

Aus dem Herzzentrum der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. St. Baldus

Untersuchung der pleiotropen Effekte von nitrierten Fettsäuren in einem Mausmodell der dilatativen Kardiomyopathie

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

vorgelegt von
Wibke Schumacher
aus Gummersbach

promoviert am 14. November 2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2023

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

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. S. Baldus
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 Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten: Dr. med. Simon Braumann, Simon Geißen.

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 angegebenen Experimente sind von mir mit Unterstützung von Herrn Simon Braumann durchgeführt worden.

Bei der Einarbeitung in die unterschiedlichen Methoden sowie der Durchführung einzelner Experimente habe ich Unterstützung der medizinisch-technischen Assistent*innen Herrn Simon Grimm, Frau Nadja Kulesza und Christina Voßen sowie Frau Dr. Sakine Simseyilmaz erhalten. Die Picrosirius-Rot-Färbung wurde weitestgehend durch Herrn Simon Braumann und Herrn Nam Gyu Im durchgeführt und gemeinsam ausgewertet. Teile der Hypothesen beruhen auf den Vorarbeiten von Herrn Simon Braumann und Herrn Nam Gyu Im, an der entsprechenden Stelle wurde dies gekennzeichnet. Die Durchführung und Auswertung der TGF β -Verdünnungsreihe erfolgten unter meiner Anleitung und Aufsicht als Teil ihrer Bachelor-Arbeit durch die Studierende Frau Sofia Sechi.

Die Pumpenimplantation sowie die Explantation der Ventrikel sowie deren weitere Aufbereitung wurden von mir gemeinsam mit Herrn Simon Braumann sowie Herrn Simon Geißen durchgeführt. Nach Einarbeitung in die Methoden führte ich die qPCR und das Design der Primer, die Immunoblots, die ELISAs und kolorimetrischen Assays sowie die Immunofluoreszenzfärbungen selbstständig durch. Die Vorbereitung der Proben für die FACS-Messungen erfolgte durch Herrn Simon Braumann und mich. Die Auswertungen der FACS- sowie Cell-Sorting-Messungen erfolgten zu größten Teilen durch Herrn Simon Braumann.

Das Manuskript für die Veröffentlichung hat Herr Braumann mit meiner Hilfe, sowie der Hilfe der Co-Autoren, verfasst und eingereicht.

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 08.08.2023

Unterschrift: *W. Schumacher*

Danksagung

Ich möchte mich bei allen herzlich bedanken, die auf vielfältige Weise zur Fertigstellung meiner Dissertation beigetragen haben.

Herrn Professor Stephan Baldus danke ich für die Möglichkeit, in der Arbeitsgruppe für experimentelle Kardiologie arbeiten und lernen zu dürfen. Herrn Dr. Martin Mollenhauer danke ich für das Überlassen des Themas sowie die ständige Forderung und Förderung während der Experimente.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Dr. med. Simon Braumann, der mir gezeigt hat, was gute wissenschaftliche Praxis bedeutet und mich für unser Projekt immer wieder neu begeistern konnte. Seine Geduld mit mir, seine Motivation und seine Förderung waren großartig.

Außerdem möchte ich mich bei Nadja Kulesza, Christina Vosen und Simon Grimm für die Einarbeitung in die Methoden und die technische Unterstützung bedanken.

Der Arbeitsgruppe von Frau Professorin Stebut-Borschitz, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, danke ich für die freundliche Erlaubnis zur Mitbenutzung des gentleMACS™. Herrn Dr. Gunter Rappl sowie der Cell Sorting Facility des Zentrums für Molekulare Medizin in Köln danke ich für die Hilfe bei den Cell Sorting Experimenten.

Ich hatte das große Glück, als medizinische Doktorandin in das DFG-finanzierte CCRC-Graduiertenprogramm aufgenommen zu werden. Für die Unterstützung bei der Aufnahme danke ich Frau Dr. Monika Schlosser und für die schöne Zeit allen Mit-Teilnehmenden.

Danke an Simon Geissen, für intensive Nachbesprechungen, kreatives Brainstorming auf dem Laufband, für zahllose Kaffees und eine tolle Freundschaft.

Ich danke meinen Eltern, die mich von Anfang an bei jeglichen Ideen in meinem Leben unterstützt haben. Danke an meine Mama Kerstin und meinen Bruder Niklas, die mir immer zur Seite stehen. Danke an Werner und Julia, die unsere Familie vervollständigen. Ich danke meinen Freundinnen und Freunden sowie meinen wunderbaren Kolleginnen und Kollegen, die das private und das berufliche Leben schöner machen.

Und danke an Max. Danke für die bedingungslose Unterstützung, das Verständnis, die oft benötigte Geduld und dass ich mich auf dich immer verlassen kann.

*Ich widme diese Arbeit
meinem Vater, der mir in
seiner viel zu kurzen Zeit
auf dieser Welt doch so viel
Mut und Liebe mitgegeben
hat, dass es für mein
ganzes Leben reicht.*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1 Zusammenfassung	13
2 Einleitung	14
2.1 Systematik der Kardiomyopathien.....	14
2.2 Dilatative Kardiomyopathie.....	15
2.2.1 Epidemiologie und Genese der DCM.....	15
2.2.2 Symptome der DCM.....	16
2.2.3 Pathophysiologie der DCM.....	16
2.2.4 Diagnostik der DCM.....	17
2.2.5 Genetik der DCM.....	18
2.2.6 Therapie der DCM.....	20
2.3 Das Muscle LIM Protein Knockout Mausmodell.....	22
2.3.1 Die Mlp ^{-/-} Maus als Modell für die DCM.....	22
2.3.2 Zucht.....	24
2.3.3 Funktionelle Charakteristika der Mlp ^{-/-} Mäuse als Modell für die DCM.....	24
2.4 Nitrierte Fettsäuren.....	25
2.4.1 Synthese nitrierter Fettsäuren.....	25
2.4.2 Nitrierte Fettsäuren in kardiovaskulären Erkrankungen.....	29
2.5 Fragestellung der Arbeit.....	31
3 Material und Methoden	32
3.1 Materialien.....	32
3.1.1 Verwendete Kits und Assays.....	32
3.1.2 Verwendete Geräte und Software.....	32
3.1.3 Medikamente und Applikationen für Tierversuche.....	34
3.1.4 Verwendete Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Lösungen und Zubehör.....	34
3.2 Methoden.....	37
3.2.1 Arbeiten mit der Maus.....	37
3.2.2 Arbeit mit Nukleinsäuren.....	39
3.2.3 Arbeit mit Proteinen.....	42
3.2.4 Arbeiten in der Zellkultur.....	49
3.2.5 Histologische Färbungen.....	56
3.2.6 Plasma-Gewinnung und TGFβ-Elisa.....	58
3.2.7 Total Collagen Assay.....	59
4 Ergebnisse	61
4.1 Statistische Auswertung.....	61
4.2 Vorarbeiten: Nitrierte Fettsäuren verbesserten die linksventrikuläre Funktion.....	62
4.3 Nitrierte Fettsäuren verbesserten die myokardiale Fibrosierung in erkrankten Mäusen.....	65
4.4 Experimente an Ventrikelgewebe.....	66

4.4.1	NO ₂ -OA verringerte die exprimierte Kollagenmenge in Ventrikeln der behandelten Mäuse	66
4.4.2	Auf mRNA-Ebene bestand kein Unterschied in der Expression von <i>Tgfβ</i> sowie der untersuchten Kollagene	67
4.4.3	Sowohl TGFβ als auch TGFβ/LAP zeigten vermehrte Expression auf Proteinebene in erkrankten Mäusen	68
4.4.4	Auf mRNA- sowie auf Proteinebene zeigten sich keine Unterschiede in der Expression des TGFβ-Rezeptors 1	69
4.4.5	Die Behandlung mit NO ₂ -OA veränderte die Aktivität der Matrixmetalloproteasen 2 und 9 in der in situ Zymographie	70
4.5	In Vitro-Ergebnisse: Etablierung einer primären Fibroblastenkultur.....	71
4.5.1	Isolation mittels OctoMACS sowie anschließende Cell-Sorting-Analyse	71
4.5.2	In der Cell-Sorting Analyse war keine Isolation von primären Fibroblasten im <i>Mlp^{-/-}</i> Modell möglich	71
4.5.3	Isolierte Fibroblasten exprimierten kein MLP	73
4.5.4	In isolierten Fibroblasten zeigten sich nach Stimulation Unterschiede im TGFβ-Signalweg	74
4.5.5	NO ₂ -OA verhinderte die Transdifferenzierung vom ruhenden Fibroblasten zum aktivierten Myofibroblasten	77
5	Diskussion.....	81
5.1	NO ₂ -OA verbessert die myokardiale Fibrosierung des Myokards in Mäusen mit DCM	82
5.2	Nitrierte Fettsäuren als mögliche neue Therapeutika in Patienten mit DCM	82
5.3	Schlussfolgerung und Limitationen.....	93
6	Literaturverzeichnis	94
7	Anhang	105
7.1	Abbildungsverzeichnis	105
7.2	Tabellenverzeichnis	108
8	Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen.....	109

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
°C	Grad Celsius
%	Prozent
ACE-Hemmer	Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer
AG	Arbeitsgruppe
ARB	Angiotensin-Rezeptorblocker
ARNI	Angiotensin-Rezeptor-Nepriylisin-Inhibitoren
αSMA	alpha-Smooth-Muscle-Actin
BB	Betablocker
BCA	Bicinchoninsäure-Assay
BNP	Brain Natriuretic Peptide
Bpm	Schläge pro Minute
BSA	Bovines Serumalbumin
BTC	Bridge-to-candidacy
BTT	Bridge-to-transplantation
bzw.	beziehungsweise
CABG	Koronarer Bypass
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA, („complementary deoxyribonucleic acid“)
Col1a1, Col3a1	Gennamen von Kollagentypen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRT-D	Kardiale Resynchronisationstherapie mit Defibrillator
CRT-P	Kardiale Resynchronisationstherapie mit Schrittmacher
CSRP3/CRP3	Cysteine Rich Protein 3
ct	cycle threshold
ctrl	control
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DCM	Dilatative Kardiomyopathie, („dilated cardiomyopathy“)
ddH ₂ O	double-distilled Water
DDR2	Discoidin Domain Receptor 2

DMAB	Dimethylaminobenzaldehyd
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium, Nährmedium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DT	Zieltherapie
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Erk	extracellular-signal regulated kinases
pErk	phosphorylierte extracellular-signal regulated kinases
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS/FBS	fetales Kälberserum, ("fetale bovine serum")
FGF	Fibroblast-Growth-Factor
FS	fractional shortening
g	G-Zahl = RCF = relative Zentrifugalkraft
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	hour
HBWR	Heart-to-Body-weight-Ratio
HCl	Chlorwasserstoff/Salzsäure
HF	Herzinsuffizienz
HfmrEF	Herzinsuffizienz mit leicht reduzierter Ejektionsfraktion
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion
HFrEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion
HRP	Horseradishperoxidase
ICD	implantierbarer Kardioderibrillator
IDC	Idiopathische dilatative Kardiomyopathie/idiopathic dilated cardiomyopathy
IF	Immunofluoreszenz
IMS	Immunomagnetic Separation
ISDN	Isosorbiddinitrat
kb	Kilobase

KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KM	Kardiomyopathie
KO	knock-out
L	Liter
LA	Linoleic Acid
LAP	Latency associated Peptide
LSB	Linksschenkelblock
LV	linker Ventrikel
LVAD	Left Ventricular Assistant Device
M	Molar
mA	Miliamper
MACS	magnetic activated cell sorting
MCS	Mechanische Kreislaufunterstützung
MetOH	Methanol
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
MK-TEER	Mitralklappen-Transkatheter Edge-to-Edge Rekonstruktion
ml	Milliliter
mM	mmol/Liter
mmol	Millimol
MMP	Matrixmetalloproteasen
MP	Milchpulver
MRA	Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonist
mRNA	Boten-RNA („Messenger RNA“)
ms	Milisekunden
μN	Mikronewton
μl	Mikroliter
n	Anzahl der Versuchstiere/Experimente

NaCl	Natriumchlorid 0,9 %
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO ₂ -OA	Nitro-Oleic acid
NO ₂ -FA	Nitrated fatty acid
Nr.	Nummer
ns	nicht significant
NYHA	New York Heart Association
OA	Oleic Acid
OD	Optical density
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PEG	Polyethylene Glycol/Ethanol
PEB	Protein Extraction Buffer
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung („phosphate buffered saline“)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion („polymerase chain reaction“)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVI	Pulmonalvenenisolation
QoL	Lebensqualität
qPCR	quantitative PCR
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay Puffer
RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)
rpm	Rounds per minute
RT	Reverse Transkriptase
RV	Rechter Ventrikel
SAVR	chirurgische Aortenklappenrekonstruktion
s.c.	subkutan
sek	Sekunde
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SGLT2i	sodium glucose transporter 2 Hemmer

Smad	Gruppe von intrazellulären Proteinen, welche zur TGF β -Signalkaskade gehören
SR	Sinusrhythmus
Stat	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
pStat	phosphorlyierte Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
TAVI	Transkatheter-Aortenklappenimplantation
TBS-T	Tris-Buffered Saline + Tween
TEMED	N,N,N',N'- tetramethylethylenediamin
TGF β	Transforming Growth Factor β
TGF β R1	Transforming Growth Factor β 1
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
V	Volt
Vcf	velocity of circumferential fiber shortening
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZMMK	Zentrum für Molekulare Medizin der Universität zu Köln

1 Zusammenfassung

Nitrierte Fettsäuren entstehen durch die Reaktion von Stickstoffoxiden (NO_x) mit einer ungesättigten Fettsäure. Über posttranslationale Modifikationen können die hoch elektrophilen Moleküle die Aktivität von Proteinen beeinflussen. Verschiedene Studien konnten einen antiinflammatorischen sowie antifibrotischen Effekt von nitrierten Fettsäuren, beispielsweise in pulmonaler Hypertonie und Vorhofflimmern, nachweisen. In einem murinen Ischämie-/Reperusionsmodell reduzierte Nitro-Ölsäure (NO₂-OA) außerdem die Infarktgröße sowie die Leukozyteninfiltration. Die Wirksamkeit von NO₂-OA in Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) ist bislang noch nicht bekannt und soll in dieser Arbeit an Versuchstieren mit genetischer *Mip*-Defizienz (*Mip*^{-/-}) untersucht werden. Adulte *Mip*^{-/-} Mäuse entwickeln eine DCM mit eingeschränkter linksventrikulärer Ejektionsfraktion (LV-EF). In Vorarbeiten zu dieser Arbeit sowie der dazugehörigen Publikation konnte gezeigt werden, dass sich die LV-EF in erkrankten Mäusen nach einer subkutanen Infusion mit NO₂-OA signifikant verbessert. In der vorliegenden Dissertation sollen die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen untersucht werden. Dazu erhielten erkrankte Tiere über den Zeitraum von vier Wochen eine kontinuierliche NO₂-OA-Infusion (1,04 nmol/g/h). Die Vergleichsgruppe erhielt die Trägersubstanz Polyethylenglykol (PEG). Die behandelten Versuchstiere zeigten in der Picosirius-Rot-Färbung eine signifikant rückläufige Fibrosierung der linken Ventrikel sowie einen niedrigeren Gesamtkollagenspiegel als ihre nicht behandelten Geschwistertiere. In LV-Homogenaten konnte, unabhängig von der Exposition mit NO₂-OA, eine erhöhte Expression auf mRNA- und Proteinebene von TGFβ, einem der Hauptauslöser von fibrotischen Prozessen, gezeigt werden. Die Auswirkungen von NO₂-OA auf Effektoren des TGFβ-Signalwegs wurden in primären kardialen Fibroblasten untersucht. Nach der Stimulation mit TGFβ (10 ng/ml) und gleichzeitiger Inkubation mit NO₂-OA (1 μM) zeigte sich, dass NO₂-OA die Phosphorylierung von Smad2/3, Stat3 und Erk1/2 signifikant reduziert. Zusätzlich konnte eine Verringerung der Expression von Alpha-smooth-muscle-actin (αSMA) in den behandelten Fibroblasten nachgewiesen werden.

Die Verbesserung der linksventrikulären Funktion ist partiell auf die Rückbildung der Myokardfibrose zurückzuführen. Während keine Effekte auf direkte Veränderungen der TGFβ-Spiegel nachgewiesen werden konnten, hemmt NO₂-OA die TGFβ-induzierte Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten *in vitro* über die Modifikation wichtiger Signalmoleküle im TGFβ-Signalweg. Die Daten zeigen eine antifibrotische Wirkung von NO₂-OA in DCM. Damit stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit mit anderen Studien überein, die zeigen, dass nitrierte Fettsäuren pleiotrope Effekte erzielen und in Zukunft als potenzielle antifibrotische Therapieoption für kardiovaskuläre Erkrankungen, inklusive der DCM, zu diskutieren sind.

2 Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind für einen großen Teil der Mortalität und Morbidität in sogenannten High-Income-Countries verantwortlich. Im Jahr 2020 haben die Folgen von kardiovaskulären Erkrankungen, beispielsweise Myokardinfarkte, Herzinsuffizienz oder Folgen von langjähriger Hypertonie 34 % aller Todesfälle in Deutschland bedingt. Dies entspricht etwa 338.000 Verstorbenen¹. Auch die Hospitalisierungsrate ist hoch: Etwa neun Prozent aller vollstationär behandelten Patienten sind auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückzuführen². Neben der individuellen Morbidität stellen die Erkrankungen somit auch eine gesellschaftliche und wirtschaftliche Belastung dar. Zu den kardiovaskulären Erkrankungen gehört auch die heterogene Gruppe der Kardiomyopathien (KM), unter denen die dilatative Kardiomyopathie die häufigste Form darstellt³.

2.1 Systematik der Kardiomyopathien

Unter dem Begriff „Kardiomyopathien“ werden unterschiedliche Erkrankungen des Myokards zusammengefasst, die mit einer Funktionseinschränkung einer oder beider Ventrikel einhergehen⁴. In der Vergangenheit gab es bereits verschiedene Ansätze und Versuche, um die sehr heterogene Gruppe systematisch zu ordnen. Bereits im Jahr 1957 beschrieben Brigden et al. die sogenannten „nicht koronaren Kardiomyopathien“ und verwiesen auf die Schwierigkeit der Klassifikation⁵. Im Jahr 1964 wurde erstmals eine morphologische Einteilung zwischen Kardiomyopathien mit kongestiver, verengender und obstruktiver Komponente vorgenommen⁶.

Durch neue Technologien und ein immer größer werdendes Verständnis für zugrundeliegende Pathomechanismen wurde eine immer differenziertere Einteilung möglich. Die WHO unterschied im Jahr 1995 die dilatative Kardiomyopathie, die obstruktive und nicht-obstruktive hypertrophische Kardiomyopathie (H(O)CM), die restriktive Kardiomyopathie (RCM), die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) und die nicht-klassifizierbaren Kardiomyopathien⁴.

Außerdem kann unterschieden werden zwischen primären Formen, die entweder idiopathisch sind - dessen Genese also nicht bekannt ist – oder die durch eine Genmutation ausgelöst werden sowie die sekundären Formen. Diese entstehen als Folge einer anderen Grunderkrankung beziehungsweise einer systemischen Erkrankung. Eine weitere etablierte und für die Therapie entscheidende Unterteilung, die auf alle Formen der Kardiomyopathien angewendet werden kann, richtet sich entsprechend der European Society of Cardiology nach dem Ausmaß der Herzinsuffizienz und insbesondere der Funktion des linken Ventrikels. Ist die Ejektionsfraktion (EF) des linken Ventrikels erhalten (LV-EF \geq 50 %) und sind weitere Kriterien erfüllt, wird die englische Bezeichnung heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF)

genutzt. Ist die Ejektionsfraktion erniedrigt ($LV\text{-}EF \leq 40\%$), dann wird die Herzinsuffizienz als heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF) bezeichnet. Dazwischen liegt die Herzinsuffizienz mit mäßig reduzierter Ejektionsfraktion, die sogenannte HFmrEF ($LV\text{-}EF 41\text{--}49\%$)⁷.

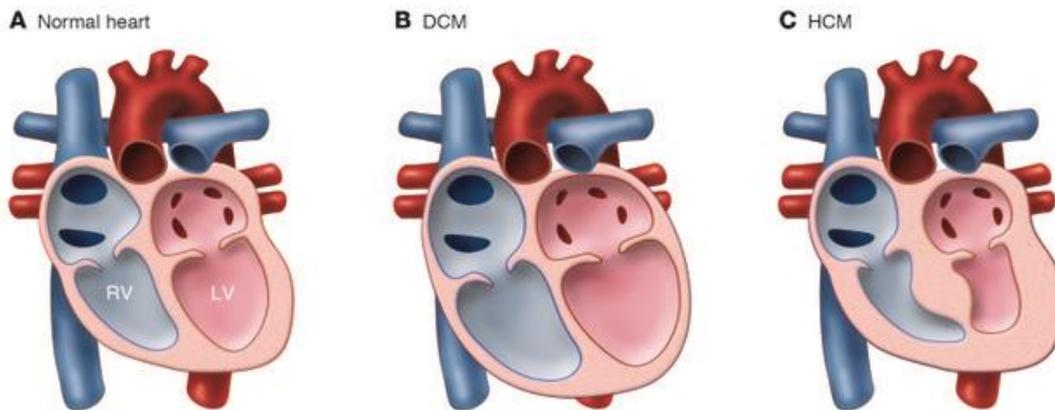


Abbildung 1: (A) Schematische Darstellung eines gesunden Herzens. (B) Bei der dilatativen Kardiomyopathie vergrößert sich das Herz und die LV-Funktion nimmt ab. (C) Bei Patienten mit einer HCM zeigt sich das Myokard verdickt, sodass es sich nur reduziert füllen kann⁸.

2.2 Dilatative Kardiomyopathie

2.2.1 Epidemiologie und Genese der DCM

Mit einer Prävalenz von 40/100.000 ist die DCM eine der häufigsten Ursachen für die Entwicklung einer HFrEF⁹. Die jährliche Inzidenz beträgt 7/100.000 Einwohner. Das mittlere Alter bei Erstvorstellung ist variabel und liegt etwa zwischen 20–50 Jahren¹⁰. Die DCM betrifft meist erwachsene Patienten, ist aber auch für den Großteil aller Kardiomyopathien im Säuglings- und Kindesalter verantwortlich¹¹. Neben der erblichen Form sind die Ursachen heterogen und können in vielen Fällen nicht abschließend geklärt werden (idiopathische dilatative Kardiomyopathie. Noxen wie Alkohol, Kokain oder Metamphetamine) können die Entwicklung einer DCM begünstigen^{12,13}, auch kardiotoxische Medikamente wie Anthrazykline¹⁴ können als unerwünschte Arzneimittelwirkung die DCM auslösen. Viele sekundäre Formen der DCM gehen auf Myokarditiden zurück, beispielsweise ausgelöst durch virale Infektionen mit dem Coxsackievirus B¹⁵. Ob auch das neuartige SARS-CoV-2 mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer DCM einhergeht ist Gegenstand aktueller Studien^{16,17}. Eine Übersicht der heterogenen Ursachen findet sich in Abbildung 2.

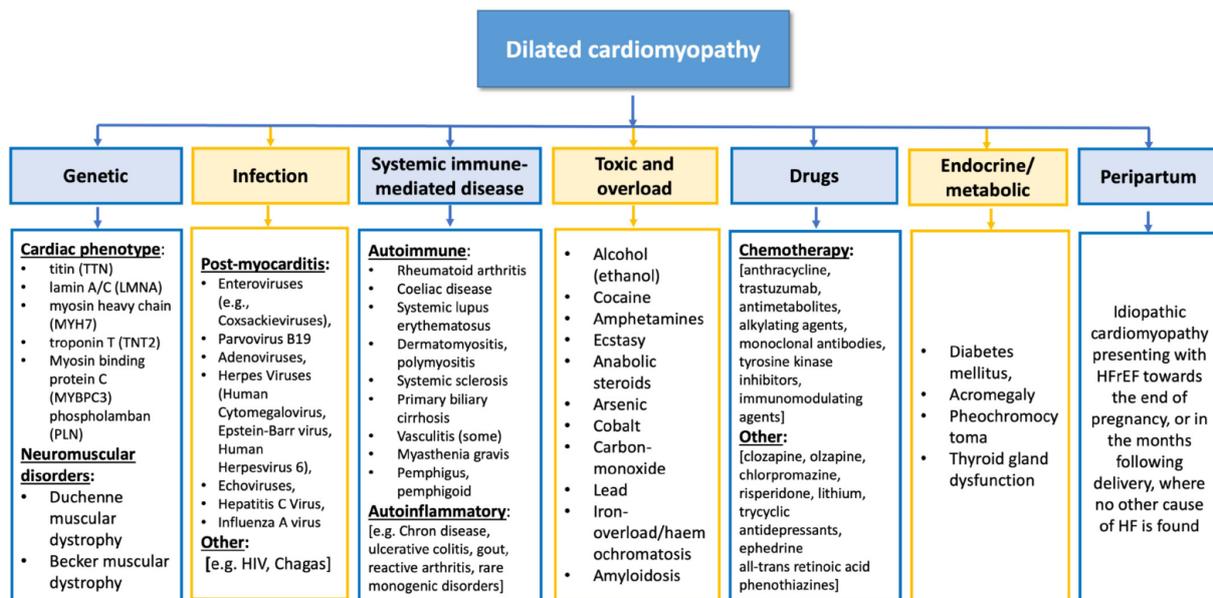


Abbildung 2: Systematische und zusammenfassende Darstellung heterogener Ätiologien, die zu einer DCM führen können¹⁸.

2.2.2 Symptome der DCM

Für Patienten bleibt die Erkrankung zunächst oft lange klinisch inapparent, sodass bei etwa 75-85 % der Patienten bereits bei Diagnosestellung eine manifeste Herzinsuffizienz vorliegt¹⁰. Durch den vergrößerten und dilatierten Ventrikel kommt es zu einer betont linksventrikulären Funktionsstörung mit Hypoperfusion der Peripherie. Diese kann neben einer eingeschränkten Belastbarkeit zu Synkopen, Palpitationen und Schwindelgefühlen führen. Schreitet die Erkrankung weiter fort, kann es außerdem zu Endorganschäden wie einer Niereninsuffizienz kommen. Außerdem entwickeln sich typischerweise eine Belastungsdyspnoe mit Angina pectoris Beschwerden sowie peripheren Ödemen. Im Verlauf kann es außerdem zu Komplikationen wie Rhythmusstörungen, arteriellen und pulmonalen Embolien durch kardiale Thrombenbildung sowie dem plötzlichen Herztod kommen.

2.2.3 Pathophysiologie der DCM

Durch die anhaltende Druck- und Volumenbelastung entstehen bei der DCM unterschiedliche Veränderungen des Myokards. Das Herz der Patienten zeigt sich insgesamt vergrößert mit einem erhöhten Herzgewicht sowie einer Dilatation insbesondere des linken Ventrikels. In Proben aus endomyokardialen Biopsien oder postmortalen Autopsien konnten histologische Korrelate gefunden werden: Neben einer Hypertrophie der Kardiomyozyten, nekrotischen Anteilen und Narbenbildung¹⁹ imponiert histopathologisch eine interstitielle Fibrose.

2.2.4 Diagnostik der DCM

Bei Symptomen, die mit einer DCM vereinbar sind, sollte eine ausführliche Diagnostik in einem spezialisierten Zentrum erfolgen. Durch die heterogene Ätiologie gestaltet sich die Diagnosefindung und Ausschlussdiagnostik anderer Entitäten häufig kompliziert und prolongiert. Zunächst sollte eine ausführliche Anamnese inklusive Familienanamnese, Medikamenteneinnahme, Drogenkonsum, infektiologische Erkrankungen wie HIV sowie die Frage nach der Möglichkeit einer bestehenden Schwangerschaft erhoben werden²⁰ und über seine alltägliche Belastbarkeit das patientenindividuelle NYHA-Stadium²¹ bestimmt werden. Neben einem EKG zum Ausschluss begleitender Herzrhythmusstörungen und als Ausgangspunkt und Vergleich für Verlaufs-EKGs sollte eine transthorakale Echokardiographie (TTE) durchgeführt werden²². Hier wird die LV-EF bestimmt und damit die Kardiomyopathie diagnostiziert. Außerdem kann die Klappenfunktion beurteilt werden. Die TTE wird auch zur Verlaufskontrolle eingesetzt. Typischerweise wird bei der DCM in der Echokardiographie eine Vergrößerung beider Herzhöhlen, mit Betonung des linken Ventrikels²³, sichtbar. Es besteht häufig eine Hypokinesie bei der Kontraktion des Myokards sowie eine HFrEF mit einer LV-EF von $\leq 40\%$. Bedingt durch die Dilatation kann es zu einer funktionellen Mitralklappeninsuffizienz kommen, die mittels Dopplersonographie quantifiziert werden kann. Außerdem können intrakavitäre Thromben nachgewiesen werden. Patienten sollten bei Erstdiagnose außerdem eine laborchemische Kontrolle mit Differentialblutbild, Leber- und Nieren- sowie Schilddrüsenwerten bekommen. Typischerweise zeigen sich erhöhte Level des N-terminalen natriuretischen Peptid Typ B (NT-pro-BNP). Diese klassischen Herzinsuffizienzmarker können auch als Verlaufsparemeter bestimmt werden. Je nach individueller Situation folgen weitere diagnostische Schritte. Zur Bestimmung hämodynamischer Parameter wie des Herzzeitvolumens, der Füllungsdrücke sowie des systemischen Widerstandes, aber auch zum Ausschluss einer koronaren Herzerkrankung kann eine invasive Diagnostik mittels Links- und Rechtsherzkatheteruntersuchung erfolgen. Besteht der Verdacht auf eine fulminante Myokarditis kann eine endomyokardiale Biopsie diesen stützen. Im Röntgen-Thorax zeigt sich bei DCM-Patienten häufig eine Kardiomegalie. Auch eine Kardio-MRT kann zur Diagnosestellung und Klassifikation herangezogen werden.

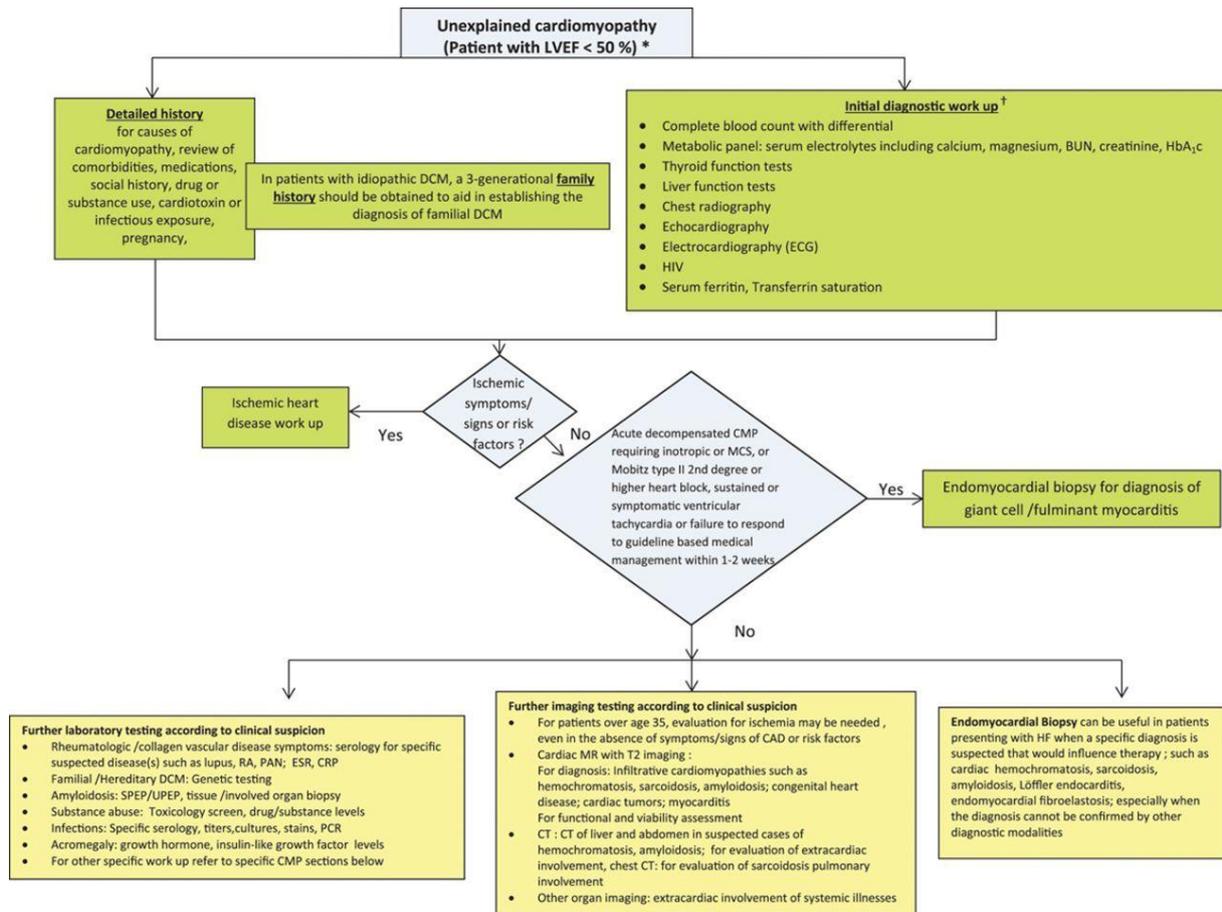


Abbildung 3: Vorschlag zur Diagnosefindung einer DCM sowie zum Ausschluss anderer Differentialdiagnosen der American Heart Association²².

2.2.5 Genetik der DCM

Patienten mit positiver Familienanamnese haben ein erhöhtes Risiko, ebenfalls an einer DCM zu erkranken. Michels et al. konnten zeigen, dass bei einem von fünf Patienten mit idiopathischer DCM die untersuchten Familienmitglieder echokardiographisch ebenfalls die Diagnosekriterien einer DCM erfüllten²⁴. Verschiedene Genmutationen sind mit der Entwicklung einer DCM assoziiert. Meist wird das zugrundeliegende Gen autosomal-dominant mit unterschiedlicher Penetranz vererbt. Auch x-chromosomale autosomal-rezessive sowie mitochondriale Erbgänge sind beschrieben. Die Mutationen führen meist zu einer Veränderung in Proteinen des Zytoskeletts, beispielsweise von Dystrophin, Desmin und Lamin A/C, oder des Sarkomers²⁵, beispielsweise von Actin oder dem Muscle LIM Protein²⁶. Eine Übersicht über bekannte genetische Ursachen für eine DCM ist in Tabelle 1 dargestellt.

Lokalisation im Chromosom	Gen	Protein	Lokalisation des Proteins
Xp21.2	<i>DMD</i>	Dystrophin	Zytoskelett/SL
2q35	<i>DES</i>	Desmin	Zytoskelett
5q34	<i>SGCD</i>	δ-Sarcoglycan	Zytoskelett/Sarkolemm
10q22.1–q23	<i>VCL</i>	Metavinculin	Zytoskelett
1q12	<i>TNNI1</i>	Kardiales Troponin 1	Sarkomer
1q32	<i>TNNT2</i>	Kardiales Troponin Typ 2	Sarkomer
2q31	<i>TTN</i>	Titin	Sarkomer
10q22.1	<i>MYPN</i>	Myopalladin	Sarkomer
10q22.3–23.2	<i>ZASP/Cypher (LDB3)</i>	LIM domain binding protein 3	Sarkomer
1q42–q43	<i>α2-actinin</i>	ACTN	Sarkomer
10q23.22	<i>ANKRD1</i>	CARP	Sarkomer
11p11.2	<i>MYBPC3</i>	Myosin-bindendes Protein-C	Sarkomer
11p15.1	<i>CSRP3</i>	Muscle LIM Protein	Sarkomer
14q11.2–q13	<i>MYH7</i>	β-myosin heavy chain	Sarkomer
15q11–q14	<i>ACTC1</i>	Cardiac actin	Sarkomer
15q22.1	<i>TPM1</i>	α-Tropomyosin	Sarkomer
Xq28	<i>G4.5</i>	Tafazzin	Phospholipid
6q22.1	<i>PLN</i>	Phospholamban	Calcium
6q12–q16	<i>CMD1K</i>	Unbekannt	Unbekannt
9q13–q22	<i>CMD1B</i>	Unbekannt	Unbekannt
9q22–q31	<i>SEMA4D</i>	Unbekannt	Unbekannt
10q25.3	<i>RBM20</i>	RNA binding motif protein 20	Unbekannt

Tabelle 1: Übersicht der identifizierten betroffenen Gene bei genetischen Formen der DCM (modifiziert nach Jefferies et al.)²⁷.

Ist bei einem Patienten der Erbgang einer familiären DCM gesichert, sollte allen erstgradigen Verwandten eine humangenetische Abklärung entsprechend des Gendiagnostikgesetzes angeboten werden. Liegt die als wahrscheinlich pathogen oder gesichert pathogen gewertete Mutation vor, sollten auch bei asymptomatischen Verwandten regelmäßige kardiologische Kontrollen erfolgen²⁸. Durch eine frühzeitige Diagnosestellung kann der Patient bestmöglich eingestellt und die Prognose positiv beeinflusst werden²⁹. Durch aktuelle Methoden wie Next-Generation-Sequencing und großen, international geführten Datenbanken wie beispielsweise dem Exome Study Project oder der Genome Aggregation Database (gnomAD)³⁰ sind in

Zukunft weitere Erkenntnisse des Einflusses von genetischen Variabilitäten in DCM-Patienten zu erwarten.

2.2.6 Therapie der DCM

Die Therapie der DCM richtet sich nach der individuellen Ätiologie, der Symptomatik sowie der vorherrschenden Komplikationen. Führend und prognostisch höchstrelevant ist die Behandlung der eingeschränkten LV-EF sowie im Verlauf die Behandlung von Herzrhythmusstörungen oder Klappenvitien. Außerdem spielen Faktoren wie Alter, Komorbiditäten und Einschränkungen im Alltag eine wichtige Rolle. Somit ist die medikamentöse Einstellung sowie die Planung interventioneller Therapiemöglichkeiten hoch komplex und individuell. Ist die Genese bekannt, so kann ein kausaler Ansatz, i.d.R. durch Behandlung der Grunderkrankung bzw. Vermeidung des Auslösers angestrebt werden. Steht keine Kausaltherapie zur Verfügung oder ist die DCM idiopathisch, steht die symptomatische, leitliniengerechte Therapie der Herzinsuffizienz im Vordergrund. Diese soll die Lebensqualität, Morbidität und Mortalität verbessern, Hospitalisierungen vermeiden sowie die Progression verlangsamen und Komplikationen verhindern. Allen Patienten sollte eine Lifestyle-Modifikation empfohlen werden, beispielsweise eine Gewichtsabnahme, das Verzicht auf Rauchen sowie den Konsum von Alkohol, ein moderates Ausdauertraining sowie Einhalten einer mediterranen Diät. Zur Senkung der Sterblichkeit soll ein Patient mit HFrEF laut aktueller ESC-Leitlinie von 2021⁷ auch bei einem niedrigen NYHA-Stadium eine Multimedikation bestehend aus Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer (ACE-Hemmer)/Angiotensin-Rezeptor-Nepriylsin-Inhibitor (ARNI), Beta-Blocker und Mineralokortikoid-Antagonist erhalten. Zusätzlich wird seit der Zulassung für die Indikation der Herzinsuffizienz im Jahr 2020 der zugelassene SGLT2-Inhibitor, entweder Dapagliflozin oder Empagliflozin, empfohlen. Dieser senkt signifikant das kardiovaskuläre Mortalitätsrisiko sowie die Hospitalisationsrate³¹. Weitere Medikamente, wie Diuretika, gerinnungshemmende Medikamente wie Marcumar oder neue orale Antikoagulanzen, sollten ja nach Nebendiagnosen oder Symptomen zum Einsatz kommen.

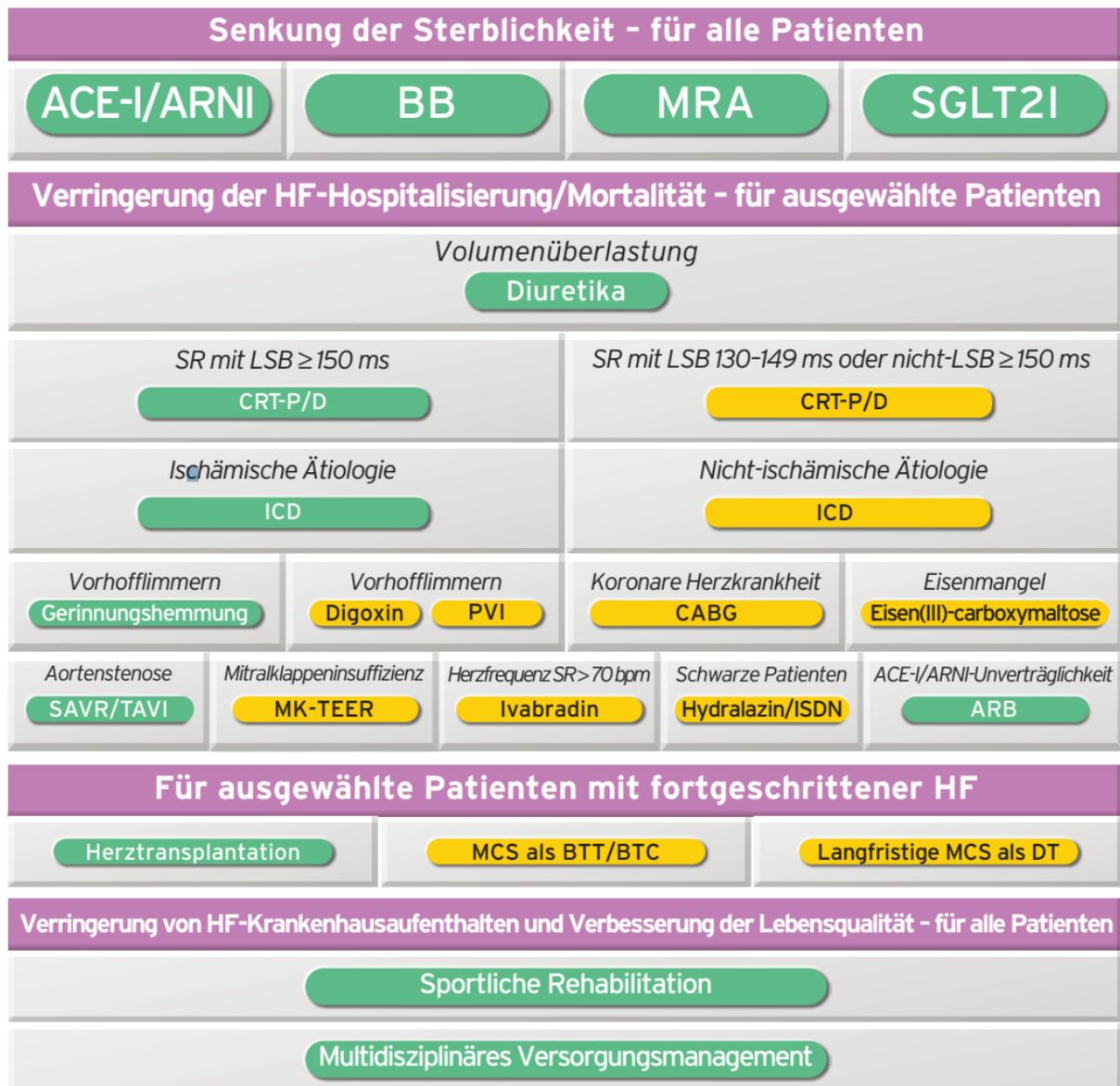


Abbildung 4: Leitliniengerechte Behandlung eines Patienten mit HF_{rEF}, modifiziert aus der Pocket-Leitlinie: Akute und chronische Herzinsuffizienz (Version 2021). ACE-I; ARB = Angiotensin-Rezeptorblocker; ARNI; BB = Betablocker; bpm=Schläge pro Minute; BTC = „bridge-to-candidacy“- Indikation; BTT = „bridge-to-transplantation“-Indikation; CABG = Koronarer Bypass; CRT-D = kardiale Resynchronisationstherapie mit Defibrillator; CRT-P = kardiale Resynchronisationstherapie mit Schrittmacher; DT = Zieltherapie; HF = Herzinsuffizienz; HF_{rEF} = Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion; ICD = implantierbarer Kardioverter-Defibrillator; ISDN = Isosorbiddinitrat; LSB = Linksschenkelblock; MCS = mechanische Kreislaufunterstützung; MK-TEER = Mitralklappen-Transkatheter Edge-to-Edge Rekonstruktion; MRA = Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonist; ms = Millisekunden; PVI = Pulmonalvenenisolation; QoL = Lebensqualität; SAVR = chirurgische Aortenklappenrekonstruktion; SGLT2I = SGLT2 Hemmer; SR = Sinusrhythmus; TAVI = Transkatheter-Aortenklappenimplantation. Farbcode für die Empfehlungsgrade: Grün für den Empfehlungsgrad I; Gelb für den Empfehlungsgrad IIa. Die Abbildung zeigt Managementoptionen mit Empfehlungen der Grade I und IIa³².

Bei bestimmten Patienten kann die Implantation eines ICDs zur Verhinderung des plötzlichen Herztods, ggf. erweitert um eine kardiale Resynchronisationstherapie (CRT-D), sinnvoll sein. Der Patient sollte engmaschig durch seinen Hausarzt sowie den niedergelassenen Kardiologen betreut werden, um eine Progression mit höherem NYHA-Stadium sowie eine sich verschlechternde LV-EF früh zu erkennen und reagieren zu können. Außerdem sollte der Patient über seine Erkrankung geschult werden, um beispielsweise eine sprunghafte

Gewichtszunahme als Hinweis auf eine Dekompensation zu erkennen und seine Therapiecompliance zu verbessern.

Bei einer terminalen Herzinsuffizienz müssen sogenannte „bridge to transplantation“-Maßnahmen, wie die Implantation eines links ventrikulären assistant device, kurz LVAD, in Erwägung gezogen werden. Bei terminaler Herzinsuffizienz kann bei DCM-Patienten eine Herztransplantation notwendig werden. Die Prognose bei DCM-Patienten ist stark variabel und richtet sich nach der zugrundeliegenden Ätiologie und Schwere der Herzinsuffizienz. Die durchschnittliche 3-Jahres-Mortalität liegt bei ca. 12–20 %³³. Bis heute ist die DCM immer noch die häufigste Ursache einer Herztransplantation bei Kindern und Erwachsenen^{34,35}.

2.3 Das Muscle LIM Protein Knockout Mausmodell

In dieser Arbeit wird das Muscle LIM Protein Knockout Mausmodell (*Mlp*^{-/-}) als Tiermodell für die DCM genutzt. Das Muscle LIM Protein ist ebenfalls unter dem Namen Cysteine Rich Protein 3 (CSRP3 oder CRP3) bekannt.

2.3.1 Die *Mlp*^{-/-} Maus als Modell für die DCM

Das Muscle LIM Protein wurde erstmals von Arber et al. im Jahr 1994 beschrieben³⁶. Es wird zur Familie der Proteine mit einer oder mehreren LIM-Domänen gezählt. LIM leitet sich ab aus den Anfangsbuchstaben der ersten identifizierten Proteine dieser Gruppe (LIN-11, ISI1 und MEC-3)³⁷. Alle LIM Proteine haben sogenannte Zinkfingerdomänen, das sind schleifenförmige Strukturen in der Polypeptidkette, welche mit anderen Proteinen Bindungen eingehen können³⁸ und somit eine Rolle in vielen verschiedenen Zellfunktionen spielen. Das MLP wird in Zellen der quergestreiften Muskulatur und somit auch in Zellen des Myokards exprimiert. Es besteht aus 194 Aminosäuren. Das kodierende Gen *CSRP3* befindet sich im humanen Genom auf dem Chromosom 11p15.1³⁹. In der Muskelzelle ist es insbesondere an der Z-Scheibe des Sarkomers lokalisiert⁴⁰. Die Z-Scheibe, auch Z-Streifen oder Z-Linie genannt, begrenzt das Sarkomer. Ein Sarkomer ist die kontraktile Einheit einer Myofibrille. Um sich gerichtet kontrahieren zu können, ist das Sarkomer aus regelmäßigen Anordnungen von Aktin, Myosin und Titin aufgebaut. Während Aktin und Myosin durch den Verbrauch von ATP für die eigentliche Verkürzung des Sarkomers verantwortlich sind, halten die Z- sowie die M-Scheibe das Sarkomer stabil und sind somit essenziell wichtig für die gerichtete Kontraktion. Zusätzlich fungiert die Z-Scheibe als Stress- und Dehnungssensor. *Mlp*^{-/-} Mäuse exprimieren in ihren Muskelzellen kein MLP und weisen somit eine Fehlfunktion der Sarkomere auf. Während die Aufgabe des MLPs für eine intakte Zytoarchitektur und gerichtete Muskelkontraktion seit langem bekannt ist, ist die Rolle des MLPs als aktiver Teil des Stress- und Dehnungssensors nicht abschließend geklärt^{41–43}.

Neben dem Sarkomer wurde MLP auch in anderen subzellulären Kompartimenten, insbesondere im Nukleus sowie im Zytoplasma, detektiert.

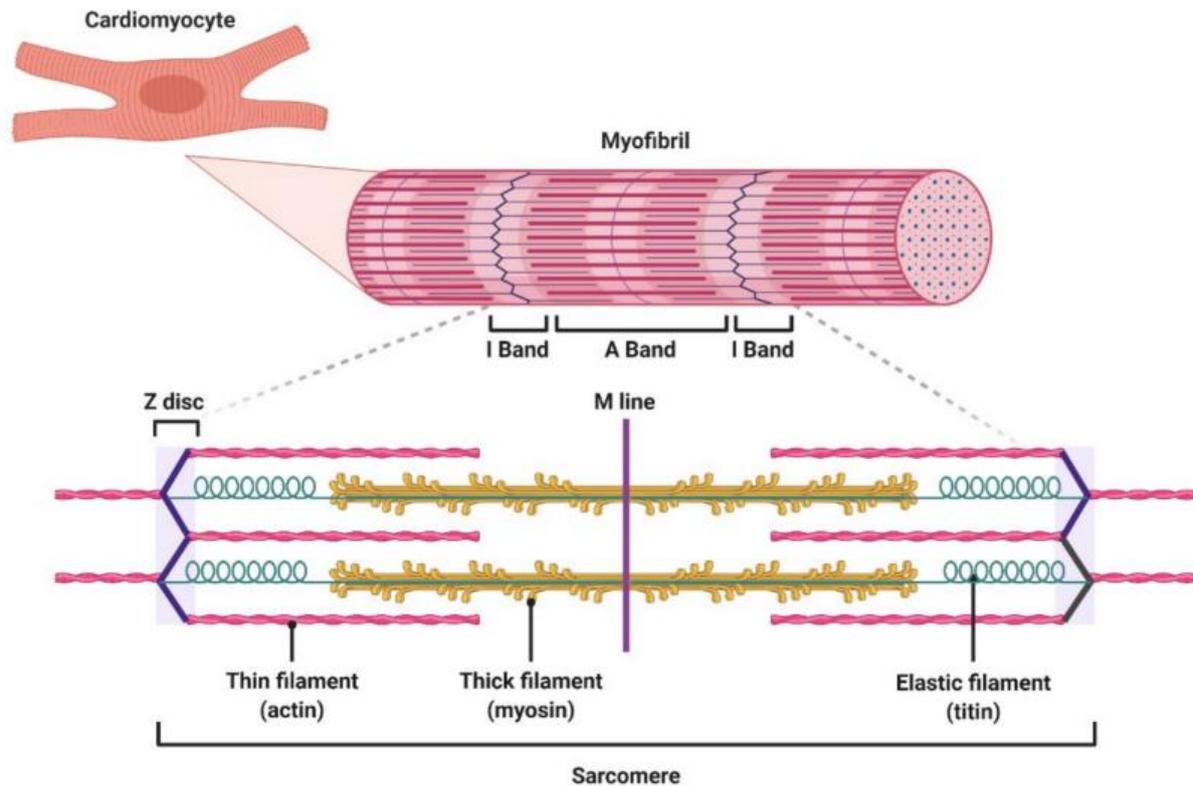


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines einzelnen Sarkomers als Teil einer Myofibrille. Die Z-Scheibe ist hier in lila dargestellt⁴⁴.

Während der Embryonalphase wird MLP sowohl von differenzierenden Skelettmuskelzellen als auch im entwickelnden Herzmuskel exprimiert. Während im adulten murinen Herzen ähnlich hohe Level des exprimierten MLPs gemessen werden können, verschwindet die Expression in Skelettmuskelzellen rund zwei Wochen postnatal und kann auch im adulten Tier kaum mehr nachgewiesen werden. Bei *Mlp*^{-/-} Mäusen besteht deshalb ein kardialer Phänotyp mit ausgeprägter DCM, jedoch keine Einschränkungen der Skelettmuskelphysiologie.

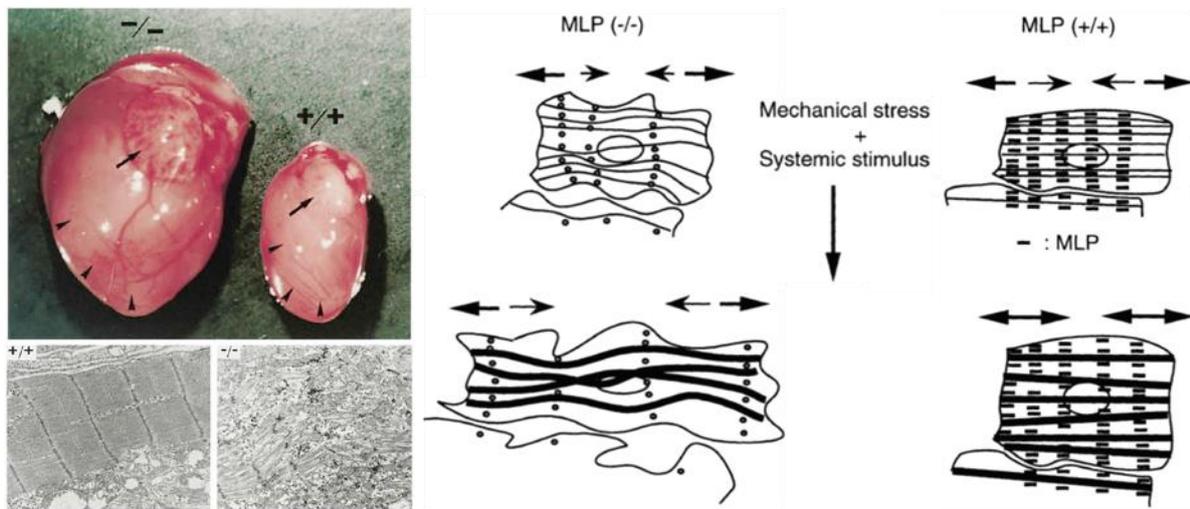


Abbildung 6: Originalpublikation Arber et al.: $Mlp^{-/-}$ Mäuse zeigen die typischen Charakteristika einer DCM mit makroskopisch sichtbar dilatiertem Ventrikel sowie in der Elektronenmikroskopie dargestellten Disruption der Sarkomere. Schematisch dargestellt sind die nun nicht mehr streng parallel angeordneten Sarkomere, welche zu einer inadäquaten Antwort auf mechanische Stimuli führen.

In Abbildung 6 ist die Ausprägung der DCM in $Mlp^{-/-}$ Mäusen schematisch dargestellt. Arber et al. beschrieben in ihrer Etablierung des Tiermodells insbesondere eine Einschränkung der Organisation der Myofibrillen und der interzellulären Gap Junctions mit vollständiger Aufhebung der physiologischen Kontraktionseinheit. Wird MLP durch Transfektion wieder in die Kardiomyozyte eingebracht, wird die Organisation der Myofibrille wieder positiv beeinflusst. MLP fungiert daher am ehesten als eine Art Gerüstprotein, das mitverantwortlich für den Zusammenhalt und die Funktionsfähigkeit der Myofibrille ist.

2.3.2 Zucht

In der Zucht konnte pränatal keine höhere Sterblichkeit der homozygoten Embryonen festgestellt werden⁴⁰. Allerdings weisen homozygote Tiere in den ersten Tagen nach der Geburt teilweise eine höhere Sterblichkeit auf. Zwischen P5 und P10 entwickeln 50-70 % dieser Tiere einen progressiven Erschöpfungszustand. Etwa 20-30 Stunden nach Auftreten dieses Symptoms versterben die betroffenen Tiere. Die überlebende Gruppe der homozygoten Mäuse erreicht das Erwachsenenalter ohne Entwicklungsunterschiede zu ihren Wildtyp-Geschwistertieren.

2.3.3 Funktionelle Charakteristika der $Mlp^{-/-}$ Mäuse als Modell für die DCM

In adulten Mäusen mit homozygoter Ausprägung des $Mlp^{-/-}$ zeigt sich für den Phänotyp der DCM eine nahezu 100%ige Penetranz. Mäuse mit nur einem Allel ($Mlp^{+/-}$) entwickeln keine DCM. Bereits neugeborene Mäuse zeigen dysorganisierte Myofibrillen und eine zerstörte Zytoarchitektur der Kardiomyozyten. Ein höheres Herzgewicht im Vergleich zu ihren nichtbelasteten Geschwistertieren zeigt sich postnatal zunächst nicht. Bei adulten Mäusen bildet sich eine Vergrößerung der Ventrikel, mit Betonung des linken Ventrikels, aus. Die

Myokardwand stellte sich verdünnt dar. Mittels *in vivo* Experimenten⁴⁵ konnte gezeigt werden, dass *Mlp*^{-/-} Mäuse eine linksventrikuläre Funktionseinschränkung aufweisen mit einem reduzierten fractional shortening (%FS) sowie einem reduzierten velocity of LV wall shortening (meanVcf). Das Herzgewicht in Relation zum Körpergewicht der Mäuse (englisch: Heart-to-Bodyweight-Ratio, kurz HBWR), war in den Mäusen mit vollständig ausgeprägtem Krankheitsbild erhöht. Dies erklärt sich vor allem mit dem durch Hypertrophie erhöhten Herzgewicht. Außerdem konnte eine Erhöhung des enddiastolischen Drucks im linken Ventrikel sowie eine reduzierte LV-Relaxation, als Ausdruck einer diastolischen Funktionseinschränkung festgestellt werden⁴⁶. In histologischen Präparaten imponiert neben der myokardialen Unordnung außerdem eine vermehrte Fibrosierung mit Expression von beispielsweise Kollagen Typ 1⁴⁷.

Zusammenfassend kommt es bei den *Mlp*^{-/-} Mäusen zu einem Rückwärtsversagen vorrangig durch eine eingeschränkte Kontraktilität des linken Ventrikels. Die in diesem Herzinsuffizienzmodell beobachteten morphologischen Charakteristika, die funktionellen Einschränkungen sowie die molekularbiologischen Korrelate in der Maus lassen sich auf den kardialen Phänotypen in humanem Patienten mit DCM gut übertragen. Zum Zeitpunkt ihrer Erstbeschreibung war die *Mlp*-Maus das erste genetische Modell für die DCM und ist seitdem gut etabliert. Auch im Menschen wurden Defekte des *Mlp*-Gens mit der Entwicklung einer DCM in Verbindung gebracht⁴⁸.

2.4 Nitrierte Fettsäuren

Die in dieser Arbeit genutzte Nitro-Ölsäure wurde mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. Bruce A. Freeman, Professor am Institut für Pharmakologie und chemische Biologie in Pittsburgh⁴⁹, zur Verfügung gestellt.

2.4.1 Synthese nitrierter Fettsäuren

Nitroalkene bestehen aus einer ungesättigten Kohlenwasserstoffkette mit einer oder mehreren Alkengruppen (-C=C-) sowie einer oder mehreren Nitrogruppen (-NO₂). Die organischen Moleküle entstehen beispielsweise bei Reaktionen von Alkenen mit nitrierten Säuren. Reagiert Stickstoffmonoxid (NO) mit Stickstoffdioxid (NO₂) oder Peroxinitrit (ONOO-) entstehen in verschiedenen Kompartimenten des menschlichen Körpers Nitrogruppen (-NO₂). Diese können an die Doppelbindung der ungesättigten Fettsäure binden und eine nitrierte Fettsäure bilden. Die nitrierte Fettsäure kann verschiedene Isomere aufweisen. Die in Studien am besten untersuchten nitrierten Fettsäuren sind die nitrierte Ölsäure (bestehend aus 18 C-Atomen und einer Doppelbindung), auch Nitro-Ölsäure genannt, sowie die nitrierte Linolsäure (bestehend aus 18 C-Atomen und zwei Doppelbindungen). In dieser Arbeit wird Nitro-Ölsäure verwendet.

Die Konzentration von NO₂-OA ist im Blut etwa 50% höher als die Konzentration von nitrierter Linolsäure⁵⁰. NO₂-OA hat eine Halbwertszeit von etwa 90 Minuten.

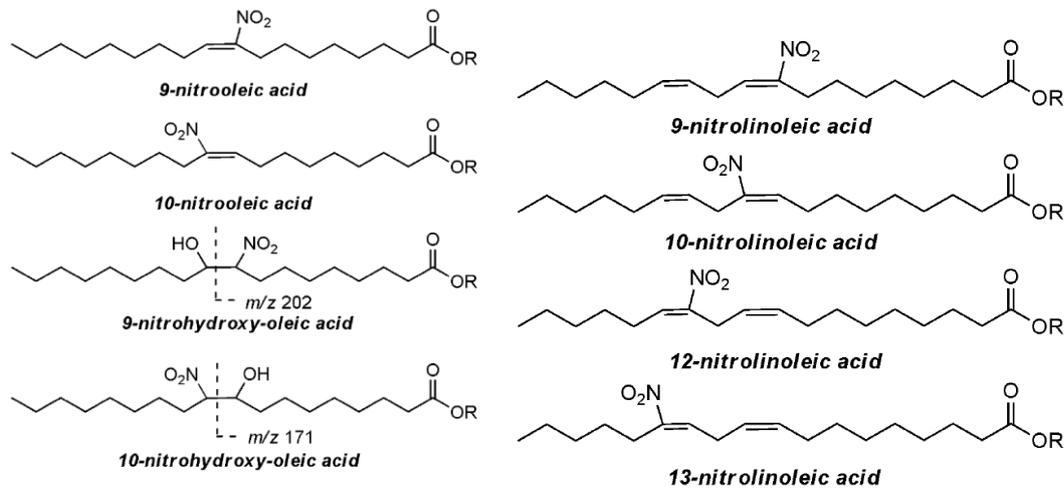
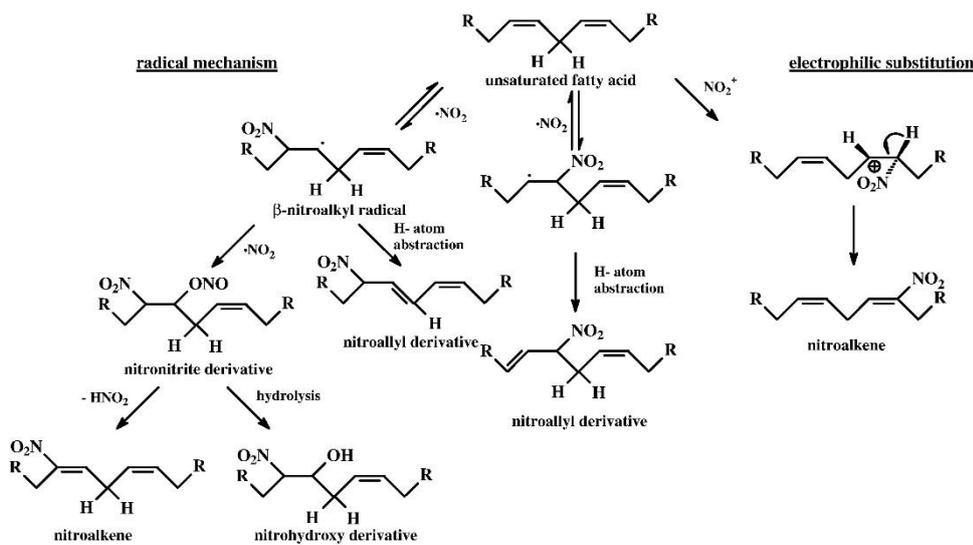


Abbildung 7: Strukturformel von 9- und 10-Nitro-Cis-Ölsäure und 9- und 10-Nitrohydroxid-Ölsäure (links) sowie 9-; 10-; 12- und 13-Nitrolinoléure. Leicht modifizierte Abbildung nach B.A: Freeman et al.

Der spezifische Synthesemechanismus nitrierter Fettsäuren *in vivo* ist noch nicht abschließend geklärt. Es existieren jedoch unterschiedliche Hypothesen zu Reaktionen, welche zur Bildung von nitrierten Fettsäuren führen könnten. Die Art der im Kompartiment ablaufenden Reaktion hängt dabei entscheidend von der Reaktionsumgebung ab⁵¹. Läuft die Reaktion in einem Milieu mit niedriger Sauerstoffkonzentration ab, kommt es am ehesten zu einer Nitrierung von Fettsäuren durch -NO₂. Bei hoher Sauerstoffkonzentration überwiegen Oxidationsreaktionen. Eine Übersicht über die verschiedenen möglichen Reaktionswege, welche *in vivo* zur Bildung von nitrierten Fettsäuren führen könnten, bietet Abbildung 8.

low oxygen tension: lipid nitration



high oxygen tension: lipid oxidation

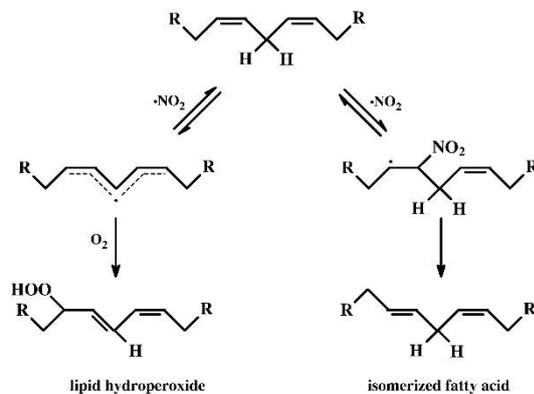


Abbildung 8: Zusammenfassung unterschiedlicher möglicher Synthesewege für nitrirte Fettsäuren abhängig vom Sauerstoffgehalt des Reaktionsmilieus, Abbildung nach A. Trostchansky et al.⁵¹

Durch ihre elektrophilen Eigenschaften können nitrirte Fettsäuren als Reaktionspartner insbesondere mit Proteinen, welche viele Cysteinreste besitzen, reagieren. Diese posttranslationale Modifikation der Proteine, an die NO_2 -FA binden, wird über die Michael-Addition katalysiert. Bei dieser Reaktion geht die vorher bestandene Doppelbindung zur NO_2 -Gruppe eine neue Verbindung mit dem Protein ein. In Studien gezeigte aktivierte Proteine durch NO_2 -FA sind beispielsweise das Kelch-ähnliche ECH-assoziierte Protein 1 (KEAP 1)⁵², der nukleäre Faktor kappa-light-chain-enhancer von aktivierten B-Zellen (NF- κB)⁵³ sowie der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor γ (PPAR γ)⁵⁴.

Insbesondere im inflammatorischen Reaktionsmilieu können nitrirte Fettsäuren als Signalmediatoren Zielproteine beeinflussen und modifizieren. NO_2 -FA werden außerdem, genau wie andere Fettsäuren auch, über die β -Oxidation in den Mitochondrien metabolisiert. Die NO_2 -FA-Spiegel werden über die Glutathion (GSH)-Addition sowie der Ausscheidung über die Diurese der Nieren reguliert. Sowohl im Plasma als auch im Urin können die Spiegel quantifiziert werden.

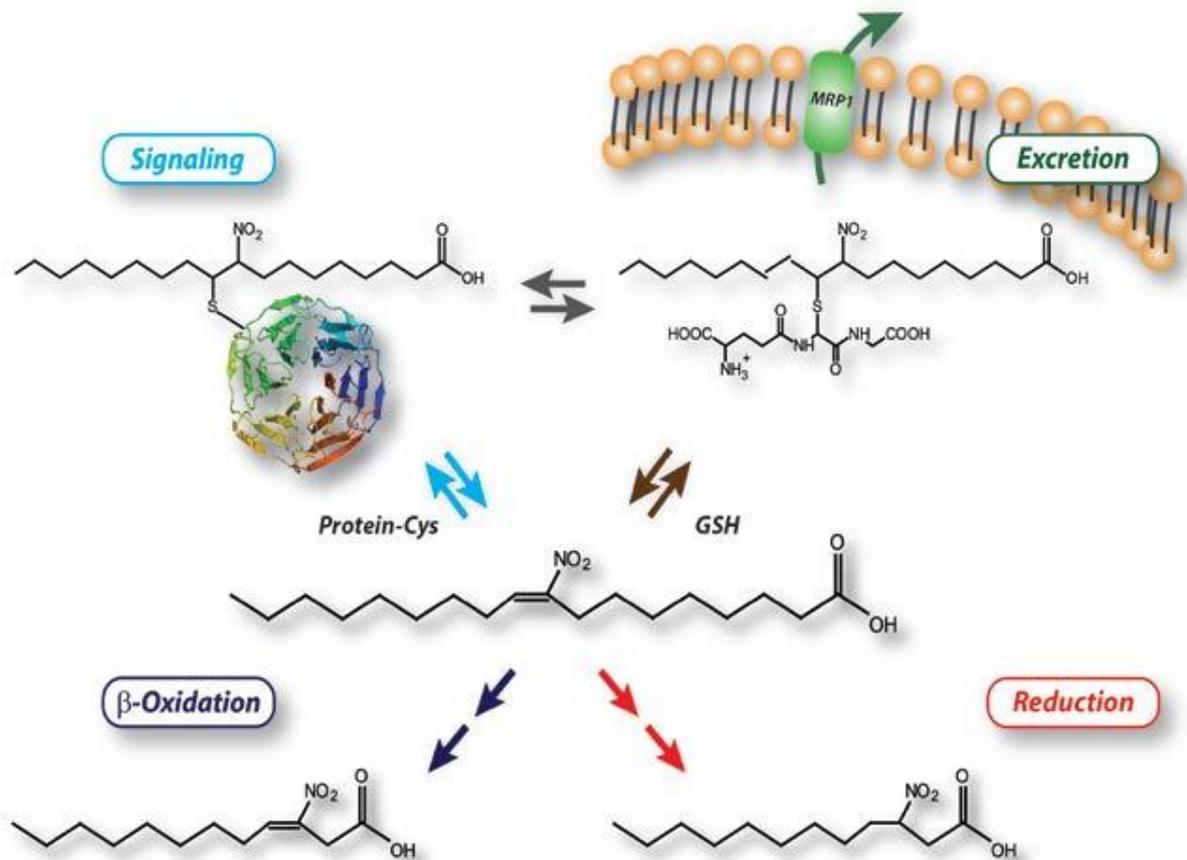


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Reaktion von NO₂-FA mit Cysteinresiduen in Proteinen. Durch die posttranslationale Modifikation können NO₂-FA als Transkriptionsfaktoren fungieren und die Genexpression im Zellkern beeinflussen. Zusätzlich ist die β-Oxidation dargestellt, welche die NO₂-FA mitochondrial durchlaufen sowie die Inaktivierung über die Prostaglandin-Reduktase-1⁵⁵.

Die Konzentration von nitrierten Fettsäuren ist nicht in jedem Milieu gleich hoch. Rudolph et al. beobachteten in Tierversuchen die Verteilung von radioaktivem NO₂-OA 90 Minuten nach intravenöser Gabe. Rund 18 % der initialen Dosis konnten in der Leber nachgewiesen werden, 31 % in Muskelanteilen, 6 % im Urin, 2 % in den Nieren sowie 2 % im Fettgewebe und 0,2 % im Plasma⁵⁶.

Bei gesunden Menschen lassen sich unter Ruhebedingungen nur sehr geringe Spiegel von nitrierten Fettsäuren im Plasma (NO₂-OA < 1 nM) sowie im Urin (10 pmol/mg Kreatinin) messen^{57,58}. Unter inflammatorischen Bedingungen oder im sauren Milieu wird die Nitrierung der ungesättigten Fettsäuren begünstigt. So steigen im sauren Milieu des Magens oder nach ischämischen Zuständen die Spiegel im jeweiligen Kompartiment an und sind damit höher als die im Plasma zu bestimmenden Spiegel.

In verschiedenen Studien wird postuliert, dass nitrierte Fettsäuren anti-inflammatorische und anti-oxidative Wirkungen zeigen und somit als neue Substanzklasse in verschiedenen Krankheitsbildern einen potenziellen Therapieeffekt haben könnten. Auch ihr Effekt in kardiovaskulären Erkrankungen wird diskutiert und ist Gegenstand aktueller Forschung sowie dieser Arbeit. Nitrierte Fettsäuren können *in vitro* hergestellt werden. Für die klinische

Anwendung wurde durch die Arbeitsgruppe von Bruce A. Freeman, welcher freundlicherweise auch das in dieser Arbeit genutzte NO₂-OA zur Verfügung stellte, die Leitsubstanz CXA-10 (10-OA-NO₂) entwickelt und patentgeschützt⁵⁹. CXA-10 kann sowohl oral als auch intravenös verabreicht werden. In unterschiedlichen Phase I Studien konnten vielversprechende Ergebnisse erzielt werden. Beispielsweise erhielten adipöse sowie normgewichtige gesunde Probanden CXA-10 in unterschiedlichen Dosierungen. Die Substanz zeigte eine gute Bioverfügbarkeit und führte zu Veränderungen in Entzündungsparametern und Zielstrukturen, die mit einem erhöhten oxidativen Stress in Verbindung gebracht werden, beispielsweise IL-6⁶⁰. Darüber hinaus wurde die Wirkung von CXA-10 in den Phase II Studien PRIMEx (NCT03449524)⁶¹ sowie FIRSTx (NCT03422510)⁶² untersucht. In die PRIMEx Studie wurden Patienten mit diagnostizierter PAH eingeschlossen, welche randomisiert zunächst einmal täglich 75 mg oder 150 mg CXA-10 oder aber ein Placebo einnahmen. Als Endpunkte wurden die RV-Funktion, der pulmonale vaskuläre Widerstand sowie die Änderung der sechs Minuten Gehstrecke untersucht. In der FIRSTx Studie sollte die Wirkung von CXA-10 an erwachsenen Patienten mit primärer fokaler segmentaler Glomerulosklerose untersucht werden. Gemessen wurde im Anschluss an die Verabreichung von CXA-10 die relative Reduktion der Proteinurie innerhalb der kommenden drei Monate sowie die Rate der Patienten mit partieller oder kompletter Remission. Beide Studien wurden bereits im August 2020 abgeschlossen, zum jetzigen Zeitpunkt wurden noch keine Ergebnisse publiziert.

2.4.2 Nitrierte Fettsäuren in kardiovaskulären Erkrankungen

Nitrierte Fettsäuren wurden bereits in unterschiedlichen Krankheitsmodellen untersucht. Dies umfasst Pathologien der Niere⁶³, der Lunge sowie vieler kardiovaskulärer Erkrankungen. Durch posttranslationale Modifikationen zeigen die FA insbesondere einen antiinflammatorischen und antifibrotischen Effekt.

In einem im Mausmodell durch Angiotensin-II induzierten arteriellen Hypertonus senkt die kontinuierliche subkutane Verabreichung von NO₂-OA signifikant den Blutdruck⁶⁴. Die FA binden an den Angiotensin-II-Rezeptor und verhindern die Vasokonstriktion. NO₂-OA inhibiert außerdem das Enzym Epoxide hydrolase 2 (EPHX2) und hat damit zusätzlich eine antiinflammatorische Wirkung⁶⁵. In einem Tiermodell eines Ischämie-Reperfusionsschadens reduzierte der Einsatz von NO₂-OA die Infarktgröße, die Infiltration von Leukozyten nahm ab und der Transkriptionsfaktor NF-κB wurde potent inhibiert^{53,66}. Einen positiven Einfluss hatten nitrierte Fettsäuren außerdem in Studien zum Vorhofflimmern⁶⁷, zur pulmonalen Hypertonie⁶⁸ und zur Atherosklerose⁶⁹.

Auch in *in vitro* Versuchen konnten positive Effekte der nitrierten Fettsäure nachgewiesen werden. Beispielsweise wurde die Hochregulation von MMP-7 und MMP-9 berichtet⁷⁰. Diese

Matrixmetalloproteasen werden mit der Entwicklung einer myokardialen Fibrose in Verbindung gebracht⁷¹. Ein antioxidativer sowie anti-inflammatorischer Effekt der nitrierten Fettsäuren wird auch im Mausmodell der hypoxieinduzierten akuten Lungenschädigung (HALI) beschrieben. Nach einer intraperitonealen oder intratrachealen Applikation zeigten die untersuchten Mäuse weniger Infiltration von inflammatorischen Zellen sowie ein geringer ausgeprägtes Kapillarlecksyndrom. Die Autoren umschreiben hier einen potenziellen protektiven Effekt für Patienten mit ARDS, welches auch für Patienten mit einem schweren Verlauf einer SARS-CoV2-Infektion eine supplementäre Therapieoption darstellen könnte⁷². Der Effekt der nitrierten Fettsäuren auf die genetische Form der DCM wurde unseres Wissens bisher noch nicht untersucht.

2.5 Fragestellung der Arbeit

In dieser Arbeit wird die Wirksamkeit der subkutanen Applikation von nitrierter Ölsäure im Mausmodell der DCM untersucht. Damit soll die Frage beantwortet werden, ob diese Behandlung einen positiven Effekt auf die myokardiale Funktion hat und somit als potenzielle neue Arzneimittelgruppe zur Behandlung der DCM beitragen kann. Es wurden sowohl *in vivo* Experimente mit behandelten Versuchstieren durchgeführt als auch *in vitro* Methoden genutzt.

Zusammenfassend sollen insbesondere folgende Fragen in dieser Arbeit beantwortet werden:

- Gibt es Unterschiede in der Expression profibrotisch-assoziiierter Gene und Proteine im LV-Homogenat behandelter Mäuse?
- Gibt es Unterschiede in der Expression profibrotisch-assoziiierter Gene und Proteine nach Kostimulation mit TGF β und NO₂-OA in primären kardialen Fibroblasten?
- Gibt es identifizierbare Effektoren in spezifischen Signalkaskaden, welche durch NO₂-OA im Tiermodell der DCM beeinflusst werden?

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Verwendete Kits und Assays

Assay	Hersteller
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
cDNA reverse transcription kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Direct-zol RNA Microprep	Zymo Research, Freiburg, Deutschland
GoTaq® Master Mix	Promega, Walldorf, Germany
Neonate Cardiac Fibroblast Isolation Kit mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany
Mouse TGFβ1/TGF Beta 1 Sandwich ELISA Kit, #LS-F5184	LSBio, Seattle, USA
Multi Tissue Dissociation Kit 2	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany
Total Collagen Assay Kits (Perchlorate Free, #ab222942)	Abcam, Cambridge, UK

3.1.2 Verwendete Geräte und Software

Auflichtmikroskop Zellkultur Axiovert 25	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Beatmungsgerät MiniVent	Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus, March, Deutschland
BioRad Zell-Zählmaschine	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Biorevo BZ-9000 Mikroskop	Keyence Inc., Osaka, Japan
BZ-II Viewer/Analyser	Keyence Inc., Osaka, Japan
Digitalwaage EMB 1000-2	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Eppendorf Comfort Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Feinwaage	VWR, International, Pennsylvania, USA
FusionCapt Advance Software	Vilber Smart Imaging, Collégien, France

gentleMACS™ 7Dissociator	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany
Heraeus HERAccl® CO2-Inkubator für <i>in vitro</i> Experimente	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Isofluran-Anlage	Penlon Sigma, Abingdon, USA
Laminar Flow Werkbank SterilGARD Class II Type A/B3 für sterile Arbeiten	The Baker Company, Sanford, USA
Magnetrührer RCT basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Breisgau, Deutschland
Mikroskop Olympus CK 2	Olympus, Shinjuku, Japan
Mikrotiterplatten-Zentrifuge (PCR Plate Spinner)	VWR International, Pennsylvania, USA
Multipipette (BCA-Assay, 20–200 µl)	Peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
OctoMACS™ Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany
Perfect spin 24Plus Zentrifuge	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Real-Time PCR Thermocycler System 7300	Applied Biosystems, Kalifornien, USA
Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, Typ 357
Stickstofftank (CRYO-Behälter)	Linde (The Linde Group), Dublin, Irland
Peqlab Tissue Lyser	VWR, International, Pennsylvania, USA
Vakuumpumpe Mini-Vac Power	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Vevo Mouse Handling Table Funktionstisch mit Wärmeplatte	Fujifilm VisualSonics Inc., Toronto, Kanada
Vortex Schüttler VF2 Janke & Kunkel	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Breisgau, Deutschland
Tissue Lyser	Peqlab, International, Pennsylvania, USA
Thermocycler Comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zellcounter automatisch	BioRadbTc20 Automated Cell Counter
Zentrifuge Eppendorf 5420 für RNA-Isolationen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Zentrifuge Mega Star 1.6 R (Zellkultur)	VWR International, Pennsylvania, USA
Wasserbad SUB Aqua 26 Plus	Grant Instruments, Cambridge, England

3.1.3 Medikamente und Applikationen für Tierversuche

Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Buprenorphin; Analgetikum 0,1 mg/Kg KG s.c.	TEMGESIC®, Indivior Europe Limited, Dublin, Irland
Isofluran-Piramal®	Piramal Critical Care, Voorschoten, Niederlande; (Titrierung mit 5 % vol/vol für die Einleitung und 2 % vol/vol zur Aufrechterhaltung der Anästhesie)
NO ₂ -OA (Regioisomer ¹⁰ -nitro-octadec-9 (E)-enoic acid)	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Bruce Freeman, Ph.D., University of Pittsburgh

3.1.4 Verwendete Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Lösungen und Zubehör

0,22 µM Filter (Syringe-driven Filter Unit)	Millex GS Merck, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
70 µm Filter (MACS SmartStrainer (70 µm))	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany
6-Well Platten; 12-well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
8-well chamber slides	Thermo Fisher Scientific, Lab-Tek II Chamber Slide, System 154534, New York, NY, USA
96-well Platte (BCA-Assay)	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Accutase	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Alzet Minipumpen Model 2002	ALZET, Cupertino, CA, USA
Ampuwa® Spüllösung 1000 ml Plastipur (ddH ₂ O), steril	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Anti-GAPDH-Polyklonaler Antikörper	Cell Signaling, Danvers, MA, USA, #2118
BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
C-Tubes	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany

DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride)	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
DAKO fluorescence mounting medium	Agilent Dako, Fluorescence Mounting Medium, # S302380-2
Deckgläser 24x60 mm	Thegeyer GmbH& Co.KG (Renningen)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) plus Glutamax	Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland
DQ-Getaline	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
dNTP-Mix,	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DTT	PanReacApplieChem
ECL-Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EDTA-free Protease Inhibitor Tabletten	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ethanol 70 %	Fischar, Saarbrücken, Deutschland
Falcon (15 ml und 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Filterpapier (Vorbereitung Polyacrylamid-Gele)	Whatman, Maidstone, England
Fötales Kälberserum/FCS	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
FGFb	Recombinant Human FGF-basic (154 a.a.) Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA
Flüssigstickstoff	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Gelatine from bovine skin, Type B, powder, BioReagent suitable for cell culture	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycin	PanReacAppliChem A1067, 1000
HBSS	Gibco Life Technologies Limited, England

HEPES	(für den Tyrodeansatz gebraucht)
Liberase™	Roche, Basel, Schweiz
Liquid Blocker Super Pap Pen (Immunofluoreszenz-Färbungen)	Daido Sangyo Co. Ltd., Tokyo, Japan
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver (blotting grade, pulver, fettarm)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nitrocellulosemembran	VWR, International, Pennsylvania, USA
Nunc® CryoTubes® Kryoröhrchen, Füllvolumen 1,8 ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Oligonukleotide (Primer)	Invitrogen
Page Ruler für WesternBlot, Prestained Protein Ladder	Protein Biology, ThermoScientific
Paraformaldehyd	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PBS, steril	Gibco Life Technologies Limited, England
PBS-Tabletten für unsterilen Ansatz	Gibco Life Technologies Limited, England
Pipetten (P2, P10, P20, P100, P200, P1000)	Peqette, VWR International, Pennsylvania, USA
PCR-Mikrotiterplatten (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, PCR Compatible DNA/Rnase/PCR Inhibitors Free)	Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA
Ponceau S Solution	SERVA, Heidelberg, Deutschland
PEG	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt Nümbrecht, Deutschland sowie Biozym Scientific GmbH 2023, Hessisch Oldendorf, Deutschland
PBS	PAN-Biotech GmbH, Aidendach, Deutschland sowie Gibco Life Technologies Limited, England
PhoSTOP	Roche, Basel, Schweiz

Red Blood Cell Lysis Solution (10x)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany
RNase free water	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Serologische Glaspipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TC-Flasche T25 und T75, steril	Sarstedt, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
TGFβ (Human TGF-β1, premium grade)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany
Tris Base	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TRIzol™ Reagenz	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tween 20	Sigma, St. Louis, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Arbeiten mit der Maus

3.2.1.1 Tierhaltung und Zucht

Um mit den Tieren arbeiten zu dürfen, wurde ein „Versuchstierkundlicher Kurs zum Erwerb der Sachkunde zur Durchführung von Tierversuchen an Maus und Ratte“ (FELASA B), zertifiziert von der Gesellschaft für Versuchstierkunde - Society for Laboratory Animal Science (GV-SOLAS, im September 2019 absolviert. Alle Tierversuche wurden von den Tierschutzbeauftragten der Universität zu Köln und dem LANUV (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen) genehmigt. Die Tierversuchsantragsnummer lautete 84-02.04.2015.A459.

Alle Mäuse haben einen FVB/N Hintergrund. Es wurden ausschließlich männliche Mäuse verwendet. Die Tiere wurden unter Laborbedingungen in NexGen™ Maus 500 Käfigen (Allentown Inc., Allentown, USA) gehalten. Sie waren einem inversen 12/12 Stunden Lichtzyklus ausgesetzt und bekamen ein Standardfutter für Nager sowie Wasser ad libitum.

3.2.1.2 Pumpenimplantation

Für alle *in vivo* Versuche wurde die ALZET Minipumpe (ALZET Model 2002, Cupertino, CA, USA) verwendet. Die Pumpe besteht aus einer semipermeablen Membran, über die Wasser in eine osmotische Schicht gelangt, welche die Testsubstanz umgibt⁷³. Die Flüssigkeit wird

über die osmotische Schicht komprimiert und über den Flow Moderator am Kopf der Pumpe freigegeben. Die in dieser Arbeit verwendete Pumpe setzt über den Zeitraum von zwei Wochen kontinuierlich 0,5 µl/h frei. Die kontinuierliche Abgabe der eingebrachten Substanz ermöglicht einen konstanten Wirkspiegel im subkutanen Gewebe. Die Pumpen sind nicht wiederverwendbar und müssen nach zwei Wochen einmalig durch eine neue Pumpe ersetzt werden.

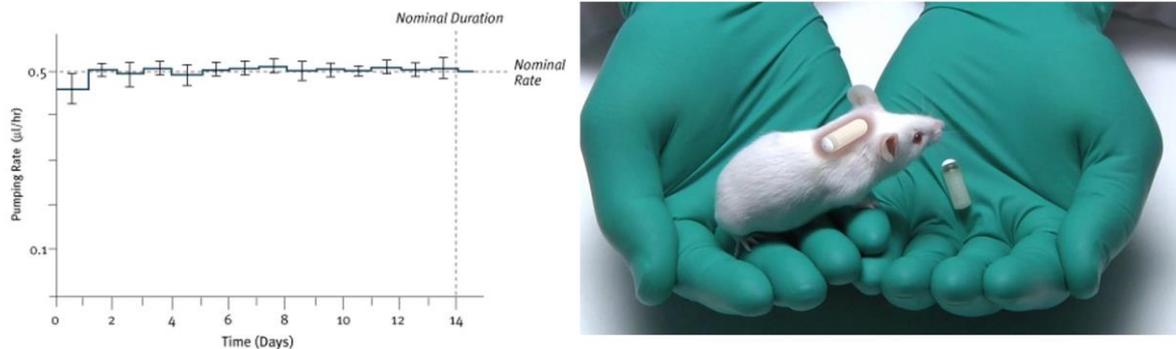


Abbildung 10: Darstellung der kontinuierlichen Freisetzung der gewählten Befüllungsflüssigkeit, in dieser Arbeit NO₂-OA oder PEG, einer ALZET osmotic pump "Model 2002" über den Zeitraum von vierzehn Tagen (links) sowie schematische Darstellung der subkutanen Lage der Pumpe nach Implantation (rechts)⁷⁴

Damit die Pumpe direkt nach der Implantation die eingebrachte Substanz freisetzt, wurden diese einen Tag vor der geplanten Implantation entweder mit der Trägersubstanz Polyethylene Glycol/Ethanol (90:10, vol/vol, PEG) oder mit NO₂-OA (1 nmol/(gxh)) befüllt und bei 4 °C in NaCl gelagert. Dreißig Minuten vor der Implantation erfolgte eine gewichtsadaptierte Analgesie der Mäuse mittels Buprenorphin (0,01 mg/kg Körpergewicht). Der Eingriff erfolgte unter Isoflurannarkose. Nach einem erfolgreich erloschenen Zwischenzehenreflex wurde ein kleiner Hautschnitt in die Nackenfalte gesetzt und dieser durch Spreizen mit einer autoklavierten Schere subkutan stumpf erweitert. Die Pumpe wurde in die gebildete subkutane Tasche, mit der Öffnung nach kaudal, eingesetzt. Der Verschluss der Wunde erfolgte mit zwei Einweg-Hautklammern. Alle Mäuse wurden postoperativ nachbeobachtet und täglich mittels standardisiertem Scoring-System bewertet. Alle zwei bis drei Tage wurde die subkutan liegende Pumpe vorsichtig bewegt, um ein Verwachsen mit dem umliegenden Gewebe zu vermeiden. Nach zwei Wochen wurde die Pumpe explantiert und eine neue Pumpe eingesetzt. Um die kontinuierliche Freisetzung zu gewährleisten und subkutane Verwachsungen durch den Fremdkörper zu vermeiden, erfolgte die Reimplantation wenn möglich auf der kontralateralen Seite. Nach dem Versuchsende von vier Wochen wurden die Mäuse getötet und die Herzen in toto entnommen. Insgesamt wurde die Implantation gut toleriert, lediglich einzelne Versuchstiere zeigten lokale Reizungen des subkutanen Gewebes mit vereinzelt Durchbruch der Pumpe durch die Haut. Diese Mäuse wurden von den Analysen ausgeschlossen.

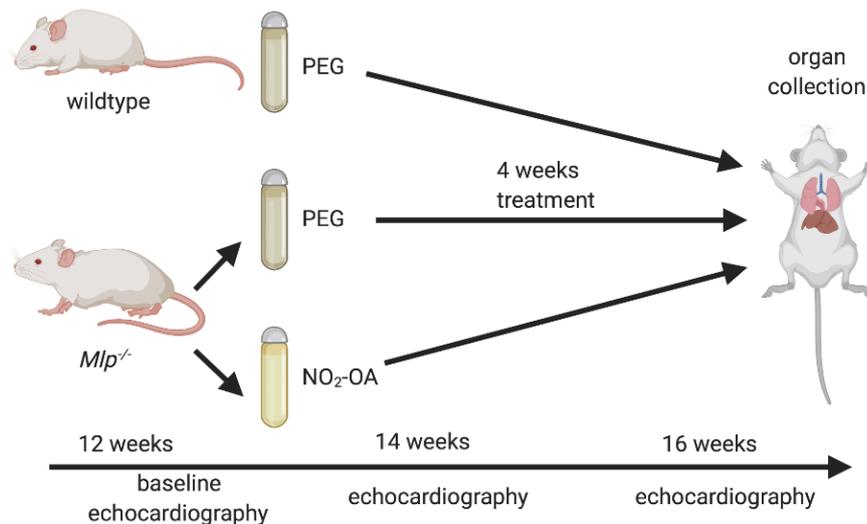


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Graphik mit freundlicher Genehmigung von Simon Geißler.

3.2.2 Arbeit mit Nukleinsäuren

3.2.2.1 RNA-Isolation

Um eine Degradierung der RNA zu vermeiden, wurde die RNA-Isolation zeitnah nach dem Ernten der Zellen beziehungsweise der Organentnahme durchgeführt. Wenn die RNA nicht am selben Tag der Probengewinnung isoliert werden konnte, wurden die Proben in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert. Die Isolation erfolgte in DNA-freier Umgebung sowie während des Einsatzes von Trizol-haltigen Reagentien unter einer Abzugshaube. Es wurde das Direct-zol™ RNA MicroPrep von Zymo Research verwendet, welches die Extraktion von bis zu $10\text{ }\mu\text{g}$ RNA ermöglicht. Die bereits in Trizol aufgenommenen Proben wurden auf Eis schonend aufgetaut und im Verhältnis 1:1 mit reinem Ethanol versetzt. Danach wurde jede Probe auf dem Vortexer durchmischt. Die gesamte Probe wurde auf die beigefügten Zymo-Spin™ IC Columns gegeben und auf ein Collection Tube gesteckt. Die Proben wurden anschließend bei 15.000 g für 30 Sekunden abzentrifugiert und die Säule auf ein neues Collection Tube transferiert. Das abzentrifugierte Trizol wurde entsorgt. Zur optimalen Aufreinigung entschieden wir uns für einen optionalen DNase-Verdau. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit erneuter Zentrifugation. Die eluierte RNA wurde in $15\text{ }\mu\text{l}$ RNase-freiem Wasser aufgenommen.

Zur Quantifizierung und Beurteilung der Reinheit der extrahierten RNA erfolgte die Messung mittels NanoDrop Spektralphotometer. Mit diesem Gerät kann schnell und einfach die Konzentration kleinster Volumina von $0,5\text{--}1\text{ }\mu\text{l}$ einer DNA- oder RNA-Probe photometrisch bestimmt werden. Neben der Konzentration wird auch das A_{260}/A_{280} -Verhältnis berechnet, sodass eine Verunreinigung der RNA-Probe, beispielsweise mit DNA oder Proteinen, erkannt wird. Verunreinigte Proben wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen.

3.2.2.2 Reverse Transkription

Bevor eine qPCR durchgeführt werden kann, muss die isolierte RNA in komplementäre DNA, kurz cDNA, umgeschrieben werden. Die Reaktion wird von der reversen Transkriptase katalysiert, welche die Einzelstrang-RNA abliest und einen komplementären DNA-Strang synthetisiert.

In dieser Arbeit wurde für die Umschreibung in cDNA das cDNA-Reverse-Transcription-Kit von Thermo Fisher Scientific verwendet. Alle Schritte wurden streng auf Eis durchgeführt. Um eine Kontamination zu vermeiden, wurde auf eine kontinuierliche Benutzung derselben, sauberen qPCR-Pipetten geachtet. Entsprechend der vorher durchgeführten Quantifizierung wurden 250-750 ng RNA pro Eppendorf-Tube vorgelegt. Jede Probe wurde mit RNA-freiem Wasser auf 14,2 µl aufgefüllt. In einem separaten Eppendorf-Tube wurde die Enzyme entsprechend der unten angefügten Tabelle angesetzt und anschließend 5,8 µl des Enzym-Mix zu jeder Probe gegeben, sodass in jeder Probe 20 µl Volumen enthalten waren. Anschließend erfolgte die Erwärmung auf 25 °C für zehn Minuten, gefolgt von der enzymatischen Reaktion bei 37 °C für 120 Minuten in einem Thermomixer. Danach wurde das Enzym bei 85 °C für fünf Minuten inaktiviert und die Proben direkt auf Eis gelagert. Die umgeschriebene cDNA wurde mit RNA-freiem Wasser auf eine Konzentration von 1 ng/µl verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Reagenz	Menge
10 x RT Puffer	2,0 µl
25 x dNTP Mix	0,8 µl
10 x Random Primer Mix	2,0 µl
MultiScribe Reverse Transkriptase	1,0 µl

Tabelle 2: Genutzte Materialien für die Umschreibung der isolierten RNA in cDNA

3.2.2.3 Real-Time Quantitative PCR

Bei der Real-Time quantitativen Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) werden Nukleinsäuren, welche die DNA-Doppelhelix bilden, amplifiziert. So können einzelne Genabschnitte der DNA detektiert und quantifiziert werden. Die qPCR hat eine hohe Sensitivität. Im Gegensatz zur qPCR können bei der Real-Time-qPCR die vervielfältigten Zyklen während der Amplifikation in Echtzeit betrachtet und bewertet werden. So kann der Zyklus, ab dem die Reaktion exponentiell verläuft, genau bestimmt werden. Zunächst wird der cDNA-Doppelstrang durch die Temperaturänderung denaturiert und in zwei Einzelstränge aufgeteilt. Im nächsten Schritt wird die Temperatur gesenkt, damit die hinzugegebenen spezifischen Primer an die DNA-

Einzelstränge binden können. Die hier gewählten Primer wurden so entworfen, dass ihr Temperaturoptimum dem verwendeten Protokoll entspricht.

An den Lokalisationen, an denen die Primer an den DNA-Einzelstrang gebunden haben, entsteht nun eine Doppelstrang-DNA. Hier kann in der sogenannten Elongation die DNA-Polymerase ansetzen und die Basenpaare miteinander verbinden. Am Ende des Zyklus liegt das DNA-Stück in identischer Form dupliziert vor. Falls das gesuchte Gen in der DNA vorhanden ist und von dem spezifischen Primer gebunden werden kann, zeigt sich eine exponentielle Vervielfältigung. Der Beginn dieser exponentiellen Amplifikationsphase wird als Threshold Cycle, kurz C_T -Wert, bezeichnet.

Je früher die Replikation beginnt, desto niedriger ist der C_T -Wert und desto mehr Genprodukt des gesuchten Genabschnitts ist in der Probe vorhanden. Durch die zeitgleiche proportionale Amplifikation des fluoreszierenden Farbstoffes, in dieser Arbeit BRYT Green, der an die DNA bindet, kann die Anzahl der Zyklen detektiert und quantifiziert werden. Dazu wird der individuelle Threshold-Cycle (C_T -Wert) einer jeden Probe analysiert und mit der Amplifikation von dH_2O sowie eines Standard-Gens, dem sogenannten Housekeeping-Gene, verglichen. Das Housekeeping-Gene, auch nicht-regulierendes Gen genannt, ist in nahezu allen eukaryotischen Zellen, unabhängig von Zelltyp und äußeren Einflüssen, aktiv und kann so als Normalisierungsreferenz benutzt werden. In dieser Arbeit wurden die gut etablierten Housekeeping-Gene *gapdh* sowie β -Actin verwendet⁷⁵. Zur Auswertung wurde die Delta-Delta-CT-Methode ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) benutzt⁷⁶.

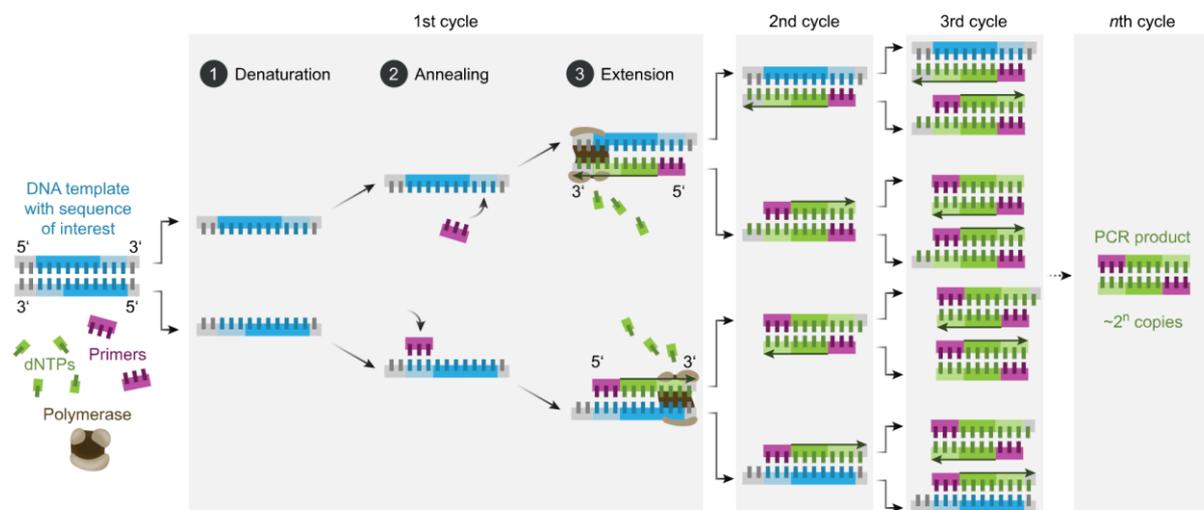


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Ablaufs einer qPCR⁷⁷

In dieser Arbeit wurde für die qRT-PCR das Promega GoTaq® qPCR Master Mix Kit benutzt. Auf einer qPCR-Mikrotiterplatte wurden 2 ng der umgeschriebenen cDNA auf Eis in

Doppelbestimmung vorgelegt. Der MasterMix wurde in einem separaten Eppendorf-Tube angesetzt. Pro Probe entspricht der MasterMix 5 µl 2 x GoTaq qPCR Master Mix, 1 µl 100 pmol forward primer, 1 µl 100 pmol reverse primer, 0,1 µl 30 µM CXR Reference Dye und 0,9 µl dH₂O. Im Anschluss wurde der MasterMix mit einer Multipipette zu den einzelnen DNA-Proben hinzu pipettiert. Die Platte wurde mit einer Folie verschlossen und in einer Zentrifuge zentrifugiert. Danach erfolgte die qPCR nach einem standardisierten Protokoll in einem PCR-Gerät.

Die einzelnen Primer wurden mit Primer-BLAST entworfen⁷⁸. Die benutzten Primer wurden teilweise selbst entworfen, andere Primer waren bereits durch die Arbeitsgruppe etabliert. Es wurden verschiedene Gene mit folgenden Primersequenzen verwendet:

Primer	Sequenz 5'-3'
<i>Acta2</i>	CAG GCA TGG ATG GCA TCA ATC AC
<i>Pai 1</i>	CAC AGG CAC TGC AAA AGG TC
<i>Ltbp2</i>	GTC TGT TCC GAG AGC CTG AC
<i>Col1</i>	CGA CCT CAA GAT GTG CCA CT
<i>Col 3</i>	CAA GGC TGC AAG ATG GAT GC
<i>Actin β</i>	GCT GTA TTC CCC TCC ATC G
<i>Cux 1</i>	ACT GCA AAG GCC GAT GAG AT
<i>Tgfβ</i>	AGC CCG AAG CGG ACT ACT AT
<i>Tgfβ R1</i>	TGG TCC AGT CTG CTT CGT CT

Tabelle 3: Benutzte Primer-Sequenzen

Temperatur	Dauer
95 °C	2 Minuten
95 °C	15 Sekunden
60 °C	1 Minute

Tabelle 4: Konditionen des benutzten Standard-Cycling Programms

3.2.3 Arbeit mit Proteinen

3.2.3.1 Proteinbestimmung mittels Bicinchonin-Säure-Assay

Die absolute Proteinmenge der einzelnen Proben wurde mittels Bicinchonin Säure Assay, kurz BCA-Assay, quantifiziert. Diese Methode eignet sich für Proteinbestimmungen mit einer erwarteten Proteinkonzentration von bis zu 5 µg/ml Protein. Das Testprinzip basiert auf einer im alkalischen Medium stattfindenden Reduktion von Kupferionen (Cu²⁺ zu Cu¹⁺) durch die in

der Probe vorhandenen Proteine. Im ersten Schritt der Reaktion, die als Biuretreaktion bekannt ist, bilden Kupferionen einen Chelatkomplex mit Peptiden, welche mindestens drei Aminosäurereste enthalten, einen makroskopisch sichtbaren hellblauen Komplex. Im zweiten Teil reagiert die zugefügte Bicinchoninsäure mit den reduzierten Kupferkationen. Eine Probe mit hohem Proteinanteil färbt sich intensiv violett. Der entstandene BCA-Kupferkomplex kann photometrisch gemessen werden.

Nach Herstellerangaben wurde der Albumin-Standard mit bekannter Proteinkonzentration in Radioimmunpräzitationspuffer (RIPA)-Puffer aufgenommen und als Doppelbestimmung in eine 96-Well-Platte pipettiert. Die untersuchten Proben wurden ebenfalls in doppelter Bestimmung aufgetragen. Das BCA-Working-Reagent wurde unmittelbar vor der photometrischen Bestimmung angesetzt und mittels Multipipette auf die Proben sowie den Standard pipettiert. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten mit anschließender Durchmischung der Proben für 30 Sekunden auf einer Schüttelplatte. Die photometrische Bestimmung erfolgte bei einer Wellenlänge von 562 nm. Die Berechnung der einzelnen Proteinkonzentrationen erfolgte im Vergleich zur Standardkurve der bekannten Konzentration im aufgetragenen Proteinstandard mittels quadratischer Funktion ($y = ax^2 + bx + c$).

Materialien	Menge
1 M Tris/HCl (pH 7,4)	5 ml
1 M NaCl	15 ml
0,5 M EDTA (pH 7,4)	0,2 ml
Triton X-100	1 g
Sodiumdeoxycholat 1 %	1 g
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 0,1 %	0,1 g
Ad 100 ml ddH ₂ O	
Pro 10 ml RIPA-Puffer wurde eine Tablette PhosStop sowie complete ultra Mini EDTA-free hinzugefügt	

Tabelle 5: Benutztes Rezept für den RIPA-Puffer

3.2.3.2 SDS-Page und Immunoblot

Der Immunoblot, auch Western Blot genannt, beschreibt ein erstmals 1979 beschriebenes Verfahren, bei dem Proteine auf eine Membran übertragen und anschließend sichtbar gemacht werden können⁷⁹. Im ersten Schritt erfolgt mittels Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-Page) die Auftrennung eines Proteingemisch nach

seiner molekularen Masse und seiner Ladung. Anschließend werden durch Anlegen eines gerichteten elektrischen Feldes die negativ-geladenen Proteine vom Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran transferiert. Danach erfolgt die Inkubation mit spezifischen Antikörpern, die an die Epitope der gesuchten Proteine binden. Mit einem sekundären Detektionsantikörper, welcher an die Fc-Region des Primärantikörpers bindet, werden die Proteine sichtbar gemacht und quantifiziert.

Um die Proteine nach ihrer molekularen Größe aufzutrennen, wurden entsprechend der photometrischen BCA-Messung gleiche absolute Mengen (7,5–15 µg) Protein einer jeden Probe mit Laemmli-Puffer (Rezept siehe unten) inklusive Dithiothreitol (DTT) versetzt. Während der SDS-haltige Laemmli-Puffer die Proteine denaturiert, sodass die Proteine in reiner Aminosäuresequenz vorliegen und ihnen eine gleichmäßige negative Ladung versetzt, fungiert das DTT als Reduktionsmittel, welches die Schwefelbrückenbindungen zwischen den Proteinen aufspaltet. Um die tertiären und quartären Strukturen der Proteine aufzulösen, wurden alle Proben für fünf Minuten bei 95 °C in einem Thermocycler aufgeköcht und danach unmittelbar auf Eis gesetzt.

Für die SDS-Page wurden in dieser Arbeit selbstgegossene 12%ige Polyacrylamidgele mit zehn Taschen benutzt. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Gel bei 4 °C in einer feuchten Kammer gelagert. Außerdem wurden der Trenngelpuffer, der Sammelpuffer, der SDS-Page-Laufpuffer sowie Tris-buffered saline mit Tween20, kurz TBS-T, hergestellt. Der methanolhaltige Blotpuffer wurde am Tag des Immunoblots frisch hergestellt und bis zur Verwendung gekühlt gelagert. Die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer findet sich in den untenstehenden Tabellen.

In die einzelnen Taschen des Gels wurde jeweils 8–10 µg des im BCA-quantifizierten Ziel-Proteins einer jeden Probe aufgetragen. Zusätzlich wurde pro Gel mindestens ein vorgefärbter Molekulargewichtsmarker verwendet. Der Laufpuffer wurde in das Kassettensystem eingefüllt. Anschließend wurde eine Spannung von 60 Volt (V) angelegt. Nachdem die Proben in das Trenngel gelaufen sind, wurde die Spannung auf 100 V erhöht. Während der SDS-Page wurde der Prozess der Proteinaufteilung anhand des molekularen Markers sowie die durch den blau gefärbten Laemmli-Puffer sichtbare Laufbande kontinuierlich beobachtet und nach etwa zwei Stunden beendet.

Um die Proteine sichtbar machen zu können, wurden diese auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Dieses ist für den nassen Transfer geeignet. Die Membran wurde zunächst in Methanol aktiviert und im Anschluss auf in Blotpuffer getränkte Filterpapiere sowie zum System gehörende Schwämme gelegt. Die Membran wurde, ohne diese mit den Handschuhen zu berühren, vorsichtig auf dem Polyacrylamid-Gel platziert und ebenfalls mit Filterpapieren und Schwämmen bedeckt. In einer mit Blotpuffer befüllten Schale wurde über dem letzten

Schwamm mit einem Roller moderater Druck ausgeübt, um Blasenbildung auf der Membran zu vermeiden. Die Halteapparatur wurde in die Blotkammer transferiert und der restliche Blotpuffer eingefüllt. Von außen wird die Blotkammer mit Eis gekühlt. Beim Transfer fließen die Proteine von der Anode, auf deren Seite sich das Gel befindet, zur Kathode in Richtung Membran. Die Proteine wurden bei 200 mA für zwei Stunden auf die Membran transferiert. Nach Abschluss wurde die Membran für fünf Minuten mit Ponceau-Rot gefärbt. Durch die Ponceau-Rot-Färbung färben sich alle Proteinbanden an. Anhand der zu untersuchenden Proteine und dem Molekularmarker wurde die Membran gezielt in einzelne Teile geschnitten, um mit unterschiedlichen Primärantikörpern inkubieren zu können. Die Ponceau-Rot-Färbelösung wurde nach dem Schneiden mit TBS-T wieder entfernt. Danach wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit der Blockierlösung, in unserem Fall 5 % BSA in TBS-T, bedeckt und auf einem Schüttler geschwenkt. Die Blockierung ist notwendig, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu vermeiden. BSA oder Milchpulver sind gut etablierte Blockierungslösungen, welche viele Proteine als potenzielle Bindungsstellen besitzen und eine unspezifische Bindung an andere Proteine der Membran verhindern.

Alle Antikörper wurden in 5 % BSA in TBS-T gelöst. Die Membranen wurden bei 4 °C über Nacht mit dem primären Antikörper inkubiert. Danach wurde der Primärantikörper für dreimal zehn Minuten mit TBS-T von der Membran entfernt. Anschließend wurden die Membranen mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die Membranen kontinuierlich auf einem Schüttler geschwenkt. Danach wurde auch der Sekundärantikörper mit TBS-T entfernt. Es wurden folgende Antikörper verwendet:

Primärer Antikörper	Verdünnung
Phospho-STAT3 (Tyr705) (Cell Signaling, Technology, Danvers, MA, USA, #9145)	1:1000
STAT3 (D1B2J) (Cell Signaling, Technology, Danvers, MA, USA, #30835)	1:1000
Phospho-SMAD2 (Ser465/Ser467, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA, #3849-I)	1:1000
SMAD2/3 (D7G7) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, #8685)	1:1000
GAPDH (Cell Signaling, Danvers, MA, USA, #2118I)	1:7500

α SMA (Abcam, Cambridge, UK, ab5694)	1:5000
p44/42 MAPK (Erk1/2) (Cell Signaling, Technology, Danvers, MA, USA, #4695)	1:1000
phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2, Thr202/Tyr204) (Cell Signaling, Technology, Danvers, MA, USA #9101)	1:1000
Sekundärer Antikörper	Verdünnung
Anti-Rabbit IgG Peroxidase antibody, (Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Deutschland, #A0545)	1:10.000

Tabelle 6: Benutzte Antikörper sowie zugehörige Verdünnung für Immunoblot-Analysen.

Die Detektion der Membranen erfolgte mit SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate und ECL™ Start Western Blotting Detection Reagent. Je nach Stärke der Banden wurden unterschiedliche Verdünnungen dieser beiden Substrate verwendet, die Verdünnung für das gesuchte Protein mit der Ladekontrolle (Gapdh) war jedoch stets dieselbe. Die Membranen wurden unter Chemilumineszenz in einer Entwicklerkammer der Firma Fusion belichtet.

Um mehrere Proteine mit ähnlicher molekularer Größe auf der gleichen Membran sichtbar zu machen, erfolgte vereinzelt ein einmaliges Strippen der Membran. Hierbei werden die gebundenen Antikörper von der Membran entfernt und der Western Blot kann erneut mit einem primären und sekundären Antikörper inkubiert werden. Dazu wurde die Membran nach der Entwicklung für fünf Minuten in ddH₂O gewaschen und die Membran für zwei bis acht Minuten mit 0,2 M NaOH benetzt. Anschließend wurde die Membran für fünf Minuten in TBS-T gewaschen und erneut für 30 Minuten blockiert. Danach erfolgt erneut die Antikörperinkubation wie oben beschrieben.

Die Auswertung der Bandenstärke erfolgte mithilfe der FusionCapt Advance Software. Es wurde die Optical Density (OD) der einzelnen Proteinbanden quantifiziert. Die Volumina der einzelnen Banden wurden auf die korrespondierenden Banden der Ladekontrolle normalisiert.

Materialien	Menge
126 mM Tris	3,05 g
40 % Glycerin	40 ml
8 % SDS	40 ml
0,04 % Bromphenolblau	0,04 g
pH auf 6,8 einstellen	

ad 100 ml ddH ₂ O	
------------------------------	--

Tabelle 7: Ansatz für 100 ml eines vierfach konzentrierten Laemmli Puffers.

Materialien	Menge
TrisBase	90,85 g
EDTA	1,5 g
mit HCl auf pH 8,8 einstellen	
20 % SDS	10 ml
Ad 500 ml ddH ₂ O	

Tabelle 8: Rezept für den Ansatz eines vierfach konzentrierten Trenngelpuffers (1,5 M Tris).

Materialien	Menge
TrisBase	30,3 g
EDTA	1,5 g
mit HCl auf pH 6,8 einstellen	
20 % SDS	10 ml
Ad 500 ml ddH ₂ O	

Tabelle 9: Rezept für den Ansatz eines vierfach konzentrierten Sammel-puffers (0,5 M Tris).

Materialien	Menge
TrisBase	30,2 g
Glycin	144 g
EDTA	7,44 g
20 % SDS	30 ml
Ad 1000 ml ddH ₂ O	

Tabelle 10: Rezept für den Ansatz eines zehnfach konzentrierten SDS-PAGE Laufpuffers.

Materialien	Menge
TrisBase	4,545 g

Glycin	21,6 g
MetOH	300 ml
20 % SDS	7,5 ml
Ad 1500 ml ddH ₂ O	

Tabelle 11: Rezept für den Ansatz des Blotpuffers.

Materialien	Menge
TrisBase	24,2 g
NaCl	80 g
Auf pH 7,6 einstellen	
Ad 1000 ml ddH ₂ O	

Tabelle 12: Rezept für den Ansatz des zehnfach konzentrierten TBS, kurz vor Gebrauch 0,1 % Tween20 hinzufügen.

Reagenz	Trenngel	Sammelgel
ddH ₂ O	4,3 ml	3,2 ml
Trennpuffer	2,5 ml	Entfällt
Sammelpuffer	Entfällt	1,2 ml
Acrylamid/Bis	3 ml	0,5 ml
10 % APS	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl

Tabelle 13: Rezept für den Ansatz des zwölf-prozentigen Polyacrylamidgels.

3.2.4 Arbeiten in der Zellkultur

Alle *in vitro* Versuche wurden an selbstisolierten, primären murinen kardialen Fibroblasten durchgeführt. Zur Prävention einer Kontamination wurden für die Organentnahme sowie die primäre Isolation autoklavierte Scheren und Pinzetten genutzt. Die verwendeten Materialien wurden entweder primär steril eingekauft oder vor Beginn der Isolation autoklaviert. Alle nicht primär sterilen Lösungen wurden durch einen 0,22 µM-Filter gegeben. Die Kultivierung erfolgte unter einer sterilen Werkbank. Die Oberflächen der unter der Werkbank benutzten Materialien wurden mit 70 % Ethanol desinfiziert. Die isolierten Zellen wurden in einem eigenen Inkubator gezüchtet.

Alle Ergebnisse erfolgten in Passage p2–p4. In der Literatur wird beschrieben, dass sich in höheren Passagen der Phänotyp der Fibroblasten verändert und rein der mechanische Stress und regelrechte Wachstumsbedingungen ein Auslöser für die Transdifferenzierung sein kann⁸⁰. Auf Experimente in höheren Passagen wurde deshalb verzichtet.

3.2.4.1 Isolation primärer kardialer Fibroblasten

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit bestand in der Etablierung eines Protokolls zur Isolation primärer Fibroblasten aus entnommenen Mausherzen. Hierfür wurden verschiedene

Isolationsprotokolle genutzt und für die von uns geplanten Experimente optimiert. Eine leicht angepasste Isolation mit Hilfe des gentleMACS™ Dissociators hat sich bewährt und wurde für den Hauptanteil der verwendeten Zellkulturversuche verwendet. Zur Vollständigkeit werden die anderen Protokolle hier kurz erläutert und auf Schwierigkeiten während der Isolation eingegangen.

3.2.4.2 Isolation mittels Liberase

Die kommerziell zu erwerbende Liberase™ Research Grade besteht aus verschiedenen Proteasen, unter anderem Kollagenase I und II sowie Thermolysin. Die Enzymmischung kann für die Isolation unterschiedlicher Zellen aus Gewebe genutzt werden, inklusive dem Verdau muriner Herzen. In verschiedensten Organsystemen konnten hohe Zellausbeuten sowie gute Ergebnisse in der Viabilität der isolierten Zellen erreicht werden⁸¹. Die lyophilisierte Liberase wurde nach Herstellerangaben gelöst und mit Tyrode-Lösung auf eine Konzentration von 0,1 mg/ml verdünnt. Die Ventrikel wurden wie beschrieben entnommen und in kaltes, steriles PBS überführt. Das Myokard wurde in etwa 1 mm³ kleine Stücke geschnitten und das Homogenat in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube® mit Liberase-Lösung transferiert. Danach folgte die Inkubation bei 37 °C, welches dem Temperaturoptimum der Liberase entspricht, in einem Thermoblock für etwa 30–40 Minuten. Im Thermoblock wurden die Eppendorf-Reaktionsgefäße kontinuierlich mit niedriger Drehzahl bewegt. Alle zehn Minuten wurde die Lösung mit einer stumpf abgeschnittenen und steril autoklavierten 1000 µl Pipette zweimalig vorsichtig auf- und abpipetiert, sodass die Liberaselösung das Homogenat zu jeder Zeit gleichmäßig umspülte. Nach Ablauf der Inkubation erfolgten alle weiteren Schritte auf Eis. Das Homogenat wurde bei 300 g und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in sieben Milliliter Protein-Extraction-Buffer (PEB) aufgenommen. Anschließend erfolgte die erneute Zentrifugation. Im Anschluss wurde die Zellsuspension durch einen 70 µm Filter gegeben und der Filter mit PEB-Puffer gespült. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Zellen dann in ihr Ziel-Nährmedium aufgenommen und auf vorbereitete Zellkulturplatten ausgesät.

Reagenzien	Menge
NaCl	78,9 g
HEPES	23,831 g
KCl	2,982 g
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	2,033 g
NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	0,5148 g

Ad 1000 ml ddH ₂ O, im Anschluss autoklavieren	
Glucose	1,98 g (sterilfiltriert)

Tabelle 14: Rezept für den Ansatz einer zehnfach konzentrierten Tyrode, in der die lyophilisierte Liberase aufgelöst wurde.

3.2.4.3 Fibroblasten-Isolation mittels Miltenyi gentleMACS™

Die Isolation mittels Liberase führte zu gut reproduzierbaren Ergebnissen und einem verlässlichen Fibroblasten-Wachstum, jedoch war die Menge der vitalen Zellen durch den Verdau sehr gering. Somit erbrachte der Verdau eines wertvollen Mausherzens nicht die gewünschte Quantität und intrazelluläre Veränderungen durch den subjektiv als aggressiv empfundenen Prozess konnten nicht ausgeschlossen werden. Die in dieser Arbeit für die Zellkultur-Ergebnisse verantwortlichen Fibroblasten wurden deshalb weitestgehend mittels gentleMACS™ Dissociator und dem Multi Tissue Dissociation Kit 2 isoliert. Außerdem wurde Protokoll „Dissociation of adult mouse heart using the Multi Tissue Dissociation Kit 2“, ebenfalls von Miltenyi Biotec, verwendet.

Für die Kultivierung wurde eine leicht abgewandelte Version des Herstellerprotokolls etabliert. Das Enzym-Gemisch wurde nach Herstellerangaben angesetzt und in die C-Tubes vorgelegt. Während der Präparation an der Maus wurden die Enzyme strikt auf Eis gelagert.

Das eröffnete Herz wurde auf einer sterilen Schale in etwa 1–2 mm³ große Stücke zerschnitten und in die C-Tubes überführt. Durch vorsichtiges Invertieren wurden die zerschnittenen Ventrikel mit dem Enzymmix vermischt und das C-Tube auf den gentleMACS™ Dissociator aufgesetzt. Pro C-Tube wurde, wie empfohlen, eine Heating-Unit platziert und das Programm 37C_Multi_G für 55 Minuten gestartet. Nach Beendigung des Programms wurden die C-Tubes direkt auf Eis gelagert und die Enzymreaktion mittels 7,5 ml Nährmedium (DMEM + Glutamax + 20 % FCS) abgestoppt. Die Zellsuspension wurde durch einen 70 µm Filter gefiltert und bei 600 g bei 4 °C für fünf Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml sterilem PEB resuspendiert. Anschließend erfolgte ein Verdau der Erythrozyten mittels Red Blood Cell Lysis Solution sowie ein weiterer Zentrifugationsschritt. Das Zellpellet wurde mit 10 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Auf das im Protokoll empfohlene Debris Removal, also ein Entfernen des insbesondere aus toten Zellen bestehenden Zellschrotts, wurde verzichtet, da hier reproduzierbar ein erheblicher Teil der noch vitalen Zellen entfernt wurden und das Debris Removal keinen Einfluss auf die morphologisch reine Fibroblastenkultur hatte. Im Anschluss erfolgte die Aufnahme der Zellen im Ziel-Nährmedium und die Kultivierung auf einer mit 1 % Gelatine beschichteten 6-well-Platte. Nach zwei Stunden Adhäsion der Zellen wurden

die nicht adhärenen Zellen dreimalig mit sterilem, angewärmtem PBS abgewaschen und neues Nährmedium hinzugefügt.

Materialien	Menge
BSA 0,5 %	2,7 ml
EDTA 2 mM	800 µl
PBS	196,5 ml
Der pH wurde auf 7,2 eingestellt	

Tabelle 15: Rezept für den Ansatz von 200 ml PBS-Puffer.

3.2.4.4 Magnetische Isolation (MACS) mittels MS Columns

Für FACS- und Cell-Sorting-Analysen wurden im Anschluss an den Verdau mittels Liberase beziehungsweise die gentleMACS™-Isolation Fibroblasten mittels immunomagnetischer Zellseparation (IMS) gewonnen. Bei der IMS werden magnetische Kügelchen (sogenannte „MicroBeads“), welche mit Antikörpern beschichtet sind, in die Zellsuspension eingebracht. Die somit markierten Antikörper binden an spezifische Oberflächenantigene der Zellen. Ein von der Außenseite angebrachtes Magnetfeld hält die markierten Zellen zurück, während die nicht magnetisierten Zellen aus der Zellsuspension herausgespült werden können. Im Anschluss wird das Magnetfeld entfernt, und die positiv markierten Zellen können eluiert werden. Durch mehrere Durchgänge und Inkubation mit unterschiedlichen magnetisch markierten Antikörpern ist es möglich, die Zellpopulation immer weiter aufzutrennen (sogenannte fraktionierte Trennung), bis eine Einzelzellsuspension entsteht. Bei der sogenannten positiven Selektion sind die markierten Zellen die Zielzellen, die nach Entfernung des Magnetfeldes aufgefangen werden. Bei der Depletion oder nativen Selektion sind die nicht-markierten Zellen die Zellen von Interesse. So können durch Herausfiltern von anderen Populationen Zellen gewonnen werden, für die noch keine spezifischen Antikörper zur Verfügung stehen. In dieser Arbeit wurde das Neonatal Cardiac Fibroblast Isolation Kit sowie der OctoMACS™ verwendet. In diesem Kit sind ein Non-Cardiac Fibroblast Depletion Cocktail sowie ein Cardiac Fibroblast Isolation Cocktail enthalten⁸². Die Firma Miltenyi Biotec entwickelte die Methode in den 1990er Jahren und ist Markführer für MACS-Geräte und Reagenzien⁸³.

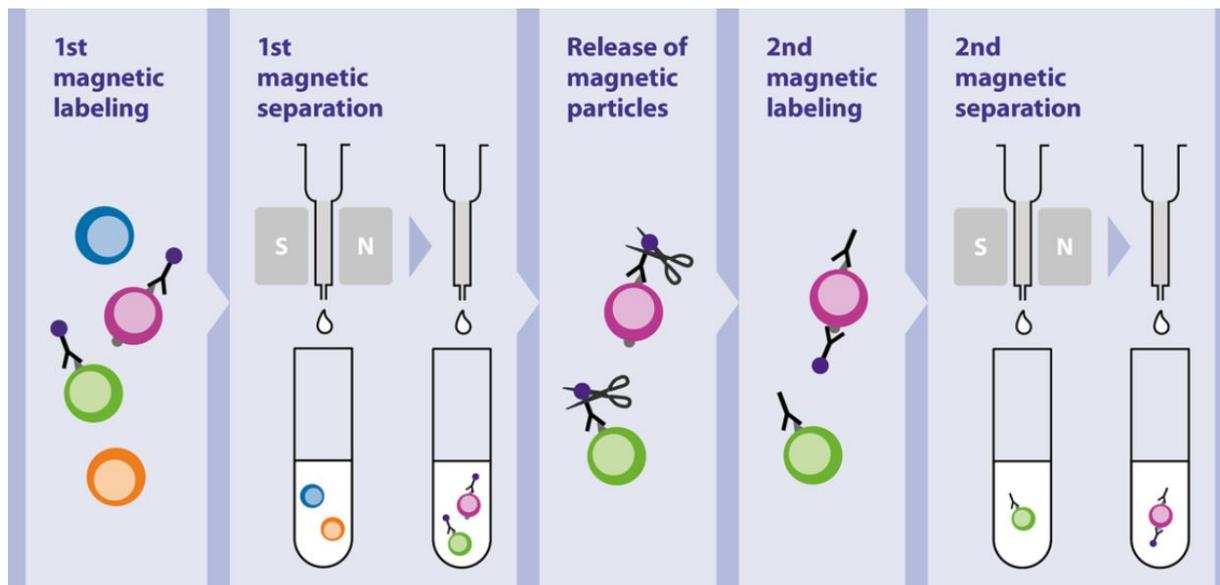


Abbildung 13: Schematische Darstellung der MACS-basierten Zellisolation⁸⁴.

Nach der beschriebenen Liberase- oder gentleMACS™-Isolation wurden die lebenden Zellen in der entstandenen Suspension gezählt. Die genutzten MS-Säulen (englisch MS Columns) haben laut Hersteller eine Kapazität von 10^7 magnetisch markierten Zellen und 2×10^8 Zellen insgesamt. Die Kapazität wurde in den von uns durchgeführten Isolierungen nicht überschritten. Die gewonnene Zellsuspension wurde bei 300 g für fünf Minuten in einer auf $4\text{ }^\circ\text{C}$ heruntergekühlten Zentrifuge abzentrifugiert und das Pellet in $90\ \mu\text{l}$ PEB-Puffer resuspendiert. Pro Probe wurden im Anschluss $10\ \mu\text{l}$ Non-Cardiac-Fibroblast Depletion Cocktail hinzugegeben. Die Probe wurde durch vorsichtiges auf- und abpipettieren gemischt und für fünf Minuten bei $2\text{--}8\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe mit PEB-Puffer auf ein Volumen von $500\ \mu\text{l}$ gebracht. Entsprechend des Herstellerprotokolls wurden die MS-Säulen zunächst mit $500\ \mu\text{l}$ PEB-Puffer vorgespült. Danach wurde die Probe auf die Säule gegeben. In diesem Schritt werden die Nicht-Fibroblasten durch den Magneten in der Säule zurückgehalten, während die Fibroblasten-Fraktion in das darunter stehende Eppendorf-Tube gespült wird. Die Säule wurde dreimal mit $500\ \mu\text{l}$ PEB-Puffer gespült und die entstandene Population („Pre enriched Fibroblasts“) erneut abzentrifugiert. In dieser Zeit wurde die Fraktion der Nicht-Fibroblasten durch Entfernen des Magnetfeldes aus der Säule gespült. Das Pellet der Pre-enriched Fibroblasts wurde in $90\ \mu\text{l}$ PEB-Puffer aufgenommen und im Anschluss $10\ \mu\text{l}$ Cardiac-Fibroblast-Isolation Cocktail hinzugegeben. Die Suspension wurde bei $2\text{--}8\text{ }^\circ\text{C}$ für 15 Minuten inkubiert und erneut, wie oben beschrieben, auf neue MS-Säulen gegeben. Der durch Spülen entstandene Durchfluss („flow-through positive selection“) wurde ebenfalls aufgefangen. Die Fibroblasten wurden in der Säule zurückgehalten und nach Entfernen des Magnetfeldes mit $1\ \text{ml}$ PEB-Puffer aus der Säule entfernt. Die Zellen wurden im Anschluss erneut gezählt und entweder direkt für FACS- oder Cell-Sorting-Analysen weiterverwendet oder für RNA- beziehungsweise Proteinisolation entsprechend eingefroren.

3.2.4.5 FACS und Cell-Sorting-Analysen

Zur Quantifizierung der Fibroblastenpopulation in unserem genetisch-modifizierten Mausmodell erfolgte nach der MACS-Isolation eine durchflusszytometrische Messung mittels Cell-Sorting. Zusätzlich zur klassischen FACS-Analyse können die vitalen Zellen nach ihren Oberflächenmarkern sortiert in einzelnen Gefäßen gesammelt und für weitere Analysen verwendet werden. Die FACS-Methode ist eine erstmals 1968 von Wolfgang Göhde entwickelte Technik, bei der Zellen zunächst mit einem fluoreszierenden Farbstoff inkubiert werden, welcher an die Oberflächenmoleküle (Cluster of differentiation, kurz CD) der Zellen bindet. Im Anschluss fließen die Zellen einzeln an einem Laserdetektor vorbei, werden dadurch angeregt und anhand ihrer Fluoreszenzsignale detektiert. Im Anschluss an die beschriebene MACS-Isolation wurden die Zellen abzentrifugiert und in 50 µl PEB sowie den Antikörpern (siehe Tabelle) resuspendiert. Nach einer Inkubation von zehn Minuten bei 4 °C im Dunkeln erfolgte eine erneute Zentrifugation, danach wurden die Zellen in 300 µl PEB aufgenommen und im FACS gemessen.

In Zusammenarbeit mit der Cell-Sorting-Facility erfolgte die Sortierung der gemessenen Zellen in einzelne Reagenzgefäße, sodass im Anschluss an die Messung die lebenden Zellen weiterverwendet werden können.

Antikörper	Verdünnung
CD90.2 APC	1:50
CD31 PE	1:50
CD45 Vio770	1:50
FACS Staining Buffer	

Tabelle 16: Genutzte Antikörper für die Cell-Sorting-Analysen

3.2.4.6 Kultivierung und Vorbereitung der Stimulation

Die adhärenenten, primären Fibroblasten wurden in einem Standard-Nährmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)+ Glutamax) kultiviert, welches mit 10 % fetalem Kälberserum (Fetal Bovine Serum, kurz FBS) sowie 1 % Penicillin/Streptomycin und 0,1 % basic Fibroblast-Growth-Factor (FGF) angereichert wurde. Die Zellen wurden regelmäßig optisch unter dem Mikroskop auf Konfluenz sowie zum Ausschluss einer Kontamination kontrolliert. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurde das Nährmedium alle zwei bis drei Tage ausgetauscht und vorher einmalig mit warmem, sterilem PBS gewaschen. Die Zellen befanden sich in einem Inkubator mit 5 % CO₂ bei 37 °C. Zur Verdünnung der steigenden Zelldichte, dem sogenannten Passagieren, wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 70–80 % mithilfe von Accutase (siehe Kapitel 3.4.5) abgelöst und mit Hilfe eines automatischen Zellzählers die Zellviabilität ermittelt.

Zur Kontrolle der automatischen Zählung erfolgte stichprobenartig die Ermittlung des Lebendzellanteils mittels Neubauer-Zählkammer. Alle verwendeten Zellkulturplatten wurden vorher mit 1%iger autoklavierter Gelatine beschichtet. Die Fibroblasten wurden mit einer Zelldichte von $0,3 \times 10^6$ Zellen pro Well einer 6-well-Platte gleichmäßig ausgesät. Für entsprechende Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte die Kultivierung auf 8-well-Chamber-Slides. Die Zellen wurden jeweils zwei- bis dreimal passagiert, bis eine morphologisch reine Fibroblastenkultur vorlag.

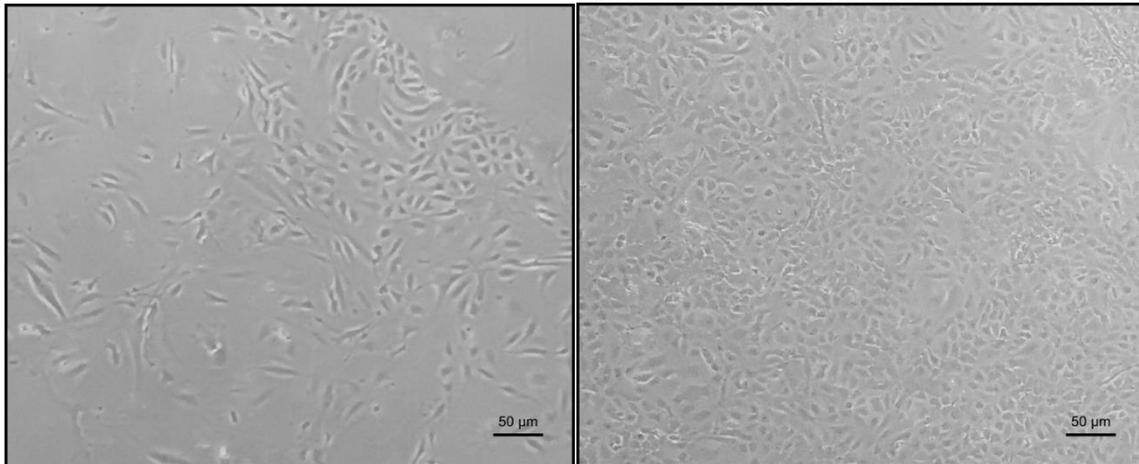


Abbildung 14: Beispielaufnahme der kultivierten primären Fibroblasten in der Zellkultur mit einer Konfluenz von etwa 60 % (links) und 100 % (rechts).

3.2.4.7 Stimulation

Bei einer Konfluenz von annähernd 100 % wurde 24 Stunden vor Beginn der Stimulation das Kultivierungsmedium gegen Hungermedium ausgetauscht. Die serumarme Hungerphase ist notwendig, um die Homogenität der Zellen zu verbessern und die Zellen in eine gleichmäßige Zellphase (G_0/G_1 -Phase) zu bringen. Außerdem enthält Serum selbst viele Komponenten, beispielsweise Proteine, die in folgenden Experimenten zu Störfaktoren werden könnten⁸⁵. Das verwendete Hungermedium enthielt lediglich 0,1 % FBS. Nach der Hungerphase wurden die Zellen wie folgt stimuliert:

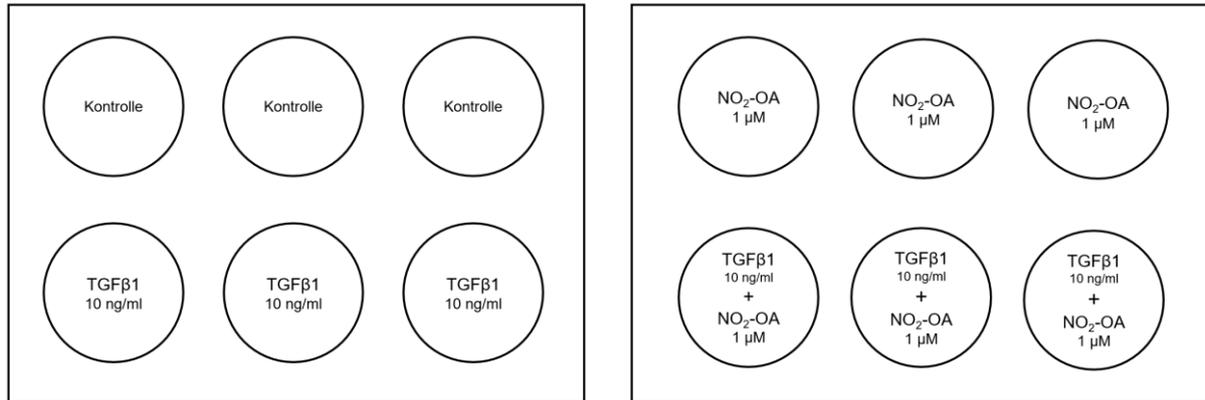


Abbildung 15: Genutzte Stimulationsbedingungen in der Zellkultur.

Die Stimulationsreagenzien wurden ebenfalls in Hungermedium gelöst. Nach einer Stimulationszeit von sechs, zwölf oder 24 Stunden wurden die Zellen einmal mit erwärmten, sterilem PBS gewaschen.

3.2.4.8 Ablösen der Zellen

Die stimulierten Fibroblasten wurden mit 750 μ l Accutase pro Well für fünf Minuten bei 37 °C abgelöst. Accutase ist ein proteolytischer Enzymmix, der ähnlich wie Trypsin zur Ablösung adhärenter Zellen führt. Laut Herstellerangaben kann Accutase Fibroblasten ablösen, ohne dabei die Eigenschaften der Zellen zu verändern oder intrazelluläre Reaktionen zu beeinflussen⁸⁶. Die Wirkung des Enzyms wurde mit der doppelten Menge Kultivierungsmedium abgestoppt und die Zellen schonend abpipettiert. Um einen Scherstress zu vermeiden, wurde auf den Einsatz eines Zellschabers verzichtet. Die Fibroblasten wurden im Anschluss bei 300 g für fünf Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Für die Aufbereitung der RNA wurde das Pellet in Trizol resuspendiert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Für die Verwendung der Proteinfraction wurde das Pellet in RIPA-Puffer aufgenommen, welche mit PhosSTOP™ und complete ultra-mini EDTA-free versetzt wurde. Die Proben wurden bei -80 °C gelagert.

3.2.5 Histologische Färbungen

Alle histologischen Färbungen wurden auf einem Keyence BZ-9000E Mikroskop angesehen und mit der Keyence BZ-II Analyzer Software quantifiziert.

3.2.5.1 Immunofluoreszenz

Für die Darstellung der TGF β -Stimulation wurden primäre kardiale Fibroblasten in einer Dichte von 20.000 Zellen pro Chamber auf einem 8-well-Chamber Slide ausgesät. Bei einer

Konfluenz von 90 % wurden die Zellen wie beschrieben stimuliert. Nach 24 Stunden wurde kaltes Ethanol 100 % für 15 Minuten auf die Zellen gegeben und für die Fixierung mit 1 % Paraformaldehyd bedeckt. Für die Färbung erfolgte zunächst eine Permeabilisation der Zellmembranen in 0,1 % Triton für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Triton bewirkt eine Durchlässigkeit der Zellmembran und dadurch den Zugang für den Antikörper ins Zellinnere. Zum Blockieren freier Bindungsstellen wurde 1 % BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Kammern gegeben. Pro Kammer wurden 85 µl der jeweiligen Antikörper-Verdünnung (siehe unten) genutzt und bei 4 °C über Nacht im Dunkeln inkubiert. Am Folgetag wurde der Antikörper zunächst mit PBS abgewaschen und im Anschluss der Zweitantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgte die Färbung der Zellkerne mittels 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) für zehn Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach Entfernen der Kammern vom Objektträger wurde dieser mit Dako Fluorescence Mounting Medium befeuchtet und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Primär- und Sekundär-Antikörper wurden in 1 % BSA gelöst, der DAPI-Antikörper in PBS.

Die Antikörper wurden in folgenden Verdünnungen verwendet:

Primäre Antikörper	Verdünnung
αSMA, Host Rabbit, Abcam	1:200
Sekundäre Antikörper	Verdünnung
Alexa Fluor 588, Thermofisher Scientific, Goat anti-rabbit	1:200
Alexa Fluor 594, Thermofisher Scientific, Chicken anti-rabbit	1:200
Zellkernfärbung	Verdünnung
DAPI, Thermofisher Scientific	1:1000

Tabelle 17: Verwendete Antikörper für die gezeigten Immunfluoreszenzfärbungen.

3.2.5.2 In situ Zymographie

Die in situ Zymographie ist eine spezielle Färbung, mit der die Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) in Kryoschnitten nachgewiesen und quantifiziert werden kann. MMPs spielen eine wichtige Rolle bei der Erhaltung einer gesunden Gewebemöostase und sind an vielen Reaktionen im Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix beteiligt^{87,88}. Die Enzymfamilie besteht aus über 25 verschiedenen Proteinen. In der in situ Zymographie wird eine fluoreszierende Gelatine verwendet, die von MMP2 und MMP9 gespalten wird⁸⁹. Ein Rückschluss auf die Aktivität der anderen MMPs ist durch diese Methode nicht möglich. Die

MMPs spalten die aufgetragene Gelatine, sodass ein fluoreszierendes Signal entsteht. Je heller das in unserem Fall grün fluoreszierende Signal, desto stärker also die MMP-Aktivität.

Die in situ Zymographie wurde an linken Ventrikeln von fünf Wildtyp-Mäusen, vier PEG-bepumpten sowie vier NO₂-behandelten Mäusen verglichen. Zunächst wurde ein EDTA-haltiger sowie ein EDTA-freier Gelatinase-Reaktions-Puffer hergestellt. Der EDTA-haltige Puffer wird in diesem Protokoll als Negativkontrolle benutzt, da das zugefügte EDTA als MMP-Antagonist fungiert. Somit wird in diesen Schnitten die Gelatinolyse verhindert und die Autofluoreszenz des Gewebes kann beurteilt werden. Die DQ-Gelatine wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml im EDTA-freien Reaktionspuffer angesetzt. Die Lösung wurde durch einen 0,2 µm Filter gefiltert. Die nicht fixierten Kryoschnitte wurden schonend auf Eis aufgetaut und die einzelnen Schnitte eines Objektträgers mit einem hydrophoben Stift umrundet, welcher ein Ausbreiten der Reagenzien über die umkreiste Fläche hinaus verhindert. Jeder Ventrikelschnitt wurde mit 50 µl der Gelatinase-Lösung bedeckt und bei 37 °C in einer dunklen Feuchtkammer für drei Stunden inkubiert. Anschließend folgten drei Waschschrte für jeweils 15 Minuten in sterilem PBS. Die Objektträger wurden mit DAKO-Immunofluorescence-Mounting-Medium befeuchtet und mit einem Deckglas abgedeckt.

Materialien	Menge
150 mM NaCl	350,64 mg
5 mM CaCl ₂	22,16 mg
0,3 mM NaN ₃	0,78 mg
50 mM Tris	242,28 mg
Für EDTA-haltigen Puffer: zusätzlich 10 mM EDTA	800 µl
Im Anschluss den pH auf 7,6 eingestellt	

Tabelle 18: Ansatz für Gelatinase-Reaktions-Puffer.

3.2.6 Plasma-Gewinnung und TGFβ-Elisa

Zur Quantifizierung der sezernierten TGFβ-Menge im Blut der Mäuse wurde ein Kit-basierter indirekter Sandwich-ELISA benutzt. Die Mikrotiterplatte des ELISAs ist mit einem spezifischen Antikörper, dem sogenannten „Capture Antikörper“ oder „Fangantikörper“ beschichtet, an den das zu messende Antigen, in diesem Fall TGFβ, aus den zugegebenen Proben, bindet. Im Anschluss wird ein Detektionsantikörper hinzugefügt, bei diesem Kit ein Biotin-konjugierter Antikörper, welches wiederum an das Antigen bindet (Antikörper – Antigen – Antikörper). Im letzten Schritt wird ein Avidin-Horseradishperoxidase (HRP)-Konjugat hinzugefügt, welches

an das Biotin des Detektionsantikörpers bindet. Durch die Reaktion mit einem 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrat entsteht ein Farbumschlag, welcher spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen werden kann. Über die OD des gleichzeitig aufgetragenen Standards kann die Konzentration von TGF β in jeder einzelnen Probe berechnet werden.

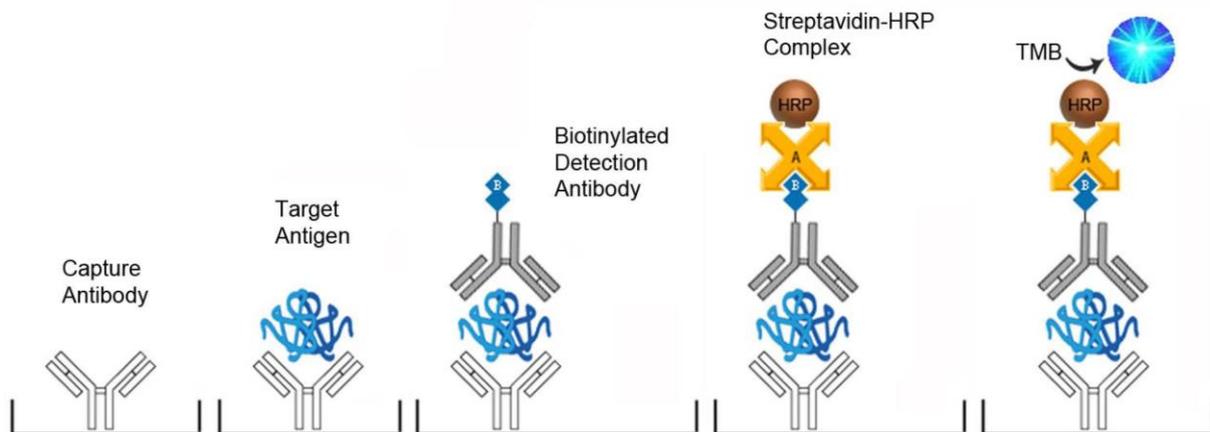


Abbildung 16: Prinzip des verwendeten Sandwich-ELISA⁹⁰.

Mit dem verwendeten ELISA können geringe Mengen (157–1000 pg/ml) TGF β 1 nachgewiesen werden. Die Proben wurden entsprechend des Protokolls vorbereitet und gemessen. Das verwendete Blut wurde durch eine intrakardiale Punktion vor der Organentnahme abgenommen und anschließend in einem Heparin-Röhrchen abzentrifugiert. Es wurde Plasma aus sechs WT-Mäusen mit acht *Mlp*^{-/-} Tieren, welche lediglich die Trägersubstanz PEG erhielten, mit sieben mit NO₂-OA behandelten *Mlp*^{-/-} Mäusen verglichen.

3.2.7 Total Collagen Assay

Um die Kollagenmenge im Ventrikel der Wildtyp-Mäuse mit *Mlp*^{-/-} Mäusen vergleichen zu können, wurde der Kollagengehalt mittels eines Total Collagen Assay Kits bestimmt. Mit diesem Assay kann die Kollagenmenge sowohl aus lysiertem Gewebe als auch aus Plasma oder anderen Flüssigkeiten quantifiziert werden. Die Messung basiert auf der Hydrolyse der Proben im alkalischen Bereich. Zunächst wird Hydroxyprolin freigesetzt, welches in einem weiteren Reaktionsschritt durch einen Farbumschlag photometrisch bei einer OD von 560 nm gemessen werden kann. Je nach gemessener Intensität des Farbumschlags kann die Menge des in der Probe enthaltenen Kollagens berechnet werden.

Das bei -80 °C gelagerte Ventrikelgewebe wurde schonend auf Eis aufgetaut. Nach Herstellerangaben wurde das Gewebe mit 100 μ l ddH₂O versetzt und in einem Gewebelysierer lysiert. Danach wurde das Lysat in ein Eppendorf-Tube transferiert und 100 μ l einer 10-molaren NaOH-Lösung hinzugegeben. Die Proben wurden bei 120 °C für eine Stunde

erhitzt. Im Anschluss wurden die erhitzten Proben direkt auf Eis gelagert und abgekühlt. Danach wurden 100 µl einer 10-molaren HCl-Lösung unter einem Abzug hinzugefügt und die Proben kurz auf einem Vortex-Mischer durchmischt. Es erfolgte die Zentrifugation bei 10.000 g für fünf Minuten. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Tube transferiert. Die vorbereiteten Proben verblieben auf Eis.

In einer 96-Well-Platte wurden 10 µl des im Kit enthaltenen Kollagen-Standards sowie 10 µl der zu bestimmenden Proben in Doppelbestimmung vorgelegt. Entsprechend des Protokolls wurden anschließend der Oxidations-Mix hinzugegeben und die Platte lichtgeschützt bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Entwickler-Lösung und eine fünfminütige Inkubation bei 37 °C. Zu jeder Probe wurden 50 µl des DMAB-Konzentrats gegeben und auf einem Plattenschüttler bei geringer Geschwindigkeit durchmischt. Die Platte wurde mit der beiliegenden Folie verschlossen und lichtgeschützt für 45 Minuten bei 65 °C inkubiert. Im Anschluss wurde der Farbumschlag bei 560 nm im Spektralphotometer gemessen. Zur Auswertung der einzelnen Kollagenkonzentrationen wurde der Mittelwert der Doppelbestimmung bestimmt und davon die Absorption der negativen Blindprobe subtrahiert. Aus den Messungen des Kollagenstandards wurde eine Standard-Kurve erstellt und die Kollagenkonzentrationen der einzelnen Proben entsprechend berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Statistische Auswertung

Mit „n“ wird die Anzahl der Versuchstiere oder Einzelversuche in der Zellkultur bezeichnet. Die Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism Version 8. Als statistisch signifikant wurden p-Werte $< 0,05$ gewertet. Das Signifikanzniveau wird in einigen Grafiken mit Sternchen dargestellt. Hier bezeichnet * einen p-Wert von $< 0,05$ und ** einen p-Wert von $< 0,01$.

4.2 Vorarbeiten: Nitrierte Fettsäuren verbesserten die linksventrikuläre Funktion

Die hier beschriebenen Versuche beruhen teilweise auf Vorarbeiten, welche bereits durch andere Mitglieder der Arbeitsgruppe generiert und ebenfalls in der angegebenen Publikation veröffentlicht wurden. Die Vorarbeiten, aus denen sich auch die Hypothesen für diese Arbeit generieren, wurden von verschiedenen Co-Autoren der Publikation, darunter Simon Braumann, Simon Geissen und Nam Gyu Im, durchgeführt und vor der Veröffentlichung gemeinsam analysiert und diskutiert. Zum besseren Verständnis und zur Einordnung in den Gesamtzusammenhang der Fragestellung werden die Ergebnisse hier kurz erläutert.

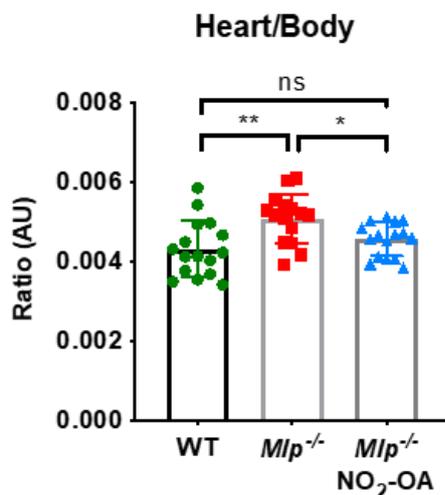


Abbildung 17: Erkrankte *Mlp*^{-/-} Mäuse hatten ein erhöhtes Herz-Körpergewicht-Verhältnis, welches sich insbesondere über das erhöhte Herzgewicht erklärt. Nach einer vierwöchigen Behandlung besserte sich dieses signifikant.

Bei *Mlp*^{-/-} Mäusen mit DCM imponierte im Alter von zwölf Wochen ein signifikant erhöhter Herz-/Körpergewichts-Quotient (Heart-Body-Weight-Ratio, HBWR). Nach vier Wochen kontinuierlicher subkutaner Applikation von NO₂-OA verringerte sich das Gewicht der explantierten Herzen der behandelten KO-Mäuse signifikant. Somit zeigte sich ein erniedrigtes HBWR in Richtung der gesunden Wildtyp-Geschwister Tiere.

Auch funktionelle Messungen zeigten die Wirkung des NO₂-OA. Echokardiographisch wurden die LV-EF sowie das Cardiac Output gemessen. *Mlp*^{-/-} Versuchstiere zeigten eine signifikant reduzierte LV-EF im Vergleich zu gesunden Geschwister Tieren. Nach vier Wochen Behandlung hatte sich die LV-EF um etwa 10 % verbessert. Die Messung des Herzminutenvolumens (CO) zeigte vergleichbare Ergebnisse. Hier wiesen die erkrankten Mäuse einen signifikant reduzierten Auswurf auf. Nach der Behandlung zeigte sich eine Verbesserung, die aber nicht signifikant blieb ($p = 0,051$). Neben der EF und dem CO wurde auch der Global Longitudinal Strain (GLS) als zusätzlicher Marker für die Kontraktilität gemessen. Hier wird die Verkürzung des Myokards bestimmt. Je stärker sich das LV-Myokard während der Systole verkürzt, desto negativer wird der Wert des GLS und desto

beeinträchtigt ist die linksventrikuläre Herzfunktion. Mäuse mit *Mip^{-/-}* ohne Behandlung zeigten nach vier Wochen eine schlechtere GLS als zu Beginn der Versuchsreihe, während die Ventrikel der behandelten erkrankten Mäuse eine verbesserte Kontraktilität zeigten. Die LV-Funktion von behandelten Wildtyp-Mäusen wurde durch die Behandlung mit nitrierten Fettsäuren nicht beeinflusst (Ergebnisse hier nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnte in Vorergebnissen eine signifikante funktionelle Verbesserung der Herzfunktion der erkrankten Mäuse durch eine vierwöchige Behandlung mit subkutaner nitrierter Ölsäure erreicht werden.

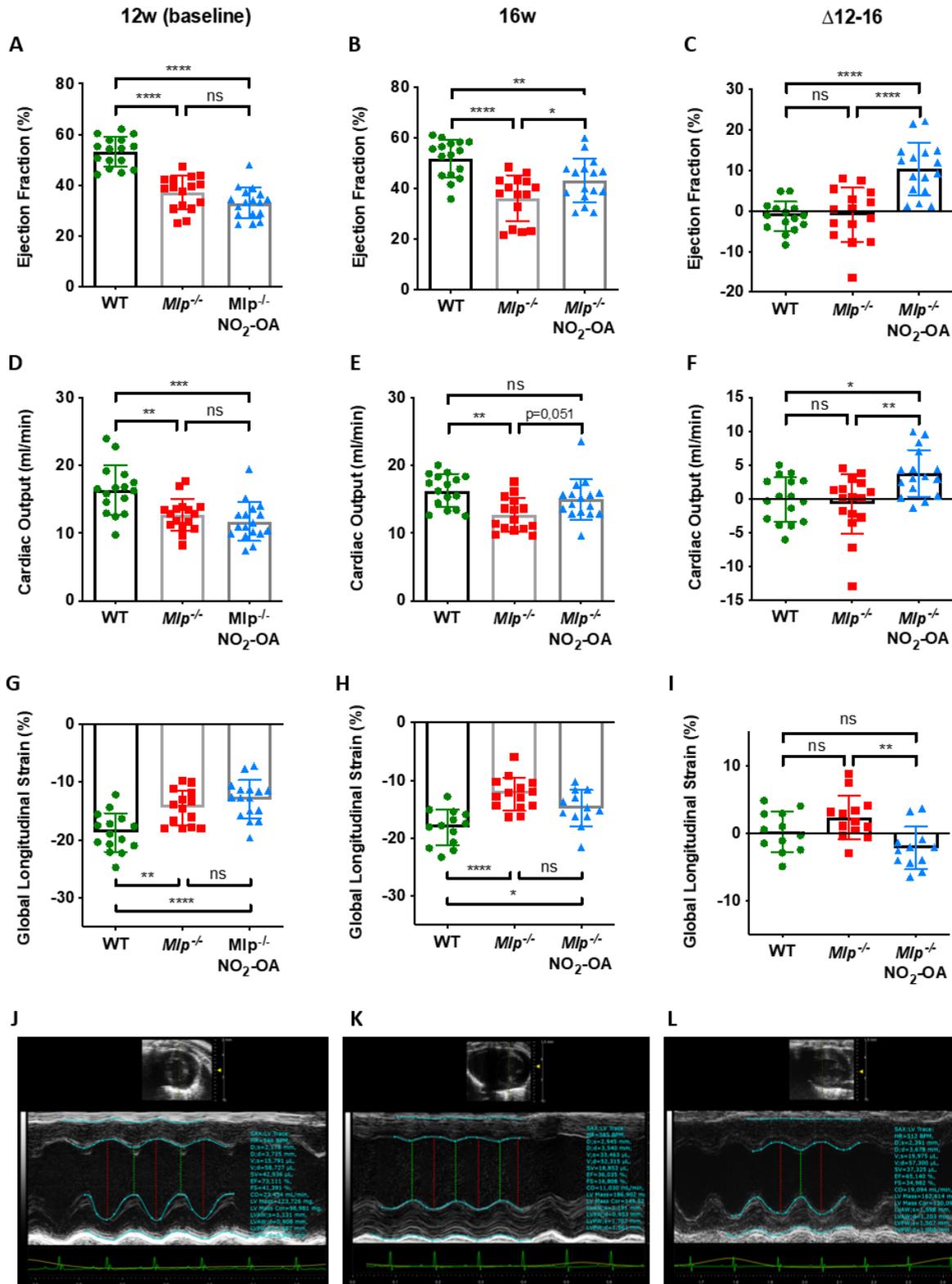


Abbildung 18: Vorarbeiten entsprechend der Originalpublikation. Vor der Behandlung zeigten *Mip*^{-/-} Mäuse eine signifikant eingeschränkte LV-EF im Vergleich zu ihren WT-Geschwistertieren (A). Nach vierwöchiger Behandlung mit NO₂-OA hatte sich die LV-EF im Vergleich zu den Tieren, die lediglich die Trägersubstanz PEG erhielten, signifikant verbessert (B, C). Für das CO konnten ähnliche Ergebnisse dargestellt werden (D, E, F) sowie das GLS (G, H, I). Repräsentative Darstellungen der Echokardiographie mit GLS-Messung in WT (J), *Mip*^{-/-} Tiere, welche PEG (K) sowie *Mip*^{-/-} Tiere, welche die Behandlung mit NO₂-OA erhielten (L).

4.3 Nitrierte Fettsäuren verbesserten die myokardiale Fibrosierung in erkrankten Mäusen

Um die intraventrikuläre Fibrose in den Versuchstieren zu untersuchen, wurden in Formalin fixierte Ventrikelschnitte mit der Picrosirius-Rot-Färbung gefärbt. Mit dieser Färbung stellen sich Kollagenfasern rot dar, während der Muskelanteil des Myokards gelb-orange gefärbt wird⁹¹. In den *Mlp*^{-/-} Tieren, welche über vier Wochen die Trägersubstanz PEG erhalten haben, zeigte sich eine vermehrte interstitielle Fibrose, die anhand der rot gefärbten Fasern zu erkennen ist. Nach vier Wochen Behandlung war die Fibrosierung der Ventrikel bereits rückläufig beziehungsweise deutlich geringer ausgeprägt als bei den nicht-behandelten erkrankten Geschwistertieren. In einer quantitativen Auswertung zeigte sich der Unterschied der Fibrosierung zweifach signifikant. Die Färbung selbst wurde von Mitgliedern der Arbeitsgruppe durchgeführt, die partielle Auswertung war ebenfalls Teil dieser Arbeit.

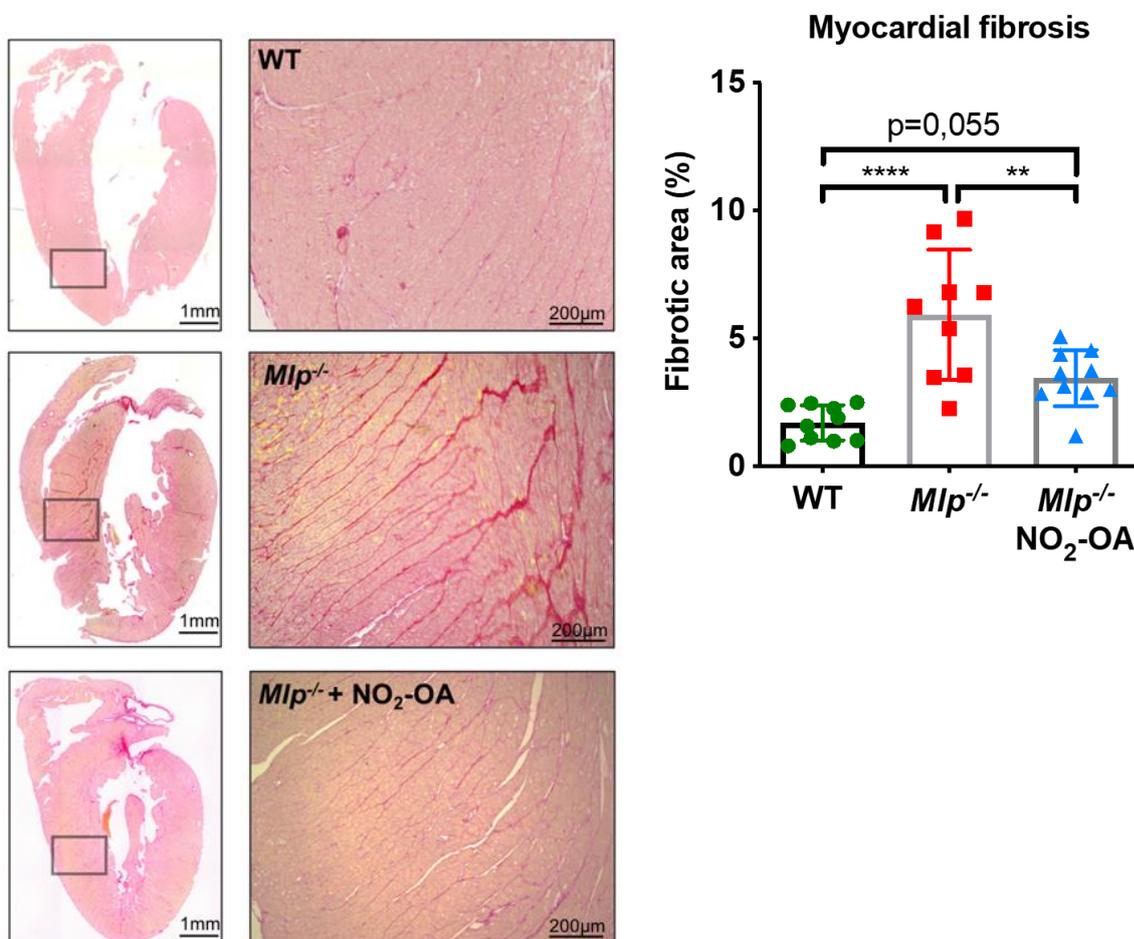


Abbildung 19: Repräsentative Aufnahmen der fibrosierten Ventrikel in der Picrosirius Rot Färbung (links) sowie Quantifizierung des fibrotischen Anteils (rechts) mit signifikant weniger Fibrosierung in mit NO₂-OA behandelten Versuchstieren.

4.4 Experimente an Ventrikelgewebe

4.4.1 NO₂-OA verringerte die exprimierte Kollagenmenge in Ventrikeln der behandelten Mäuse

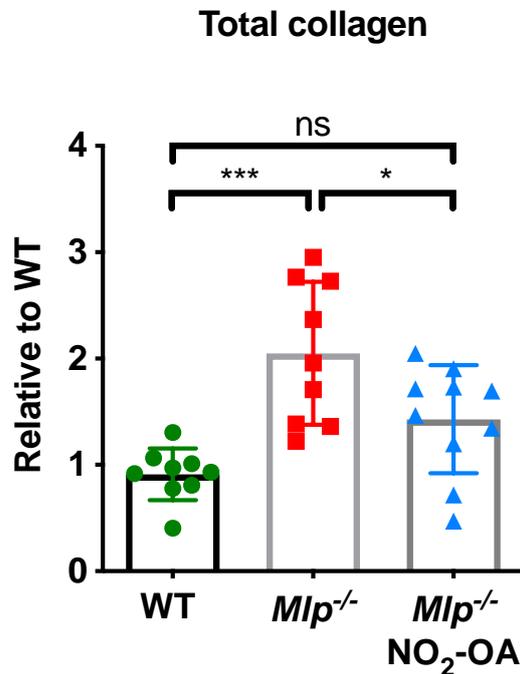


Abbildung 20: Erkrankte Mäuse exprimierten signifikant mehr intraventrikuläres Kollagen als ihre gesunden Wildtyp-Geschwistertiere. Nach der Behandlung mit NO₂-OA zeigte sich bereits eine signifikante Reduktion des Kollagens auf Ventrikel Ebene.

Mithilfe des Total-Collagen Assays wurde der Kollagengehalt in Ventrikeln von Wildtypmäusen mit der Menge an Kollagen in Ventrikeln von *Mlp*^{-/-} Mäusen ohne sowie nach der Behandlung mit NO₂-OA verglichen. Unbehandelte *Mlp*^{-/-} Mäuse zeigten signifikant ($p < 0.05$) höhere Kollagenlevel im Vergleich zu WT-Mäusen. Nach vierwöchiger Behandlung wurde im Ventrikel der behandelten Mäuse signifikant weniger Kollagen nachgewiesen als in Myokardgewebe der unbehandelten Geschwistertiere. Ein Vergleich zwischen den WT-Mäusen und den behandelten *Mlp*^{-/-} Mäusen blieb nicht signifikant.

4.4.2 Auf mRNA-Ebene bestand kein Unterschied in der Expression von *Tgfβ* sowie der untersuchten Kollagene

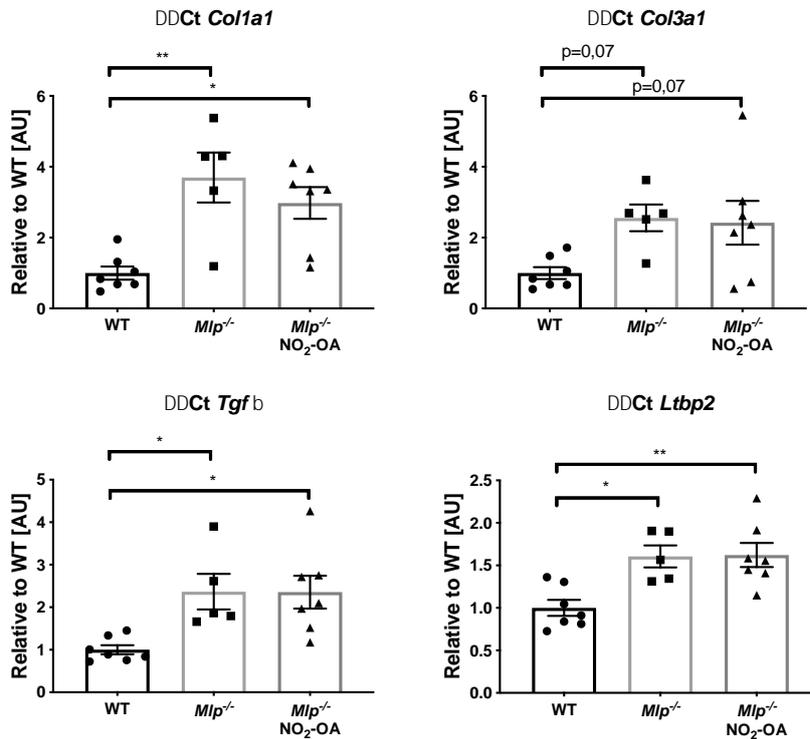


Abbildung 21: Expression der Gene *Col1a1*; *Col3a1*, *Tgfβ* sowie *Ltbp2* in der qPCR in Ventrikeltgewebe aus Wildtyp-Tieren, erkrankten unbehandelten Tieren sowie erkrankten *Mip*^{-/-} Tieren mit vierwöchiger NO₂-OA-Behandlung.

Im homogenisierten Gewebe aus den linken Ventrikeln der Versuchstiere wurden unterschiedliche mit Fibrosierung assoziierte Gene auf mRNA-Ebene analysiert. Hier zeigte sich in den Tieren mit DCM eine vermehrte Expression der Kollagen Typ 1 und 3 sowie *Tgfβ* und des *Latent TGFβ binding Protein 2 (Ltbp2)* und somit ein deutlicher Unterschied zwischen den erkrankten und gesunden Tieren. Zwischen den nicht-behandelten und den behandelten *Mip*^{-/-} Tieren konnte kein Unterschied gezeigt werden.

4.4.2.1 In erkrankten und gesunden Mäusen fand sich kein Unterschied zwischen den TGFβ-Plasmaspiegeln

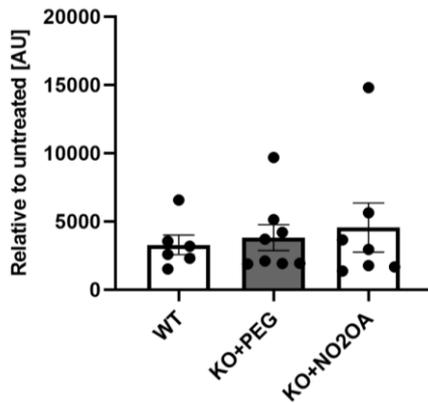


Abbildung 22: Plasma-Level von TGFβ im Plasma von behandelten und unbehandelten Versuchstieren.

In Plasmaproben aus allen drei Versuchstiergruppen wurden die TGFβ-Spiegel mittels ELISA bestimmt. Zwischen den Gruppen fanden sich keine Unterschiede des TGFβ-Plasma-Spiegeln.

4.4.3 Sowohl TGFβ als auch TGFβ/LAP zeigten vermehrte Expression auf Proteinebene in erkrankten Mäusen

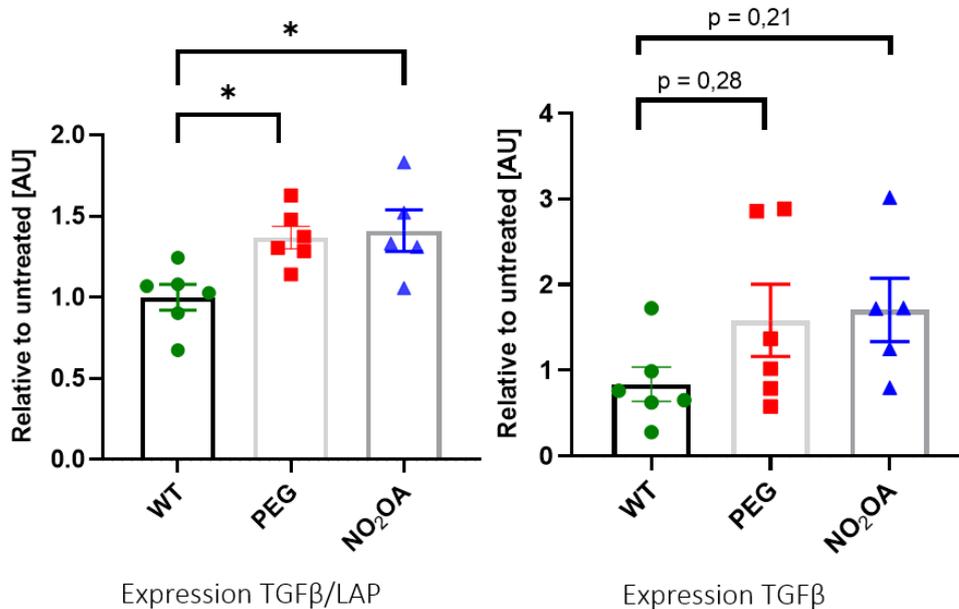
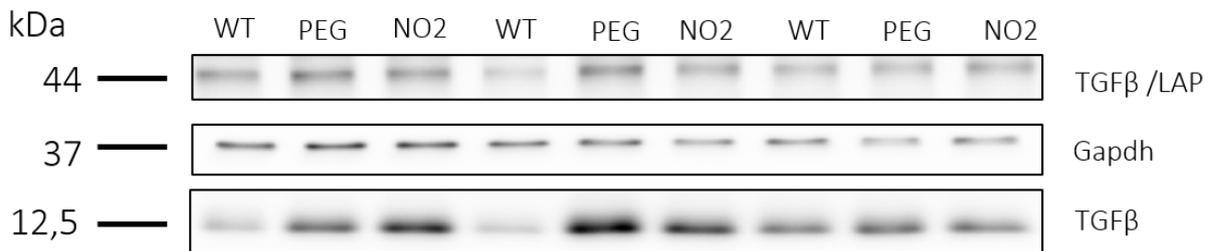


Abbildung 23: Expression von TGFβ/LAP (links) sowie reifem TGFβ (rechts) im Immunoblot.

In Abbildung 23 ist die Expression von TGF β /LAP sowie von TGF β selbst in behandelten Mäusen sowie *Mip*^{-/-} Mäusen, welche nur die Trägersubstanz PEG erhielten, im Vergleich zu unbehandelten Wildtyp-Geschwistertieren im Immunoblot zu sehen. Es zeigte sich eine vermehrte Expression von reifem TGF β sowie des LAPs in den *Mip*^{-/-} Tieren. Die Behandlung mit nitrierter Ölsäure führte jedoch zu keiner signifikanten Veränderung auf Proteinebene.

4.4.4 Auf mRNA- sowie auf Proteinebene zeigten sich keine Unterschiede in der Expression des *Tgf β* -Rezeptors 1

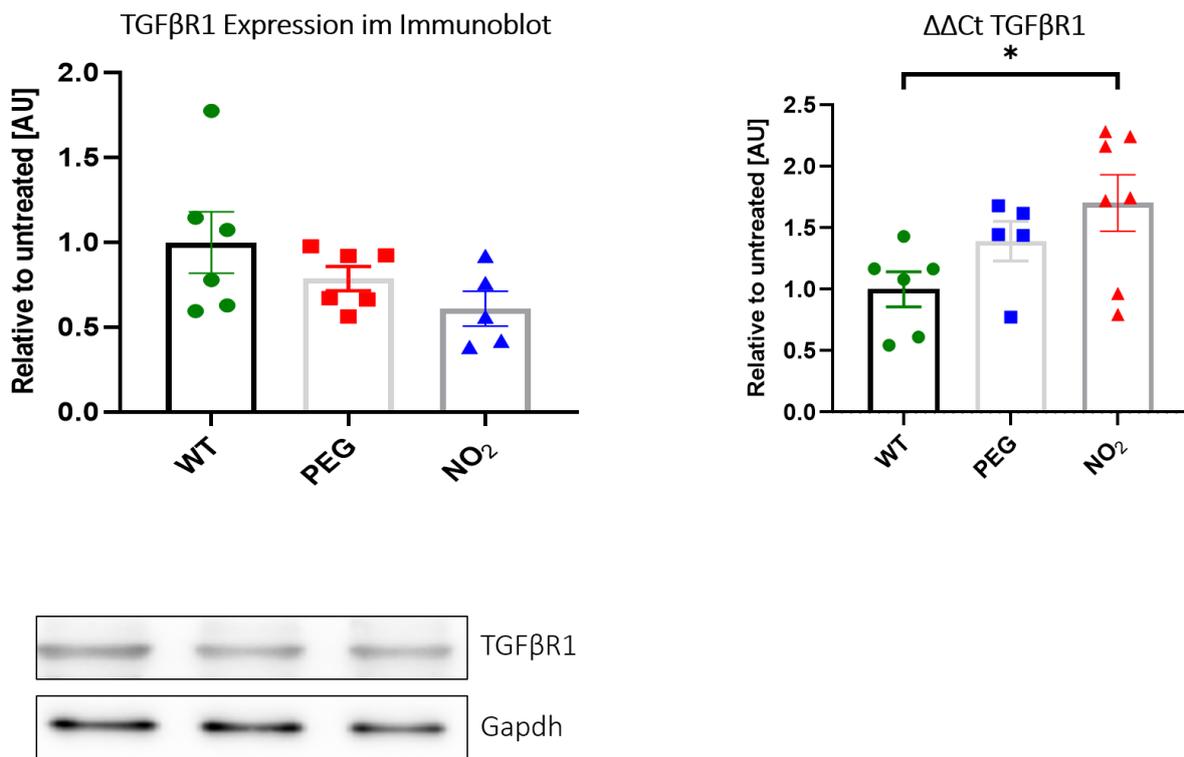


Abbildung 24: Expression von TGF β -Rezeptor 1 auf Proteinebene im Immunoblot (links) und in der qPCR (rechts).

In Abbildung 24 wird die relative Änderung der Expression auf mRNA-Level sowie im Immunoblot von TGF β -Rezeptor 1 in LV-Gewebe dargestellt. Diese Ergebnisse dienen als Bestätigung, dass die im weiteren Verlauf beschriebenen Modifikationen im TGF β -Signalweg, beispielsweise in *pStat/Stat* und *pSmad/Smad*, nicht durch eine Überexpression auf Rezeptorebene, sondern einen direkten TGF β -Effekt zurückzuführen waren. Im Immunoblot sowie in den repräsentativ ausgewählten Proteinbanden ist zu sehen, dass keine Änderung des Rezeptorlevels zwischen den Gruppen vorlag. In der qPCR stellte sich eine Hochregulation auf Rezeptorebene in der mit NO₂-OA-behandelten Gruppe dar.

4.4.5 Die Behandlung mit NO₂-OA veränderte die Aktivität der Matrixmetalloproteasen 2 und 9 in der in situ Zymographie

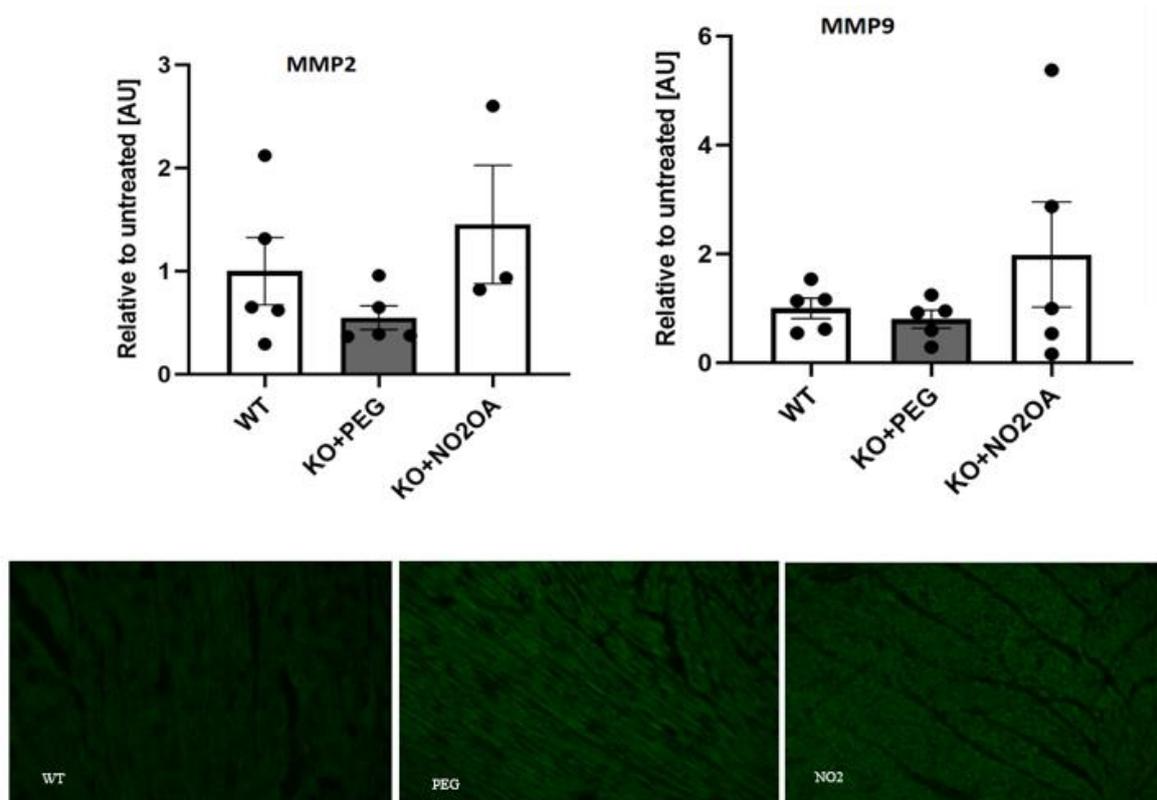


Abbildung 25: In der mRNA-Expression zeigte sich kein Effekt der relativen Genexpression für MMP2 und MMP9. Eine rein qualitative Betrachtung in der in situ Zymographie ließ eine subjektive vermehrte enzymatische Aktivität in den Schnitten der *Mlp*^{-/-} Tiere erahnen. Auf den Einsatz der in situ Zymographie wurde im weiteren jedoch verzichtet.

In der qPCR konnte kein Unterschied zwischen der Expression von *Mmp2* und *Mmp9* zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen gezeigt werden. In der in situ Zymographie erschien die enzymatische Aktivität der MMP2/9 im Vergleich zu WT-Geschwistertieren im Myokard von behandelten und nicht-behandelten *Mlp*^{-/-} Tieren verstärkt. Die Auswertung erfolgte rein qualitativ. Bei nicht reproduzierbaren und nicht auswertbaren Ergebnissen, sowie in Zusammenschau mit der *Mmp2/9*-Expression auf mRNA-Ebene wurde diese Methode nicht weiterverfolgt.

4.5 *In Vitro*-Ergebnisse: Etablierung einer primären Fibroblastenkultur

In den beschriebenen Vorarbeiten und in den *in vivo* Versuchen konnte eine vermehrte intraventrikuläre Fibrosierung in den *Mip*^{-/-} Tieren nachgewiesen werden. Ein Treiber für vermehrte Fibrosierung und Kollagenexpression ist TGFβ.

In den hier durchgeführten Zellkulturexperimenten sollte insbesondere gezeigt werden, wie Fibroblasten als primär für die Expression extrazellulärer Matrixproteine verantwortliche Zellpopulation von NO₂-OA beeinflusst werden.

4.5.1 Isolation mittels OctoMACS sowie anschließende Cell-Sorting-Analyse

4.5.2 In der Cell-Sorting Analyse war keine Isolation von primären Fibroblasten im *Mip*^{-/-} Modell möglich

Nach der Etablierung des Isolationsprotokolls und dessen Quantifizierung erfolgte eine Cell Sorting Analyse. Im Gegensatz zur reinen FACS-Methode werden die Zellen hier während der Analyse in einzelne Eppendorf-Tubes sortiert und stehen für weitere Analysen, beispielsweise Genomics oder Proteomics, zur Verfügung. Die Analyse wurde mit freundlicher Hilfe von Herrn Dr. Gunter Rapp, Leiter der Cell Sorting Facility des Zentrums für Molekulare Medizin der Universität zu Köln (ZMMK) durchgeführt⁹².

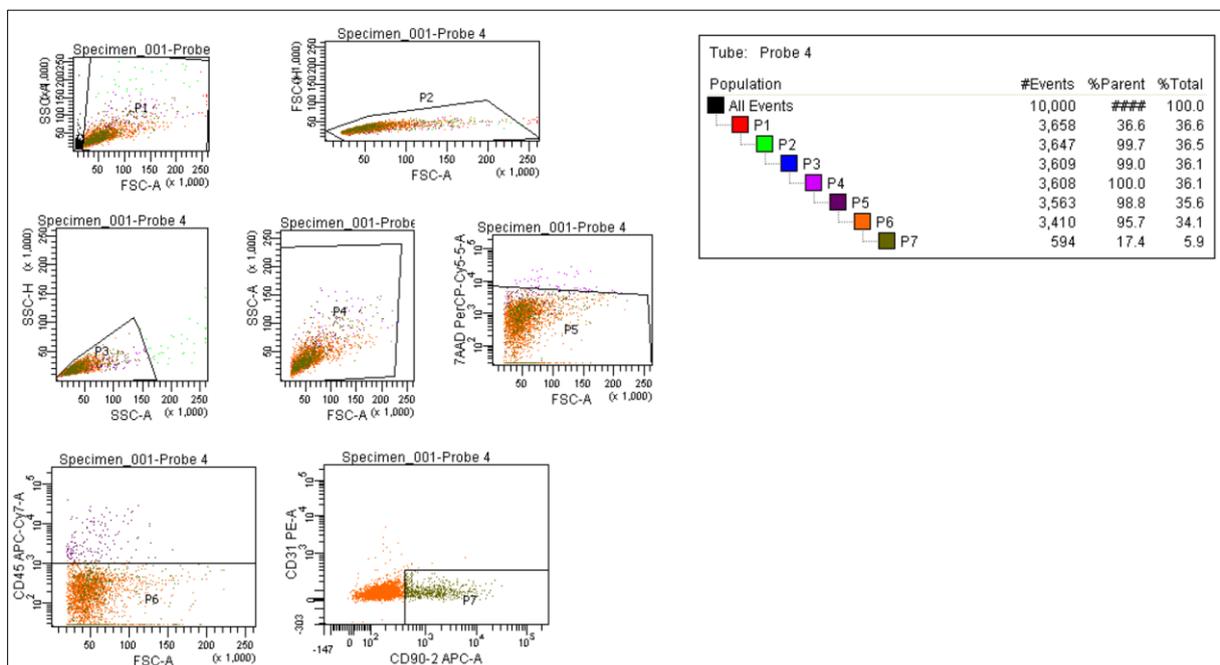


Abbildung 26: Repräsentative Cell-Sorting Analyse einer mit PEG behandelten WT-Maus: Die Fibroblastenpopulation P7 machte etwa 5,9% der gemessenen Events aus.

In Abbildung 26 ist das Ergebnis einer repräsentativen Sorting-Analyse einer mit der Trägersubstanz PEG behandelten WT-Maus nach Inkubation mit den beschriebenen Antikörpern dargestellt. Die als P7 gekennzeichnete Population war CD90-2 positiv und CD31 und CD45 negativ. Prozentual machten die Fibroblasten aus einem ganzen Mauserzen 5,2 %

aus. Davon waren 27,7 % zum Zeitpunkt des Cell Sortings noch lebendige Zellen (% parent). Die Sorting-Analyse in dieser WT-Maus diente als Etablierung des Protokolls sowie der genutzten Antikörper.

In der nächsten Kohorte der behandelten Versuchstiere erfolgte nach demselben Protokoll und den gleichen Antikörpern die Isolation von *Mip*^{-/-} Mäusen, welche mit NO₂-OA behandelt wurden. Als Kontrolle wurde erneut eine WT-Maus genutzt, diese Ergebnisse finden sich in Abbildung 27.

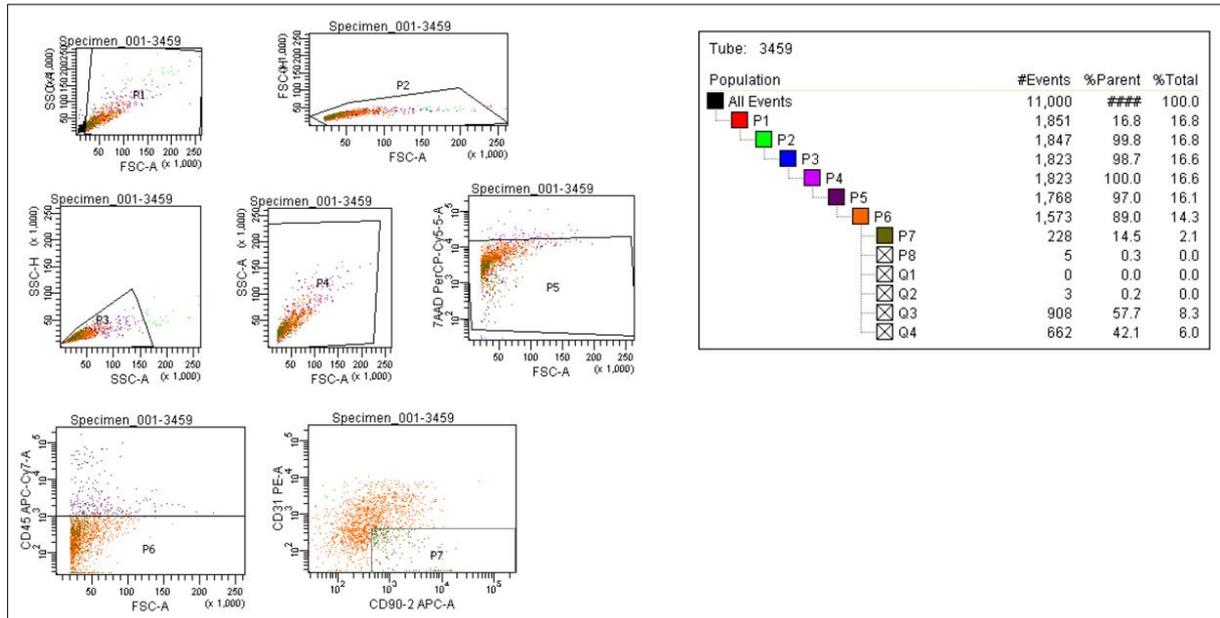


Abbildung 27: Sorting-Analyse einer mit PEG-behandelten WT-Maus. Die Cell-Sorting-Analyse zeigte ein vergleichbares Ergebnis zu Abbildung 26.

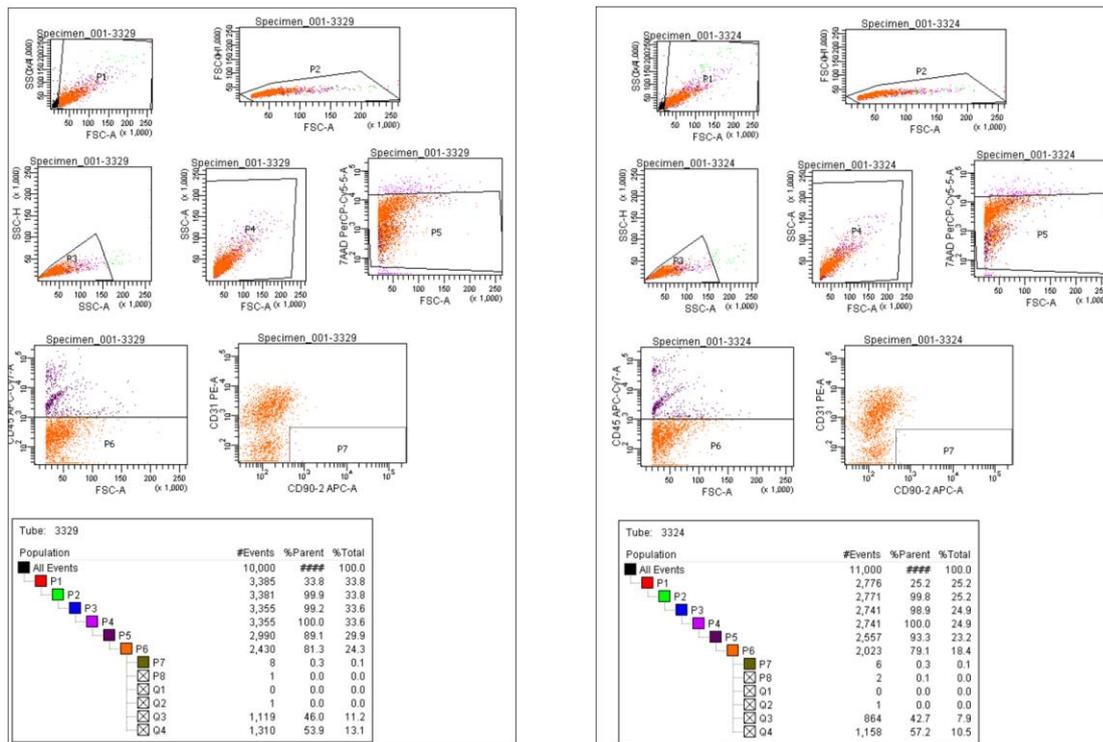


Abbildung 28: Repräsentative Cell-Sorting-Analysen einer $Mlp^{-/-}$ Maus, welche PEG erhalten hat (links). Es zeigten sich in der Zielpopulation der Fibroblasten lediglich acht detektierbare Events ohne lebende Zelle. Auf der rechten Seite ist dieselbe Analyse für eine mit NO_2 -OA-behandelte $Mlp^{-/-}$ Maus dargestellt. Auch hier konnten keine lebendigen Fibroblasten gefunden werden.

Im Anschluss wurden die Zellen eines explantierten Ventrikels einer $Mlp^{-/-}$ Maus gemessen. Sowohl bei Tieren mit dem genetischen Knockout, die PEG erhalten hatten, als auch Geschwistertiere mit NO_2 -OA-Behandlung zeigten eine fast gänzlich ausgelöschte Population in P7. Die Events in absoluten Zahlen waren kaum darstellbar und ließen keinerlei Downstream-Analysen zu. Somit konnten mit dieser Methode keine Fibroblasten aus Mäusen mit diesem genetischen Knock-Out isoliert werden.

Aufgrund der unzureichenden spezifischen Isolation mittels OctoMACS und Cell Sorting wurde eine primäre Fibroblasten-Kultur etabliert. Die Protokolle zur Isolation mittels Liberase und gentleMACS™ waren beide dazu in der Lage, eine ab P2 morphologisch eindeutige Fibroblasten-Monokultur zu erzeugen. Aufgrund einer höheren Zellviabilität und eines schonenderen Protokolls wurde die halbautomatisierte Isolation mittels gentleMACS™ bevorzugt und für die weiteren Experimente die kultivierten Fibroblasten aus dieser Isolation verwendet.

4.5.3 Isolierte Fibroblasten exprimierten kein MLP

Die primären kardialen Fibroblasten wurden mittels gentleMACS™ Isolation aus LV-Gewebe von Wildtyp- und $Mlp^{-/-}$ Mäusen kultiviert und die Proteine im Anschluss wie beschrieben isoliert. Im Immunoblot wurde als Positivkontrolle Lysat aus WT-Herzgewebe aufgetragen, in

welchem physiologisch MLP exprimiert wird. Das deutliche MLP-Signal in LV-Gewebe der Wildtypmäuse und die fehlende Proteinexpression in LV-Gewebe aus *Mlp*^{-/-} Mäusen bestätigte das genetische Modell und die korrekte Typisierung. Weder primär isolierte Fibroblasten aus *Mlp*^{-/-} Mäusen, noch aus WT-Mäusen, zeigten eine MLP-Expression. Wir gehen davon aus, dass sich auf Zellebene alle Reaktionen gleich verhielten und zwischen dem KO-Mausmodell und den WT-Geschwistertieren keine Unterschiede auf Fibroblasten-Zellebene zu finden sind. Aufgrund des autosomal-rezessiven Erbganges mit nur 25 % zur Verfügung stehenden *Mlp*^{-/-} Mäusen wurden deshalb alle *in vitro* Versuche in dieser Arbeit mit isolierten primären kardialen Fibroblasten aus Wildtyp-Mäusen durchgeführt.

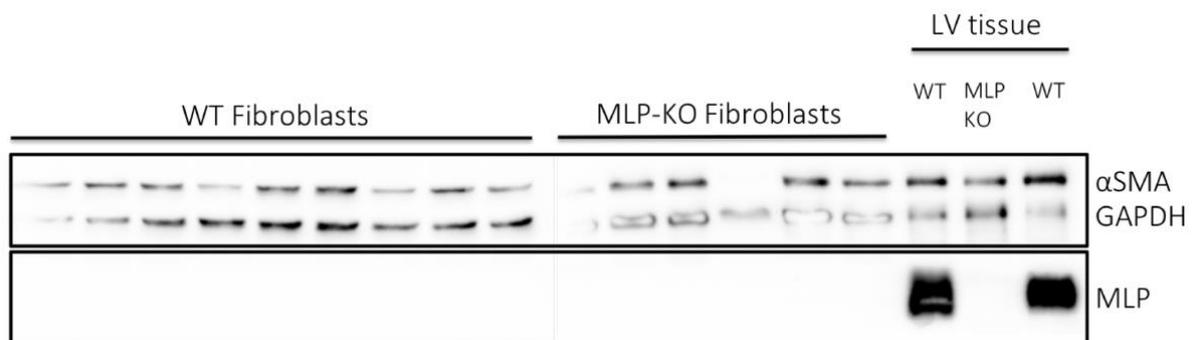


Abbildung 29: Im Immunoblot zeigten WT- und *Mlp*^{-/-} Fibroblasten keine Expression von MLP auf Proteinebene, während im LV-Homolysat von WT-Mäusen ein starkes MLP-Signal detektiert werden konnte.

4.5.4 In isolierten Fibroblasten zeigten sich nach Stimulation Unterschiede im TGFβ-Signalweg

Nach einer umfassenden Literaturrecherche zu fibroseassoziierten Pathways und Targets wurden verschiedene Gene und Proteine in den primär isolierten kardialen Fibroblasten untersucht. Die Expression auf mRNA-Ebene wurde nach 6- sowie 24-stündiger Stimulation in der RT-qPCR gemessen. Auf mRNA-Ebene wurden unbehandelte Zellen mit der durch TGFβ-stimulierten Gruppe mit Zellen, welche ausschließlich NO₂-OA erhielten sowie der behandelten Gruppe mit TGFβ + NO₂-OA, verglichen. Es ergeben sich somit vier unterschiedliche Gruppen an stimulierten Zellen. Auf Proteinebene wurden keine Immunoblots mit der Gruppe der Zellen, welche lediglich NO₂-OA erhielt, durchgeführt. Alle Ergebnisse wurden auf das nicht-regulierte Housekeeping Gen *gapdh* oder β-Actin normalisiert. Je nach Expression wurde nur ein oder zwei Zeitpunkte untersucht. Eine Übersicht der untersuchten Gene findet sich in der Tabelle 19.

Kodierendes Gen	Exprimiertes Protein
<i>Col1a1</i>	Collagen 1

<i>Col3a1</i>	Collagen 3
<i>Acta2</i>	α smooth muscle actin
<i>Ltbp2</i>	Latent TGF β -binding protein 2
<i>Pai1</i>	Plasminogen activator inhibitor-1
<i>Smad2</i>	SMAD2 protein
(p)Erk	(phosphorylated) extracellular-signal regulated kinases
(p)Stat	(phosphorylierte) Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription

Tabelle 19: Übersicht über die untersuchten fibroseassoziierten Gene und die dazugehörigen Proteine.

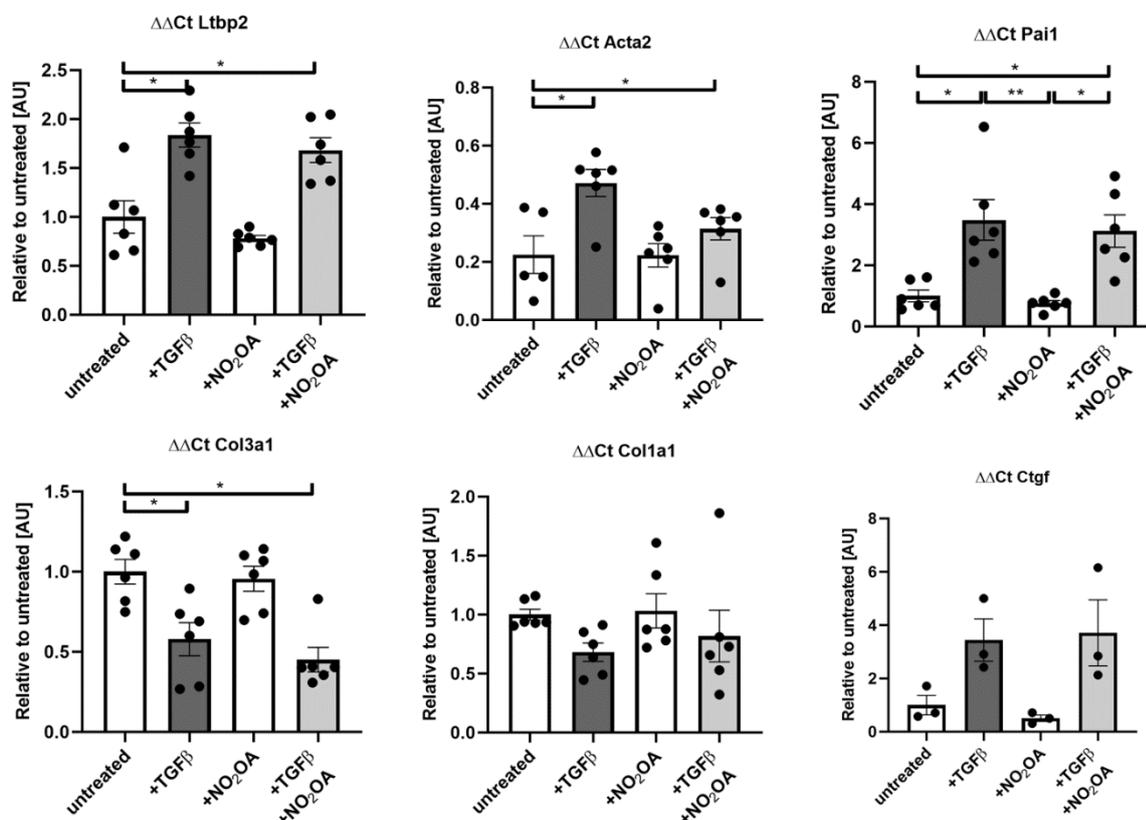


Abbildung 30: Ergebnisse der mRNA-Expression nach einer Stimulationszeit von t = 6 Stunden.

Nach sechs Stunden zeigte sich eine relative vermehrte Expression von *Latent Tgf β 1-Binding-Protein 2 (Ltbp2)* durch die Stimulation mit TGF β . Die Ko-Inkubation mit NO₂-OA bewirkte einen rückwirkenden Trend in Richtung der Wildtyp-Gruppe, dieser bleibt nicht-signifikant. Nach sechs Stunden Stimulation mit TGF β zeigte sich außerdem ein Anstieg der relativen Genexpression für *Ctgf* (nicht signifikant) und *Pai1* (signifikant). Eine simultane Inkubation mit NO₂-OA führte zu keiner Änderung zwischen den beiden Gruppen.

Die Expression der bereits auf Ventrikelebene untersuchten Kollagene wurde in der qPCR sowie im Immunoblot in den primären Fibroblasten untersucht. Nach einer Stimulationsdauer

von sechs Stunden zeigte sich sowohl für *Kollagen 1* als auch *Kollagen 3* eine verminderte relative mRNA-Expression in den durch TGF β -stimulierten Zellen.

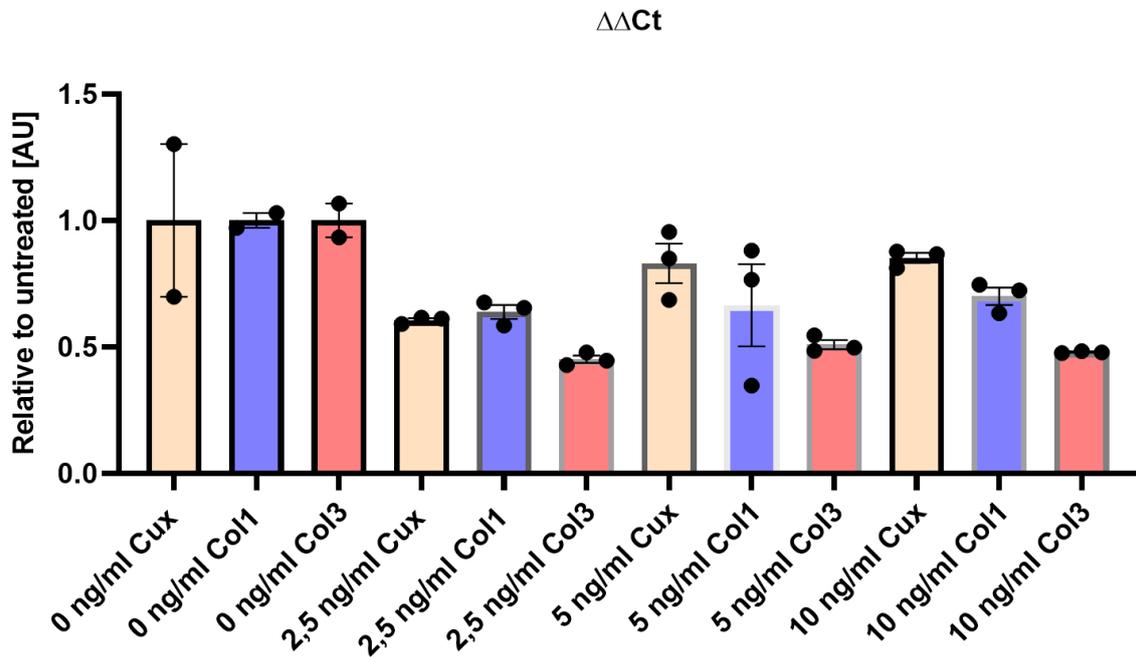


Abbildung 31: Verdünnungsreihe in primären kardialen Fibroblasten mit verschiedenen TGF β -Konzentrationen ($n = 2$ oder $n = 3$).

Um die Ergebnisse der supprimierten Expression von Kollagenen nach Stimulation mit TGF β näher zu untersuchen, wurden in einer Verdünnungsreihe die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Zytokins stimuliert. Es zeigte sich eine am ehesten umgekehrt proportionale Beziehung zwischen der Expression der Kollagene sowie der Konzentration des Zytokins. Der Trend, welcher nicht-signifikant blieb, zeigte sich sowohl für die beiden Kollagene als auch für *Cux1*. *Cux1* ist ein Transkriptionsfaktor, der als negativer Regulator von TGF β und gleichzeitig als Inhibitor der Transkription von Kollagen Typ 1 fungiert. Im Immunoblot konnten keine Unterschiede zwischen der Kollagenexpression in den unterschiedlich behandelten Fibroblasten gefunden werden.

4.5.5 NO₂-OA verhinderte die Transdifferenzierung vom ruhenden Fibroblasten zum aktivierten Myofibroblasten

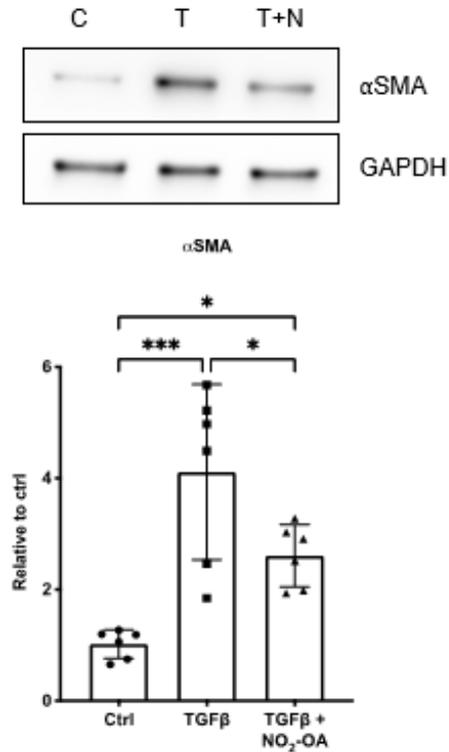


Abbildung 32: Eine Stimulation mit TGF β führte zu einer erhöhten Expression des Myofibroblastenmarkers α SMA im Immunoblot. Eine Ko-Inkubation mit NO₂-OA verringerte die Expression im Vergleich zu den Zellen, die nur mit TGF β stimuliert wurden.

Nach einer Stimulation mit TGF β zeigte sich nach sechs Stunden eine erhöhte Expression des Myofibroblastenmarkers α SMA im Immunoblot. Bei gleichzeitiger Inkubation mit NO₂-OA war die Expression signifikant geringer.

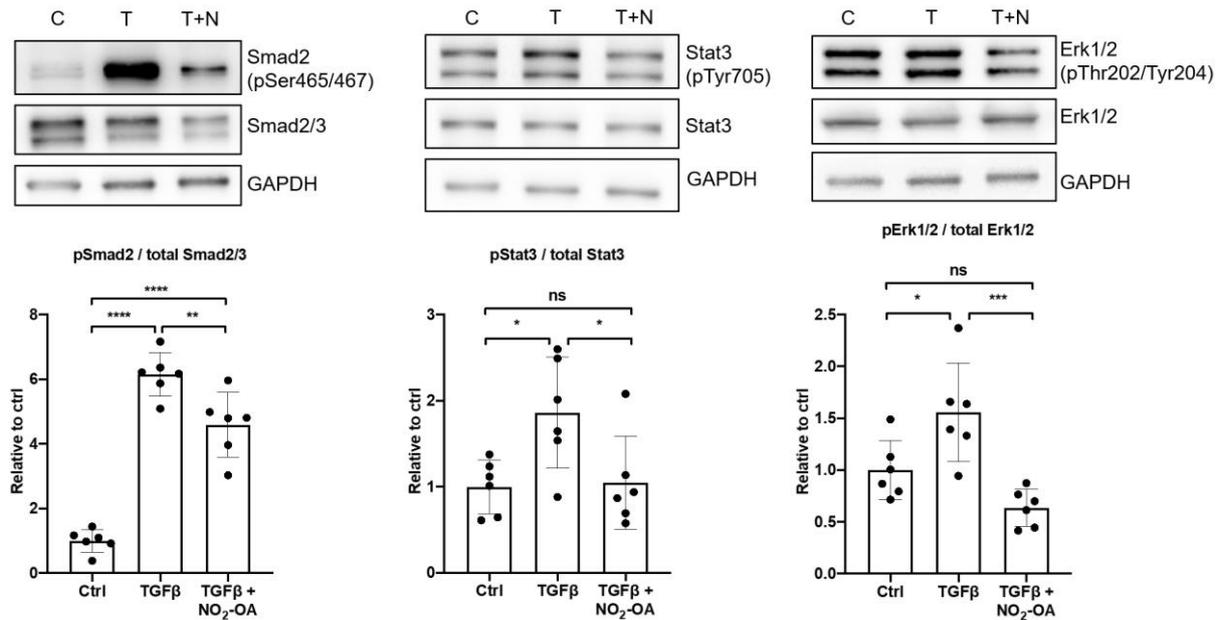


Abbildung 33: Expression im Immunoblot von (p)Smad2, (p)Stat3 und (p)Erk nach Stimulation mit TGFβ sowie Koinkubation mit NO₂-OA.

Im Immunoblot wurden verschiedene Proteine des kanonischen sowie nicht-kanonischen TGFβ-Pathways untersucht. Für die Proteinexpression von pSmad2/Smad2, pStat3/Stat3 sowie pErk1/2/Erk1/2 waren die Ergebnisse ähnlich: Nach Stimulation mit TGFβ kam es zu einer vermehrten Phosphorylierung der Proteine, die sich durch die Ko-Inkubation mit NO₂-OA rückläufig zeigte. Für pStat3/Stat3 sowie pErk1/2/Erk1/2 gab es zusätzlich keinen Unterschied in der Expression zwischen nicht-behandelten Zellen sowie den Zellen, die sowohl TGFβ als auch NO₂-OA erhalten haben. Für pSmad2/Smad2 war der Effekt schwächer, es zeigte sich auch nach Inkubation mit der nitrierten Fettsäure noch eine erhöhte Expression. Verglichen mit den durch TGFβ zu Myofibroblasten transdifferenzierten Zellen zeigte sich jedoch auch für pSmad2/Smad2 eine signifikante Reduktion der Phosphorylierung.

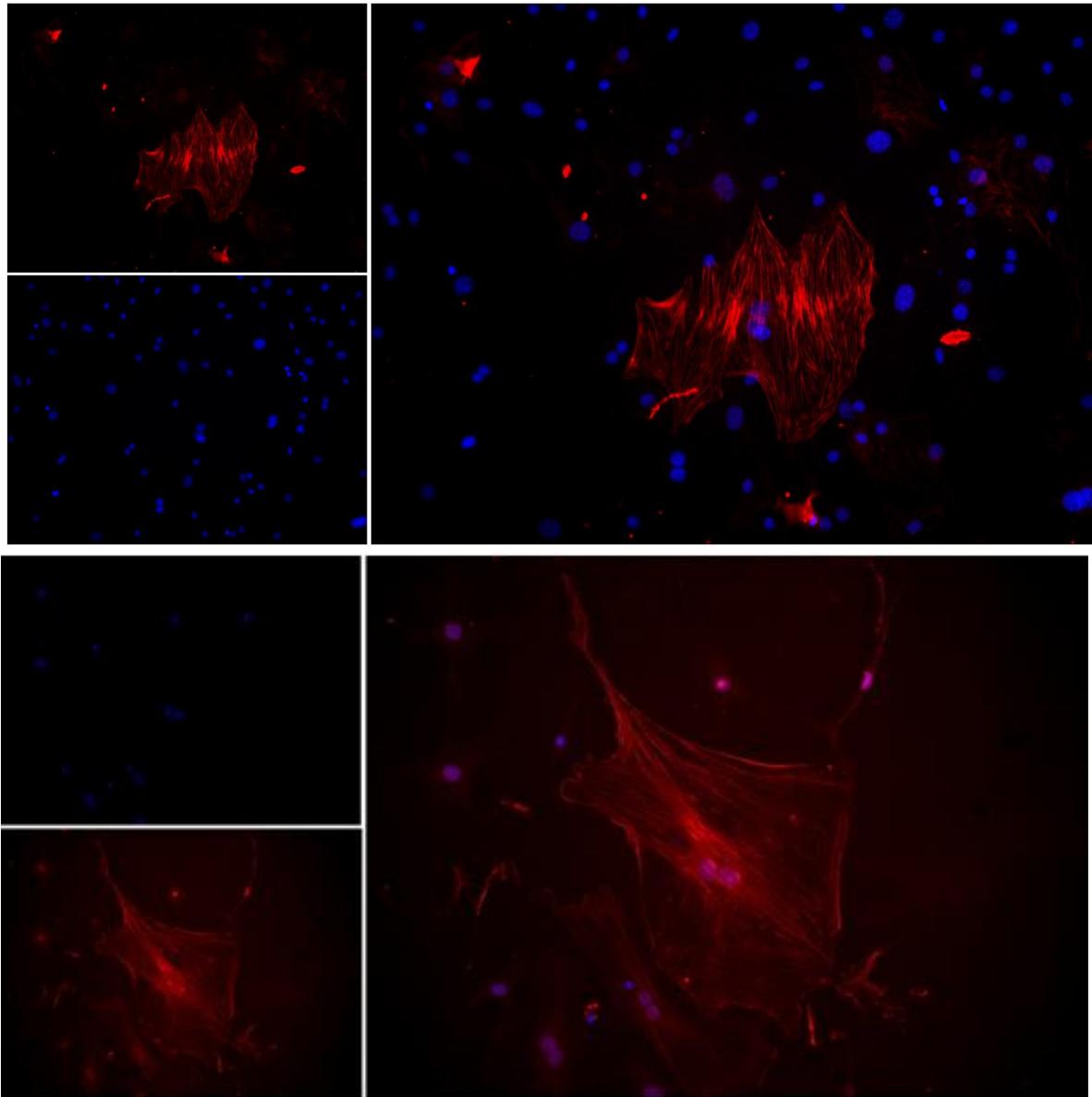
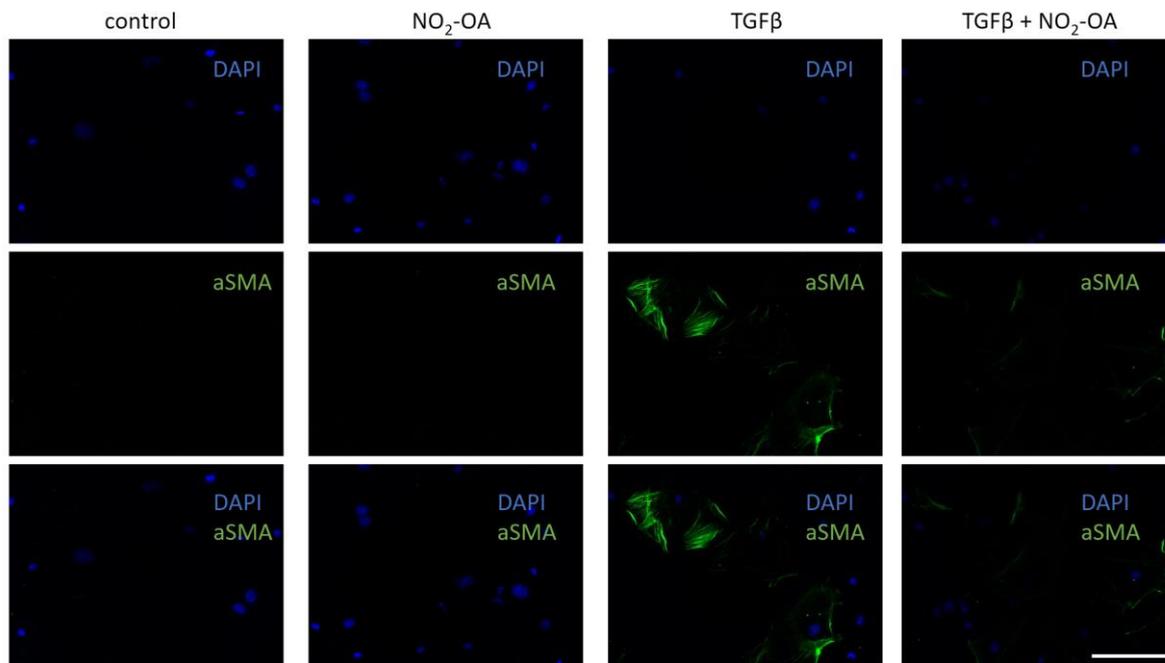


Abbildung 34: Repräsentative Immunofluoreszenz-Färbung zweier mit TGF β -stimulierten Myofibroblasten. Die Stressfasern wurden durch die Inkubation mit einem α SMA-Antikörper angefärbt.

In diesen repräsentativen Immunofluoreszenzfärbungen wurden Stressfasern (stress fibers) in den durch die Stimulation mit TGF β aktivierten Myofibroblasten mit einem Antikörper für α SMA angefärbt. Im Gegensatz zu einem ruhenden Fibroblasten mit charakteristischem ovalen Zellkörper und schmalen, langen zytoplasmatischen Fortsätzen besaß der der aktivierte Myofibroblast eine sternförmige Form mit kontraktile Elementen und zahlreichen Fortsätzen. Neben dieser Visualisierung des aktivierten Myofibroblasten zeigte diese Färbung außerdem, dass sich nur ein Teil der mit TGF β stimulierten Zellen transdifferenzierte.

Auf den repräsentativen Bildern waren multiple DAPI-Signale, also Zellkerne, zu erkennen, die aber kein rotes Signal und somit nicht das charakteristische α SMA-Signal exprimierten.



scalebar: 100µm

Abbildung 35: Weitere repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von naiven und stimulierten Myofibroblasten. Belichtung durch Simon Geißler.

In einem weiteren Versuch wurden die kultivierten Zellen gleichzeitig mit TGFβ sowie NO₂-OA inkubiert und anschließend für αSMA gefärbt. Während die Stimulation mit TGFβ allein (mittlere Bildreihe) zur Ausföhrung von Stressfasern und somit zur Transdifferenzierung des ruhenden in einen aktivierten Fibroblasten föhrt, konnten in der Ko-Inkubation mit hinzugefügtem NO₂-OA keine Myofibroblasten angefärbt werden. In der Immunfluoreszenzfärbung zeigte sich, dass die Zugabe von NO₂-OA eine Transdifferenzierung durch TGFβ verhindern konnte.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Effekte von Nitro-Ölsäure auf die dilatative Kardiomyopathie im Tiermodell der *Mip*^{-/-} Maus untersucht. Während nitrierte Fettsäuren bereits in anderen kardiovaskulären Erkrankungen antiinflammatorische sowie antifibrotische Effekte zeigten, identifizieren wir in dieser Arbeit und der dazugehörigen Publikation die Beeinflussung einer genetisch bedingten DCM.

Zusammenfassend können die folgenden Hauptergebnisse berichtet werden:

1. Im Vergleich zu ihren nicht-behandelten Geschwistertieren zeigen sich bei an DCM-erkrankten Versuchstieren nach vierwöchiger kontinuierlicher subkutaner Infusion von NO₂-OA signifikant positive Effekte auf die Fibrosierung der dilatierten Ventrikel. In der Picrosirius-Rot-Färbung nimmt der Anteil an fibrotisch umgebautem Myokard signifikant ab. Auch wurde signifikant weniger Kollagen exprimiert.
2. Sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene ist die Expression des fibroseassoziierten Zytokins TGFβ in *Mip*^{-/-} Tieren unabhängig von der Exposition mit NO₂-OA erhöht.
3. Die Inkubation von mit TGFβ-stimulierten Fibroblasten mit NO₂-OA führt zu einer Inhibition der Transdifferenzierung vom ruhenden Fibroblasten zum aktivierten Myofibroblasten. Die mit NO₂-OA behandelten Zellen exprimieren signifikant geringere Mengen an αSMA und bilden weniger Stress-Fasern aus. Der kardiale Fibroblast scheint somit eine der primären Effektorzellen für die Wirkung von nitrierten Fettsäuren darzustellen und zur in Vorarbeiten beschriebenen funktionellen Verbesserung auf Ventrikelebene beizutragen.
4. Die pleiotropen Effekte von NO₂-OA scheinen, zumindest partiell, auf Modifikationen der Effektoren der TGFβ-Signalkaskade zurückzuführen zu sein. Sowohl die Aktivierung der Signaltransduktoren pSmad2/Smad2, pStat3/Stat3 sowie pErk/Erk wurde durch den Einsatz von nitrierten Fettsäuren partiell verhindert. Damit wird ein potentieller Signalweg identifiziert, über den die pleiotropen antifibrotischen Effekte von NO₂-OA teilweise erklärt werden könnten.

Im Folgenden sollen die beschriebenen Ergebnisse anhand der aktuellen Fachliteratur kritisch betrachtet und eingeordnet werden.

5.1 NO₂-OA verbessert die myokardiale Fibrosierung des Myokards in Mäusen mit DCM

Die dilatative Kardiomyopathie ist eine Erkrankung des Myokards, bei der es insbesondere zu einer systolischen Dysfunktion mit eingeschränkter Ejektionsfraktion kommt. Echokardiographisch zeigt sich bei Patienten ein herabgesetztes kardiales Auswurfvolumen (Cardiac Output) und eine eingeschränkte LV-EF. Im Verlauf imponiert häufig ein fibrotischer Umbau sowie eine restriktive Einschränkung der Ventrikelfunktion. Diese bei Patienten beobachteten Veränderungen sind charakteristische Merkmale der *Mip*^{-/-} Maus⁴⁰. Die pathophysiologischen Veränderungen konnten auch in den in dieser Arbeit genutzten Versuchstieren in den gezeigten Vorarbeiten bestätigt werden. Zusätzlich zu den funktionellen Einschränkungen des LV zeigt sich in der Picosirius-Rot-Färbung sowie dem an LV-Gewebe durchgeführten Kollagen-Assay ein vermehrtes fibrotisches Remodelling des Myokards der *Mip*^{-/-} Maus als Teil der Pathogenese dieses Krankheitsbildes. Unsere Ergebnisse stimmen mit in anderen Studien gezeigten Ergebnissen zur Fibrosierung des Myokards der *Mip*^{-/-} Mäuse überein⁹³. Ein fibrotischer Umbau des Myokards ist ebenfalls Teil der Pathogenese vieler verschiedener kardialer Erkrankungen, beispielsweise nach einem stattgehabten Myokardinfarkt⁹⁴ oder im Rahmen der hypertensiven Herzerkrankung⁹⁵. Auch in DCM-Patienten ist eine vermehrte Fibrosierung beschrieben^{96,97}. Somit bestehen zwischen dem genutzten Tierversuchsmodell und den pathologischen Befunden im humanen Organismus starke Parallelen. Die im Verlauf diskutierten Ergebnisse und die durch NO₂-OA erreichten Verbesserungen lassen deshalb Rückschlüsse auf die Anwendbarkeit bei Patienten ziehen.

5.2 Nitrierte Fettsäuren als mögliche neue Therapeutika in Patienten mit DCM

Zum aktuellen Stand der Forschung ist keine der zur Verfügung stehenden Therapien bei Patienten mit DCM kurativ; insbesondere existiert keine zielgerichtete antifibrotische Therapie. Sowohl bei DCM-Patienten als auch bei Patienten mit anderen kardiovaskulären und heterogenen internistischen Erkrankungen, bei denen Gewebeschäden und der konsekutive fibrotische Umbau mechanistisch eine entscheidende Rolle spielen, hat die Reduktion der Bindegewebsneubildung bislang unausgeschöpftes therapeutisches Potential.

Die in den Vorarbeiten durchgeführten Echokardiographien zeigen eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Funktion nach Nitroölsäurebehandlung. Das CO erreicht nach einer vierwöchigen subkutanen Applikation Wildtyp-Werte. Eine Behandlung mit der Trägersubstanz PEG bei erkrankten Mäusen sowie die Behandlung von Wildtyp-Mäusen mit NO₂-OA hatte keine Effekte auf die echokardiografisch erhobene Herzfunktion. Es lässt sich deshalb darauf schließen, dass NO₂-OA lediglich unter pathophysiologischen Bedingungen einen biologisch relevanten Einfluss auf das Myokard hat, in einem gesunden Organismus

jedoch nicht entscheidend in die Homöostase des Herzgewebes eingreift. Weiter zeigt sich in der Picosirius-Rot-Färbung in den nicht behandelten *Mip^{-/-}* Tieren ein gegenüber Wildtyp-Mäusen erhöhtes Maß an intraventrikulärer Fibrosierung. Nach der abgeschlossenen Behandlung ist in den Ventrikeln der vorher erkrankten Mäuse signifikant weniger Fibrose nachzuweisen als bei Geschwistertieren, welche lediglich die Trägersubstanz erhielten. Somit hat NO₂-OA entweder die weitere Progression der Fibrosierung im erkrankten Myokard verhindert oder zu einer Rückbildung der bestehenden Fibrose geführt. Auch eine Kombination aus Fibroseprävention und -reversion scheint denkbar. Zusätzlich zeigt sich im Total Collagen Assay eine zwei- bis dreifach so hohe Kollagenexpression in Ventrikelgewebe der erkrankten Tiere verglichen mit ihren Wildtyp-Geschwistertieren. Durch die subkutane Gabe von NO₂-OA ist die Kollagenabundanz in den behandelnden Mäusen signifikant rückläufig. NO₂-OA bestätigt sich hiermit auch in unserem Tiermodell für DCM als antifibrotisch wirksame Substanz. Damit decken sich die Ergebnisse dieser Arbeit mit in anderen Pathologien gefundenen Effekten von NO₂-OA. Liu et al. zeigten in einer Studie, dass nitrierte Fettsäuren als Kombinationstherapie mit Losartan über eine Reduktion der Fibrosierung eine signifikante Verbesserung bei diabetischer Nephropathie, insbesondere der Albuminurie, der glomerulären Filtration sowie der glomerulären Sklerose, im Mausmodell induzieren⁹⁸. Rudolph et al. demonstrierten, dass die Behandlung mit NO₂-OA die Fibrosierung auf Vorhofebene in einem Hypertoniemodell⁶⁷ verbesserte. In dieser Arbeit wurden gesunde Versuchstiere zwei Wochen lang mit Angiotensin II und gleichzeitig mit NO₂-OA behandelt. Während eine alleinige Gabe von Angiotensin II zu einer atrialen Fibrosierung führte, konnten die nitrierten Fettsäuren die Fibrosierung teilweise verhindern. Auch die Inzidenz von Vorhofflimmern war in diesen Tieren geringer ausgeprägt. Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte außerdem, dass in murinen Herzen nitrierte Fettsäuren nach einer stattgehabten Ischämiephase mit anschließender Reperfusion endogen synthetisiert werden. Folgte auf die schädigende Minderdurchblutung keine Reperfusion, dann konnten keine erhöhten endogenen Spiegel gemessen werden. In einem weiteren Experiment erhielten die Mäuse zusätzlich zur Ischämie/Reperfusion eine subkutane Infusion von NO₂-OA über eine osmotische Minipumpe. Die exogene Zufuhr der nitrierten Fettsäuren führte zu einer Verringerung der Infarktgröße und der Leukozyteninfiltration als Zeichen einer Entzündungsreaktion. Auch die Expression pro-inflammatorischer Zytokine war deutlich geringer. Rom et. al.⁹⁹ untersuchten den Effekt von NO₂-OA auf die nicht alkoholische Steatohepatitis (NASH). Auch hier führte die Gabe von NO₂-OA zu einer Reduktion der durch TGFβ-induzierten intrahepatischen Fibrosierung. In der Studie konnte eine signifikante Reduktion der Expression von Collagen Typ 1A1, ACTA2 sowie weiteren mit fibroseassoziierten Genen gefunden werden. Auch in kardiovaskulären Erkrankungen wird NO₂-OA bereits in klinischen Studien getestet. In einer klinischen Phase I-Studie waren niedrige Dosierungen gut verträglich, erst bei der Einnahme von über 450 mg pro Tag traten

vermehrte unerwünschten Arzneimittelwirkungen, insbesondere abdominellen Beschwerden mit Übelkeit und Diarrhoen auf⁶⁰. Somit stellen nitrierte Fettsäuren eine interessante neue Medikamentenklasse dar.

Als Beispiel für eine bereits etablierte antifibrotische Therapie sei beispielsweise Pirfenidon (Esbriet®) genannt, ein Antifibrotikum, welches seit 2011 für Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose zugelassen ist¹⁰⁰. Der genaue Wirkmechanismus von Pirfenidon ist noch nicht abschließend geklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die zu den niedermolekularen Molekülen („small molecules“) gehörende Substanz die fortschreitende Fibrosierung des Lungengewebes in Patienten mit IPH verlangsamt. Insbesondere konnte ein Effekt von Pirfenidon auf Zielstrukturen des TGF β -Signalwegs, beispielsweise Smad3, p38 und Akt, gezeigt werden. Damit verhindert Pirfenidon die Differenzierung von Lungenfibroblasten zu von TGF β aktivierten Myofibroblasten¹⁰¹. Ebenfalls antifibrotisch und zur Behandlung bei Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose zugelassen ist der Antikörper Nintedanib, ein Tyrosinkinase-Inhibitor, der VEGF-, FGF- und den Platelet-derived growth factor (PDGF)-Rezeptor hemmt¹⁰². Dadurch wird die Proliferation von primären humanen Lungenfibroblasten aufgehalten und in der Zellkultur die durch TGF β stimulierte Transformation zu Myofibroblasten sowie die Kollagensekretion inhibiert^{103,104}. Pirfenidon ist, wie auch die nitrierten Fettsäuren, eine niedermolekulare Verbindung und kann durch die geringe molare Masse vom Körper resorbiert werden, leicht in die Zelle gelangen und dort durch Modifikationen Zellsignalwege modifizieren¹⁰⁵.

Die in dieser Arbeit gezeigten sowie in den Vorarbeiten zu dieser Arbeit generierten *in vivo* Ergebnisse zeigen, dass nitrierte Fettsäuren eine positive Auswirkung auf die linksventrikuläre Funktion bei an DCM-erkrankten Versuchstieren hat und diese Substanzklasse als potenzielle Therapieoption vielversprechend ist. Der fibrotische Umbau des Myokards kann durch verschiedenste Stimuli ausgelöst werden. Das profibrotische Zytokin TGF β ist ein zentraler Mediator für Fibrosierung¹⁰⁶. TGF β ist an unterschiedlichsten metabolischen Prozessen beteiligt, beispielsweise an Proliferation, Differenzierung und Apoptosevorgängen. In mit Fibrose assoziierten Erkrankungen, auch in Patienten mit DCM, kommt es häufig zur Hochregulation von TGF β . Sanderson et al. fanden in einer Studie erhöhte Spiegel an TGF β in Plasma von erkrankten DCM-Patienten¹⁰⁷. Holweg et al. untersuchten Genpolymorphismen im TGF-beta1 Gen, welche mit einem erhöhten Plasmaspiegel von TGF β 1 einhergeht und mit der Entwicklung einer DCM assoziiert ist¹⁰⁸.

Nitrierte Fettsäuren beeinflussen den TGFβ-Signalweg

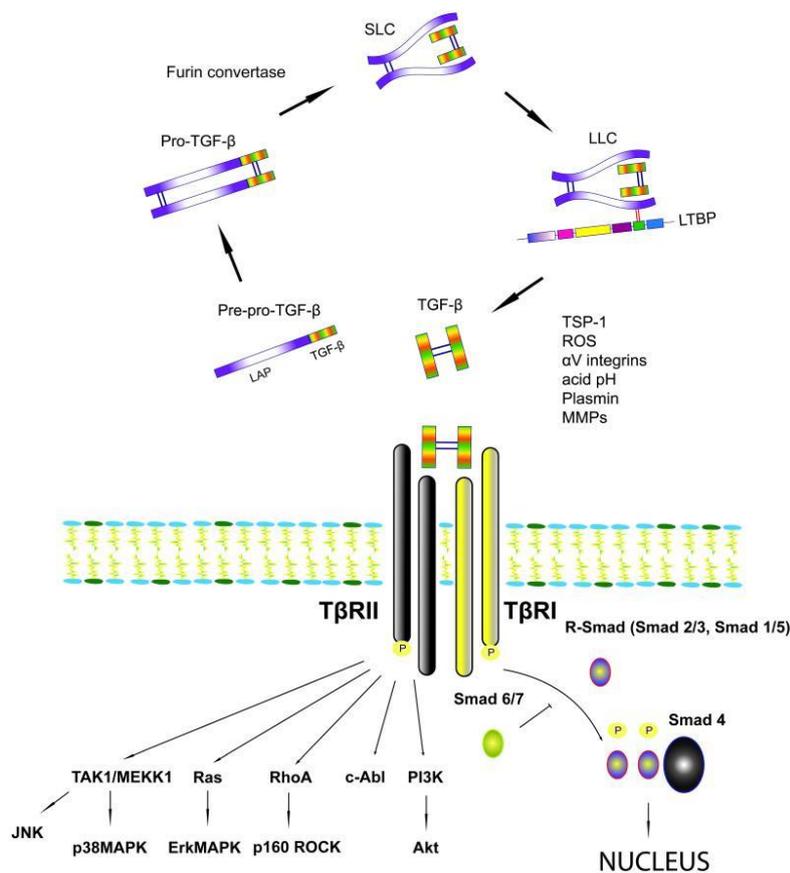


Abbildung 36: Aktivierungsprozess von TGFβ nach Biernacka et al.¹⁰⁹: In seiner inaktiven Form ist TGFβ als Dimer an LAP gebunden. An das Dimer bindet LTBP, welches die Freisetzung von aktivem TGFβ katalysiert. TGFβ bindet an den membrangebundenen Rezeptor TGFβR1 und TGFβR2 und aktiviert den kanonischen sowie nicht-kanonischen Pathway.

Nachdem wir zeigen konnten, dass in den *Mlp*^{-/-} Mäusen eine vermehrte Fibrosierung als Teil der Pathogenese eine große Rolle spielt und nitrierte Fettsäuren diese Fibrosierung aufhalten oder umkehren können, wurde deshalb im Anschluss der TGFβ-Signalweg untersucht. Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zeigt sich eine erhöhte Expression von TGFβ in den Ventrikeln der erkrankten Mäuse. Auch in endomyokardialen Biopsien humaner DCM-Patienten wurde eine erhöhte Expression von TGFβ gefunden. Pauschinger et al. untersuchten mittels qPCR die Genexpression von TGFβ sowie Kollagen Typ 1 und Typ 2 als Teil der bei der Fibrosierung ausgeschütteten extrazellulären Matrixproteine in 30 Patienten⁹⁶. Bei den untersuchten Patienten mit einer EF < 50 % zeigte sich eine hochregulierte Expression von Kollagen Typ I sowie TGFβ. Damit besteht eine gute Übereinstimmung zwischen erhobenen Daten bei humanen Patienten und dem hier genutzten Mausmodell der DCM. Auch in der Behandlungsgruppe ist die Expression von TGFβ in unseren Tierversuchen weiterhin erhöht – ein Effekt durch die Behandlung mit NO₂-OA konnte nicht beobachtet werden. Für das TGFβ Latency Associated Peptide (LAP) konnten wir ebenfalls beobachten, dass in den *Mlp*^{-/-} Mäusen das Signaling hochreguliert ist. Die Behandlung mit NO₂-OA führte auch hier zu keinem signifikanten Unterschied. Um auszuschließen, dass die berichteten Effekte durch eine

Veränderung der TGFβR1-Expression hervorgerufen werden, wurde auch die Abundanz dieses Proteins quantifiziert. Zwischen den Wildtyp-Geschwistertieren und den behandelten sowie unbehandelten Mäusen bestand auf Proteinebene kein Unterschied, sodass auf Rezeptorebene kein Effekt durch den DCM-Phänotyp anzunehmen ist. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass TGFβ signifikant an der Fibrosierung der an DCM erkrankten Tieren beteiligt ist, die in der Echokardiographie beobachteten Verbesserungen der EF und des CO durch den Einsatz von NO₂-OA jedoch nicht durch einen Einfluss auf die TGFβ-Bioverfügbarkeit oder Sensing erklärt werden. Bei Annahme einer Einflussnahme auf den TGFβ-Signalweg liegt somit ein Effekt downstream des TGFβR1 nahe. Da der kardiale Fibroblast den wesentlichen Teil an Kollagen und damit Fibrose produziert, ist unsere Hypothese, dass NO₂-OA seine Wirkung durch Modifikationen dieser Zellpopulation und insbesondere durch pleiotrope Modifikationen im TGFβ-Signalweg erreicht.

Kardiale Fibroblasten sind eine Gruppe von Zellen mesenchymalen Ursprungs, die Bindegewebe produzieren und für den Großteil der ausgeschütteten extrazellulären Matrixproteine, beispielsweise Kollagene, Proteoglykane und Glykoproteine, verantwortlich sind¹¹⁰. Der Anteil der Fibroblasten an der Gesamt-Zellmenge eines Herzens variiert stark und wird in der Literatur mit 30–70 % angegeben¹¹¹. Die restlichen 70 % bestehen aus heterogenen Zellpopulationen, wie Kardiomyozyten, Endothelzellen, Perizyten, Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen (smooth muscle cells/SMCs)¹¹². Fibroblasten finden sich als Teil des Bindegewebes in den meisten Organen wieder, insbesondere der Haut, Muskelgewebe und dem Herzen. Je nach Ursprungsorgan und physiologischem Zustand des Gewebes variiert ihre Funktion und die Synthese der exprimierten Proteine. Studien machen deutlich, dass die Interaktion zwischen den Fibroblasten als Teil des Stützgewebes und anderen Zellen entscheidend für eine physiologische Herzaktion ist¹¹³. Chang et al.¹¹⁴ konnten an Fibroblastenkulturen aus 50 verschiedenen Gewebeproben zeigen, dass die Genexpression der Zellen sich je nach Ursprungsgewebe unterschieden und die Zellen keine homogene Population darstellen. Auch aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit auf kommerziell erwerbliche Zellen verzichtet und auf eine primäre Isolation aus Ventrikelgewebe der genutzten Versuchstiere zurückgegriffen.

Sowohl die erhöhte TGFβ-Bioverfügbarkeit als auch funktionelle kardiale Belastungen können dazu führen, dass sich ruhende Fibroblasten in aktivierte Myofibroblasten transformieren. Diese Zellen sind in einem gesunden Herzen nicht vorhanden¹¹⁵ und sind in der Lage, exzessiv Matrixproteine, insbesondere Kollagene, auszuschütten. Bei Patienten mit HFrEF zeigt sich ebenfalls eine vermehrte Transdifferenzierung des Fibroblasten zum Myofibroblasten. Nagaraju et al. isolierten primäre Fibroblasten aus explantierten Herzen von

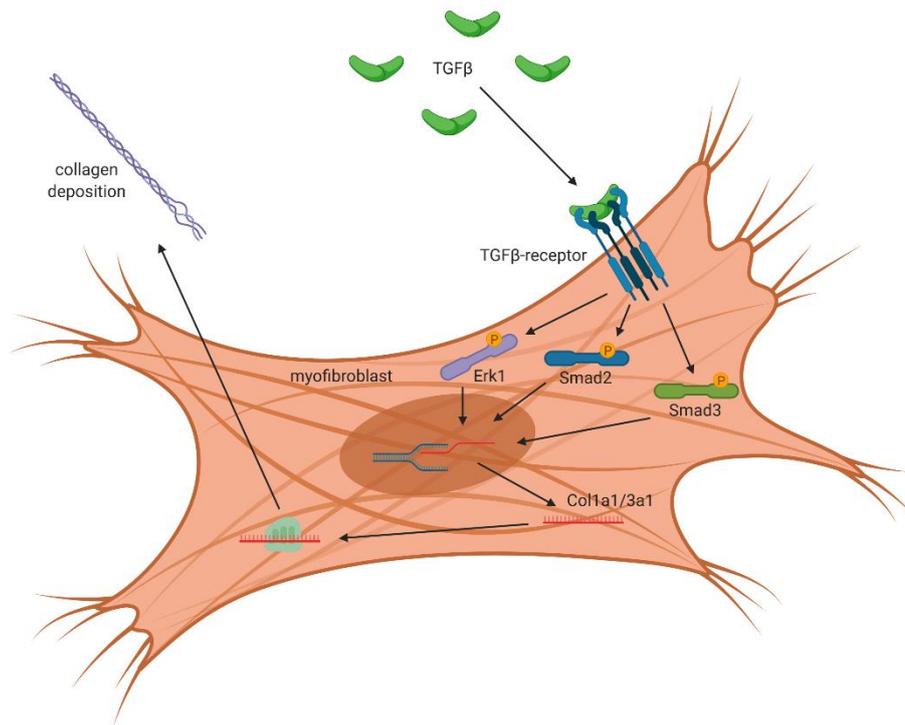


Abbildung 37: Schematische Darstellung der postulierten Veränderungen von TGFβ auf den aktivierten Myofibroblasten. Grafik von Simon Braumann und Simon Geißen, die Grafik wurde mit Hilfe von BioRender erstellt.

Patienten bei Herztransplantation¹¹⁶. Hier konnten erhöhte Gewebespiegel von TGFβ, Periostin und Osteopontin nachgewiesen werden. Die isolierten Fibroblasten waren insbesondere aktivierte Myofibroblasten mit darstellbaren Stressfasern. Durch eine Hemmung der TGFβ-Rezeptor Kinase konnte interessanterweise eine partielle Umgekehrung der Transdifferenzierung, also von einem aktivierten Myofibroblasten zu einem ruhenden Fibroblasten, bewirkt werden. Die Entwicklung antifibrotischer Therapien für Patienten mit HFrEF scheint somit durchaus vielversprechend.

Die Heterogenität der Fibroblasten macht ihre Klassifikation und spezifische Isolation schwierig. Ein spezifischer Zellmarker, mit dem Fibroblasten zuverlässig gefärbt oder in FACS-Analysen identifiziert werden könnten, fehlt bislang. Es gibt eine Reihe von Antikörpern, die für die Identifizierung genutzt werden können, beispielsweise Anti-Vimentin-Antikörper¹¹⁷. In der in dieser Arbeit primär angestrebten Fibroblastenisolation sollten kardiale Fibroblasten in einem fibroseassoziierten Krankheitsmodell, der DCM, näher charakterisiert und mit Fibroblasten aus WT-Geschwistertieren verglichen werden. Zunächst sollte untersucht werden, ob sich primär isolierte Fibroblasten aus *Mlp*^{-/-} Tieren von Zellen aus ihren WT-Geschwistertieren in der Gen- und Proteinexpression unterscheiden.

Die Isolierung mittels magnetisch-markierter Antikörper zeigte in der Cell-Sorting-Analyse zunächst in WT-Tieren eine gute Ausbeute an Fibroblasten. Somit ist das verwendete Protokoll mit dem Isolationskit von Miltenyi grundsätzlich dazu in der Lage, Fibroblasten zu erkennen und mit den entsprechenden Gating eine Population zu identifizieren. Im nächsten Schritt durchliefen behandelte Tiere das Cell-Sorting. Hier konnten auch in Wiederholungsversuchen

in behandelten und unbehandelten *Mlp*^{-/-} Tieren keine lebenden Fibroblasten isoliert werden. Durch das genetische Modell scheinen Oberflächenmarker so verändert worden zu sein, dass die Antikörperbindung blockiert wird. Für eine geplante Genomics- sowie Proteomics-Analyse hat sich diese Methode nicht bewährt. Um die Einflüsse von nitrierten Fettsäuren auf die Effektorzelle der Fibroblasten dennoch untersuchen zu können und eine ausreichende Zellausbeute für die *in vitro* Versuche zu generieren, wurde deshalb für die Analysen und Versuche eine halb-automatische Isolierung mittels enzymatischer Verdauung der entnommenen Ventrikel genutzt. Die Einzelzellsuspension in Kultur wurde zwei- bis dreimal passagiert. In dieser Passage zeigen sich die Zellen mit spindelförmigem ovalen Zellkörper und meist zwei auslaufenden Zellfortsätzen. Die entstandene Kultur wurde anhand ihrer Morphologie als reine Fibroblastenkultur gewertet. Es wurde keine antikörpergekoppelte Selektion der Zellen vorgenommen. Somit ist eine Verunreinigung und ein dadurch entstandener Bias nicht gänzlich auszuschließen. Der enzymatische Verdau ist in der Literatur jedoch gut untersucht und etabliert^{118,119}. Auf Proteinebene konnten wir zeigen, dass auf diese Weise isolierte Fibroblasten sowohl aus WT und *Mlp*^{-/-} Geschwistertieren kein MLP exprimieren. Somit schlussfolgern wir, dass die Zellen sich identisch auf eine Stimulation und Behandlung verhalten. Die Ergebnisse sind deshalb nur an Fibroblasten aus Wildtyp-Tieren durchgeführt worden. Durch die Stimulation wird die Fibrosierung, welche *in vivo* durch den genetischen *Mlp*-Knockout erreicht wird, *in vitro* simuliert.

In dieser Arbeit wurde die Transdifferenzierung der ruhenden Fibroblasten zu aktivierten Myofibroblasten *in vitro* mit der Stimulation durch TGFβ simuliert. In verschiedenen Studien wird TGFβ als primärer Stimulus für die Transdifferenzierung zu Myofibroblasten beschrieben^{120,121}. Auch *in vivo* konnten wir erhöhte TGFβ-Spiegel in den behandelten sowie nicht behandelten erkrankten Tieren zeigen. Während NO₂-OA keinen direkten Effekt auf die TGFβ-Expression *in vivo* erzielen konnte, gehen wir von Wirkungen in weiteren Targets im TGFβ-Signalweg aus. Es wurden unterschiedliche Zielstrukturen untersucht. Nach ersten Analysen konnten interessante, mit Fibrose assoziierte Gene identifiziert werden, welche weiter verfolgt wurden. Andere, beispielsweise *Ctgf* sowie *Pai1*, zeigten unspezifische Effekte und wurden nicht weiter untersucht. Auf mRNA-Ebene zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von *Ltbp2*. Dieses Gen ist Teil der LTBP-Familie, einer Gruppe an Matrix-Proteinen, die an verschiedenen Angriffsstellen Teil des TGFβ-Pathways sind. Sie helfen beispielsweise bei der korrekten Faltung von TGFβ bevor das Zytokin sekretiert wird und an seinen Rezeptor auf der Effektorzelle bindet^{122,123}. Pang et al. demonstrierten, dass ein *Ltbp2*-Knockdown sich positiv auf den oxidativen Stress und auf den fibrotischen Umbau in einem Tiermodell in DCM auswirkte¹²⁴. In weiteren Untersuchungen wird LTBP2 als möglicher Herzinsuffizienz-Marker genannt¹²⁵. Bredhardt et al. konnten in einer prospektiven Kohortenstudie außerdem feststellen, dass LTBP2 sich als zuverlässiger prädiktiver Marker

für die Mortalität von Patienten mit akut aufgetretener Dyspnoe bewies¹²⁶. Während LTBP1, LTBP3 und LTBP4 gut charakterisiert sind, ist die genaue Funktion von LTBP2 jedoch noch nicht abschließend geklärt¹²⁷. Das Gen *Acta2*, welches für das Protein α SMA kodiert, ist das charakteristische Expressionsgen eines aktivierten Myofibroblasten¹²⁸. Jin et al. konnten zeigen, dass in ihrem Mausmodell für DCM in der primären kardialen Fibroblastenkultur die Zellen vermehrt α SMA sowie Kollagene exprimierten¹²⁹. In den in dieser Arbeit mit TGF β -stimulierten primären Fibroblasten zeigt sich sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene eine signifikant erhöhte Expression von *Acta2* beziehungsweise α SMA, sodass eine erfolgreiche abgeschlossene Transdifferenzierung anzunehmen und eine Simulation des *in vivo* beobachteten Zustandes in der Zellkultur erreicht worden ist. Die Zugabe von NO₂-OA konnte die Transdifferenzierung vom ruhenden Fibroblasten zum Myofibroblasten teilweise hemmen. Es ist deshalb davon auszugehen, dass nitrierte Fettsäuren aktiv mit dem Prozess der Transdifferenzierung interagieren und diese verhindern. Ähnliches war auch in der Immunfluoreszenzfärbung zu sehen, in der nach der Ko-Inkubation weniger Stressfasern und somit weniger Myofibroblasten angefärbt werden konnten. Unsere Hypothese, dass die Effekte der nitrierten Fettsäure auf Effektoren innerhalb der TGF β -Signalkaskade zu finden sind, wurde in den transdifferenzierten Myofibroblasten *in vitro* weiter untersucht.

Die geringere Kollagenexpression in isolierten Fibroblasten nach Stimulation mit TGF β ist unerwartet und gegenteilig zu den Ergebnissen im Ventrikel sowie den zu erwartenden Effekten des als fibrinogen und damit kollagenassoziiert beschriebenen Stimulanz TGF β . In der Literatur ist mehrfach beschrieben, dass Myofibroblasten Kollagen exprimieren^{130,131}. Eine erhöhte Dosierung von TGF β als Stimulanz kann jedoch die Kollagenproduktion *in vivo* als auch *in vitro* inhibieren¹³². In der Studie von Fragiadaki et al. wird eine Interaktion über das Gen CUX1, ein CCAAT displacement protein, beschrieben, welches die Transkription der Kollagene stören kann. In einem Transfektions-Modell konnte durch die Ausschaltung von CUX1 in Fibroblasten der Niere eine erhöhte Kollagenproduktion getriggert werden. Auch in unserer Verdünnungsreihe zeigt sich für die relative Expression von *Col1* und *Col3* ein Trend zu weniger Kollagenexpression nach Stimulation mit zunehmender Konzentration von TGF β . Dieser ist jedoch statistisch nicht signifikant, sodass sich über die Kollagene auf Zellebene in dieser Arbeit keine klare Aussage treffen lässt.

In den Immunoblotanalysen zeigte sich in den aktivierten Myofibroblasten eine verstärkte Expression der phosphorylierten Effektoren Smad2/3 sowie Erk1/2. Die vermehrte Phosphorylierung, also die Aktivierung, konnte durch die Ko-Inkubation mit nitrierten Fettsäuren signifikant verringert werden.

Smads sind wichtige Moleküle der TGF β -Signalkaskade. Bindet das aktive TGF β -Dimer mit seinem Rezeptorkomplex in der Zellmembran, dann aktiviert es Smad-Moleküle, die dann die

Transkription von Proteinen im Zellkern stimulieren. Smad2/3 gehören zum sogenannten kanonischen TGF β -Signalweg. Sie werden direkt durch den aktivierten Rezeptorkomplex phosphoryliert¹³³. Während Smad3 sowie Smad2 insbesondere über die TGF β -Signalkaskade aktiviert werden, unterscheiden sich die Proteine beispielsweise leicht in ihrer Affinität zu DNA-Sequenzen¹³⁴ und ihren Ko-Faktoren, insbesondere Smad3 wird eine ausgeprägte profibrotische Rolle zugesprochen, während Smad2 insbesondere bei der embryonalen Entwicklung wichtig ist¹³⁵.

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von Smad2/3 die Translation und Transkription von extrazellulären Matrixproteinen, beispielsweise Kollagenen, aktiviert¹³⁵. Zhao et al. konnten im Tierversuch zeigen, dass Tiere mit Smad3-KO vor der Fibrosierung bei pulmonaler Fibrose geschützt waren und weniger ECM-Proteine produzierten¹³⁶. Die Mäuse zeigten sich resistent gegen unterschiedliche profibrotische Stimuli, sodass die Phosphorylierung von insbesondere Smad3 eine enorme Rolle bei der TGF β -induzierten Fibrosierung zu haben scheint.

Ähnliche Ergebnisse konnten Rudolph et al. an 3T3-Zellen generieren. Auch in diesen Zellen verringerte die zeitgleiche Inkubation der 3T3-Zellen mit TGF β und NO₂-OA die vermehrte Phosphorylierung von Smad2⁶⁷. In ihrer Arbeit beschreiben sie die Smad2-verbundene Unterdrückung der Myofibroblast-Transdifferenzierung in einem murinen Modell für Vorhofflimmern. Somit zeigen sowohl die Arbeiten von Rudolph et al. als auch diese Arbeit einen positiven Einfluss von nitrierten Fettsäuren auf die Fibrosierung *in vivo* und zeigen, dass die kardialen Fibroblasten einen primären Angriffspunkt der Wirkung darstellen.

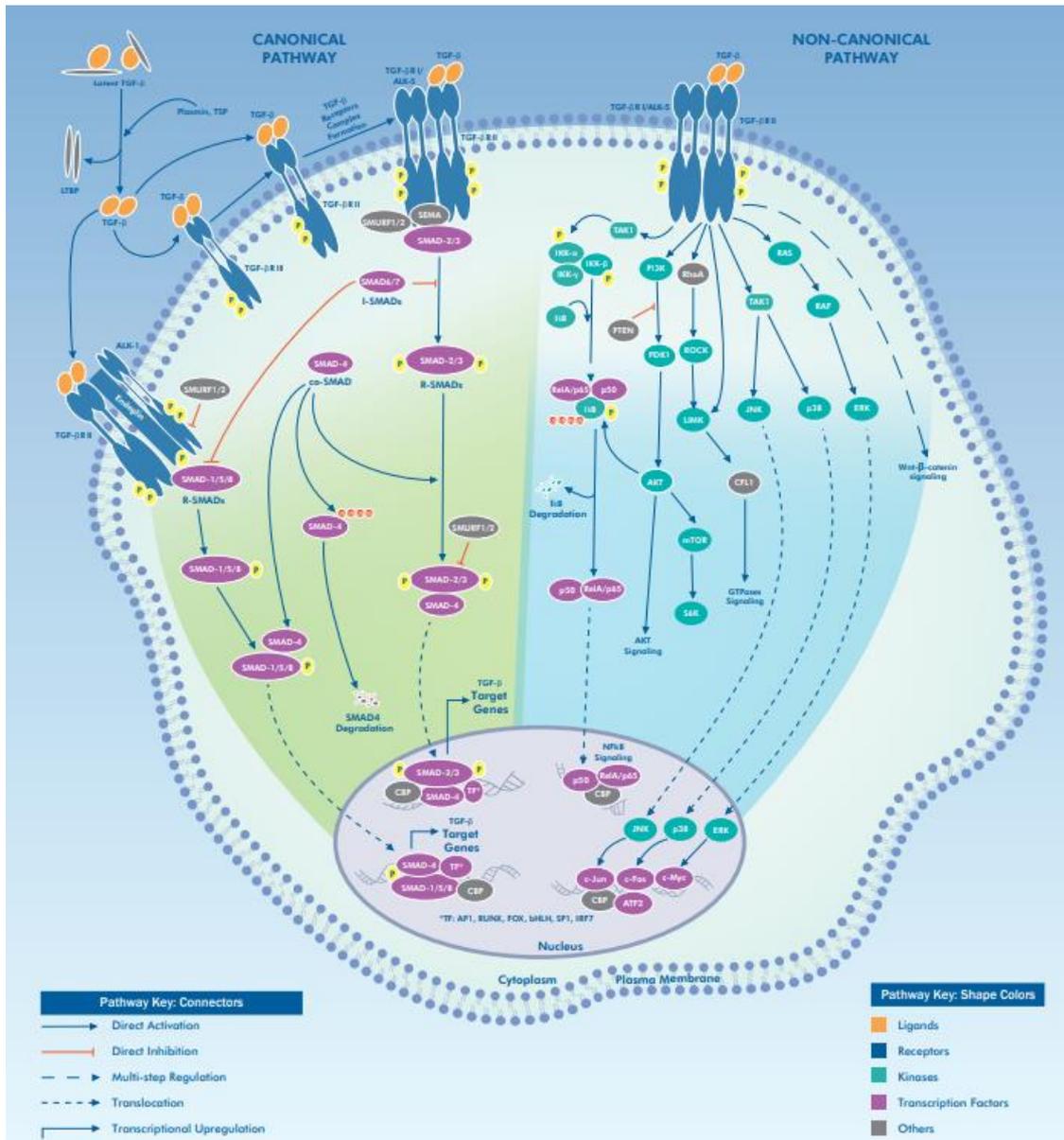


Abbildung 38: Schematische Übersicht der nicht-kanonischen und kanonischen TGFβ-Signalkaskade¹³⁷.

Demgegenüber gehört Erk1/2 als Mitogen-aktivierte Kinase (MAPK) zum nicht-kanonischen, Smad-unabhängigen Teil des TGFβ-Signalwegs¹³⁸. Eine gesteigerte Aktivierung von Erk1 und Erk2 führt beispielsweise zu einer vermehrten Proliferation von glatten Muskelzellen in der Lunge¹³⁹. Eine supprimierte Phosphorylierung von Erk1/2 durch NO₂-OA wurde bereits für verschiedene Zelltypen beschrieben. Beispielsweise zeigten Klinke et al.⁶⁸, dass NO₂-OA die Muskularisierung kleiner Lungengefäße in einem Hypoxie-Modell der Pulmonalen Hypertonie reduziert und dabei *in vitro* insbesondere eine verminderte Phosphorylierung von Erk1 und Erk2 beobachtet werden konnte. Dadurch wurde die Proliferation von small muscle cells verhindert. Ein ähnlicher Effekt konnte durch Su et al. in peritonealen mesenchymalen Zellen als Modell für Dialyse-assoziierte peritoneale Fibrose gezeigt werden¹⁴⁰. Kürzlich konnte außerdem in einer Arbeit von Nettersheim et al. gezeigt werden, dass sowohl die Expression von TGFβ als auch von Smad2 in einem Mausmodell des Marfan-Syndroms erhöht ist¹⁴¹.

Nachdem diese Tiere subkutan NO₂-OA für zwei Wochen erhielten, zeigte sich auch hier eine signifikant erniedrigte Aktivierung von Smad2 sowie Erk1/2.

Auch die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Stat3 wurde in stimulierten Fibroblasten durch die Behandlung mit NO₂-OA inhibiert. Der JAK-Stat-Signalweg ist in verschiedenen Zelltypen Bestandteil von beispielsweise der Zellentwicklung, der Aufrechterhaltung der Homöostase sowie Proliferations- und Apoptosevorgänge. Bindet ein Signalpeptid, beispielsweise TGFβ, an den Rezeptor innerhalb der Zellmembran, dann wird intrazellulär die Januskinase (JAK) aktiviert und phosphoryliert Stat-Proteine, die wiederum als Transkriptionsfaktor im Nucleus fungieren¹⁴². Der JAK-Stat-Signalweg ist auch Teil der nicht-kanonischen TGFβ-Signalkaskade, seine Aktivierung ist mit einer vermehrten Fibrosierung assoziiert. Chakraborty et al. konnten zeigen, dass die durch TGFβ-stimulierte Aktivierung von Stat3 Fibroblasten eine profibrotische Wirkung hat und in manchen Erkrankungen, beispielsweise der systemischen Sklerodermie, ein zentraler Mediator von Fibrosierung darzustellen scheint¹⁴³. Hilfiker-Kleiner et. al zeigten, dass im Myokard insbesondere inflammatorische Stimuli wie IL-6 oder IL-11 zu einer Phosphorylierung von Stat-Proteinen, insbesondere Stat3, führen¹⁴⁴. Die aktivierten Stat-Proteine regulierten im Anschluss im Myokard insbesondere die Expression von Proteinen, welche eine wichtige Rolle in der Angiogenese, Inflammation, Apoptose sowie der Aufrechterhaltung der extrazellulären Matrix spielen^{145,146}. Auch in Patienten mit DCM konnte in Studien gezeigt werden¹⁴⁷, dass der JAK-Stat-Signalweg verändert und insbesondere die Stat3-positiven Kardiomyozyten vermindert waren. Stat3-Inhibitoren existieren bereits, werden aktuell jedoch nur in klinischen Studien bei onkologischen Patienten erprobt¹⁴⁸. Ob die Inhibierung des nicht-kanonischen TGFβ-Signalwegs auch als antifibrotisches Target vielversprechend ist, ist aktuell Gegenstand der Forschung.

5.3 Schlussfolgerung und Limitationen

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, dass nitrierte Fettsäuren ihre pleiotropen Wirkungen unter anderem durch eine Modifizierung zentraler Effektoren der TGF β -Signalkaskade bewirken und der kardiale Fibroblast eine Effektor-Zellpopulation darstellt. Wir bestätigen mit diesen Ergebnissen bereits bekannte pleiotropen Effekte der nitrierten Fettsäuren auf die Effektoren des TGF β -Signalwegs in einem weiteren Krankheitsbild.

Zusammenfassend zeigt sich, dass nitrierte Fettsäuren neben dem bereits beschriebenen und veröffentlichten antifibrotischen Wirkungen in unterschiedlichen Erkrankungen auch im Tiermodell der DCM funktionell relevante Effekte auf das Myokard haben. Während kein Einfluss auf die Plasmaspiegel und Expression von TGF β verzeichnet werden konnte, scheinen die pleiotropen Effekte zumindest teilweise auf eine Modulation der Downstream-Effektoren im TGF β -Signalweg zurückzuführen zu sein. Ein spezifischer Mechanismus von nitrierten Fettsäuren kann aber auch in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Zusätzlich ist zu betonen, dass in dieser Arbeit die DCM über einen autosomal-rezessiven Erbgang ausgelöst wurde. Die heterogenen Ätiologien, insbesondere inflammatorische und entzündliche Komponenten, welche häufigere Auslöser der DCM im Menschen sind, werden somit nicht abgebildet. Auch wenn der ausgebildete Phänotyp in der Maus der humanen Pathologie in vielerlei Hinsicht ähnelt, ist eine Übertragung auf den menschlichen Organismus nur bedingt möglich. Auch wurden die Effekte von NO₂-OA primär nur im kardialen Fibroblasten und nicht myokardialen Zellen, beispielsweise den Kardiomyozyten, untersucht.

Weitere Studien sind notwendig, um die Sicherheit und Wirksamkeit der vielversprechenden Substanz potenziell bei humanen Patienten einsetzen zu können. Beispielsweise könnten Proteomics- und Genomics-Daten der mit nitrierten Fettsäuren behandelten Ventrikel Rückschlüsse auf die spezifischen Modifikationen geben.

6 Literaturverzeichnis

1. Radtke R. Häufigste Todesursachen in Deutschland, 2022. (https://de.statista.com/themen/69/todesursachen/#topicHeader__wrapper (zuletzt geprüft am 25.07.2023)).
2. Fleck E, Heinemann M. Deutscher Herzbericht 2021. (<https://www.herzstiftung.de/system/files/2022-09/DHB21-Herzbericht-2021.pdf> (zuletzt abgerufen am 25.07.2023)).
3. Brownrigg JR, Leo V, Rose J, et al. Epidemiology of cardiomyopathies and incident heart failure in a population-based cohort study. *Heart* 2022;108:1383–91. (<https://heart.bmj.com/content/108/17/1383>).
4. Richardson P, McKenna W, Bristow M, et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996;93:841–2.
5. BRIGDEN W. UNCOMMON MYOCARDIAL DISEASES THE NON-CORONARY CARDIOMYOPATHIES*. *The Lancet* 1957;270:1243–9.
6. GOODWIN JF. CARDIAC FUNCTION IN PRIMARY MYOCARDIAL DISORDERS II. *Br Med J* 1964;1:1595–7.
7. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J* 2021;42:3599–726. (<https://academic.oup.com/eurheartj/article/42/36/3599/6358045>).
8. McNally EM, Golbus JR, Puckelwartz MJ. Genetic mutations and mechanisms in dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2013;123:19–26.
9. Weintraub RG, Semsarian C, Macdonald P. Dilated cardiomyopathy. *The Lancet* 2017;390:400–14.
10. Dec GW, Fuster V. Idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1994;331:1564–75.
11. Lipshultz SE, Sleeper LA, Towbin JA, et al. The incidence of pediatric cardiomyopathy in two regions of the United States. *N Engl J Med* 2003;348:1647–55.
12. Guzzo-Merello G, Cobo-Marcos M, Gallego-Delgado M, Garcia-Pavia P. Alcoholic cardiomyopathy. *World J Cardiol* 2014;6:771–81.
13. Kevil CG, Goeders NE, Woolard MD, et al. Methamphetamine Use and Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2019;39:1739–46.
14. Lipshultz SE, Adams MJ, Colan SD, et al. Long-term cardiovascular toxicity in children, adolescents, and young adults who receive cancer therapy: pathophysiology,

course, monitoring, management, prevention, and research directions: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2013;128:1927–95.

15. Bowles NE, Olsen E, Richardson PJ, Archard LC. DETECTION OF COXSACKIE-B-VIRUS-SPECIFIC RNA SEQUENCES IN MYOCARDIAL BIOPSY SAMPLES FROM PATIENTS WITH MYOCARDITIS AND DILATED CARDIOMYOPATHY. *The Lancet* 1986;327:1120–3.
16. Komiyama M, Hasegawa K, Matsumori A. Dilated Cardiomyopathy Risk in Patients with Coronavirus Disease 2019: How to Identify and Characterise it Early? *Eur Cardiol* 2020;15:e49.
17. Dhakal B, Sharma N, Pathak BD, Simkhada N, Limbu B. Case Report: A case of Dilated Cardiomyopathy in COVID-19; A case report. *F1000Res* 2022;11:567.
18. Seferović PM, Polovina M, Bauersachs J, et al. Heart failure in cardiomyopathies: a position paper from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *European Journal of Heart Failure* 2019;21:553–76. (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ejhf.1461>).
19. Schultheiss H-P, Fairweather D, Caforio ALP, et al. Dilated cardiomyopathy. *Nat Rev Dis Primers* 2019;5:32.
20. Japp AG, Gulati A, Cook SA, Cowie MR, Prasad SK. The Diagnosis and Evaluation of Dilated Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2016;67:2996–3010.
21. Kubo SH, Schulman S, Starling RC, Jessup M, Wentworth D, Burkhoff D. Development and validation of a patient questionnaire to determine New York Heart Association classification. *J Card Fail* 2004;10:228–35.
22. Bozkurt B, Colvin M, Cook J, et al. Current Diagnostic and Treatment Strategies for Specific Dilated Cardiomyopathies: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* 2016;134:e579-e646.
23. Pinamonti B, Abate E, Luca A de, Finocchiaro G, Kocova R, eds. Dilated Cardiomyopathy: From Genetics to Clinical Management [Internet]. Springer, 2019.
24. Michels VV, Moll PP, Miller FA, et al. The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1992;326:77–82.
25. Towbin JA, Bowles NE. Dilated cardiomyopathy: a tale of cytoskeletal proteins and beyond. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2006;17:919–26.
26. Mohapatra B, Jimenez S, Lin JH, et al. Mutations in the muscle LIM protein and alpha-actinin-2 genes in dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis. *Molecular Genetics and Metabolism* 2003;80:207–15.
27. Jefferies JL, Towbin JA. Dilated cardiomyopathy. *Lancet* 2010;375:752–62.
28. Hershberger RE, Lindenfeld J, Mestroni L, Seidman CE, Taylor MRG, Towbin JA. Genetic evaluation of cardiomyopathy--a Heart Failure Society of America practice guideline. *J Card Fail* 2009;15:83–97.

29. Rosenbaum AN, Agre KE, Pereira NL. Genetics of dilated cardiomyopathy: practical implications for heart failure management. *Nat Rev Cardiol* 2020;17:286–97.
30. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 2020;581:434–43.
31. Berg DD, Jhund PS, Docherty KF, et al. Time to Clinical Benefit of Dapagliflozin and Significance of Prior Heart Failure Hospitalization in Patients With Heart Failure With Reduced Ejection Fraction. *JAMA Cardiol* 2021;6:499–507.
32. Stefan Frantz, Stephan von Haehling. Pocket-Leitlinie: Akute und chronische Herzinsuffizienz (Version 2021), ESC Pocket Guidelines. Akute und chronische Herzinsuffizienz, 2021. (<https://leitlinien.dgk.org/2022/pocket-leitlinie-akute-und-chronische-herzinsuffizienz-version-2021/> (zuletzt geprüft am 25.07.2023)).
33. Halliday BP, Cleland JGF, Goldberger JJ, Prasad SK. Personalizing Risk Stratification for Sudden Death in Dilated Cardiomyopathy: The Past, Present, and Future. *Circulation* 2017;136:215–31.
34. Towbin JA, Lowe AM, Colan SD, et al. Incidence, causes, and outcomes of dilated cardiomyopathy in children. *JAMA* 2006;296:1867–76.
35. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, et al. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2006;113:1807–16.
36. Arber S. Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation. *Cell* 1994;79:221–31.
37. Vafiadaki E, Arvanitis DA, Sanoudou D. Muscle LIM Protein: Master regulator of cardiac and skeletal muscle functions. *Gene* 2015;566:1–7.
38. Schmeichel K. The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell* 1994;79:211–9.
39. Fung YW, Wang RX, Heng HH, Liew CC. Mapping of a human LIM protein (CLP) to human chromosome 11p15.1 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 1995;28:602–3.
40. Arber S, Hunter JJ, Ross J, et al. MLP-Deficient Mice Exhibit a Disruption of Cardiac Cytoarchitectural Organization, Dilated Cardiomyopathy, and Heart Failure. *Cell* 1997;88:393–403.
41. Voelkel T, Linke WA. Conformation-regulated mechanosensory control via titin domains in cardiac muscle. *Pflugers Arch* 2011;462:143–54.
42. Buyandelger B, Ng K-E, Miodic S, et al. MLP (muscle LIM protein) as a stress sensor in the heart. *Pflugers Arch* 2011;462:135–42.

43. Knöll R, Hoshijima M, Hoffman HM, et al. The Cardiac Mechanical Stretch Sensor Machinery Involves a Z Disc Complex that Is Defective in a Subset of Human Dilated Cardiomyopathy. *Cell* 2002;111:943–55.
44. Santiago CF, Huttner IG, Fatkin D. Mechanisms of TTNtv-Related Dilated Cardiomyopathy: Insights from Zebrafish Models. *J Cardiovasc Dev Dis* 2021;8.
45. Kubalak SW, Hunter JJ, Chien KR, et al. [26]Molecular analysis of cardiac muscle diseases based on mouse genetics. In: Adolph KW, ed. *Human molecular genetics*. San Diego: Academic Press, 1996:470–87.
46. Lorenzen-Schmidt I, Stuyvers BD, ter Keurs HEDJ, et al. Young MLP deficient mice show diastolic dysfunction before the onset of dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2005;39:241–50.
47. Knöll R, Kostin S, Klede S, et al. A common MLP (muscle LIM protein) variant is associated with cardiomyopathy. *Circ Res* 2010;106:695–704.
48. Boateng SY, Belin RJ, Geenen DL, et al. Cardiac dysfunction and heart failure are associated with abnormalities in the subcellular distribution and amounts of oligomeric muscle LIM protein. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292:H259-69.
49. University of Pittsburgh School of Medicine Department of Pharmacology & Chemical Biology. Bruce A. Freeman, PhD. (<https://www.pharmacology.us/faculty/BruceFreeman?AspxAutoDetectCookieSupport=1> (zuletzt geprüft am 25.07.2023)).
50. Baker PRS, Lin Y, Schopfer FJ, et al. Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: multiple nitrated unsaturated fatty acid derivatives exist in human blood and urine and serve as endogenous peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *J Biol Chem* 2005;280:42464–75.
51. Trostchansky A, Rubbo H. Nitrated fatty acids: mechanisms of formation, chemical characterization, and biological properties. *Free Radic Biol Med* 2008;44:1887–96.
52. Villacorta L, Zhang J, Garcia-Barrio MT, et al. Nitro-linoleic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation via the Keap1/Nrf2 signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H770-6.
53. Rudolph V, Rudolph TK, Schopfer FJ, et al. Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 2010;85:155–66.
54. Li Y, Zhang J, Schopfer FJ, et al. Molecular recognition of nitrated fatty acids by PPAR gamma. *Nat Struct Mol Biol* 2008;15:865–7.
55. Freeman Lab - Labs - University of Pittsburgh School of Medicine Department of Pharmacology & Chemical Biology, 2023. (<https://www.pharmacology.us/Labs/FreemanLab> (zuletzt geprüft am 25.07.2023)).

56. Rudolph V, Schopfer FJ, Khoo NKH, et al. Nitro-fatty acid metabolome: saturation, desaturation, beta-oxidation, and protein adduction. *J Biol Chem* 2009;284:1461–73.
57. Salvatore SR, Vitturi DA, Baker PRS, et al. Characterization and quantification of endogenous fatty acid nitroalkene metabolites in human urine. *J Lipid Res* 2013;54:1998–2009.
58. Tsikas D, Zoerner AA, Mitschke A, Gutzki F-M. Nitro-fatty acids occur in human plasma in the picomolar range: a targeted nitro-lipidomics GC-MS/MS study. *Lipids* 2009;44:855–65.
59. Schopfer FJ, Vitturi DA, Jorkasky DK, Freeman BA. Nitro-fatty acids: New drug candidates for chronic inflammatory and fibrotic diseases. *Nitric Oxide* 2018;79:31–7.
60. Garner RM, Mould DR, Chieffo C, Jorkasky DK. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Effects of Oral CXA-10, a Nitro Fatty Acid, After Single and Multiple Ascending Doses in Healthy and Obese Subjects. *Clin Transl Sci* 2019;12:667–76.
61. PRIMEx - A Study of 2 Doses of Oral CXA-10 in Pulmonary Arterial Hypertension (PAH) - Full Text View - ClinicalTrials.gov, 2023. (<https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03449524>).
62. FIRSTx - A Study of Oral CXA-10 in Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis (FSGS) - Full Text View - ClinicalTrials.gov, 2023. (<https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03422510> (zuletzt geprüft am 25.07.2023)).
63. Wang W, Li C, Yang T. Protection of nitro-fatty acid against kidney diseases. *Am J Physiol Renal Physiol* 2016;310:F697-F704.
64. Zhang J, Villacorta L, Chang L, et al. Nitro-oleic acid inhibits angiotensin II-induced hypertension. *Circ Res* 2010;107:540–8.
65. Charles RL, Rudyk O, Prysyazhna O, et al. Protection from hypertension in mice by the Mediterranean diet is mediated by nitro fatty acid inhibition of soluble epoxide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:8167–72.
66. Cui T, Schopfer FJ, Zhang J, et al. Nitrated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators. *J Biol Chem* 2006;281:35686–98.
67. Rudolph TK, Ravekes T, Klinke A, et al. Nitrated fatty acids suppress angiotensin II-mediated fibrotic remodelling and atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2016;109:174–84.
68. Klinke A, Möller A, Pekarova M, et al. Protective Effects of 10-nitro-oleic Acid in a Hypoxia-Induced Murine Model of Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014;51:155–62.
69. Rudolph TK, Rudolph V, Edreira MM, et al. Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:938–45.
70. Bonacci G, Schopfer FJ, Batthyany CI, et al. Electrophilic fatty acids regulate matrix metalloproteinase activity and expression. *J Biol Chem* 2011;286:16074–81.

- 71.** Giannandrea M, Parks WC. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Dis Model Mech* 2014;7:193–203.
- 72.** Narala VR, Thimmana LV, Panati K, Kolliputi N. Nitrated fatty acid, 10-nitrooleate protects against hyperoxia-induced acute lung injury in mice. *Int Immunopharmacol* 2022;109:108838.
- 73.** Principles of the Design and Operation of Generic Osmotic Pumps for the Delivery of Semisolid or Liquid Drug Formations. *Annals of Biomedical Engineering* 1976;(Vol. 4).
- 74.** ALZET® Osmotic Pumps. Pump Performance - ALZET® Osmotic Pumps, 2019. (https://www.alzet.com/products/alzet_pumps/performance/ (zuletzt geprüft am 25.07.2023)).
- 75.** Hounkpe BW, Chenou F, Lima F de, Paula EV de. HRT Atlas v1.0 database: redefining human and mouse housekeeping genes and candidate reference transcripts by mining massive RNA-seq datasets. *Nucleic Acids Res* 2021;49:D947-D955.
- 76.** Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402–8.
- 77.** File:Polymerase chain reaction-en.svg - Wikimedia Commons, 2021. (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polymerase_chain_reaction-en.svg (zuletzt geprüft am 25.07.2023)).
- 78.** Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 2012;13:134.
- 79.** Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:3116–20.
- 80.** Santiago J-J, Dangerfield AL, Rattan SG, et al. Cardiac fibroblast to myofibroblast differentiation in vivo and in vitro: expression of focal adhesion components in neonatal and adult rat ventricular myofibroblasts. *Dev Dyn* 2010;239:1573–84.
- 81.** Linetsky E, Bottino R, Lehmann R, Alejandro R, Inverardi L, Ricordi C. Improved human islet isolation using a new enzyme blend, liberase. *Diabetes* 1997;46:1120–3.
- 82.** Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG. DS_Neonatal Cardiac Fibroblast Isolation Kit_m. (https://www.miltenyibiotec.com/_Resources/Persistent/a9484add651b74057e7ad0d0a760785953ad443a/DS_Neonatal%20Cardiac%20Fibroblast%20Isolation%20Kit_m.pdf (zuletzt geprüft am 25.07.2023)).
- 83.** Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990;11:231–8.
- 84.** Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG. Magnetic cell separation. (<https://www.miltenyibiotec.com/DE-en/resources/macs-handbook/macs-technologies/cell-separation/magnetic-cell-separation.html> (zuletzt geprüft am 25.07.2023)).

- 85.** Pirkmajer S, Chibalin AV. Serum starvation: caveat emptor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011;301:C272-9.
- 86.** C. Kevin Becker. Accutase® Cell Detachment Solution. San Diego, CA, USA: Innovative Cell Technologies, Inc. (<https://www.accutase.com/accutase.html> (zuletzt geprüft am 25.07.2023)).
- 87.** Gkantidis N, Katsaros C, Chiquet M. Detection of gelatinolytic activity in developing basement membranes of the mouse embryo head by combining sensitive in situ zymography with immunolabeling. *Histochem Cell Biol* 2012;138:557–71. (<https://link.springer.com/article/10.1007/s00418-012-0982-8>).
- 88.** Rodríguez D, Morrison CJ, Overall CM. Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim Biophys Acta* 2010;1803:39–54. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488909002407>).
- 89.** Gkantidis N, Katsaros C, Chiquet M. Detection of gelatinolytic activity in developing basement membranes of the mouse embryo head by combining sensitive in situ zymography with immunolabeling. *Histochem Cell Biol* 2012;138:557–71. (<https://link.springer.com/article/10.1007/s00418-012-0982-8>).
- 90.** LifeSpan BioSciences, Inc. Mouse TGFB1/TGF Beta 1 ELISA kit User Manual. Seattle. (<https://www.lsbio.com/elisakits/manualpdf/ls-f5184.pdf> (zuletzt geprüft am 25.07.2023)).
- 91.** Lattouf R, Younes R, Lutomski D, et al. Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. *J Histochem Cytochem* 2014;62:751–8.
- 92.** Prof. Dr. T. Benzing. Cell Sorting Facility. (<https://www.cmmc-uni-koeln.de/core-facilities/cell-sorting-facility> (zuletzt geprüft am 25.07.2023)).
- 93.** Yamamoto R, Akazawa H, Ito K, et al. Angiotensin II type 1a receptor signals are involved in the progression of heart failure in MLP-deficient mice. *Circ J* 2007;71:1958–64.
- 94.** Talman V, Ruskoaho H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration. *Cell Tissue Res* 2016;365:563–81.
- 95.** Mann DL, Bristow MR. Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. *Circulation* 2005;111:2837–49.
- 96.** Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, et al. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation* 1999;99:2750–6.
- 97.** Schalla S, Bekkers SC, Dennert R, et al. Replacement and reactive myocardial fibrosis in idiopathic dilated cardiomyopathy: comparison of magnetic resonance imaging with right ventricular biopsy. *European Journal of Heart Failure* 2010;12:227–31.
- 98.** Liu Y, Jia Z, Liu S, et al. Combined losartan and nitro-oleic acid remarkably improves diabetic nephropathy in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013;305:F1555-62.

99. Rom O, Xu G, Guo Y, et al. Nitro-fatty acids protect against steatosis and fibrosis during development of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *EBioMedicine* 2019;41:62–72.
100. Dr. Isabelle Viktoria Maucher. Pirfenidon. Vidal MMI Germany GmbH. 2020 Oct 22.
101. Conte E, Gili E, Fagone E, Fruciano M, Iemmolo M, Vancheri C. Effect of pirfenidone on proliferation, TGF- β -induced myofibroblast differentiation and fibrogenic activity of primary human lung fibroblasts. *Eur J Pharm Sci* 2014;58:13–9.
102. Wollin L, Wex E, Pautsch A, et al. Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2015;45:1434–45.
103. Wollin L, Maillet I, Quesniaux V, Holweg A, Ryffel B. Antifibrotic and anti-inflammatory activity of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib in experimental models of lung fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2014;349:209–20.
104. Hostettler KE, Zhong J, Papakonstantinou E, et al. Anti-fibrotic effects of nintedanib in lung fibroblasts derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* 2014;15:157.
105. Gurevich EV, Gurevich VV. Therapeutic potential of small molecules and engineered proteins. *Handb Exp Pharmacol* 2014;219:1–12.
106. Frangogiannis N. Transforming growth factor- β in tissue fibrosis. *J Exp Med* 2020;217:e20190103.
107. Sanderson JE, Lai KB, Shum IO, Wei S, Chow LT. Transforming growth factor-beta(1) expression in dilated cardiomyopathy. *Heart* 2001;86:701–8.
108. Holweg CT, Baan CC, Niesters HG, et al. TGF-beta1 gene polymorphisms in patients with end-stage heart failure. *J Heart Lung Transplant* 2001;20:979–84.
109. Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. TGF- β signaling in fibrosis. *Growth Factors* 2011;29:196–202.
110. Ivey MJ, Tallquist MD. Defining the Cardiac Fibroblast. *Circ J* 2016;80:2269–76.
111. Souders CA, Bowers SLK, Baudino TA. Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res* 2009;105:1164–76.
112. Nag AC. Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios* 1980;28:41–61.
113. Banerjee I, Yekkala K, Borg TK, Baudino TA. Dynamic interactions between myocytes, fibroblasts, and extracellular matrix. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1080:76–84.
114. Chang HY, Chi J-T, Dudoit S, et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:12877–82.
115. Baum J, Duffy HS. Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about? *J Cardiovasc Pharmacol* 2011;57:376–9.

- 116.** Nagaraju CK, Robinson EL, Abdesselem M, et al. Myofibroblast Phenotype and Reversibility of Fibrosis in Patients With End-Stage Heart Failure. *J Am Coll Cardiol* 2019;73:2267–82.
- 117.** Camelliti P, Green CR, LeGrice I, Kohl P. Fibroblast network in rabbit sinoatrial node: structural and functional identification of homogeneous and heterogeneous cell coupling. *Circ Res* 2004;94:828–35.
- 118.** Stellato M, Czepiel M, Distler O, Błyszczuk P, Kania G. Identification and Isolation of Cardiac Fibroblasts From the Adult Mouse Heart Using Two-Color Flow Cytometry. *Front. Cardiovasc. Med.* 2019;6:105. (<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2019.00105/full#B26>).
- 119.** Stewart JA, Massey EP, Fix C, Zhu J, Goldsmith EC, Carver W. Temporal alterations in cardiac fibroblast function following induction of pressure overload. *Cell Tissue Res* 2010;340:117–26.
- 120.** Leask A. TGFbeta, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovasc Res* 2007;74:207–12.
- 121.** Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat M-L, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 2007;170:1807–16.
- 122.** Saharinen J. Latent transforming growth factor- β binding proteins (LTBPs) – structural extracellular matrix proteins for targeting TGF- β action. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 1999;10:99–117. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359610199000106>).
- 123.** Todorovic V, Rifkin DB. LTBPs, more than just an escort service. *J Cell Biochem* 2012;113:410–8.
- 124.** Pang X-F, Lin X, Du J-J, Zeng D-Y. LTBP2 knockdown by siRNA reverses myocardial oxidative stress injury, fibrosis and remodelling during dilated cardiomyopathy. *Acta Physiol (Oxf)* 2020;228:e13377.
- 125.** Bai Y, Zhang P, Zhang X, Huang J, Hu S, Wei Y. LTBP-2 acts as a novel marker in human heart failure - a preliminary study. *Biomarkers* 2012;17:407–15.
- 126.** Breidhardt T, Vanpoucke G, Potocki M, et al. The novel marker LTBP2 predicts all-cause and pulmonary death in patients with acute dyspnoea. *Clin Sci (Lond)* 2012;123:557–66.
- 127.** Sideek MA, Smith J, Menz C, Adams JRJ, Cowin AJ, Gibson MA. A Central Bioactive Region of LTBP-2 Stimulates the Expression of TGF- β 1 in Fibroblasts via Akt and p38 Signalling Pathways. *Int J Mol Sci* 2017;18.
- 128.** Shinde AV, Humeres C, Frangogiannis NG. The role of α -smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017;1863:298–309.

- 129.** Jin B, Zhu J, Shi H-M, Wen Z-C, Wu B-W. YAP activation promotes the transdifferentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts in matrix remodeling of dilated cardiomyopathy. *Braz J Med Biol Res* 2018;52:e7914. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30484494/>).
- 130.** Phan SH. Biology of fibroblasts and myofibroblasts. *Proc Am Thorac Soc* 2008;5:334–7.
- 131.** Zhang K, Rekhter MD, Gordon D, Phan SH. Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol* 1994;145:114–25.
- 132.** Fragiadaki M, Ikeda T, Witherden A, Mason RM, Abraham D, Bou-Gharios G. High doses of TGF- β potently suppress type I collagen via the transcription factor CUX1. *Mol Biol Cell* 2011;22:1836–44.
- 133.** Clayton SW, Ban GI, Liu C, Serra R. Canonical and noncanonical TGF- β signaling regulate fibrous tissue differentiation in the axial skeleton. *Sci Rep* 2020;10:21364. (<https://www.nature.com/articles/s41598-020-78206-4>).
- 134.** Brown KA, Pietenpol JA, Moses HL. A tale of two proteins: differential roles and regulation of Smad2 and Smad3 in TGF-beta signaling. *J Cell Biochem* 2007;101:9–33. (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcb.21255>).
- 135.** Flanders KC. Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int J Exp Pathol* 2004;85:47–64.
- 136.** Zhao J, Shi W, Wang Y-L, et al. Smad3 deficiency attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282:L585-93.
- 137.** Novus Biologicals. TGF-beta Signaling Pathway Poster, 2023. (<https://www.novusbio.com/support/tgf-beta-poster> (zuletzt geprüft am 25.07.2023)).
- 138.** Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 2003;425:577–84.
- 139.** Liu A-J, Ling F, Wang D, Wang Q, Lü X-D, Liu Y-L. Fasudil inhibits platelet-derived growth factor-induced human pulmonary artery smooth muscle cell proliferation by up-regulation of p27kip¹ via the ERK signal pathway. *Chin Med J (Engl)* 2011;124:3098–104.
- 140.** Su W, Wang H, Feng Z, Sun J. Nitro-oleic acid inhibits the high glucose-induced epithelial-mesenchymal transition in peritoneal mesothelial cells and attenuates peritoneal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2020;318:F457-F467.
- 141.** Nettersheim FS, Lemties J, Braumann S, et al. Nitro-oleic acid reduces thoracic aortic aneurysm progression in a mouse model of Marfan syndrome. *Cardiovasc Res* 2022;118:2211–25.
- 142.** Imada K, Leonard WJ. The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol* 2000;37:1–11.

- 143.** Chakraborty D, Šumová B, Mallano T, et al. Activation of STAT3 integrates common profibrotic pathways to promote fibroblast activation and tissue fibrosis. *Nat Commun* 2017;8:1130.
- 144.** Fischer P, Hilfiker-Kleiner D. Survival pathways in hypertrophy and heart failure: the gp130-STAT3 axis. *Basic Res Cardiol* 2007;102:279–97.
(<https://link.springer.com/article/10.1007/s00395-007-0658-z>).
- 145.** Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Fuchs M, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for myocardial capillary growth, control of interstitial matrix deposition, and heart protection from ischemic injury. *Circ Res* 2004;95:187–95.
- 146.** Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Drexler H. Many good reasons to have STAT3 in the heart. *Pharmacol Ther* 2005;107:131–7.
- 147.** Podewski EK, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, et al. Alterations in Janus kinase (JAK)-signal transducers and activators of transcription (STAT) signaling in patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2003;107:798–802.
- 148.** Tvardi Therapeutics, Incorporated, M.D. Anderson Cancer Center. Phase I Study of TTI-101, an Oral Inhibitor of Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) 3, in Patients With Advanced Cancers, NCT03195699, SM_CP2016-0842, 2022.
(<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03195699>).
- 149.** Braumann S, Schumacher W, Im NG, et al. Nitro-Oleic Acid (NO₂-OA) Improves Systolic Function in Dilated Cardiomyopathy by Attenuating Myocardial Fibrosis. *Int J Mol Sci* 2021;22.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: (A) Schematische Darstellung eines gesunden Herzens. (B) Bei der dilatativen Kardiomyopathie vergrößert sich das Herz und die LV-Funktion nimmt ab. (C) Bei Patienten mit einer HCM zeigt sich das Myokard verdickt, sodass es sich nur reduziert füllen kann⁸. ...15
- Abbildung 2: Systematische und zusammenfassende Darstellung heterogener Ätiologien, die zu einer DCM führen können¹⁸.16
- Abbildung 3: Vorschlag zur Diagnosefindung einer DCM sowie zum Ausschluss anderer Differentialdiagnosen der American Heart Association²².18
- Abbildung 4: Leitliniengerechte Behandlung eines Patienten mit HFrEF, modifiziert aus der Pocket-Leitlinie: Akute und chronische Herzinsuffizienz (Version 2021). ACE-I; ARB = Angiotensin-Rezeptorblocker; ARNI; BB = Betablocker; bpm=Schläge pro Minute; BTC = „bridge-to-candidacy“- Indikation; BTT = „bridge-to-transplantation“-Indikation; CABG = Koronarer Bypass; CRT-D = kardiale Resynchronisationstherapie mit Defibrillator; CRT-P = kardiale Resynchronisationstherapie mit Schrittmacher; DT = Zieltherapie; HF = Herzinsuffizienz; HFrEF = Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion; ICD = implantierbarer Kardioverter-Defibrillator; ISDN = Isosorbiddinitrat; LSB = Linksschenkelblock; MCS = mechanische Kreislaufunterstützung; MK-TEER = Mitralklappen-Transkatheter Edge-to-Edge Rekonstruktion; MRA = Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonist; ms = Millisekunden; PVI = Pulmonalvenenisolation; QoL = Lebensqualität; SAVR = chirurgische Aortenklappenrekonstruktion; SGLT2I = SGLT2 Hemmer; SR = Sinusrhythmus; TAVI = Transkatheter-Aortenklappenimplantation. Farbcode für die Empfehlungsgrade: Grün für den Empfehlungsgrad I; Gelb für den Empfehlungsgrad IIa. Die Abbildung zeigt Managementoptionen mit Empfehlungen der Grade I und IIa³².21
- Abbildung 5: Schematische Darstellung eines einzelnen Sarkomers als Teil einer Myofibrille. De Z-Scheibe ist hier in lila dargestellt⁴⁴.23
- Abbildung 6: Originalpublikation Arber et al.: Mlp^{-/-} Mäuse zeigen die typischen Charakteristika einer DCM mit makroskopisch sichtbar dilatiertem Ventrikel sowie in der Elektronenmikroskopie dargestellten Disruption der Sarkomere. Schematisch dargestellt sind die nun nicht mehr streng parallel angeordneten Sarkomere, welche zu einer inadäquaten Antwort auf mechanische Stimuli führen.....24
- Abbildung 7: Strukturformel von 9- und 10-Nitro-Cis-Ölsäure und 9- und 10-Nitrohydroxid-Ölsäure (links) sowie 9-; 10-; 12- und 13-Nitrolinoläure. Leicht modifizierte Abbildung nach B.A: Freeman et al.26
- Abbildung 8: Zusammenfassung unterschiedlicher möglicher Synthesewege für nitrierte Fettsäuren abhängig vom Sauerstoffgehalt des Reaktionsmilieus, Abbildung nach A. Trostchansky et al.⁵¹27
- Abbildung 9: Schematische Darstellung der Reaktion von NO₂-FA mit Cysteinresiduen in Proteinen. Durch die posttranslationale Modifikation können NO₂-FA als

Transkriptionsfaktoren fungieren und die Genexpression im Zellkern beeinflussen. Zusätzlich ist die β -Oxidation dargestellt, welche die NO_2 -FA mitochondrial durchlaufen sowie die Inaktivierung über die Prostaglandin-Reduktase-1 ⁵⁵	28
Abbildung 10: Darstellung der kontinuierlichen Freisetzung der gewählten Befüllungsflüssigkeit, in dieser Arbeit NO_2 -OA oder PEG, einer ALZET osmotic pump "Model 2002" über den Zeitraum von vierzehn Tagen (links) sowie schematische Darstellung der subkutanen Lage der Pumpe nach Implantation (rechts) ⁷⁴	38
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Graphik mit freundlicher Genehmigung von Simon Geißen.	39
Abbildung 12: Schematische Darstellung des Ablaufs einer qPCR ⁷⁷	41
Abbildung 13: Schematische Darstellung der MACS-basierten Zellisolation ⁸⁴	53
Abbildung 14: Beispielaufnahme der kultivierten primären Fibroblasten in der Zellkultur mit einer Konfluenz von etwa 60 % (links) und 100 % (rechts).	55
Abbildung 15: Genutzte Stimulationsbedingungen in der Zellkultur.....	56
Abbildung 16: Prinzip des verwendeten Sandwich-ELISA ⁹⁰	59
Abbildung 17: Erkrankte $\text{Mip}^{-/-}$ Mäuse hatten ein erhöhtes Herz-Körpergewicht-Verhältnis, welches sich insbesondere über das erhöhte Herzgewicht erklärt. Nach einer vierwöchigen Behandlung besserte sich dieses signifikant.	62
Abbildung 18: Vorarbeiten entsprechend der Originalpublikation. Vor der Behandlung zeigten $\text{Mip}^{-/-}$ Mäuse eine signifikant eingeschränkte LV-EF im Vergleich zu ihren WT-Geschwistertieren (A). Nach vierwöchiger Behandlung mit NO_2 -OA hatte sich die LV-EF im Vergleich zu den Tieren, die lediglich die Trägersubstanz PEG erhielten, signifikant verbessert (B, C). Für das CO konnten ähnliche Ergebnisse dargestellt werden (D, E, F) sowie das GLS (G, H, I). Repräsentative Darstellungen der Echokardiographie mit GLS-Messung in WT (J), $\text{Mip}^{-/-}$ Tiere, welche PEG (K) sowie $\text{Mip}^{-/-}$ Tiere, welche die Behandlung mit NO_2 -OA erhielten (L).....	64
Abbildung 19: Repräsentative Aufnahmen der fibrosierten Ventrikel in der Pircosirius Rot Färbung (links) sowie Quantifizierung des fibrotischen Anteils (rechts) mit signifikant weniger Fibrosierung in mit NO_2 -OA behandelten Versuchstieren.	65
Abbildung 20: Erkrankte Mäuse exprimierten signifikant mehr intraventrikuläres Kollagen als ihre gesunden Wildtyp-Geschwistertiere. Nach der Behandlung mit NO_2 -OA zeigte sich bereits eine signifikante Reduktion des Kollagens auf Ventrikelebene.	66
Abbildung 21: Expression der Gene Col1a1 ; Col3a1 , $\text{Tgf}\beta$ sowie Ltbp2 in der qPCR in Ventrikelgewebe aus Wildtyp-Tieren, erkrankten unbehandelten Tieren sowie erkrankten $\text{Mip}^{-/-}$ Tieren mit vierwöchiger NO_2 -OA-Behandlung.	67
Abbildung 22: Plasma-Level von $\text{TGF}\beta$ im Plasma von behandelten und unbehandelten Versuchstieren.	68

Abbildung 23: Expression von TGFβ/LAP (links) sowie reifem TGFβ (rechts) im Immunoblot.	68
Abbildung 24: Expression von TGFβ-Rezeptor 1 auf Proteinebene im Immunoblot (links) und in der qPCR (rechts).....	69
Abbildung 25: In der mRNA-Expression zeigte sich kein Effekt der relativen Genexpression für MMP2 und MMP9. Eine rein qualitative Betrachtung in der in situ Zymographie ließ eine subjektive vermehrte enzymatische Aktivität in den Schnitten der Mlp ^{-/-} Tiere erahnen. Auf den Einsatz der in situ Zymographie wurde im weiteren jedoch verzichtet.	70
Abbildung 26: Repräsentative Cell-Sorting Analyse einer mit PEG behandelten WT-Maus: Die Fibroblastenpopulation P7 machte etwa 5,9% der gemessenen Events aus.	71
Abbildung 27: Sorting-Analyse einer mit PEG-behandelten WT-Maus. Die Cell-Sorting-Analyse zeigte ein vergleichbares Ergebnis zu Abbildung 26.	72
Abbildung 28: Repräsentative Cell-Sorting-Analysen einer Mlp ^{-/-} Maus, welche PEG erhalten hat (links). Es zeigten sich in der Zielpopulation der Fibroblasten lediglich acht detektierbare Events ohne lebende Zelle. Auf der rechten Seite ist dieselbe Analyse für eine mit NO ₂ -OA-behandelte Mlp ^{-/-} Maus dargestellt. Auch hier konnten keine lebendigen Fibroblasten gefunden werden.	73
Abbildung 29: Im Immunoblot zeigten WT- und Mlp ^{-/-} Fibroblasten keine Expression von MLP auf Proteinebene, während im LV-Homolysat von WT-Mäusen ein starkes MLP-Signal detektiert werden konnte.	74
Abbildung 30: Ergebnisse der mRNA-Expression nach einer Stimulationszeit von t = 6 Stunden.....	75
Abbildung 31: Verdünnungsreihe in primären kardialen Fibroblasten mit verschiedenen TGFβ-Konzentrationen (n = 2 oder n = 3).	76
Abbildung 32: Eine Stimulation mit TGFβ führte zu einer erhöhten Expression des Myofibroblastenmarkers αSMAs im Immunoblot. Eine Ko-Inkubation mit NO ₂ -OA verringerte die Expression im Vergleich zu den Zellen, die nur mit TGFβ stimuliert wurden.	77
Abbildung 33: Expression im Immunoblot von (p)Smad2, (p)Stat3 und (p)Erk nach Stimulation mit TGFβ sowie Koinkubation mit NO ₂ -OA.	78
Abbildung 34: Repräsentative Immunofluoreszenz-Färbung zweier mit TGFβ-stimulierten Myofibroblasten. Die Stressfasern wurden durch die Inkubation mit einem αSMA-Antikörper angefärbt.	79
Abbildung 35: Weitere repräsentative Immunofluoreszenzfärbungen von naiven und stimulierten Myofibroblasten. Belichtung durch Simon Geißen.	80
Abbildung 36: Aktivierungsprozess von TGFβ nach Biernacka et al. ¹⁰⁹ : In seiner inaktiven Form ist TGFβ als Dimer an LAP gebunden. An das Dimer bindet LTBP, welches die Freisetzung von aktivem TGFβ katalysiert. TGFβ bindet an den membrangebundenen Rezeptor TGFβR1 und TGFβR2 und aktiviert den kanonischen sowie nicht-kanonischen Pathway.	85

Abbildung 37: Schematische Darstellung der postulierten Veränderungen von TGFβ auf den aktivierten Myofibroblasten. Grafik von Simon Braumann und Simon Geißen, die Grafik wurde mit Hilfe von BioRender erstellt.	87
Abbildung 38: Schematische Übersicht der nicht-kanonischen und kanonischen TGFβ-Signalkaskade ¹³⁷	91

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der identifizierten betroffenen Gene bei genetischen Formen der DCM (modifiziert nach Jefferies et al.) ²⁷	19
Tabelle 2: Genutzte Materialien für die Umschreibung der isolierten RNA in cDNA.....	40
Tabelle 3: Benutzte Primer-Sequenzen.....	42
Tabelle 4: Konditionen des benutzten Standard-Cycling Programms	42
Tabelle 5: Benutztes Rezept für den RIPA-Puffer.....	43
Tabelle 6: Benutzte Antikörper sowie zugehörige Verdünnung für Immunoblot-Analysen.....	46
Tabelle 7: Ansatz für 100 ml eines vierfach konzentrierten Laemmli Puffers.	47
Tabelle 8: Rezept für den Ansatz eines vierfach konzentrierten Trenngelpuffers (1,5 M Tris).	47
Tabelle 9: Rezept für den Ansatz eines vierfach konzentrierten Sammelpuffers (0,5 M Tris).	47
Tabelle 10: Rezept für den Ansatz eines zehnfach konzentrierten SDS-PAGE Laufpuffers..	47
Tabelle 11: Rezept für den Ansatz des Blotpuffers.	48
Tabelle 12: Rezept für den Ansatz des zehnfach konzentrierten TBS, kurz vor Gebrauch 0,1 % Tween20 hinzufügen.	49
Tabelle 13: Rezept für den Ansatz des zwölf-prozentigen Polyacrylamidgels.....	49
Tabelle 14: Rezept für den Ansatz einer zehnfach konzentrierten Tyrode, in der die lyophilisierte Liberase aufgelöst wurde.	51
Tabelle 15: Rezept für den Ansatz von 200 ml PBS-Puffer.....	52
Tabelle 16: Genutzte Antikörper für die Cell-Sorting-Analysen	54
Tabelle 17: Verwendete Antikörper für die gezeigten Immunofluoreszenzfärbungen.....	57
Tabelle 18: Ansatz für Gelatinase-Reaktions-Puffer.	58
Tabelle 19: Übersicht über die untersuchten fibroseassoziierten Gene und die dazugehörigen Proteine.....	75

8 Vorabveröffentlichung der Ergebnisse

Das zugrunde liegende Manuskript für diese Dissertation wurde bereits am 22.08.2021 im International Journal of Molecular Sciences veröffentlicht¹⁴⁹ (<https://www.mdpi.com/1422-0067/22/16/9052>)