra Pieres für die Erstellung vieler, aussagekräftiger Illustrationen.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie, meinen Freunden und meinem Partner danken, die mich durch ihre Geduld, ihr Verständnis und ihre Zuversicht durch diese anspruchsvolle Zeit getragen haben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf sowie der Richtlinien der Medizinischen Fakultät zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis erstellt worden ist. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Inhalte wurden als solche kenntlich gemacht. Ich bin mir darüber klar, dass der Bruch der obigen eidesstattlichen Versicherung in jedem Fall zum Nichtbestehen der betreffenden Promotionsleistung führt und die weitere Folge hat, dass die Fakultät über die Entziehung des Doktorgrades entscheidet (§ 16 Promotionsordnung). Die strafrechtlichen Konsequenzen einer falschen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt (§156 StGB). Des Weiteren kann gemäß § 63 Absatz 5 HG eine Zuwiderhandlung mit einer Geldbuße geahndet werden.

Düsseldorf, den 16.07.2024

Theresa Hube