

Aus der Klinik und Poliklinik
für Herzchirurgie, herzchirurgische Intensivmedizin und Thoraxchirurgie der
Universität zu Köln

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Th. Wahlers

Identifizierung von Biomarkern in
hypertrophierten Kardiomyozyten und Einfluss
von mesenchymalen Stammzellen im *in vitro*
Modell

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von Laura Marie Suhr

aus Melle

promoviert am

07. März 2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2023

Eidesstattliche Erklärung

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachterin: Professorin Dr. rer. nat. A.-N. Paunel-Görgülü

2. Gutachter: Privatdozent Dr. rer. medic. K. P. Pfannkuche

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit verwendeten iPS - CM wurden ohne meine Mitarbeit im Labor des Instituts für Neurophysiologie der Uniklinik Köln in der AG PD Dr. Kurt Pfannkuche differenziert und aufgezogen und danach für die Experimente dieser Arbeit bereitgestellt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente, ausgenommen der Microarray- Analyse, sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Priv.- Doz. Dr. Paunel-Görgülü und Frau Dr. Philipp sowie den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Henrich und Frau Lauer von mir selbst ausgeführt worden.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Daten zur Microarray- Analyse wurde nach Vorbereitung und Bereitstellung der Proben durch mich, anschließend ohne meine Mitarbeit in dem Institut für Neurophysiologie der Uniklinik Köln von der AG Prof. A. Sachinidis ermittelt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 07. März 2023



Danksagung

Zum Gelingen meiner Arbeit haben viele Menschen auf unterschiedliche Weise beigetragen. An dieser Stelle möchte ich mich dafür bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an Frau Priv. Doz. Dr. Paunel-Görgülü, die mich als Betreuerin sowohl während der Zeit meiner praktischen Tätigkeit im Labor als auch im Anschluss beim Schreiben dieser Dissertation jederzeit mit ihrem umfassenden Fachwissen bei der Umsetzung dieser Arbeit unterstützt hat.

Des Weiteren geht ein herzlicher Dank an meine Kollegin Frau Dr. Philipp und die medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Henrich und Frau Lauer, die mir während meiner Zeit im Labor stets zur Seite standen.

Zusätzlich möchte ich mich hier bei Frau Holthaus und der aktuellen Besetzung des Labors Frau Mirau und Frau Schmitt bedanken, die mir bei Nachfragen während der Verschriftlichung dieser Arbeit geholfen haben.

Ein besonderer Dank gilt ebenso Tom, der mich als Laborpartner während meiner Zeit im Labor täglich mit seinem Wissen und auch seiner guten Laune unterstützt und motiviert hat.

Diese Gelegenheit möchte ich auch nutzen, meinem klinischen und wissenschaftlichen Lehrer Herrn Professor Wahlers für die wohlwollende Unterstützung ganz herzlich zu danken.

Nicht zuletzt gilt natürlich mein besonders herzlicher Dank meinen Eltern, Geschwistern und meinem Freund Christian, die mich jederzeit ausnahmslos unterstützt haben und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1 Zusammenfassung	11
2 Einleitung	13
2.1 Das Herz als Motor – leistungsfähig und ausdauernd	13
2.2 Formen der Myokardhypertrophie.....	14
2.2.1 Physiologische und pathologische Myokardhypertrophie.....	14
2.2.2 Exzentrische und konzentrische Myokardhypertrophie	15
2.2.3 Linksventrikuläre und rechtsventrikuläre Myokardhypertrophie.....	17
2.3 Hypertrophie in Kardiomyozyten	18
2.3.1 Induktion von Hypertrophie – Kardiales Remodeling.....	18
2.3.2 Kardiale <i>in vitro</i> Modelle	23
2.4 Von der Myokardhypertrophie zur Herzinsuffizienz.....	24
2.4.1 Allgemeines zur Herzinsuffizienz	24
2.4.2 Therapie der Myokardhypertrophie auf der Basis mesenchymaler Stammzellen	25
2.5 Ziele der Arbeit	28
3 Material und Methoden	29
3.1 Material.....	29
3.1.1 Verbrauchsartikel und Zubehör.....	29
3.1.2 Geräte	30
3.1.3 Chemikalien und Lösungen	30
3.1.4 Zellkultur.....	32
3.1.5 Puffer.....	33
3.1.6 Kits	35
3.1.7 Primer.....	35
3.1.8 Antikörper.....	35
3.1.9 Interleukine	35
3.1.10 Verwendete Zellreihen.....	36

3.2	Methoden	37
3.2.1	Auftauen, Kultivierung und Passagieren von HL – 1 Zellen.....	37
3.2.2	Kultivierung und Passagieren von iPS – CM.....	38
3.2.3	Bestimmung der Zellzahl	38
3.2.4	<i>In vitro</i> Induktion von Hypertrophie	39
3.2.5	Auftauen und Kultivierung von mMSCs.....	39
3.2.6	Co – Kultivierung iPS – CM und mMSCs.....	40
3.2.7	Bestimmung der Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie	40
3.2.8	Zelltrennung via <i>autoMACS</i> ®	43
3.2.9	Reinheitsbestimmung mittels Durchflusszytometrie	44
3.2.10	Färbung des Aktin-Zytoskeletts und Quantifizierung der Zellgröße	44
3.2.11	RNA- Isolation mittels Trizol.....	45
3.2.12	RNA- Isolation mit Hilfe des RNeasy Mini Kit von Qiagen.....	46
3.2.13	DNase- Vorbehandlung von RNA.....	47
3.2.14	RNA Konzentrationsmessung.....	47
3.2.15	RNA- Aufreinigung mittels Ethanol-Fällung.....	47
3.2.16	RNA- Aufreinigung mit Hilfe des NucleoSpin® RNA Clean-up.....	48
3.2.17	Reverse Transkription.....	48
3.2.18	Real-Time quantitative PCR (qPCR).....	49
3.2.19	Microarray- Analyse.....	50
3.2.20	Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung	50
3.2.21	Gelelektrophorese	51
3.2.22	Western Blot.....	53
3.2.23	Immundetektion	53
3.2.24	Blot- Stripping.....	54
3.2.25	Statistik.....	54
4	Ergebnisse	56
4.1	Hypertrophieinduktion in HL - 1 Zellen und iPS - CM.....	56
4.2	Effekt der Hypertrophieinduktion auf die Apoptoserate der HL - 1 Zellen und iPS - CM.....	58

4.3	Hypertrophie-induzierte Veränderung der Protein- und Genexpression in HL - 1 und iPS - CM.....	59
4.3.1	Identifizierung von Hypertrophie-induzierten Faktoren in HL - 1 und iPS - CM	59
4.3.2	Hypertrophie-induzierte Veränderung der Genexpression in iPS - CM.....	66
4.3.3	Hypertrophie-induzierte Veränderung der Proteinexpression in HL - 1 Zellen und iPS - CM.....	67
4.4	Effekt von präkonditionierten MSCs auf Hypertrophiemarker in hypertrophierten iPS - CM.....	70
5	Diskussion	73
6	Literaturverzeichnis.....	82
7	Anhang	91
7.1	Abbildungsverzeichnis	91
7.2	Tabellenverzeichnis	92
8	Vorabveröffentlichung.....	93

Abkürzungen

A	Ampere
Akt	Protein Kinase B (Serin-Threonin-Kinase)
°C	Grad Celsius
Creb	cAMP responsive element-binding protein
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca	Calcium
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
Cu	Kupfer
Cx 43	Connexin 43
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
ECL	Chemilumineszenz Reaktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Ejektionsfraktion
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
Fc-	bei Antikörper
FITC	Fluorescein isothiocyanate
g	Gramm
G	Gauge
\vec{g}	Gravitationsfeldstärke

h	Stunde
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion
HFrfEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter linksventrikulärer Ejektionsfraktion
HL - 1	heart-like 1
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HWZ	Halbwertszeit
IL	Interleukin
iPS - CM	Cardiomyocytes from induced pluripotent stem cell mark
kDa	Kilo Dalton
LVH	Linksventrikuläre Hypertrophie
M	Molare Masse
Mcl- 1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl- 1
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
Mgarp	Mitochondria-Localized Glutamic Acid-Rich Protein
min	Minute
miRNA	micro RNA
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MSC	mesenchymal stromal cells
mMSC	murine mesenchymal stromal cells
MW	Mittelwert
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NOR- 1	Neuron-abgeleitet orphan <i>Rezeptoren</i> 1
NR4A3	nuclear receptor subfamily 4 group A member 3
NYHA	New York Heart Association
pAkt	Phosphorylierte Form von Akt
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phenylephrin
PFA	Paraformaldehyd
PJ	Propidiumiodid

PKB	Proteinkinase B
RAAS	Renin–Angiotensin–Aldosteron System
rel.	Relativ
R-PE	R-phycoerythrin
RT	Raumtemperatur
RTq-PCR	Real-Time-quantitative-PCR
Sca- 1	Stem cells antigen-1
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
s	Sekunde
TBS	Tris-buffered saline
TBS/T	Tris-buffered saline with Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
U_v	Spannung
U	Umdrehung (1/s)
U_{max}	Maximale Umdrehung
V	Volt
α - SMA	Alpha-smooth muscle actin

1 Zusammenfassung

Herzkreislaferkrankungen stehen weltweit noch immer auf Platz eins der Todesursachen. Da viele kardiovaskuläre Erkrankungen im direkten Zusammenhang mit einer Myokardhypertrophie stehen und diese als starker Prädiktor für einen negativen Verlauf gilt, nimmt die Erforschung therapeutischer Ansätze in diesem Bereich seit langem einen hohen Stellenwert ein. Auf der zellulären Ebene gilt besonders die Therapie mit mesenchymalen Stammzellen (MSCs) als vielversprechender Ansatz.

Ziel dieser Arbeit war es, ein *in vitro* Modell für die kardiale Hypertrophie auf Basis der beiden kardialen Zellreihen HL - 1 (heart like 1) und iPS - CM (Cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells) zu etablieren. Hierfür sollte mittels Phenylephrin in den Zellreihen eine Hypertrophie induziert und anschließend in den hypertrophierten Zellen geeignete Biomarker detektiert werden. Zur Bestätigung der Zellhypertrophie wurde eine histologische Quantifizierung der Zellgröße durchgeführt und die mittels Microarray detektierten und anhand von Literaturrecherche ausgewählten Hypertrophiemarker durch rtPCR und Western Blot überprüft. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte mit Hilfe dieser Marker der Einfluss von MSCs auf die Hypertrophie in den Kardiomyozyten untersucht werden. Hierfür wurden direkte und indirekte Co- Kulturen aus iPS - CM und MSCs angelegt. Da bereits bekannt ist, dass eine Präkonditionierung der MSCs zur Stimulation ihrer parakrinen Aktivität führt, erfolgte vor Co - Kultivierung bei einem Teil der MSCs zusätzlich eine Behandlung mit IL - β und IFN - γ .

Während der Untersuchungen erbrachten insbesondere die immortalisierten HL - 1 Zellen trotz ihrer langen Etablierung als Zellreihe für die Herz- Kreislaufforschung nicht die zu erwartenden Ergebnisse, so dass die weiteren Versuche der Co -Kultur ausschließlich mit den iPS - CM durchgeführt wurden. Für murine iPS - CM sind bislang in der Literatur keine hypertrophiespezifischen Marker beschrieben worden. In der Microarray Analyse zeigte sich in den hypertrophierten iPS - CM die stärkste Hochregulierung beim neuron-derived orphan receptor Gen (NOR- 1). Neben NOR- 1 zeigte sich ebenfalls eine Signifikanz bei der Proteinexpression der Proteinkinase B (pAkt) und dem Transmembranprotein Connexin 43 (Cx 43). Die Ergebnisse der direkten und indirekten Co- Kultivierung stellten sich bei der Proteinexpression gegensätzlich dar. Der kardioprotektive Effekt der MSCs auf die iPS - CM scheint sich in der indirekten Co- Kultivierung zu manifestieren, hier zeigte sich ein signifikanter Rückgang der Expression von Cx 43 und NOR- 1.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die iPS - CM als vielversprechendes *in vitro* Modell für die Myokardhypertrophie. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse von pAkt, Cx 43 und NOR- 1 detektieren diese als nutzbare Hypertrophiemarker in den iPS - CM. Anhand der ermittelten Biomarker besteht eine gute Möglichkeit, die kardiale Hypertrophie und deren

mögliche Therapie auf zellulärer Ebene weitergehend zu untersuchen. Insbesondere NOR-1 erscheint hierfür besonders interessant zu sein, da hier die kardialen Zusammenhänge noch weitestgehend unbekannt sind. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit konnte eine Regression der Hypertrophie in den iPS-CM in der indirekten Co-Kultur mit präkonditionierten MSCs gezeigt werden. Die Ergebnisse bestätigen, dass der MSC-vermittelte Effekt auf die hypertrophierten iPS-CM am ehesten über lösliche Faktoren geschieht.

2 Einleitung

Die Erforschung der Myokardhypertrophie lässt sich bis in das Jahr 1705 zurückverfolgen. Damals beschrieb William Cowper, ein englischer Chirurg und Anatom, in einem Bericht die Größe eines Herzens mit Aortenklappenstenose als „larger than that of an ordinary ox“. Über die Jahrhunderte entwickelte sich der deskriptive Begriff des *Cor bovinum* für besonders große menschliche Herzen. Dieser Begriff wird auch heute noch für Herzen, die das kritische Herzgewicht von 500 g deutlich überschreiten, verwendet.¹

2.1 Das Herz als Motor – leistungsfähig und ausdauernd

Das Herz übernimmt im Kreislauf mit seiner Pumpfunktion einen wichtigen Part als Versorgungs- und Transportorgan. Durch die dauerhafte Bereitstellung von Substanzen und deren Verteilung im Körper wird es auf ganz besondere Art gefordert. Zusätzlich muss es sich durch die unterschiedliche Belastung des Körpers immer wieder neuen Anforderungen anpassen und seine Funktion innerhalb kürzester Zeit in weitem Maße regulieren. Um diesen Herausforderungen gerecht zu werden, besitzt das Herz ein komplexes System an Regulationsmechanismen. Die Regulation bei Mehrbelastung erfolgt unter anderem über die Aktivierung des sympathischen Nervensystems, das über positive Ino- und Chronotropie die Pumpleistung des Herzens beeinflussen kann, sowie die Aktivierung des Renin- Angiotensin- Aldosteron- Systems (RAAS) welches Einfluss auf den Blutdruck und die Nierendurchblutung nimmt. Während der Sympathikus bei kurzfristigen Belastungen eine sehr effektive Maßnahme zur Bewältigung der erhöhten Belastung bereitstellt, muss das Herz bei chronischer Mehrbelastung mit einer Zunahme der Myokardmasse reagieren. Da adulte Kardiomyozyten nicht mehr teilungsfähig sind, kommt es zu einer Größenzunahme der einzelnen Zelle. Charakteristisch für die Hypertrophie (griechisch: hyper: übermäßig, trophè: Ernährung) von Kardiomyozyten ist die Zunahme ihrer Zellgröße, eine verstärkte Proteinsynthese sowie die Reorganisation des Zytoskeletts und die Wiedereinführung eines so genannten fetalen Genexpressionsprogramms.²

Die Myokardhypertrophie lässt sich vereinfacht in drei Stadien zusammenfassen:^{3, 4}

1. Das Stadium der Hypertrophieentwicklung: Durch eine Mehrbelastung kommt es zur Überlastung der normalen Herzmuskelmasse.
2. Das Stadium der Kompensation: Durch eine Zunahme der Muskelmasse kommt es zur Kompensation, indem das Verhältnis von Herzmuskelmasse zu Herzarbeit ausgeglichen wird. Hier kommt es noch nicht zu eindeutigen Einschränkungen der rhythmischen Abfolge von Systole zu Diastole, jedoch zeigen sich erste Anzeichen für eine verminderte Verkürzungs- und Relaxationszeit des Muskels.

- Das Stadium des Herzversagens: Unter chronischer Belastung kommt es zur Dilatation des Herzens bis das geforderte Herzzeitvolumen nicht mehr befördert werden kann.

2.2 Formen der Myokardhypertrophie

2.2.1 Physiologische und pathologische Myokardhypertrophie

Die Art der Myokardhypertrophie richtet sich nach dem vorgelagerten Stimulus und der dazugehörigen Signalkaskade und kann somit je nach Ursache physiologisch oder aber auch pathologisch auftreten (siehe **Abbildung 2.1**).^{5,6}

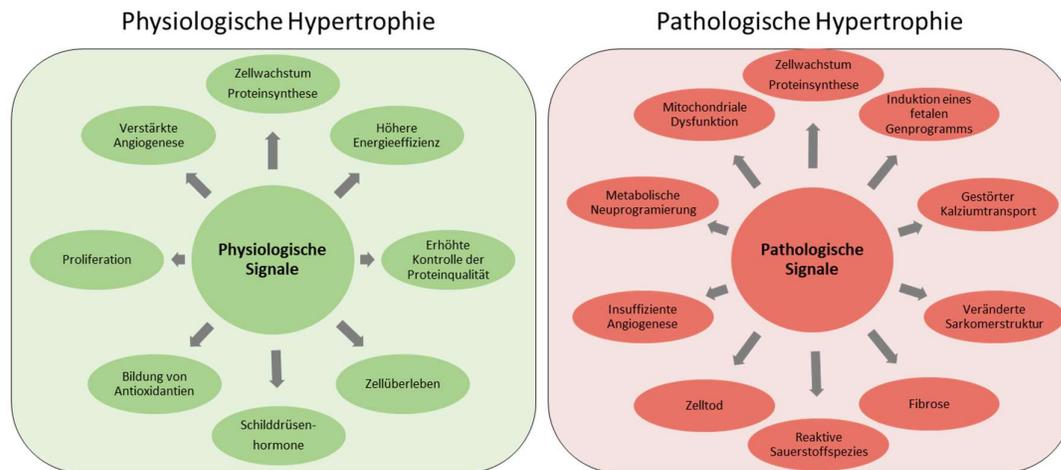


Abbildung 2.1: Allgemeine Merkmale der physiologischen und pathologischen Hypertrophie (modifiziert nach ⁷)

Die starke Größenzunahme, die beim kindlichen Herzen, bei Schwangerschaft oder auch bei einem Ausdauersportler mit moderatem Trainingsniveau als Anpassungsreaktion auf vermehrte körperliche Belastung geschieht, ist physiologisch. Die als kritisch geltende Herzgröße von 500 g wird bei der physiologischen Myokardhypertrophie nicht überschritten, es handelt sich vielmehr um eine milde Hypertrophie (10 – 20 %). Weiterhin gilt die physiologische Größenzunahme des Herzens als reversibel mit einer erhaltenen oder sogar gesteigerten Kontraktilität.⁷ Sie ist assoziiert mit einer normalen Herzfunktion, da die Vergrößerung der Myozyten unter einer entsprechenden Versorgung mit Nährstoffen sowie einer proportional zur Wanddickenzunahme mitwachsenden Gefäßversorgung stattfindet. Weiterhin werden Signalwege zum Zellüberleben und eine mitochondriale Qualitätskontrolle initiiert. Insgesamt stellt sich der genetische und zelluläre Mechanismus anders dar als bei der pathologischen Hypertrophie des Myokards. Es kommt bei der physiologischen kardialen Hypertrophie nicht zu strukturellen und funktionellen Störungen der Kardiomyozyten, weshalb sie nicht als Risikofaktor für eine Herzinsuffizienz gilt.⁶

Geschieht die Hypertrophie der Kardiomyozyten als Folge einer Herzerkrankung, wie z.B. einer chronischen Drucküberlastung durch eine höhergradige Aortenklappenstenose oder vermittelt durch einen hypoxischen Myokardschaden nach Myokardinfarkt oder einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung, gilt sie als pathologisch. Durch die krankhafte Zunahme des Myokards, ohne Zunahme der kapillaren Versorgung, kommt es zu einer Minderversorgung der Muskelzellen mit Nährstoffen und Sauerstoff. Die pathologische Hypertrophie ist bei Behebung der Ursache zu Beginn innerhalb einiger Wochen reversibel, kommt es jedoch zu einer längerfristigen kardialen Hypertrophie mit Fibrosierung des Interstitiums, ist dies nur noch bedingt reversibel. In diesem Fall werden in der Zelle andere Signalwege als bei der physiologischen Hypertrophie aktiviert. Ein breites Spektrum an parallel aktivierten Signalwegen führt zu einer erhöhten Proteintranslation und Aktivierung anderer Transkriptionsfaktoren, unter anderem eines fetalen Genexpressionsprogramms. Dieses wird normalerweise unmittelbar post partum abgeschaltet, jedoch bei der pathologischen Myokardhypertrophie erneut aktiviert.⁸ Weiterhin kommt es zum starken Anstieg von neurohumoralen Faktoren und zu einer deutlichen hämodynamischen Überbelastung des Herzens.⁶ Dies führt zu einer Abnahme der Leistungsfähigkeit des Herzens und einer Umordnung des Gefüges im Myokard und zur vermehrten Fibrose. Innerhalb des Myokards kommt es zu einer interstitiellen Fibrosierung, welche mit einem Expressionsshift der Myosin-Isoformen einhergeht (Abnahme des α -Myosins und Zunahme der β -Isoform).⁹ Diese sogenannte Gefügedilatation induziert den programmierten Zelltod (Apoptose), sodass die Dilatation weiter voranschreitet und ein *Circulus vitiosus* entsteht.¹⁰ Zusammengefasst ist die pathologische Myokardhypertrophie die Folge vieler verschiedener Erkrankungen, wie z.B. der arteriellen Hypertonie oder verschiedener Klappenerkrankungen. Sie führt beim Überschreiten einer kritischen Grenze zu einer kardialen Dysfunktion mit Verschlechterung der Herzinsuffizienz, ob mit erhaltener oder reduzierter Ejektionsfraktion (HFpEF oder HFrEF) und zu einer relativen Koronarinsuffizienz sowie im weiteren Verlauf zu einem erhöhten Risiko für einen plötzlichen Herztod.⁷ Ebenfalls sind Adipositas und Diabetes mellitus wichtige Komorbiditäten, die mit der Entwicklung einer pathologischen Hypertrophie einhergehen.¹¹⁻¹³

2.2.2 Exzentrische und konzentrische Myokardhypertrophie

Pathologisch können abhängig vom auslösenden Stimulus zwei Formen der Myokardhypertrophie unterschieden werden (siehe **Abbildung 2.2**).¹⁴ Klinisch lassen sich beide Hypertrophieformen dem Krankheitsbild der Kardiomyopathie zuordnen. Kardiomyopathien beschreiben Erkrankungsformen des Myokards, bei denen es zu einer kardialen Funktionsstörung kommt. Beide Hypertrophieformen können zur Herzinsuffizienz führen.^{10, 15}

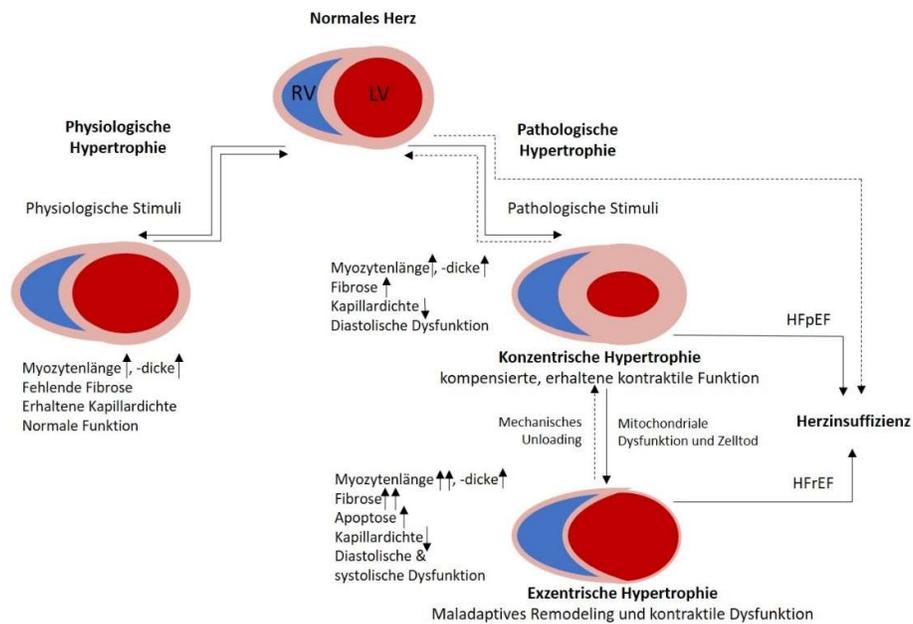


Abbildung 2.2: Physiologische und pathologische kardiale Hypertrophie (modifiziert nach ^{7, 16})

Die exzentrische Myokardhypertrophie tritt in erster Linie bei vermehrter Volumenbelastung des Herzens auf, zum Beispiel durch den dauerhaften Blutrückfluss, bedingt durch eine insuffiziente Herzklappe. Je nach Sitz der insuffizienten Klappe ist der jeweils vorgeschaltete Teil des Herzens betroffen. Bei jeder erneuten Kontraktion muss entsprechend mehr Blut in den nächsten Abschnitt transportiert werden. Um diese Mehrbelastung bewältigen zu können, kommt es zur Größenzunahme der Kardiomyozyten. Da es sich um eine Volumenbelastung handelt, folgt daraus gleichzeitig die Dilatation der entsprechenden Herzzinnenräume.¹⁴ Bei der exzentrischen Myokardhypertrophie wird vom Krankheitsbild der dilatativen Kardiomyopathie gesprochen, welchem führend eine fehlerhafte systolische Pumpfunktion des dilatierten Ventrikels zugrunde liegt. Hieraus ergibt sich eine reduzierte Pumpfunktion, zusätzlich zeigt sich eine verlangsamte und inkomplette Relaxation des Myokards. Die dilatative Kardiomyopathie ist die häufigste idiopathische Kardiomyopathie.¹⁰

Die konzentrische Myokardhypertrophie hingegen ist bedingt durch eine dauerhaft erhöhte Druckbelastung des Herzens. Mögliche Ursachen können die arterielle Hypertonie oder eine stenosierte Klappe darstellen. Durch die erhöhten Druckverhältnisse muss das Herz bei jedem Schlag gegen einen Widerstand anpumpen. Auch hier kommt es durch die geforderte Leistungssteigerung zu einer Vergrößerung der Myokardzellen sowie im Gegensatz zur exzentrischen Myokardhypertrophie zu einer Einengung der Herzzinnenräume.¹⁴ Die ausgeprägte Form der konzentrischen Myokardhypertrophie bildet die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM). Die hypertrophe Kardiomyopathie kann man noch weiter in eine nicht- obstruierende Form (HNCM) und eine obstruierende Form (HOCM), bei der es zur

Vorwölbung des hypertrophierten Septums in die linksventrikuläre Ausflussbahn kommt, unterteilen. Die primäre hypertrophische Kardiomyopathie ist die häufigste hereditäre Herzerkrankung und wird autosomal-dominant mit variabler Penetranz vererbt.^{15, 17} Neben der Myokarditis ist die HCM eine der Hauptursachen des plötzlichen Herztodes bei Patienten in jungen Jahren.¹⁰

2.2.3 Linksventrikuläre und rechtsventrikuläre Myokardhypertrophie

Klinisch findet eine Unterscheidung der Hypertrophie entsprechend des betroffenen Herzteils und der Symptome statt, wobei zwischen der Links- und der rechtsventrikulären Hypertrophie unterschieden wird.

Die linksventrikuläre Hypertrophie oder Linksherzhypertrophie (LVH) beschreibt eine Vergrößerung, welche nur das linke Herz betrifft. Durch eine chronische Mehrbelastung des linken Herzens kommt es zur konzentrischen Größenzunahme, wobei die Ursachen hierfür vielfältig sind wie z.B. arterielle Hypertonie, Klappenvitien im linken Herzen, wie eine Aortenklappenstenose, aber auch eine hypertrophe Kardiomyopathie oder die seltenere Speicherkrankheit *Morbus Fabry*. Kann die Ursache durch ein Größenwachstum nicht mehr kompensiert werden, kommt es zur Herzinsuffizienz mit diastolischer- und systolischer Dysfunktion. Wird die LVH nicht behandelt, endet sie im schlimmsten Fall in einer terminalen Herzinsuffizienz.¹⁰ Die LVH gilt seit langem als unabhängiger Prädiktor für die Inzidenz einer Herzinsuffizienz, ohne das gleichzeitige Auftreten einer koronaren Herzerkrankung.^{18, 19} Die amerikanische *Cardiovascular Health Study* hat gezeigt, dass sich das Risiko, eine Herzinsuffizienz zu entwickeln, um 3 % pro g/m^2 ^{2.7} (bezogen auf den linksventrikulären Massenindex) erhöht.¹⁸ Weiterhin hat sich in der *Framingham*- Studie bestätigt, dass es einen signifikanten Zusammenhang zwischen linksventrikulärer Muskelmasse ($> 140 \text{ g / m}^2$) und der Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen sowie deren Mortalität gibt.^{19, 20}

Besonders bei der LVH, die direkt assoziiert ist mit einer verminderten myokardialen Toleranz gegenüber einem ischämischen Reperfusionsschaden, steht die Größenzunahme der Kardiomyozyten im Fokus. Durch die vermehrte Druckbelastung des Herzens kommt es zu verschiedenen Adaptations- und Umbauprozessen auf molekularer und zellulärer Ebene, dem myokardialen Remodeling, welches zum Beispiel die Apoptose der Myozyten und inflammatorische und fibrogene Reaktionen beinhaltet.²¹ Diese dadurch entstehende kardiale Vulnerabilität geht einher mit einer erhöhten peri- und postoperativen Morbidität und Mortalität.²²

Im Vergleich zur LVH kommt es sehr viel seltener zur Rechtsherzhypertrophie, häufig ist sie auch erst Folge einer voranschreitenden Linksherzhypertrophie. Die Rechtsherzhypertrophie kann kardiale und pulmonale Ursachen haben. Zu den kardialen Ursachen zählen Klappenvitien, wie eine Trikuspidalklappeninsuffizienz und Pulmonalklappenstenose, oder

auch ein Ventrikelseptumdefekt mit Links-Rechts-Shunt. Bei den pulmonalen Ursachen der Rechtsherzhypertrophie steht die pulmonale Hypertonie, welche z.B. durch eine Lungenarterienembolie, Asthma bronchiale oder eine Lungenfibrose ausgelöst wird, im Vordergrund. Durch die Mehrbelastung des rechten Herzens kommt es auch hier zur Hypertrophie der Muskelzellen und im weiteren Verlauf zur diastolischen Dysfunktion mit peripheren Ödemen, Stauungsleber- und -gastritis sowie einer Erhöhung des zentralen Venendrucks. Ist eine Rechtsherzhypertrophie Ursache oder begleitet von einer Linksherzhypertrophie, spricht man bei den Symptomen von einer globalen Herzinsuffizienz.¹⁰

2.3 Hypertrophie in Kardiomyozyten

2.3.1 Induktion von Hypertrophie – Kardiales Remodeling

Die Entwicklung einer physiologischen oder pathologischen Hypertrophie hängt von der Art der vorangehenden Stimuli und Signalmechanismen ab.⁷

Zur maladaptiven Dekompensation kommt es, wenn bei der kardialen Hypertrophie neben dem Zellwachstum und der Proteinsynthese folgende Prozesse auftreten: Zelltod, Fibrose, Dysregulation von Ca^{2+} -Handling-Proteinen, mitochondriale Dysfunktion, metabolische Reprogrammierung, Reaktivierung der fetalen Genexpression, gestörte Protein- und mitochondriale Qualitätskontrolle, veränderte Sarkomerstruktur und unzureichende Angiogenese (siehe **Abbildung 2.1**).⁷

Unter pathologischen Bedingungen, wie Hypertonie, Klappenvitien und Myokardinfarkt, entwickelt sich die Hypertrophie weitestgehend über neuroendokrine Hormone (u.a. Angiotensin II, Phenylephrin oder Endothelin-1) und mechanische Kräfte, begleitet von deren nachgeschalteten Signalwegen (siehe **Abbildung 2.3**).

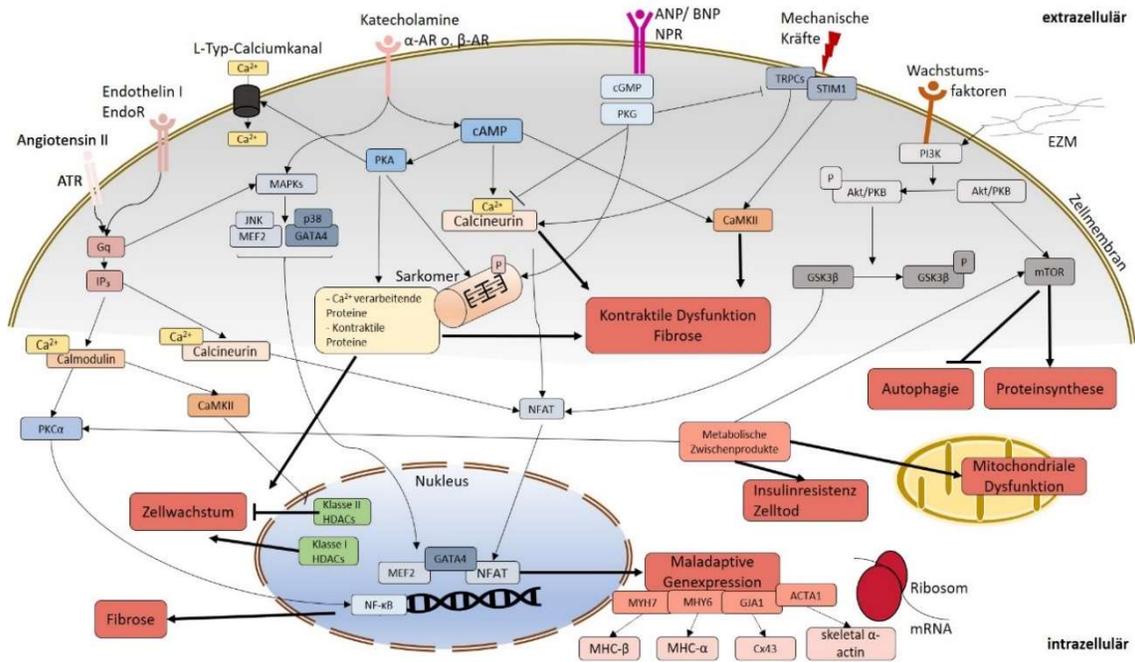


Abbildung 2.3: Signalkaskaden der Hypertrophie (vereinfacht und modifiziert nach ^{7, 23, 24});

ACTA1 (Actin Alpha 1); Akt/PKB (Akt/ Proteinkinase B); ANP (natriuretisches Peptid A); ATR (Angiotensin II Rezeptor); cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat); cGMP (cyclisches Guanodinmonophosphat); BNP (natriuretisches Peptid B); CaMKII (Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinasetyp II); Cx43 (Connexin 43) EndoR (Endothelin 1 Rezeptor); EZM (extrazelluläre Matrix) GATA4 (Transkriptionsfaktor GATA4); GJA1 (Gap Junction alpha-1 Protein); GSK – 3 β (Glycogensynthase Kinase-3β); HDAC (Histondeacetylase); IP₃ (Inositol 1,4,5-triphosphat); JNK (JUN N-terminale Kinase); MAPK (mitogen-aktivierte Proteinkinase); MEF2A (Myozyten Enhancer Faktor 2 A); MHC-α (α-Isoform, schwere Myosinkette); MHC-β (β-Isoform, schwere Myosinkette), mTOR (mechanistisches Target von Rapamycin); MYH-6 (kodierendes Gen für MHC-α); MYH-7 (kodierendes Gen für MHC-β); NF-κB (nukleärer Faktor-κB); NFAT (nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen); NPR (natriuretischer Peptid Rezeptor); P (Phosphat); p38 (mitogen-aktivierte Proteinkinase 11); PI3K (Phosphoinositid-3-Kinasen); PKA (Proteinkinase A); PKCα (Proteinkinase Cα); PKG (Proteinkinase G); PLC, (Phospholipase C); PLN (Phospholamban) STIM1 (stromales Interaktionsmolekül 1); TRPC (transienter Rezeptorproteinkanal), α-AR (α-adrenerger Rezeptor); β-AR (β-adrenerger Rezeptor)

Über G - Protein gekoppelte Rezeptoren in der Zellmembran binden Katecholamine, sowie das atriale natriuretische Peptid (ANP), das B-Typ natriuretisches Peptid (BNP; brain natriuretic peptide) und die Peptidhormone Angiotensin II und Endothelin an der Zellmembran und setzen multiple Signalkaskaden in Gang.

Eine entscheidende Rolle der pathologischen Hypertrophieentwicklung wird der Freisetzung von Calcium zugeschrieben. G - Protein gekoppelt wird über Inositoltrisphosphat (IP₃) die Freisetzung von intrazellulärem Ca²⁺ aus dem endoplasmatischen und sarkoplasmatischen Retikulum gefördert und die beiden calciumabhängigen Komplexe Calcineurin und Calmodulin gebildet.

Calcineurin ist eine Ca^{2+} -aktivierte Serin/Threonin-Proteinphosphatase, die den nukleären Faktor von aktivierten T-Zellen (NFAT) dephosphoryliert und die nukleäre Lokalisierung von NFAT fördert. NFAT interagiert mit transkriptionellen Kofaktoren, wie GATA4 (GATA binding protein 4) oder MEF2A (Myocyte Enhancer Factor 2A), und stimuliert hierüber die Expression von hypertrophiespezifischen Genen wie zum Beispiel MYH6 MYH7, ACTA1 und GJA1.^{25, 26} Der Calcineurin-NFAT-Signalweg sorgt ausschließlich für eine pathologische Hypertrophie, er wird nicht bei körperlichem Training oder in der Schwangerschaft aktiviert.²⁷

Neben der Induktion der Calcineurin/NFAT-Signalkaskade werden kalziumabhängig weitere pathologische Signalsysteme über den Ca^{2+} - Calmodulin-Komplex aktiviert, hierzu zählen die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII)-Signaltransduktion und die Proteinkinase C α (PKC α).

Die CaMKII inhibiert im Zellkern durch Phosphorylierung die Klasse-II Histon-Deacetylasen (Klasse - II HDACs).²⁸ Klasse - II HDACS sind Repressoren der kardialen Hypertrophie, wohingegen Klasse - I HDACs prohypertroph wirken.^{29, 30} Von den vier CaMKII-Isoformen (α , β , γ und δ) ist CaMKII δ die wichtigste Isoform im Herzen und fördert das Fortschreiten der maladaptiven pathologischen Hypertrophie und daraus folgend der Herzinsuffizienz.^{28, 31} Über den Ca^{2+} -Calmodulin- Komplex wird ebenfalls die Signalkaskade über PKC α und den Transkriptionsfaktor NF- κ B fortgesetzt, welche als Auslöser für Arrhythmien, kontraktile Dysfunktionen und Fibrose gilt.³²⁻³⁵

Ein weiterer wichtiger Signalweg in der kardialen Hypertrophie ist der MAP-Kinase-Weg über die mitogen-aktivierte Proteinkinase. Wichtige Bestandteile dieser Kaskade sind die p38-Kinase und die C-Jun-N-terminale Kinase (JNK), welche ebenfalls eine MEF2A und GATA4-vermittelte Transkription herbeiführen und so zur pathologischen Hypertrophie beitragen.³⁶ In kardialen Fibroblasten führt die Signalkaskade über p38 und das ACTA2-Gen zu einer erhöhten Expression von α - SMA (alpha smooth muscle actin).^{37, 38}

α - SMA ist eine Isoform des Aktins, wobei Aktin Teil des dreidimensionalen Zytoskeletts von Eukaryoten ist und unter anderem am intrazellulären Transport,³⁹ an der Zellform und der Zellmotilität beteiligt ist.⁴⁰ Die α - Isoformen (α - SMA, α - cardiac actin (α - CA) und α - skeletal muscle actin) sind Bestandteile im kontraktilem Apparat von Muskelzellen und bilden mit Myosin Sarkomere, die sich ATP- und calciumabhängig verkürzen, hierüber kommt es zur zellulären Muskelkontraktion. α - SMA wird in glatten Gefäßmuskelzellen und Myofibroblasten exprimiert und spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Fibrose.^{41, 42} Tritt ein Myokardschaden oder eine Erhöhung des mechanischen Stresses auf, werden die Myofibroblasten aktiviert, ihr Proliferationsbestreben lässt nach und sie schütten vermehrt extrazelluläre Proteine aus. Die Expressierung von α - SMA korreliert mit dem Aktivitätszustand der Myofibroblasten.⁴³

Als ein Schlüsselenzym in der Wachstumsregulation der Kardiomyozyten gilt die Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K). Die PI3K phosphoryliert ihr Zielprotein die Proteinkinase B (PKB) oder auch Akt genannt. Der PI3K- Akt Signalweg nimmt bei der Entstehung der Hypertrophie eine entscheidende Rolle ein, ursprünglich entdeckt als Onkogen innerhalb des Maus- Leukämie- Virus Akt 8.^{44, 45} Die drei existierenden Akt- Proteinkinasen unterscheiden sich unter anderem durch die Häufigkeit ihrer Exprimierung sowie durch ihre Gewebelokalisation. Akt 1/ PKB α und Akt 3/ PKB γ lassen sich in Eukaryoten ubiquitär finden, wohingegen Akt 2/ PKB β sich bevorzugt in Insulin-sensiblen Geweben, wie braunem Fettgewebe, Skelettmuskulatur und Lebergewebe zeigt. Alle drei sind Teil des PI3K- Akt Signalwegs.⁴⁶ Der PI3K- Akt Signalweg ist ein streng regulierter Stoffwechselweg, seine Aktivierung erfolgt über extrazelluläre Faktoren wie Hormone, Wachstumsfaktoren und Teile der extrazellulären Matrix und führt zur Translokation des inaktiven Akts im Cytosol an die Plasmamembran.⁴⁷ Hier findet die Aktivierung von Akt mittels Phosphorylierung statt. Anschließend löst sich die phosphorylierte Form wieder von der Plasmamembran und kann in verschiedene Kompartimente der Zelle translozieren und dort selbst verschiedene Substrate phosphorylieren, damit sie ihrerseits Einfluss auf Zellwachstum, -zyklus oder -proliferation nehmen.⁴⁶ Unter anderem inhibiert das phosphorylierte Akt die Glycogensynthase Kinase-3 β (GSK - 3 β), welche eine Hemmung der GSK - 3 β induzierten hypertrophen Reaktion zur Folge hat. Das aktive Enzym GSK - 3 β erwirkt über Effektoren wie β -Catenin, GATA-4 und NFAT eine Hypertrophieentwicklung.⁴⁸ Neben der GSK - 3 β - Inhibition sorgt Akt/PKB durch die Aktivierung von mTOR (mammalian target of Rapamycin) auch für eine gesteigerte Proteinsynthese. Die Serin/Threonin-Proteinkinase mTOR koordiniert über die Aktivierung verschiedener Kinasen das Zellwachstum der Kardiomyozyten, in dem sie die Synthese und den Abbau von Proteinen kontrolliert.⁴⁹ mTOR wird sowohl in der physiologischen als auch in der pathologischen Hypertrophie in Kardiomyozyten aktiviert. Und obwohl die Steigerung der Proteinsynthese und die mitochondriale Qualitätskontrolle durch mTOR essentielle adaptive Mechanismen bei akuter Drucküberlastung des Herzens sind, ist eine anhaltende Aktivierung von mTOR mit Unterdrückung der Autophagie und der daraus resultierenden Verschlechterung der Protein-Qualitätskontrollmechanismen schädlich.⁵⁰

Ein veränderter zellulärer Stoffwechsel trägt ebenfalls zur pathologischen Hypertrophieentwicklung bei. Eine wichtige Rolle spielen hierbei metabolische Zwischenprodukte und deren Akkumulation. Es kommt so zu kardialen Speicherkrankheiten, die konsekutiv zu Kardiomyopathien führen. Insbesondere die diabetische Kardiomyopathie, welche häufig mit Adipositas, Insulinresistenz oder Diabetes assoziiert ist, induziert eine kardiale Hypertrophie und Herzinsuffizienz.⁵¹⁻⁵⁴ Auf welchem molekularen Weg die Akkumulation von Zwischenprodukten zur kardialen Hypertrophie führt, ist jedoch noch weitgehend unbekannt.

Neben der Liganden- und G-Protein gekoppelten- Induktion von pathologischer Myokardhypertrophie besteht auch eine Signaltransduktion über biomechanische Reize. Es wurden bereits eine Vielzahl von Signalwegen identifiziert, die die Mechanosensorik von kardialen Myozyten und Fibroblasten vermitteln, diese sind besonders während des Wachstums und der Entwicklung des Herzens aktiv und unter normalen homöostatischen Bedingungen im adulten Myokard herunterreguliert.⁵⁵ Viele dieser Signalwege werden jedoch durch pathologische Bedingungen reaktiviert und sind assoziiert mit Strukturen und Proteinkomplexen auf der Zellmembran dieser Zellen.⁸ Mechanosensoren regulieren wichtige Kaskaden des adaptiven und maladaptiven Remodelings in Myozyten und im kardialen extrazellulären Gewebe.^{56, 57} Die extrazelluläre Matrix ist ein wichtiger Mediator bei der Regulierung von Wachstumsfaktorrezeptoren auf der Zelloberfläche und Adhäsionsmolekülen in Kardiomyozyten und Fibroblasten, wie z. B. Integrinen, aber auch Gap Junctions, wie z.B. Connexin 43.⁵⁸

Connexin- 43 (Cx 43) gehört zu einer Gruppe von Transmembranproteinen, den Connexinen, und hat ein Molekulargewicht von 43 kDa. Je sechs Connexine bilden innerhalb der Membran eine Pore ein sog, Connexon. Lagern sich von zwei Zellen jeweils die Connexone zueinander entsteht eine Gap Junction durch die der Austausch von Molekülen, wie zum Beispiel ATP, Glutathion, cAMP, und so die elektromechanische Kopplung der Kardiomyozyten, stattfinden kann.⁵⁹⁻⁶²

Neben den Membranproteinen ist die Kalziumverschiebung nach intrazellulär, welche z.B. auf akute Dehnung hin geschieht, relevant bei der Entstehung von kardialer Hypertrophie über Mechanosensoren.⁶³ Diese erfolgt am ehesten über L-Typ-Kalziumkanäle und nicht-selektive Kationenkanäle (TRPC).⁶⁴⁻⁶⁷ TRPCs oder das stromale Interaktionsmolekül 1 (STIM 1) sorgen über den Calcineurin-NFAT- und CaMKII-Signalweg für eine pathologische Hypertrophie.⁶⁸⁻⁷²

Pathologische Stimuli, wie z.B. myokardiale Dehnung, sorgen für die erhöhte Expression von natriuretischen Peptiden, wie ANP und BNP, diese gelten als wichtige Regulatoren der kardiovaskulären Volumen- und Druckhomöostase.^{73, 74} Zelluläre Effekte der natriuretischen Peptide umfassen die Regulation von Zellproliferation, Angiogenese, Apoptose, Fibrose und Entzündung.⁷³ Sowohl auf kardialer als auch auf vaskulärer Ebene werden ihnen anti-proliferative, anti-fibrotische und anti-hypertrophe Effekte zugeschrieben.⁷⁵⁻⁷⁷ Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass natriuretische Peptide als antihypertrophe und kardioprotektive Moleküle dienen. Natriuretische Peptide binden an natriuretische Peptidrezeptoren und aktivieren die Guanylatzyklase zur Erzeugung von Cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP), wodurch die Proteinkinase G (PKG) aktiviert wird. PKG hat antihypertrophe Wirkungen durch Hemmung von Signalwegen, welche unter anderem Calcineurin-NFAT und TRPCs beinhalten.⁷⁸

2.3.2 Kardiale *in vitro* Modelle

Dadurch, dass bei vielen Herzerkrankungen die Hypertrophie der Kardiomyozyten eine wichtige oder sogar entscheidende Rolle einnimmt, ist das Interesse groß, die zellulären Mechanismen zu verstehen und im Weiteren therapeutisch darauf Einfluss zu nehmen. Für diese Umsetzung werden seit langem *in vitro* Modelle zur Untersuchung genutzt. Sie bieten die Möglichkeit, Vorgänge des menschlichen Körpers im gesunden Zustand sowie im Krankheitszustand detailliert zu untersuchen. Weiterführend kann anhand von *in vitro* Modellen die Testung neuer Medikamente stattfinden und sie werden als prädiktive Alternative zum Tierversuch eingesetzt. Besonders geeignet für die Erforschung dieser Mechanismen sind Stammzellen, da sie sich vermehren und in verschiedene Zelltypen und Gewebe differenzieren können. Insbesondere embryonale Stammzellen (ES - Zellen) haben durch ihre Pluripotenz die Option, sich in jegliches Gewebe zu differenzieren, adulte Stammzellen hingegen können sich nur in bestimmte, festgelegte Gewebetypen entwickeln. Allerdings werden ES-Zellen aus der Blastozyste, einem frühen Embryonalstadium von Säugetieren, isoliert und bei der Gewinnung wird die Blastozyste zerstört. Nach Kultivierung der Zellen lassen sich die Zellen zwar in nahezu alle Zelltypen differenzieren, ein gesamter Organismus kann jedoch nicht mehr daraus entstehen, so dass die Verwendung ein großes moralisches Dilemma mit sich bringt. Weiterhin stehen die Zellen nicht in unbegrenztem Maße zur Verfügung. Die Verwendung von ES - Zellen wird innerhalb der Forschung aus ethischen Gesichtspunkten sehr kritisch gesehen. Durch das am 01. Februar 2002 in Kraft getretene Stammzellgesetz in Deutschland, aber auch in vielen anderen Ländern, kann die Arbeit mit ES – Zellen nur unter strengen Voraussetzungen stattfinden (Bundesministerium für Gesundheit, 2020). Hieraus ergab sich seit langem der Wunsch nach Zellalternativen. Im Bereich der kardiovaskulären Erkrankungen bestehen bereits verschiedene *in vitro* Modelle, welche stetig weiterentwickelt werden. Zwei entsprechende murine *in vitro* Modelle bilden die HL - 1 Zellen (heart-like-1 Zellen) und die iPS - CM (induced pluripotent Stemcells- derived cardiomyocytes). Die murine Zellreihe HL - 1, die von William Claycomb in den 90er Jahren entwickelt wurde, ist die erste Zelllinie, die den Phänotyp der Kardiomyozyten und dessen Kontraktibilität *in vitro* enthält. Primär wurde die HL - 1 Zellreihe abgeleitet aus atrialen Kardiomyozyten von transgenen Mäusen, welche *das Onkogen Simian virus 40 (SV 40) large T Antigen* exprimieren, sogenannte AT - 1 Zellen.^{79, 80} Aus diesen AT – 1 Zellen erfolgte anschließend die Generierung der HL - 1 Zellen. Wichtige Merkmale der HL - 1 Zellen für die zellbasierte Erforschung sind die wiederholte Passagierbarkeit, die Möglichkeit, die Zellen aus gefrorenem Zustand wieder zu verwenden und der Umstand, dass sie die morphologischen, biochemischen, elektrophysiologischen, physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften von Kardiomyozyten besitzen und beibehalten. Diese Eigenschaften machen sie zu einer idealen und etablierten Zellreihe für Studien zur Funktion von Kardiomyozyten.⁸¹

⁸² Bei der zweiten Zellreihe handelt es sich um die iPS - CM, eine murine Zellreihe, welche auf molekularer, struktureller, funktionaler und auch elektrophysiologischer Ebene den Eigenschaften von Kardiomyozyten gleicht. Über wenige definierte Faktoren (Oct3/4, Sox2, Klf4 und c - Myc, sogenannte transiente Transkriptionsfaktoren (OSKM)) werden humane und murine Fibroblasten in induzierte pluripotente Stammzellen (iPS- Zellen) umgewandelt, welche große Eigenschaftsähnlichkeiten zu ES - Zellen aufweisen.^{83, 84} Somit gelten sie seit einigen Jahren als vielversprechendes Modell für *in vitro* Versuche. Die genetische Reprogrammierung von Zellen steht bereits seit Jahrzehnten im Fokus bei der Erforschung von Zellmechanismen, weiterhin gilt deren therapeutischer Nutzen insbesondere auch bei kardiovaskulären Erkrankungen als vielversprechende Strategie.

2.4 Von der Myokardhypertrophie zur Herzinsuffizienz

2.4.1 Allgemeines zur Herzinsuffizienz

„Bei der Herzinsuffizienz ist das Herz nicht mehr in der Lage, den Organismus mit ausreichend Blut und damit mit genügend Sauerstoff zu versorgen, um den Stoffwechsel unter Ruhe- wie unter Belastungsbedingungen zu gewährleisten.“⁸⁵

Eine pathologische kardiale Hypertrophie ist eine der wesentlichen Ursachen für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz und einen plötzlichen Herztod vor allem bei jüngeren Patienten.

Die Herz-Kreislaufkrankungen sind in der westlichen Welt trotz besserer Therapiemöglichkeiten immer noch die häufigste Todesursache, so dass ein großes Interesse an der Erforschung der entsprechenden Risikofaktoren und den dazugehörigen molekularen Mechanismen besteht. Bei 80 - 90 % der Patienten mit Herzinsuffizienz besteht eine Funktionsstörung des Herzmuskels, circa 54 - 70 % der Patienten haben eine Koronare Herzerkrankung und bei 35 - 52 % besteht zusätzlich eine arterielle Hypertonie.⁸⁶ In Deutschland liegt die Gesamtprävalenz von Patienten mit Herzinsuffizienz bei 1 - 2 %, wobei die Prävalenz mit dem Alter ansteigt. Laut dem statistischen Bundesamt lag die Herzinsuffizienz im Jahr 2020 hinter der chronisch ischämischen Herzkrankheit und dem Myokardinfarkt auf Platz drei der häufigsten Todesursachen im Bereich der Herz-Kreislaufkrankungen⁸⁷. Im Jahr 2015 verursachten die Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit 46,4 Milliarden Euro (13,7%) auch die höchsten Kosten im deutschen Gesundheitssystem, hiervon entfielen 5,3 Milliarden Euro auf die Behandlung der Herzinsuffizienz.⁸⁸ Weiterhin ist die akut dekompensierte Herzinsuffizienz in Deutschland die häufigste Einweisungsdiagnose für eine stationäre Aufnahme im Krankenhaus.^{89, 90} Daraus ergibt sich neben der medizinisch therapeutischen Herausforderung auch ein großes sozioökonomisches Interesse.

2.4.2 Therapie der Myokardhypertrophie auf der Basis mesenchymaler Stammzellen

Initial steht die Ursachenbehandlung der Myokardhypertrophie z.B. durch operatives Beheben eines höhergradigen Klappenvitiums oder die medikamentöse Therapie einer arteriellen Hypertonie im Fokus. Zusätzlich wird die Ausschaltung der bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus oder Adipositas angestrebt. Im fortgeschrittenen Stadium einer pathologischen Myokardhypertrophie mit voranschreitender Dekompensation steht neben der kurzfristigen Symptomlinderung die weiter optimierte medikamentöse Einstellung der Herzinsuffizienz abhängig von ihrer NYHA- Klassifikation im Vordergrund. Hier sind insbesondere die Gabe von ACE- Hemmern, Betablockern und eine entsprechende diuretische Therapie empfohlen.¹⁰ Zwar bestehen mittlerweile Möglichkeiten, das geschädigte Herz mittels mechanischer Unterstützung im Akutfall kurzfristig durch eine extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) oder Impella zu entlasten oder langfristig durch z.B. ein linksventrikuläres Unterstützungssystem, kurz LVAD, zu versorgen. Bis heute bleibt die Herztransplantation die einzige kurative Behandlung für schwere Myokardschäden. Doch die wachsende Diskrepanz zwischen Nachfrage und Angebot unterstreicht, dass sie den klinischen Bedarf nicht deckt.⁹¹

In den letzten zehn Jahren gab es zwar wichtige Fortschritte bei den therapeutischen Strategien im Bereich der Myokardhypertrophie und der Herzinsuffizienz, aber bisher kann keine den Verlust von Kardiomyozyten suffizient beheben. Mesenchymale Stammzellen (MSC) sind immer mehr in den Fokus der Forschung gerückt, wenn es um die zellbasierte Therapie von kardialen Erkrankungen ging.^{92, 93} Die Gewinnung der Zellen erfolgt über die Aspiration von kleinen Mengen an Knochenmark. Charakteristisch für die MSCs ist ihre Fähigkeit sich selbst zu erneuern und sich in ganz verschiedene Gewebearten differenzieren zu können.⁹⁴ Weiterhin besitzen sie ein immunmodulatorisches Potential, welches neben der Fähigkeit, sich in verschiedene Gewebsarten zu differenzieren, hauptsächlich darauf basiert, die Immunantwort zu supprimieren.⁹⁵ Vorausgehend ist eine Aktivierung der MSCs mit Interferon γ (IFN - γ) und Interleukin 1 (IL - 1) durch Immunzellen. Insbesondere der Effekt von IFN - γ auf die Möglichkeit der MSCs, immunsupprimierend zu wirken wurde in Studien mit IFN γ - /- Mäusen belegt. Hier waren die MSCs der Mäuse nicht in der Lage, eine Immunsuppression hervorzurufen.^{96, 97}

Das Myokard leidet unter seiner Unfähigkeit zur Regeneration, sodass insbesondere hier der Ansatz einer zellbasierten Regenerationsstrategie mittels MSCs seit Jahren verfolgt wird.^{98, 99} Früh konnte gezeigt werden, dass die Injektion von Stammzellen eine Steigerung der myokardialen Kontraktilität und der kardialen Durchblutung zur Folge hat.^{100, 101} Weiterhin kam es zur Differenzierung der MSCs zu Zellen des kardialen Phänotyps.¹⁰² Da die anfänglichen

Studien in Kombination mit chirurgischen oder interventionellen Eingriffen vorgenommen wurden, konnte die tatsächliche reine Zellwirkung nur eingeschränkt beurteilt werden. Im weiteren Verlauf wurde in verschiedenen Tierexperimenten der Einfluss von eingebrachten MSCs untersucht.^{103, 104}

Einige präklinische Studien belegen bereits, dass sich sowohl nach Transplantation von MSCs in Mäusen nach akutem oder chronischem Myokardinfarkt als auch nach Einbringen von MSCs im Ischämie- Reperusionsmodell in Ratten, die linksventrikuläre Funktion verbessert und histologisch die Myokardinfarktgröße eindämmen bzw. verkleinern lässt. Ebenso lässt sich eine Differenzierung von MSCs zu Kardiomyozyten und vaskulären Zellen beobachten.^{103, 104} In Langzeitstudien konnten allogene und gelabelte MSCs, die per Injektion in die Infarktnarbe von Ratten eingebracht wurden, bis zu sechs Monate nachgewiesen werden. Als weitere positive Effekte ließen sich nach vier Wochen vorübergehend ein verbessertes Schlagvolumen sowie eine höhere linksventrikuläre Ejektionsfraktion bei den mit MSCs behandelten Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen. Im weiteren Verlauf, nach drei und sechs Monaten, zeigten sich zwischen den untersuchten Tieren hinsichtlich der linksventrikulären Funktion keine Unterschiede mehr. Diese vorübergehende Verbesserung der Herzfunktion könnte sich am ehesten auf einen frühen parakrinen Effekt der MSCs zurückführen lassen. Obwohl die MSCs muskel- und endothelspezifische Marker exprimierten, kam es nicht zur Ausbildung eines reifen kardialen Phänotyps.¹⁰⁵ Auch im Großtiermodell zeigte sich unter anderem, dass endokardial eingebrachte MSCs in Schweinen eine kardiale Erholung durch Stimulation von endogenen kardialen Stammzellen nach Infarkt erbrachten.¹⁰⁶

MSCs produzieren viele bioaktive Faktoren, dies ermöglicht einen vielfältigen Ansatz. Die Verabreichung von humanen MSC ins verletzte Myokard führt zu mehreren zusammenwirkenden Wirkmechanismen, unter anderem Fibrosereduktion, Neovaskularisationsstimulation und Immunmodulation und Stimulation der endogenen Geweberegeneration.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹

In Kombinationen sind diese besonders bei der Vermeidung des negativen Remodelings nach ischämischer Verletzung potent. Zahlreiche präklinische und klinische Studien haben gezeigt, dass die Injektion von MSCs in die Grenzzone zwischen infarziertem und vitalem Herzgewebe zu einem starken antifibrotischen Effekt, einer reduzierten Gewebeschädigung und einer Vermehrung des lebensfähigen und durchbluteten Gewebes führt.^{98, 106, 110-113} Die verbesserte myokardiale Kontraktilität resultiert überwiegend aus verbesserten endogenen Regenerationsmechanismen durch die injizierten MSCs, die hierfür notwendigen Signalmechanismen rücken somit mehr und mehr in das Interesse der Forschung.^{106, 114} Aufgrund des positiven Effekts der MSCs auf die Regenerationsfähigkeit des Myokards gewinnt auch die Erforschung des Einflusses von MSCs auf die pathologische

Hypertrophieentwicklung an Bedeutung. Cai und Kollegen zeigten bereits, dass MSCs über vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (VEGF) eine antihypertrophe Wirkung auf Kardiomyozyten haben.¹¹⁵

Anlässlich dieser Erkenntnisse ist die weitere Erforschung der MSCs in *in vitro* Modellen auf molekularer und zellulärer Ebene sowie auch deren Interaktion mit anderen Zellen, für die Entwicklung von Therapieansätzen der kardialen Hypertrophie vielversprechend

2.5 Ziele der Arbeit

Erkrankungen, die das Herz- Kreislaufsystem betreffen, wie Herzinsuffizienz, koronare Herzerkrankung und Herzinfarkt, sind in der westlichen Welt sehr häufig und weltweit noch immer auf Platz eins der Todesursachen. Studienergebnisse aus der PURE- Studie belegen zwar, dass sich Prävention und Behandlung von Herz- Kreislauf- Erkrankungen in einkommensstarken Ländern stetig verbessern. Laut der Studie sterben Patienten aus reichen Ländern (Saudi-Arabien, Vereinigten Arabischen Emiraten, Schweden, Kanada) mittlerweile weniger wahrscheinlich an kardiovaskulären als an karzinogenen Erkrankungen, wobei ungeachtet dessen im Jahr 2019 die ischämische Herzkrankheit für 8,89 Millionen Todesfälle verantwortlich ist.¹¹⁶

¹¹⁷ Bei insgesamt 55,4 Millionen Todesfällen weltweit belegen die kardiovaskulären Erkrankungen somit den ersten Platz unter den Todesursachen. Auch in Deutschland ist die Anzahl derer, die aufgrund von Erkrankungen des Herz- Kreislaufsystems sterben, weiterhin extrem hoch. Mehr als ein Drittel der deutschen Todesfälle entfiel im Jahr 2020 auf Erkrankungen des kardiovaskulären Bereichs, Neoplasien hingegen waren nur für knapp ein Viertel der Todesfälle verantwortlich.¹¹⁸ Die Erforschung, Diagnostik und Therapie dieser Krankheitsbilder werden in den kommenden Jahren weiterhin einen hohen Stellenwert einnehmen. Neben den schon bekannten Risikofaktoren, wie unter anderem Tabakkonsum, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Hyperlipoproteinämie, familiärer Vorbelastung und zunehmendes Alter und deren Vorbeugung, rückt auch die Erforschung auf molekularer Ebene zur Erkennung von potentiellen Therapieansätzen immer mehr in den Vordergrund. Da viele Herz- Kreislaferkrankungen im direkten Zusammenhang mit einer Herzhypertrophie stehen, ist eines der Ziele dieser Dissertation, geeignete Hypertrophiemarker in den verwendeten murinen Kardiomyozyten HL - 1 und den iPS - CM zu finden. Bisher sind in der Literatur keine hypertrophiespezifischen Marker für die iPS - CM beschrieben worden. Durch die Verwendung des Adrenalinderivats Phenylephrin wurde in den Zelllinien eine Hypertrophie induziert und auf Gen- und Proteinebene Veränderungen untersucht. Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit dem immunmodulatorischen Effekt einer zellbasierten Therapie mit murinen MSCs auf die zuvor hypertrophierten Kardiomyozyten. In der Arbeit wird der Einfluss von nicht- aktivierten und aktivierten mMSCs auf die hypertrophierten iPS - CM anhand der zuvor entdeckten Hypertrophiemarker in direkter Zellkultur sowie in Transwells untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verbrauchsartikel und Zubehör

autoMACS Columns	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Biosphere® Filter Tips (verschiedene Volumina)	Sarstedt, Nümbrecht
Blotting Filter Paper 2,5 mm	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Casting Frames	BioRad Laboratories, München
Casting Stands	BioRad Laboratories, München
Histologie Deckglässchen	Carl Roth, Karlsruhe
Eppendorf-Gefäß 0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorf-Gefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
FACS-Röhrchen	BD Bioscience, Heidelberg
Falconröhrchen 15 ml	VWR, Darmstadt
Falconröhrchen 50 ml	VWR, Darmstadt
Filter 70 µm	BD Bioscience, Heidelberg
Glasplatten (0,75m)	BioRad Laboratories, München
Kanülen, 0,45 x 12 mm	Terumo, Eschborn
Multi®-SafeSeal® Tubes 0,2 ml	Carl Roth, Karlsruhe
Multi®-SafeSeal® Tubes 0,5 ml	Carl Roth, Karlsruhe
Multi®-SafeSeal® Tubes 1,5 ml	Carl Roth, Karlsruhe
MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Microseal® `B` adhesive seals	BioRad Laboratories, München
Mini Protean® Glass Plates	BioRad Laboratories, München
Mini Protean® Stand and Clamp Kit	BioRad Laboratories, München
Neubauer Kammer	LO Labor Optik, Lancing, UK
Nitrocellulose Blotting-Membrane 0,2 µm	Peqlab, Erlangen
PCR Soft Tube (0,2 ml)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Petrischalen	VWR, Darmstadt
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen, 1 ml	BD Bioscience, Heidelberg
T75 Flasche	BD Bioscience, Heidelberg
Tissue Culture Plate 6 Well, steril	VWR, Darmstadt
Tissue Culture Plate 12 Well, steril	VWR, Darmstadt
Transwell®-Clear Membraneeinlagen aus Polyester, 0,4µm Poren	VWR, Darmstadt

Zellkulturflaschen T25 mit Filterkappe	VWR, Darmstadt
Zellkulturflaschen T75 mit Filterkappe	VWR, Darmstadt

3.1.2 Geräte

Applied Biosystems StepOnePlus	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
<i>autoMACS</i> ®,	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
BD FACSCalibur™	BD Bioscience, Heidelberg
BioPhotometer	Eppendorf
Brutschrank MCO-170AICUV-PE	Panasonic, Hamburg
ChemiDoc™XRS Gel Imaging System	BioRad Laboratories, München
Eclipse Ti-E	Nikon, Tokyo
Heizblock MKR13	Carl Roth, Karlsruhe
linear shacking water bath	VWR, Darmstadt
MACSQuant® Analyzer 10	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Microfuge 16	Beckmann Coulter
Mini-PROTEAN Tetra Cell	BioRad Laboratories, München
Mini-Protean® Tetra Cell	BioRad Laboratories, München
NanoDrop™™ 2000/2000c Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Novex® Semi-Dry Blotter	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Perfect Spin 24R Zentrifuge	Peqlab, Erlangen
PowerPac™ HC Power Supply	BioRad Laboratories, München
Real Time PCR System (Applied Biosystems)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Sterilbank, Kojair	Vilppula, Finland
Thermo Shaker MKR13	Hettich Benelux, Geldermalsen, Netherlands
Trans-Blot Turbo	BioRad Laboratories, München
UP50H Ultraschallprozessor	Hielscher Ultrasonics, Teltow
Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Victor3	Perkin Elmer, Rodgau
Vortexer	Carl Roth, Karlsruhe
VWR <i>linear shacking water bath</i>	VWR, Darmstadt

3.1.3 Chemikalien und Lösungen

Acrylamid 30 %	BioRad Laboratories, München
Alexa Fluor 555-Phalloidin (Aktin)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Ammoniumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma- Aldrich, München
Ampuwa Spüllösung	Fresenius Kabi, Bad Homburg

Aqua dest.	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
<i>Bovine Serum Albumine</i>	PAA, Cölbe
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe
CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega, Madison, USA
Chloroform ≥ 99%, DAB	Carl Roth, Karlsruhe
Fluorescence Mounting Medium	Agilent Dako, Santa Clara
DAPI (hydrochlorid)	Cayman chemical, Ann arbor, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Sigma- Aldrich, München
Ethanol 96% vergällt	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol absolute p. A.	AppliChem, Darmstadt
FACS Clean Solution	BD Bioscience, Heidelberg
FACS Flow Solution	BD Bioscience, Heidelberg
FACS Rinse Solution	BD Bioscience, Heidelberg
GeneChip™ Mouse Genome 430 2.0 Array	Thermo Fisher Scientific
Glycerol	Sigma- Aldrich, München
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol ≥ 99,8%	Carl Roth, Karlsruhe
L-Ascorbic Acid, Reagent grade, Crystall	Sigma- Aldrich / Merck
L-Phenylephrine Hydrochlorid	Sigma- Aldrich / Merck
Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol ≥99%	Carl Roth, Karlsruhe,
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe
Na-Deoxycholat	Carl Roth, Karlsruhe
Nonidet-P40	US Biological, Salem, USA
Nuclease-Free Water	Qiagen, Hilden
PFA Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
Phosphatase Inhibitor Cocktail (100x)	Cell Signaling Technology, Frankfurt a.M.
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific
Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Propidiumiodid	Carl Roth, Karlsruhe

Protease Inhibitor Cocktail (100x)	Cell Signaling Technology, Frankfurt a.M.
reines Wasser für MoBI	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Roti®-Mark WESTERN-Set	Carl Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Acrylamid 30%	Carl Roth, Karlsruhe
SDS Pellets	Carl Roth, Karlsruhe
Sodium Acetate Buffer Solution	Sigma- Aldrich, München
Sodium dodecylsulfate (SDS)	Sigma- Aldrich, München
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe,
Trichloressigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Tris Base	Carl Roth, Karlsruhe
Tris HCl	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS Pufferan®, min. 99,9%	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS-EDTA-Pufferlösung, pH7,4	Sigma- Aldrich, München
Triton™ X-100 Molecular Biology Reagent	Sigma- Aldrich, München
Trizol® Reagent	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Trypanblau	Sigma- Aldrich, München
Trypsin-EDTA Solution (1x)	Sigma- Aldrich, München
Tween 20	Sigma- Aldrich, München
Uptilight HRP Blot Chemiluminescent ECL	Uptima/ Interchim

3.1.4 Zellkultur

2-Mercaptoethanol	Sigma- Aldrich, München
Claycomb <i>medium without L-glutamine</i>	Sigma- Aldrich, München
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe,
<i>Fetal Bovine Serum</i> (FBS)	Sigma- Aldrich, München
<i>Fetal Bovine Serum</i> (FBS) premium	Sigma- Aldrich, München
Fibronektin (1 mg/ ml)	Sigma- Aldrich, München
<i>Gelatine from bovine skin</i>	Sigma- Aldrich, München
<i>Gibco™ DMEM GlutaMAX™</i>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
<i>Gibco™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution</i>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
<i>L-Ascorbic Acid, sodium salt</i>	Sigma- Aldrich, München
<i>L-Glutamine, 200 mM</i>	Sigma- Aldrich, München
Medium for murine MSC, w: L - Glutamine	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
<i>Norepinephrine-bitartrate salt</i>	Sigma- Aldrich, München
<i>Penicillin-Streptomycin with 10,000 units penicillin and 10 mg streptomycin per mL</i>	Sigma- Aldrich, München

Trypsin/ EDTA	Sigma- Aldrich, München
---------------	-------------------------

Kultivierungsmedium (Vollmedium) HL - 1 Zellen

Claycomb Medium
10 % FBS von Sigma
1 % Norepinephrin (0,1mM)
1 % L - Glutamin (2mM)
1 % Penicillin/Streptomycin

Magermedium HL - 1 Zellen

Claycomb Medium
0,5 % FBS von Sigma
1 % L - Glutamin
1 % Penicillin/ Streptomycin

Kultivierungsmedium (Vollmedium) iPS - CM

IMDM + GlutaMax
20 % FCS premium
1 % Penicillin/ Streptomycin
1 % NEEA
0,2 % β - Mercaptoethanol

Magermedium iPS - CM

IMDM + GlutaMax
1 % Penicillin/ Streptomycin
1 % FCS (premium)

Kultivierungsmedium mMSC

Medium for murine MSC, w: L - Glutamine
1 % Penicillin/ Streptomycin

3.1.5 Puffer

RIPA-Puffer:

50 mM Tris pH = 8
150 mM NaCl
1 % NP – 40
0,5 % Na - deoxycholot
0,1 % SDS

4 x Trenngelpuffer:	1,5 M Tris	91 g (pH = 8,8)
	0,4 % SDS	2 g SDS
		ad 500 ml H ₂ O
4 x Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris	6,05 g (pH = 6,8)
	0,4 % SDS	0,4 g SDS
		100 ml H ₂ O
Laufpuffer: 1 x Puffer (keinen pH einstellen)		für 10 x Puffer:
	25 mM Tris, pH = 8,3 – 8,8	30,3 g
	192 mM Glycin	144,2 g
	0,1 % SDS	10 g
		ad 1000 ml H ₂ O
Tris-Glycine Transferpuffer (keinen pH einstellen, für sechs Monate bei RT haltbar) für 25 x Puffer:	12 mM Tris-Base	18,2 g
	96 mM Glycin	90 g
		ad 500 ml H ₂ O
Blotting-Puffer (2 x Tris-Glycine Transferpuffer):	40 ml 25 x Transferpuffer	
	50 ml Methanol	
	ad 500 ml	
Ponceau S (Aufbewahrung im Dunkeln bei RT):	0,1 % Ponceau	
	3 % Trichloressigsäure	
Tris-buffered saline (TBS) :	7,7 mM Tris (pH = 7,5)	12,1 g
	150 mM NaCl	87,7 g
		ad 1000 ml H ₂ O
4x Tris-Glycine SDS Sample Buffer (4x Laemmli- Puffer) (Aufbewahrung bei 4° C für 6 Monate möglich, vor der Nutzung auf RT aufwärmen):		
	252 mM Tris-HCl	2,5 ml 1 M Tris-HCl, pH = 6,8
	40 % Glycerol	4 ml
	8 % SDS	0,8 g
	0,01 % Bromphenolblau	eine Spatelspitze

Verwendung: 1:333,33

0,03 µg/ ml

3.1.10 Verwendete Zellreihen

Für die vorliegende Arbeit wurden vergleichsweise zwei unterschiedliche murine Zellreihen, die HL - 1 Zellen (heart-like-1 Zellen) und die iPS - CM (induced pluripotent Stem cells- derived cardiomyocytes) zur Detektion von Hypertrophiemarkern untersucht.

3.1.10.1 HL - 1

Die murine Zellreihe HL - 1, die von William Claycomb in den 90er Jahren entwickelt wurde, ist eine etablierte Zellreihe für die molekulare Untersuchung von Kardiomyozyten.⁸¹ Primär wurde die HL - 1 Zellreihe abgeleitet aus atrialen Kardiomyozyten von transgenen Mäusen, welche *das Onkogen Simian virus 40 (SV 40) large T Antigen* exprimieren, sogenannte AT - 1 Zellen.^{79, 80} Aus diesen AT - 1- Zellen erfolgte anschließend die Generierung der HL - 1 Zellen. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie die morphologischen, biochemischen und elektrophysiologischen Eigenschaften von Kardiomyozyten besitzen. Weiterhin weisen sie die Fähigkeit zur spontanen Kontraktion auf, behalten ihre Differenzierung zum Kardiomyozytenphänotyp bei und zeigen pharmakologische Charakteristika von kardialen Muskelzellen. Da die HL - 1 Zellen außerdem vielfach passagierbar sind, sowie eingefroren und wieder aufgetaut werden können, ermöglichen sie eine Vielzahl an experimentellen Untersuchungen in Bezug auf die Funktion, Struktur und Interaktion von Kardiomyozyten.^{81, 82} In dieser Arbeit wurden HL - 1 Zellen der Zellreihen von Passage 97- 105 verwendet und die Kultivierung wurde entsprechend der Vorlage von Herrn Professor Dr. W. Claycomb durchgeführt.

3.1.10.2 iPS - CM

Bei der zweiten in dieser Arbeit verwendeten Zellreihe handelt es sich um die iPS - CM (induced pluripotent stem cells- derived cardiomyocytes). Humane und murine Fibroblasten werden über wenige definierte Faktoren (Oct3/4, Sox2, Klf4 und c - Myc sogenannte transiente Transkriptionsfaktoren) umprogrammiert, so dass aus adulten somatischen Zellen pluripotente Zellen werden. Für weiterführende Untersuchungen können diese pluripotenten Stammzellen weiter differenziert und im *in vitro* Modell eingesetzt werden.^{83, 84, 119} Mittlerweile ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor Oct3/4 bei der Reprogrammierung zu iPS- Zellen ein unverzichtbarer Faktor ist, wohingegen Sox2, Klf4 und c - Myc als supportive Faktoren gelten.¹²⁰ Weiterführende Versuche haben gezeigt, dass die iPS- Zellen sich in verschiedene Gewebe aller drei Keimblätter differenzieren können, sodass eine Ausdifferenzierung zu Kardiomyozyten verfolgt wurde.¹²¹ Die Weiterentwicklung von iPS- Zellen zu Kardiomyozyten (iPS - CM) führt dazu, dass sie auf molekularer, struktureller und funktionaler Ebene die typischen Eigenschaften von Kardiomyozyten aufweisen. Weiterhin zeigte sich in der

elektrophysiologischen Untersuchung in den iPS - CM ein funktionierender adrenerger und muskarinerges Signalweg.¹²² In der weiterführenden Analyse präsentiert sich zudem, dass, neben den gleichen hormonellen Regelmechanismen und Ionenkanälen, die iPS - CM einen ventrikulären Phänotyp ausbilden. Jedoch besteht im Vergleich zu den Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen eine zeitlich verzögerte Entwicklung zum kardialen Typ.¹²³ Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen bieten iPS - CM außerdem die Möglichkeit autologe Kardiomyozyten zur Geweberekonstruktion des Myokards oder zur zellulären Behandlung von Kardiomyopathien zu generieren.¹²⁴

Die in dieser Arbeit verwendeten iPS - CM wurden von der AG PD Dr. Kurt Pfannkuche aus dem Neurophysiologischen Institut der Uniklinik Köln zur Verfügung gestellt, die für die Differenzierung und Aufzucht der Zellen zu iPS - CM zuständig war. Die entsprechende Differenzierung und Aufzucht aus iPS - CM wurde bereits von Pfannkuche et al., 2009 beschrieben.¹²²

3.2 Methoden

3.2.1 Auftauen, Kultivierung und Passagieren von HL - 1 Zellen

Die HL - 1 Zellen wurden im flüssigen Stickstoff, bestehend aus 95% FBS und 5% DMSO, gefroren gelagert und für die jeweiligen Versuche aufgetaut. Da Bestandteile des Mediums lichtempfindlich sind, wurde bei der Arbeit mit HL - 1 Zellen darauf geachtet, das Medium vor Licht zu schützen. Bevor die Zellen aufgetaut werden konnten, wurde das Vollmedium erstellt und die T-75 Flaschen mit 3 ml 0,02% Gelatine + 5µg/ml Fibronectin (Gelatine/ Fibronectin) beschichtet (*Coating*). Im Anschluss an die Vorbereitung wurde die entsprechende Anzahl Vials aus dem Stickstofftank entnommen und zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut bis nur noch ein kleiner Eisklumpen zu sehen war. Die Zellen sollten dabei so kurz wie möglich in dem aufgetauten DMSO verbleiben, da dies ansonsten zum Zelltod führen kann. Anschließend wurde die Zellsuspension langsam in 10 ml Vollmedium aufgenommen, da es bei zu schneller Zugabe zum osmotischen Schock in den Kardiomyozyten kommen kann. Im nächsten Schritt wurde die Zellsuspension zur Separation zentrifugiert (5 min; 500 \vec{g} ; 4 °C), das Medium abgesaugt und in Vollmedium gelöst. Zeitgleich wurde das Gelatine/ Fibronectin aus den gecoateten Flaschen entfernt, die Flaschen mit DPBS gewaschen und die Zellsuspension hineingegeben und durch vorsichtiges Schwenken verteilt. Je Flasche wurden 3×10^6 Zellen ausgesät. Die Kultivierung erfolgt im Brutschrank MCO-170AICUV-PE bei 37°C mit 5 % CO₂ und 95 % O₂. Nach 4 h war eine Adhäsion der HL - 1 Zellen am Flaschenboden erfolgt, so dass überschüssige Zellen durch Wechseln des Vollmediums entfernt werden konnten. Während der Kultivierung der Zellen wurde täglich das Medium ausgetauscht und die Zellen mit gewärmter phosphatgepufferter Kochsalzlösung (DPBS) gewaschen. Durchschnittlich benötigte eine aufgetaute Menge von 3×10^6 Zellen drei Tage um eine Konfluenz von 100 %

zu erreichen und somit eine geeignete Menge für den Versuch zu haben oder dicht genug zu sein, um auf drei neue Flaschen aufgesplittet zu werden. Sowohl für den Versuchsstart als auch zur fortgesetzten Kultivierung wurde das Medium auf den Zellen entfernt und die Flasche mit DPBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mittels *Trypsinierung* aus den Kulturflaschen gelöst. Hierfür wurden 3 ml Trypsin/ EDTA (0,05% Trypsin in 0,02% EDTA) für 1 min in die Flaschen gegeben und bei 37°C inkubiert. Nach dem Absaugen wurde erneut frisches Trypsin/ EDTA (3 ml) hinzugefügt und für weitere 5 min inkubiert. Durch das Trypsin werden die adhärenierten Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst. Das Trypsinieren wurde durch die Zugabe von der gleichen Menge Vollmedium (3 ml) gestoppt und die entstandene Zellsuspension in ein Falcon überführt und zentrifugiert (5 min; 500 \vec{g} ; 4 °C). Für eine weitere Kultivierung in T-75 Flaschen wurde das Zellpellet in Vollmedium gelöst und auf die vorbereiteten Flaschen aufgeteilt.

3.2.2 Kultivierung und Passagieren von iPS - CM

Vor Abholung der iPS - CM aus dem Institut für Neurophysiologie wurden Kultivierungsgefäße (T-75 Flaschen oder 6 Well- Platten) mit Fibronectin (2,5 μ g/ ml) ge-coated sowie Kultivierungsmedium (Vollmedium) und Magermedium erstellt. Die Zellen wurden mittels *Trypsinierung* vom Boden der Petrischalen gelöst, die Zellsuspension in ein Falcon überführt, zentrifugiert (5 min; 1200 rpm; 4 °C) und der Überstand verworfen. Zur fortgeführten Kultivierung wurde das Zellpellet der iPS - CM wieder im Vollmedium gelöst und die Zellsuspension in T-75 Flaschen gegeben, nach Adhäsion der Zellen zeigte sich eine ca. 70% Konfluenz der Zellen in den Flaschen.

3.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Für die Zellzählung wurde das Zellpellet in DPBS gelöst und 10 μ l der Zellsuspension separat mit Trypanblau vermischt (Verdünnung 1:4). Für die Quantifizierung der Zellzahl wurde eine Neubauer- Zählkammer mit Deckglas vorbereitet und die mit Trypanblau versetzte Zellsuspension damit bestückt. Die Zellsuspension zieht sich mit Hilfe von Kapillarkräften unter das Deckglas, anschließend wurde unter dem Lichtmikroskop die Zellzählung der vitalen Zellen durchgeführt (siehe **Abbildung 3.1**).



Abbildung 3.1: Neubauer- Zählkammer ohne aufgelegtes Deckglas (links) und Quadrantenmuster einer Neubauer- Zählkammer (rechts)

Es wurden die Zellen pro Eckquadrat gezählt. Die Zellzahl von allen vier Einheiten wurde addiert, hieraus der Mittelwert gebildet und anschließend in die folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Gesamtzellzahl pro ml} = y \times 4 \times 10^4$$

Formel 3.1: Berechnung der Gesamtzellzahl (y =gezählte Zellzahl; Faktor 4 für die 1:4 Verdünnung mit Trypanblau; Faktor 10^4 da ein Eckquadrat = $0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \mu\text{l}$, $0,1 \mu\text{l} \times 10^4 = 1 \text{ ml}$)

3.2.4 *In vitro* Induktion von Hypertrophie

Um die Hypertrophie in den verwendeten Kardiomyozytenzellreihen zu induzieren, wurden die Zellen mit Phenylephrin (PE) behandelt.

Nach der Zellzählung wurde die auf Eis stehende Zellsuspension zentrifugiert (HL - 1: 5 min; $500 \vec{g}$; 4°C ; iPS - CM: 5 min; 1200 rpm; 4°C) und das Zellpellet im entsprechenden Magermedium gelöst. Für den Versuch wurden 1×10^6 HL - 1 Zellen und 8×10^5 iPS - CM in 1,5 ml Magermedium pro Well auf zuvor gecoatete Wells ausplattiert. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurde das Magermedium gewechselt, die Zellen mit DPBS gewaschen und pro Well erneut 1,5 ml Magermedium hinzugefügt und alle Wells bis auf die Kontrolle mit $100 \mu\text{M}$ PE versetzt.

Nach weiteren 24 h Inkubationszeit wurde der Versuch gestoppt, die Zellen mittels Trypsinierung gelöst und die Zellen der einzelnen Wells in Eppendorfgefäße gesammelt, herunterzentrifugiert (2 min; U_{max} ; 4°C) und das überschüssige Medium entfernt. Um Rückstände des Mediums zu entfernen, wurde das Zellpellet erneut in DPBS resuspendiert, herunterzentrifugiert (2 min; U_{max} ; 4°C), der Überstand entfernt und das Zellpellet bei -80°C gefroren.

3.2.5 Auftauen und Kultivierung von mMSCs

In dieser Arbeit wurden mMSCs bis zur zwölften Passage genutzt. Die mMSCs wurden im flüssigen Stickstoff in 1 ml Flüssigkeit (90 % FBS; 10 % DMSO) gelagert. Je Versuch wurden

zwei Vial zügig im Wasserbad (37 °C), wie bereits in 3.2.1. beschrieben, aufgetaut. Anschließend wurden die zwei Zellsuspensionen langsam separat in mMSC - Medium aufgenommen, zentrifugiert (5 min; 1300 rpm; 4 °C), der Überstand abgesaugt und die Zellpellets erneut in Vollmedium gelöst. Die Zellsuspension wurde dann in zwei T-75 Flaschen überführt und 72 h im Brutschrank aufbewahrt.

3.2.6 Co - Kultivierung iPS - CM und mMSCs

24 h vor Start der Co - Kultivierung wurde das Medium der mMSCs gewechselt und eine Flasche zur Zellaktivierung und Stimulation ihrer parakrinen Aktivität 0,3 µg/ ml IL - β und 0,3 µg/ ml IFN - γ hinzugefügt. Für die Co- Kultur wurden pro Well 8×10^5 iPS - CM in 1,5 ml Magermedium ausgesät. Nach 24 h Inkubation wurde bei allen Wells das Magermedium gewechselt und bis auf das Well für die Kontrolle mit 100 µM PE behandelt.

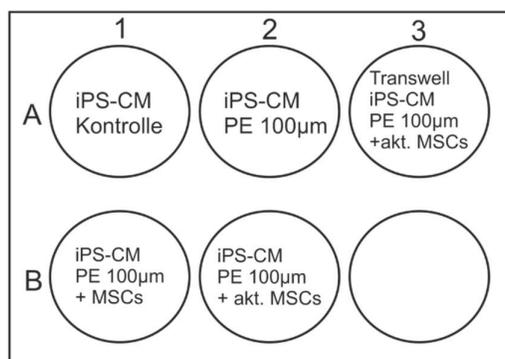


Abbildung 3.2: Versuchsaufbau Co- Kultur iPS - CM (8×10^5 Zellen/ Well) und mMSCs ($1,6 \times 10^5$ Zellen/ Well)

Nach weiteren 24 h wurden alle Wells mit frischem Magermedium, diesmal pro Well 3 ml, versorgt und bis auf die Kontrolle mit 100µM PE behandelt. Wie im Versuchsaufbau in **Abbildung 3.2** ersichtlich, wurden je einem Well mit iPS - CM nichtaktivierte und aktivierte mMSCs ($1,6 \times 10^5$) in direkter Co- Kultur hinzugefügt. Ein weiteres Well wurde mit einem Transwell mit 0,4 µm Porengröße bestückt und aktivierte mesenchymale Stammzellen darauf gegeben. Die Zellen wurden für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert.

Nach *Trypsinierung* wurden alle Zellen, bis auf die Zellen der direkten Co- Kultur, herunterzentrifugiert (2 min, U_{max}). Der Überstand wurde von den Zellpellets abgesaugt, die Pellets erneut in DPBS gewaschen, anschließend erneut herunterzentrifugiert und bei -80°C eingefroren. Die Zellen der direkten Co- Kultur, bestehend aus iPS - CM und nichtaktivierten bzw. aktivierten mMSCs, wurden nach der *Trypsinierung* herunterzentrifugiert (2 min, 1200 rpm), der Überstand verworfen, in DPBS gelöst und auf Eis gestellt.

3.2.7 Bestimmung der Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht das Zählen und die Analyse von Zellengröße, -form, und -struktur. Die schematische Darstellung der Lichtwege im BD FACSCalibur™ ist in **Abbildung**

3.3 dargestellt. Für die Analyse müssen die Zellen in einer Zellsuspension vorliegen und ggfs. mit einem Fluoreszenzfarbstoff vorbehandelt werden. Die Trägerflüssigkeit ermöglicht die Erzeugung eines Hüllstroms, der dann laminar durch die Küvette fließt. Zu Beginn wird die Probenflüssigkeit mittels „*stream in stream*“-Methode in die Trägerflüssigkeit eingebracht. Dies geschieht, indem der Druck der Probenflüssigkeit höher ist als der des Hüllstroms. Im Gegensatz dazu ist die Geschwindigkeit des Hüllstroms höher als die der Probenflüssigkeit. Je nach Druckdifferenz der beiden Flüssigkeiten kann die Durchflussrate bestimmt werden. Durch eine Verringerung des Messküvettenquerschnitts im Verlauf werden die Zellen beschleunigt, der Abstand zwischen ihnen wird vergrößert und sie werden einzeln in der Durchflusszelle (cell flow) an einem Laserstrahl entlanggeführt und von diesem angeregt. Das entstehende Streu- und Fluoreszenzlicht wird separat voneinander detektiert und elektronisch umgewandelt. Die Analyse erfolgt basierend auf den optisch emittierten Signalen der jeweiligen Zellen. Bei der Lichtstreuung korreliert die Menge des gestreuten Lichts mit dem Volumen der Zelle (Vorwärtsstreuung (FSC = Forward Scatter)) und ihrer Komplexität (Seitwärtsstreuung (SSC = Sidewards Scatter)). Der FSC detektiert das von der Zelloberfläche in einem flachen Winkel gestreute Licht und gibt Auskunft über die Größe der Zelle. Die Detektion des Seitwärtsstreuung hingegen repräsentiert die Lichtbrechung und Reflexion des Lichts des Zellinnenlebens. Es wird im rechten Winkel zum einfallenden Licht gemessen und seine Streuung ist proportional zur Komplexität des Zellinnenlebens, z.B. Granularität der Zelle, Vesikeln oder Zellkern. Zusätzlich können am FACSCalibur™ drei bis vier verschiedene Fluoreszenzen mit Hilfe von ein bis zwei Lasern gemessen werden. Die Fluoreszenzen werden wie das Seitwärtsstreuung im 90°-Winkel gemessen und sind abhängig vom eingesetzten Fluorochrom. Das Fluoreszenzlicht, welches emittiert wird, hängt proportional davon ab, wie viele Fluorochrome von der Zelle gebunden wurden. Die Darstellung der Zellen erfolgt als Histogramm und als Dot Plot **Abbildung 3.4** (Hartmann, 2015).

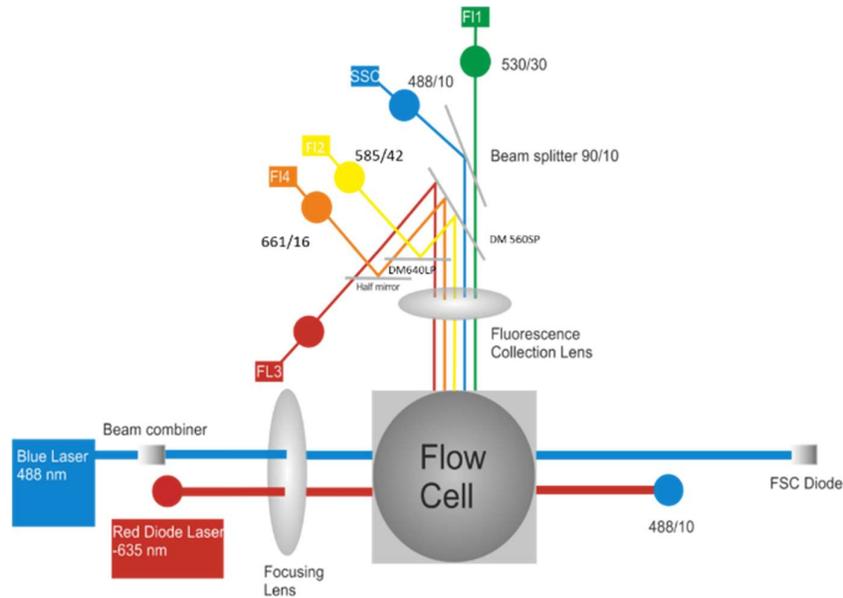


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Lichtwege im BD FACSCalibur™.

FSC = Forward Scatter; SSC = Sideways Scatter; F1, F2, F3, F4 = Fluoreszenzdetektoren; DM = Dichroic Mirror, SP = shortpass filter, LP = longpass filter. Darstellung der von Becton Dickinson nachempfunden.

In dieser Arbeit dient Propidiumiodid als Nukleinsäureinterkalator für die Diskriminierung der Zellviabilität in der gemessenen Zellsuspension.¹²⁵ Durch die Interkalation mit der DNA verschiebt sich sein Absorptions- und Emissionsmaximum von 488 nm/ 590 nm auf 535 nm/ 617 nm. Die vorherige Inkubation mit Ethanol sorgt in den vitalen Zellen für eine durchlässige Zellmembran. In vitale Zellen mit intakter DNA kann ein wesentlich höherer Anteil an Propidiumiodid interkalieren und es kommt zu deutlich mehr emittierten Photonen, die im FL2 - h Detektor gemessen werden. Im Histogramm repräsentiert der G1- Peak den Anteil an vitalen Zellen (**Abbildung 3.4**). Die apoptotischen Zellen werden aufgrund ihrer fragmentierten DNA mit geringerer Anzahl emittierter Photonen in den sub - G1 einsortiert. Der Bereich wird manuell festgelegt, sodass anhand dieser Unterteilung eine prozentuale Angabe der Apoptoserate bzw. Zellviabilität gemacht werden kann.

Um die Apoptoserate zu bestimmen, wurden von den einzelnen HL - 1 und iPS - CM Proben je 300 µl der Zellsuspension in ein FACS- Röhrchen überführt, zentrifugiert (5 min; 200 \vec{g} ; 4 °C) und der Überstand verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde in 1 ml DPBS aufgenommen, resuspendiert, erneut zentrifugiert (5 min; 200 \vec{g} ; 4 °C) und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet in 500 µl DPBS resuspendiert und das FACS- Röhrchen nach und nach mit 4 ml gekühltem 70 % Ethanol aufgefüllt, vermischt, anschließend mit Parafilm verschlossen und inkubiert (2 h; -20 °C). Dadurch werden die Zellen fixiert und für eine spätere Behandlung mit Propidiumiodid vorbereitet. Nach Inkubation wurde die Zellsuspension zentrifugiert (5 min; 400 \vec{g} ; 4 °C), der Überstand verworfen, in DPBS gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min; 400 \vec{g} ; 4 °C). Nach Entfernung des Überstands

wurde das Zellpellet in 300 µl Propidiumiodid (20µg/ml) aufgenommen. Durch die Vorbehandlung kann das Propidiumiodid in die Zellen eindringen und sich an der DNA anlagern. Nach Inkubation (30 min; RT; im Dunkeln) wurden die Proben ins FACSCalibur™ für die Zellanalyse eingesetzt. Es wurden pro Probe je 10.000 Zellen analysiert und die Ergebnisse mit der Software BD CellQuestPro™ ausgewertet.

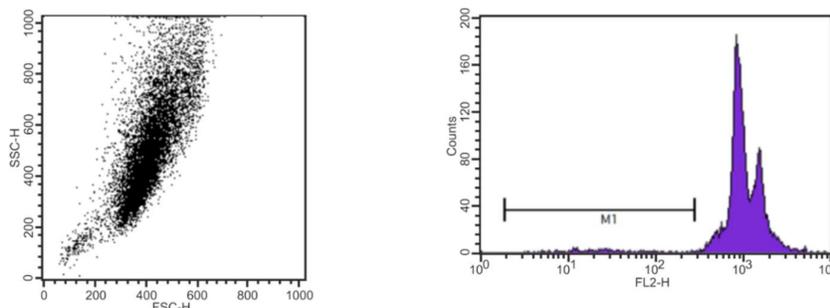


Abbildung 3.4: Exemplarische Darstellung des Histogramms und des Dot Plots der im BD FACSCalibur™ untersuchten Zellen.

Auf der linken Seite zeigt die Punktwolke die Größe (FSC) sowie Komplexität (SSC) der HL - 1 Kardiomyozyten; rechts: Der G1- Peak beschreibt die Anzahl der vitalen Zellen der HL - 1 Zellsuspension. Der Sub -G1 - Bereich, hier als M1 eingegrenzt, beschreibt die Anzahl der apoptotischen Zellen.

3.2.8 Zelltrennung via *autoMACS*®

Bei der Separation werden die mesenchymalen Stammzellen durch immunmagnetische Markierung wieder von den iPS - CM getrennt. Dies geschieht aufgrund einer spezifischen Bindung von dem mit Biotin- konjugiertem Antikörper Sca - 1 (Stem cells antigen - 1) an die mMSCs. Die notwendige sekundäre Bindung an die gelabelten mMSCs erfolgt mittels Anti- Biotin Micro Beads, wobei hier eine magnetische Kennzeichnung der mMSCs entsteht. Bei der anschließenden Separation im *autoMACS* werden die Zellen durch Säulen geschickt, die von einem Magnetfeld umgeben sind. Wird das Magnetfeld eingeschaltet, bleiben die positiv markierten Zellen, in diesem Fall die mMSCs, haften. Die iPS - CM werden so im Sinne einer Negativauswahl ausgesondert, wobei im Anschluss beide Zellreihen in getrennten Zellsuspensionen ausgegeben werden. Die durchgeführte Zelltrennung im *autoMACS*® bezieht sich auf eine Zellzahl von 1×10^7 Zellen.

Die Zellsuspension aus der direkten Co – Kultivierung wird herunterzentrifugiert (10min; $300\vec{g}$; 4°C) und in 90 µl *autoMACS*® Puffer resuspendiert und mit 10 µl biotinylierten Sca - 1 Antikörper versetzt, gut gemischt und erneut inkubiert (10 min; 4 °C). Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit 2 ml *autoMACS*® Puffer gewaschen und zentrifugiert (10 min; $300\vec{g}$; 4 °C). Der entstandene Überstand wurde verworfen. Als nächstes wurde das Zellpellet in 80 µl *autoMACS*® Puffer gelöst und 20 µl des sekundären Antikörpers Anti- Biotin Micro-Beads hinzugefügt, gut gemischt und inkubiert (15 min; 4 °C). Nach einem weiteren Waschschrift (2 ml *autoMACS*® Puffer; $300\vec{g}$; 4 °C) wurde das Pellet in 1 ml

autoMACS® Puffer sorgfältig resuspendiert und unter den Einsog des *autoMACS*® gestellt und das Programm *Deplete* für die Separation ausgewählt. Nach der Separation liegen zwei unterschiedliche Zellsuspensionen vor. Die Suspension der iPS - CM wurden bei U_{\max} zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

3.2.9 Reinheitsbestimmung mittels Durchflusszytometrie

Der Reinheitsgrad der aufgetrennten iPS - CM nach Co – Kultivierung mit mMSCs wurde mittels FACS Analyse im MACSQuant ermittelt. Die Suspension der iPS - CM wurden hierfür mit einem anti- Sca - 1 Antikörper markiert. Der Antikörper, der an Sca - 1 (Stem cells antigen - 1) bindet, kann nur an die verbliebenen mMSCs binden, die mit dem Biotin- konjugiertem Antikörper Sca - 1 bestückt sind. In der Zellsuspension mit den iPS - CM sollte das Signal des Antikörpers also entsprechend niedrig bis gar nicht gemessen werden können. Es wurde außerdem eine zusätzliche Negativ- Probe mit iPS - CM ohne Sca - 1 Antikörper mitgemessen. Der Sca - 1 Antikörper ist mit R - PE (R- phycoerythrin), einem im längerwelligen Bereich emittierenden Fluoreszenzfarbstoff, konjugiert, wobei diese Emission im MACSQuant® Analyzer 10 mittels Durchflusszytometrie gemessen und der Anteil an mMSCs in den iPS - CM bestimmt werden kann.

Nach der Zelltrennung im *autoMACS*® wurden die iPS - CM herunterzentrifugiert (10min; $300\text{ }g$; 4°C) und anschließend in $200\text{ }\mu\text{l}$ Zellwash mit 3% FBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in zwei FACS- Röhren gleichmäßig aufgeteilt. In das eine FACS- Röhren wurden Sca - 1 Antikörper hinzugefügt und gut durchmischt. Nach einer Inkubationszeit (20 min; $8\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurden die beiden Gefäße mit Zellwash und 3% FBS gewaschen, herunterzentrifugiert (10 min; $300\text{ }g$; 4°C), erneut in $400\text{ }\mu\text{l}$ Zellwash und 3% FBS resuspendiert und im MACSQuant® Analyzer 10 analysiert. Je Probe wurden 10 000 Zellen untersucht, anschließend wurden manuell R – PE positive Zellen gegatet, sodass anhand dieser Unterteilung eine prozentuale Angabe der Sca - 1 Antikörper tragenden Zellen ausgewertet wurde.

3.2.10 Färbung des Aktin-Zytoskeletts und Quantifizierung der Zellgröße

Um histologisch eine Hypertrophie der mit PE behandelten HL - 1- und iPS - CM- Zellen darstellen zu können, wurden die Zellen mit einer 4',6-Diamidin - 2 - phenylindol (DAPI) und Alexa Fluor 555 Phalloidin Färbelösung behandelt. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI, dessen Emission im kurzwelligen, bläulichen Bereich liegt, lagert sich vorzugsweise an doppelsträngiger DNA an und sorgt so für die Darstellung des Zellkerns unter dem Mikroskop. Alexa Fluor 555 Phalloidin emittiert hingegen im längerwelligen Bereich. Phalloidin, welches aus dem Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*) extrahiert wird, bindet an die F- Aktinfilamente der Zellen. Durch diese Bindung werden die Filamente stabilisiert und ihre Polymerisation unterbunden. Aktin bildet einen Teil des Zytoskeletts der Zelle und ist für deren mechanische

Stabilität und den Transport innerhalb der Zelle zuständig. Durch den Immunfluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 555 Phalloidin, welcher an das Phalloidin gekoppelt ist, können die Aktinfilamente sichtbar gemacht werden.

Für die Histologie wurden je 10.000 HL - 1 und 10.000 iPS - CM auf Deckgläschen in 12-Well-Platten ausgesät und nach 24 h Inkubation mit 100 µM PE behandelt. Nach 24 h Inkubation wurden die Deckgläschen zweifach in den Wells mit DPBS gewaschen und anschließend in eine Dunkelkammer überführt. Auf jedes Deckgläschen wurden 200 µl 3,7 % PFA in DPBS gegeben und für 10 min inkubiert. Es folgte eine 4 min Inkubation mit 200 µl 0,1 % Triton - X in DPBS, vor und nach der Inkubation wurden die Deckgläschen erneut zweifach mit DPBS gewaschen. Danach folgte eine Inkubation für 20 min mit 200 µl 1 % BSA in DPBS. Nach diesem Schritt wurden 200 µl Färbelösung aus 193 µl 1% BSA in PBS, 5 µl Phalloidin und 4 µl DAPI (1 µg/ml) auf die Deckgläschen aufgebracht, erneut 20 min inkubiert und anschließend zweifach mit DPBS gewaschen. Zur Platzierung des Deckgläschen wurde auf jeden Objektträger vorab ein Tropfen Dako Mounting Medium gegeben. Die fertigen Präparate wurden dann bei 4°C gelagert.

Die Untersuchung am Mikroskop Eclipse Ti- E mittels des Programms NIS Elements fand nach 24 h Inkubation statt. Je nach Zelldichte und Lage der Zellen wurden pro Versuch 20-25 Bilder gemacht und je Bild die Größe von 10-20 Zellen quantifiziert. Mit Hilfe des Programms konnten so mindestens hundert Zellen pro Präparat auf ihre Zellgröße hin untersucht werden.

3.2.11 RNA- Isolation mittels Trizol

Für eine spätere Verwendung der mRNA in der Real-time PCR wurde die Phenol- Chloroform- Extraktion von Piotr Chomczynski und Nicoletta Sacchi genutzt - diese basiert auf den unterschiedlichen Löslichkeiten von RNA, DNA und Proteinen.¹²⁶ Den noch gefrorenen Proben wurde zu Beginn je 800 µl Trizol hinzugefügt und das Zellpellet durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren homogenisiert und inkubiert (5 min; RT). Dieser Schritt dient der Zellyse durch das im Trizol enthaltene Guanidiniumthiocyanat, zusätzlich werden verschiedene Enzyme inaktiviert. So wird unter anderem verhindert, dass die RNA weiterverdaut wird. Neben dem Guanidiniumthiocyanat ist in dem Trizol Phenol enthalten, welches Proteine denaturiert und die RNA löst, indem es bei saurem pH Protonen an die sauren Phosphatgruppen von DNA und RNA anlagert. Bei der doppelsträngigen DNA kommt es so zu einem Ladungsausgleich. Da bei der Einzelstrang-RNA sowohl negative Phosphatgruppen als auch positive Basen vorliegen, kommt es durch die Anlagerung der Protonen zu einem positiven Ladungsüberschuss, sodass Wassermoleküle eine Hydrathülle um die RNA bilden können. Dadurch wird die RNA im Gegensatz zur DNA hydrophil. Im nächsten Schritt wurde zum Vollziehen der Phasentrennung 160 µl Chloroform zugesetzt, 15 sec kräftig geschüttelt, inkubiert (3 min; RT) und zentrifugiert (10 min; 12.000 \bar{g} ; 4 °C). Das

Chloroform trägt zur Denaturierung der Proteine bei und sorgt für eine optimalere Trennung von wässriger, inter- und organischer Phase. Die entsprechende Phasentrennung ist in **Abbildung 3.5** schematisch dargestellt.

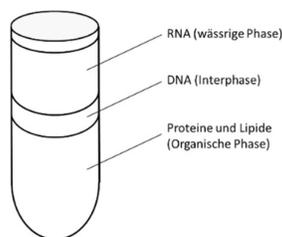


Abbildung 3.5: Phasentrennung nach Hinzugabe von Trizol und Zentrifugation (10 min; 12.000 \vec{g} , 4°C)

Im nächsten Schritt wurde die wässrige Phase mit der RNA sorgfältig in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 400 μ l Isopropanol versetzt, erneut vermischt, inkubiert (10 min; RT), zentrifugiert (10 min; 12.000 \vec{g} ; 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Isopropanol fällt die RNA aus der wässrigen Phase aus und die RNA liegt als geleeartiges Pellet vor. Das Pellet wurde dreimal mit 800 μ l 75 %- Ethanol gewaschen, mittels Vortex vermischt, zentrifugiert (5 min; 7500 \vec{g} ; 4 °C) und der Überstand sorgfältig entfernt. Zum Abschluss wurde das Pellet unter der Sicherheitswerkbank für 20 min getrocknet, mit 15 μ l RNase/ DNase freiem Wasser resuspendiert und inkubiert (10 min, 60 °C). Nach kurzer Zentrifugation kann die RNA bei - 80°C gelagert werden.

3.2.12 RNA- Isolation mit Hilfe des RNeasy Mini Kit von Qiagen

Zur Gewinnung von RNA für Microarray- Analysen wurde das RNeasy Mini Kit verwendet. Das Zellpellet wurde langsam aufgetaut und 350 μ l RLT- Buffer hinzugefügt. Mittels Kanülen (20 G) wurden die Proben durch Auf- und Abziehen homogenisiert. Nach einer Inkubation für 20 min bei RT wurden 350 μ l 70 % Ethanol hinzugefügt und durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt. Die RNeasy Säulen wurden in einem Auffanggefäß platziert und das Zelllysate mittig und ohne die Membran zu beschädigen auf die Membran pipettiert. Anschließend wurde das Zelllysate abzentrifugiert (15 s, 8000 \vec{g}) und der Durchfluss verworfen. Als nächstes folgten zwei verschiedene Waschschrte, wobei der erste ein Pipettieren des Buffer RW1 auf die Membran sowie ein erneutes Zentrifugieren (15 s, 8000 \vec{g}) und ein anschließendes Verwerfen des Durchflusses beinhaltete. Im zweiten Waschschrte wurden 500 μ l RPE- Buffer auf die Säulen pipettiert, zentrifugiert (2 min; 8000 \vec{g}) und der Durchfluss verworfen. Dieser Waschschrte wurde dreimal wiederholt, um Verunreinigungen der Proben mit Alkohol vorzubeugen. Danach wurde die Säule in ein neues Auffanggefäß platziert und zentrifugiert (1 min, U_{max}). Anschließend wurde die Säule in ein neues Auffanggefäß gesetzt und 30 μ l RNase/ DNase freies Wasser auf die Membran pipettiert. Nach einer Inkubation von 2 min wurde die Säule zentrifugiert (1 min; 8000 \vec{g}). Die in dem entstandenen Eluat befindliche RNA-

Konzentration kann dann am NanoDrop™ gemessen werden. Bei zu geringer RNA Konzentration wurde das Eluat erneut auf die Membran pipettiert und abzentrifugiert.

3.2.13 DNase- Vorbehandlung von RNA

Vor Umschreiben der RNA in cDNA wurde sie mit Hilfe von DNase von DNA befreit. Die Aufreinigung erfolgte durch das *DNA-free™ Kit*, 10 µl des RNA-Eluat aus der Isolation mit Trizol wurde mit 1 µl DNase I Buffer (10x) und 1 µl DNase versetzt, gemischt und inkubiert (30 min; 37 °C). Im nächsten Schritt wurde 1 µl DNase Inactivation Reagent hinzugefügt, gemischt, inkubiert (2 min; RT), erneut gemischt und zentrifugiert (90 s; 10000 \vec{g} ; 4 °C). Der Überstand, in dem die RNA enthalten ist, wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.14 RNA Konzentrationsmessung

Bevor die RNA in cDNA umgeschrieben werden kann, muss die RNA Konzentration am Thermo Scientific™ NanoDrop™™ 2000 / 2000c photometrisch gemessen werden. Der NanoDrop™™ misst die optische Dichte bei 260 nm, Absorptionsmaximum für RNA und DNA, und bei 280 nm, Absorptionsmaximum für Proteine. Eine optische Dichte von 1 entspricht bei 260 nm 40 µg/ ml RNA, diese Konstante wird als Wert in die Berechnung mit einbezogen. Aus der Absorption und der Konstanten (40 µg/ ml) kann so die RNA- Konzentration errechnet werden.

$$c = Extinktion_{260 \text{ nm}} \times 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$$

Formel 3.2: Berechnung der RNA Konzentration

Durch die zusätzliche Bestimmung der Extinktion bei 280nm kann bestimmt werden, inwieweit die Probe mit Proteinresten verunreinigt ist. Der Quotient aus 260/ 280 Extinktion sollte möglichst nah an 2,0 und nicht unter 1,8 liegen, um die RNA in die real- time PCR einsetzen zu können. Zusätzlich berechnet der NanoDrop™™ den Extinktionsquotienten von 260/ 230, welcher anzeigt, ob es bei der Isolation eine Verunreinigung durch Alkohol gab.

3.2.15 RNA- Aufreinigung mittels Ethanol-Fällung

Die RNA- Aufreinigung mittels Fällung ist eine effiziente Methode, um kurze und lange RNA mit Hilfe von Ethanol erneut zu fällen und dabei aufzureinigen. Dafür wurde den Proben zu Beginn 50 µl RNase/ DNase freies Wasser hinzugefügt und anschließend mit 0,1 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumen 100% EtOH vermischt. Nach 24 h Inkubation bei -20 °C wurden die Proben zentrifugiert (15 min; 12.000 \vec{g} ; 4 °C), der Überstand abgenommen und das Pellet in zwei Waschschritten mit jeweils 2,5 Volumen 75% EtOH versetzt und erneut abzentrifugiert (2 min; 12.000 \vec{g} , 4 °C). Nachdem das Pellet bei RT getrocknet war, wurde es in 15 µl RNase/DNase freiem Wasser resuspendiert und am NanoDrop™ erneut die Konzentration und die Reinheit kontrolliert.

3.2.16 RNA- Aufreinigung mit Hilfe des NucleoSpin® RNA Clean-up

Da für die spätere Microarray- Analyse die Reinheitswerte der RNA Proben für den 260/ 230 Wert über 1,5 und für den 260/ 280 Wert möglichst um 2,0 liegen sollten, wurde die RNA mit dem *NucleoSpin® RNA Clean- up* zusätzlich aufgereinigt.

Die Proben wurden dann mit 100 µl RNase freiem Wasser aufgefüllt und ein Lyse- Binde Puffer Vormix aus pro Probe 300 µl Buffer RA1 und 300 µl 100 % Ethanol erstellt, zur Probe hinzugefügt und vermischt. Dann wurde jedes Lysat auf eine NucleoSpin® RNA Clean- up Säule pipettiert. Die Säule wurde anschließend auf einem Sammelgefäß platziert, zentrifugiert und auf ein neues Sammelgefäß platziert. Um die Säule von Alkoholresten zu befreien, wurden zwei Waschschriffe mit dem Buffer RA3 angeschlossen. Hierfür wurden zuerst 700 µl Buffer RA3 auf die Säule gegeben, zentrifugiert (30 sec; 8.000 \vec{g} ; 4 °C) und der Überstand verworfen. Im zweiten Waschschriff wurden 350 µl Buffer RA3 auf die Säule gegeben, zentrifugiert (2 min; 8.000 \vec{g} ; 4 °C) und die Säulen danach auf ein neues Sammelgefäß platziert und für 3 min mit offenem Deckel getrocknet. Abschließend wurde auf die Säule 40 µl RNase freies Wasser gegeben und zentrifugiert (1 min; 8.000 \vec{g} ; 4 °C). Von dem Eluat wurde erneut die RNA Konzentration gemessen und die Reinheitswerte bestimmt (3.2.14 RNA Konzentrationsmessung).

3.2.17 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription der mRNA in komplementäre DNA (cDNA) wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* verwendet. Es wurden 200 ng RNA umgeschrieben. Die Probe wurde im Vorfeld auf 20 ng/ µl verdünnt. Jeweils 10 µl dieser Verdünnung wurden in ein PCR *Soft Tube* gegeben und ein Mastermix entsprechend der umzuschreibenden Anzahl an Proben angesetzt:

RNase freies Wasser	4,2µl
RT Buffer (10x)	2,0µl
dNTP Mix (25x)	0,8µl
Random Primers (10x)	2,0µl
Multiscribe™ Reverse Transkriptase	1,0µl
Gesamtmenge	10µl

Tabelle 3.1: Mastermix für je eine Probe der reversen Transkription

Pro Probe wurden 10 µl des Mastermixes hinzugefügt, die Proben mit Hilfe des Vortex gemischt und bei U_{max} für einige Sekunden herunterzentrifugiert. Die Umschreibung der RNA in cDNA im Veriti® Thermal Cycler lief unter folgenden Bedingungen:

25°C	10 min
37°C	120 min

85°C	5 min
4°C	Ende

Tabelle 3.2: Reaktionsbedingungen für das Umschreiben der RNA in cDNA

Im Anschluss an das Umschreiben wurden die cDNA- Proben herunterzentrifugiert (30sec; U_{max}) und dann bei -20°C gelagert.

3.2.18 Real-Time quantitative PCR (qPCR)

Die Methode der *Polymerase-Chain-Reaction* (PCR) wird genutzt, um bestimmte Gensequenzen der cDNA zu amplifizieren. Für diese Vervielfältigung muss die genaue Gensequenz bekannt sein, damit entsprechende Primer, die komplementär zum Beginn der entsprechenden Sequenz sind, eingesetzt werden können. Die cDNA der Proben dient als Template für die Reaktion und wird amplifiziert. Zu Beginn der PCR wird die doppelsträngige DNA bei 95 °C in zwei Einzelstränge denaturiert. Beim anschließenden Anealing, welches bei 60 °C stattfindet, kommen dann die Primer zur Wirkung und markieren den Genabschnitt, der von der hitzestabilen Polymerase repliziert werden soll. Die Elongation durch die Polymerase findet an beiden Einzelsträngen der DNA statt, es kommt zur Verdopplung des entsprechenden DNA- Abschnitts.

Das Besondere an der hier verwendeten *Real- Time quantitative* PCR (q PCR) ist, dass wie bei einer herkömmlichen PCR DNA amplifiziert wird, zusätzlich kann aber auch eine Quantifizierung der DNA vorgenommen werden. Die Quantifizierung basiert auf der Messung von Fluoreszenz während der exponentiellen Phase der PCR, da hier die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen. Dabei nimmt der Fluoreszenzgehalt proportional mit den enthaltenen PCR- Produkten zu. Im Anschluss an einen PCR- Lauf, der aus mehreren Zyklen besteht, wird mittels der Fluoreszenzsignale die Quantifizierung durchgeführt. Das zu messende Signal kommt dabei durch DNA- interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. in diesem Versuch SYBR- Green, zustande.

In dieser Arbeit wurde die Expression von NOR- 1 untersucht. Die relative Quantifizierung des Gens wird dabei im Vergleich zum *housekeeping* Gen 18 S durchgeführt. Aufgrund der suboptimalen Substrat/ Produktverhältnisse zu Beginn und zum Ende der Amplifikation ist nur die mittlere Phase mit einem exponentiellen und somit quantifizierbaren Bereich von Interesse. Um diesen Bereich zu definieren, wurde für die Berechnung eine Baseline und ein Cycle Threshold (Ct- Wert) berechnet. Den Proben aus der reversen Transkription wurden je 8,5 µl des Mastermixes (**Tabelle 3.3, Tabelle 3.4**) zugesetzt und die q PCR gestartet. Um die Expression des *NOR- 1* Gens zu untersuchen, wurden für *NOR 1* 2 ng (0,5ng/ µl) und für *18S* 0,08 ng (0,02 ng/ µl) der cDNA als Template- Konzentration in die RTq PCR eingesetzt. Aus den Verdünnungen wurden je 4 µl als Triplet für *NOR- 1* oder *18S* vorgelegt und zu jeder Probe 8,5µl des Mastermixes gegeben.

<i>PowerSYBR®Green</i> master mix	2x	6,250 µl
<i>Primer</i> F NOR- 1 (300 nM)		0,375 µl
<i>Primer</i> R NOR- 1 (300 nM)		0,375 µl
RNase/DNase freies Wasser		1,5 µl
Gesamtvolumen		8,5 µl

Tabelle 3.3: NOR- 1 Genexpression Mastermix

<i>PowerSYBR®Green</i> master mix	2x	6,250 µl
<i>Primer</i> F 18S (10µM)		0,125 µl
<i>Primer</i> R 18S (10 µM)		0,125 µl
Nuklease-freies Wasser		2,0 µl
Gesamtvolumen		8,5 µl

Tabelle 3.4: 18S Genexpression Mastermix

Die q PCR und deren Auswertung wurde mit Hilfe des StepOnePlus™ *Real- Time* PCR System von Applied Biosystems unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

10 Min	95 °C Enzymaktivierung	} 40 Zyklen
15 sec	95 °C Denaturierung	
60 sec	60 °C <i>Primer Annealing</i> und Elongation	

3.2.19 Microarray- Analyse

Die Microarray- Analyse wurde am Zentrum für Molekulare Medizin (ZMMK)/ Institut für Neurophysiologie von der AG Prof. A. Sachinidis Gene Expression Affymetrix facility mittels GeneChip™ Mouse Genome 430 2.0 Array von Thermo Fisher Scientific durchgeführt.

Für die Analyse wurden 2 µg isolierte und aufgereinigte RNA in 20 µl H₂O (100ng/µl-verdünnt) gelöst. Es wurden dem ZMMK Proben von HL - 1 und iPS - CM für die Analyse zur Verfügung gestellt, wobei es sich jeweils pro Zelllinie um eine Kontrolle und eine mit 100 µM PE behandelte Probe handelt. mRNA aus drei unabhängigen Versuchen wurde für die Microarray- Analysen gepoolt.

Bei der anschließenden Auswertung der veränderten Genexpression durch das Institut für Neurophysiologie wurde ein Fold Change von ≥ der 2-fachen Änderung der PE behandelten Zellen, HL - 1 und iPS - CM, zur unbehandelten Kontrollgruppe festgelegt.

3.2.20 Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung

Für die Proteinisolation wurde das bei -80 °C weggefrorene Zellpellet im vorgefertigten RIPA- Puffer (30µl) gelöst und mit Proteaseinhibitoren versetzt. Zur möglichst vollständigen Lyse

wurden die Proben mittels Vortex gemischt und je zehnmal 3 sec sonifiziert (UP50H Ultraschallprozessor mit Sonotrode MS1, Hielscher Ultrasonics). Anschließend wurde mit dem *Pierce™ BCA Protein Assay Kits* die Proteinkonzentration bestimmt. Die Ermittlung basiert auf zwei aufeinanderfolgenden chemischen Reaktionen. Die erste Reaktion, eine Biuret- Reaktion, geschieht durch die in der BCA Working Reagent enthaltenen Kupferionen. Die zweiwertigen Kupferionen reagieren im alkalischen Milieu mit je zwei Peptidbindungen der zu messenden Proteine zu einem Chelatkomplex. Dabei werden die Cu^{2+} - Ionen zu Cu^+ - Ionen reduziert und es kommt zum Farbumschlag zu blassblau. Die zweite Reaktion basiert auf der Komplexbildung von 2,2'Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (Bicinchoninsäure, BCA) aus der BCA Working Reagent mit den reduzierten einwertigen Kupferionen aus der Vorreaktion. Das Ergebnis der Reaktion ist ein photometrisch messbarer Farbwechsel zu dunkelviolet. Die in der Probe enthaltene Proteinkonzentration korreliert linear mit der absorbierten Farbtintensität bei 562nm.

Für die Proteinkonzentration wurden die Proben zunächst mit DPBS 1:6 verdünnt. Der Standard des Kits, der als Vergleichsreferenz mit aufsteigenden Konzentrationen von 0 bis 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pipettiert wurde, und je 10 μl der zu untersuchenden Probe wurden als Doppelbestimmung auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Nach Hinzufügen von 200 μl Working-Reagent pro Well wurde die Platte für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abkühlen der Platte auf RT kann die Intensität des Farbumschlags mittels photometrischer Absorptionsmessung bei 562 nm gemessen werden. Die gemessenen Absorptionswerte von der totalen Proteinkonzentration in den zu analysierenden Proben wurden mit den Werten des vordefinierten Standards, der als Eichkurve dient, verglichen und daraus berechnet.

3.2.21 Gelelektrophorese

Die SDS- Page (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) dient der Auftrennung von Proteinen gemäß ihrer Größe und Ladung im elektrischen Feld. Um dieses Verfahren durchführen zu können, wurden die Proben spezifisch aufbereitet und Polyacrylamidgele vorbereitet. Das für die Auftrennung verwendete SDS- Gel hat die Funktion eines molekularen Siebs, durch das die Proteine wandern. Das Gel besteht aus zwei Anteilen, dem Trenngel, (**Tabelle 3.5**), welches für die Proteinauftrennung zuständig ist und einem Sammelgel (**Tabelle 3.6**), in dessen Taschen die Proben zu Beginn aufgetragen wurden. Zuerst wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten pipettiert und mit 70% EtOH überschichtet. Nach 20 min wurde das EtOH entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel geschichtet. Zum Schluss wurde ein Gelkamm eingesetzt.

In der Mischung ist das 30 % Acrylamid mit dem Bestandteil Bisacrylamid für die Polymerisation und damit für die Starrheit und Porengröße des Gels zuständig. Die Trenneigenschaften des Gels werden bestimmt durch den Anteil an Acrylamid und

Bisacrylamid in der Ausgangsmischung und dem pH- Wert des verwendeten Puffers während der Elektrophorese. Tetramethylethyldiamin (TEMED) wirkt dabei als Katalysator der Reaktion und das Ammoniumpersulfat (APS) startet die Polymerisation. Für die Versuche wurden 10 %ige Polyacrylamidgele nach dem folgenden Schema gegossen:

30% Acrylamid	5 ml
H ₂ O	6,25 ml
4x Trenngelpuffer	3,75 ml
TEMED	20 µl
10% APS	50 µl

Tabelle 3.5: Trenngel für SDS- Page

30% Acrylamid	1300 µl
H ₂ O	6 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml
TEMED	20 µl
10% APS	50 µl

Tabelle 3.6: Sammelgel für SDS- Page

Für den Gellauf wurden 20 µg Protein je Tasche mit Laemmli-Puffer versetzt. Die Probenlösung wurde im Anschluss für 7 min bei 95 °C erhitzt. Das im Laemmli-Puffer enthaltene 20% Mercaptoethanol und die Wärmeenergie sind dafür zuständig, die Stabilitätsstrukturen der Proteine zu lösen, indem sie die Disulfidbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen der Proteine aufbrechen. Das im Laemmli Puffer im Überschuss enthaltene *sodium dodecyl sulfate* (SDS) ist ein anionisches Tensid, welches eine stark denaturierende Wirkung auf die Proteine hat. Zusätzlich bindet das SDS sehr effizient über hydrophobe Wechselwirkungen an den Proteinen und überlagert mit seiner negativen Ladung die Eigenladung der Proteine, sodass sich in der anschließenden Gelelektrophorese die Proteine proportional ihrer Größe bewegen und detektieren lassen, wobei die längeren Proteine langsamer und die kürzeren Proteine schneller durch das Gel wandern.

Nach der Vorbereitung der Proben und des Gels wurde die Gelelektrophorese im Mini Protean® Tetra Cell durchgeführt. Die Proben sowie der Roti®- Mark Western Protein Marker wurden in die vorgesehenen Taschen aufgetragen. Bis die Proteine durch das Sammelgel gewandert sind, erfolgt die Gelelektrophorese mit einer Spannung von 60 V, danach wurde eine Spannung von 130 V verwendet. Nach dem Durchlauf wurde das Trenngel vom Sammelgel abgetrennt und für 10 min in Transferpuffer äquilibriert.

3.2.22 Western Blot

Der Western Blot dient der Übertragung von den in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinen im Gel auf eine Trägermembran, z.B. einer Nitrocellulose-Membran, mit Hilfe eines elektrischen Feldes. Im Western Blot bewegen sich die negativ geladenen Proteine aus dem Gel von der Seite der Kathode senkrecht Richtung Anode, wo sich die Nitrocellulose-Membran befindet. Die Anlagerung der Proteine an der Nitrocellulosemembran erfolgt dabei durch ionische und polare Wechselwirkungen. Das Auftrennungsmuster der Proteine aus der SDS- Page wird beim Transfer auf die Trägermembran beibehalten.

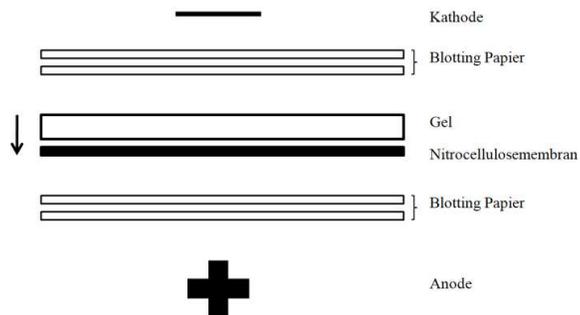


Abbildung 3.6: Aufbau des Transfers als schematische Darstellung

Der Transfer wurde mit dem Trans- Blot® Turbo™ Transfer System im *Semi-dry* Verfahren durchgeführt. Der Aufbau des Transfers ist schematisch in **Abbildung 3.6** dargestellt. Die Kassette wurde danach verschlossen, in den Trans- Blot® Turbo™ eingesetzt und der Transfer bei 25 V, 1 A für 45 min gestartet.

Direkt im Anschluss an das Blotten wurde zur Kontrolle des Proteintransfers die Membran mit Ponceau S für 5 min eingefärbt. Nachdem die Ponceau S Färbung vollständig mit Aqua dest. und Tris- buffered saline mit 0,1% Tween20 (TBS/T) abgewaschen wurde, kann mit der Immundetektion weitergemacht werden.

3.2.23 Immundetektion

Die Immunmarkierung erfolgte nach dem Antigen- Antikörper- Bindungs- Prinzip und kann so einzelne Proteine auf der Membran detektieren. Im ersten Schritt wurde die Membran mit dem primären monoklonalen (mouse) oder polyklonalen (rabbit) Antikörper inkubiert, der spezifisch an seinem Epitop, dem nachzuweisenden Protein, bindet. Im zweiten Schritt bindet ein sekundärer Antikörper an die Fc- Region des ersten Antikörpers, dieser zweite Antikörper dient der Detektion des Proteins über ein an ihn gebundenes Signalmolekül, das Enzym *horseradish peroxidase* (HRP). Bei der Detektion handelt es sich um eine Chemilumineszenz Reaktion (ECL), bei der das HRP die Oxidation des in der Entwicklerlösung enthaltenen Luminols katalysiert. Bei dieser Reaktion entsteht Chemilumineszenz, die mit Hilfe des

ChemiDoc™XRS *Gel Imaging* System visualisiert werden kann. Je höher der Proteingehalt in der Probe, desto stärker das Signal.

Für einen spezifischen Nachweis eines Antigens müssen zu Beginn die freien Bindungsstellen auf der Membran geblockt werden. Dafür wurde die Nitrocellulose-Membran je nach später verwendetem Primärantikörper mit 5 % Milchpulver oder 5 % BSA gelöst in TBS/T für 1 h bei RT geblockt. Im Anschluss an das Blocken erfolgte die Inkubation der Membranen über Nacht bei 4°C mit folgenden primären Antikörpern: NOR- 1, p-Akt, Mcl- 1, Cx 43, α SMA in einer Verdünnung von 1:1000 in TBS/T + 5% Milchpulver bzw. 5% BSA. Vor Zugabe des Sekundärantikörpers wurde die Membran gewaschen (dreimal 5 min in TBS/T). Danach folgte die Inkubation mit dem mit HRP-konjugierten Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in TBS/T für 1 h bei RT. Zur Darstellung des Roti®-Mark Western Protein Marker wurde zusätzlich Roti®-Mark Western HRP-Konjugat im Verhältnis 1:4000 hinzugefügt. Vor der anschließenden Detektion wurde die Membran 3 × mit TBS/T für jeweils 5 min gewaschen. Für die Proteindetektion wurden die Anteile A und B der Pierce® ECL Western Blotting Substrate nach Herstellerangaben im Verhältnis von 1:1 gemischt und die Nitrocellulose-Membran damit vollständig benetzt. Der Proteingehalt auf der Membran wurde dann mit Hilfe des ChemiDoc™XRS *Gel Imaging* System detektiert.

Um eine spätere relative Quantifizierung des Proteingehaltes zu ermöglichen, muss die Membran auf den Gehalt des jeweiligen *house-keeping* Gens untersucht werden. Für NOR- 1, Mcl- 1, Cx 43 und α - SMA ist das *house-keeping* Gen GAPDH, für p-Akt wurde auf den Gehalt von Akt überprüft. Zuvor wurde die Membran mittels „Blot-Stripping“ (siehe 3.2.24) vorbereitet. Danach folgte ein erneutes Blocken der Membran mit 5% BSA in TBS/T bzw. 5% Milch in TBS/T für 1h. Es folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in 3% BSA in TBS/T (GAPDH) und 5% BSA in TBS/T (Akt) über Nacht bei 4 °C und anschließend mit den entsprechenden sekundären Antikörpern.

3.2.24 Blot- Stripping

Bevor die Detektion eines weiteren Gens stattfinden kann, muss die Nitrocellulose- Membran von den schon gebundenen Antikörpern befreit werden. Das sogenannte „*Stripping*“ der Membran erfolgte in 40 ml Stripping Puffer, der mit 312 μ l Mercaptoethanol versetzt ist, für 20 min bei 60 °C im Wasserbad. Anschließend wurde die Membran dreimal 5 min mit DPBS und einmal 5 min in TBS/T gewaschen. Anschließend kann die Membran für eine weitere Detektion geblockt und mit neuem Antikörper inkubiert werden.

3.2.25 Statistik

Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Die graphische Darstellung und statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism Version 5. Mindestens drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt.

Zur interferenzstatistischen Beurteilung wurde bei normalverteilten Werten der t-Test angewendet. Ein Unterschied wurde als signifikant erachtet bei Testergebnissen von $p < 0,05$ und wie folgt benannt $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, # $p < 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Hypertrophieinduktion in HL - 1 Zellen und iPS - CM

Zur Untersuchung der Hypertrophieinduktion wurde die HL - 1 Zellreihe von W. Claycomb verwendet.

Die in dieser Arbeit für die Hypertrophieinduktion genutzten HL - 1 Zellen wurden im flüssigen Stickstoff gefroren gelagert und für die jeweiligen Versuche aufgetaut. Eine primäre Kultivierung fand in dem HL - 1 spezifischen Vollmedium statt, wohingegen zur Durchführung des Versuchs vorab eine Kultivierung über 24 h in Magermedium stattfand. Zur Induktion der Hypertrophie wurde anschließend die Kultivierung und Behandlung der HL - 1 Zellen für weitere 24 h mit L-Phenylephrin (PE, 100 μ M), einem direkten Sympathomimetikum durchgeführt.

Neben den HL - 1 Zellen wurde die Hypertrophieinduktion ebenfalls an murinen iPS - CM vorgenommen.

Die Kultivierung der iPS - CM erfolgte im entsprechenden Vollmedium. Zum Versuchsstart fand die initiale Kultivierung ebenfalls über 24h in Magermedium statt. Im Anschluss wurde zur Hypertrophieinduktion L-Phenylephrin (PE, 100 μ M) hinzugegeben sowie eine Kultivierung für weitere 24h fortgeführt.

Um die Hypertrophie in den Zellreihen zu visualisieren sowie zur Quantifizierung der induzierten Hypertrophie, wurden je 10.000 HL - 1 und 10.000 iPS - CM auf Deckgläschen in 12- Well Platten ausgesät, nach 24 h Inkubation in Magermedium mit 100 μ M PE behandelt und nochmals 24 h inkubiert.

Nach Durchführung der Hypertrophieinduktion kam es bei den HL - 1 Zellen durch die Behandlung mit 100 μ M PE zu keiner signifikanten Zunahme der Zellgröße. Es konnte eher eine Abnahme der Zellgröße beobachtet werden (**Abbildung 4.1 A und B**). Im Gegensatz dazu führte eine Hypertrophieinduktion mit PE über 24 h in der Zellreihe der iPS - CM zu einer signifikanten Größenzunahme der Zellen (**Abbildung 4.1 C und D**).

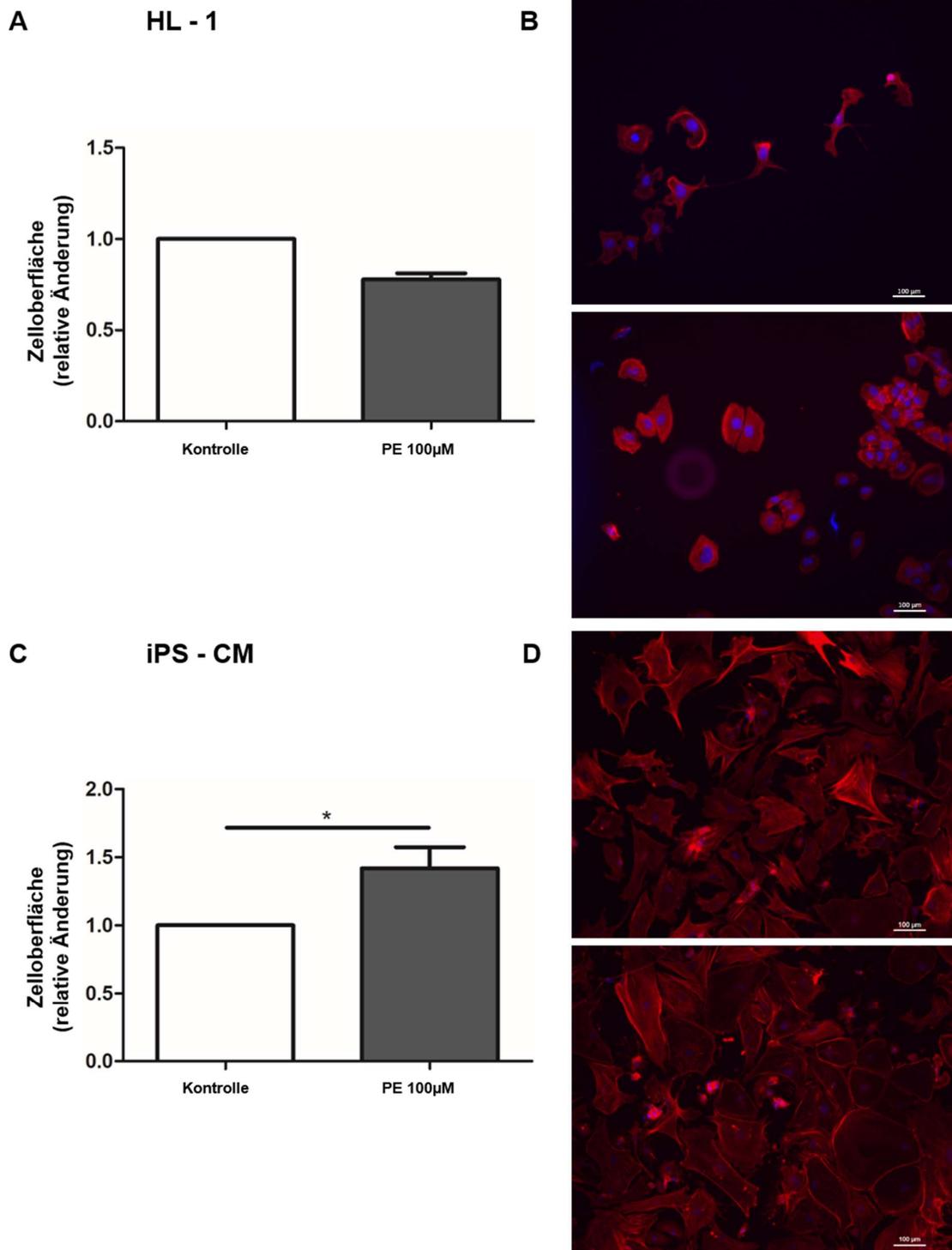


Abbildung 4.1: Hypertrophieinduktion in HL - 1 Zellen und iPS - CM.

(A) Quantifizierung der HL - 1 Zellgröße anhand der Zelloberfläche mittels histologischer Färbung von F-Aktin (100 µM PE behandelte HL - 1 Zellen versus unbehandelte Kontrollprobe), n = 4. **(B)** Exemplarische Darstellung der Histologie der HL - 1 Zellen als Kontrolle ohne Behandlung (oben) und nach 24 h Kultivierung mit 100 µM PE (unten), Maßstabsleiste 100 µm. **(C)** Quantifizierung der Zellgröße der iPS - CM anhand der Zelloberfläche mittels histologischer Färbung von F-Aktin (100 µM PE behandelte iPS - CM versus unbehandelte Kontrollprobe) n = 8,

*p<0,05. **(D)** Exemplarische Darstellung der Histologie der iPS - CM als Kontrolle ohne Behandlung (oben) und nach 24 h Kultivierung mit 100 µM PE (unten), Maßstabsleiste 100 µm.

4.2 Effekt der Hypertrophieinduktion auf die Apoptoserate der HL - 1 Zellen und iPS - CM

Zum Ausschluss eines frühen programmierten Zelltods durch das zur Hypertrophieinduktion verwendete Phenylephrins wurde bei beiden Zellreihen eine Untersuchung des apoptotischen Zellanteils mittels Durchflusszytometrie durchgeführt.

Um die Auswirkung der Hypertrophieinduktion mittels PE auf die Apoptoserate der HL - 1 Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen für 24 h mit 100 µM PE kultiviert. Nach der 24- stündigen Inkubationszeit wurde die Apoptoserate der HL - 1 Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht. In den Kontrollen zeigte sich eine durchschnittliche Apoptoserate von $2,73 \pm 0,9\%$, in den mit PE behandelten Zellsuspensionen eine Rate von $3,23 \pm 1,72\%$. Zwar kam es bei der Behandlung mit 100 µM PE zu einer leichten Erhöhung der Apoptoserate, allerdings stellte sich diese als nicht signifikant dar (**Abbildung 4.2 A und B**). Wie bei den HL - 1 Zellen wurde auch bei den iPS - CM die Apoptoserate nach einer Inkubationszeit von 24 h mit 100 µM PE im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle mittels FACS-Analyse untersucht und anschließend mit der Datenverarbeitungssoftware BD CellQuestPro™ ausgewertet. Insgesamt zeigt sich bei beiden Proben, Kontrolle und mit PE- behandelten iPS - CM, eine höhere Apoptoserate als bei den HL - 1 Zellen. Der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen lag in den Kontroll suspensionen bei $18,83 \pm 2,69\%$ und in den mit PE behandelten Zellen bei $18,35 \pm 1,63\%$. Im Vergleich zur Kontrolle zeigt sich jedoch kein Anstieg der gemessenen „events“ im subG1 Bereich als Maß für eine erhöhte Apoptoserate nach der Behandlung mit 100 µM PE (**Abbildung 4.2 C und D**).

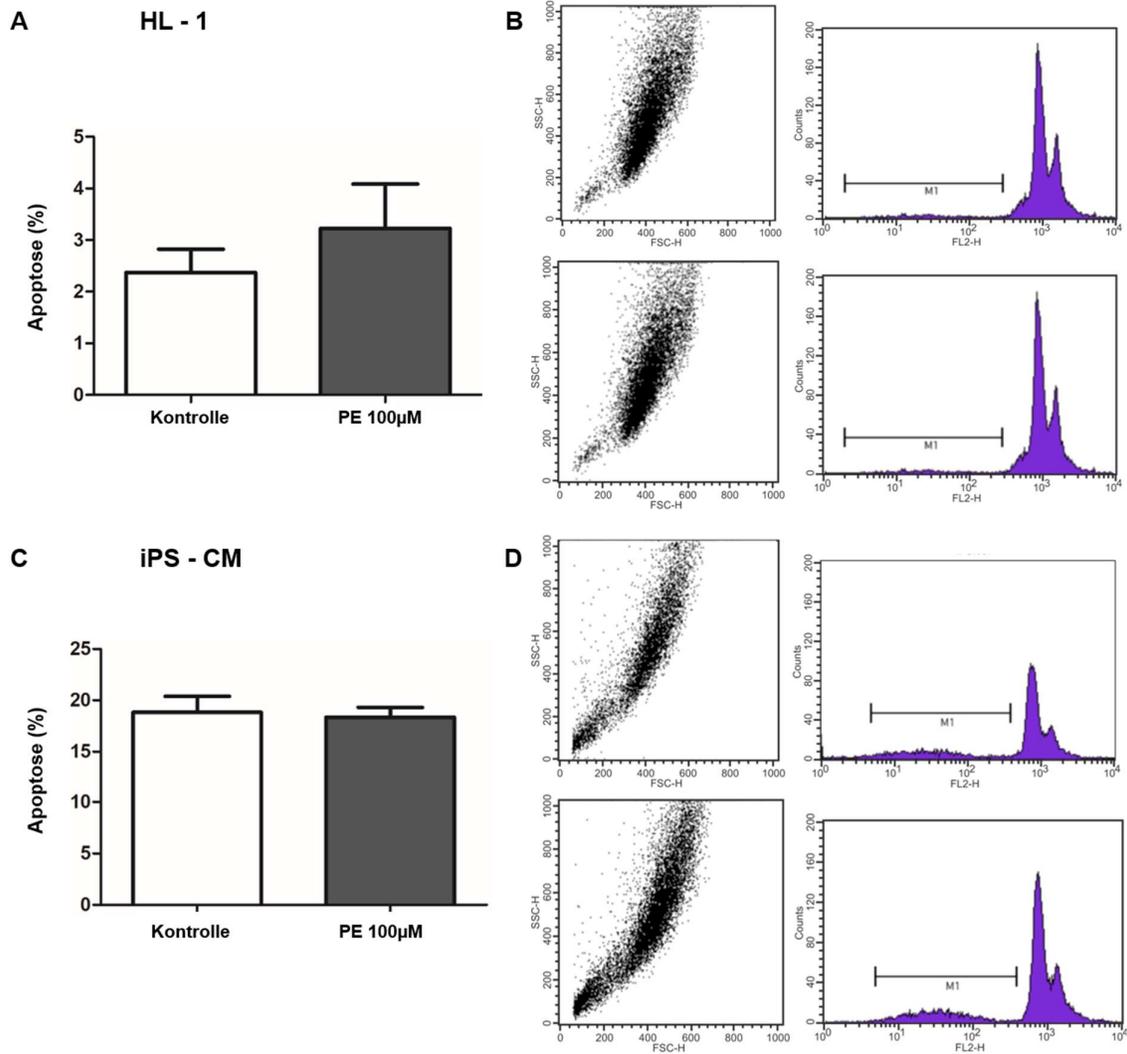


Abbildung 4.2: Bestimmung der Apoptoserate nach Hypertrophieinduktion in HL - 1 Zellen und iPS - CM. **(A)** Mittels FACS- Analyse ermittelte prozentuale Apoptoserate in der Kontrollzellsuspension sowie der mit 100 µM PE behandelten Zellsuspension der HL - 1 Zellen (n = 5). **(B)** Exemplarische Darstellung der graphischen Quantifizierung der Apoptoserate der unbehandelten HL - 1 Zellen als Kontrolle (oben) und nach Behandlung mit PE 100µM (unten) im Dot Plot und Histogramm. **(C)** Mittels FACS- Analyse ermittelte prozentuale Apoptoserate in der Kontrollzellsuspension sowie der mit 100 µM PE behandelten Zellsuspension der iPS - CM (n = 4). **(D)** Exemplarische Darstellung der graphischen Quantifizierung der Apoptoserate der unbehandelten iPS - CM als Kontrolle (oben) und nach Behandlung mit PE 100µM (unten) im Dot Plot und Histogramm.

4.3 Hypertrophieinduzierte Veränderung der Protein- und Genexpression in HL - 1 und iPS - CM

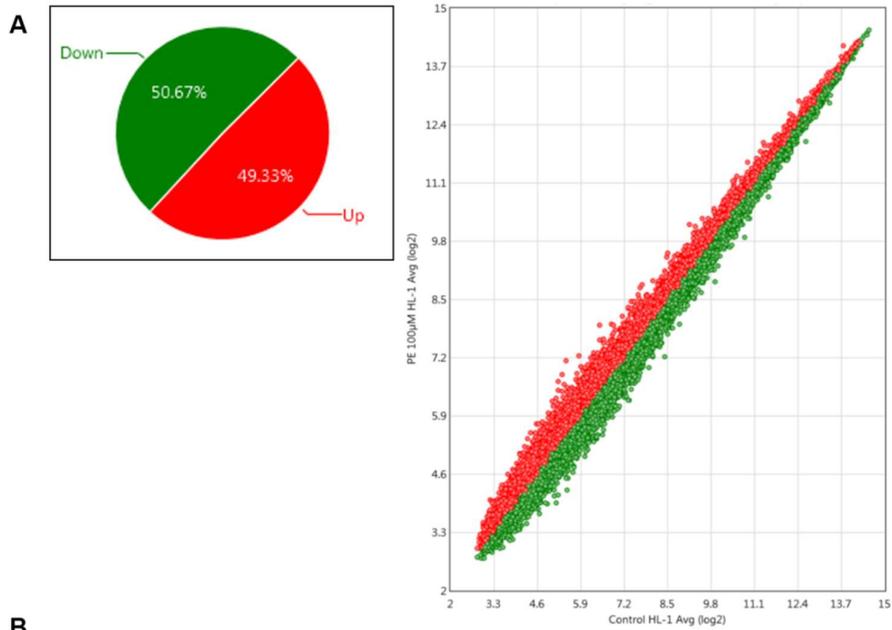
4.3.1 Identifizierung von hypertrophieinduzierten Faktoren in HL - 1 und iPS - CM

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Biomarker pAkt und α - SMA in hypertrophierten Zellen hochreguliert werden. pAkt, als Teil des PI3K-Akt Signalwegs, sorgt unter anderem für das

Herzwachstum und die myokardiale Angiogenese. Die Aktivierung von Akt fördert kurzfristig die physiologische Hypertrophie, während die langfristige Aktivierung zu pathologischer Hypertrophie und Herzversagen führt.¹²⁷ α -SMA wird normalerweise in sich differenzierenden Kardiomyozyten exprimiert. Die Expression in adulten Herzen gilt als Marker für eine Myokardhypertrophie.¹²⁸ Im Gegensatz dazu ist in der Literatur belegt, dass die Biomarker Cx43 und Mcl-1 in hypertrophierten Kardiomyozyten herunterreguliert sind. Die Cx43 Expression zeigt sich insbesondere in ischämischen und hypertrophierten Kardiomyozyten verringert und auch der Verlust von Mcl-1 steht im Zusammenhang mit einem schnellen voranschreitenden Herzversagen.^{129, 130} Somit sind alle vier Biomarker bereits mit kardialer Hypertrophie in Verbindung gebracht worden. Bislang sind jedoch in der Literatur keine hypertrophiespezifischen Marker für murine iPS - CM beschrieben worden.

Um weitere hypertrophie-regulierte Marker zu identifizieren wurden in den hypertrophierten HL - 1 Zellen und iPS - CM Transkriptomanalysen durchgeführt.

Diese haben gezeigt, dass in HL - 1 Kardiomyozyten ungefähr die Hälfte aller untersuchten Gene durch PE hochreguliert (49,33 %) und die andere Hälfte (50,67 %) herunterreguliert wurde. Wie in **Tabelle 4.1** dargestellt, zeigte sich bei den untersuchten Genen eine maximale relative Änderung von -2,36 für das Gen *establishment of cohesion 1 homolog 2 (S. cerevisiae)* (*Esco2*) und 2,35 für das Gen *coiled-coil domain containing 186 (Ccdc186)*.



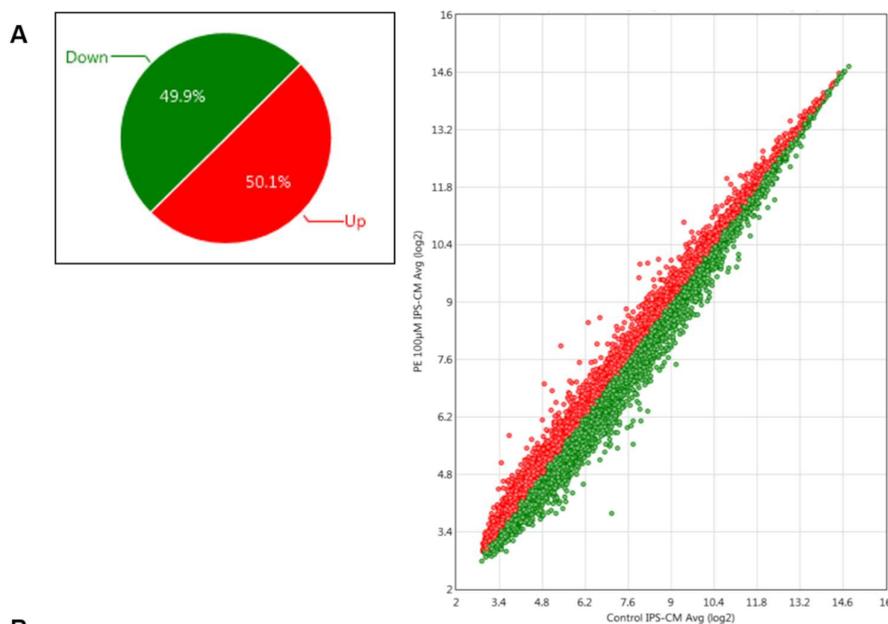
PE 100 µM HL - 1 Avg (log2)	Control HL - 1 Avg (log2)	Fold Change	Gensymbol	Beschreibung
4,24	5,48	-2,36	Esco2	establishment of cohesion 1 homolog 2 (S. cerevisiae)
7,23	8,43	-2,29	Serinc3	serine incorporator 3
3,97	5,15	-2,27	Tdrd3	tudor domain containing 3
6,26	7,34	-2,12	Elf1	E74-like factor 1
6,26	7,32	-2,1	Kpnb1	karyopherin (importin) beta 1
4,15	5,21	-2,09	Serpinb9	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 9
5,48	6,54	-2,08	Ercc6l	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency complementation group 6 like
5	6,02	-2,03	Setd5	SET domain containing 5
8,89	9,91	-2,02	Cyr61	cysteine rich protein 61
4,52	5,53	-2,01	Rp2	retinitis pigmentosa 2 homolog (human)
10,17	9,16	2,01	Slc38a3	solute carrier family 38, member 3
7,61	6,59	2,02	Gm19313	predicted gene, 19313
7,3	6,28	2,03	Scly	selenocysteine lyase
6,84	5,77	2,1	Bcl2	B cell leukemia/lymphoma 2
7,59	6,51	2,11	Kif6	kinesin family member 6
5,38	4,3	2,12	Tmem209	transmembrane protein 209
7,94	6,82	2,17	Itga10	integrin, alpha 10
6,3	5,15	2,22	Zak	sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK
5,72	4,57	2,23	Gnat1	guanine nucleotide binding protein, alpha transducing 1
6,46	5,23	2,35	Ccdc186	coiled-coil domain containing 186

Tabelle 4.1: Transkriptomanalyse hypertrophieregulierter Gene in HL - 1 Kardiomyozyten.

(A) Im Kreisdiagramm dargestellter prozentualer Anteil der hochregulierten Gene in rot (49,33%) und der herunterregulierten Gene in grün (50,67%). Daneben die Genänderung als logarithmische Darstellung (avg log₂) der PE behandelten Zellen auf der Y- Achse versus die unbehandelte Kontrolle auf der X- Achse im Streudiagramm.

(B) Tabellarische Darstellung der hoch- und herunterregulierten Gene der mit 100 µM PE behandelten HL - 1 Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe aus der Micro- Array Analyse mit einem Fold Change von < -2 und > 2.

In der Microarray-Analyse der iPS - CM zeigte sich eine Vielzahl an Genen, die durch PE reguliert wurden. Wie bei den HL - 1 Zellen wurde bei iPS - CM die Hälfte (50,1%) aller untersuchten Gene durch PE hoch-, die andere Hälfte (49,9%) herunterreguliert. Insgesamt stellt sich bei den untersuchten iPS - CM eine maximale relative Änderung von -9,27 für das Gen *early growth response 3 (Egr3)* und 5,78 für das Gen *Nr4a3 dar*, das für den neuron-derived orphan receptor 1 (Nor1) kodiert. Somit war Nr4a3 das am stärksten hochregulierte Gen mit einer beinahe 6-fachen Induktion in den mit PE-behandelten iPS-CM (**Tabelle 4.2**).



B

PE 100 µM iPS - CM Avg (log2)	Control iPS - CM Avg (log2)	Fold Change	Gensymbol	Beschreibung
3,84	7,06	-9,27	Egr3	early growth response 3
5,54	7,75	-4,64	Unc80	unc-80 homolog (C. elegans)
5,5	6,99	-2,82	Egr2	early growth response 2
5,54	7,03	-2,81	Figf	c-fos induced growth factor
3,97	5,47	-2,81	Olfm1	olfactomedin 1
4,13	5,56	-2,69	Skiv2l2	superkiller viralicidic activity 2-like 2 (S. cerevisiae)
4,36	5,78	-2,68	Vgll3	vestigial like 3 (Drosophila)
5,83	7,26	-2,68	Ccdc187	coiled-coil domain containing 187
6,53	7,94	-2,65	44808	septin 4
3,86	5,24	-2,61	Asb15	ankyrin repeat and SOCS box-containing 15
5,81	7,18	-2,59	Igfbp2	insulin-like growth factor binding protein 2
5,65	6,99	-2,53	Col8a1	collagen, type VIII, alpha 1
5,53	6,87	-2,53	Clca1; Clca3a1	chloride channel accessory 1; chloride channel accessory 3A1
6,58	7,89	-2,48	Map3k8	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8
4,25	5,52	-2,43	Edil3	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3

6,02	7,3	-2,43	ligp1	interferon inducible GTPase 1
7,34	8,61	-2,42	Socs3	suppressor of cytokine signaling 3
9,85	11,13	-2,42	Cpne5	copine V
7,07	8,34	-2,41	Lox	lysyl oxidase
4,13	5,38	-2,38	Asb14	ankyrin repeat and SOCS box-containing 14
6,08	7,32	-2,37	Ramp1	receptor (calcitonin) activity modifying protein 1
7,65	8,89	-2,37	Bgn	biglycan
5,83	7,07	-2,36	Frem1	Fras1 related extracellular matrix protein 1
7,54	8,78	-2,36	44808	septin 4
5,77	6,98	-2,31	Boc	biregional cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes (Cdon) binding protein
5,08	6,29	-2,31	Fam155a	family with sequence similarity 155, member A
4,4	5,59	-2,28	Cdc14a	CDC14 cell division cycle 14A
6,48	7,66	-2,27	Kctd12	potassium channel tetramerisation domain containing 12
8,69	9,87	-2,26	Zfp36	zinc finger protein 36
6,08	7,25	-2,26	Fbln5	fibulin 5
9,02	10,19	-2,25	Junb	jun B proto-oncogene
10,04	11,21	-2,24	Cyr61	cysteine rich protein 61
7,06	8,22	-2,24	Gucy1a3	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3
3,92	5,08	-2,23	Rufy3	RUN and FYVE domain containing 3
8	9,14	-2,21	Scn7a	sodium channel, voltage-gated, type VII, alpha
7,02	8,16	-2,21	Olfm1	olfactomedin 1
6,99	8,13	-2,2	Bgn	biglycan
6,06	7,2	-2,2	Adams5	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 5 (aggrecanase-2)
5,9	7,03	-2,19	Hmga2	high mobility group AT-hook 2
6,74	7,88	-2,19	Figf	c-fos induced growth factor
3,87	5	-2,18	Ano3	anoctamin 3
4,8	5,92	-2,18	Batf3	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3
5,85	6,96	-2,16	Kcnp2	Kv channel-interacting protein 2
8,27	9,37	-2,15	Atp1a2	ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 2 polypeptide
9,73	10,84	-2,15	Cyr61	cysteine rich protein 61
9,12	10,23	-2,15	Atp1a2	ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 2 polypeptide
7,42	8,51	-2,14	Pcdh17	protocadherin 17
5,95	7,05	-2,14	Figf	c-fos induced growth factor
5,37	6,46	-2,13	Angpt1	angiopoietin 1
8,21	9,3	-2,13	Col18a1	collagen, type XVIII, alpha 1
6,05	7,14	-2,12	Dpm1	dolichol-phosphate (beta-D) mannosyltransferase 1
7,92	8,99	-2,11	Socs3	suppressor of cytokine signaling 3
8,92	9,99	-2,1	Ptn	pleiotrophin
6,76	7,83	-2,1	Col8a1	collagen, type VIII, alpha 1
4,22	5,29	-2,1	Cdh11	cadherin 11
6,91	7,97	-2,09	Ssbp2	single-stranded DNA binding protein 2
9,83	10,89	-2,09	Gucy1a3	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3
8,41	9,47	-2,09	Cdh11	cadherin 11

4,16	5,22	-2,08	Ctla2a; Ctla2b	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha; cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 beta
5,6	6,66	-2,08	Tm4sf1	transmembrane 4 superfamily member 1
5,76	6,81	-2,07	Rgs4	regulator of G-protein signaling 4
4,48	5,53	-2,07	Socs2	suppressor of cytokine signaling 2
8,7	9,75	-2,07	Dlk1	delta-like 1 homolog (Drosophila)
7,85	8,9	-2,07	Kcnj3	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3
5,07	6,1	-2,05	Scn7a	sodium channel, voltage-gated, type VII, alpha
7,81	8,85	-2,05	4833420G17Rik	RIKEN cDNA 4833420G17 gene
6,68	7,71	-2,05	Rgs12	regulator of G-protein signaling 12
6,29	7,32	-2,04	Tuba8	tubulin, alpha 8
10,16	11,19	-2,04	Atp1a2	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide
4,55	5,58	-2,04	Parp8	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 8
4,2	5,22	-2,03	Prss35	protease, serine 35
8,07	9,08	-2,02	Scn7a	sodium channel, voltage-gated, type VII, alpha
6,62	7,63	-2,02	Fbln2	fibulin 2
6,16	7,17	-2,02	Fmod	fibromodulin
7,95	8,97	-2,02	Clec2l	C-type lectin domain family 2, member L
6,46	7,46	-2,01	Phkg1	phosphorylase kinase gamma 1
6,62	7,62	-2,01	Kcnd2	potassium voltage-gated channel, Shal-related family, member 2
5,45	6,46	-2,01	Ccdc187	coiled-coil domain containing 187
4,98	5,98	-2,01	Fmod	fibromodulin
3,79	4,8	-2,01	Shisa9	shisa family member 9
9,23	10,24	-2,01	Cdo1	cysteine dioxygenase 1, cytosolic
6,8	7,81	-2,01	Phkg1	phosphorylase kinase gamma 1
5,89	6,91	-2,01	Epb41l2	erythrocyte membrane protein band 4.1 like 2
6,23	7,23	-2	Ddit4l	DNA-damage-inducible transcript 4-like
7,26	8,26	-2	Maob	monoamine oxidase B
5,97	6,97	-2	Mmp2	matrix metalloproteinase 2
6,18	7,18	-2	Sema5a	sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembrane domain TM and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 5A
7,54	6,53	2,02	Spr1a	small proline-rich protein 1A
8,17	7,16	2,02	Synpo	synaptopodin
10,71	9,68	2,03	Olfml2b	olfactomedin-like 2B
10,01	8,99	2,03	Aqp4	aquaporin 4
9,86	8,83	2,04	Bdh1	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 1
8,49	7,46	2,04	Pmaip1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
6,23	5,2	2,04	Sox11	SRY (sex determining region Y)-box 11
8,77	7,75	2,04	Kdelr3	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3
6,51	5,49	2,04	Fkbp11	FK506 binding protein 11
8,3	7,26	2,06	Syt7	synaptotagmin VII
7,98	6,93	2,06	Synm	synemin, intermediate filament protein
6,73	5,69	2,06	Gp1bb	glycoprotein Ib, beta polypeptide

6,67	5,62	2,07	Bmp7	bone morphogenetic protein 7
4,44	3,38	2,08	Pcdh8	protocadherin 8
8,66	7,59	2,1	Rgs2	regulator of G-protein signaling 2
6,77	5,68	2,12	Fndc5	fibronectin type III domain containing 5
9,71	8,61	2,13	Slitrk4	SLIT and NTRK-like family, member 4
4,64	3,54	2,15	Pcdh8	protocadherin 8
6,79	5,67	2,17	Sox11	SRY (sex determining region Y)-box 11
9,55	8,42	2,19	Slc7a3	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 3
7,06	5,92	2,21	Rgs2	regulator of G-protein signaling 2
7,54	6,39	2,22	Bmp7	bone morphogenetic protein 7
5,43	4,28	2,22	Krt19	keratin 19
12	10,82	2,27	Emilin2	elastin microfibril interfacier 2
8,42	7,22	2,3	Rgs2	regulator of G-protein signaling 2
5,66	4,44	2,32	Greb11	growth regulation by estrogen in breast cancer-like
7,03	5,75	2,41	Slc16a3	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3
6,36	5,08	2,42	Ap1s3	adaptor-related protein complex AP-1, sigma 3
8,83	7,54	2,45	Aqp4	aquaporin 4
6,56	5,26	2,46	Mapk10	mitogen-activated protein kinase 10
6,12	4,8	2,5	Clic6	chloride intracellular channel 6
7,99	6,58	2,65	Alpl	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney
7,08	5,68	2,66	Dgkk	diacylglycerol kinase kappa
10,04	8,6	2,72	Cnn1	calponin 1
7,52	6,01	2,85	Slitrk4	SLIT and NTRK-like family, member 4
10,95	9,42	2,9	Scd1	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1
5,08	3,48	3,04	Ajap1	adherens junction associated protein 1
9,58	7,93	3,14	Fam46a	family with sequence similarity 46, member A
9,94	8,22	3,3	Nppb	natriuretic peptide type B
6,84	5,11	3,31	Dner	delta/notch-like EGF repeat containing
9,91	7,97	3,86	Inha	inhibin alpha
8,62	6,67	3,87	Pde4d	phosphodiesterase 4D, cAMP specific
5,75	3,72	4,11	Dner	delta/notch-like EGF repeat containing
7,01	4,87	4,39	Mgarp	mitochondria localized glutamic acid rich protein
8,49	6,31	4,53	Creb3l1	cAMP responsive element binding protein 3-like 1
7,93	5,4	5,78	Nr4a3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3

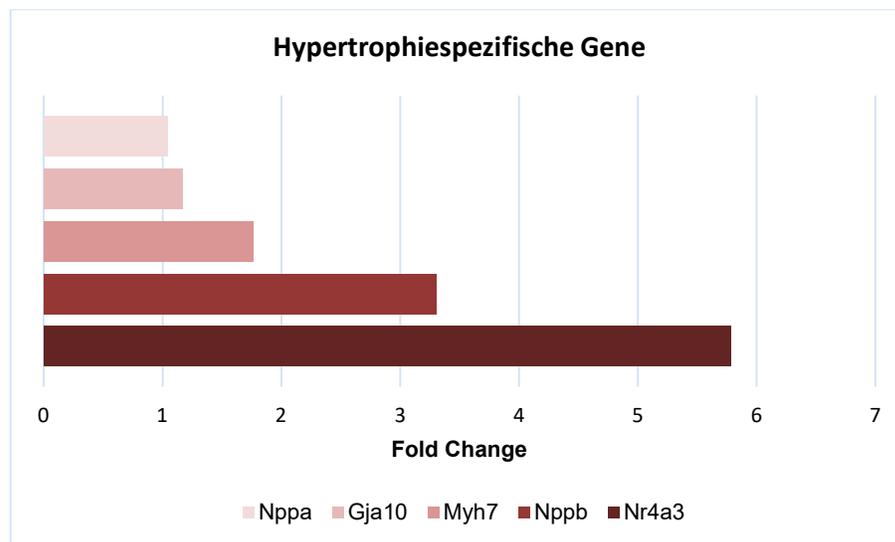
Tabelle 4.2: Transkriptomanalyse hypertrophie-regulierter Gene in iPS - CM.

(A) Im Kreisdiagramm dargestellter prozentualer Anteil der hochregulierten Gene in rot (50,1%) und der herunterregulierten Gene in grün (49,9%). Daneben die Genänderung als logarithmische Darstellung (avg log₂) der PE behandelten Zellen auf der Y- Achse versus die unbehandelte Kontrolle auf der X- Achse im Streudiagramm.

(B) Tabellarische Darstellung der hoch- und herunterregulierten Gene der mit 100 µM PE behandelten iPS - CM im Vergleich zur Kontrollgruppe aus der Microarray- Analyse mit einem Fold Change von < -2 und > 2.

In der angeschlossenen Literaturrecherche zeigten sich erste Zusammenhänge zwischen NOR- 1 und kardialer Hypertrophie.¹³¹ Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde NOR- 1 als zusätzlicher zu untersuchender Biomarker hinzugenommen. Die Regulierung weiterer Gene, die am hypertrophen Zellwachstum beteiligt sind, wie Nppb (BNP), Myh7 (β-MHC), Gja1

(Cx43) und Nppa (ANP), war im Vergleich zum Nor1/Nr4a3-Expressionsniveau geringer (Tabelle 4.3).



PE 100 µM iPS - CM Avg (log2)	Control iPS - CM Avg (log2)	Fold Change	Gensymbol	Beschreibung
11,81	11,75	1,04	Nppa	natriuretic peptide type A
4,77	4,54	1,17	Gja10	gap junction protein, alpha 10
12,08	11,27	1,76	Myh7	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta
9,94	8,22	3,3	Nppb	natriuretic peptide type B
7,93	5,4	5,78	Nr4a3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3

Tabelle 4.3: Aus der Transkriptomanalyse ausgewählte hypertrophieregulierte Gene in iPS - CM.

Darstellung der am Zellwachstum beteiligten Gene Nppb (natriuretisches Peptid des Gehirns, BNP), Myh7 (β -Myosin Heavy Chain, β -MHC), Gja1 (Cx43), Nppa (atriales natriuretisches Peptid, ANP)) und NOR- 1 (Nr4a3) mit ihrem Expressionsniveau aus der Microarray- Analyse (iPS - CM Kontrollgruppe versus iPS - CM + PE).

4.3.2 Hypertrophieinduzierte Veränderung der Genexpression in iPS - CM

Im Anschluss an die Microarray- Analyse wurde die Hochregulation von NOR- 1 nach 24 h Kultivierung mit PE 100µM ebenfalls in der Genexpression mittels rtPCR überprüft.

Bezüglich der Genexpression von NOR- 1 in mit 100 µM PE hypertrophierten iPS - CM im Vergleich zur Kontrolle zeigt sich eine Steigerung der Genexpression in den mit PE kultivierten iPS - CM, allerdings ohne Signifikanz (Abbildung 4.3).

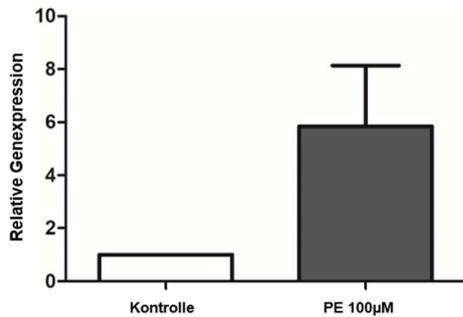


Abbildung 4.3: Einfluss von PE auf die Genexpression in iPS - CM.

Hypertrophieinduzierte Veränderung der Genexpression in iPS - CM Zellen durch 24 h Kultivierung mit 100µM PE (n = 5). Dargestellt ist die relative Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Expression von NOR- 1 wurde mittels rtPCR untersucht.

4.3.3 Hypertrophieinduzierte Veränderung der Proteinexpression in HL - 1 Zellen und iPS - CM

Für die Messung der Proteinexpression nach Hypertrophieinduktion wurden 1×10^6 HL - 1 Zellen oder 8×10^5 iPS - CM in 1,5 ml Magermedium pro Well ausplattiert. Nach 24 h Kultivierung wurden die beiden Zellreihen mit L- Phenylephrin (PE, 100 µM) behandelt und hiermit für weitere 24 h kultiviert.

Wie in **Abbildung 4.4** dargestellt zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Proteinexpression von pAkt nach Behandlung mit Phenylephrin im Vergleich zur Kontrolle. Dieses Ergebnis unterstützt die zuvor anhand der Literaturrecherche getroffene Annahme, dass die Expression von pAkt in hypertrophierten Kardiomyozyten hochreguliert wird. Bei der Untersuchung der Proteinexpression der weiteren drei Biomarker (Cx 43, Mcl- 1, α - SMA) in den HL - 1 Zellen zeigen sich nach Hypertrophieinduktion mit 100 µM PE hingegen keine signifikanten Unterschiede zur jeweiligen Kontrollgruppe.

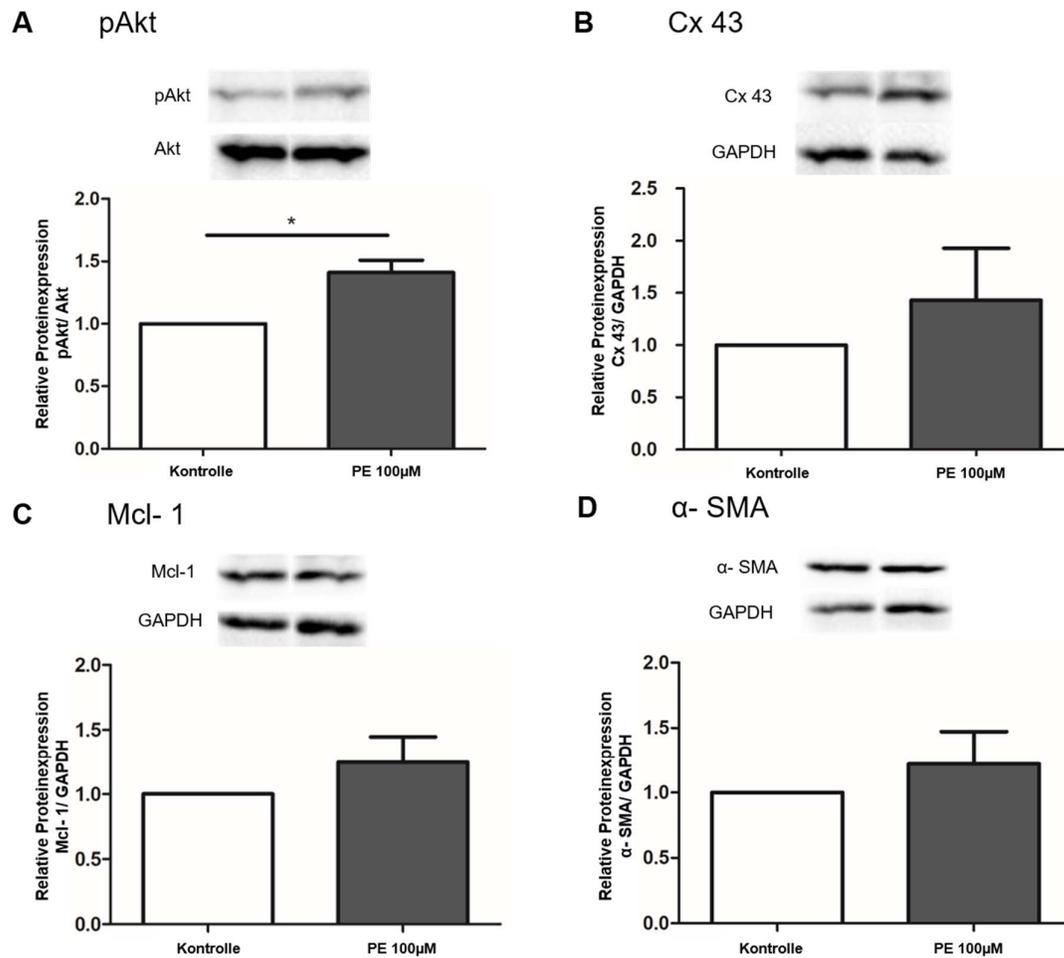


Abbildung 4.4: Einfluss von PE auf die Proteinexpression in HL-1 Zellen. HL-1 Kardiomyozyten wurden mit 100μM Phenylephrin (PE) für 24 h behandelt. Anschließend wurde die Expression von pAkt (A), Cx 43 (B), Mcl- 1 (C) und α- SMA (D) mittels Western Blot quantifiziert. Dargestellt ist die relative Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die exemplarische Darstellung eines Western Blots ist gezeigt. n = 5, *p<0,05.

Bei der Untersuchung der Proteinexpression von pAkt, Cx 43 und NOR- 1 in den iPS - CM ist im Vergleich zur Kontrolle ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen (**Abbildung 4.5**). Dieses Ergebnis bestätigt die zuvor anhand der Literaturrecherche und der Microarrayanalyse getroffene Annahme, dass die Expression von pAkt und NOR- 1 in hypertrophierten Kardiomyozyten hochreguliert wird. Bei der Proteinexpression von Cx 43 zeigt sich hingegen nicht, wie erwartet, eine Herunterregulation, sondern stattdessen eine signifikant erhöhte Proteinexpression. Die Ergebnisse der Biomarker Mcl- 1 und α- SMA weisen nach 24 h Behandlung mit 100 μM PE hingegen keine signifikanten Unterschiede zur jeweiligen

Kontrollgruppe auf und lassen somit keine Bewertung bezüglich der Hypertrophieinduktion in den iPS - CM zu.

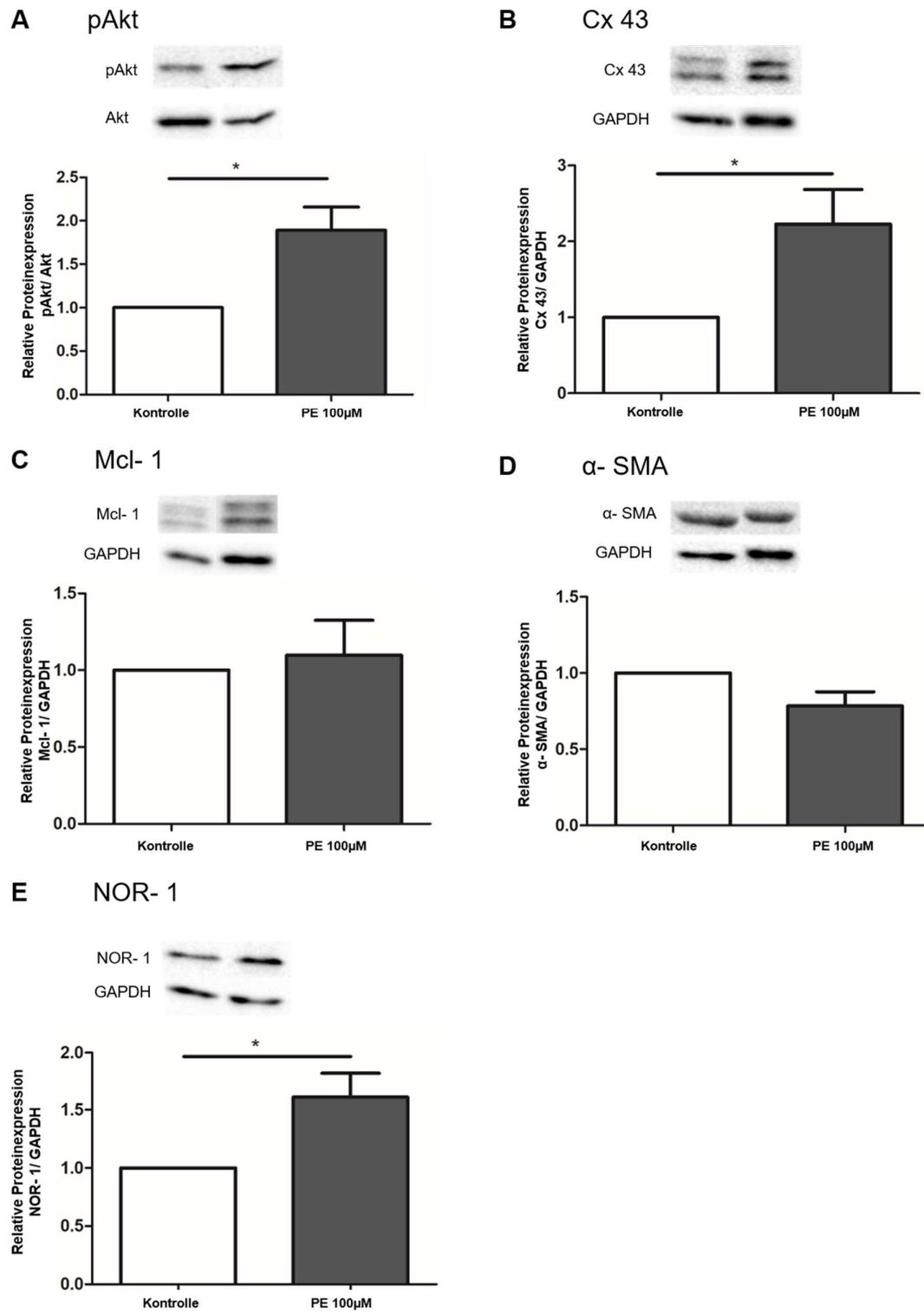


Abbildung 4.5: Einfluss von PE auf die Proteinexpression in iPS - CM.

iPS - CM wurden mit 100µM Phenylephrin (PE) für 24 h behandelt. Anschließend wurde die Expression von pAkt (A), Cx 43 (B), Mcl- 1 (C), α - SMA (D) und NOR- 1 (E) mittels Western Blot quantifiziert. Dargestellt ist die relative Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die exemplarische Darstellung eines Western Blots ist gezeigt. n=5-6, *p<0,05.

4.4 Effekt von präkonditionierten MSCs auf Hypertrophiemarker in hypertrophierten iPS - CM

Im letzten Jahrzehnt wiesen MSCs auf Grund ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung und der Möglichkeit, sich in verschiedene Zellen zu differenzieren, auf vielversprechende zelluläre Therapieansätze hin - auch für Erkrankungen des kardiovaskulären Systems. Des Weiteren sondern MSCs eine Vielzahl löslicher Faktoren (Wachstumsfaktoren, Chemokine, Zytokine) ab, welche auf das umliegende Gewebe und benachbarte Zellen Einfluss nehmen können.¹³² Die Präkonditionierung von MSCs verstärkt ihre Differenzierungsfähigkeit sowie ihre proliferativen, sekretorischen und migratorischen Fähigkeiten.¹³³

Um die Wirkung von präkonditionierten MSCs auf das Ausmaß der Hypertrophieinduktion in den iPS - CM zu untersuchen, wurden Zweifachkulturen aus iPS - CM und MSCs angelegt. 24 h vor Start der Co - Kultivierung erfolgte bei einem Teil der MSCs eine Zellaktivierung und Stimulation ihrer parakrinen Aktivität mit 3 ng/ ml IL - β und 30 ng/ ml IFN - γ (aMSCs). Für die Co- Kultur wurden weiterhin vorab iPS - CM durch Zugabe von 100 µM PE zur Hypertrophie angeregt. Nach 24 h wurden die hypertrophierten iPS - CM mit nicht aktivierten bzw. aktivierten MSCs co-kultiviert. In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen durch Transwells mit 0,4 µm Porengröße getrennt, sodass ein direkter Zell- Zellkontakt unterbunden wurde. Alle Wells bis auf die Kontrolle wurden erneut mit 100µM PE behandelt. Die Proben der direkten Zellkultur wurden nach weiteren 24h mittels autoMACS® wieder in iPS - CM und MSCs aufgeteilt. Die restlichen Proben (Kontrolle, iPS - CM mit PE und die iPS - CM aus dem Transwell) wurden zeitgleich abgeerntet und bei -80 °C eingefroren.

Nach Induktion der Hypertrophie in der Zellkultur und erfolgter Zelltrennung wurde die Proteinexpression in den iPS - CM mittels Western Blot untersucht. Hierfür wurden die Biomarker verwendet, die zuvor in der Einzelkultur der iPS - CM eine signifikante Veränderung nach Hypertrophieinduktion gezeigt haben (pAkt, Cx 43 und NOR- 1).

Wie in **Abbildung 4.6** zu erkennen, kam es bei den drei Markern pAkt, Cx 43 und NOR- 1, wie schon in den Einzelkulturversuchen, zu einer signifikanten Zunahme der Proteinexpression nach Hypertrophieinduktion. Bei der Untersuchung der Zweifachkulturen zeigte sich bei den direkten Zellkulturen hinsichtlich pAkt ein signifikanter Abfall der relativen Proteinexpression bei den nichtaktivierten MSCs und aktivierten MSCs im Verhältnis zu den hypertrophierten iPS - CM (**Abbildung 4.6 A**). Bei der Untersuchung im Transwell zeigte sich keine Reduktion der Proteinexpression von pAkt. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass die Wirkung von

MSCs auf hypertrophierte iPS Kardiomyozyten durch einen direkten Zell-Zell-Kontakt bedingt ist.

Bei der Untersuchung der Proteinexpression von Cx 43 und NOR- 1 gab es jedoch ein konträres Ergebnis. In der direkten Kultivierung von iPS - CM und aMSCs/ MSCs stellte sich ein noch zunehmender Anstieg der Proteinexpression von Cx 43 und NOR- 1 dar. Diese Zunahme der Proteinexpression ist signifikant im Vergleich zu den hypertrophierten iPS - CM. Vielmehr scheint sich hier der kardioprotektive Effekt der MSCs in der indirekten Kultivierung von iPS - CM und aMSCs im Transwell zu manifestieren. Hier kam es zu einem signifikanten Rückgang der Expression von Cx 43 und NOR- 1 im Vergleich zu den hypertrophierten Einzelkulturen (**Abbildung 4.6 B und C**). Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die Wirkung von MSCs auf hypertrophierte iPS Kardiomyozyten nicht rein vom direkten Zell-Zell-Kontakt abhängt, sondern der protektive Effekt vielmehr auch auf die löslichen Faktoren zurückzuführen ist.

In Bezug auf die Aktivität der mesenchymalen Stammzellen zeigen sich in den direkten Co- Kulturen keine Unterschiede zwischen den nichtaktivierten und den mit IL- β und IFN- γ präkonditionierten MSCs bei der Regulation der Hypertrophie.

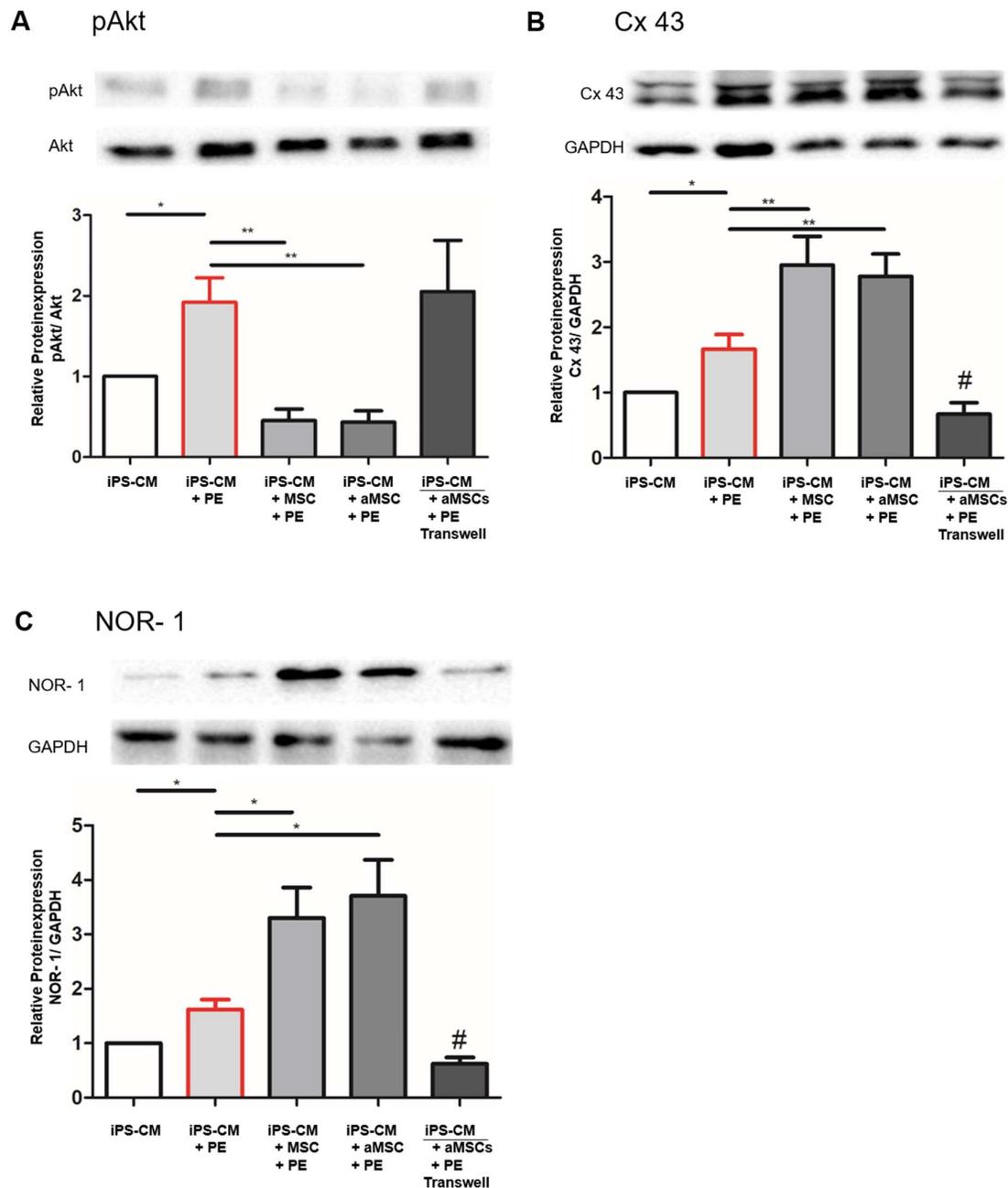


Abbildung 4.6: Einfluss von MSCs/aMSCs auf die Proteinexpression in mit PE hypertrophierten iPS - CM. Hypertrophieinduzierte Veränderung der Proteinexpression in hypertrophierten iPS - CM sowie anschließender zusätzlicher direkter oder indirekter (Transwell) Kultivierung mit aktivierten MSCs (aMSCs) und MSCs für weitere 24 h. Anschließend wurde die Expression von pAkt (A), Cx 43 (B) und NOR- 1 (E) mittels Western Blot quantifiziert. Exemplarische Darstellung der Proteinexpression von pAkt, Cx 43, NOR- 1 in mit 100 µM PE behandelten iPS - CM (PE), der jeweiligen Kontrolle (K) sowie in Co- Kultur mit aktivierten (iPS - CM + PE + aMSCs) und nichtaktivierten MSCs (iPS - CM + PE + MSCs) und im Transwell (Transwell iPS - CM + PE + aMSCs). Die exemplarische Darstellung eines Western Blots ist gezeigt. n = 5-6, *p < 0,05, **p < 0,01, # p < 0,05 vs iPS - CM + PE.

5 Diskussion

Trotz intensiver Erforschung mit immer neuen Erkenntnissen nimmt die Anzahl an Menschen mit Myokardhypertrophie und der damit verbundenen infausten Prognose einer Herzinsuffizienz insbesondere in den Industrienationen zu. Seit langem liegen in der westlichen Welt die Herz- Kreislauferkrankungen an der Spitze der Todesursachen, Tendenz steigend. Neben der initialen Ursachenbehandlung (u.a. Klappenvitien, arterieller Hypertonus) gibt es bislang keine kurative Therapie. Bei fortgeschrittener Herzinsuffizienz steht die medikamentöse oder chirurgische Therapie im Vordergrund, welche neben der Verlängerung der Lebenszeit hauptsächlich der Symptomlinderung dient. Immer neue Forschungsansätze werden verfolgt, um die fatale Diagnose Herzinsuffizienz therapieren zu können. Seit einigen Jahren sind sowohl die iPS - CM als auch die mesenchymalen Stammzellen in den Fokus der Herz- Kreislauferforschung gerückt.

Ziel dieser Arbeit war es, ein *in vitro* Modell für die kardiale Hypertrophie auf Basis der beiden kardialen Zellreihen HL - 1 und iPS - CM zu etablieren. Hierfür sollte mittels Phenylephrin in den Zellreihen eine Hypertrophie induziert und anschließend in den hypertrophierten Zellen geeignete Biomarker detektiert werden. Anhand dieser Marker sollte im zweiten Teil dieser Arbeit der Einfluss von mesenchymalen Stammzellen auf die Hypertrophie in den iPS - CM untersucht werden. Diese Ziele ließen sich innerhalb der vorliegenden Arbeit für die zuvor ausgewählten Biomarker nur bedingt umsetzen.

Insbesondere die immortalisierte HL - 1 Zellreihe erbrachte trotz ihrer langen Etablierung als Zellreihe für die Herz- Kreislauferforschung nicht die zu erwartenden Ergebnisse. Innerhalb dieser Arbeit ist es nicht gelungen mittels Phenylephrin eine Hypertrophie in den HL - 1 Zellen zu erzeugen. Es kam zwar nicht zu einer erhöhten Apoptoserate in den mit PE behandelten HL - 1 Zellen im Vergleich zur Kontrolle, jedoch ließ sich bei der erwarteten Hypertrophieinduktion mit Phenylephrin in den HL - 1 Zellen kein signifikanter Größenzuwachs der Zellen in der histologischen Darstellung dokumentieren. Ebenso führte die durchgeführte Microarray- Analyse zu keinem zusätzlichen Marker für weitere Untersuchungen, sodass die Proteinexpression mittels Western Blot mit den zuvor anhand von Literaturrecherchen bestimmten vier Markern (pAkt, Cx 43, α - SMA und Mcl- 1) erfolgte. Aufgrund des fehlenden histologischen Nachweises einer Hypertrophie in den HL - 1 Zellen nach Behandlung mit Phenylephrin, kann in diesem Rahmen somit auch nur von Phenylephrin- regulierten Faktoren und nicht von hypertrophieinduzierten gesprochen werden. Auch entgegen den zuvor gestellten Hypothesen konnte bis auf die gesteigerte Proteinexpression von pAkt kein signifikanter Unterschied nach Behandlung mit Phenylephrin zur Kontrolle gezeigt werden. Insgesamt reagieren die verwendeten HL - 1 Kardiomyozyten weniger ausgeprägt als die iPS - CM auf eine Behandlung mit PE. Zwar zeichnen sich die HL - 1 Zellen dadurch aus, dass

sie die morphologischen, biochemischen und elektrophysiologischen Eigenschaften von Kardiomyozyten besitzen und die pharmakologischen Charakteristika von kardialen Muskelzellen aufweisen, jedoch bestätigen einige Studien bereits die heterogene Ausprägung in den HL - 1 Zelllinien bei der funktionellen Erscheinungsform.^{81, 82} Dies gilt zum Beispiel für die Präsenz von I_r-Kanälen und deren Weiterleitung von Aktionspotentialen.¹³⁴ In einer weiteren Arbeit wurden nicht-kontraktile HL - 1 Zellen isoliert und strukturelle sowie funktionelle Unterschiede in diesen gefunden.¹³⁵ Ebenso zeigten sich Expressionsunterschiede von Cx 43 in untersuchten HL - 1 Zellreihen.¹³⁶ Somit ist trotz der vielfach beschriebenen Stabilität innerhalb der HL - 1 Zelllinie eine heterogene Ausprägung der HL - 1 Zellen bei der Klonierung möglich.^{82, 136} Hervorgehend aus diesen Erkenntnissen und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit scheint die Zellreihe der HL - 1 Kardiomyozyten weniger gut geeignet zu sein, physiologische Effekte nachzuahmen. Im Verlauf der Arbeit erfolgte auf Grund dieser Ergebnisse der frühzeitige Ausschluss der HL - 1 Kardiomyozyten, so dass die weiteren Versuche der Co-Kultur ausschließlich mit den iPS - CM durchgeführt wurden.

Zu Beginn wurde auch in den iPS - CM eine histologische Überprüfung zur Bestätigung der Zellhypertrophie durchgeführt. Hier führte die Behandlung mit PE zu einer signifikanten Größenzunahme der iPS - CM. Anschließend erfolgte in den iPS - CM mittels Durchflusszytometrie ebenfalls eine Kontrolle auf eine erhöhte Apoptoserate durch die Behandlung mit PE. Hier zeigte sich die Zellreihe der iPS - CM im Vergleich zu den HL - 1 Zellen vulnerabler und mit einer höheren Apoptoserate nach Phenylephrinbehandlung, jedoch kam es im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zu keiner signifikant erhöhten Apoptoserate in der Durchflusszytometrie.

Bislang sind in der Literatur keine hypertrophiespezifischen Marker für murine iPS - CM beschrieben worden. Aus diesem Grund wurden mögliche Biomarker, welche bereits mit kardialer Hypertrophie in Verbindung gebracht wurden, anhand einer Literaturrecherche ausgewählt (pAkt, Cx 43, α -SMA und Mcl- 1). Zusätzlich wurde eine Microarray- Analyse zur Detektion weiterer hypertrophiespezifischer Biomarker durchgeführt. Hier zeigte sich das NOR- 1 Gen mit einer Hochregulation der Expression um mehr als das 5-fache in den hypertrophierten iPS - CM als vielversprechender Biomarker. Die Hochregulierung weiterer Gene, welche am hypertrophen Zellwachstum beteiligt sind, wie Nppb (BNP), Myh7 (β -MHC), Gja1 (Cx43) und Nppa (ANP), war im Vergleich zum Nor1/Nr4a3-Expressionsniveau geringer.¹³⁷

Mehrere Berichte deuten darauf hin, dass NOR- 1 an der Pathophysiologie von Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz beteiligt ist, jedoch ist bisher nur sehr wenig über die

zugrunde liegenden molekularen Mechanismen bekannt. Bereits 1996 konnte von Ohkura und Kollegen NOR- 1 mRNA in adulten Herzen nachgewiesen werden.¹³⁸ In den letzten Jahren wird die Bedeutung von NOR- 1 immer häufiger in Verbindung mit kardialen Remodeling gebracht.^{139, 140} Aus diesem Grund lag innerhalb dieser Arbeit auch ein besonderes Augenmerk auf der veränderten Gen- und Proteinexpression von NOR- 1 durch die Hypertrophieinduktion mit PE in den iPS - CM. In anderen Studien führte eine β -adrenerge Stimulation mittels Isoprenalin *in vitro* als auch *in vivo* zu einer Hochregulation der Proteinexpression von NOR- 1 und trug zu einer Exazerbation der kardialen Hypertrophie durch Überexpression von NOR- 1 bei.^{131, 141} Anfang 2020 erfolgte erstmals eine erste genauere Aufschlüsselung der zellulären Rolle von NOR- 1 und dessen Signalwege in Bezug auf die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie durch Cañes et al. Mit Hilfe einer transgenen Maus, die NOR- 1 im Herzen überexprimiert, wurden veränderte Zellmechanismen untersucht.¹⁴² Unter anderem exprimierten die transgenen Mäuse höhere Konzentrationen von Myofibroblasten- Markern (α 1 Skelettmuskel-Aktin (Acta1), Transgelin (Sm22 α)) als die Wildtypmäuse, ebenfalls neigten sie eher zur Kollagensynthese und Migration. Eine zusätzliche Behandlung der Mäuse mit Angiotensin II, welches neben Phenylephrin ebenfalls eine Zunahme des kardialen Remodelings mit Hypertrophie und Fibrosierung hervorruft, führte auch zu einer vermehrten kardialen Expression von NOR- 1.¹⁴³ Innerhalb der transgenen Mäuse verschlimmerte sich durch die Behandlung mit Angiotensin II die kardiale Hypertrophie und Fibrose. Zusätzlich konnte durch die NOR- 1 Überexpression die Hochregulation von zwei Schlüsselgenen, welche an der kardialen Hypertrophie (Myh7) und der Fibrose (Loxl2) beteiligt sind, detektiert werden. Diese Ergebnisse unterstreichen die Beteiligung von NOR- 1 bei der Entstehung von hypertensiv bedingter kardialer Hypertrophie.¹⁴²

Auch in dieser Arbeit gelang es im Anschluss an die vielversprechende Microarray- Analyse bei der Proteinexpression von NOR- 1, einen signifikanten Anstieg in hypertrophierten iPS - CM mittels Western Blot nachzuweisen. Auf Genebene konnte in den durchgeführten Untersuchungen zwar ein Anstieg der Expression gezeigt werden, dieser stellte sich jedoch nicht als signifikant dar. Das Ziel dieser Arbeit, die iPS - CM Zellen als kardiales *in vitro* Modell zur Untersuchung hypertrophiespezifischer Zellmechanismen zu etablieren, wird durch die vorliegenden Ergebnisse unterstützt. In Zusammenschau ist erkennbar, dass die Erforschung des NOR- 1- Stoffwechsels insbesondere im Hinblick auf die Auswirkungen auf das Herz-Kreislauf-System noch am Anfang steht. Das Verständnis zur Entstehung von kardialer Hypertrophie auf zellulärer Ebene könnte durch die forcierte Erforschung von NOR- 1 vermittelten Stoffwechselvorgängen in Bezug auf Kardiomyozyten verbessert werden, so wie es bereits im Zusammenhang von NOR- 1 und seiner Rolle in der Entstehung von diversen Karzinomen sowie des Glukosestoffwechsels erfolgt ist.¹⁴⁴

Neben der Hochregulation des NOR- 1 Gens innerhalb der Microarray- Analyse zeigten einige andere Gene (u.a. Creb3l1, Mgap, Dner, Unc80, Egr3) eine > 4-fache Änderung (Fold Change > 4) nach Phenylephrinbehandlung in den iPS - CM. Auch diese Gene sollten als mögliche Forschungsansätze in Bezug auf die kardiale Hypertrophie in zukünftigen Untersuchungen bedacht werden. Zum Zeitpunkt des experimentell im Labor durchgeführten Teils dieser Arbeit ließ sich mittels Literaturrecherche jedoch besonders eine Verbindung zwischen NOR- 1 und der kardialen Hypertrophie feststellen. Die Hochregulierung anderer wichtiger Hypertrophie-relevanter Gene wie Nppa (ANP), Nppb (BNP), Gja1 (Cx 43) und Myh7 (β -MHC) erwies sich im Vergleich zum Expressionsniveau von Nr4a3 (NOR -1) als deutlich schwächer. Dies lässt den Schluss zu, dass NOR- 1 der am besten geeignete Hypertrophie-Marker in iPS-CM ist.

Im Gegensatz zu den erfolgversprechenden Untersuchungsansätzen von NOR- 1 als Hypertrophiemarker in iPS - CM, zeigte die Untersuchung der zuvor rein anhand von Literaturrecherche ausgewählten möglichen Biomarkern unterschiedliche Ergebnisse.

Neben NOR- 1 als möglichem Hypertrophiemarker in iPS - CM standen auch Cx 43 und pAkt im Fokus dieser Arbeit. In den durchgeführten Western Blot Versuchen kam es zu einer signifikanten Erhöhung der zellulären Proteinexpression von Cx 43 in den hypertrophierten iPS - CM. Ebenso war in der durchgeführten Microarray- Analyse eine 1,2-fache Hochregulation des Gja1 (Gap Junction Alpha-1-Protein) festzustellen. Der Zusammenhang von Cx 43 und kardialer Hypertrophie wurde in der Literatur bereits vielfach beschrieben, allerdings zeigt sich insbesondere in ischämischen und hypertrophierten Kardiomyozyten eine Reduktion der Proteinkonzentration von Cx 43.^{129, 145} Die in dieser Arbeit dargestellte signifikante Erhöhung des Proteingehalts von Cx 43 in hypertrophierten iPS - CM hingegen könnte eine zelluläre Abwehrreaktion im Sinne eines Kompensationsmechanismus' auf den schädlichen Trigger, das Phenylephrin, sein und sich erst im Stadium der Dekompensation mit einer Proteinreduktion darstellen. Diese These stützt eine Arbeit zur Untersuchung der Proteinexpression von Cx 43 bei Patienten mit kardialer Hypertrophie bedingt durch eine Aortenklappenstenose.¹⁴⁶ Hier zeigte sich, dass bei noch kompensierter linksventrikulärer Hypertrophie (EF > 50%) eine Hochregulation von Cx 43 stattfindet, am ehesten als rasche adaptive Anpassungsreaktion. Im Gegensatz dazu kann diese Hochregulation bei der anschließenden kardialen Dekompensation nicht aufrechterhalten werden.¹⁴⁶ Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen Bellafore und Kollegen in ihrem Experiment, in dem durch Training eine Myokardhypertrophie im Mausmodell induziert und anschließend eine erhöhte Cx 43 Proteinkonzentration gemessen wurde.¹⁴⁷

Weiterhin konnte in dieser Arbeit auch eine signifikante Erhöhung der Proteinexpression von pAkt in hypertrophierten iPS - CM dargestellt werden, welches für eine vermehrte Aktivierung der Proteinkinase B (Akt), d.h. für eine vermehrte Phosphorylierung von Akt in

hypertrophierten iPS - CM, spricht. pAkt gilt seit langem auf multiplen Ebenen als einer der Hauptregulatoren der biologischen Zellaktivität. Die Induktion von kardialer Hypertrophie wurde zuvor bereits vielfach mit einer Hochregulation/ Aktivierung des PI3K/Akt- Signalwegs in Verbindung gebracht.^{24, 148} Bisher ist der pAkt Signalweg hingegen noch nicht im Zusammenhang mit iPS - CM beschrieben worden. Die aus dieser Arbeit hervorgehenden Ergebnisse zeigen auf, dass auch in iPS - CM die Induktion von Hypertrophie zu einer zunehmenden Aktivität im Bereich des Akt- Signalwegs führt. Diese Erkenntnis betont in einem weiteren Punkt die Verwendung von iPS - CM als *in vitro* Modell für die Erforschung von Hypertrophie in Kardiomyozyten.

Die iPS - CM verhalten sich im Bereich der Proteinexpression von Cx43 und pAkt entsprechend vieler bereits zuvor durchgeführter *in vivo* Studien an Kardiomyozyten. Diese Ergebnisse unterstützen die Nutzung der iPS - CM als *in vitro* Modell im Hinblick auf die weitere molekulare Erforschung von Herz-Kreislauf- Erkrankungen.

Im Verlauf der Arbeit zeigten sich einige der zuvor ausgewählten potentiellen Hypertrophiemarker für die iPS - CM als weniger gut geeignet als andere. Trotz des zuvor in der Literatur beschriebenen Einflusses, ließ sich in Bezug auf α -SMA und Mcl-1 nach 24 h kein signifikanter Unterschied in den hypertrophierten iPS - CM im Vergleich zur Kontrolle darstellen. Bekannt ist, dass Mcl-1 nicht nur in verschiedenen Karzinomen, sondern auch in Kardiomyozyten stark exprimiert wird.¹⁴⁹ Das Mcl-1 Gen ist für die Kodierung eines Proteins zuständig, das zur Bcl-2 Familie gehört und eine zentrale Rolle bei der Regulierung zwischen Apoptose und Zellüberleben übernimmt.¹⁵⁰ Mit dieser zentralen Funktion gilt Mcl-1 auch angesichts seiner Wirkung in der Entstehung der Herzinsuffizienz als bedeutend.¹⁵¹

Bezüglich Mcl-1 wurde beschrieben, dass ein aktiver Verlust des Proteins (u.a. mittels Knock-downs) zu einer raschen Entwicklung von kardialer Myopathie führt. Aus dieser induzierten kardialen Myopathie folgt im Weiteren am Rattenmodell ein plötzlicher Herztod. Durch diese aus dem Mcl-1 Knock-down hervorgerufene Letalität wird die kardial protektive Bedeutung von Mcl-1 begründet.¹³⁰ Bezüglich der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche kommt es möglicherweise durch die Hypertrophieinduktion in den iPS - CM zu keiner direkten Proteinzunahme oder -abnahme von Mcl-1, sodass Mcl-1 in diesem Versuchsaufbau nicht als Marker einer Hypertrophie bestätigt werden konnte.

Ein weiterer Marker, welcher in dieser Arbeit untersucht wurde und nicht zu den erwarteten Ergebnissen geführt hat, ist α -SMA. Obwohl α -SMA seit langem als bewährter Marker zur Darstellung einer kardialen Hypertrophie in Myozyten gilt^{152, 153}, ließ sich dies in dieser Arbeit nicht nachweisen. Vielmehr zeigte sich kein signifikanter Unterschied nach Hypertrophieinduktion mit Phenylephrin. Möglich wäre, dass die Inkubationszeit von 24 h für eine Proteinveränderung dieser Gene sowohl von Mcl-1 als auch α -SMA nicht ausreicht. Auf

Grund der nicht signifikanten Ergebnisse bezüglich der Proteinexpressionsveränderung in den Einzelkulturversuchen wurden α -SMA und Mcl-1 in den weiteren Versuchen insbesondere in den Co-Kulturversuchen mit den mMSCs nicht weiterverwendet.

Weltweit besteht ein immenses Bedürfnis nach Therapiemöglichkeiten, welche die Reparatur und Regeneration von Organ- oder Gewebefunktionen, die durch Krankheiten oder Verletzungen geschädigt wurden, ermöglicht. Die große Hoffnung, dass viele Krankheiten eines Tages mit einer Stammzelltherapie behandelt werden können, beruht auf dem historischen Erfolg von Knochenmarktransplantationen, welche das Überleben von Patienten mit Leukämie und anderen Krebsarten verlängern.¹⁵⁴

Dass MSCs aufgrund ihrer langfristigen Selbsterneuerung und der Fähigkeit, sich in verschiedene spezialisierte Zelltypen zu differenzieren, auch eine der vielversprechendsten zellulären Therapien für kardiovaskuläre Erkrankungen sind, ist im letzten Jahrzehnt erkannt worden. Einige Studien konnten bereits den präklinischen Nutzen der mesenchymalen Stammzellen bei der zellbasierten Therapie der Herzinsuffizienz zeigen.^{101, 104} Die ebenfalls häufig verwendeten embryonalen Stammzellen gelten für die Therapie der Stammzelltransplantation vor allem aufgrund ihrer Pluripotenz als sehr geeignet. Trotz ihrer Fähigkeit, sich leicht in fast jede Körperzelle zu differenzieren, bergen sie neben der Gefahr einer Immunantwort mit Abstoßung^{155, 156} auch ethische Bedenken. Wegen dieser Hürden bietet die Entwicklung und Verwendung von *in vitro* Modellen, wie in dieser Arbeit aus iPS - CM und MSCs bestehend, eine Möglichkeit, die Zell-Zell-Interaktion in Bezug auf kardiale Hypertrophie und mögliche Therapieoptionen zu untersuchen.

Die zellbasierte Therapie des Herzens kann entweder direkt durch Transdifferenzierung zur Auffüllung verlorengegangenen Gewebes oder indirekt durch freigesetzte Faktoren, welche Angiogenese, Immunregulation und Hemmung von Apoptose und Fibrose fördern, wirken. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von präkonditionierten, murinen MSCs, auf hypertrophierte iPS - CM mittels Co-Kultivierung und den zuvor bestimmten Hypertrophie markern (pAkt, Cx43 und NOR-1) untersucht. Um einen Vergleich zwischen einer direkten Zell-Zell-Interaktion und einen über rein lösliche Faktoren vermittelten Einfluss zu untersuchen, erfolgte neben der direkten Co-Kultivierung auch eine Kultivierung im Transwell. Die direkt co-kultivierten Zellen wurden anschließend via *autoMACS*® getrennt. Die Ergebnisse der direkten Kultivierung und des Transwells stellten sich bei der Proteinexpression gegensätzlich dar. Eine direkte Co-Kultivierung führte bei Cx43 und NOR-1 zu einer signifikanten Hochregulation und bei pAkt, welches als kardioprotektiver Faktor gilt, zu einer signifikanten Herunterregulation.

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass MSCs von den verschiedenen differenzierten Zellen, in diesem Fall Kardiomyozyten, durch direkten Zell- Zell- Kontakt gezielt beeinflusst werden können.¹⁵⁷ Mittels direkten Kontaktes zeigt sich eine ausgeprägte Veränderung des Phänotyps der MSCs, wohingegen diese bei indirekter Zellkultur nur spärlich ausgeprägt ist. Auch in Bezug auf die Proteinexpression sind Unterschiede zwischen direkter und indirekter Zellkultur mit MSCs feststellbar.¹⁵⁷ Bei der Differenzierung von MSCs zu Kardiomyozyten und glatten Muskelzellen bestätigt sich ebenfalls, dass ein direkter Zellkontakt und nicht die löslichen Faktoren obligatorisch sind.¹⁵⁸ Möglicherweise zeigt sich im Versuchsaufbau mit direktem Zell- Zell- Kontakt ein ganz anderer molekularer Wirkmechanismus, sodass hier vielmehr die iPS - CM Einfluss auf die mesenchymalen Stammzellen nehmen und nicht der immunmodulatorische Effekt der MSCs auf die iPS - CM zur Geltung kommt. Die eventuelle Veränderung, welche innerhalb der MSCs durch den direkten Zell- Zell- Kontakt mit den iPS - CM hervorgerufen wird, lässt den vorab erhofften protektiven Einfluss der MSCs auf die iPS - CM nicht mehr zu. Somit lässt die in dieser Arbeit gewählte Fragestellung die direkten Co- Kulturen als weniger gut geeignet erscheinen. Dies stützt auch die in der Literatur mehrfach beschriebene These, dass der immunmodulatorische Effekt von MSCs über lösliche Faktoren vermittelt wird.^{159, 160} Dies wird in dieser Arbeit am besten durch die Kultivierung in Transwells dargestellt.

Es ist bekannt, dass MSCs eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die sowohl parakrine als auch autokrine Aktivitäten haben, sezernieren.¹³² Diese sezernierten Faktoren unterdrücken u.a. das lokale Immunsystem, hemmen Fibrose und Apoptose und fördern Angiogenese.¹⁵⁹ Kinnaird und Kollegen zeigten weiterhin, dass Stress, in diesem Fall Hypoxie, die Produktion mehrerer dieser Faktoren zusätzlich steigert.¹⁶¹ In dieser Arbeit erfolgte bei einem Teil der MSCs eine Präkonditionierung mit 3 ng/ ml IL - β und 30 ng/ ml IFN - γ (aMSCs) zur Zellaktivierung und Stimulation ihrer parakrinen Aktivität. Hierunter kommt es zu einer signifikanten Verminderung der Proteinexpression der zuvor detektierten Hypertrophiemarker Cx 43 und NOR- 1 bei der Kultivierung von iPS - CM und MSCs im Transwell. Dies unterstützt die These, dass unter dem Stress einer Hypertrophieinduktion die löslichen Faktoren der MSCs einen protektiven Effekt auf die iPS - CM haben können.

Die Behandlung der iPS - CM mit Zytokin-präkonditionierten MSCs im Transwell hat in den vorliegenden Versuchen hingegen keinen signifikanten Effekt auf die Proteinexpression von pAkt gehabt. Die Proteinkonzentration von pAkt bleibt nahezu unverändert im Vergleich zu den hypertrophierten iPS - CM ohne Kultivierung mit mMSCs.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die iPS - CM als vielversprechendes *in vitro* Modell für die linksventrikuläre Hypertrophie herangezogen werden können. Die in dieser Arbeit

dargestellten Ergebnisse der Proteinexpression von pAkt, Cx 43 und NOR- 1 detektieren diese als nutzbare Hypertrophiemarker in den iPS - CM. Anhand der ermittelten Biomarker besteht eine gute Möglichkeit, die kardiale Hypertrophie und deren mögliche Therapie auf zellulärer Ebene weitergehend zu untersuchen. Insbesondere NOR- 1 erscheint für die weitere Erforschung besonders interessant zu sein, da hier die kardialen Zusammenhänge noch weitestgehend unbekannt sind. Zum jetzigen Zeitpunkt weisen jedoch verschiedene bereits veröffentlichte Studien darauf hin, dass NOR- 1 neben anderen Markern eine Schlüsselrolle im kardialen Stoffwechsel einnehmen kann.

Des Weiteren wären eine verlängerte Hypertrophiezeit und anschließende Untersuchung der Protein- und Genexpression sinnvoll, um u.a. eine Erniedrigung des Gen-/Proteingehalts von Cx 43 zu prüfen, wie es in der chronischen Phase der kardialen Hypertrophie mit Dekompensation zu erwarten wäre. Auch im Hinblick auf die Biomarker α - SMA und Mcl- 1, welche in dieser Arbeit bisher keine erwartbaren Ergebnisse lieferten, wäre eine Verlängerung der Kultivierungszeit mit PE denkbar.

Vor dem Hintergrund der vorliegenden Erkenntnisse sollte auch die Frage gestellt werden, ob durch eine Herunterregulation der entsprechenden Biomarker (Cx 43, pAkt, NOR- 1) die induzierte Hypertrophie beeinträchtigt und gegebenenfalls rückgängig gemacht werden kann. Hierfür ist neben den Untersuchungen innerhalb eines Knock-down Modells auch die Verwendung von Transfektion im *in vitro* Modell denkbar, wie sie mit genspezifischer siRNA bzw. dem p13-Kinase-Inhibitor Wortmannin bereits in weiterführenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe umgesetzt wurden. In diesen Untersuchungen wurden kein hypertrophes Zellwachstum bei Abwesenheit von NOR- 1 oder unterdrückter Akt-Aktivität festgestellt. Dies lässt den Schluss zu, dass sowohl NOR- 1 als auch die Aktivierung von Akt für die Hypertrophieinduktion in iPS-CM erforderlich sind.¹⁶² Die Ergebnisse zeigen, dass eine weiterführende Untersuchung der detektierten Biomarker bezüglich ihrer Rolle in der kardialen Hypertrophie als vielversprechend erscheint. Ein entsprechendes Knockout- Mausmodell mit NOR- 1 *-/-* oder auch das seit langem etablierte TAC (Transverse aortic constriction) - Mausmodell zur Induktion von Druck induzierter kardialer Hypertrophie und daraus resultierender Herzinsuffizienz¹⁶³ könnte weitere Ergebnisse hinsichtlich der Bedeutung von NOR- 1 im kardialen Zellstoffwechsel bieten. Zielführend wäre die Untersuchung von humanen Kardiomyozyten zur weiteren Abklärung der Bedeutung von NOR- 1. Möglich wäre hierfür die Untersuchung von Kardiomyozyten von Patienten mit bestehender kardialer Hypertrophie, zum Beispiel bedingt durch eine hochgradige Aortenklappenstenose, verglichen mit Probanden ohne echokardiographisch vorbeschriebener linksventrikulärer Hypertrophie.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass präkonditionierte MSCs zu einer Regression der Hypertrophie in hypertrophierten iPS - CM führen. Die Ergebnisse bestätigen,

dass der MSC-vermittelte Effekt auf die hypertrophierten iPS - CM am ehesten über lösliche Faktoren geschieht. Unklar ist, welche der von den MSCs stammenden Moleküle an der Rückbildung der Hypertrophie beteiligt sind. Die detaillierte Detektion der löslichen parakrinen Faktoren sowie deren zelluläre Mechanismen, welche auf die iPS - CM wirken, könnte für einen therapeutischen Nutzen entscheidend sein. Weiterführende Analysen unserer Arbeitsgruppe haben jedoch gezeigt, dass die zur Präkonditionierung verwendeten Zytokine IFN- γ und IL-1 β zu einer Hochregulation zahlreicher Chemokine und unter anderem von iNOS und IL-6 in den MSCs führen.

Dies bestätigt die Aktivierung der MSCs sowie die Expression immunmodulatorischer Faktoren. Des Weiteren sind viele der regulierten Gene an den unterschiedlichsten zellulären Reaktionen beteiligt, unter anderem an IFN- β , IFN- γ , zytokinvermittelten Signalwegen und der Regulierung von Apoptose.¹⁶²

Die beschriebenen Beobachtungen im Rahmen der Stammzelltherapie geben Grund zum Optimismus, da zu erwarten ist, dass Stammzellen in der regenerativen Medizin, insbesondere auch im Bereich der kardialen Regeneration, weiterhin eine entscheidende Rolle spielen werden. Es stellen sich hierbei gewaltige Herausforderungen, unter anderem hinsichtlich der Identifizierung der effektivsten Zellquellen, der Verbesserung der Transplantationsmethoden und der Erzielung einer nachhaltigen oder funktionellen Integration der transplantierten Zellen an verletzten Stellen. Erst dann ist eine effiziente klinische Umsetzung möglich. Bei Betrachtung der Problematik, welche die Herzinsuffizienz für die Bevölkerung darstellt, besteht zu Recht ein großes Interesse an der Fortführung der entsprechenden Forschung.

6 Literaturverzeichnis

1. Reith G, Busch B, Verhoff MA. The term *cor bovinum* in anatomical pathology. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2009;455(4):395–6.
2. Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annual review of physiology*. 2003;65:45–79.
3. Meerson FZ. On the mechanism of compensatory hyperfunction and insufficiency of the heart. *Cor Vasa*. 1961;3:161-77.
4. Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation*. 2004;109(13):1580-9.
5. Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacology & therapeutics*. 2010;128(1):191–227.
6. Shimizu I, Minamino T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2016;97:245–62.
7. Nakamura M, Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nature reviews Cardiology*. 2018;15(7):387–407.
8. Schiattarella GG, Hill JA. Inhibition of hypertrophy is a good therapeutic strategy in ventricular pressure overload. *Circulation*. 2015;131(16):1435–47.
9. Gupta MP. Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2007;43(4):388–403.
10. Herold G. *Innere Medizin 2014*. Köln2013. 1000 Seiten p.
11. Turkbey EB, McClelland RL, Kronmal RA, Burke GL, Bild DE, Tracy RP, et al. The impact of obesity on the left ventricle: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *JACC Cardiovasc Imaging*. 2010;3(3):266-74.
12. Abbasi SA, Hundley WG, Bluemke DA, Jerosch-Herold M, Blankstein R, Petersen SE, et al. Visceral adiposity and left ventricular remodeling: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2015;25(7):667-76.
13. Devereux RB, Roman MJ, Paranicas M, O'Grady MJ, Lee ET, Welty TK, et al. Impact of diabetes on cardiac structure and function: the strong heart study. *Circulation*. 2000;101(19):2271-6.
14. Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *The Journal of clinical investigation*. 1975;56(1):56–64.
15. Prinz C, Farr M, Hering D, Horstkotte D, Faber L. The diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy. *Dtsch Arztebl Int*. 2011;108(13):209-15.
16. Kempf T, Drexler H, Wollert KC. [Pathophysiology of heart failure]. *Internist (Berl)*. 2007;48(9):899-908.
17. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*. 2016;37(27):2129-200.
18. Simone Gd, Gottdiener JS, Chinali M, Maurer MS. Left ventricular mass predicts heart failure not related to previous myocardial infarction: the Cardiovascular Health Study. *European heart journal*. 2008;29(6):741–7.
19. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *The New England journal of medicine*. 1990;322(22):1561–6.
20. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Left ventricular mass and incidence of coronary heart disease in an elderly cohort. The Framingham Heart Study. *Annals of internal medicine*. 1989;110(2):101–7.
21. Hunter JJ, Chien KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *The New England journal of medicine*. 1999;341(17):1276–83.
22. Healy KO, Waksmonski CA, Altman RK, Stetson PD, Reventovich A, Maurer MS. Perioperative outcome and long-term mortality for heart failure patients undergoing

- intermediate- and high-risk noncardiac surgery: impact of left ventricular ejection fraction. *Congestive heart failure (Greenwich, Conn)*. 2010;16(2):45–9.
23. Mudd JO, Kass DA. Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature*. 2008;451(7181):919-28.
 24. Heineke J, Molkenin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(8):589–600.
 25. Molkenin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*. 1998;93(2):215-28.
 26. Saucerman JJ, Tan PM, Buchholz KS, McCulloch AD, Omens JH. Mechanical regulation of gene expression in cardiac myocytes and fibroblasts. *Nat Rev Cardiol*. 2019;16(6):361-78.
 27. Wilkins BJ, Dai YS, Bueno OF, Parsons SA, Xu J, Plank DM, et al. Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 2004;94(1):110-8.
 28. Backs J, Backs T, Neef S, Kreusser MM, Lehmann LH, Patrick DM, et al. The delta isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(7):2342-7.
 29. Zhang CL, McKinsey TA, Chang S, Antos CL, Hill JA, Olson EN. Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell*. 2002;110(4):479-88.
 30. Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet*. 2009;10(1):32-42.
 31. Ling H, Zhang T, Pereira L, Means CK, Cheng H, Gu Y, et al. Requirement for Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice. *J Clin Invest*. 2009;119(5):1230-40.
 32. Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Klevitsky R, et al. PKC- α regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med*. 2004;10(3):248-54.
 33. Kadambi VJ, Ponniah S, Harrer JM, Hoit BD, Dorn GW, 2nd, Walsh RA, et al. Cardiac-specific overexpression of phospholamban alters calcium kinetics and resultant cardiomyocyte mechanics in transgenic mice. *J Clin Invest*. 1996;97(2):533-9.
 34. Luo W, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, et al. Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ Res*. 1994;75(3):401-9.
 35. Geraldes P, King GL. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res*. 2010;106(8):1319-31.
 36. Rose BA, Force T, Wang Y. Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: angels versus demons in a heart-breaking tale. *Physiol Rev*. 2010;90(4):1507-46.
 37. Turner NA, Blythe NM. Cardiac Fibroblast p38 MAPK: A Critical Regulator of Myocardial Remodeling. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2019;6(3).
 38. van den Borne SW, Diez J, Blankesteyn WM, Verjans J, Hofstra L, Narula J. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nat Rev Cardiol*. 2010;7(1):30-7.
 39. Titus MA. Myosin-Driven Intracellular Transport. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2018;10(3).
 40. Svitkina T. The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2018;10(1).
 41. Kawasaki Y, Imaizumi T, Matsuura H, Ohara S, Takano K, Suyama K, et al. Renal expression of alpha-smooth muscle actin and c-Met in children with Henoch-Schönlein purpura nephritis. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*. 2008;23(6):913–9.
 42. Elberg G, Chen L, Elberg D, Chan MD, Logan CJ, Turman MA. MKL1 mediates TGF- β 1-induced alpha-smooth muscle actin expression in human renal epithelial cells. *American journal of physiology Renal physiology*. 2008;294(5):F1116-28.

43. Nakatani T, Honda E, Hayakawa S, Sato M, Satoh K, Kudo M, et al. Effects of decorin on the expression of alpha-smooth muscle actin in a human myofibroblast cell line. *Molecular and cellular biochemistry*. 2008;308(1-2):201–7.
44. Staal SP. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(14):5034–7.
45. Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science (New York, NY)*. 1991;254(5029):274–7.
46. Bellacosa A, Testa JR, Moore R, Larue L. A portrait of AKT kinases: human cancer and animal models depict a family with strong individualities. *Cancer biology & therapy*. 2004;3(3):268–75.
47. Oudit GY, Sun H, Kerfant BG, Crackower MA, Penninger JM, Backx PH. The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;37(2):449-71.
48. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 2002;296(5573):1655-7.
49. Proud CG. Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2004;63(3):403-13.
50. Zhang D, Contu R, Latronico MV, Zhang J, Rizzi R, Catalucci D, et al. MTORC1 regulates cardiac function and myocyte survival through 4E-BP1 inhibition in mice. *J Clin Invest*. 2010;120(8):2805-16.
51. Boudina S, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation*. 2007;115(25):3213-23.
52. Bando YK, Murohara T. Diabetes-related heart failure. *Circ J*. 2014;78(3):576-83.
53. Schilling JD, Mann DL. Diabetic cardiomyopathy: bench to bedside. *Heart Fail Clin*. 2012;8(4):619-31.
54. Szczepaniak LS, Victor RG, Orci L, Unger RH. Forgotten but not gone: the rediscovery of fatty heart, the most common unrecognized disease in America. *Circ Res*. 2007;101(8):759-67.
55. Park JY, Li W, Zheng D, Zhai P, Zhao Y, Matsuda T, et al. Comparative analysis of mRNA isoform expression in cardiac hypertrophy and development reveals multiple post-transcriptional regulatory modules. *PLoS One*. 2011;6(7):e22391.
56. Mann DL. Left ventricular size and shape: determinants of mechanical signal transduction pathways. *Heart Fail Rev*. 2005;10(2):95-100.
57. Swynghedauw B. Darwinian evolution and cardiovascular remodeling. *Heart Fail Rev*. 2016;21(6):795-802.
58. Kim SH, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol*. 2011;209(2):139-51.
59. Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA. Connexin family of gap junction proteins. *The Journal of membrane biology*. 1990;116(3):187–94.
60. Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell*. 1996;84(3):381–8.
61. Gros DB, Jongsma HJ. Connexins in mammalian heart function. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 1996;18(9):719–30.
62. Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annual review of biochemistry*. 1996;65:475–502.
63. Sigurdson W, Ruknudin A, Sachs F. Calcium imaging of mechanically induced fluxes in tissue-cultured chick heart: role of stretch-activated ion channels. *Am J Physiol*. 1992;262(4 Pt 2):H1110-5.
64. Lyford GL, Strege PR, Shepard A, Ou Y, Ermilov L, Miller SM, et al. alpha(1C) (Ca(V)1.2) L-type calcium channel mediates mechanosensitive calcium regulation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;283(3):C1001-8.

65. Rosa AO, Yamaguchi N, Morad M. Mechanical regulation of native and the recombinant calcium channel. *Cell Calcium*. 2013;53(4):264-74.
66. Katanosaka Y, Iwasaki K, Ujihara Y, Takatsu S, Nishitsuji K, Kanagawa M, et al. TRPV2 is critical for the maintenance of cardiac structure and function in mice. *Nat Commun*. 2014;5:3932.
67. Qi Y, Li Z, Kong CW, Tang NL, Huang Y, Li RA, et al. Uniaxial cyclic stretch stimulates TRPV4 to induce realignment of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;87:65-73.
68. Eder P, Molkentin JD. TRPC channels as effectors of cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 2011;108(2):265-72.
69. Kuwahara K, Wang Y, McAnally J, Richardson JA, Bassel-Duby R, Hill JA, et al. TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling. *J Clin Invest*. 2006;116(12):3114-26.
70. Correll RN, Goonasekera SA, van Berlo JH, Burr AR, Accornero F, Zhang H, et al. STIM1 elevation in the heart results in aberrant Ca(2)(+) handling and cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;87:38-47.
71. Troupes CD, Wallner M, Borghetti G, Zhang C, Mohsin S, von Lewinski D, et al. Role of STIM1 (Stromal Interaction Molecule 1) in Hypertrophy-Related Contractile Dysfunction. *Circ Res*. 2017;121(2):125-36.
72. Luo X, Hojaye B, Jiang N, Wang ZV, Tandan S, Rakalin A, et al. STIM1-dependent store-operated Ca(2)(+) entry is required for pathological cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52(1):136-47.
73. Volpe M, Carnovali M, Mastromarino V. The natriuretic peptides system in the pathophysiology of heart failure: from molecular basis to treatment. *Clin Sci (Lond)*. 2016;130(2):57-77.
74. Rubattu S, Volpe M. Natriuretic Peptides in the Cardiovascular System: Multifaceted Roles in Physiology, Pathology and Therapeutics. *Int J Mol Sci*. 2019;20(16).
75. Volpe M, Rubattu S, Burnett J, Jr. Natriuretic peptides in cardiovascular diseases: current use and perspectives. *Eur Heart J*. 2014;35(7):419-25.
76. Calvieri C, Rubattu S, Volpe M. Molecular mechanisms underlying cardiac antihypertrophic and antifibrotic effects of natriuretic peptides. *J Mol Med (Berl)*. 2012;90(1):5-13.
77. Molkentin JD. A friend within the heart: natriuretic peptide receptor signaling. *J Clin Invest*. 2003;111(9):1275-7.
78. Rainer PP, Kass DA. Old dog, new tricks: novel cardiac targets and stress regulation by protein kinase G. *Cardiovasc Res*. 2016;111(2):154-62.
79. Delcarpio JB, Lanson NA, Field LJ, Claycomb WC. Morphological characterization of cardiomyocytes isolated from a transplantable cardiac tumor derived from transgenic mouse atria (AT-1 cells). *Circulation research*. 1991;69(6):1591-600.
80. Field LJ. Atrial natriuretic factor-SV40 T antigen transgenes produce tumors and cardiac arrhythmias in mice. *Science (New York, NY)*. 1988;239(4843):1029-33.
81. Claycomb WC, Lanson NA, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, et al. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(6):2979-84.
82. White SM, Constantin PE, Claycomb WC. Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2004;286(3):H823-9.
83. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
84. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72.
85. Bundesärztekammer (BÄK) KBK, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische

- Herzinsuffizienz – Langfassung, 3. Auflage. 2019 (12.04.2021). <https://www.leitlinien.de/nvl/herzinsuffizienz>. (Zuletzt abgerufen am 23.07.2022)
86. Müller-Werdan U, Werdan K. Chronische Herzinsuffizienz: Die Zahl der Patienten steigt, aber auch die differenzierter Therapien. *Deutsches Ärzteblatt*. 2016(25).
87. Destatis. Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html>. (Zuletzt abgerufen am 23.07.2022)
88. Destatis. Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachen die höchsten Kosten https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2017/09/PD17_347_236.html;jsessionid=F41B304B298614241CD499DED346C9D2.live732. (Zuletzt abgerufen am 23.07.2022)
89. Neumann T, Biermann J, Erbel R, Neumann A, Wasem J, Ertl G, et al. Heart failure: the commonest reason for hospital admission in Germany: medical and economic perspectives. *Deutsches Ärzteblatt international*. 2009;106(16):269–75.
90. Fleck E. Herzinsuffizienz: Verdoppelung der Betroffenen in den letzten 20 Jahren, Rückgang der Sterbeziffer 2018 <https://idw-online.de/de/news687614>. (Zuletzt abgerufen am 23.07.2022)
91. DSO. Statistiken zur Organtransplantation im Überblick 2020 <https://www.dso.de/organspende/statistiken-berichte/organtransplantation>. (Zuletzt abgerufen am: 23.07.2022)
92. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res*. 2004;95(1):9-20.
93. Sid-Otmane C, Perrault LP, Ly HQ. Mesenchymal stem cell mediates cardiac repair through autocrine, paracrine and endocrine axes. *J Transl Med*. 2020;18(1):336.
94. Segers VFM, Lee RT. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature*. 2008;451(7181):937–42.
95. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007;110(10):3499–506.
96. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2006;24(2):386–98.
97. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell stem cell*. 2008;2(2):141–50.
98. Eschenhagen T, Bolli R, Braun T, Field LJ, Fleischmann BK, Frisén J, et al. Cardiomyocyte Regeneration: A Consensus Statement. *Circulation*. 2017;136(7):680–6.
99. Sensebé L, Krampera M, Schrezenmeier H, Bourin P, Giordano R. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox sanguinis*. 2010;98(2):93–107.
100. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*. 2001;357(9252):279-80.
101. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*. 2003;361(9351):45-6.
102. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;938:221-9; discussion 9-30.
103. Kudo M, Wang Y, Wani MA, Xu M, Ayub A, Ashraf M. Implantation of bone marrow stem cells reduces the infarction and fibrosis in ischemic mouse heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2003;35(9):1113–9.
104. Karpov AA, Uspenskaya YK, Minasian SM, Puzanov MV, Dmitrieva RI, Bilibina AA, et al. The effect of bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation on myocardial remodelling in the rat model of ischaemic heart failure. *Int J Exp Pathol*. 2013;94(3):169-77.

105. Dai W, Hale SL, Martin BJ, Kuang JQ, Dow JS, Wold LE, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. *Circulation*. 2005;112(2):214-23.
106. Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskouei BN, Hu Q, Feigenbaum GS, Margitich IS, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res*. 2010;107(7):913-22.
107. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, Suncion VY, et al. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA*. 2012;308(22):2369-79.
108. Hare JM, DiFede DL, Rieger AC, Florea V, Landin AM, El-Khorazaty J, et al. Randomized Comparison of Allogeneic Versus Autologous Mesenchymal Stem Cells for Nonischemic Dilated Cardiomyopathy: POSEIDON-DCM Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69(5):526-37.
109. Butler J, Epstein SE, Greene SJ, Quyyumi AA, Sikora S, Kim RJ, et al. Intravenous Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Nonischemic Cardiomyopathy: Safety and Efficacy Results of a Phase II-A Randomized Trial. *Circ Res*. 2017;120(2):332-40.
110. Karantalis V, DiFede DL, Gerstenblith G, Pham S, Symes J, Zambrano JP, et al. Autologous mesenchymal stem cells produce concordant improvements in regional function, tissue perfusion, and fibrotic burden when administered to patients undergoing coronary artery bypass grafting: The Prospective Randomized Study of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Patients Undergoing Cardiac Surgery (PROMETHEUS) trial. *Circ Res*. 2014;114(8):1302-10.
111. Karantalis V, Suncion-Loescher VY, Bagno L, Golpanian S, Wolf A, Sanina C, et al. Synergistic Effects of Combined Cell Therapy for Chronic Ischemic Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66(18):1990-9.
112. Mathiasen AB, Qayyum AA, Jorgensen E, Helqvist S, Fischer-Nielsen A, Kofoed KF, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment in patients with severe ischaemic heart failure: a randomized placebo-controlled trial (MSC-HF trial). *Eur Heart J*. 2015;36(27):1744-53.
113. Perin EC, Borow KM, Silva GV, DeMaria AN, Marroquin OC, Huang PP, et al. A Phase II Dose-Escalation Study of Allogeneic Mesenchymal Precursor Cells in Patients With Ischemic or Nonischemic Heart Failure. *Circ Res*. 2015;117(6):576-84.
114. Wehman B, Sharma S, Pietris N, Mishra R, Siddiqui OT, Bigham G, et al. Mesenchymal stem cells preserve neonatal right ventricular function in a porcine model of pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;310(11):H1816-26.
115. Cai B, Tan X, Zhang Y, Li X, Wang X, Zhu J, et al. Mesenchymal Stem Cells and Cardiomyocytes Interplay to Prevent Myocardial Hypertrophy. *Stem Cells Transl Med*. 2015;4(12):1425-35.
116. Yusuf S. Contrasting patterns of cardiovascular disease, cancers and related mortality between high- versus low-middle income countries. Vorgestellt in der Sitzung „Hot line 5“. Kongress der European Society of Cardiology (ESC); 31.8.–4.9.2019; Paris2019.
117. Statista. Häufigste Todesursachen weltweit im Jahr 2019 <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/38995/umfrage/weltweite-odesfaelle-aufgrund-chronischer-krankheiten/>. (Zuletzt abgerufen am 23.07.2022)
118. Statista. Häufigste Todesursachen in Deutschland 2020 <https://de.statista.com/themen/69/todesursachen/>. (Zuletzt abgerufen am 23.07.2022)
119. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318(5858):1917-20.
120. Yamanaka S. A fresh look at iPS cells. *Cell*. 2009;137(1):13–7.
121. Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. 2007;448(7151):318–24.
122. Pfannkuche K, Liang H, Hannes T, Xi J, Fatima A, Nguemo F, et al. Cardiac myocytes derived from murine reprogrammed fibroblasts: intact hormonal regulation, cardiac ion channel

expression and development of contractility. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2009;24(1-2):73–86.

123. Kuzmenkin A, Liang H, Xu G, Pfannkuche K, Eichhorn H, Fatima A, et al. Functional characterization of cardiomyocytes derived from murine induced pluripotent stem cells in vitro. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2009;23(12):4168–80.

124. Mauritz C, Schwanke K, Reppel M, Neef S, Katsirntaki K, Maier LS, et al. Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation*. 2008;118(5):507–17.

125. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature protocols*. 2006;1(3):1458–61.

126. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156-9.

127. Chaanine AH, Hajjar RJ. AKT signalling in the failing heart. *Eur J Heart Fail*. 2011;13(8):825-9.

128. Kern S, Feng HZ, Wei H, Cala S, Jin JP. Up-regulation of alpha-smooth muscle actin in cardiomyocytes from non-hypertrophic and non-failing transgenic mouse hearts expressing N-terminal truncated cardiac troponin I. *FEBS Open Bio*. 2013;4:11-7.

129. Peters NS, Green CR, Poole-Wilson PA, Severs NJ. Reduced content of connexin43 gap junctions in ventricular myocardium from hypertrophied and ischemic human hearts. *Circulation*. 1993;88(3):864–75.

130. Thomas RL, Roberts DJ, Kubli DA, Lee Y, Quinsay MN, Owens JB, et al. Loss of MCL-1 leads to impaired autophagy and rapid development of heart failure. *Genes & development*. 2013;27(12):1365–77.

131. Feng X-J, Gao H, Gao S, Li Z, Li H, Lu J, et al. The orphan receptor NOR1 participates in isoprenaline-induced cardiac hypertrophy by regulating PARP-1. *British journal of pharmacology*. 2015;172(11):2852–63.

132. Fierabracci A, Del Fattore A, Muraca M. The Immunoregulatory Activity of Mesenchymal Stem Cells: 'State of Art' and 'Future Avenues'. *Curr Med Chem*. 2016;23(27):3014-24.

133. Hu C, Li L. Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med*. 2018;22(3):1428-42.

134. Sartiani L, Bochet P, Cerbai E, Mugelli A, Fischmeister R. Functional expression of the hyperpolarization-activated, non-selective cation current I_f in immortalized HL-1 cardiomyocytes. *J Physiol*. 2002;545(1):81-92.

135. Pelloux S, Robillard J, Ferrera R, Bilbaut A, Ojeda C, Saks V, et al. Non-beating HL-1 cells for confocal microscopy: application to mitochondrial functions during cardiac preconditioning. *Prog Biophys Mol Biol*. 2006;90(1-3):270-98.

136. Dias P, Desplantez T, El-Harasis MA, Chowdhury RA, Ullrich ND, Cabestrero de Diego A, et al. Characterisation of connexin expression and electrophysiological properties in stable clones of the HL-1 myocyte cell line. *PLoS One*. 2014;9(2):e90266.

137. Peng C, Luo X, Li S, Sun H. Phenylephrine-induced cardiac hypertrophy is attenuated by a histone acetylase inhibitor anacardic acid in mice. *Mol Biosyst*. 2017;13(4):714-24.

138. Ohkura N, Ito M, Tsukada T, Sasaki K, Yamaguchi K, Miki K. Structure, mapping and expression of a human NOR-1 gene, the third member of the Nur77/NGFI-B family. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1308(3):205-14.

139. Medzikovic L, de Vries CJM, Waard Vd. NR4A nuclear receptors in cardiac remodeling and neurohormonal regulation. *Trends in cardiovascular medicine*. 2019;29(8):429–37.

140. Walton RG, Zhu X, Tian L, Heywood EB, Liu J, Hill HS, et al. AP2-NR4A3 transgenic mice display reduced serum epinephrine because of increased catecholamine catabolism in adipose tissue. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2016;311(1):E69-81.

141. Myers SA, Eriksson N, Burow R, Wang S-CM, Muscat GEO. Beta-adrenergic signaling regulates NR4A nuclear receptor and metabolic gene expression in multiple tissues. *Molecular and cellular endocrinology*. 2009;309(1-2):101–8.
142. Cañes L, Martí-Pàmies I, Ballester-Servera C, Herraiz-Martínez A, Alonso J, Galán M, et al. Neuron-derived orphan receptor-1 modulates cardiac gene expression and exacerbates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2020;134(3):359–77.
143. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev*. 1999;79(1):215-62.
144. Herring JA, Elison WS, Tessem JS. Function of Nr4a Orphan Nuclear Receptors in Proliferation, Apoptosis and Fuel Utilization Across Tissues. *Cells*. 2019;8(11).
145. Peters NS. New insights into myocardial arrhythmogenesis: distribution of gap-junctional coupling in normal, ischaemic and hypertrophied human hearts. *Clinical science (London, England : 1979)*. 1996;90(6):447–52.
146. Kostin S, Dammer S, Hein S, Klovekorn WP, Bauer EP, Schaper J. Connexin 43 expression and distribution in compensated and decompensated cardiac hypertrophy in patients with aortic stenosis. *Cardiovascular research*. 2004;62(2):426–36.
147. Bellafore M, Sivverini G, Palumbo D, Macaluso F, Bianco A, Palma A, et al. Increased cx43 and angiogenesis in exercised mouse hearts. *International journal of sports medicine*. 2007;28(9):749–55.
148. Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, Brancaccio M, et al. PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell*. 2004;118(3):375–87.
149. Wu CF, Bishopric NH, Pratt RE. Atrial natriuretic peptide induces apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(23):14860–6.
150. Hornstein T, Lehmann S, Philipp D, Detmer S, Hoffmann M, Peter C, et al. Staurosporine resistance in inflammatory neutrophils is associated with the inhibition of caspase- and proteasome-mediated Mcl-1 degradation. *Journal of leukocyte biology*. 2016;99(1):163–74.
151. Wang X, Bathina M, Lynch J, Koss B, Calabrese C, Frase S, et al. Deletion of MCL-1 causes lethal cardiac failure and mitochondrial dysfunction. *Genes & development*. 2013;27(12):1351–64.
152. Black FM, Packer SE, Parker TG, Michael LH, Roberts R, Schwartz RJ, et al. The vascular smooth muscle alpha-actin gene is reactivated during cardiac hypertrophy provoked by load. *The Journal of clinical investigation*. 1991;88(5):1581–8.
153. Leslie KO, Taatjes DJ, Schwarz J, vonTurkovich M, Low RB. Cardiac myofibroblasts express alpha smooth muscle actin during right ventricular pressure overload in the rabbit. *The American journal of pathology*. 1991;139(1):207–16.
154. Thomas ED. A history of haemopoietic cell transplantation. *Br J Haematol*. 1999;105(2):330-9.
155. Calderon D, Planat-Benard V, Bellamy V, Vanneaux V, Kuhn C, Peyrard S, et al. Immune response to human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors and adipose-derived stromal cells. *J Cell Mol Med*. 2012;16(7):1544-52.
156. Kofidis T, deBruin JL, Tanaka M, Zwierzchoniewska M, Weissman I, Fedoseyeva E, et al. They are not stealthy in the heart: embryonic stem cells trigger cell infiltration, humoral and T-lymphocyte-based host immune response. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2005;28(3):461-6.
157. Ball SG, Shuttleworth AC, Kielty CM. Direct cell contact influences bone marrow mesenchymal stem cell fate. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(4):714-27.
158. Wang T, Xu Z, Jiang W, Ma A. Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell. *Int J Cardiol*. 2006;109(1):74-81.
159. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006;98(5):1076-84.
160. Gnecci M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008;103(11):1204-19.

161. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res.* 2004;94(5):678-85.
162. Philipp D, Holthaus M, Basoah V, Pfannkuche K, Suhr L, Wahlers T, et al. VEGF Contributes to Mesenchymal Stem Cell-Mediated Reversion of Nor1-Dependent Hypertrophy in iPS Cell-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cells Int.* 2021;2021:8888575.
163. Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilber ME, Field LJ, et al. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1991;88(18):8277–81.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Allgemeine Merkmale der physiologischen und pathologischen Hypertrophie (modifiziert nach ⁷).....	14
Abbildung 2.2: Physiologische und pathologische kardiale Hypertrophie (modifiziert nach ^{7, 16})	16
Abbildung 2.3: Signalkaskaden der Hypertrophie (vereinfacht und modifiziert nach ^{7, 23, 24});	19
Abbildung 3.1: Neubauer- Zählkammer ohne aufgelegtes Deckglas (links) und Quadrantenmuster einer Neubauer- Zählkammer (rechts)	39
Abbildung 3.2: Versuchsaufbau Co- Kultur iPS - CM (8×10^5 Zellen/ Well) und mMSCs ($1,6 \times 10^5$ Zellen/ Well)	40
Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Lichtwege im BD FACSCalibur™.....	42
Abbildung 3.4: Exemplarische Darstellung des Histogramms und des Dot Plots der im BD FACSCalibur™ untersuchten Zellen.....	43
Abbildung 3.5: Phasentrennung nach Hinzugabe von Trizol und Zentrifugation (10 min; $12.000 g$, 4°C).....	46
Abbildung 3.6: Aufbau des Transfers als schematische Darstellung.....	53
Abbildung 4.1: Hypertrophieinduktion in HL - 1 Zellen und iPS - CM.	57
Abbildung 4.2: Bestimmung der Apoptoserate nach Hypertrophieinduktion in HL - 1 Zellen und iPS - CM.....	59
Abbildung 4.3: Einfluss von PE auf die Genexpression in iPS - CM.....	67
Abbildung 4.4: Einfluss von PE auf die Proteinexpression in HL-1 Zellen.	68
Abbildung 4.5: Einfluss von PE auf die Proteinexpression in iPS - CM.	69
Abbildung 4.6: Einfluss von MSCs/aMSCs auf die Proteinexpression in mit PE hypertrophierten iPS - CM.....	72

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Mastermix für je eine Probe der reversen Transkription	48
Tabelle 3.2: Reaktionsbedingungen für das Umschreiben der RNA in cDNA.....	49
Tabelle 3.3: NOR- 1 Genexpression Mastermix.....	50
Tabelle 3.4: 18S Genexpression Mastermix	50
Tabelle 3.5: Trenngel für SDS- Page	52
Tabelle 3.6: Sammelgel für SDS- Page	52
Tabelle 4.1: Transkriptomanalyse hypertrophiereregulierter Gene in HL - 1 Kardiomyozyten.	61
Tabelle 4.2: Transkriptomanalyse hypertrophiereregulierter Gene in iPS - CM.	65
Tabelle 4.3: Aus der Transkriptomanalyse ausgewählte hypertrophiereregulierte Gene in iPS - CM.....	66

8 Vorabveröffentlichung

Artikel:

Philipp D, Holthaus M, Basoah V, Pfannkuche K, Suhr L, Wahlers T, et al. VEGF Contributes to Mesenchymal Stem Cell-Mediated Reversion of Nor1-Dependent Hypertrophy in iPS Cell-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cells Int.* 2021;2021:8888575.

Präsentation:

Suhr L, Basoah V, Philipp D, Wahlers T, Choi YH, Paunel-Görgülü A. The Orphan Receptor NOR1 And Connexin 43 Play An Essential Role For Hypertrophy In Induced Pluripotent Stem Cells-Derived Cardiomyocytes (iPS-CM). 68th Congress of the European Society of Cardiovascular and Endovascular Surgery (ESCVS); Groningen, Netherlands 2019.