

Aus dem Bereich Innere Medizin III  
Klinische und Experimentelle Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/ Saar  
(Prof. Dr. med. U. Laufs)

**Untersuchung des Einflusses  
des Raf-Kinase-Inhibitor-Proteins (RKIP)  
bei kardialem Remodeling und kardialer Fibrogenese**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*  
**der Medizinischen Fakultät**  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2016

vorgelegt von: Timo Meier  
geb. am: 16.04.1991 in Bühl

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ZUSAMMENFASSUNG/ SUMMARY</b> .....	<b>3</b>
2.1. ZUSAMMENFASSUNG .....	3
2.2. SUMMARY.....	4
<b>3. EINFÜHRUNG</b> .....	<b>6</b>
3.1. KARDIALE FIBROSE UND ASSOZIIERTE KRANKHEITSBILDER .....	6
3.1.1. <i>Kardiale Fibrose und Fibrogenese</i> .....	6
3.1.2. <i>Herkunft kardiale Fibroblasten</i> .....	7
3.1.3. <i>Funktionen kardialer Fibroblasten</i> .....	9
3.1.4. <i>Rolle der Fibroblasten bei kardialer Fibrogenese</i> .....	11
3.2. ANALYSE GENETISCHER DETERMINANTEN KARDIALER FIBROSE .....	14
3.2.1. <i>Methodik der Analyse</i> .....	14
3.2.2. <i>Ergebnisse der Analyse</i> .....	15
3.3. DAS RAF-KINASE-INHIBITOR-PROTEIN UND SEINE FUNKTIONEN .....	18
3.3.1. <i>Funktionen des Raf-Kinase-Inhibitor-Proteins</i> .....	18
3.3.2. <i>Regulationen des Raf-Kinase-Inhibitor-Proteins</i> .....	21
<b>4. FRAGESTELLUNGEN</b> .....	<b>23</b>
<b>5. MATERIALIEN UND METHODEN</b> .....	<b>24</b>
5.1. MATERIALIEN.....	24
5.1.1. <i>Versuchstiere</i> .....	24
5.1.2. <i>Chemikalien und Ausgangsstoffe</i> .....	24
5.1.3. <i>Antikörper</i> .....	26
5.1.3.1. <i>Primärantikörper</i> .....	26
5.1.3.2. <i>Sekundärantikörper</i> .....	27
5.1.4. <i>Assay und Kits, Sonden für die Polymerasekettenreaktion</i> .....	28
5.1.5. <i>Medikamente</i> .....	28
5.1.6. <i>Lösungen</i> .....	28
5.1.7. <i>Instrumente und Geräte</i> .....	33
5.1.8. <i>Computer Software</i> .....	35
5.2. METHODEN .....	36
5.2.1. <i>Gruppenaufbau</i> .....	36
5.2.2. <i>Induktion von Ersatzfibrose mittels Aortenligatur</i> .....	36
5.2.3. <i>Induktion von interstitieller Fibrose mittels Tetrachlorkohlenstoff- Behandlung</i> .....	37
5.2.4. <i>Messung der linksventrikulären Druckwerte und des peripheren Blutdruckes</i> .....	38
5.2.5. <i>Histologie</i> .....	38
5.2.5.1. <i>Fixierung</i> .....	38
5.2.5.2. <i>Entparaffinieren</i> .....	38
5.2.5.3. <i>Hämatoxylin Eosin- Färbung</i> .....	39
5.2.5.4. <i>Picro- Sirius- Red- Färbung</i> .....	39
5.2.6. <i>Immunfärbungen</i> .....	40
5.2.6.1. <i>Grundprinzip der Immunfärbungen</i> .....	40
5.2.6.2. <i>Antigendemaskierung</i> .....	40
5.2.6.3. <i>Inkubationen mit Antikörpern und Färbereagenzien</i> .....	40
5.2.6.4. <i>Indirekte Zwei-Schritt-Methode</i> .....	41
5.2.6.5. <i>Streptavidin-Biotin-Methode</i> .....	42
5.2.6.6. <i>Tyramid Amplifikationsmethode</i> .....	42
5.2.6.7. <i>Kontrolle der Immunfärbung</i> .....	43
5.2.7. <i>Detektion von Apoptose</i> .....	44

5.2.8. Präparat Untersuchung und Gewebemorphologie .....	44
5.2.9. Zellkulturexperimente .....	46
5.2.9.1. Fibroblasten Isolation .....	46
5.2.9.2. Kultivierung und Kulturbedingungen.....	47
5.2.9.3. Fibroblastenmigrationsassay .....	47
5.2.9.4. Behandlung der Fibroblasten mit Angiotensin .....	48
5.2.10. Analyse der Genexpression mittels quantitativer Real- Time- Polymerasekettenreaktion ...	48
5.2.10.1. RNA- Isolation.....	48
5.2.10.2. Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion .....	49
5.2.10.3. Quantitative Real- Time- Polymerasekettenreaktion .....	50
5.2.11. Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot.....	50
5.2.11.1. Proteinisolation und Proteinkonzentrations- Messung.....	50
5.2.11.2. Kernextraktion.....	51
5.2.11.3. Gelelektrophorese und Blotten .....	52
5.2.11.4. Blocken und Inkubation mit Antikörpern .....	53
5.2.11.5. Entwickeln .....	53
5.2.11.6. Strippen der Membranen.....	54
5.2.11.7. Auswertung .....	54
5.2.12. Durchflusszytometrie .....	54
5.2.13. Statistik .....	55
<b>6. ERGEBNISSE.....</b>	<b>57</b>
6.1. EINFLUSS DER TRANSAORTALEN KONSTRIKTION UND DER BEHANDLUNG MIT TETRACHLORKOHLENSTOFF AUF DIE EXPRESSION VOM RAF-KINASE-INHIBITOR-PROTEIN .....	57
6.2. EINFLUSS DES RAF-KINASE-INHIBITOR-PROTEIN-DEFIZIENZ AUF DIE HÄMODYNAMISCHEN PARAMETER.....	59
6.3. EINFLUSS DER RAF-KINASE-INHIBITOR-PROTEIN-DEFIZIENZ AUF DIE KARDIALE FIBROSE .....	61
6.3.1. Interstitielle Fibrose.....	61
6.3.2. Ersatzfibrose.....	63
6.3.3. Zirkulierende Fibroblasten und Fibroblastenmigration .....	65
6.3.4. Matrixproduktion der Fibroblasten .....	69
6.4. EINFLUSS DER RAF-KINASE-INHIBITOR-PROTEIN-DEFIZIENZ AUF DAS KARDIALE REMODELING .....	71
6.4.1. Zellproliferation.....	71
6.4.2. Myokardiale und kardiomyozytäre Hypertrophie .....	74
6.4.3. oxidativer Stress .....	76
6.4.4. Apoptose .....	80
<b>7. DISKUSSION.....</b>	<b>82</b>
7.1. SYSTEMISCHE DEFIZIENZ DES RAF-KINASE-INHIBITOR-PROTEINS HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE HÄMODYNAMIK ....	82
7.2. REDUKTION VON SOWOHL INTERSTITIELLER FIBROSE ALS AUCH ERSATZFIBROSE BEI DEFIZIENZ DES RAF-KINASE- INHIBITOR-PROTEINS.....	84
7.3. VERBESSERUNG DES KARDIALEN REMODELINGS BEI DEFIZIENZ DES RAF-KINASE-INHIBITOR-PROTEINS .....	87
7.4. VERMINDERUNG DES OXIDATIVEN STRESSES BEI DEFIZIENZ DES RAF-KINASE-INHIBITOR-PROTEINS .....	90
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>92</b>
<b>9. PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>107</b>
9.1. ORIGINALARBEITEN .....	107
9.2. ABSTRACTS.....	107
<b>10. DANKSAGUNGEN.....</b>	<b>108</b>

# 1. Abkürzungen

Übersicht der verwendeten Abkürzungen:

°C	Grad Celsius
8-OHdG	8-Hydroxyguanosin
A, mA	Ampere, Milliampere
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AF	Atemfrequenz = Anzahl der Atemzüge pro Minute
Aqua dest	destilliertes Wasser
CCl <sub>4</sub>	Tetrachlorkohlenstoff
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CTGF	connective tissue growth factor
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
DDR 2	Discoidin Domain Receptor 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMT	epithelial-mesenchymal transition
EndMT	endothelial-mesenchymal transition
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinases
EZH2	Enhancer von Zeste Homolog 2
FACS	fluorescence-activated cell sorting = Durchflusszytometrie
FGF	fibroblast growth factor
G	Gauge
GPCR	G Protein gekoppelter Rezeptor
GPx	glutathione peroxidase
GRK2	G Protein gekoppelten Rezeptor Kinase 2
GSK 3β	Glykogen Synthase Kinase 3 β
GST	glutathione-S-transferases
h, min, s	Stunde(n), Minute(n), Sekunde(n)
H <sub>2</sub> O	Wasser (Leitungswasser)
HE	Hämatoxylin Eosin
HMGA2	High-mobility group AT-hook 2
HO-1	heme oxygenase-1
i.p.	intraperitoneal
IKK	Inhibitor κB Kinase
IκB	Inhibitor κB
kDa	kilo Dalton
KG	Körpergewicht
kg, g, mg, µg, ng	Kilogramm, Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
l, dl, cl, ml, µl, nl	Liter, Deziliter, Zentiliter, Milliliter, Mikroliter, Nanoliter
L-NAME	L-N <sup>G</sup> -nitroarginine methyl ester
Lox	Lysyloxidase
LV	linker Ventrikel
m, dm, cm, mm, µm, nm	Meter, Dezimeter, Zentimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer
M, mM	Molar, Millimolar
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
mda-9	Melanoma differentiation associated gene-9
MEK = MAPKK	mitogen-activated protein kinase kinase

mir	micro-RNA
Mm.	Musculi
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
NF-κB	nukleärer Faktor κB
NIK	NFκB-inducing kinase
Nrf-2	Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2
PCR	Polymerase Chain Reaction = Polymerasekettenreaktion
PDGF	platelet derived growth factor
PDGFRA	Alpha-type Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PEBP	Phosphatidylethanolamin-binding protein
PKC	Protein Kinase C
p-MAP-Kinase	phospho- Mitogen activated Protein-Kinase
pRKIP	phospho- Raf-Kinase-Inhibitor-Protein
QTL	quantitative trait loci
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
RKIP	Raf-Kinase-Inhibitor-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
SDF-1	stromal derived factor 1
SHAM	SHAM- Operation = Placebo Operation
SOD	superoxide dismutase
TAC	Transaortale Konstriktion
TAK-1	transforming growth factor B-activated kinase-1
TGF	transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
VEGF	vascular endothelial growth factor
WT	Wildtype
α-SMA	alpha-smooth muscle actin

## 2. Zusammenfassung/ Summary

### 2.1. Zusammenfassung

#### **Raf Kinase Inhibitor Protein reguliert kardiale Fibrose**

Die zugrundeliegenden zellulären und molekularen Mechanismen der kardialen Fibrogenese sind erst teilweise verstanden. Deshalb wurde nach unbekanntem genetischen Risikofaktoren der Herzfibrose gesucht. Dies geschah mit Hilfe einer quantitativen Trait Loci (QTL) Analyse in 26 experimentellen Kreuzungen von rekombinanten Inzuchtmausstämmen der Mausstämmen C57BL/6J und DBA/2J.

Um eine kardiale und systemische Fibrose zu induzieren, wurden 26 BXD Linien für sechs Wochen mit CCl<sub>4</sub> (Tetrachlorkohlenstoff) behandelt. Durch Zuordnung der QTL-Analysen zu der Quantifizierung der kardialen Fibrose wurde nach möglichen Kandidatengen gesucht. Auf diese Weise wurde RKIP (Raf Kinase Inhibitor Protein) als genetischer Marker der Fibrogenese identifiziert.

Der Kollagengehalt im linken Ventrikel der BXD Linien korrelierte mit der linksventrikulären RKIP mRNA Expression ( $R=0,34$ ;  $p=0,02$ ). Daher untersuchten wir den Einfluss einer RKIP-Defizienz in zwei Modellen kardialer Fibrose: Interstitielle, durch CCl<sub>4</sub>-induzierte, kardiale Fibrose und Ersatzfibrose nach Aortenligatur. Dafür wurden zehn Wochen alte C57/Bl6N Wildtype (WT) und C57/Bl6N-RKIP-defiziente (RKIP<sup>-/-</sup>) Mäuse einer transversen aortalen Konstriktion (TAC, 360µm) für fünf Wochen, oder CCl<sub>4</sub>-Behandlung (0,7mg CCl<sub>4</sub> pro kg Körpergewicht, zwei Mal pro Woche intraperitoneal) unterzogen. SHAM-operierte und unbehandelte Tiere dienten als Kontrolle.

In beiden Modellen reduzierte der RKIP-Knockout das myokardiale Kollagen sowie die mRNA-Expression von Kollagen Iα2 und verbesserte die Fibroblastendichte im LV. Darüber hinaus wiesen die CCl<sub>4</sub>-behandelten RKIP<sup>-/-</sup> Mäuse eine verminderte Fibroblastenproliferation und eine reduzierte mRNA-Expression von TNFα im LV-Myokard auf. Der Anteil von zirkulierenden Fibroblasten im peripheren Blut, Knochenmark und linksventrikulären Myokard war bei den RKIP<sup>-/-</sup> TAC Mäusen signifikant vermindert. RKIP-defiziente adulte kardiale Fibroblasten zeig-

ten eine verminderte Migration in der modifizierten Boyden-Kammer. RKIP-Defizienz verbesserte die myokardiale Kapillarisation, verminderte die Apoptoserate der Kardiomyozyten in beiden Modellen und reduzierte kardiale und kardiomyozytäre Hypertrophie bei TAC. RKIP<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten eine Reduktion des oxidativen Stresses, gemessen mittels der Immunfärbung für 8-Hydroxyguanosin und eine erhöhte nukleare Proteinexpression von Nrf-2 bei erhöhter Nachlast.

Zusammenfassend identifizieren die Daten RKIP als Mediator der myokardialen Fibrose in C57/Bl6N Mäusen. Eine systemische RKIP Defizienz vermindert die kardiale Fibrose, die myokardiale Hypertrophie, den oxidativen Stress sowie die Apoptose und vermehrt die Kapillarisation.

## 2.2. Summary

### **Raf kinase inhibitor protein regulates cardiac fibrosis**

Genetic determinants of cardiac fibrogenesis are still not completely understood. A QTL (quantitative trait loci) analysis in recombinant inbred BXD mouse lines and a subsequent characterization of the identified target were applied to identify novel regulators of myocardial fibrosis.

For a genome-wide QTL analysis, 26 BXD lines representing a genetically mosaic genetic reference population were treated with CCl<sub>4</sub> to induce cardiac and systemic fibrosis. The cardiac QTLs linked to the collagen accumulation were screened for potential candidates. RKIP (Raf Kinase Inhibitor Protein) was identified as a genetic marker for the individual fibrosis progression. The cardiac fibrosis in the LV (left ventricle) of BXD lines assessed through a picrosirius red staining correlated positively with LV RKIP mRNA ( $R=0.4$ ;  $p=0.05$ ). To further investigate the influence of systemic RKIP-knockout on cardiac remodeling in two models of cardiac fibrosis, 10-week-old C57/Bl6N wildtype (WT) and C57Bl/6N-RKIP-deficient mice (RKIP<sup>-/-</sup>) were subjected to transverse aortic constriction (TAC, 360  $\mu$ m) to induce replacement fibrosis or treatment with CCl<sub>4</sub> for 6 weeks to induce interstitial fibrosis. Sham-operated or untreated mice served as controls (n=9-10 per group).

Systemic RKIP-deficiency reduced the cardiac collagen content as well as the mRNA-expression of collagen I $\alpha$ 2 and ameliorated the fibroblast density in LV in both models. CCl<sub>4</sub> RKIP<sup>-/-</sup> mice demonstrated a reduced fibroblast proliferation and mRNA-expression of TNF $\alpha$  in LV-myocardium. The numbers of the circulating fibroblasts in the peripheral blood, the bone marrow and the LV-myocardium were reduced in the RKIP<sup>-/-</sup> TAC mice. RKIP deficient adult cardiac fibroblasts demonstrated a reduced migration capacity in the modified Boyden chamber. RKIP-knockout ameliorated the myocardial capillarization, diminished the apoptotic rate in cardiomyocytes in both models and reduced the cardiomyocyte and the cardiac hypertrophy in pressure overload. RKIP<sup>-/-</sup> mice revealed a reduced myocardial oxidative stress evaluated by immunostaining for 8-hydroxyguanosine and an increased nuclear expression of Nrf2 in the pressure-overloaded myocardium.

In conclusion, systemic deficiency of raf kinase inhibitor protein in C57/Bl6N mice ameliorates the maladaptive cardiac remodeling by reduction of the fibrosis, the hypertrophy, the oxidative stress, the apoptosis and increase of the capillarization.

## **3. Einführung**

### **3.1. Kardiale Fibrose und assoziierte Krankheitsbilder**

Die Herzinsuffizienz hat sich zu einem wichtigen Krankheitsbild des 21. Jahrhunderts entwickelt. [1, 2] Als Herzinsuffizienz wird ein pathologischer Zustand des Myokards bezeichnet, bei dem die Auswurfleistung des Herzens nicht ausreicht um den Körper mit genügend Blut für die metabolischen Vorgänge im Zellstoffwechsel zu versorgen. [3]

In Deutschland waren 2013 ca. 40% der Todesfälle auf kardiovaskuläre Ursachen zurückzuführen. Die Herzinsuffizienz trägt mit 13% aller kardiovaskulären Todesfälle einen nicht unerheblichen Anteil dazu bei. [4] Die Prävalenz und Inzidenz der Herzinsuffizienz sind altersabhängig: Während bei den 45 bis 55 Jährigen nur 1% an einer Herzinsuffizienz leiden, erhöht sich diese Zahl bei den 65 bis 75 Jährigen auf 2-5% und betrifft bei den über 80 Jährigen nahezu 10% der Bevölkerung. [2, 3, 5, 6, 7] Sowohl in den Vereinten Nationen als auch in Europa repräsentiert die Herzinsuffizienz 1-2% aller Krankenhauseinweisungen, was sie zum häufigsten Grund einer Hospitalisierung bei den über 65 Jährigen macht. [8]

#### **3.1.1. Kardiale Fibrose und Fibrogenese**

Das gesunde Herz setzt sich – bezogen auf die Gesamtmasse – aus 76% myozytärem sowie 24% nichtmyozytärem, interstitiellem Gewebekompartiment zusammen. Letzteres lässt sich weiter differenzieren in 59% Gefäßanteil sowie das kardiale Bindegewebe mit 4% Kollagen, 8% Fibroblasten und 29% Grundsubstanz. [9] Betrachtet man den Aufbau des Herzens bezüglich der Zellzahl, so stellt sich heraus, dass myozytären Zellen nur 30% der Zellpopulation ausmachen und die nichtmyozytären Zellen mit 70% den Hauptanteil der kardialen Zellen stellen. Die häufigste Zelle im Myokard ist dabei der Fibroblast. [10]

Als generelles Reaktionsmuster auf chronische Organschädigungen unterschiedlicher Ätiologie kommt es im Endstadium des Gewebeumbaus zu einer Fibrose. Diese ist durch die Vermehrung von Fibroblasten gekennzeichnet, welche abnorm und exzessiv extrazelluläre Matrix produzieren. [11, 12] Auch im

Herzen treten infolge verschiedener Erkrankungen wie Herzinsuffizienz, Myokardhypertrophie, koronarer Herzkrankheit, Kardiomyopathien, Vorhofflimmern und durch Noxen, wie zum Beispiel Alkohol und Antracycline, maladaptive atriale und ventrikuläre Remodelingprozesse auf. Dabei spielen drei morphologische Typen der Fibrose eine Rolle, welche isoliert und in Kombination auftreten können: die interstitielle Fibrose, die perivaskuläre Fibrose und die reparative Ersatzfibrose. [13, 14] Die Ersatzfibrose entwickelt sich als reparative Fibrose am Ort einer Nekrose wie beispielsweise in einem Infarktareal. Bei der reaktiven Fibrose handelt es sich meist um eine diffuse Fibrose, welche sich disproportional zur Myozytenhypertrophie entwickeln kann. [9, 15, 16, 17, 11]

Mechanistisch erklärt sich die Fibrogenese im Myokard über eine Akkumulation von Fibroblasten mit vermehrter, exzessiver Synthese von extrazellulärer Matrix, welche dann – durch die Änderung der Organarchitektur – letztendlich zu einer Funktionseinschränkung des Herzens führt. [11, 12] Diese Funktionseinschränkung begründet sich zum einen über eine zunehmende Steifigkeit des Myokards, welche zu systolischen sowie diastolischen Funktionsverlusten führt [18] und zum anderen über die Störung der elektromechanischen Koppelung zwischen den einzelnen Kardiomyozyten, welche zu Arrhythmien führen kann. Eine ausgeprägte kardiale Fibrose reduziert also die Anzahl von Kardiomyozyten, erhöht die Steifigkeit des Myokards und führt so zu systolischer sowie diastolischer Herzinsuffizienz. [11, 19, 20]

In Tiermodellen der nachlastinduzierten Hypertrophie durch TAC (transaortale Konstriktion) zeigt sich nach einer anfänglichen Phase der diffusen, reaktiven Fibrose ein Übergang in eine reparative Fibrose, welche sich aufgrund zunehmender Apoptose und Nekrose der Kardiomyozyten nach Hypertrophie ergibt. [11, 21]

### **3.1.2. Herkunft kardiale Fibroblasten**

Wesentlicher Bestandteil der Fibrogenese sind die beteiligten Zellen, die Fibroblasten. Die Fibroblastenpopulation im Herzen ist nicht homogen. Bei Fibroblasten handelt es sich um Zellen mesenchymalen Ursprunges, die neben den extrazellulären Matrixproteinen auch viele biochemische Mediatoren, wie zum

Beispiel Wachstumsfaktoren und Proteasen synthetisieren und damit eine wichtige Rolle für Aufbau und Funktion des Herzens spielen. [22] Die Differenzierung in kardiale Fibroblasten geschieht unter anderem getriggert über PDGF [23]. Residierende intrakardiale Fibroblasten entstehen während der embryonalen Entwicklung hauptsächlich aus endothelialen und epikardialen Zellen. Einige dieser Zellen weisen eine neuronale oder hämatopoetische Herkunft auf. Im adulten Myokard exprimieren residierende Fibroblasten DDR 2 (Discoidin Domain Receptor 2), Kollagen I und PDGFRA (Alpha-type Platelet-Derived Growth Factor Receptor). Sie sind dabei keineswegs lokal verankert, sondern zeichnen sich auch durch eine Migrationskapazität aus, welche sich durch den Gehalt an Aktin und Myosin begründet. [24]

Während der embryonalen Entwicklung sowie auch im Rahmen der Fibrogenese als Reaktionsmuster auf chronische Organschädigung gibt es verschiedene Ursprungsmöglichkeiten der kardialen Fibroblasten (vgl. Abb. 1A):

Die Zellen des Interstitiums sowie des Annulus fibrosus entstammen den mesenchymalen Zellen des embryologischen Proepikardes [25] und entwickeln sich durch eine EMT (epithelial-mesenchymale Transition) [26], die durch verschiedene Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel FGF (fibroblast growth factor), PDGF (platelet derived growth factor) und TGF (transforming growth factor) getriggert wird [27]. Die Fibroblasten, die das bindegewebige Gerüst der Herzklappen formen, haben ihren Ursprung im kardialen Endothel. [28] Sie entstehen über EndMT (endothelial-mesenchymale Transition) aus den Zellen des Endokardkissens, hierbei spielen primär TGF- $\beta$ , PDGF und Wnt eine Rolle. [28, 29] Auch die perivaskuläre Zellen, wie zum Beispiel Perizyten, sind eine Quelle für Fibroblasten im kardialen Verbund. Perizyten sind perivaskuläre Zellen mesenchymalen Ursprunges, welche direkt mit endothelialen Zellen kommunizieren. [10, 11, 30] Als weiterer Ursprungsort der Fibroblasten kommt das hämatopoetische System in Betracht. Neben Makrophagen kommen vor allem monozytäre Zellen und deren aus dem Knochenmark entstandenen Progenitorzellen als Quelle für Fibroblasten in Betracht. [10, 31] Immer größere Bedeutung kommt den aus dem Knochenmark entstandenen Fibroblasten, den sogenannten Fibrozyten zu. Sie scheinen vor allem im Rahmen von reaktiven und reparativen fibrotischen Um-

bauprozessen eine wichtige Rolle zu spielen. Fibrozyten sind Zellen mesenchymalen Ursprunges und zeigen morphologische und molekulare Ähnlichkeiten zu sowohl hämatopoetischen Stammzellen als auch zu monozytären Zellen und Fibroblasten. [22, 32, 33]

Zahlreiche klinische und experimentelle Daten weisen darauf hin, dass neben den residierenden intrakardialen Fibroblasten vor allem auch diese zirkulierende, dem Knochenmark entstammende Fibroblasten (Fibrozyten) an der Fibrogenese beteiligt sind [34]. Diese Zellen exprimieren hämatopoetische Marker und Chemokinrezeptoren (CXCR4, CCR2, CCR7, CCR3, CCR5). Ihre Migration in verschiedene Organe wird durch spezifische Liganden, z.B. MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), CCL19, CCL21, CXCL12/SDF-1 und RANTES vermittelt. Die Fibrozyten unterscheiden sich von residenten Fibroblasten unter anderem durch ihre Fähigkeit, verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix zu produzieren und zu degradieren. Für Fibrozyten konnte gezeigt werden, dass sie zwar in der fibrotischen Frühreaktion 25-60% der Fibroblasten ausmachen können. Später allerdings, wenn eine persistierende fibrotische Reaktion vorliegt, ist die Anzahl der im Knochenmark entstandenen Fibroblasten, die zur fibrotischen Reaktion im Myokard beitragen, reduziert. [35, 32, 33]

Durch diese Erkenntnisse ergibt sich eine große Heterogenität in der Zellgruppe der Fibroblasten, welche sich unter anderem durch deren verschiedenen Ursprünge erklärt und die Vielfalt der kardialen Struktur mitbegründet. [11]

### **3.1.3. Funktionen kardialer Fibroblasten**

Um die Mechanismen und Funktionen der Fibroblasten im Rahmen der kardialen Fibrogenese genauer zu beleuchten, ist es von Nöten die Funktionen der kardialen Fibroblasten im physiologischen Zustand des Herzens zu kennen (vgl. Abb. 1B):

Hierzu gehört unter anderem der Erhalt der Homöostase der extrazellulären Matrix durch die Synthese von interstitiellem Kollagen, Glykoproteinen und Proteasen, sodass sich ein organisiertes extrazelluläres Netzwerk ergibt, welches letztendlich den Kardiomyozyten als Gerüst dient. [11] Die Synthese der einzelnen Komponenten der extrazellulären Matrix erfolgt dabei nach Stimulation über

verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine zum einen bzw. über mechanische Stimuli wie zum Beispiel Dehnung zum anderen. [11, 36, 37] Die wichtigsten Bestandteile der extrazellulären Matrix bilden neben ca. 90% Kollagen (vor allem Typ I und Typ III) auch Elastin und Laminin [38]. Insbesondere für die Vernetzung von Kollagen und Elastin ist dabei die Lox (Lysyloxidase) verantwortlich [39, 40], welche ihrerseits wiederum durch bioaktive Moleküle der Fibroblasten reguliert wird. Bei Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie konnte eine Induktion der Lox gezeigt werden. [41]

Auch die Degradation der extrazellulären Matrix über die Matrix Metalloproteinasen (zum Beispiel MMP-1 und MMP-13) und deren Inhibitoren wird durch die Fibroblasten moduliert. [42] Bei der Homöostase der extrazellulären Matrix kommt den eben erwähnten Metalloproteinasen eine wichtige Rolle zu. Die Funktion ausführlich zu beschreiben, würde den Rahmen dieses Kapitels sprengen, daher bleibt nur kurz zu erwähnen: Die Metalloproteinasen selbst können extrazelluläre Matrix degradieren, während demzufolge über die Inhibitoren der Metalloproteinasen (genauer: tissue inhibitors of metalloproteinases) eine Degradation verhindert wird. [43] Das Verhältnis zwischen Metalloproteinasen und entsprechenden Inhibitoren ist essentiell für die Homöostase der extrazellulären Matrix im Myokard. [44] Die Tatsache, dass Fibroblasten sowohl die Metalloproteinasen selbst, als auch ihre Inhibitoren regulieren, unterstreicht noch einmal ihre wichtige Rolle im Aufbau der extrazellulären Matrix. Die Regulation findet dabei in beide Richtungen statt, das heißt auch die Metalloproteinasen können über spezifische Mechanismen die Funktion der Fibroblasten regulieren. [43]

Eben dieses Gerüst der extrazellulären Matrix ist auch unabdingbar für die elektrische Reizleitung im Myokard, da so spezifische Areale elektrisch separiert werden können. Dadurch und auch durch die elektrische Koppelung zwischen Kardiomyozyten und Fibroblasten begründet sich der Wert der Fibroblasten für die funktionsfähige Reizleitung im Herzen. [11, 45]

Fibroblasten spielen auch eine große Rolle in der Produktion von bioaktiven Molekülen. Durch die Synthese von Wachstumsfaktoren und Zytokinen sowie andere auto- und parakrine Faktoren modulieren sie entscheidend Zellproliferation

und Apoptose im Myokard. Zu den Sekretionsprodukten gehören dabei beispielsweise TNF- $\alpha$ , Angiotensin II und TGF- $\beta$ . [10, 11]

Außerdem produzieren kardiale Fibroblasten Mitogene, die eine Rolle für die Entwicklung der Kardiomyozyten spielen. Auch wenn lange davon ausgegangen wurde, dass Kardiomyozyten ausdifferenziert wären, konnte gezeigt werden, dass eine langsame Proliferation stattfindet [46], welche von Fibroblasten getriggert wird; hierbei sind vor allem FGF und Periostin wichtige Faktoren [47, 48].

Auch bei der Regulation der kardialen Angiogenese erfüllen Fibroblasten eine wichtige Funktion. Über die Sekretion von VEGF (vascular endothelial growth factor) und FGF sind sie potente Stimulatoren der Neoangiogenese [49, 50] und können gegensinnig über die Sekretion von CTGF (connective tissue growth factor) und PDGF antiangiogenetisch wirksam sein [49, 51].

#### **3.1.4. Rolle der Fibroblasten bei kardialer Fibrogenese**

Verschiedene biologisch aktive Substanzen regulieren die Funktion von Fibroblasten. Diese Funktionen sind im wesentlichen Matrixproduktion, Proliferation und Migration. Während des physiologischen Herzzustandes sezernieren kardiale Fibroblasten keine großen Mengen an Matrixproteinen [52, 53] und weisen auch keine Aktin-assoziierten Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Kontakte auf [54]. Kommt es nun aber zu kardialen Verletzungen so werden durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel TGF- $\beta$  und ED A Fibronectin, Veränderungen der kardialen Matrix induziert. Unabhängig von der Ätiologie des fibrotischen Umbaus kommt es dabei auch zu einer Differenzierung der Fibroblasten in zum Beispiel Myofibroblasten [14], welche primär durch TGF- $\beta$ 1 bedingt ist [55]. Myofibroblasten zeichnen sich dabei dadurch aus, dass sie kontraktile Proteinen wie Aktin, Myosin und  $\alpha$ -SMA (alpha-smooth muscle actin) exprimieren [11] und nur in einer pathologischen kardialen Situation vorgefunden werden können [43, 56]. Sie spielen vor allem bei der reparativen Ersatzfibrose eine entscheidende Rolle. [57]

Bei Hochdruckherzen kommt als weiterer Stimulus für kardiales Remodeling vor allem der Katecholaminexzess in Betracht. [58, 59] Auch die viszerale Adipozy-

ten spielen eine entscheidende Rolle. Letztere setzen dabei unter anderem proinflammatorische Zytokine wie TNF  $\alpha$  (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ) frei, welche dann wiederum zu einer gesteigerten Fibrogenese führen [15, 16] und gleichsinnig auch die Degradation von Kollagen inhibieren [60].

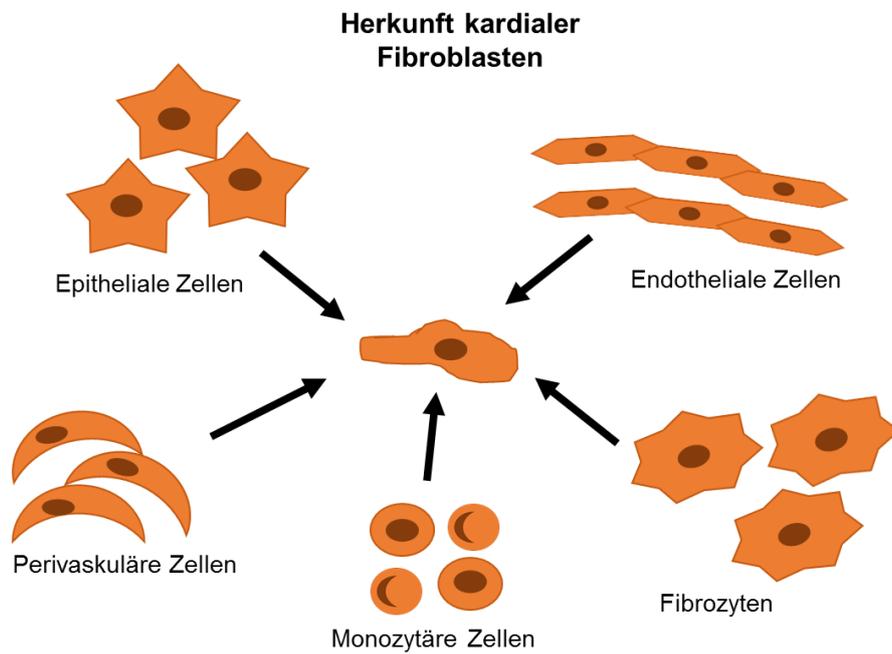
Auch der schon angesprochene Katecholaminexzess stimuliert – neben der Aggravation einer Hypertonie – proinflammatorische Prozesse. [9] Außerdem wird durch die gesteigerte Reninsynthese Angiotensin II gebildet, welches wiederum zu einem ungünstigen kardialen und vaskulären Remodeling führt. [9] Angiotensin II wird aber nicht nur durch das ACE (Angiotensin Converting Enzyme) aus Angiotensin I gebildet, sondern auch durch Chymasen und Mastzellen, vor allem in atherosklerotischen Gefäßen und ist dort hochwirksam auf das lokale Remodeling in Form von Fibrose und Hypertrophie. [61]

Neben inflammatorischen und hämodynamischen Ursachen sollten aber auch andere Ursachen einer kardialen Fibrogenese beachtet werden. So konnte schon in zahlreichen Tierversuchen gezeigt werden, dass bei nachlastinduzierter Hypertrophie im Ventrikel vermehrt Apoptose auftritt. Diese Apoptose wiederum führt zu einer Ersatzfibrose. [11, 21, 62] Auch hierfür werden vor allem inflammatorische Signalkaskaden [63] sowie TGF- $\beta$  [64] verantwortlich gemacht.

Zusammenfassend ergibt sich aus diesem Kapitel, dass kardiale Fibrose integraler Bestandteil einer Vielzahl von kardialen und systemischen Krankheiten ist und somit große Beachtung verdient. Der zelluläre Hauptmediator der maladapten Remodelingvorgänge in Form von Fibrose ist der Fibroblast. Diese sehr heterogene Zellpopulation trägt – wie oben dargelegt – einen großen Teil zur fibrotischen Reaktion auf verschiedenste ätiologische Stimuli bei und stellt somit einen wichtigen Kandidaten für die Erforschung der Fibrose dar.

Abbildung 1

A



B

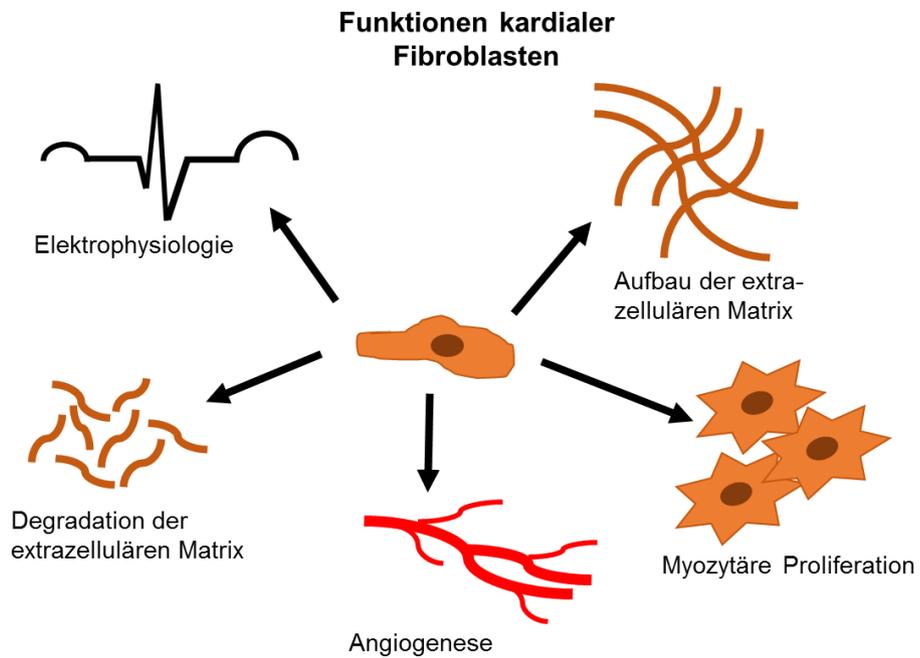


Abbildung 1- Fibroblasten

## **3.2. Analyse genetischer Determinanten kardialer Fibrose**

Diese Dissertation entstand im Rahmen des Teilprojektes 10 „Identifizierung und Charakterisierung von zellulären Mechanismen und genetischen Determinanten der kardialen und systemischen Fibrogenese“, in der DFG- geförderten klinischen Forschergruppe „Signaltransduktion bei adaptiven und maladaptiven kardialen Remodeling-Prozessen“. [65]

### **3.2.1. Methodik der Analyse**

Im Rahmen des Teilprojektes wurden genetische Faktoren, sogenannte quantitative trait loci (QTL), eruiert, die individuell variabel die Progression der Fibrose determinieren. Studienhypothese hierbei war, dass kardiale und systemische Fibrogenese sowohl gemeinsame als auch unterschiedliche (gewebsspezifische) zelluläre Mechanismen der Fibroseentstehung zeigen. Diese wurden mittels der qualitativen und quantitativen Analyse verschiedener kardialer Fibrosemodelle erforscht. Zudem wurden die zentralen profibrogenen Signalwege durch eine simultane QTL-Analyse der kardialen und hepatischen Fibrogenese in rekombinanten Mausinzuchtlinien identifiziert. [66]

Durch die Etablierung von Inzuchtmausmodellen und entsprechende Genomanalysen können unbekannte genetische Risikofaktoren (Suszeptibilitätsgene) identifiziert werden. [67, 68] Durch die Benutzung von Inzuchtmausmodellen ergibt sich der Vorteil einer genetischen Diversität bei kontrollierten Umweltfaktoren. Die Inzuchtmausstämme werden dabei durch Bruder-Schwester-Verpaarungen über mehr als zwanzig Generationen erzeugt, sodass sich für alle Allele eine Homozygotie ergibt. Unbekannte, krankheitsrelevante Gene können dann durch Kreuzung suszeptibler und resistenter Stämme mit Hilfe der QTL-Analyse identifiziert werden. [67, 68] Methodisch spielt dabei die Quantität der Variante eines genetischen Markers in der Nähe eines Suszeptibilitätsgenes in einem QTL eine Rolle. Erkrankte Nachkommen weisen nämlich häufiger dieselbe Variante diesen Markers auf. Wenngleich diese Risikogene zunächst nur im Mausmodell erforscht sind, konnte bezüglich einiger Determinanten schon in translationalen

Studien gezeigt werden, dass die im Mausmodell relevanten Gene (z.B. Komplementfaktor C5a und das Interferon-induzierbare Chemokin CXCL9) auch bei humanen Individuen Determinanten der Fibrogenese darstellen. [69, 70]

Als rekombinante Inzuchtlinie wurde dabei das BXD-Panel verwendet, das aus den Mausstämmen C57BL/6J und DBA2/2J generiert wurde (vgl. Abb. 2A). [71] Für die Phänotypisierung verfügbar waren zu Projektbeginn achtzig verschiedene BXD-Linien, die vom Wellcome Trust [72] für über dreizehntausend Marker genomweit typisiert wurden. [73]

### 3.2.2. Ergebnisse der Analyse

Nach Induktion einer chemisch-toxischen Fibrose mittels Tetrachlorkohlenstoff (CCl<sub>4</sub>) konnte beobachtet werden, dass die Fibrose in den einzelnen BXD-Linien genetisch determiniert unterschiedlich stark ausgeprägt war. Außerdem zeigten sich signifikante Korrelation zwischen kardialer und hepatischer Kollagenakkumulation. DBA/2 Inzuchtmäuse zeigten dabei sowohl in der Leber als auch interstitiell im Herz stärker ausgeprägte Fibrose als Vergleichstiere der C57BL/6J-Linie. [66]

Nun wurde bei sechsundzwanzig rekombinanten Inzuchtlinien aus dem BXD-Panel, welches über Kooperationen mit dem virtuellen Helmholtz-Zentrum für Systemgenetik [74] und dem europäischen Netzwerk für Systemgenetik [75] zur Verfügung stand, mittels CCl<sub>4</sub> eine chemisch-toxische Fibrose in Herz und Leber erzeugt. Über Analysen der Fibrosephänotypen mit den genomweit vom Wellcome Trust [72] bestimmten BXD-Genotypen konnte Genloci identifiziert werden, die cis (ausschließlich Regulation der Gene im selben DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Molekül) oder trans (auch Regulation von Genen auf anderen DNA-Molekülen) regulatorisch die Fibrosephänotypen modulieren. So konnten, durch Vergleich mit Genloci andere Organfibrosen, kardiospezifische oder organübergreifende Determinanten identifiziert werden. [66]

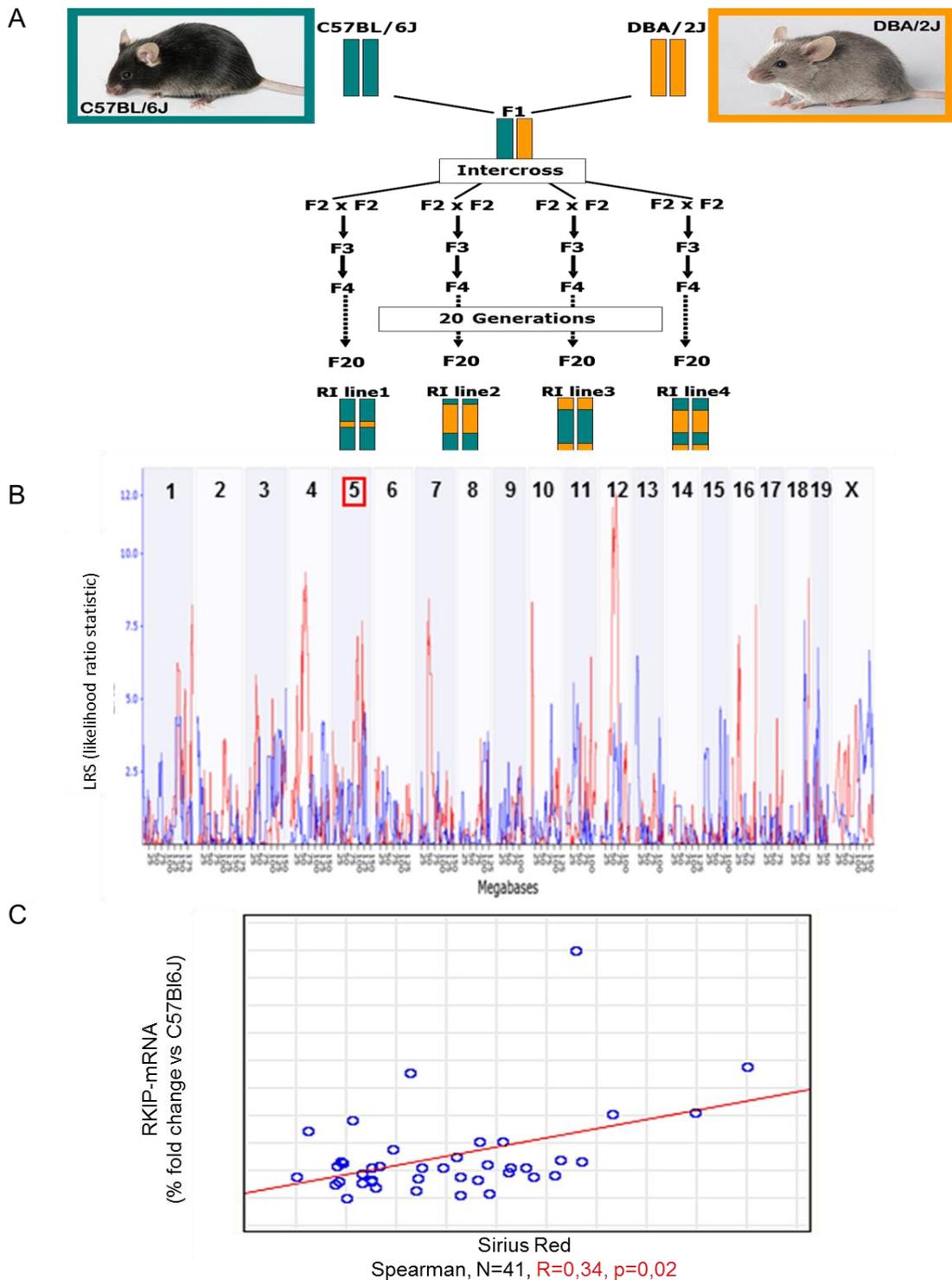
Die eQTL-Analyse nach cis-regulierten Gene bei sechsundzwanzig untersuchten BXD-Linien mit ausgeprägter Herz- und Leberfibrose (vgl. Abb. 2B) ergab folgende Gene, die eine individuelle Progression der Fibrose determinieren können

ten: Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP), Afamin (Afm), Napsin A aspartic peptidase (Napsa), Sushi domain containing 1 (Susd1) und Riboflavin kinase (Rfk). Nach Studium der aktuellen Literatur stellte sich RKIP als vielversprechendster Kandidat der Regulation von kardialem Remodeling heraus. [76, 77, 78, 79, 80] So wird die Familie der Raf (rapidly accelerated fibrosarcoma)-Proteine (welche von RKIP gehemmt wird) als essentiell für kardiomyozytäres Überleben und die kardiomyozytäre Entwicklung beschrieben. [80] Außerdem konnte schon gezeigt werden, dass Raf-Mutationen eine Rolle in der kindlichen dilatativen Kardiomyopathie spielen. So ergibt sich eine neunprozentige Prävalenz für Raf-Mutationen bei der kindlichen dilatativen Kardiomyopathie. Es konnte gezeigt werden, dass dilatativen Kardiomyopathie- assoziierte Raf1 Mutationen eine veränderte Aktivität der Kinasen zeigt, welche zur Folge hat, dass die ERK Aktivität größtenteils unverändert bleibt, während AKT durch die Mutation überaktiv war. [81] Ein integraler Bestandteil der Pathogenese der Kardiomyopathie ist hierbei also der Raf-MEK-MAPK-Signalweg [82]. Außerdem konnten auch Zusammenhänge zwischen dem kardio-fazio-kutanen Syndrom und Mutationen des MAPK- Signalweges gezeigt werden [83, 84].

Nach Identifikation von RKIP als mögliches Suszeptibilitätsgen für Fibrose, konnte eine Korrelation zwischen RKIP-Expression und Kollagengehalt (vgl. Abb. 2C) gezeigt werden. Neben CCl<sub>4</sub> als Induktor einer chemisch-toxischen Fibrose, wurde dann mit einer TAC ein weiteres Studiendesign für Fibrogenese eingeführt.

Als Fazit des Kapitels ergibt sich also, dass es wichtig ist individuelle Mechanismen und Signaltransduktionswege der Fibroseprogression zu erforschen. Nach den Vorarbeiten ergab sich mit dem Raf-Kinase-Inhibitor-Protein ein neues Suszeptibilitätsgen kardialer Fibrogenese. Die veröffentlichten Forschungsergebnisse, die eine Beteiligung des Raf-MEK-MAPK-Signalweges an Pathologien des kardialen Systems suggerieren sowie die positive Korrelation zwischen der RKIP-mRNA und dem Kollagengehalt untermauern somit die Wichtigkeit die Rolle von RKIP in der Progression kardialer und systemischer Fibrose weiter zu erforschen.

## Abbildung 2



### Abbildung 2- Analyse genetischer Determinanten kardialer Fibrose

(A) Generierung der BXD- Linien

(B) Kopplungsanalysen zwischen Herz (blau) und Leber (rot). Auf der Abszisse sind die genetischen Loci aufgetragen. Die Ordinate zeigt den LRS-Wert, als Maß für die Wahrscheinlichkeit einer Assoziation zwischen Merkmal und genetischem Locus.

(C) Korrelation zwischen RKIP- Expression (gemessen anhand der mRNA) und Fibrose (gemessen mit Hilfe einer Sirius Red Färbung)

### **3.3. Das Raf-Kinase-Inhibitor-Protein und seine Funktionen**

RKIP gehört zur Familie der Phosphatidylethanolamin-binding proteins (PEBP) und trägt daher auch den Namen PEBP-1. Neben PEBP-1 sind in der Literatur für RKIP auch die Namen HCNP, Neuropolypeptide h3 und Prostatic-binding protein beschrieben. Zur Superfamilie der PEBP gehören neben RKIP noch über vierhundert weitere Proteine, die in verschiedenen Spezies vorkommen. [85, 86] Starke Expression von RKIP zeigen vor allem das Nervensystem sowie die Nebennieren und die Schilddrüse, während RKIP im Herz eher weniger stark exprimiert wird. [87] Aufgrund zahlreicher Interaktionen mit nukleären Vorgängen, kann RKIP auch im Nucleus verstärkt nachgewiesen werden. [88]

Das aus vier Exons und drei Introns bestehende 9728 Basenpaare lange Gen, welches für RKIP kodiert, findet sich auf dem Chromosom 12q24.23. Das Protein, welches in nahezu allen Gewebearten exprimiert wird, hat eine Masse zwischen 21 und 23kDa, die sich aus insgesamt 186 Aminosäuren ergibt. [77]

Durch Interaktionen mit verschiedensten Signalkaskaden kommen RKIP Rollen in der Pathogenese verschiedener Krankheiten zu. Auch wenn heute die genauen Mechanismen noch nicht komplett verstanden sind, konnte schon gezeigt werden, dass eine Dysregulation von RKIP eine Rolle bei Erkrankungen wie Asthma [89], Systemischen Inflammations Respons Syndrom [90], diabetischer Neuropathie [91], Helicobacter pylori assoziierter Gastritis [92] sowie einigen Herzerkrankungen [93] und Alzheimer [94] zuteilwird. [95] Größte Beachtung in der aktuellen Forschung erhält RKIP jedoch vor allem im Rahmen der Onkologie, vor allem bei der Entstehung von Metastasen kommt RKIP eine große Rolle zu. [95] Hauptinteresse der aktuellen Studien ist dabei das Potential von RKIP als natürlicher Suppressor des metastatischen Prozesses. [79, 96]

#### **3.3.1. Funktionen des Raf-Kinase-Inhibitor-Proteins**

Betrachtet man die Funktionen und Interaktionen von RKIP, wird schnell klar, dass der Begriff „Raf Kinase Inhibitor Protein“ der Funktion von RKIP nicht gerecht wird. Im Folgenden sollen die wichtigsten Regulationswege, bei denen RKIP eine Rolle spielt, kurz beleuchtet werden:

RKIP ist ein Inhibitor von Raf-1 und moduliert somit den Raf-MEK (mitogen-activated protein kinase kinase) -MAPK (mitogen-activated protein kinase) Signalweg, welcher für zelluläre Proliferation, Differenzierung, Migration sowie Apoptose wichtig ist. [97, 98, 99] Eine Dysregulation dieses essentiellen Signalweges führt zu einer Vielzahl von Krankheitsbildern. [79] Die Inhibition von Raf geschieht dabei über Bindung von RKIP an Raf, wodurch eine Phosphorylierung des N-terminalen Endes von Raf verhindert wird. [77] Zu erwähnen sind in diesem Zuge auf jeden Fall auch noch die ERK (Extracellular-signal Regulated Kinases) als Downstream im Raf-MEK-MAPK Signalweg. Vor allem die ERK1/2 haben dabei erheblichen Einfluss auf den Zellzyklus [100], so dass auch RKIP eine wichtige Rolle in der Zellzykluskontrolle zukommt. Einige Studien konnten außerdem zeigen, dass RKIP an der Regulation des Spindel-Checkpoints der Zellteilung beteiligt ist. [101] Diese Daten werden auch nochmals dadurch erhärtet, dass RKIP defiziente Zellen eine höhere Aktivität von Aurora B vorweisen, was zu genomischer Instabilität führt [101], da die Kinase Aurora B eine wichtige Rolle für Zellteilung, den Spindel-Checkpoint und die chromosomale Anordnung spielt. [102] Klinisch relevant werden diese Erkenntnisse beispielsweise bei der Betrachtung von kolorektalen Tumoren, für die gezeigt wurde, dass RKIP Defizienz zu signifikant höheren Raten an genomischer Instabilität führt. [103]

Neben der Funktion als Raf- Inhibitor kommt RKIP auch eine Rolle als Inhibitor der GRK2 (G Protein gekoppelten Rezeptor Kinase 2) zu. [93] GRK2 ist ein Inhibitor der GPCR (G Protein gekoppelten Rezeptor), welche für Neurotransmission, Inflammation und Regulation des Blutdruckes eine wichtige Rolle spielen. [104] Für die Inhibition von GRK2 ist notwendig, dass RKIP durch die PKC (Protein Kinase C) phosphoryliert wird [105], um dann von Raf zu dissoziieren und als pRKIP (phospho-Raf Kinase Inhibitor Protein) GRK2 zu binden und so dessen inhibitorische Aktivität zu blockieren. [93, 105, 106] Neueste Erkenntnisse präsentieren außerdem eine dritte Zustandsform, welche die Phosphorylierung von RKIP durch PKC überhaupt erst erlaubt und somit eine Zwischenform zwischen dem Raf inhibierendem RKIP und dem GRK2 inhibierendem RKIP darstellt. [107, 108]

Des Weiteren kontrolliert RKIP die Aktivität des NF- $\kappa$ B (nukleären Faktors  $\kappa$ B) und hat somit Einfluss auf die Apoptose. [77] NF- $\kappa$ B ist in der aktiven Form im Zytoplasma lokalisiert und an Inhibitor  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) gebunden [109]. Erst durch eine Phosphorylierung von I $\kappa$ B durch die IKK (Inhibitor  $\kappa$ B Kinase), welche wiederum durch NIK (NF $\kappa$ B-inducing kinase) und TAK-1 (transforming growth factor B-activated kinase-1) durch Phosphorylierung aktiviert wird, degradiert I $\kappa$ B und sorgt so für aktives NF- $\kappa$ B. [77] NF $\kappa$ B schließlich wird in den Nucleus transloziert und reguliert dort Gene, welche sich auf Inflammation, Zellproliferation, Migration und Apoptose auswirken. [110] RKIP moduliert den NF $\kappa$ B Signalweg, indem es die NIK und TAK-1 sowie IKK inhibiert und somit die Phosphorylierung von I $\kappa$ B und die Aktivität von NF- $\kappa$ B verhindert. [111]

Auch auf den Aufbau der extrazellulären Matrix kann RKIP Einfluss nehmen, Einige Studien konnten zeigen, dass RKIP die Funktion besitzt, die Aktivität von Matrix Metalloproteinasen zu vermindern und somit einem Abbau zellulärer Matrix entgegenwirken kann. [112, 113, 114]

Andererseits kann RKIP auch als Aktivatorprotein fungieren. So sind zwei Wege beschrieben, wie RKIP die GSK3 $\beta$  (Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$ ) reguliert: Zum einen kann RKIP durch Bindung an GSK3 $\beta$  für deren Erhalt sorgen und zum anderen schützt RKIP die GSK3 $\beta$  vor einer inhibitorischen Phosphorylierung. [115] Da sich über eine aktive GSK3 $\beta$  eine reduzierte zelluläre Motilität und Migration ergibt, gibt es also laut einigen Quellen Hinweise auf einen negativen Effekt von RKIP auf die Zellmotilität. [77, 116, 117] Andererseits gibt es aber auch Projekte, welche einen positiven Effekt von RKIP auf die zelluläre Motilität und Migration nachweisen konnten. [118]

Außerdem ist eine Aktivierung der mir (micro-RNA) let-7 durch RKIP beschrieben [119]. Insbesondere durch die Inhibition des Raf-MEK-MAPK Signalweges ist die Transkription von LIN28 vermindert. LIN28 inhibiert die Reifung von mir let-7 [78]. Die mir let-7 wiederum inhibiert HMGA2 (High-mobility group AT-hook 2), welches als Remodelingprotein des Chromatins, eine große Rolle in der Aktivität von proinvasiven und damit auch prometastatischen Genen, wie Snail und CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) spielt. [120]

Erwähnenswert ist bei allen beschriebenen Mechanismen noch, dass die Modulation der intrazellulären Vorgänge und Signalkaskaden durch RKIP keineswegs als An-Aus-Schalter funktioniert, sondern vielmehr die jeweiligen Signalintensitäten moduliert. [121]

### 3.3.2. Regulationen des Raf-Kinase-Inhibitor-Proteins

Nachdem nun beleuchtet wurde wie RKIP sich auf Signaltransduktionswege in der Zelle auswirkt, sollen nun noch die wichtigsten Wege der Regulation von RKIP beschrieben werden:

In der Regel sind Tumorsuppressorgene vor allem über Methylierung der DNA (Desoxyribonukleinsäure) und Modifikation der Histone reguliert [122], so ist für die Methylierung von sogenannten CpG (Cytosin-phosphatidyl-Guanin) Inseln in der Promotorregion des RKIP Genoms sowohl im normalen als auch malignen Gewebe ein Transkriptionsstopp beschrieben [123]. Dieser Transkriptionsstopp geht mit einer RKIP Defizienz in vivo einher [103]. Außerdem wird RKIP durch Snail herunterreguliert [124], das heißt RKIP und Snail beeinflussen sich gegenseitig negativ. Der EZH2 (Enhancer von Zeste Homolog 2) und mda-9 (Melanoma differentiation associated gene-9) inhibieren ebenso die Transkription von RKIP [125, 126]. Abschließend sollte hierzu aber bedacht werden, dass diese Suppressionsmechanismen primär für maligne Zellen gelten und dabei auch abhängig vom Zelltyp sind [77].

Ein positiver Einfluss auf RKIP konnte für 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron gezeigt werden, welches über eine Bindung an Androgenrezeptoren die Expression von RKIP induziert [127]. Indirekt kann auch GSK3 $\beta$  ein stimulierender Faktor für die Expression von RKIP sein: GSK3 $\beta$  inhibiert Snail [128], da Snail RKIP herunterreguliert [124], hat GSK3 $\beta$  also einen positiven Effekt auf RKIP.

Zusammenfassend ergibt sich also eine ausgeprägte Multifunktionalität, welche zeigt, dass RKIP unter verschiedenen Bedingungen unterschiedliche Rolle spielen kann und somit in multiplen Signalwegen interagieren kann. Diese Tatsache macht RKIP zu einem zentralen Schalter diverser intrazellulärer Vorgänge und die Erforschung von RKIP als Determinante individueller Progression von systemischer und kardialer Fibrose sehr wichtig.

Abbildung 3

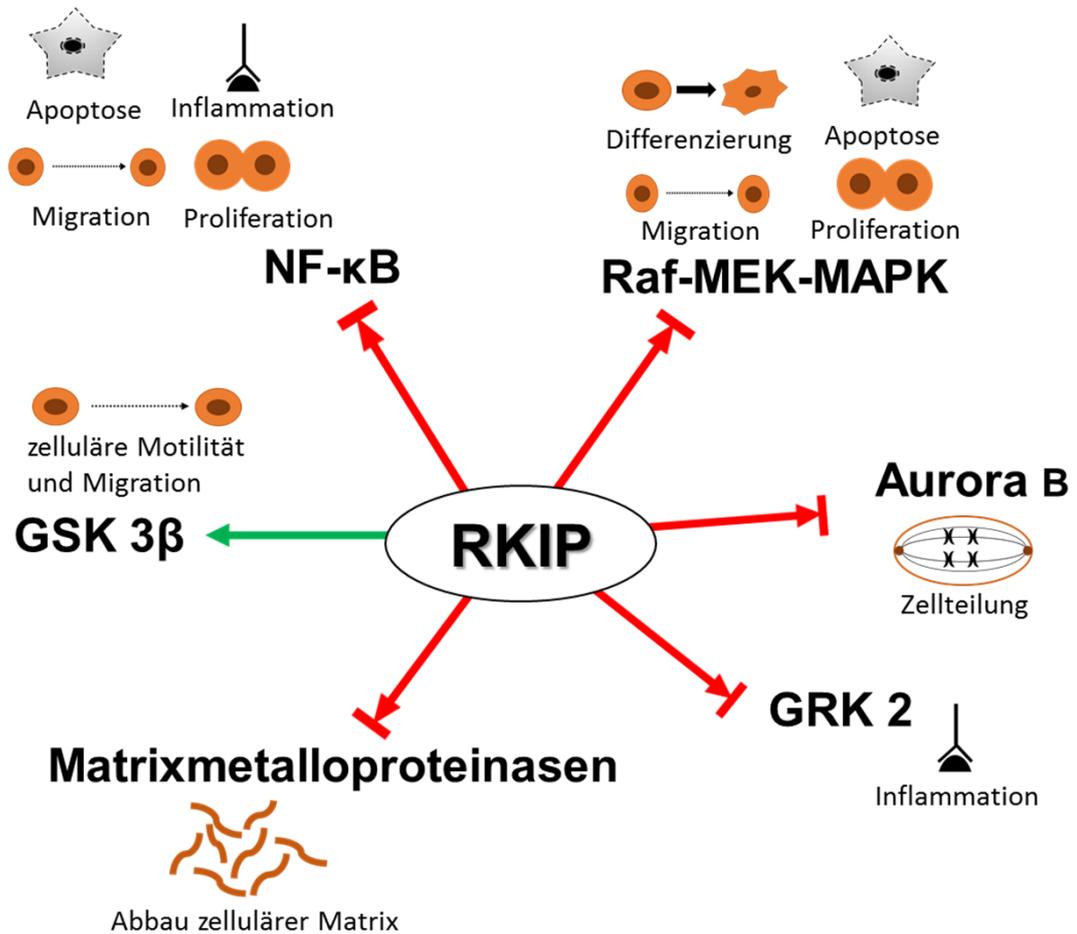


Abbildung 3- Funktionen des Raf-Kinase-Inhibitor-Proteins

## 4. Fragestellungen

Nach Vorarbeiten im Rahmen des Teilprojektes 10 „Identifizierung und Charakterisierung von zellulären Mechanismen und genetischen Determinanten der kardialen und systemischen Fibrogenese“ wurde das Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP) als ein relevanter genetischer Risikofaktor der Fibrogenese identifiziert. Die aktuelle Literatur weist darauf hin, dass das Raf-Kinase Inhibitor Protein eine wichtige Rolle bei kardialem Remodelling spielen könnte. RKIP wird in verschiedenen Geweben aktiv exprimiert und ist an Signaltransduktionswegen beteiligt, die Zellproliferation, Apoptose, Zellwachstum, Zellmigration und Angiogenese regulieren. Allerdings sind die genauen zellulären und molekularen Funktionen von RKIP und insbesondere die Bedeutung im Myokard nicht bekannt.

Basierend auf diesen Erkenntnissen untersuchen wir den Einfluss der globalen RKIP-Defizienz auf kardiales Remodeling und kardiale Reparaturvorgänge bei erhöhter Nachlast und Tetrachlorkohlenstoff-Behandlung. Hierzu sollen folgende Parameter untersucht werden:

- 1) funktionelle Herzparameter,
- 2) zelluläre Parameter des kardialen Remodeling, wie Hypertrophie, Fibrogenese, Kapillarisierung, Apoptose, Proliferation und oxidativen Stress,
- 3) Expressionsanalyse im linksventrikulären Myokard bzgl. Regulationsproteine (RKIP, phospho-RKIP, ERK, phospho-ERK), RKIP-regulierten Mediatoren (NRF2)
- 4) Migrationsfähigkeit der kardialen Fibroblasten,
- 5) Mobilisierung der zirkulierenden Fibroblasten ins periphere Blut aus dem Knochenmark mittels FACS

## 5. Materialien und Methoden

### 5.1. Materialien

#### 5.1.1. Versuchstiere

Zur Verwendung kamen zehn Wochen alte RKIP<sup>-/-</sup>C57Black6N-Albino sowie Wildtype (WT) C57Black6N-Albino Mäuse, diese wurden von David Kiskiss, Brown University, Providence, Rhode Island, USA erworben. Die Studie wurde von dem Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz des Saarlandes, Abteilung Lebensmittel und Veterinärmedizin genehmigt. Die Mäuse wurden während der Studie unter Standardbedingungen gehalten.

#### 5.1.2. Chemikalien und Ausgangsstoffe

- 0,05% Trypsin-EDTA; gibco life technologies, USA
- 30% Acrylamide Mix; Bio-Rad, USA
- 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Merck, Germany
- Algezid II, AGFA, Belgium
- Ammonium Persulfate (APS); Serva, Germany
- Amplific Diluent; PerkinElmer, USA
- Antimycin A; gibco life technologies, USA
- Aprotinin; Sigma-Aldrich, Germany
- Aqua dest (destilliertes Wasser); Braun, Germany
- Bovines Serum Albumin (BSA); Sigma-Aldrich, Germany
- Bovines Serum; gibco life technologies, USA
- Bromphenolblau; Sigma-Aldrich, Germany
- Chloroform; Sigma-Aldrich, Germany
- Citraconsäure Anhydrid; Sigma-Aldrich, Germany
- Complete- Tabletten EDTA-free, Roche Diagnostics, Switzerland
- DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) BioChemica; Pan-Reac AppliChem, Germany
- Developer Flasche 1 for CP 1000/ Curix 60; AGFA, Belgium
- Developer Flasche 2 for CP 1000/ Curix 60; AGFA, Belgium
- di-Natriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>); Merck, Germany
- Dithiothreitol (DTT); Sigma-Aldrich, USA

- E64; Sigma-Aldrich, Germany
- ECL Western Blotting Detection Reagents, Detection Reagent 1; GE Healthcare, UK
- ECL Western Blotting Detection Reagents, Detection Reagent 2; GE Healthcare, UK
- Enthellan; Merck, Germany
- Eosin; Merck, Germany
- Ethanol; Sigma-Aldrich, USA
- Ethylendiamintetraacetat (EDTA); Sigma-Aldrich, Germany
- Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat (EGTA); Sigma-Aldrich, Germany
- Gelatinelösung; Sigma-Aldrich, USA
- Glycerol; Sigma-Aldrich, USA
- Glycin; WVR, Germany
- HCl (Hydrochloric acid 37%); WVR; USA
- Hematoxinilin; Merck, Germany
- HEPES; gibco life technologies, USA
- High Range Marker; Bio-Rad, USA
- Igepal CA-630, Sigma-Aldrich, USA
- Injektionswasser: Aqua ad iniectabilia; Braun, Germany
- Kaliumchlorid (KCl); Merck, Germany
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>); Merk, Germany
- Karbontetrachlorid (CCl<sub>4</sub>); Sigma-Aldrich, Germany
- Kliniplast paraffin-haltiges Medium für die Gewebereinbettung, Klinika medikal, Germany
- Leupeptin; Sigma-Aldrich, Germany
- Low Range Marker; Bio-Rad, USA
- M199+Glutamax Medium; gibco life technologies, USA
- Magermilchpulver Sucofin; TSI GmbH, Germany
- Methanol; Merck, Germany
- Microcystin; Alexis Biochemicals, USA
- Natriumazid (NaN<sub>3</sub>); Sigma-Aldrich; Germany
- Natriumchlorid (NaCl); Merck, Germany
- Natriumhydroxid; Merck, Germany
- Natriumorthovanadat (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>); Sigma-Aldrich, Germany

- Paraffin: Kliniplast Medium for tissue embedding; Klinika Medical, Germany
- Paraformaldehyd; Merck, Germany
- Penicillin/Streptomycin; gibco life technologies, USA
- peqGOLD RNA Pure; peqlab, Germany
- Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); Sigma-Aldrich, Germany
- Pikrinsäure; Sigma-Aldrich, USA
- Rapid Fixer, AGFA, Belgium
- Reagenz A: Bio-Rad DC Protein Assay Reagent A; Bio-Rad, USA
- Reagenz B: Bio-Rad DC Protein Assay Reagent B; Bio-Rad, USA
- RotiHistol; Roth, Germany
- Sirius Red; Polysciences Inc., Germany
- Natrium dodecyl sulfate (SDS); Serva, Germany
- $\beta$ -Glycerolphosphat, calbiochem, USA
- Streptavidin-FITC; Vector, USA
- Streptavidin-TRITC: Rhodamine (TRITC)-conjugate; Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA
- Stromal derived factor (SDF-1); R&D systems, USA
- Tetramethylethylendiamin (TEMED); Sigma-Adrich, Germany
- Tri-Natriumcitrat-Dihydrat; Merck, Germany
- Trishydroxymethylaminomethane (Tris); Sigma-Aldrich, USA
- Triton X-100; Sigma-Aldrich, Germany
- Türks-Lösung; Merck, Germany
- Tween20 (Polyoxyethyenesorbitan); Sigma-Aldrich, USA
- Tyramied, biotinyliert; PerkinElmer, USA
- Vectaschield Mounting Medium for Fluorescence; Vector Laboratories, USA
- $\beta$ -Mercaptoethanol; Sigma-Aldrich, Germany

### 5.1.3. Antikörper

#### 5.1.3.1. Primärantikörper

Antikörper	hergestellt in	Ig-Fraktion	Ig-Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
Anti-8 Hydroxyguanosin antibody	Goat	IgG	1:300	abcam, UK	ab10802

Anti-Collagen Type I (RABBIT) Antibody Biotin Conjugated	Rabbit	IgG	1:165	Rockland Immunochemicals, USA	600-406-103
Anti-CXCR4 antibody	Rabbit	IgG	1:30	abcam, UK	ab2074
Anti-Fibronektin antibody	Mouse	IgG	1:50	abcam, UK	ab6328
Anti-Fibronektin antibody	Rabbit	IgG	1:100	abcam, UK	ab23750
Anti-Ki67 antibody	Rabbit	IgG	1:200	abcam, UK	ab15580
Anti-Nrf2 antibody	Rabbit	IgG	1:300	abcam, UK	ab31163
Anti-PBP antibody (RKIP)	Rabbit	IgG	1:500	abcam, UK	ab76582
Anti-RNA polymerase II Antibody	Mouse	IgG	1:4000	Merck Millipore, Germany	05-623
APC Rat IgG2b, $\kappa$ Isotype Control (CD 45 Isotypenkontrolle)	Rat	IgG	1:165	BD Bioscience, USA	556924
APC-Cy7 Rat Anti-Mouse CD45	Rat	IgG	1:165	BD Bioscience, USA	557659
Biotin-SP (long spacer) ChromPure Rabbit IgG, whole molecule (Kollagen Isotypenkontrolle)	Rabbit	IgG	1:165	Dianova, Germany	011-060-003
GAPDH (6C5)	Rabbit	IgG	1:5000	Santa Cruz Biotechnology, USA	sc-32233
Monoclonal Anti-Actin ( $\alpha$ -Sarcomeric) antibody	Mouse	IgM	1:100	Sigma-Aldrich, Germany	A2172
Mouse Endoglycan/PODXL2 Antibody (Podocalyxin)	Goat	IgG	1:30	R&D Systems, USA	AF3534
PECAM-1 (M20) (CD31)	Goat	IgG	1:15	Santa Cruz Biotechnology, USA	sc-32662
p-RKIP (rSer 153)	Rabbit	IgG	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, USA	sc-32662
Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block)	Rat	IgG	1:10	BD Bioscience, USA	553142

### 5.1.3.2. Sekundärantikörper

Antikörper	konjugiert mit	hergestellt in	Hersteller	Katalognummer
anti-goat IgG	TRITC	Donkey	Dianova, Germany	705-025-147
anti-goat IgG	HRP	Rabbit	Sigma-Aldrich, Germany	A5420
anti-mouse IgG	HRP	Rabbit	Sigma-Aldrich, Germany	A9044
anti-mouse IgM	FITC	Goat	Dianova, Germany	115-095-020

anti-rabbit IgG	HRP	Goat	Sigma-Aldrich, Germany	A6154
anti-rabbit IgG	FITC	Donkey	Dianova, Germany	711-095-152
anti-rabbit IgG	Biotin	Donkey	Dianova, Germany	711-065-152

#### 5.1.4. Assay und Kits, Sonden für die Polymerasekettenreaktion

- 1x Perm/Wash-Puffer (BD Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit Cat. No. 554714); BD, USA
- Apoptosis Detection Kit: DAB Dillution Buffer; Merck Millipore, USA
- Apoptosis Detection Kit: DAB Substrate; Merck Millipore, USA
- Apoptosis Detection Kit: Equilibration Buffer; Merck Millipore, USA
- Apoptosis Detection Kit: Oligo A; Merck Millipore, USA
- Apoptosis Detection Kit: Oligo B; Merck Millipore, USA
- Apoptosis Detection Kit: Streptavidin Peroxidase; Merck Millipore, USA
- Apoptosis Detection Kit: T4 DNA Ligase; Merck Millipore, USA
- Fixierung/Permeabilisierung Lösung (BD Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit Cat. No. 554714); BD, USA
- Kit für PCR Katalog-Nummer: 4374996; Applied Biosystems, USA
- Sonden: (alle Applied Biosystems, USA):
  - 18S-RNA (4352655)
  - HPRT (Mm01545399\_m1)
  - Kollagen Ia2 (Mm01165187\_m1)
  - RKIP (Mm02601848\_g1)

#### 5.1.5. Medikamente

- 0,9% NaCl: isotone Natriumchloridlösung; Braun, Germany
- Augen- und Nasensalbe Bepanthen; Bayer, Germany
- Carprofen (Rimadyl); Pfizer, USA
- Ketamin (Ketavet); Pfizer, USA
- Xylazin (Rompun 2%); Bayer, Germany

#### 5.1.6. Lösungen

Sollte bei den angesetzten Lösungen eine Einstellung des pH- Wertes nötig sein, so erfolgte diese mittels Lösungen von NaOH und HCl unter Kontrolle durch das pH Meter.

10xElektrophoresepuffer:	720g Glycin 151,5g Tris 50g SDS mit Aqua dest auf 5l auffüllen
10xPBS:	80g NaCl 2g KCl 14,4g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,4g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH auf 7,4 einstellen mit Aqua dest auf 1l auffüllen
10xPBS-Tween:	80g NaCl 2g KCl 14,4g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,4g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10ml Tween20 pH auf 7,4 einstellen mit Aqua dest auf 1l auffüllen
1xElektrophoresepuffer:	100ml 10xElektrophoresepuffer 900ml Aqua dest
1xPBS:	100ml 10xPBS 900ml Aqua dest
1xPBS-Tween für Immunfärbungen:	100ml 10xPBS 900ml Aqua dest 100µl Tween20
1xPBS-Tween für Western Blot:	100ml 10xPBS-Tween 900ml Aqua dest
20x SSC:	175,32 g NaCl 100,5 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat mit Aqua dest auf 1l auffüllen
4% BSA gelöst in 4xSSC:	4g Bovines Serum Albumin (BSA) pro 100ml 4xSSC
4xSSC:	200 ml 20xSSC 800 ml Aqua dest
4xSSC-Tweem:	200 ml 20xSSC 800 ml Aqua dest 100µl Tween20
APS, 10%:	1g APS 1l Aqua dest

Blocklösung für Immunfärbungen:	5g Trockenmilchpulver gelöst in 100ml 4xSSC bzw. 100ml 1xPBS-Tween für Immunfärbungen
Citraconsäure-Anhydrid Puffer:	50ml Aqua dest 50µl Citraconsäure Anhydrid pH auf 7,4 einstellen
DAPI- Lösung	20µl DAPI 15ml Aqua dest
DTT, 0,2M:	30,84mg Dithiothreitol in 1ml Aqua dest gelöst
DTT, 1M:	154,2mg Dithiothreitol in 1ml Aqua dest gelöst
EDTA, 0,5M:	186,12g EDTA 50ml Aqua dest
Entwickler:	1,25l H <sub>2</sub> O Developer Flasche 1 Developer Flasche 2
Entwicklungswasser:	2,5l H <sub>2</sub> O 0,5ml Algecid II
Ethanol, 70%:	70ml Ethanol 30ml Aqua dest
Ethanol, 85%:	85ml Ethanol 15ml Aqua dest
FACS Puffer BSA:	500ml 1xPBS 25ml gefiltertes fetales bovines Serum (gefiltert durch einen 70µm Zellfilter) 2,5g bovines Serum Albumin 3,5ml NaN <sub>3</sub>
Fixierer:	2l H <sub>2</sub> O Rapid Fixer
Gelatinelösung, 1%:	1ml Gelatine 100ml Aqua dest
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 3%:	10ml 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 90ml 1xPBS

Hepes, 0,5M:	5,96g Hepes 50ml Aqua dest pH auf 7,4 einstellen
Hepes, 1M:	11,92g Hepes 50ml Aqua dest
Igepal, 10%:	1ml Igepal 10ml Aqua dest
KCl, 1M:	3,729g KCl 50ml Aqua dest
Ladepuffer:	2ml Glycerol 2ml 10% SDS 2,5ml StackingGelBuffer 3ml Aqua dest 1 Spatelspitze Bromphenolblau
Milch, 1%:	1ml 5% Milch 4ml 1xPBS-Tween für Western Blots
Milch, 5%:	2,5g Trockenmilch 50ml 1xPBS-Tween für Western Blots
NaCl, 5M:	14,61g NaCl 50ml Aqua dest
Nährmedium für Fibroblasten:	500ml M199+Glutamax Medium 50ml Bovines Serum 5ml Penicillin/Streptomycin 5ml Antimycin A 5ml HEPES
PBS- gepuffertes Formalin:	4g Paraformaldehyd 100ml 4xSSC
PMSF, 0,1M:	0,17419g PMSF 10ml Ethanol

Proteinlysepuffer:	200µl 0,5M Hepes 100µl 100mM EGTA 25µl 0,2M DTT 250µl 0,2M Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 50µl Triton X-100 500µl Glycerol 20µl 0,1M PMSF 1µl 10mM Leupeptin 5µl Aprotinin 4µl E64 10µl 1mM Microcystin 500µl 0,5M β-Glycerolphosphat mit 3335µl Aqua dest auf 5ml auffüllen
Puffer A:	Stammlösung: 500µl 1M Hepes 500µl 1M KCl 10µl 0,5M EDTA 1,9mg EGTA mit Aqua dest auf 50ml auffüllen  frisch dazu (direkt vor Verwendung, pro 10ml Stammlösung): 10µl DTT 50µl 0,1M PMSF ¼ Complete Tablette
Puffer C:	Stammlösung: 1ml 1M Hepes 4ml 5M NaCl 100µl 0,5M EDTA 19mg EGTA mit Aqua dest auf 50ml auffüllen  frisch dazu (direkt vor Verwendung, pro 10ml Stammlösung): 10µl DTT 100µl 0,1M PMSF ¼ Complete Tablette
SDS-Polyacrylamid- Sammel- gel, 5%:	3,4ml Aqua dest 0,83ml 30% Acrylamid 0,63ml 1,0M Tris 50µl 10% SDS 50µl 10% APS 5µl TEMED

SDS-Polyacrylamid-Trenngel, 10%:	7,9ml Aqua dest 6,7ml 30% Acrylamid 5,0ml 1,5M Tris 0,2ml 10% SDS 0,2ml 10% APS 8µl TEMED
SDS-Polyacrylamid-Trenngel, 12%:	6,6ml Aqua dest 8,0ml 30% Acrylamid 5,0ml 1,5M Tris 0,2ml 10% SDS 0,2ml 10% APS 8µl TEMED
Sirius Rot:	6g Pikrinsäure 1l Aqua dest 0,5 g Sirius Rot Lösung für eine Woche bei Raumtemperatur reifen lassen
StackingGelBuffer:	6,06g Tris 4ml 10% SDS pH auf 6,8 einstellen mit Aqua dest auf 100ml auffüllen
Stripping Buffer:	31,25ml 1M Tris-HCl 10g SDS 3,5ml β-Mercaptoethanol mit Aqua dest auf 500ml auffüllen
Transferpuffer:	2,9g Tris 14,5g Glycin 200ml Methanol mit Aqua dest auf 1l auffüllen
Tris, 1,5M:	90,9g Tris 500ml Aqua dest pH auf 8,8 einstellen
Tris, 1M:	60,6g Tris 500ml Aqua dest pH auf 6,8 einstellen

### 5.1.7. Instrumente und Geräte

- 24- Well Platte; Becton Dickinson Labware, USA
- 6-0 Nylonfaden Prolene; Ethicon, Germany
- Beatmungsgerät: MiniVent Type 845; Hugo Sachs Elektronik, Germany

- Blotkammer: Trans- Blot SD; Bio-Rad, USA
- Boyden Kammer; Becton Dickinson Labware, USA
- BP-2000; Visitech System, USA
- Braunülen (18-24G); BD Microlance, USA
- Centrifuge 5415 C; Eppendorf, Germany
- Deckglas: Cover Glass; VWR, USA
- Elektrophoresekammer: Trans- Blot Cell; Bio-Rad, USA
- Entwicklungsmaschine: Curix 60; AGFA, Belgium
- Eppendorfgefäße; greiner bio-one, Austria
- Falcon; greiner bio-one, Austria
- Film: Amersham Hyperfilm ECL; GE Healthcare, UK
- Filterpapier: Extra thick blot paper, Filter paper; Bio-Rad, Germany
- Fluorescence-activated cell sorting (FACS); BD, USA
- Heizblock; HLC SAS DirectIndustry; France
- Heizplatte: DHP 37; Labo Tech, Germany
- hitzestabile Plastikkuvette; Roth, Germany
- Homogenisator; Braun, Germany
- Hybridisierungssofen: Mini oven; MWG-Biotech, Germany
- Inkubator; Heraeus, Germany
- Kassetten; Roth, Germany
- Kühlzentrifuge; J. Thieme Labortechnik, Germany
- Megafuge 1.0R; Heraeus, Germany
- Membranen: Nitrocellulose Membranes, 0,2µm; Bio-Rad, Germany
- Mikroskop für Petrischalen; Olympus, Japan
- Mikroskop: Eclipse E600; Nikon, Japan
- Mikrotom; Leica, Germany
- Millar- Katheter; Millar, USA
- Neubauer-Zählkammer; Marienfeld, Germany
- Objektträger; Menzel-Glaser, Germany
- OP- Mikroskop: SMZ645; Nikon, Japan
- Petrischale VWR; USA
- pH Meter; WTW, Germany
- Photometer: DU 730 Life Science UV/Vis Spectrophotometer; Beckman Coulter, USA

- Pipetten: Research plus; Eppendorf, Germany
- Plattformschüttler: Polymax 1040; Heidolph, Germany
- Powerpack: PowerPac Basic; Bio-Rad, USA
- Proteinbestimmung: UV/Vis Spectrophotometer DU 730; Beckman Coulter Life Science, Germany
- Real-Time PCR: StepOnePlus, Applied Biosystems, USA
- RNA- Bestimmung: Nanodrop 2000 Thermo scientific; peqlab, Germany
- Rotationsmischgerät: Vortex-Genie 2, Scientific Industries, USA
- Rotator; VWR, USA
- Scanner: CanoScan Lide 90; Canon, Japan
- Seidenfäden 6/0; Suprama, Germany
- Skalpell: Surgical Disposable Scalpels; Braun, Germany
- Thermocycler; peqlab, Germany
- Trockenschrank: Thermo scientific; Heraeus, Germany
- Wasserbad; GFL, Germany
- Zellkulturbank; Heraeus, Germany
- Zentrifuge für Taq-Man Platten: 2019R, NAPCO, Netherlands
- Zentrifuge; Eppendorf, Germany

#### **5.1.8. Computer Software**

- ImageStudioLiteVer4.0; LI-COR Bioscience, USA
- Lucia G for Nikon; Laboratory Imaging, Czech Republic
- Mikroskopsoftware: NIS Elements; Nikon, Japan
- Statistica 10; StatSoft. Inc., USA

## 5.2. Methoden

### 5.2.1. Gruppenaufbau

Die verschiedenen Aspekte des Raf-Kinase-Inhibitor-Proteins (RKIP) bei kardialem Remodeling und kardialer Fibrogenese wurden zum einen an einer mit CCl<sub>4</sub> behandelten Versuchstiergruppe und zum anderen an einer Versuchstiergruppe nach erfolgter TAC erforscht. Dabei kamen jeweils Wildtype- Tiere (WT) sowie RKIP- Knockout- Tiere (RKIP<sup>-/-</sup>) zum Einsatz. Die Aortenligatur- Gruppe wurde mit einer SHAM- Operations- Gruppe verglichen, während die CCl<sub>4</sub> behandelten Tiere mit Unbehandelten verglichen wurden. Daher ergeben sich folgende Gruppen:

Gruppen	CCl <sub>4</sub>	Kontrolle
Wildtypmäuse	n= 14 (7♀, 7♂)	n= 6 (3♀, 3♂)
RKIP <sup>-/-</sup> -Mäuse	n= 16 (8♀, 8♂)	n= 8 (4♀, 4♂)

Gruppen	TAC	SHAM
Wildtypmäuse	n= 9 (1♀, 8♂)	n= 9 (3♀, 6♂)
RKIP <sup>-/-</sup> -Mäuse	n= 10 (6♀, 4♂)	n= 10 (6♀, 4♂)

### 5.2.2. Induktion von Ersatzfibrose mittels Aortenligatur

Die Narkose setzte sich aus zwei Teilen Ketavet und einem Teil Rompum zusammen, diese Mischung wurde 1:10 mit 0,9% NaCl verdünnt und dann injiziert (zu 0,3ml pro 20g KG (Körpergewicht)).

Nach der Narkose wurden ca. 10min abgewartet (Prüfung der Zwischenzehenreflexe), bis die Maus links parasternal rasiert wurde. Anschließend wurde Augen- und Nasensalbe auf die Augen aufgetragen. Zur orotrachealen Intubation

kamen neben einer Pinzette, das Metallstück einer blauen 22G Braunüle als Tubusführung sowie der Plastikanteil einer blauen 22G Braunüle und eine rosa 18G Braunüle als Tubus zum Einsatz. Der Tubus wurde mit dem Beatmungsgerät konnektiert, welches auf ein Volumen von 200µl und eine AF (Atemfrequenz) von  $120\frac{1}{min}$  eingestellt wurde.

Sobald der Hautschnitt (links parasternal bis zur linken Achsel) erfolgt war, wurden die Mm. pectorales in der Mitte stumpf geöffnet bis die Intercostalräume sichtbar wurden. Die Pinzette wurde geschlossen zwischen der ersten und der zweiten Rippe durch die Muskulatur gesteckt und anschließend geöffnet. Um die Eröffnung des ersten Intercostalraumes zu erhalten wurde diese durch zwei Seidenfäden gespannt.

Anschließend wurde der Fettkörper des Thymus soweit abgetragen, dass eine gute Sicht auf die Aorta entstand. Diese wurde unter Zuhilfenahme eines L-Stückes – gebaut aus einer lila 24G Braunüle – mittels eines 6-0 Nylonfadens auf einen Diameter von 360µm (Konstriktion von 65-70%) verengt, zur Festlegung des korrekten Durchmessers diente dabei ein L-Stück aus einer grauen 27G Braunüle.

Nach Verschluss der Thorax und erfolgter Hautnaht wurde die Maus (sobald die Reflexe vorhanden waren) extubiert und mit 0,1ml Rimadyl analgetisiert.

Zu erwähnen wäre noch die SHAM (oder auch Placebo) Operation. Diese erfolgte nach demselben Schema wie die TAC- Operation, lediglich die Konstriktion der Aorta durch einen 6-0 Nylonfaden blieb aus. Letzterer wurde hier nur in einer Schlaufe um die Aorta geschlungen, jedoch nicht zugezogen und verursachte daher keine Konstriktion.

### **5.2.3. Induktion von interstitieller Fibrose mittels Tetrachlorkohlenstoff- Behandlung**

Die Behandlung der entsprechenden Mäuse erfolgte durch die intraperitoneale Gabe von 0,7mg CCl<sub>4</sub> pro kg Körpergewicht zwei Mal pro Woche. Der Behandlungszeitraum erstreckte sich dabei über 6 Wochen.

## 5.2.4. Messung der linksventrikulären Druckwerte und des peripheren Blutdruckes

Die peripheren Blutdruckwerte sowie der Puls wurden mit dem BP-2000 Visitech System gemessen. Zur Messung der linksventrikulären Druckwerte kam ein 1,4 French Millar-Tip-Katheter zum Einsatz.

## 5.2.5. Histologie

### 5.2.5.1. Fixierung

Aus den Versuchstieren gewonnene Gewebeproben wurden im PBS gepufferten vierprozentigem Formalin fixiert um zu erreichen, dass das Gewebe in möglichst naturgetreuem Zustand erhalten bleibt (Verhinderung von Autolyse), eine bessere Schneidbarkeit durch Härtung zu erzielen sowie potentielle Bakterien und andere Krankheitserreger abzutöten. Das Prinzip ist dabei die sogenannte Immersionsfixierung, das heißt, dass die gewonnenen Proben in Fixierungslösung eingelegt wurden. Zu erwähnen ist aber noch, dass durch Reaktionen zwischen Fixierungsmittel und Proteinen letztendlich nur noch ein Äquivalenzbild gewonnen werden kann. Ein absolut naturgetreues Abbild der Zellen ist nicht möglich.

### 5.2.5.2. Entparaffinieren

Zum Erhalt der Morphologie des entnommenen und in PBS gepufferten Formalin fixierten Gewebes wurde dieses in Paraffinblöcke eingebettet. Nachdem diese ausgehärtet waren, wurden mit einem Mikrotom 3µm dicke Schnitte hergestellt, auf einen Objektträger aufgezogen und durch zweitägige Wärmebehandlung im Trockenschrank bei 55°C fixiert.

Bevor nun eine Färbung der Gewebeschnitte erfolgen konnte war es nötig diese zu entparaffinieren, die Vollständigkeit der Entparaffinierung hat dabei hohe Wichtigkeit um eine unspezifische Bindung der Färbereagenzien zu verhindern.

Hierzu wurden die Schnitte zunächst bei 70°C 30min auf einer Heizplatte inkubiert und anschließend drei Mal 10min in RotiHistol Bäder getaucht. Darauf folgte die Rehydrierung mittels einer absteigenden Alkoholreihe – zwei Mal 100% Ethanol, 1mal 85% Ethanol und 1mal 70% Ethanol für jeweils 5min – und dem Eintauchen in Aqua dest für zwei Mal 5min.

### **5.2.5.3. Hämatoxylin Eosin- Färbung**

Die HE (Hämatoxylin Eosin) - Färbung stellt in der Histologie die Standardfärbung dar: Hämatoxylin färbt Zellkerne und Zytoplasma Anteile, die reich an rauem endothelialelem Retikulum sind, blauviolett an, während Eosin für die rosa Färbung von anderen Zytoplasma Anteilen sowie faserigen extrazellulären Komponenten verantwortlich ist.

Bevor eine Färbung der Gewebeschnitte möglich ist musste eine Entparaffinierung (vgl. 5.2.5.1.) vorgenommen werden um die Hydrophilie für Hämatoxylin und Eosin herzustellen.

Anschließend kam es zur 20-minütigen Behandlung des Gewebes mit Hämatoxylin, überschüssige Farbe wurde daraufhin mit Aqua dest für 3min abgewaschen. Zur Färbung mit Eosin genügten 5min bei RT. Nach erneutem Waschen mit Aqua dest für 5min folgte die Dehydrierung durch eine aufsteigende Alkoholreihe – 2min 70% Ethanol und 2min 100% Ethanol – und RotiHistol für zwei Mal 3min. Schließlich wurden die Präparate mit Enthellan und einem Deckgläschen eingedeckt.

### **5.2.5.4. Picro- Sirius- Red- Färbung**

Die Picro- Sirius- Red- Färbung (auch Sirius- Red- Färbung) dient der quantitativen Analyse der Fibrose im Myokard. Durch eine Färbung erscheinen kollagenhaltige Anteile rot, während das restliche Gewebe gelb angefärbt wird.

Auch hierbei gilt es zu beachten, dass vor der eigentlichen Färbung der Schnitte eine Entparaffinierung (vgl. 5.2.5.2.) vorgenommen werden musste, um das Gewebe zu rehydrieren. War diese erfolgt, wurden die Schnitte ca. 2h in Sirius- Red- Färbelösung eingelegt, anschließend kurz (ca. 2min) mit Aqua dest abgespült und dann in RotiHistol getaucht, um dann mit Enthellan und Deckgläschen eingedeckt zu werden.

## 5.2.6. Immunfärbungen

### 5.2.6.1. Grundprinzip der Immunfärbungen

Immunfärbungen bzw. deren Auswertung erlaubt es im angefärbten Gewebe spezielle Zelltypen, durch die für sie spezifischen Marker-Antigene, zu erkennen und zu quantifizieren. Hierzu kommen verschiedene Primärantikörper zum Einsatz, welche gegen die bereits erwähnten Marker-Antigene gerichtet sind. Die gebundenen Primärantikörper können wiederum durch spezielle Sekundärantikörper detektiert werden, welche gegen das jeweilige Tier gerichtet sind, aus dem der Primärantikörper gewonnen wird. Die Sekundärantikörper wiederum werden abhängig von der jeweiligen Immunfärbung mit verschiedenen Markern gekoppelt.

### 5.2.6.2. Antigendemaskierung

Die Gewebeschnitte wurden wie unter 5.2.5.2. beschrieben zunächst entparaffiniert, ehe eine Hitzebehandlung zur Auflockerung des Gewebes stattfinden konnte. Diese Hitzebehandlung diente dem Freilegen der Epitope der Antigene (sogenannte Antigendemaskierung). Dafür wurden die Schnitte bei 98°C im Wasserbad in einer hitzestabilen Plastikkuvette, welche mit 0,05% Citraconsäure-Anhydrid Puffer (pH 7,4) [129] gefüllt war, für eine Stunde gekocht. Anschließend verblieben die Objektträger zum Abkühlen für 30min bei Raumtemperatur.

### 5.2.6.3. Inkubationen mit Antikörpern und Färbereagenzien

Bei allen Immunfärbungen (wenn nicht anders erwähnt) fand die Inkubation mit dem verdünnten Primärantikörper (ca. 100µl pro Objektträger) für mindestens 12h bei 4°C in der feuchten Kammer (geschlossenes Behältnis mit durch Aqua dest befeuchtete Tücher) und anschließend für 2h bei 37°C (im Wasserbad) in der feuchten Kammer statt.

Alle Inkubationen mit Sekundärantikörper und Färbereagenzien fanden ebenfalls (wenn nicht anders erwähnt) für 2h bei 37°C in der feuchten Kammer statt.

Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten und nach der letzten Inkubation wurden die Objektträger in 1xPBS-Tween für Immunfärbungen oder 4xSSC-Tween jeweils drei Mal für 5min gewaschen. 4xSSC-Tween war dabei besser

geeignet die Hintergrundfärbung aufgrund nichtspezifischer Antikörperbindungen in problematischen Fällen der Immunfärbung zu verhindern und konnte somit auch bei schwacher Antigenreaktivität bzw. bei nichtspezifischer Antikörperbindung ein gutes Fluoreszenzsignal erzielen.

Das zusätzliche Anfärben der Zellkerne erfolgte durch die Benetzung der Gewebeschnitte mit DAPI- Lösung (1:50 in Aqua dest verdünnt) und die Inkubation für 10min in der feuchten Kammer.

Dem letzten Waschschrift folgte das Eindecken mit Maunting Medium und einem Deckgläschen. Die gefärbten Gewebeschnitte konnten dann bei 4°C gelagert werden.

#### **5.2.6.4. Indirekte Zwei-Schritt-Methode**

Die indirekte Zwei-Schritt-Methode kam für die Immunfärbungen 8-Hydroxyguanosin, Fibronektin und alpha- sarkomerisches Aktin zum Einsatz.

Nach dem die Gewebeschnitte entparaffiniert wurden, wurden sie zwei Mal 5min in 1xPBS-Tween für Immunfärbungen inkubiert. Nach der Antigendemaskierung inkubierten die Schnitte für 10min in 4xSSC-Tween. Für die Immunfärbung für alpha- sarkomerisches Aktin wurde diese Inkubation mit 4% BSA gelöst in 4xSSC vorgenommen.

Der Primärantikörper wurde in 4xSSC-Tween (bzw. 4% BSA gelöst in 4xSSC für die alpha- sarkomerisches Aktin Immunfärbung) verdünnt. Die anschließende Inkubation der feuchten Kammer im Wasserbad wurde im Falle der 8- Hydroxydesoxyguanosin Immunfärbung auf 6h verlängert. Zum Waschen zwischen den Inkubationsschritten wurde 4xSSC-Tween verwendet.

Als Sekundärantikörper kamen mit Anti Goat IgG-TRITC für 8- Hydroxydesoxyguanosin (Inkubation für 40min), Anti Rabbit IgG- FITCH für Fibronektin sowie Anti Mouse IgM- FITCH für alpha- sarkomerisches Aktin jeweils Flourchrom konjugierte Sekundärantikörper zum Einsatz, welche in 4xSSC-Tween 1:30 verdünnt wurden.

#### **5.2.6.5. Streptavidin-Biotin-Methode**

Die Streptavidin-Biotin-Methode kam für die Immunfärbungen Ki-67 und CXCR4 zum Einsatz.

Nach dem die Gewebeschnitte entparaffiniert wurden, wurden sie zwei Mal 5min in 1xPBS-Tween für Immunfärbungen inkubiert. Nach der Antigendemaskierung inkubierten die Schnitte für 10min in 1xPBS-Tween für Immunfärbungen.

Verdünnungen der einzelnen Antikörper bzw. Färbereagenzien sowie das Waschen zwischen den Inkubationsschritten erfolgten im Falle der Ki67 Immunfärbung mit 1xPBS-Tween für Immunfärbungen und bei der CXCR4 Immunfärbung mit 4xSSC-Tween.

Die Inkubationszeit mit dem Primärantikörper in der feuchten Kammer im Wasserbad wurde im Falle der CXCR4 Immunfärbung auf 7h verlängert.

Als Sekundärantikörper kam mit Anti Rabbit IgG-Biotin-AK ein mit Biotin konjugierter Sekundärantikörper zum Einsatz. Dieser wurde 1:30 (für die Ki-67 Immunfärbung) bzw. 1:50 (für die CXCR4 Immunfärbung) verdünnt. Die Inkubationszeit in der feuchten Kammer wurde im Falle der Ki67 Immunfärbung auf 90min verlängert.

Anschließend folgte noch die Inkubation mit TRITC konjugiertem Streptavidin (1:50 verdünnt für die Ki-67 Immunfärbung bzw. 1:30 verdünnt für die CXCR4 Immunfärbung) für 15min bei 37°C in der feuchten Kammer.

#### **5.2.6.6. Tyramid Amplifikationsmethode**

Die Tyramid Amplifikationsmethode kam für die Immunfärbungen CD31 und Podocalyxin zum Einsatz.

Nach dem die Gewebeschnitte entparaffiniert wurden, wurden sie zwei Mal 5min in 1xPBS-Tween für Immunfärbungen inkubiert. Nach der Antigendemaskierung inkubierten die Schnitte für 10min in 1xPBS-Tween für Immunfärbungen.

Die Primärantikörper wurden in 1xPBS-Tween für Immunfärbungen verdünnt.

Zur Verdünnung der Sekundärantikörper und Färbereagenzien sowie für das Waschen und Ansetzen der Blocklösung kam im Falle der CD31 Immunfärbung 4xSSC-Tween und im Falle der Podocalyxin Immunfärbung 1xPBS-Tween für Immunfärbungen zum Einsatz.

Die Inkubationszeit mit dem Primärantikörper in der feuchten Kammer im Wasserbad wurde im Falle der CD31 Immunfärbung auf 4h und im Falle der Podocalyxin Immunfärbung auf 2h verlängert.

Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Gewebeschnitte für jeweils 30min mit der Blocklösung für Immunfärbungen benetzt.

Als Sekundärantikörper kamen jeweils Peroxidase-gekoppelte Antikörper zum Einsatz. Dieser wurde 1:300 verdünnt. Die Inkubationszeit in der feuchten Kammer betrug 30min.

Anschließend folgte die Inkubation mit biotinyliertem Tyramid (1:50 verdünnt in Amplific Diluent) für 10min bei 37°C in der feuchten Kammer.

Der letzte Schritt der Tyramid Amplifikationsmethode war dann die Inkubation mit 1:50 verdünntem Streptavidin-TRITC für 15min bei 37°C in der feuchten Kammer.

#### **5.2.6.7. Kontrolle der Immunfärbung**

Um falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse auszuschließen, wurde bei den Immunfärbungen jeweils eine Kontrolle durchgeführt. Die dafür verwendeten Gewebeproben wurden jeweils auf die gleiche Art fixiert, eingebettet und behandelt wie es bei den Proben der Versuchstiere der Fall war.

Als Kontrolle bei der Ki67- Immunfärbungen wurden Schnitte aus einem Angiosarkom mitgefärbt, während bei der CD31- und Podocalyxinfärbung endotheliale Zellen großer Koronargefäße als Kontrolle zum Einsatz kamen. Bei der Immunfärbung für alpha-sarkomerisches Aktin wurden Kardiomyozyten zur Verifikation verwendet. Bei den Immunfärbungen für Fibronectin, CXCR4 und 8-Hydroxyguanosin gab es keine Positivkontrolle, sondern jeweils ein Gewebestück, welches als Negativkontrolle nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurde.

### 5.2.7. Detektion von Apoptose

Nachdem die Gewebeschnitte entparaffiniert wurden (vgl. 5.2.6.2.), wurden sie zwei Mal 5min in 1xPBS inkubiert. Hierauf folgte die Behandlung mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 10min in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Gewebeschnitte zwei Mal 2min mit Aqua dest gewaschen, um dann für 10min in der feuchten Kammer mit Equilibration Buffer inkubiert zu werden. Hierauf folgte die Behandlung mit T4 DNA Ligase, welche 1:10 mit Oligo A bzw. Oligo B gemischt wurde, bei 20°C für 10h in der feuchten Kammer.

Danach wurden die Schnitte zuerst 10min mit 1xPBS und dann drei Mal 10min mit Aqua dest gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Streptavidin Peroxidase für 30min in der feuchten Kammer. Hierauf wurden die Schnitte erneut drei Mal 5min in 1xPBS gewaschen und dann für 5min mit DAB Substrate, 1:50 mit DAB Dillution Buffer verdünnt, in der feuchten Kammer inkubiert. Dem darauffolgenden Waschen für zwei Mal 2min mit Aqua dest folgte das Eindecken mit Mounting Medium und Deckgläschen.

### 5.2.8. Präparat Untersuchung und Gewebemorphologie

Die histologischen Auswertungen am Mikroskop fanden jeweils an Präparaten des linken Ventrikels statt.

Die HE- Färbung diente der Ausmessung der Kardiomyozytenoberflächen um eine Hypertrophie zu quantifizieren, dabei wurden am Mikroskop mittels 40x-Objektiv und der Software NIS Elements Bilder aufgenommen und anschließend unter Zuhilfenahme der Lucia G Software pro Versuchstier mindestens 100 Kardiomyozytenoberflächen ausgemessen. Daneben dienten die HE- Schnitte auch der Beurteilung der Gesamtpräparatoberfläche (hierzu erfolgten Aufnahmen mit dem 2x-Objektiv), welche eine wichtige Bezugsgröße für einige Immunfärbungen darstellte. Außerdem wurden mittels 100xObjektiv und Raster-Okular auch in fünfzehn Gesichtsfeldern pro Präparat Kardiomyozyten und Zellkerne gezählt.

Zur Auswertung der Picro-Sirius-Red-Färbung wurden am Mikroskop mittels des 10x-Objetivs und der NIS Elements Software Bilder aufgenommen (10-12 pro

Präparat). Diese wurden anschließend mit Hilfe eines Makros der Lucia G- Software ausgewertet: Das Makro erkannte dabei die verschiedenen Farbspektren und konnte daher die jeweilige Gesamtfläche, die freie Fläche, die Fibrose- Fläche und die Fläche aller Kardiomyozyten bestimmen.

Zur Auswertung der Immunfärbung für Podocalyxin kam das Raster-Okular zum Einsatz: Pro Gewebeschnitt wurden in jeweils in fünfzehn Rastern die Kapillare gezählt, diese wurden aufsummiert und dann mittels der Formel:

$$\frac{\text{Summe in 15 Gesichtsfeldern}}{0,00153664 \cdot 15}$$
 in die Anzahl der Kapillare pro mm<sup>2</sup> umgerechnet.

Auch zur Auswertung der Immunfärbung für CD31 kam das Raster-Okular zum Einsatz: Pro Gewebeschnitt wurden in jeweils in fünfzehn Rastern die CD31 positiven Zellen sowie die Kardiomyozyten gezählt, diese wurden aufsummiert und dann mittels der Formel:

$$\frac{\text{Summe in 15 Gesichtsfeldern}}{0,00153664 \cdot 15}$$
 in die Anzahl der CD31 positiven Zellen bzw. der Kardiomyozyten pro mm<sup>2</sup> umgerechnet.

Des Weiteren kam das Raster-Okular auch zur Auswertung der Co-Immunfärbung für 8-OHdG und Fibronectin zum Einsatz: Pro Gewebeschnitt wurden in jeweils in fünfzehn Rastern die 8-OHdG positiven Kardiomyozyten, 8-OHdG-positiven Nichtkardiomyozyten und 8-OHdG positiven Fibroblasten gezählt, diese wurden aufsummiert und dann mittels der Formel:

$$\frac{\text{Summe in 15 Gesichtsfeldern}}{0,00153664 \cdot 15}$$
 in die Anzahl der 8-OHdG positiven Kardiomyozyten, 8-OHdG-positiven Nichtkardiomyozyten bzw. 8-OHdG positiven Fibroblasten pro mm<sup>2</sup> umgerechnet.

Für die Co-Immunfärbung mit Ki-67 und Fibronectin wurden jeweils die kompletten Gewebeschnitte nach Ki-67 positiven Kardiomyozyten, Ki67-positiven Nichtkardiomyozyten und Ki-67 positiven Fibroblasten abgesucht. Durch Auswertungen der jeweiligen Schnittgröße in mm<sup>2</sup> der Präparate (über Aufnahmen mittels Kamera und anschließender Ausmessung mit der Lucia G- Software) konnten dann die Anzahl der Ki-67 positiven Kardiomyozyten pro mm<sup>2</sup>, die Anzahl der

Ki67-positiven Nichtkardiomyozyten pro mm<sup>2</sup> und die Anzahl der Ki-67 positiven Fibroblasten pro mm<sup>2</sup> berechnet werden.

Auch für die Co-Immunfärbung mit CXCR4 und Fibronektin wurden jeweils die kompletten Gewebeschnitte nach CXCR4 positiven Fibroblasten und Fibroblasten insgesamt abgesucht. Durch Auswertungen der jeweiligen Schnittgröße in mm<sup>2</sup> der Präparate (über Aufnahmen mittels Kamera und anschließender Ausmessung mit der Lucia G- Software) konnten dann die Anzahl der CXCR4 positiven Fibroblasten pro mm<sup>2</sup> und die Anzahl der Fibroblasten pro mm<sup>2</sup> berechnet werden.

Die Auswertung der Apoptose Detektion erfolgte am Mikroskop mittels 40xObjektiv. Es wurden in einem Gewebeschnitt alle Apoptose-positiven Kardiomyozyten und alle Apoptose-positiven Nichtkardiomyozyten gezählt.

## 5.2.9. Zellkulturexperimente

### 5.2.9.1. Fibroblasten Isolation

Die Fibroblasten wurden aus den Herzen der adulten RKIP WT- bzw. RKIP<sup>-/-</sup> Mäusen mittels des Protokolls der AG Maack isoliert [130]. Hierzu wurden die Mäuse mit Isofluran narkotisiert. Anschließend wurde das Herz entnommen und über die Aorta kanüliert. Es folgte die Zugabe eines Puffers, welcher das Herz lysierte. Nachdem sich am Boden des Lysates ein Sediment ergeben hatte wurde der Überstand entnommen und bei 800rpm (rounds per minute) zentrifugiert, in den dabei entstandenen Pellets befanden sich dann die gewünschten Zellen.

Zur Inkubation der Fibroblasten wurde zunächst eine Petrischale mit 1ml einer 1%- Gelatinelösung beschichtet, der Überrest wurde nach zweistündiger Inkubation bei 37°C abgesaugt.

Alle folgenden Schritte fanden in der Zellkulturbank statt, die verwendeten Lösungen wurden dabei im Wasserbad auf 37°C erwärmt: Die Suspension der Fibroblasten wurde 10min im Falcon belassen, sodass sich ein Sediment ergab. Der Überstand wurde in einen neuen Falcon überführt und anschließend in der Megafuge bei 1100rpm für 10min zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abge-

saugt und verworfen und das Pellet in 2ml Nährmedium für Fibroblasten resuspendiert. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurde das Nährmedium für Fibroblasten abgesaugt und durch neues ersetzt.

### **5.2.9.2. Kultivierung und Kulturbedingungen**

Die Fibroblasten wurden in einer 5%igen CO<sub>2</sub> Atmosphäre bei 37° C in Petrischalen in Kultur gebracht. Das Nährmedium für Fibroblasten (500ml M199+Glutamax Medium, 50ml Bovines Serum, 5ml PenicillinStreptomycin und 5ml HEPES) wurde unter sterilen Bedingungen alle 2 Tage gewechselt.

### **5.2.9.3. Fibroblastenmigrationsassay**

Am dritten Tag nach der Isolation der Fibroblasten wurde mit dem Fibroblastenmigrationsassay begonnen. Nach der Isolation wurde am folgenden Tag nochmals das Nährmedium für Fibroblasten abgesaugt und durch neues ersetzt.

Alle folgenden Schritte fanden in der Zellkulturbank statt, die verwendeten Lösungen wurden dabei im Wasserbad auf 37°C erwärmt: Das Nährmedium für Fibroblasten wurde abgesaugt und durch 2ml autoklaviertes 1xPBS ersetzt. Die Petrischalen wurden für ca. 1min leicht geschwenkt, um die Zellen zu waschen. Anschließend wurde in jede Petrischale 1ml Trypsin gegeben und die Zellen wurden für 10min in den Inkubator gestellt. Nachdem sich die Zellen von der Gelatine gelöst hatten wurde je 1ml Nährmedium für Fibroblasten hinzu pipettiert und die Suspension in Eppendorfgefäße gefüllt, um sie dann bei 2000rpm für 10min zu zentrifugieren. Hierauf wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 300µl Nährmedium für Fibroblasten resuspendiert.

Aus jedem Eppendorfgefäß wurden anschließend 20µl Fibroblasten Suspension entnommen und mit 20µl Türks-Lösung gefärbt um dann in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop für Petrischalen die Anzahl an Fibroblasten zu ermitteln.

Anschließend wurde in eine 24-Well Platte pro Well 750µl Nährmedium für Fibroblasten sowie 7,5µl SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) pipettiert. In die jede Well wurde dann eine modifizierte Boyden-Kammer gesteckt, die jeweils mit ins-

gesamt 500µl Fibroblasten und Nährmedium für Fibroblasten beladen wurde, so dass sich – daher die vorherige Zählung – in jeder Boyden- Kammer die gleiche Anzahl an Fibroblasten befand. Eine Inkubation erfolgte über 24h bei 37°C im Inkubator.

Um die Fibroblasten zu identifizieren wurde eine Immunfluoreszenzmarkierung mit einem Antikörper gegen intrazelluläres Fibronectin durchgeführt. Hierzu wurden die Membranen zunächst zwei Mal für jeweils 5min mit 1xPBS gewaschen und dann mit dem Primärantikörper inkubiert. Der Primärantikörper gegen Fibronectin wurde 1:200 in 1xPBS-Tween für Immunfärbungen verdünnt, jede Membran wurde in 200µl Nährmedium für Fibroblasten und 200µl des verdünnten Primärantikörpers für 3h bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Membranen wiederum zwei Mal für jeweils 5min mit 1xPBS gewaschen und anschließend mit 300µl des 1:100 mit 1xPBS-Tween für Immunfärbungen verdünnten Sekundärantikörpers (Anti-Rabbit-IgG-TRITC) für 1h bei 37°C inkubiert.

Nach abermaligem Waschgang (1xPBS zwei Mal 5min) konnten die Membranen ausgeschnitten und mit Mounting Medium eingedeckt werden.

Die Auswertung erfolgte am Mikroskop mittels 40xObjektiv bei Fluoreszenzlicht. Es wurden alle migrierten Fibroblasten einer Membran gezählt.

#### **5.2.9.4. Behandlung der Fibroblasten mit Angiotensin**

Die Behandlung der isolierten Fibroblasten mit Angiotensin II erfolgte in der Petrischale unter Zugabe von 1mM Angiotensin II für insgesamt acht Stunden.

### **5.2.10. Analyse der Genexpression mittels quantitativer Real-Time- Polymerasekettenreaktion**

#### **5.2.10.1. RNA- Isolation**

Bei allen Versuchen, die RNA als Ausgangssubstanz beinhalten, ist es wichtig diese während der Zeit auf Eis bzw. Trockeneis zu lagern um der Autolyse vorzubeugen.

Um die RNA zu isolieren, wurde von den Gewebestücken zunächst ein kleiner Teil mittels eines Skalpell abgeschnitten. Zu den geschnittenen Gewebestücken gab man 1ml RNA Pure. Die Gewebestücke in der Lösung wurden mittels des Homogenisators lysiert. Anschließend gab man 300µl Chloroform zu den lysierten Gewebestücken, mischte die Proben mittels des Rotationsmischgerätes und inkubierte sie für 10min, um sie anschließend 30min bei 4°C und 14000rpm in der Kühlzentrifuge zu zentrifugieren. Nach der Zentrifugation befand sich die RNA im Überstand, dieser wurde daher abpipettiert und über Nacht bei -20°C inkubiert, damit die RNA ausfällen konnte.

Es folgte eine Zentrifugation für 60min bei 4°C und 14000rpm bis sich am Boden ein kleines Pellet absetzte, in diesem befand sich dann die RNA. Daher wurde der Überstand komplett abpipettiert und dann verworfen, während das Pellet in 800µl 70% Ethanol zunächst gut gemischt und dann erneut für 15min bei 4°C und 14000rpm zentrifugiert wurde. Anschließend wurde wiederum der Überstand verworfen, das Pellet wurde getrocknet (mind. 30min) und dann durch 100maliges auf- und abziehen mit der Pipette in 15µl Injektionswasser resuspendiert. Nach 5min Inkubation bei 65°C im Heizblock, konnte die isolierte RNA bei -80°C gelagert werden.

Um für weitere Versuche mit der isolierten RNA deren Konzentration zu ermitteln, stand das Nanodrop-Gerät zu Verfügung, welches aus einer Probe von 1µl der RNA, deren Konzentration errechnete.

#### **5.2.10.2. Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion**

Für die quantitative Analyse der RNA mittels Real- Time- PCR (Polymerase Chain Reaction) ist es nötig diese zunächst mittels der Technik der RT PCR zu cDNA umzuschreiben. Dieser Vorrang soll im Folgenden beschrieben werden.

Um zu gewährleisten, dass später alle Proben dieselbe Konzentration an cDNA enthalten, wurde nach der Messung der RNA-Konzentration (vgl. 5.2.9.1.) eine Tabelle aufgestellt, sodass sich ein Mischungsverhältnis aus Injektionswasser und isolierter RNA ergibt, welches zur Folge hatte, dass pro Probe dieselbe Menge an RNA pipettiert wurde. Zu 10µl dieser RNA-Verdünnung wurden jeweils

2µl RT-Puffer, 0,8µl dNTP-Mix, 2µl Random Primer, 3,2µl Injektionswasser, 1µl RT und 1µl RNase- Inhibitor pipettiert.

Das Umschreiben von RNA zu cDNA erfolgte dann im RT-PCR- Gerät (Thermocycler), anschließend wurde die cDNA mittels 20µl Injektionswasser 1:2 verdünnt und bei -20°C gelagert.

### **5.2.10.3. Quantitative Real- Time- Polymerasekettenreaktion**

Der RNA- (bzw. cDNA-) Nachweis mittels Real- Time- PCR ermöglicht die quantitative Analyse spezieller RNA- Stücke in der isolierten RNA.

Hierzu kamen neben der cDNA noch die thermostabile Taq-Polymerase und spezielle Nachweissonden (vgl. 5.1.4.) zum Einsatz. Dabei wurde auf eine 96-Wells-Platte pro Probe jeweils 3 Werte für die nachzuweisende RNA und 3 Werte für eine konstant exprimierte RNA bestimmt, daher fanden (neben den jeweiligen Leerwerten) je 15 Proben Platz. Pipettiert wurde dabei jeweils: 1µl cDNA, 1µl Nachweissonde, 8µl Injektionswasser und 10µl Taq-Polymerase. Der anschließende Nachweis fand im Real- Time- PCR- Gerät statt.

## **5.2.11. Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot**

### **5.2.11.1. Proteinisolation und Proteinkonzentrations- Messung**

Bei allen Versuchen, die Proteine als Ausgangssubstanz beinhalten, ist es wichtig diese während der Zeit auf Eis bzw. Trockeneis zu lagern um der Autolyse vorzubeugen.

Um aus Gewebestücken Proteine zu isolieren, wurde von den Gewebestücken zunächst ein kleiner Teil mittels eines Skalpells abgeschnitten. Zu den geschnittenen Gewebestücken gab man ca. 300µl Proteinlysepuffer, anschließend wurden die Gewebestücke in der Lösung mittels des Homogenisators lysiert.

Um die Konzentration der Proteine zu messen war es nun nötig, diese mittels Photometrie zu bestimmen. Hierzu wurden pro Probe drei Ansätze vorbereitet: 2µl Protein, 18µl Aqua dest, 100µl Reagenz A, 800µl Reagenz B. Diese Ansätze wurden anschließend 15min inkubiert und dann im Photometer gemessen, dabei wurde die Protein- Konzentration über die jeweilige Extinktion ermittelt.

Für den späteren Gebrauch war eine Lagerung der isolierten Proteine bei -20°C möglich.

#### **5.2.11.2. Kernextraktion**

Bei allen Versuchen, die Proteine als Ausgangssubstanz beinhalten, ist es wichtig diese während der Zeit auf Eis bzw. Trockeneis zu lagern um der Autolyse vorzubeugen.

Um aus Gewebestücken zytosolische und nukleäre Proteine zu isolieren, wurde von den Gewebestücken zunächst ein kleiner Teil mittels eines Skalpell abgeschnitten. Zu den geschnittenen Gewebestücken gab man 300µl Puffer A, dann wurden die Gewebestücke in der Lösung mittels des Homogenisators lysiert und 15min auf Eis inkubiert. Anschließend gab man 25µl 10%-Igepal hinzu und mischte jede Probe für ca. 10s gut durch. Nach der Zentrifugation bei 13000rpm für 30s befanden sich die zytosolischen Proteine im Überstand und konnten dort abpipettiert werden.

Das verbliebene Pellet wurde nun in 100µl Puffer C durch starkes Reiben des Eppendorfgefäßes über eine harte Oberfläche für 15min resuspendiert und die darin enthaltenen Kerne so zum Platzen gebracht. Anschließend erfolgte erneut eine Zentrifugation bei 13000rpm und 4°C für 5min. Im sich daraus ergebenden Überstand befanden sich die nukleären Proteine. Das Pellet konnte verworfen werden.

Um die Konzentration der Proteine zu erfahren war es nun nötig, diese mittels Photometrie zu bestimmen. Hierzu wurden pro Probe drei Ansätze vorbereitet: 2µl Protein, 18µl Aqua dest, 100µl Reagenz A, 800µl Reagenz B. Diese Ansätze wurden anschließend 15min inkubiert und dann im Photometer gemessen, dabei wurde die Protein- Konzentration über die jeweilige Extinktion ermittelt.

Für den späteren Gebrauch war eine Lagerung der isolierten Proteine bei -20°C für zytosolische bzw. -80°C für nukleäre Proteine möglich.

### 5.2.11.3. Gelelektrophorese und Blotten

Je nach Größe der Zielproteine ergibt sich für die Zusammensetzung des Trenngels für den Western Blot, dabei gilt: Je kleiner die jeweiligen Proteine desto höher der Anteil an Polyacrylamid im Gel. Die Zusammensetzung der jeweiligen SDS-Polyacrylamidgele kann dem Unterpunkt Lösungen (vgl. 5.1.6.) entnommen werden.

Für das Blotten von zwei Membranen waren dabei ca. 20ml Trenngel sowie 5ml Sammelgel notwendig. Beachten sollte man, dass TEMED schnell eine Erhärtung der Gele erfolgt, daher sollte dies erst kurz vor dem Gießen zugegeben werden. Die angesetzten Gele wurden unter Zuhilfenahme des Rotationsmischgerätes gemischt.

Aus der Konzentrationsbestimmung der Proteinproben (vgl. 5.2.10.1.) konnte die benötigte  $\mu\text{l}$ -Menge an Probe errechnet werden, sodass sich die zu pipettierende Masse an Protein ergab. Anschließend wurden eine 1:20 Mischung aus 1M DTT und Ladepuffer hergestellt und in äquivalenter Menge zu den lysierten Proteinen gegeben. Die Proben wurden dann 7min bei 70°C im Heizblock inkubiert und danach mit Hilfe einer Zentrifuge runterzentrifugiert.

Schließlich wurde die Elektrophoresekammer vorbereitet: Nach dem Einsetzen der erhärteten Gele, wurde die Elektrophoresekammer mit 1xElektrophoresepuffer gefüllt und die Gele wurden mit den Proben und dem Marker beladen. Leere Slots sollten dabei mit Ladepuffer beladen werden, um ein Schieflaufen der Proben zu verhindern. Nach Anschluss der Elektrophoresekammer an das Powerpack wurde dieses auf konstante 30mA eingestellt. Das Ausschalten erfolgte, wenn die Lauffront am unteren Rand des Gels angekommen war (ca. 2,5h).

Anschließend erfolgte das Blotten auf Membranen. Dabei wurden zunächst Filterpapier und Membran in Transferpuffer eingeweicht und anschließend wurden Filterpapier, Membran, Gel und ein weiteres Filterpapier in die Blotkammer gelegt. Diese wurde verschlossen und für 45min bei 0,2A (=200mA) an das Powerpack angeschlossen.

#### **5.2.11.4. Blocken und Inkubation mit Antikörpern**

Die auf die Membranen übertragenen Proteinbanden wurden dann mit 50ml (pro Membran) 5%-Trockenmilchlösung bei langsamer Schüttelfrequenz auf den Plattformschüttler für 30min inkubiert.

Darauf folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper: 5ml 1%-Trockenmilchlösung wurden mit der, für die jeweilige Zielverdünnung benötigten, Menge des Primärantikörpers gemischt. Die Inkubation in dieser Lösung erfolgte bei 4°C über Nacht im Rotator.

Nach der Inkubation über Nacht wurde die Membran auf dem Plattformschüttler bei schneller Frequenz gewaschen: zwei Mal 5min in 1xPBS-Tween für Western Blots, dann zwei Mal 10min in 1xPBS-Tween für Western Blots und zuletzt zwei Mal 3min in 1xPBS.

Nachdem die Membran gewaschen wurde erfolgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, welcher jeweils gegen das Tier gerichtet war, aus welchem der verwendete Primärantikörper entstammte. Dabei wurden 10µl des Sekundärantikörpers in 50ml 1xPBS auf 1:5000 verdünnt und bei langsamer Schüttelfrequenz für 20min auf dem Plattformschüttler inkubiert.

Anschließend kam es zum erneuten Waschen, dies geschah wiederum bei schneller Schüttelfrequenz auf dem Plattformschüttler: zwei Mal 5min, dann zwei Mal 10min mit 1xPBS-Tween für Western Blots und anschließend zwei Mal 3min mit 1xPBS.

#### **5.2.11.5. Entwickeln**

Zum Entwickeln der Membran wurde diese zunächst mit 5ml ECL Lösung benetzt (1min) und anschließend in Frischhaltfolie in die Kassette gelegt. Das Entwickeln erfolgt in der Dunkelkammer: Zunächst wurde ein Film in die Kassetten eingelegt und durch die Fluoreszenz des ECLs an den Membranen belichtet, der Film wurde dann in die Entwicklermaschine eingeführt, welche ein Bild des entsprechenden Western Blots erzeugte.

#### **5.2.11.6. Strippen der Membranen**

Falls erwünscht kann eine Membran mit einem weiteren Antikörper inkubiert werden. Um den schon gebundenen Antikörper abzuwaschen ist es nötig die Membran zu stripfen.

Dazu wurde zunächst das ECL durch eine kurze Behandlung mit 1xPBS abgewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit Stripping Buffer für 25min unter langsamem Drehen bei 57°C im Hybridisierungssofen.

Darauf wurde die Membran gewaschen: zwei Mal 5min mit 1xPBS-Tween für Western Blots, dann 1mal 10min mit 1xPBS-Tween für Western Blots, anschließend zwei Mal 5min mit 1xPBS und zuletzt für 1mal 10min mit 1xPBS.

Nun konnte das Routineprotokoll des Western-Blots ab dem Schritt des Blockens (vgl. 5.2.11.4.) weitergefahren werden.

#### **5.2.11.7. Auswertung**

Die Auswertung der erzeugten Filme wurde dann unter Zuhilfenahme der ImageStudioLite- Software vollzogen, nachdem die Bilder mittels des Scanners digitalisiert worden waren.

#### **5.2.12. Durchflusszytometrie**

Zirkulierende Fibroblasten im peripheren Blut wurden mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen.

Zunächst wurden den Mäusen 50-100µl EDTA-Vollblut entnommen, hinzu pipettierte man 3ml Pharmlyse (1:10 mit Aqua dest. verdünnt) und mischte die beiden Komponenten anschließend mittels des Rotationsmischgerätes ehe alles für 10min bei Raumtemperatur inkubiert wurde.

Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 1000rpm für 10min, der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet auf 100µl mit FACS (fluorescence-activated cell sorting)-Puffer-BSA aufgefüllt. Nach der Resuspension mittels des Rotationsmischgerätes wurden 250µl der Fixierung/Permeabilisierung Lösung hinzugegeben und das Gemisch bei 4°C im Dunkeln für 30min inkubiert.

Danach folgte die Zugabe von 1ml 1xPerm/Wash-Puffer (1:10 mit Aqua dest. verdünnt) und eine Zentrifugation bei 1750rpm für 10min, ehe der Überstand abgesaugt wurde und nochmals 1ml 1xPerm/Wash-Puffer (1:10 mit Aqua dest. verdünnt) hinzugegeben wurde. Nach der Resuspension mittels des Rotationsmischgerätes, folgte eine Zentrifugation für 10min bei 1750rpm. Hierauf wurde wiederum der Überstand abgesaugt, das Pellet auf 300 $\mu$  mit FACS-Puffer-BSA aufgefüllt und noch 30 $\mu$ l Fc-Block hinzugegeben. Die Mischung wurde dann bei 4°C für 10min inkubiert.

Nach der Inkubation folgte die Zugabe von 2 $\mu$ l des biotinylierten Antikörpers gegen Kollagen I. Nach kurzer Durchmischung mittels des Rotationsmischgerätes wurde die Suspension bei 4°C im Dunkeln für 45min inkubiert.

Anschließend wurden 2ml FACS-Puffer-PSA hinzu pipettiert, die Mischung bei 1750rpm für 10min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde mittels des Rotationsmischgerätes in 300 $\mu$ l FACS-Puffer-BSA sowie 10 $\mu$ l Streptavidin-FITC resuspendiert und für 30min bei 4°C im Dunkeln inkubiert.

Hierauf wurden 2ml FACS-Puffer-BSA hinzu pipettiert und der Überstand nach 10min Zentrifugation bei 1750rpm abgesaugt, ehe 2ml FACS-Puffer-BSA hinzugegeben wurden und die Mischung mittels des Rotationsmischgerätes resuspendiert wurde. Danach folgten wiederum 10min Zentrifugation bei 1750rpm, ein Absaugen des Überstandes und das Auffüllen auf 300 $\mu$ l mit FACS-Puffer-BSA. Nach der Zugabe von 2 $\mu$ l Antikörper gegen CD45 wurde die Suspension mittels des Rotationsmischgerätes gemischt und für 45min bei 4°C im Dunkeln inkubiert.

Schließlich wurden 2ml FACS-Puffer-BSA hinzu pipettiert, nach 10min Zentrifugation bei 1750rpm der Überstand abgesaugt und das Pellet in 2ml FACS-Puffer-BSA mittels des Rotationsmischgerätes resuspendiert. Darauf folgte eine erneute Zentrifugation für 10min bei 1750rpm und das Absaugen des Überstandes. Nach einer Resuspension in 200 $\mu$ l 1xPBS konnte die Messung vorgenommen werden.

### **5.2.13. Statistik**

Alle Ergebnisse wurden als arithmetisches Mittel  $\pm$  SEM (Standard error of the mean; Streuungsmaß für den Mittelwert) angegeben.

Die Auswertung erfolgte mittels der Computer gesteuerten Software Statistica. Sofern anwendbar wurde ein ANOVA Fischer-LSD Test bzw. bei nicht parametrischer Verteilung ein Kruskal-Wallis Test durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde für  $p < 0,05$  angenommen.

## 6. Ergebnisse

### 6.1. Einfluss der transaortalen Konstriktion und der Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff auf die Expression vom Raf-Kinase-Inhibitor-Protein

Um die Rolle des RKIP im myokardialen Remodeling und als Faktor der kardialer Fibrogenese zu eruieren, untersuchten wir zunächst die Expression von RKIP und phospho-RKIP nach entsprechender Behandlung mit CCl<sub>4</sub> beziehungsweise TAC.

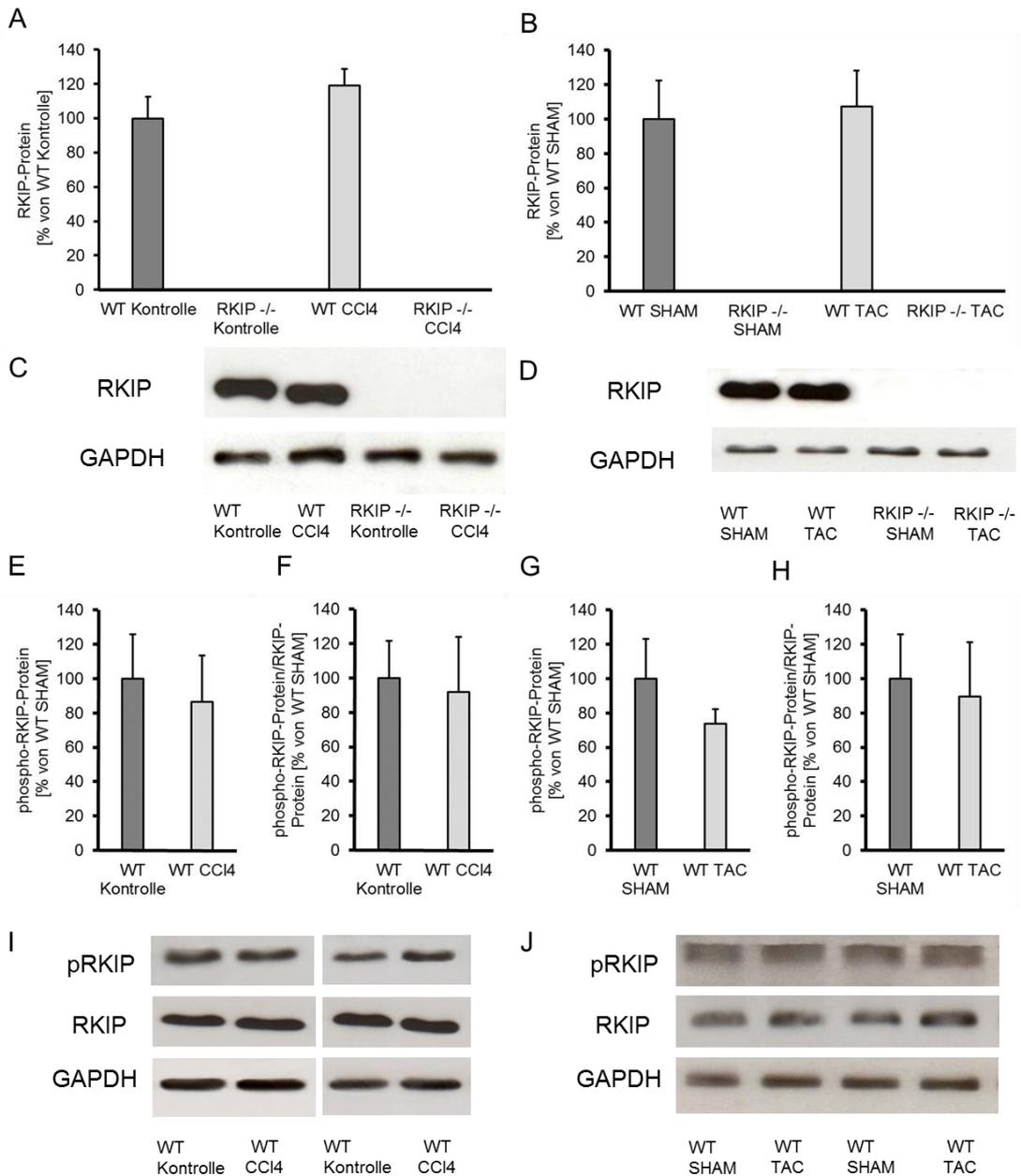
Methodisch wurden dazu Westernblots durchgeführt. In den Balkendiagrammen (vgl. Abb. 4A und 4B) ist der Quotient aus der RKIP- und der GAPD-DH Konzentration prozentual bezogen auf WT Kontrolle (bei CCl<sub>4</sub>- Behandlung, vgl. Abb. 4A) bzw. WT SHAM (bei TAC, vgl. Abb. 4B) angegeben. Abbildung 4 zeigt, dass sich weder durch eine sechswöchige Behandlung mit CCl<sub>4</sub> noch fünf Wochen nach TAC (auf 360 µm) eine signifikante Änderung in der Expression von RKIP ergab.

In Zahlen ergaben sich bei der CCl<sub>4</sub>- Gruppe für WT CCl<sub>4</sub> 119±10% vs. WT Kontrolle 100±13% (n.s.) bzw. RKIP<sup>-/-</sup> CCl<sub>4</sub> 0% vs. RKIP<sup>-/-</sup> Kontrolle 0% (n.s.). Für die TAC- Versuchsreihe betrug der Quotient RKIP durch GAPDH bezogen auf WT SHAM: WT TAC 107±21% vs. WT SHAM 100±22% (n.s.) bzw. RKIP<sup>-/-</sup> TAC 0% vs. RKIP<sup>-/-</sup> SHAM 0% (n.s.).

Auch auf die Phosphorylierung von RKIP hatten weder die TAC- noch die CCl<sub>4</sub>- Behandlung einen signifikanten Einfluss. Dies wurde mittels der Expression von pRKIP (in % WT Kontrolle bzw. in % von WT SHAM) und des Quotienten von pRKIP/RKIP (ebenfalls in % WT Kontrolle bzw. in % von WT SHAM) eruiert.

Die Werte lagen in der CCl<sub>4</sub>- Versuchsreihe für die Konzentration von pRKIP (in % WT Kontrolle) bei WT CCl<sub>4</sub> 102±21% vs. WT Kontrolle 100±18% (n.s.) und für den Quotienten aus pRKIP/RKIP (in % WT Kontrolle) bei WT CCl<sub>4</sub> 92±32% vs. WT Kontrolle 100±21% (n.s.). In der TAC- Versuchsreihe ergaben sich folgende Werte: Für die Konzentration von pRKIP (in % WT SHAM) bei WT TAC 74±9% vs. WT SHAM 100±23% (n.s.) und für den Quotienten aus pRKIP/RKIP (in % WT SHAM) bei WT TAC 90±32% vs. WT SHAM 100±26% (n.s.).

## Abbildung 4



### Abbildung 4- Expression von RKIP und pRKIP

Effekt einer Behandlung mit CCl<sub>4</sub> (6 Wochen, 0,7mg CCl<sub>4</sub> pro kg Körpergewicht zwei Mal pro Woche) bzw. einer transaortalen Konstriktion (TAC) (360µm, 5 Wochen) auf die Expression von RKIP und pRKIP

(A) Auswirkung der CCl<sub>4</sub>-Behandlung und (B) Auswirkung der TAC auf die Expression von RKIP

(C) repräsentativer Western Blot (Primärantikörper RKIP und GAPDH) der CCl<sub>4</sub>- Gruppe und der (D) TAC- Gruppe

(E) Auswirkung der CCl<sub>4</sub>-Behandlung auf die Expression von pRKIP und (F) RKIP/pRKIP

(G) Auswirkung der TAC auf die Expression von pRKIP und (H) RKIP/pRKIP

(I) repräsentativer Western Blot (Primärantikörper pRKIP, RKIP und GAPDH) der CCl<sub>4</sub>- Gruppe und der (J) TAC- Gruppe

## 6.2. Einfluss des Raf-Kinase-Inhibitor-Protein-Defizienz auf die hämodynamischen Parameter

Um einen möglichen Einfluss der RKIP- Defizienz auf die hämodynamischen Parameter zu erfassen, wurden in der CCl<sub>4</sub>- Gruppe der systolischen und der diastolische periphere Blutdruck sowie die Herzfrequenz erfasst. In der TAC- Gruppe wurde mittels Millar-Katheter Verfahren der systolische linksventrikuläre Druck ermittelt.

Bei der CCl<sub>4</sub>- Behandlung zeigten sich weder beim Blutdruck noch bei der Herzfrequenz signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (vgl. Abb. 5A).

Die TAC- Behandlung steigerte im Vergleich zur SHAM- OP den linksventrikulären systolischen Druck (WT TAC 122,6±26,3mmHg vs. WT SHAM 94,3±6,7mmHg, p<0,01 bzw. RKIP<sup>-/-</sup> TAC 112,5±4,6mmHg vs. RKIP<sup>-/-</sup> SHAM 83,2±6,5mmHg, p<0,01; vgl. Abb. 5B). Der Unterschied zwischen WT- und RKIP<sup>-/-</sup> TAC- Tieren war nicht signifikant.

Abbildung 5

A

	<b>WT Kontrolle</b>	<b>RKIP<sup>-/-</sup> Kontrolle</b>	<b>WT CCl<sub>4</sub></b>	<b>RKIP<sup>-/-</sup> CCl<sub>4</sub></b>
<b>Systolischer peripherer Blutdruck [mmHg]</b>	111,1± 0,8	105,7± 0,9	112,3± 1,1	110,2± 0,9
<b>Diastolischer peripherer Blutdruck [mmHg]</b>	81,9± 1,5	80,7± 1,2	83,1± 1,6	81,5± 1,2
<b>Herzfrequenz [bpm]</b>	550± 8,7	478± 5,8	505± 6,7	510± 7

B

	<b>WT SHAM</b>	<b>RKIP<sup>-/-</sup> SHAM</b>	<b>WT TAC</b>	<b>RKIP<sup>-/-</sup> TAC</b>
<b>Systolischer LV- Druck [mmHg]</b>	94,3± 6,7	83,2± 6,5	122,6± 6,3*	112,5± 4,6 <sup>#</sup>

**Abbildung 5- Hämodynamik**

Effekt einer Behandlung mit CCl<sub>4</sub> (6 Wochen, 0,7mg CCl<sub>4</sub> pro kg Körpergewicht zwei Mal pro Woche) bzw. einer transaortalen Konstriktion (360µm, 5 Wochen) auf die hämodynamischen Parameter

\*p<0,01 vs. WT SHAM

<sup>#</sup>p<0,01 vs. RKIP<sup>-/-</sup> SHAM

### 6.3. Einfluss der Raf-Kinase-Inhibitor-Protein-Defizienz auf die kardiale Fibrose

Das Ausmaß der Fibrose wurde über drei Parameter erfasst: Dem prozentualen Anteil von Kollagen am Gesamtmyokard, der Anzahl der Fibroblasten pro mm<sup>2</sup> sowie der mRNA-Expression von Kollagen I $\alpha$ 2.

#### 6.3.1. Interstitielle Fibrose

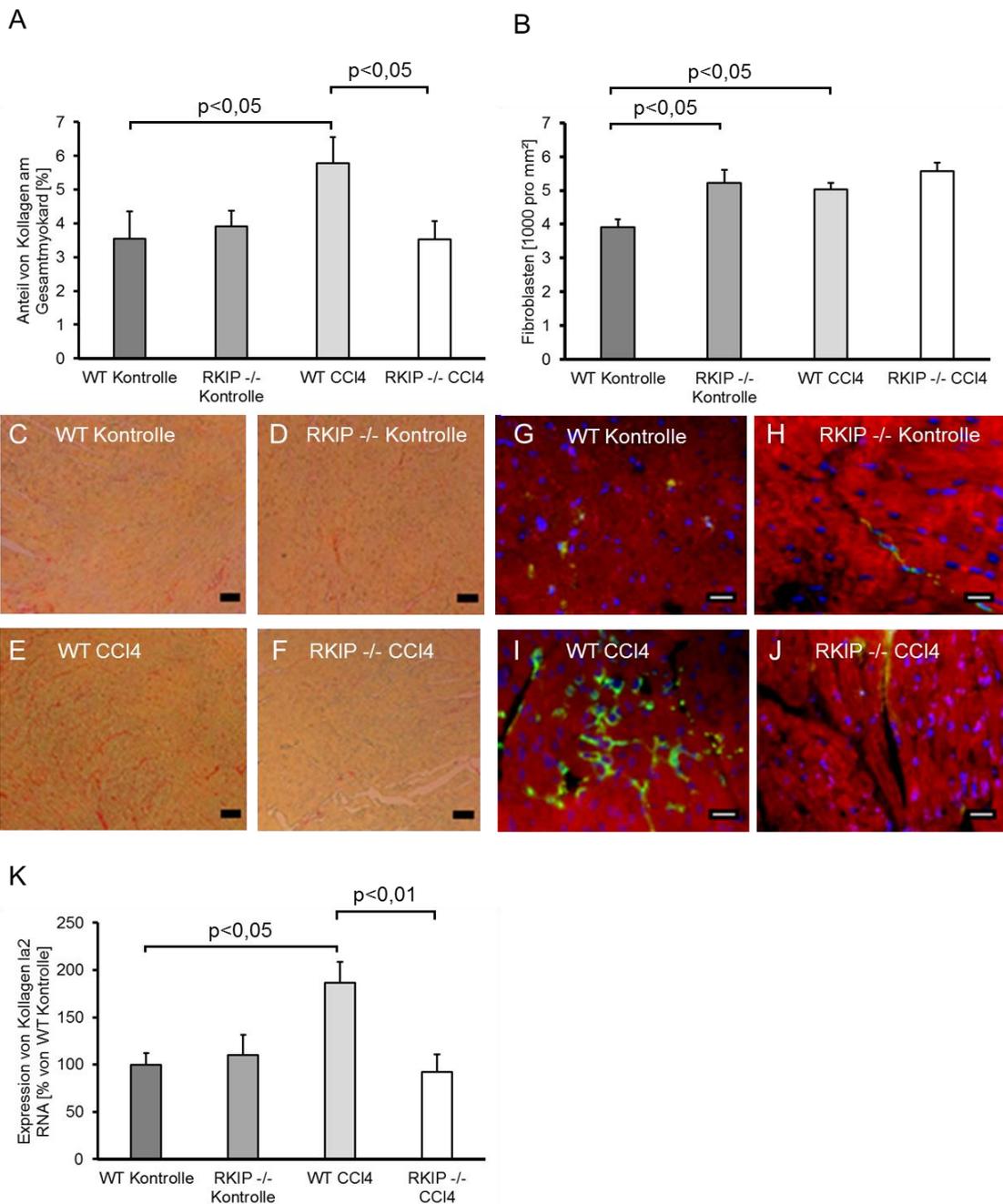
Das Hauptinteresse des Projektes galt der Untersuchung kardialer Fibrogenese mittels zweier verschiedener Fibrosemodelle. CCl<sub>4</sub> wurde hierbei zur Induktion einer interstitiellen Fibrose eingesetzt.

Die CCl<sub>4</sub>- Behandlung in der WT- Gruppe steigerte den Anteil von Kollagen am Gesamtmyokard (vgl. Abb. 6A) (WT CCl<sub>4</sub> 5,8 $\pm$ 0,8% vs. WT Kontrolle 3,6 $\pm$ 0,8%, p<0,05), während in der RKIP<sup>-/-</sup>- Gruppe kein signifikanter Anstieg nachweisbar war (RKIP<sup>-/-</sup> CCl<sub>4</sub> 3,5 $\pm$ 0,5% vs. RKIP<sup>-/-</sup> Kontrolle 3,9 $\pm$ 0,5%, n.s.). RKIP<sup>-/-</sup>- Mäuse entwickelten bei CCl<sub>4</sub>- Behandlung einen signifikant kleineren Anteil an myokardialem Kollagen als WT- Tiere.

Auch die Anzahl der Fibroblasten pro mm<sup>2</sup> (vgl. Abb. 6B) war in der behandelten WT- Gruppe größer als in der unbehandelten WT- Gruppe (WT CCl<sub>4</sub> 5039 $\pm$ 191 vs. WT Kontrolle 3913 $\pm$ 236, p<0,05) während bei der Behandlung der RKIP<sup>-/-</sup>- Gruppe kein Anstieg entstand (RKIP<sup>-/-</sup> CCl<sub>4</sub> 5567 $\pm$ 262 vs. RKIP<sup>-/-</sup> Kontrolle 5231 $\pm$ 373, n.s.).

Mittels quantitativer Real-Time-PCR wurde die Expression von Kollagen-I- $\alpha$ 2-RNA gemessen (vgl. Abb. 6K). In der WT- Gruppe kam es zu einem Anstieg der RNA- Expression (WT CCl<sub>4</sub> 186 $\pm$ 22,1% vs. WT Kontrolle 100 $\pm$ 12,0%, p<0,05), welcher für die RKIP<sup>-/-</sup>- Gruppe nicht nachzuweisen war (RKIP<sup>-/-</sup> CCl<sub>4</sub> 92 $\pm$ 18,3% vs. RKIP<sup>-/-</sup> Kontrolle 110 $\pm$ 21,5%, n.s.). RKIP<sup>-/-</sup>- Mäuse hatten bei CCl<sub>4</sub>- Behandlung einen niedrigere Kollagen-I $\alpha$ 2-RNA Expression als WT- Tiere (WT CCl<sub>4</sub> 186 $\pm$ 22% vs. RKIP<sup>-/-</sup> CCl<sub>4</sub> 92 $\pm$ 18%, p<0,01).

## Abbildung 6



### Abbildung 6- interstitielle Fibrose

Effekt einer Behandlung mit CCl<sub>4</sub> (6 Wochen, 0,7mg CCl<sub>4</sub> pro kg Körpergewicht zwei Mal pro Woche) auf die interstitielle Fibrose

(A) Auswirkung der CCl<sub>4</sub>-Behandlung auf den Anteil von Kollagen am Gesamtmyokard und (B) auf die Anzahl der Fibroblasten pro mm<sup>2</sup>

(C) – (F) Bilder von Sirius Red gefärbten linksventrikulären Schnitten der CCl<sub>4</sub>- Gruppe

(G) – (J) Bilder von der Immunfärbung für Fibronectin an linksventrikulären Schnitten der CCl<sub>4</sub>- Gruppe

(K) Auswirkungen die Auswirkung der CCl<sub>4</sub>-Behandlung auf die Expression von Kollagen-Ia2- RNA

Die Skala entspricht 30µm

### 6.3.2. Ersatzfibrose

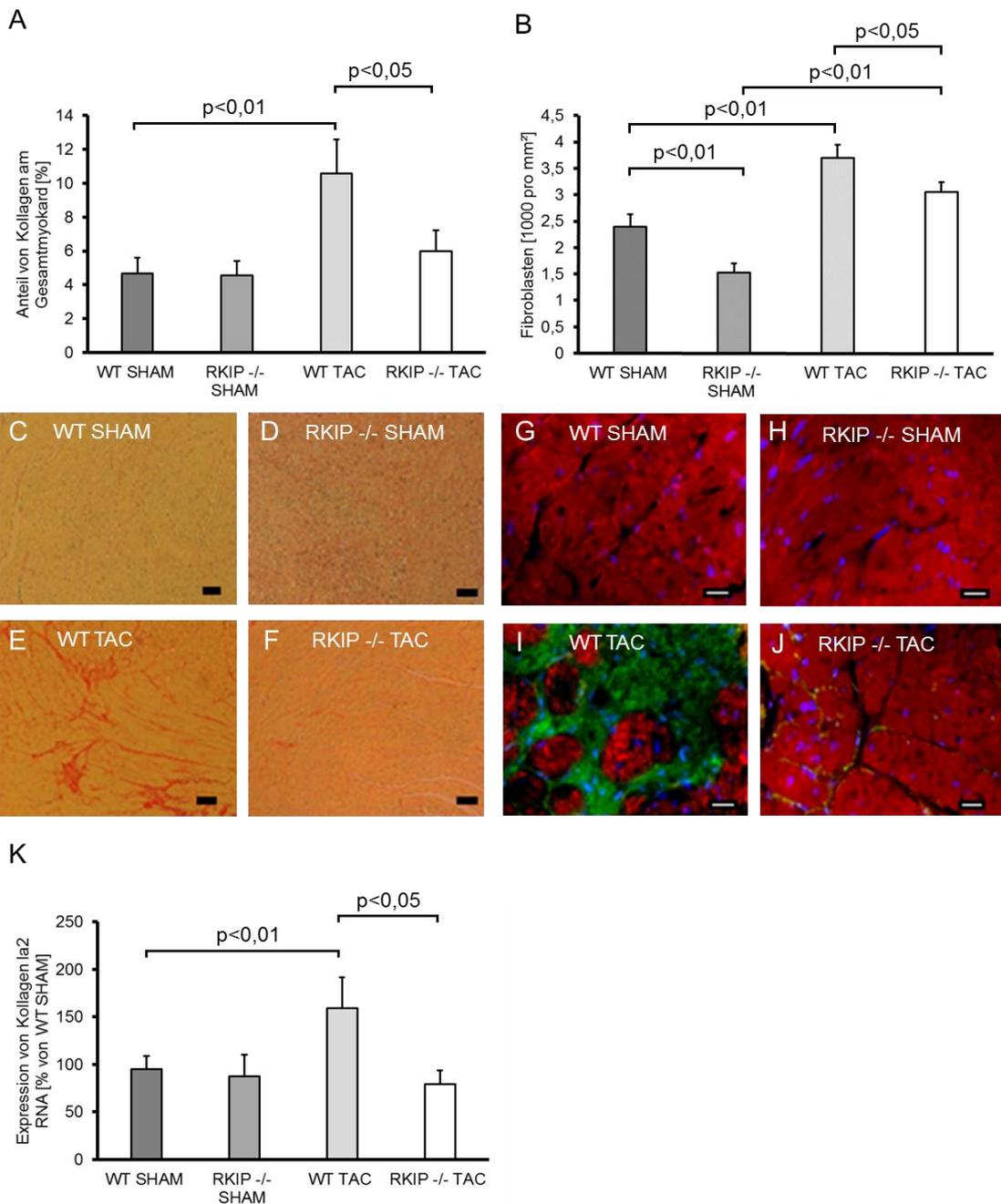
Das Hauptinteresse des Projektes galt der Untersuchung kardialer Fibrogenese mittels zweier verschiedener Fibrosemodelle. Die TAC wurde hierbei zur Induktion einer Ersatzfibrose benutzt.

Die fünfwöchige TAC- Behandlung steigerte in der WT- Gruppe den Anteil von Kollagen am Gesamtmyokard (vgl. Abb. 7A) (WT TAC  $10,6 \pm 2\%$  vs. WT SHAM  $4,7 \pm 0,9\%$ ,  $p < 0,01$ ), während in der RKIP<sup>-/-</sup>- Gruppe kein Anstieg nachweisbar war (RKIP<sup>-/-</sup> TAC  $6 \pm 1,3\%$  vs. RKIP<sup>-/-</sup> SHAM  $4,6 \pm 0,9\%$ , n.s.). RKIP<sup>-/-</sup>- Mäuse entwickelten bei TAC- Behandlung einen signifikant kleineren Anteil an myokardialem Kollagen als WT- Tiere (RKIP<sup>-/-</sup> TAC  $6 \pm 1,3\%$  vs. WT TAC  $10,6 \pm 2\%$ ,  $p < 0,05$ ).

Die Anzahl der Fibroblasten pro mm<sup>2</sup> (vgl. Abb. 7B) war in sowohl der behandelten WT- Gruppe größer als in der unbehandelten WT- Gruppe (WT TAC  $3701 \pm 240$  vs. WT SHAM  $2400 \pm 228$ ,  $p < 0,01$ ) als auch bei der Behandlung der RKIP<sup>-/-</sup>- Gruppe (RKIP<sup>-/-</sup> TAC  $3050 \pm 189$  vs. RKIP<sup>-/-</sup> SHAM  $1531 \pm 174$ ,  $p < 0,01$ ). WT- Mäuse hatten dabei sowohl nach TAC- (WT TAC  $3701 \pm 240$  vs. RKIP<sup>-/-</sup> TAC  $3050 \pm 189$ ,  $p < 0,05$ ) als auch nach SHAM-OP (RKIP<sup>-/-</sup> SHAM  $1531 \pm 174$  vs. WT SHAM  $2400 \pm 228$ ,  $p < 0,01$ ) eine höhere Anzahl von Fibroblasten pro mm<sup>2</sup> als die entsprechende RKIP<sup>-/-</sup>- Gruppe.

Mittels quantitativer Real-Time-PCR wurde die Expression von Kollagen-I- $\alpha 2$ -RNA gemessen (vgl. Abb. 7K), hier konnte gezeigt werden, dass es in der WT- Gruppe zu einem Anstieg der RNA- Expression kam (WT TAC  $159 \pm 32,2\%$  vs. WT SHAM  $95 \pm 14,3\%$ ,  $p < 0,01$ ), welcher für die RKIP<sup>-/-</sup>- Gruppe nicht nachgewiesen werden konnte (RKIP<sup>-/-</sup> TAC  $79 \pm 14,6\%$  vs. RKIP<sup>-/-</sup> SHAM  $95 \pm 14,3\%$ , n.s.). RKIP<sup>-/-</sup>- Mäuse hatten bei TAC- Behandlung eine niedrigere Kollagen-I- $\alpha 2$ -RNA Expression als WT- Tiere (RKIP<sup>-/-</sup> TAC  $79 \pm 14,6\%$  vs. WT TAC  $159 \pm 32,2\%$ ,  $p < 0,05$ ).

## Abbildung 7



### Abbildung 7- Ersatzfibrose

Effekt einer transaortalen Konstriktion (TAC) (360µm, 5 Wochen) auf die Ersatzfibrose  
 (A) Auswirkung der TAC auf den Anteil von Kollagen am Gesamtmyokard und (B) auf die Anzahl der Fibroblasten pro mm<sup>2</sup>

(C) – (F) Bilder von Sirius Red gefärbten linksventrikulären Schnitten der TAC- Gruppe  
 (G) – (J) Bilder von der Immunfärbung für Fibronectin an linksventrikulären Schnitten der TAC- Gruppe

(K) Auswirkung der TAC auf die Expression von Kollagen-Iα2- RNA

Die Skala entspricht 30µm

### 6.3.3. Zirkulierende Fibroblasten und Fibroblastenmigration

Mittels einer Ko-Immunfärbung für CXCR4 und intrazelluläres Fibronectin wurde der prozentuale Anteil der zirkulierenden Fibroblasten (Fibrozyten) im Myokard des linken Ventrikels bestimmt.

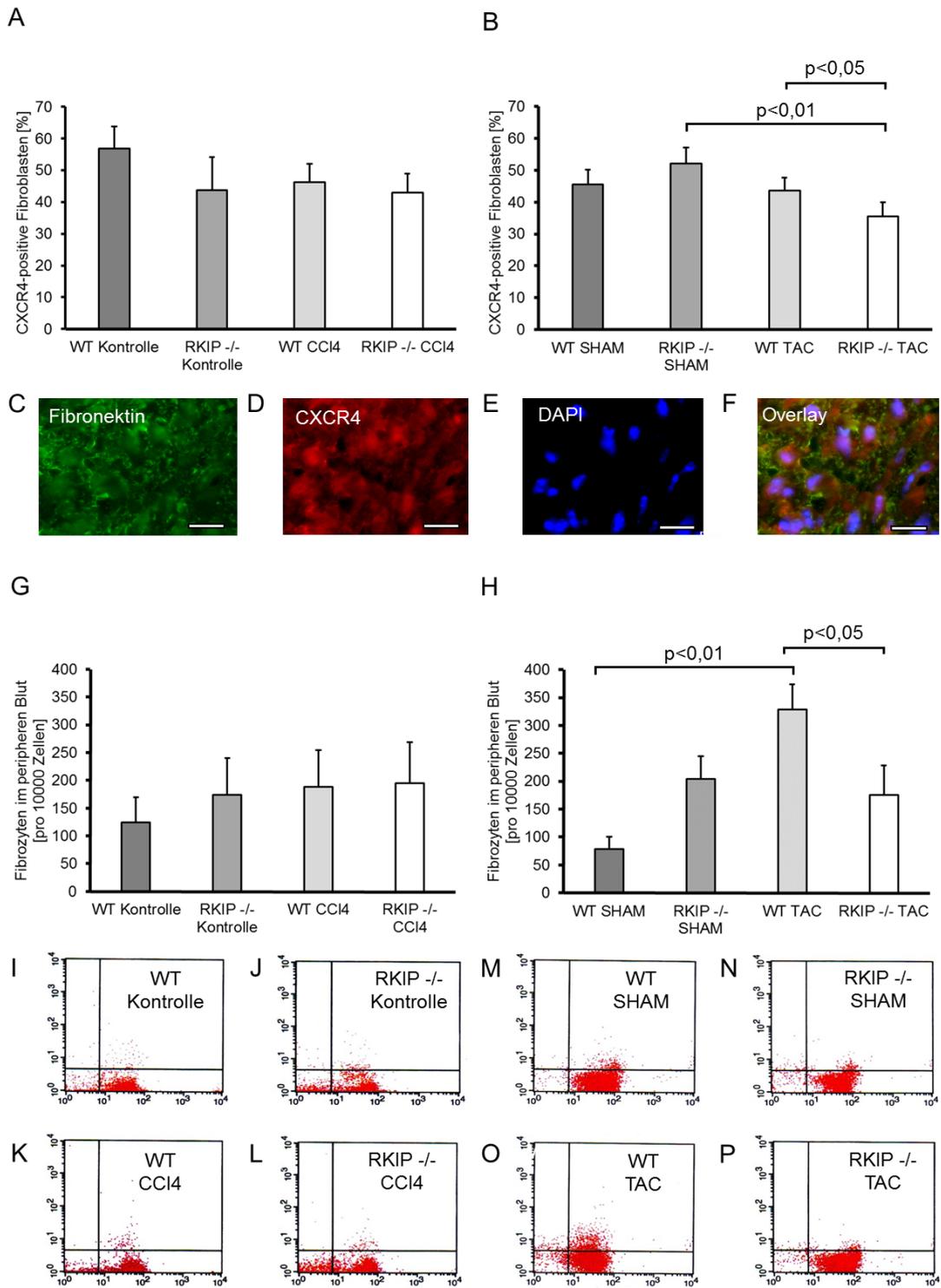
Diese Ergebnisse wurden mittels einer FACS Analyse der Zelltypen im peripheren Blut verifiziert. Hier wurden Zellen die sowohl für Kollagen als auch für CD45 positiv waren als Fibrozyten markiert und gezählt. Außerdem konnten über Zellkulturversuche und einem Migrationsassay mit anschließender Immunfärbung für Fibronectin die Migrationskapazität von WT- bzw. RKIP<sup>-/-</sup>-Fibroblasten erforscht werden.

In der CCl<sub>4</sub>-Versuchsreihe zeigten sich für den prozentualen Anteil der zirkulierenden (CXCR4 positiven) Fibroblasten keine Unterschiede (WT CCl<sub>4</sub> 46,7±5,7% vs. WT Kontrolle 57±7%, n.s. sowie RKIP<sup>-/-</sup> CCl<sub>4</sub> 43±6% vs. RKIP<sup>-/-</sup> Kontrolle 44±10,3%, n.s.; vgl. Abb. 8A). Bei den mit TAC behandelten Mäusen ergab sich in der WT-Gruppe kein Unterschied (WT TAC 44±4% vs. WT SHAM 46±4,6%, n.s.), während der Anteil der CXCR4 positiven Fibroblasten in der RKIP<sup>-/-</sup> TAC-Gruppe niedriger als in der RKIP<sup>-/-</sup> SHAM-Gruppe war (RKIP<sup>-/-</sup> TAC 36±4,3% vs. RKIP<sup>-/-</sup> SHAM 52±5%, p<0,01; vgl. Abb. 8B). Die WT TAC-Mäuse wiesen gegenüber den RKIP<sup>-/-</sup> TAC-Tieren einen erhöhten Anteil an CXCR4 positiven Fibroblasten auf (WT TAC 44±4% vs. RKIP<sup>-/-</sup> TAC 36±4,3%, p<0,05).

Auch die Daten der Fibrozyten im peripheren Blut, welche mittels FACS ermittelt wurden, zeigten in der CCl<sub>4</sub>-Versuchsreihe keine Unterschiede (WT CCl<sub>4</sub> 188,6±66,3 vs. WT Kontrolle 124,8±44,7, n.s. sowie RKIP<sup>-/-</sup> CCl<sub>4</sub> 195,4±73,5 vs. RKIP<sup>-/-</sup> Kontrolle 174,3±65,6, n.s.; vgl. Abb. 8G). Bei den mit TAC behandelten Mäusen ergab sich in der WT-Gruppe signifikant mehr Fibrozyten bei TAC als bei den SHAM behandelten Tieren (WT TAC 328,7±45,5 vs. WT SHAM 46±4,6, p<0,01), während in der RKIP<sup>-/-</sup>-Gruppe keine Unterschiede zu verzeichnen waren (RKIP<sup>-/-</sup> TAC 175,2±53,1 vs. RKIP<sup>-/-</sup> SHAM 204,2±40,4, n.s.; vgl. Abb. 8H). Die WT TAC-Mäuse wiesen gegenüber den RKIP<sup>-/-</sup> TAC-Tieren einen erhöhten Anteil an Fibrozyten im peripheren Blut auf (WT TAC 328,7±45,5 vs. RKIP<sup>-/-</sup> TAC 175,2±53, p<0,05).

Nach Fibroblasten Isolation aus Mausherzen und Anzucht in der Zellkultur wurden mittels eines Migrationsassays und der anschließenden Immunfärbung für Fibronectin außerdem gezeigt, dass WT Fibroblasten gegenüber RKIP<sup>-/-</sup> Fibroblasten eine signifikant höhere Migrationskapazität haben (vgl. Abb. 9A). Hierbei wurde die Zahl der migrierten Fibroblasten pro 0,3cm<sup>2</sup> gezählt (WT Fibroblasten 739±69 vs. RKIP<sup>-/-</sup> Fibroblasten 573±116, p<0,05).

# Abbildung 8



**Abbildung 8- zirkulierende Fibroblasten**

Fortsetzung der Beschriftung auf der folgenden Seite

Effekt einer Behandlung mit CCl<sub>4</sub> (6 Wochen, 0,7mg CCl<sub>4</sub> pro kg Körpergewicht zwei Mal pro Woche) bzw. einer transaortalen Konstriktion (TAC) (360µm, 5 Wochen) auf die Zirkulation der Fibroblasten

(A) Auswirkung der CCl<sub>4</sub>-Behandlung und (B) Auswirkungen der TAC auf die Zirkulation der Fibroblasten (bestimmt durch den Anteil der CXCR4-positiven Fibroblasten)

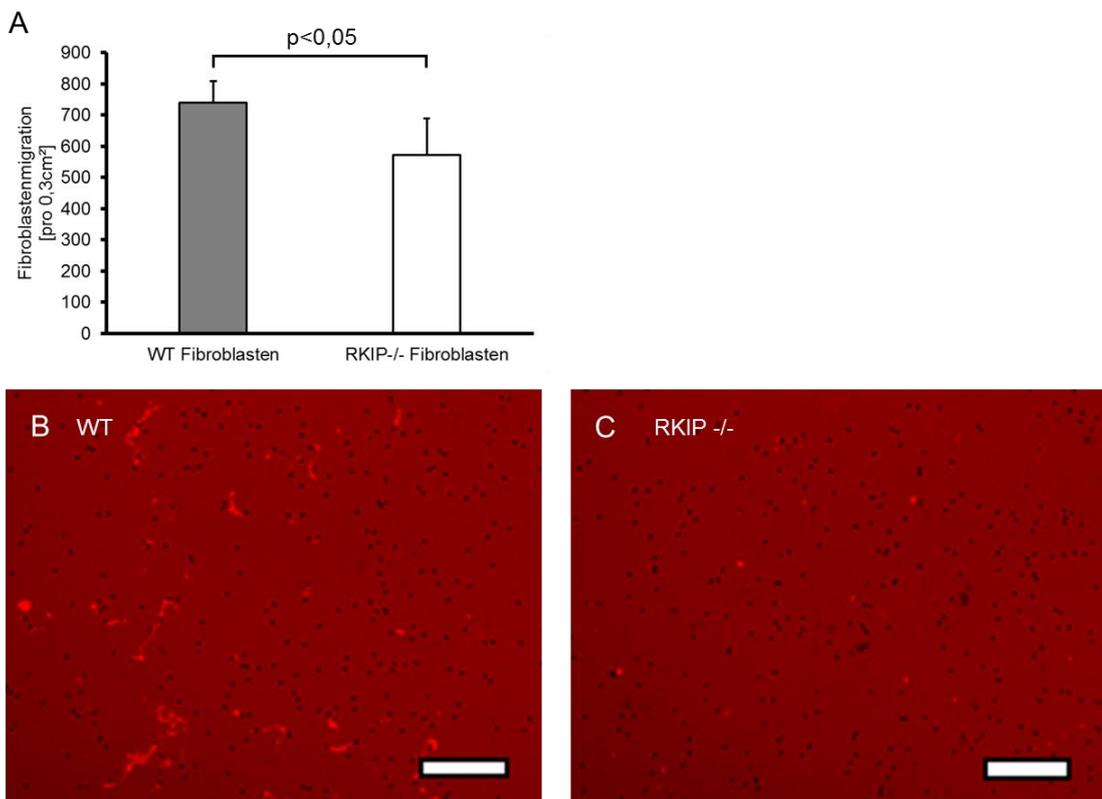
(C) – (F) Bilder der Immunfärbung für Fibronectin und CXCR4 sowie der Färbung mit DAPI

(G) Auswirkung der CCl<sub>4</sub>-Behandlung und (H) Auswirkung der TAC auf die Anzahl der Fibrozyten im peripheren Blut

(I) – (P) zeigt die FACS Daten der Analyse der Zelltypen im peripheren Blut

Die Skala entspricht 30µm

Abbildung 9



### Abbildung 9- Fibroblastenmigration

Effekt des RKIP- Knockouts auf die Migration der Fibroblasten

(A) Auswirkungen des RKIP- Knockouts auf die Migration der Fibroblasten

(B) und (C) Bilder von Fibronectin- Immungefärbten Membranen aus der modifizierten Boyden-Kammer

Die Skala entspricht 30µm

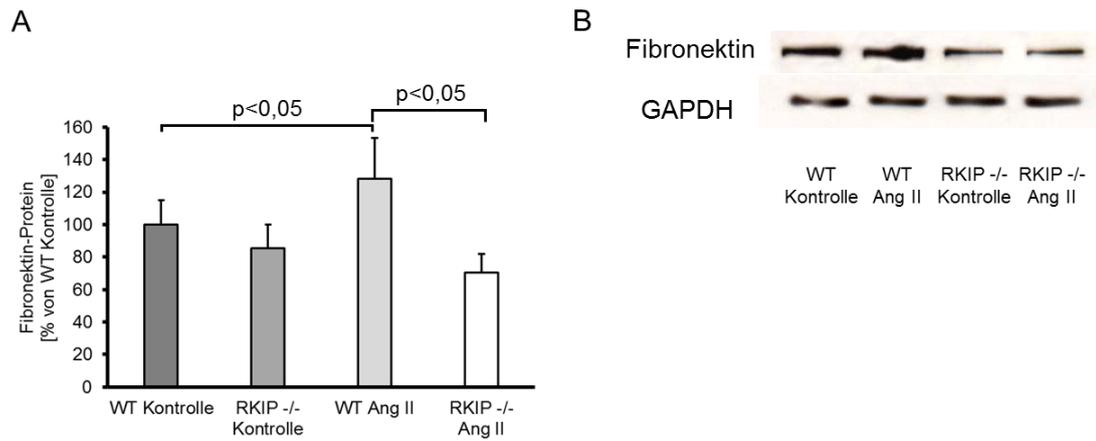
#### 6.3.4. Matrixproduktion der Fibroblasten

Durch Behandlung der kultivierten Fibroblasten mit Angiotensin II wurde der Einfluss der RKIP- Defizienz in adulten kardialen Fibroblasten auf die Produktion von Matrixproteinen untersucht.

Hierzu wurden die isolierten Fibroblasten für acht Stunden mit 1mM Angiotensin II behandelt. Anschließend kam eine Bestimmung der Proteinkonzentration vom Fibronektin zum Einsatz um die daraus resultierende Veränderung auf die Matrixproduktion der Fibroblasten zu quantifizieren.

Es zeigten sich ein Anstieg der Fibronektin- Produktion nach Angiotensin II Behandlung in der WT- Gruppe (WT Ang II  $128\pm 25\%$  vs. WT Kontrolle  $100\pm 15\%$ ,  $p < 0,05$ ). In der RKIP<sup>-/-</sup> - Gruppe war kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen (RKIP<sup>-/-</sup> Ang II  $70\pm 12\%$  vs. RKIP<sup>-/-</sup> Kontrolle  $85\pm 15\%$ , n.s.). Durch RKIP- Defizienz war die Fibronektin- Produktion nach Angiotensin II Behandlung vermindert (WT Ang II  $128\pm 25\%$  vs. RKIP<sup>-/-</sup> Ang II  $70\pm 12\%$ ,  $p < 0,05$ ; vgl. Abb. 10A).

## Abbildung 10



### Abbildung 10- Matrixproduktion der Fibroblasten

Effekt einer Behandlung der Fibroblasten mit Angiotensin II (1mM, 8h) auf die Matrixproduktion der Fibroblasten.

(A) Auswirkung der Angiotensin II Behandlung auf die Matrixproduktion der Fibroblasten (bestimmt anhand der Konzentration von Fibronectin-Protein)

(B) repräsentativer Western Blot (Primärantikörper Fibronectin und GAPDH)

## 6.4. Einfluss der Raf-Kinase-Inhibitor-Protein-Defizienz auf das kardiale Remodeling

### 6.4.1. Zellproliferation

Zur Untersuchung der Zellproliferation wurde eine Immunfärbung mit Ki67 angefertigt und in den Präparaten die Ki67-positiven Kardiomyozyten bzw. Fibroblasten gezählt, um so deren prozentualen Anteil zu ermitteln.

In der CCl<sub>4</sub>- Versuchsreihe zeigte sich ein Anstieg der Ki67 positiven Kardiomyozyten in der WT-Gruppe (WT CCl<sub>4</sub> 0,069±0,025‰ vs. WT Kontrolle 0‰, p<0,05) während in der RKIP<sup>-/-</sup>- Gruppe kein Anstieg zu verzeichnen war (RKIP<sup>-/-</sup> CCl<sub>4</sub> 0,026±0,014‰ vs. RKIP<sup>-/-</sup> Kontrolle 0,028±0,013‰, n.s.; vgl. Abb. 11A). Die mit CCl<sub>4</sub> behandelten RKIP<sup>-/-</sup>- Tiere wiesen weniger Zellproliferation der Kardiomyozyten als die behandelte WT- Gruppe auf (WT CCl<sub>4</sub> 0,069±0,025‰ vs. RKIP<sup>-/-</sup> CCl<sub>4</sub> 0,026±0,014‰, p<0,05).

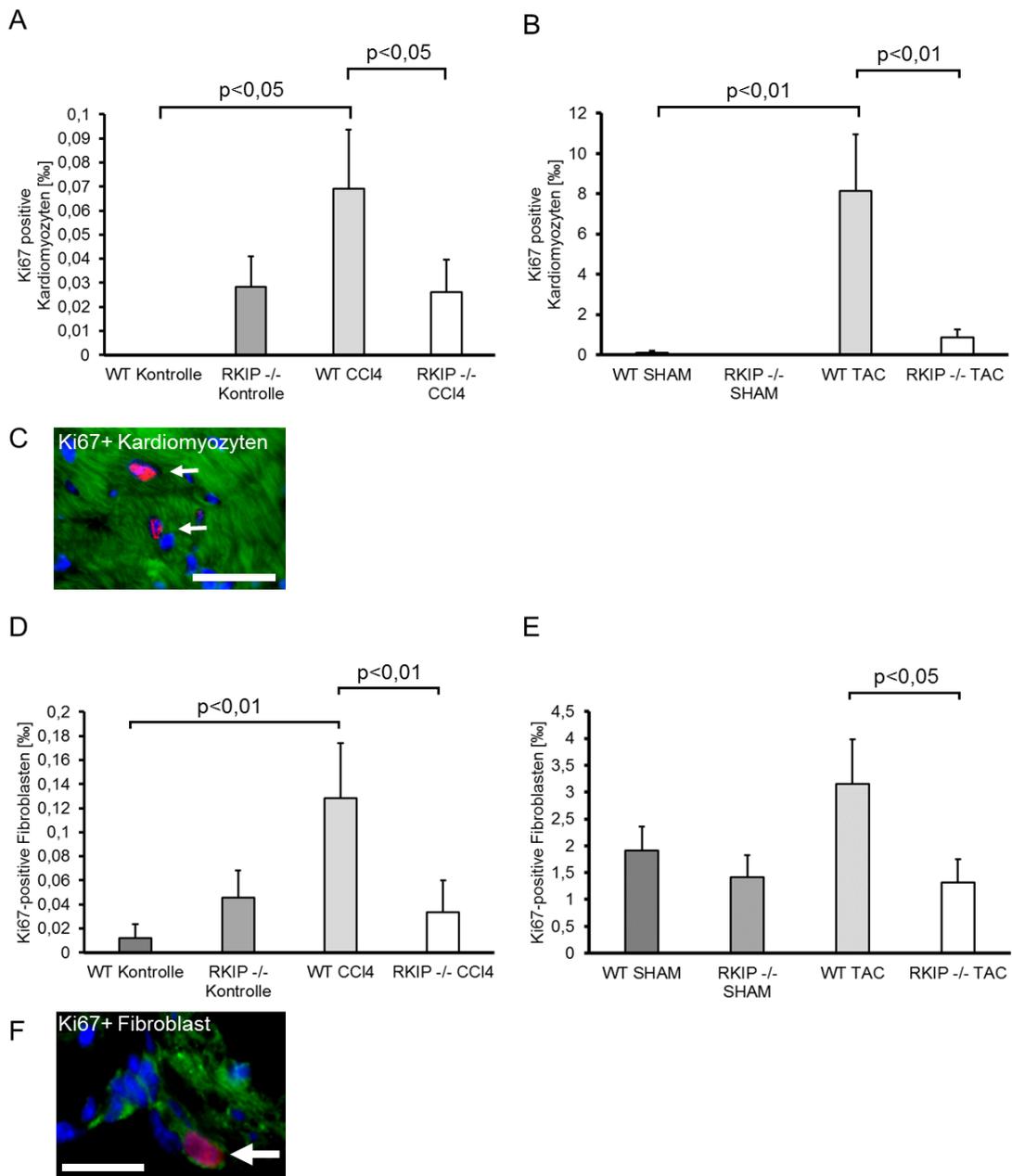
Auch bei den mit TAC behandelten Mäusen ergab sich in der WT- Gruppe ein Unterschied (WT TAC 8,129±2,824‰ vs. WT SHAM 0,112±0,080‰, p<0,01), während der Anteil der Ki67 positiven Kardiomyozyten in der RKIP<sup>-/-</sup>- Gruppe nicht unterschiedlich war (RKIP<sup>-/-</sup> TAC 0,850±0,416‰ vs. RKIP<sup>-/-</sup> SHAM 0,023±0,017‰, n.s.; vgl. Abb. 11B). Die mit TAC behandelten RKIP<sup>-/-</sup>- Tiere wiesen auch hier weniger Zellproliferation der Kardiomyozyten als die behandelte WT- Gruppe auf (WT TAC 8,129±2,824‰ vs. RKIP<sup>-/-</sup> TAC 0,850±0,416‰, p<0,01).

Bei der Zellproliferation der Fibroblasten ergaben sich höhere Proliferationsraten bei den WT CCl<sub>4</sub>- Tieren als bei den WT Kontrolle- Tieren (WT CCl<sub>4</sub> 0,128±0,046‰ vs. WT Kontrolle 0,012±0,012‰, p<0,01), während in der RKIP<sup>-/-</sup>- Gruppe keine Unterschiede auftraten (RKIP<sup>-/-</sup> CCl<sub>4</sub> 0,033±0,027‰ vs. RKIP<sup>-/-</sup> Kontrolle 0,046±0,022‰, n.s.; vgl. Abb. 11D). Der Prozentsatz der Ki-67 positiven Fibroblasten waren in der WT CCl<sub>4</sub>- Gruppe höher als in der RKIP<sup>-/-</sup> CCl<sub>4</sub>- Gruppe (WT CCl<sub>4</sub> 0,128±0,046‰ vs. RKIP<sup>-/-</sup> CCl<sub>4</sub> 0,033±0,027‰, p<0,01).

In der TAC- Versuchsreihe gab es bezüglich der Fibroblastenproliferation keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der TAC vs. SHAM Gruppen (WT TAC

3,147±0,830‰ vs. WT SHAM 1,413±0,410‰, n.s. bzw. RKIP<sup>-/-</sup> TAC 1,311±0,434‰ vs. RKIP<sup>-/-</sup> SHAM 1,413±0,410‰, n.s), jedoch zeigte WT TAC signifikant mehr Ki67-positive Fibroblasten als RKIP<sup>-/-</sup> TAC (WT TAC 3,147±0,830‰ vs. RKIP<sup>-/-</sup> TAC 1,311±0,434‰, p<0,05; vgl. Abb. 11E).

## Abbildung 11



### Abbildung 11- Zellproliferation

Effekt einer Behandlung mit CCl<sub>4</sub> (6 Wochen, 0,7mg CCl<sub>4</sub> pro kg Körpergewicht zwei Mal pro Woche) bzw. einer transaortalen Konstriktion (TAC) (360µm, 5 Wochen) auf die Zellproliferation der Kardiomyozyten und Fibroblasten

(A) Auswirkung der CCl<sub>4</sub>-Behandlung und (B) Auswirkungen der TAC auf die Zellproliferation der Kardiomyozyten (bestimmt durch den Anteil der Ki67-positiven Kardiomyozyten)

(C) repräsentativer Ki67-positiver Kardiomyozyt (Immunfärbung für Fibronectin und Ki67)

(D) Auswirkungen der CCl<sub>4</sub>-Behandlung und (E) Auswirkungen der TAC auf die Zellproliferation der Fibroblasten (bestimmt durch den Anteil der Ki67-positiven Fibroblasten)

(F) repräsentativer Ki67-positiver Fibroblast (Immunfärbung für Fibronectin und Ki67)

Die Skala entspricht 30µm

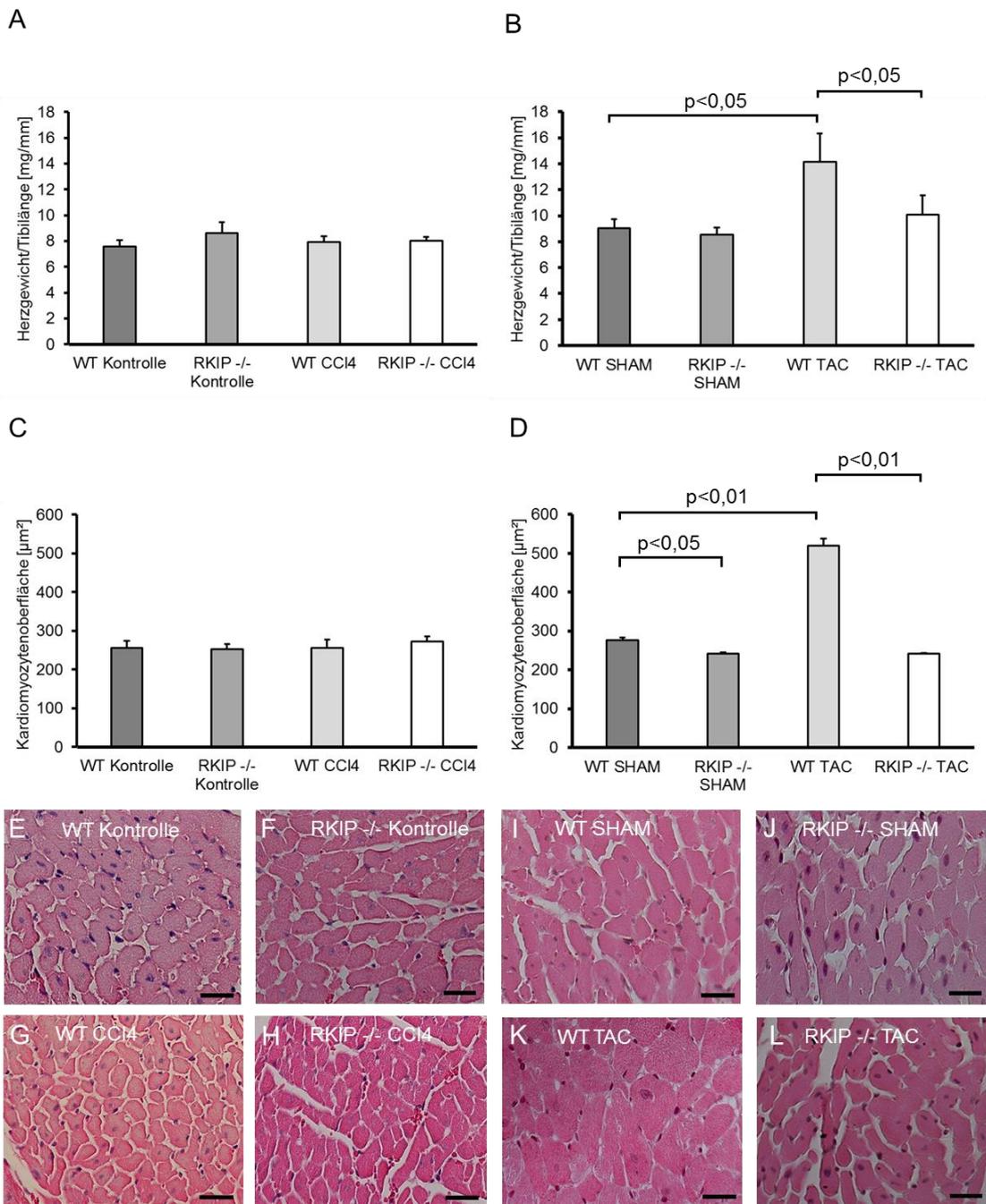
## 6.4.2. Myokardiale und kardiomyozytäre Hypertrophie

Zur Untersuchung der Hypertrophie wurde zum einen der Quotient aus Herzgewicht und Tibiallänge zur Quantifizierung der myokardialen Hypertrophie und zum anderen die Kardiomyozytenoberfläche als Marker der kardiomyozytären Hypertrophie benutzt.

Die myokardiale Hypertrophie ergab in der CCl<sub>4</sub>- Versuchsreihe keine relevanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (WT CCl<sub>4</sub>  $7,9 \pm 0,5 \frac{mg}{mm}$  vs. WT Kontrolle  $7,6 \pm 0,5 \frac{mg}{mm}$ , n.s. bzw. RKIP<sup>-/-</sup> CCl<sub>4</sub>  $8 \pm 0,3 \frac{mg}{mm}$  vs. RKIP<sup>-/-</sup> Kontrolle  $8,6 \pm 0,9 \frac{mg}{mm}$ , n.s.; vgl. Abb. 12A). Bei den TAC- Versuchen hingegen zeigte sich nach aortenkonstriktiver Operation eine deutliche Zunahme der myokardialen Masse der WT- Tiere (WT TAC  $14,1 \pm 2,2 \frac{mg}{mm}$  vs. WT SHAM  $9 \pm 0,7 \frac{mg}{mm}$ ,  $p < 0,05$ ) während die RKIP defizienten Mäuse keine signifikante myokardiale Hypertrophie entwickelten (RKIP<sup>-/-</sup> TAC  $10,1 \pm 1,5 \frac{mg}{mm}$  vs. RKIP<sup>-/-</sup> SHAM  $8,5 \pm 0,6 \frac{mg}{mm}$ , n.s.), sodass eine Reduktion der myokardialen Hypertrophie der RKIP<sup>-/-</sup> TAC- vs. WT TAC- Gruppe resultiert (RKIP<sup>-/-</sup> TAC  $10,1 \pm 1,5 \frac{mg}{mm}$  vs. WT TAC  $14,1 \pm 2,2 \frac{mg}{mm}$ ,  $p < 0,05$ ; vgl. Abb. 12B).

Auch die kardiomyozytäre Hypertrophie ergab in der CCl<sub>4</sub>- Versuchsreihe keine relevanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (WT CCl<sub>4</sub>  $256 \pm 21 \mu m^2$  vs. WT Kontrolle  $255 \pm 18 \mu m^2$ , n.s. bzw. RKIP<sup>-/-</sup> CCl<sub>4</sub>  $272 \pm 14 \mu m^2$  vs. RKIP<sup>-/-</sup> Kontrolle  $252 \pm 14 \mu m^2$ , n.s.; vgl. Abb. 12C). Doch auch hier zeigte sich bei den TAC- Versuchen nach aortenkonstriktiver Operation eine deutliche Zunahme der Kardiomyozytenoberfläche der WT- Tiere (WT TAC  $519 \pm 18 \mu m^2$  vs. WT SHAM  $276 \pm 6 \mu m^2$ ,  $p < 0,01$ ) während die RKIP defizienten Mäuse keine signifikante kardiomyozytäre Hypertrophie entwickelten (RKIP<sup>-/-</sup> TAC  $241 \pm 2 \mu m^2$  vs. RKIP<sup>-/-</sup> SHAM  $241 \pm 4 \mu m^2$ , n.s.), sodass eine Reduktion der myokardialen Hypertrophie der RKIP<sup>-/-</sup> TAC- vs. WT TAC- Gruppe (RKIP<sup>-/-</sup> TAC  $241 \pm 2 \mu m^2$  vs. WT TAC  $519 \pm 18 \mu m^2$ ,  $p < 0,01$ ) sowie RKIP<sup>-/-</sup> SHAM- vs. WT SHAM- Gruppe der resultiert (RKIP<sup>-/-</sup> SHAM  $241 \pm 4 \mu m^2$  vs. WT SHAM  $276 \pm 6 \mu m^2$ ,  $p < 0,05$ ; vgl. Abb. 12D).

## Abbildung 12



### Abbildung 12- myokardiale und kardiomyozytäre Hypertrophie

Effekt einer Behandlung mit CCl<sub>4</sub> (6 Wochen, 0,7mg CCl<sub>4</sub> pro kg Körpergewicht zwei Mal pro Woche) bzw. einer transaortalen Konstriktion (TAC) (360µm, 5 Wochen) auf die myokardiale (bestimmt durch den Quotienten aus Herzgewicht und Tibillänge) und kardiomyozytäre (bestimmt anhand der Kardiomyozytenoberfläche) Hypertrophie

(A) Auswirkung der CCl<sub>4</sub>-Behandlung und (B) Auswirkungen der TAC auf die myokardiale Hypertrophie

(C) zeigt die Auswirkungen der CCl<sub>4</sub>-Behandlung und (D) Auswirkungen der TAC auf die kardiomyozytäre Hypertrophie

(E) – (H) Bilder von H.E. gefärbten linksventrikulären Schnitten der CCl<sub>4</sub>- Gruppe

(I) – (L) Bilder von H.E. gefärbten linksventrikulären Schnitten der TAC- Gruppe

Die Skala entspricht 30µm

### 6.4.3. oxidativer Stress

Um oxidativen Stress zu quantifizieren wurden Immunfärbungen für 8-OHdG (8-Hydroxydeoxyguanosin) angefertigt und in den jeweiligen Präparaten der prozentuale Anteil der für 8-OHdG positiven Kardiomyozyten bzw. Fibroblasten bestimmt.

In der CCl<sub>4</sub>- Versuchsreihe zeigte sich nach Behandlung sowohl in der WT-Gruppe (WT CCl<sub>4</sub> 36,6±4,4% vs. WT Kontrolle 23,8±3%, p<0,05) als auch in der RKIP<sup>-/-</sup>- Gruppe (RKIP<sup>-/-</sup> CCl<sub>4</sub> 40±3,4% vs. RKIP<sup>-/-</sup> Kontrolle 26,6±2%, p<0,05) ein Anstieg der 8-OHdG positiven Fibroblasten (vgl. Abb. 13A).

Bei den Tieren der TAC- Versuchsreihe konnte in den WT- Gruppen ebenfalls ein Anstieg des oxidativen Stresses der Fibroblasten gezeigt werden (WT TAC 71±2,8% vs. WT SHAM 52±4,8%, p<0,05), während dieser in der RKIP<sup>-/-</sup>- Gruppe nicht nachzuweisen war (RKIP<sup>-/-</sup> TAC 50,3±5,5% vs. RKIP<sup>-/-</sup> SHAM 52±4,8%, n.s.). Die RKIP<sup>-/-</sup> TAC- Gruppe wies weniger 8-OHdG positive Fibroblasten als die WT TAC- Gruppe auf (RKIP<sup>-/-</sup> TAC 50,3±5,6% vs. WT TAC 71±2,8%, p<0,01; vgl. Abb. 13B).

Bei Betrachtung des oxidativen Stresses der Kardiomyozyten gab es in der CCl<sub>4</sub>- Versuchsreihe keine signifikanten Unterschiede (WT CCl<sub>4</sub> 16,1±4,1% vs. WT Kontrolle 6,6±2,1%, n.s. und RKIP<sup>-/-</sup> CCl<sub>4</sub> 16,4±2,7% vs. RKIP<sup>-/-</sup> Kontrolle 8,5±2%, n.s.; vgl. Abb. 13C).

WT TAC und WT SHAM hingegen (WT TAC 78,2±23,2% vs. WT SHAM 24,8±3,2%, p<0,01) und auch RKIP<sup>-/-</sup> TAC und RKIP<sup>-/-</sup> SHAM (RKIP<sup>-/-</sup> TAC 22±1,3% vs. RKIP<sup>-/-</sup> SHAM 5±1,2%, p<0,01) waren signifikant unterschiedlich. Ebenso hatte RKIP<sup>-/-</sup> SHAM weniger 8-OHdG positive Kardiomyozyten als WT SHAM (RKIP<sup>-/-</sup> SHAM 5±1,2% vs. WT SHAM 24,8±3,2%, p<0,01) und RKIP<sup>-/-</sup> TAC weniger als WT TAC (RKIP<sup>-/-</sup> TAC 22±1,3% vs. WT TAC 78,2±23,2%, p<0,01; vgl. Abb. 13D).

Als weiteren Methode zur Quantifizierung des oxidativen Stresses wurde die zytosolische sowie nukleäre Proteinkonzentration von Nrf-2, dem wichtigsten Transkriptionsaktivator von antioxidativen Enzymen, verwendet. Dazu wurde der

Quotient von Nrf-2 und RNA-Polymerase II für die nukleäre sowie der Quotient aus Nrf-2 und GAPDH für die zytosolische Konzentration gebildet und prozentual auf die jeweilige Reverenzgruppe (WT Kontrolle bzw. WT SHAM) bezogen.

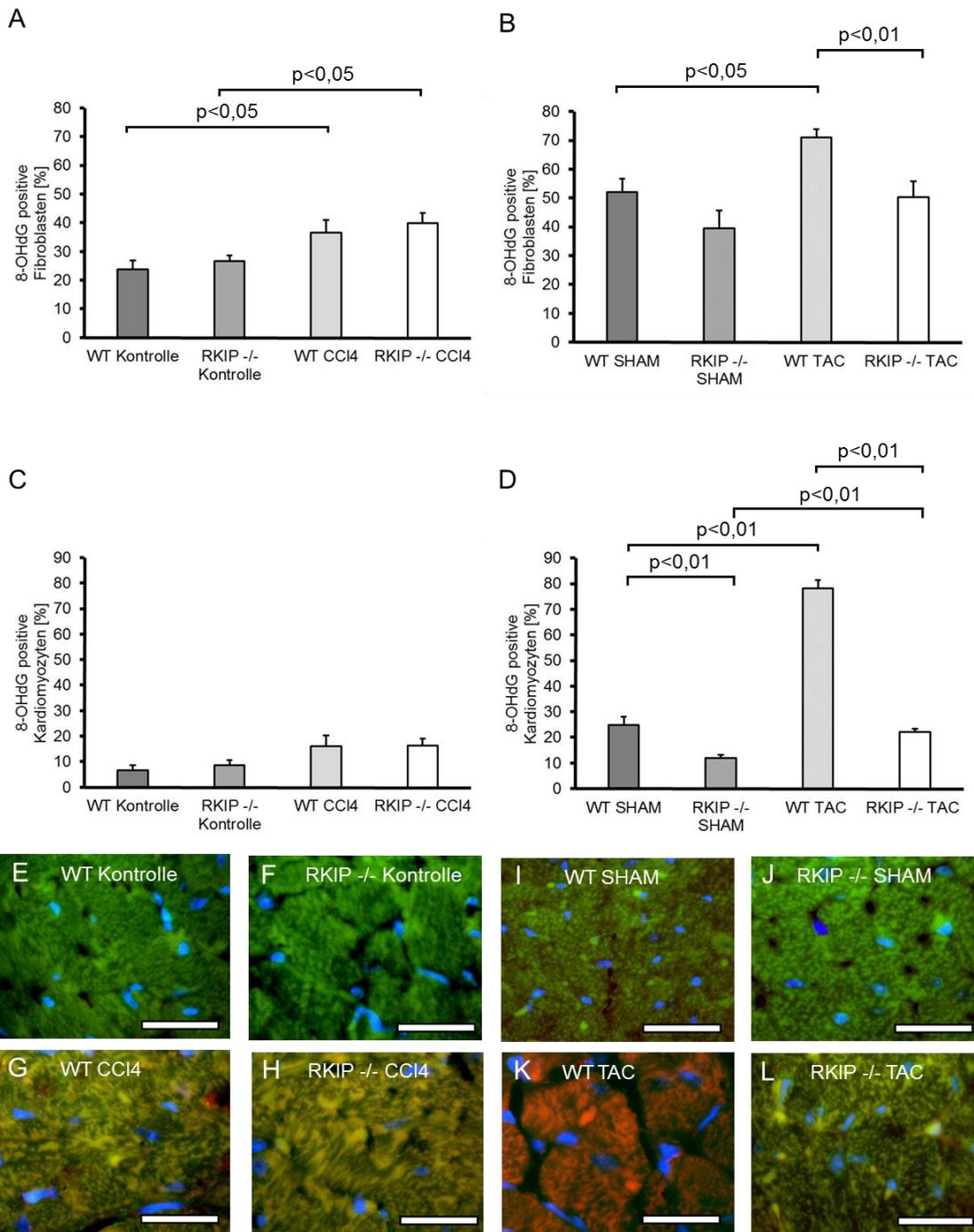
Bei der nukleären Konzentration gab es zwischen WT CCl<sub>4</sub> und WT Kontrolle einen signifikanten Unterschied (WT CCl<sub>4</sub> 208,9±67,4% vs. WT Kontrolle 100±25,4%, p<0,05) auch RKIP<sup>-/-</sup> CCl<sub>4</sub> wies mehr Nrf-2 Protein auf als RKIP<sup>-/-</sup> Kontrolle (RKIP<sup>-/-</sup> CCl<sub>4</sub> 215±39,8% vs. RKIP<sup>-/-</sup> Kontrolle 60,5±11,4%, p<0,05; vgl. Abb. 14A).

RKIP<sup>-/-</sup> TAC zeigte höhere nukleäre Nrf-2- Proteinkonzentrationen als WT TAC (RKIP<sup>-/-</sup> TAC 299±103,7% vs. WT TAC 77,4±23,2%, p<0,05). WT TAC und WT SHAM (WT TAC 77,4±23,2% vs. WT SHAM 100±15,7%, n.s.) unterschieden sich – genauso wie RKIP<sup>-/-</sup> TAC und RKIP<sup>-/-</sup> SHAM (RKIP<sup>-/-</sup> TAC 299±103,7% vs. RKIP<sup>-/-</sup> SHAM 137,6±37%, n.s.; vgl. Abb. 14B) – nicht signifikant voneinander.

Bei den zytosolischen Proteinkonzentrationen von Nrf-2 gab es in der CCl<sub>4</sub>- Versuchsreihe keine nennenswerten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (WT CCl<sub>4</sub> 82,5±10,6% vs. WT Kontrolle 100±11,3, n.s. sowie RKIP<sup>-/-</sup> CCl<sub>4</sub> 94,3±8,2 vs. RKIP<sup>-/-</sup> Kontrolle 100,3±10,5%, n.s.; vgl. Abb. 14E).

Auch bei den aortenkonstriktiv behandelten Tieren ergaben sich keine signifikanten Differenzen (WT TAC 92,6±8,9% vs. WT SHAM 100±13,7%, n.s. sowie RKIP<sup>-/-</sup> TAC 106,2±15,4% vs. RKIP<sup>-/-</sup> SHAM 89,6±5,1%, n.s.; vgl. Abb. 14F).

## Abbildung 13



### Abbildung 13- oxidativer Stress I

Effekt einer Behandlung mit CCl<sub>4</sub> (6 Wochen, 0,7mg CCl<sub>4</sub> pro kg Körpergewicht zwei Mal pro Woche) bzw. einer transaortalen Konstriktion (TAC) (360µm, 5 Wochen) auf den oxidativen Stress im Myokard (anhand des Anteiles an 8-dOGH positiven Zellen)

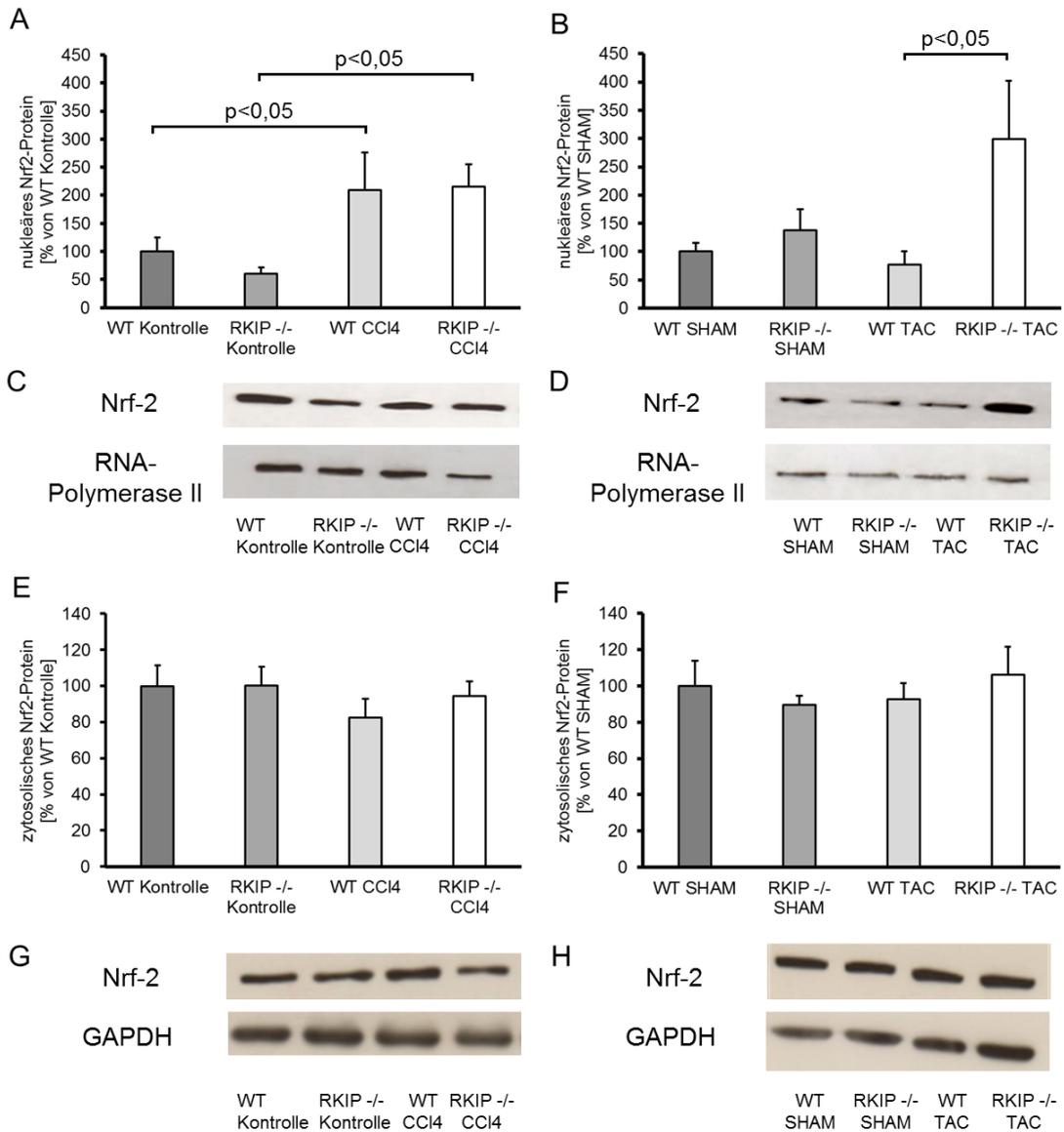
(A) Auswirkungen der CCl<sub>4</sub>-Behandlung und (B) Auswirkungen der TAC auf die Anzahl der 8-OHdG positiven Fibroblasten

Fortsetzung der Beschriftung auf der folgenden Seite

(C) Auswirkung der CCl<sub>4</sub>-Behandlung und (D) Auswirkungen der TAC auf die Anzahl der 8-OHdG positiven Kardiomyozyten  
 (E) – (H) Bilder der Immunfärbung für 8-dOHG

Die Skala entspricht 30µm

Abbildung 14



### Abbildung 14- oxidativer Stress II

Effekt einer Behandlung mit CCl<sub>4</sub> (6 Wochen, 0,7mg CCl<sub>4</sub> pro kg Körpergewicht zwei Mal pro Woche) bzw. einer transaortalen Konstriktion (TAC) (360µm, 5 Wochen) auf den oxidativen Stress im Myokard (anhand der Nrf-2 Expression)

(A) Auswirkung der CCl<sub>4</sub>-Behandlung und (B) Auswirkung der TAC auf die nukleäre Expression von Nrf-2

(C) repräsentativer Western Blot der CCl<sub>4</sub>- Gruppe und (D) der TAC- Gruppe (Primärantikörper Nrf-2 und RNA- Polymerase II)

(E) Auswirkung der CCl<sub>4</sub>-Behandlung und (F) Auswirkung der TAC auf die zytosolische Expression von Nrf-2

(G) repräsentativer Western Blot der CCl<sub>4</sub>- Gruppe und (H) der TAC- Gruppe (Primärantikörper Nrf-2 und GAPDH)

#### 6.4.4. Apoptose

Zur Untersuchung der Apoptose im Myokard wurden Paraffinschnitte mittels Apoptosedetektion (in Situ Oligo Ligation, vgl. 5.2.7.) gefärbt und der prozentuale Anteil der apoptotischen Kardiomyozyten bzw. apoptotischen Nichtkardiomyozyten berechnet.

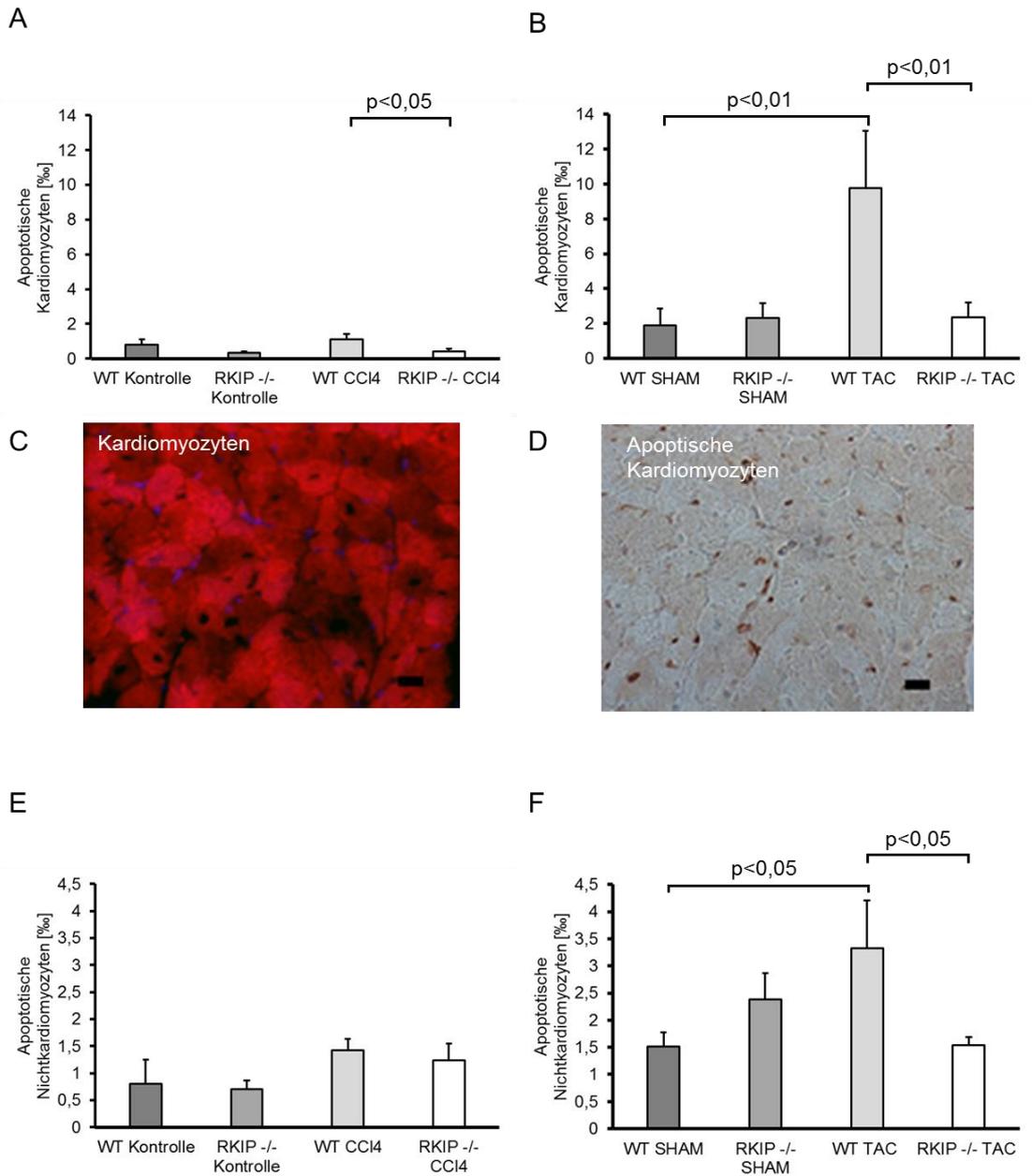
Bezüglich der Apoptoserate der Kardiomyozyten waren weder WT CCl<sub>4</sub> und WT Kontrolle (WT CCl<sub>4</sub> 1,1±0,3‰ vs. WT Kontrolle 0,8±0,3‰, n.s.) noch RKIP<sup>-/-</sup> CCl<sub>4</sub> und RKIP<sup>-/-</sup> Kontrolle (RKIP<sup>-/-</sup> CCl<sub>4</sub> 0,4±0,1‰ vs. RKIP<sup>-/-</sup> Kontrolle 0,3±0,1‰, n.s.) signifikant unterschiedlich, allerdings zeigte WT CCl<sub>4</sub> mehr apoptotische Kardiomyozyten als RKIP<sup>-/-</sup> CCl<sub>4</sub> (WT CCl<sub>4</sub> 1,1±0,3‰ vs. RKIP<sup>-/-</sup> CCl<sub>4</sub> 0,4±0,1‰, p<0,05; vgl. Abb. 15A).

In der TAC- Versuchsreihe zeigten sich Unterschiede zwischen WT TAC und WT SHAM (WT TAC 9,8±3,3‰ vs. WT SHAM 1,9±0,9‰, p<0,01), während RKIP<sup>-/-</sup> TAC und RKIP<sup>-/-</sup> SHAM (RKIP<sup>-/-</sup> TAC 2,3±0,9‰ vs. RKIP<sup>-/-</sup> SHAM 2,3±0,9‰, n.s.) keine Differenzen aufwiesen. RKIP<sup>-/-</sup> TAC zeigte verglichen mit WT TAC eine erniedrigte kardiomyozytäre Apoptoserate (RKIP<sup>-/-</sup> TAC 2,3±0,9‰ vs. WT TAC 9,8±3,3‰, p<0,01; vgl. Abb. 15B).

Im Falle der Apoptose bei Nichtkardiomyozyten zeigte sich in der CCl<sub>4</sub>- Versuchsreihe kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (WT CCl<sub>4</sub> 1,4±0,2‰ vs. WT Kontrolle 0,8±0,4‰, n.s. sowie RKIP<sup>-/-</sup> CCl<sub>4</sub> 1,2±0,3‰ vs. RKIP<sup>-/-</sup> Kontrolle 0,7±0,2‰, n.s.; vgl. Abb. 15E).

WT TAC zeigte auch bei den Nichtkardiomyozyten mehr Apoptose als WT SHAM (WT TAC 3,3±0,9‰ vs. WT SHAM 1,5±0,3‰, p<0,05), während zwischen RKIP<sup>-/-</sup> TAC und RKIP<sup>-/-</sup> SHAM (RKIP<sup>-/-</sup> TAC 1,5±0,2‰ vs. RKIP<sup>-/-</sup> SHAM 2,4±0,5‰, n.s.) keine Unterschiede zu verzeichnen waren. WT TAC hatte somit mehr apoptotische Nichtkardiomyozyten als RKIP<sup>-/-</sup> TAC (WT TAC 3,3±0,9‰ vs. RKIP<sup>-/-</sup> TAC 1,5±0,2‰, p<0,05; vgl. Abb. 15F).

## Abbildung 15



### Abbildung 15- Apoptose

Effekt einer Behandlung mit CCl<sub>4</sub> (6 Wochen, 0,7mg CCl<sub>4</sub> pro kg Körpergewicht zwei Mal pro Woche) bzw. einer transaortalen Konstriktion (TAC) (360µm, 5 Wochen) auf die Anzahl der apoptotischen Zellen im Myokard

(A) Auswirkung der CCl<sub>4</sub>-Behandlung und (B) Auswirkung der TAC auf die Anzahl der apoptotischen Kardiomyozyten

(C) Kardiomyozyten in der Immunfärbung für alpha-sarkomerisches Aktin

(D) detektierte apoptotische Kardiomyozyten

(E) Auswirkung der CCl<sub>4</sub>-Behandlung und (F) Auswirkung der TAC auf die Anzahl der apoptotischen Nichtkardiomyozyten

## 7. Diskussion

Die Daten zeigen, dass eine systemische Defizienz des Raf-Kinase-Inhibitor-Proteins weitreichende Folgen für das kardiale Remodeling und die myokardiale Fibrogenese hat:

RKIP defiziente Tiere entwickelten in beiden Versuchsreihen (sowohl im Rahmen einer TAC induzierten Ersatzfibrose, als auch im Rahmen einer Kohlenstofftetrachlorid erzeugten interstitiellen Fibrose) eine reduzierte kardiale Fibrose. Das myokardiale Remodeling in Form von Hypertrophie, Kapillarisation und Apoptose wird durch eine RKIP Defizienz signifikant verbessert.

Eine große Rolle bezüglich des myokardialen Remodelings für die aortenkonstriktiv induzierte Ersatzfibrose scheint außerdem die signifikante Verminderung von oxidativem Stress in der Versuchsgruppe der RKIP-defizienten Tiere zu spielen.

### 7.1. Systemische Defizienz des Raf-Kinase-Inhibitor-Proteins hat keinen Einfluss auf die Hämodynamik

Die Defizienz von RKIP hat keinen Einfluss auf die erhobenen hämodynamischen Parameter. In der CCl<sub>4</sub>- Versuchsreihe waren weder systolischer und diastolischer peripherer Blutdruck noch die Herzfrequenz zwischen den Gruppen unterschiedlich. Die Unterschiede zwischen den TAC und korrespondierenden SHAM Gruppen hingegen zeigen ein suffizientes Banding an. Die RKIP defizienten Tiere hatten dabei keinen Unterschied zu den Wildtype Tieren. Das TAC- Modell, welches sich in etlichen Studien als Modell des nachlastinduzierten Hochdruckes und des daraus resultierenden kardialen Remodeling bewährt hat [3, 12, 131], konnte auch in unseren Versuchen zu kardialer Fibrogenese und myokardialem Remodeling führen, jedoch konnten diese Effekte durch ein RKIP Knockout verringert werden. Daraus ergibt sich, dass diese Veränderung im kardialen Remodeling unabhängig von der Hämodynamik ist, da diese durch die RKIP Defizienz nicht affiziert wurde.

Auch im Umkehrschluss kann durch unsere Analysen der RKIP- und phospho-RKIP-Proteinexpression mittels Western Blot nachgewiesen werden, dass die

beiden fibrogenetischen Methoden (CCl<sub>4</sub>- Behandlung und TAC) keine Auswirkungen auf die Konzentration von RKIP Protein haben. Ebenfalls konnten diese Untersuchungen die Defizienz von RKIP in den entsprechenden gendefizienten Versuchstieren beweisen.

Zusammenfassend lässt sich also aus den Daten schließen, dass die Veränderung im kardialen Remodeling durch Defizienz von RKIP nicht auf eine Veränderung der Hämodynamik zurückzuführen ist und dass unsere Versuchsmethoden sowohl CCl<sub>4</sub>- Behandlung als auch TAC keinen signifikanten Einfluss auf die kardiale RKIP-Konzentration nehmen.

## 7.2. Reduktion von sowohl interstitieller Fibrose als auch Ersatzfibrose bei Defizienz des Raf-Kinase-Inhibitor-Proteins

Die Versuche zeigen, dass die Defizienz von RKIP eine Reduktion sowohl der interstitiellen Fibrose als auch der Ersatzfibrose bedingt. Nachgewiesen werden konnte diese reduzierte Fibrose über eine Färbung mit Sirius Red, woraus der Anteil von Kollagen am Gesamtmyokard berechnet wurde.

Da sich die beiden Fibrosearten (systemische Fibrose durch CCl<sub>4</sub> bzw. Ersatzfibrose durch TAC) in vielerlei Hinsicht unterscheiden, ist hier bezüglich des Mechanismus der Fibrogenese eine differenzierte Betrachtung der beiden Fibroseformen notwendig:

CCl<sub>4</sub> ist primär zur hepatischen Fibroseinduktion in Verwendung, führt aber auch zu kardialem Remodeling und kardialer Fibrogenese [132, 133]. Welche Mechanismen der Fibrogenese dabei zu Grunde liegen ist allerdings bisher noch nicht untersucht worden. Jedoch konnte in Vorversuchen gezeigt werden, dass die Entstehung einer kardialen Fibrose nicht zwangsweise einen mechanischen Stressor des Myokardes voraussetzt [134]. Unsere Daten legen nun nahe, dass die kardiale Fibrose, welche sich neben der Sirius Red Färbung auch in Form von erhöhter Expression von Kollagen I $\alpha$ 2 RNA zeigt, durch eine Erhöhung der Fibroblastendichte im Myokard zu erklären ist. Dies zeigt sich im Vergleich der WT Kontrolle- mit der WT CCl<sub>4</sub>- Gruppe. Die Erhöhung der Fibroblasten pro mm<sup>2</sup> ergibt sich dabei aus einem erhöhten Anteil an proliferierenden Fibroblasten nach CCl<sub>4</sub> Behandlung, während die Anzahl der zirkulierenden Fibroblasten hierbei keine Rolle spielt. Unsere Experimente konnten eine erniedrigte Proliferationsrate bei RKIP Defizienz zeigen. Diese signifikante Verminderung der Fibroblastenproliferation durch RKIP Defizienz ergibt, dass sich nach Behandlung der Wildtype Tiere die Fibroblastendichte signifikant erhöht, während bei den RKIP-defizienten Mäusen keine Erhöhung der Fibroblasten pro mm<sup>2</sup> nach CCl<sub>4</sub>-Behandlung zu verzeichnen ist.

Die TAC ist im Gegensatz zur CCl<sub>4</sub>- Behandlung eine langerprobte Methode zur Induktion von kardialer Fibrose und Hypertrophie [135]. Studien konnten zeigen, dass eine TAC zur Zunahme der Fibroblastendichte führt [136]. Dabei kam es zu

einem Anstieg des Anteiles der zirkulierenden Fibrozyten [136] und zu einer Zunahme der Fibroblastenproliferation durch die TAC, welche bei RKIP Defizienz nicht zu verzeichnen war. Außerdem wiesen andere Forschungsgruppen nach, dass die kardialen Fibroblasten durch eine TAC in ihrer Aktivität gesteigert werden. Das heißt, dass sie eine größere Menge an rauem endoplasmatischem Retikulum sowie einen vergrößerten Golgi-Apparat aufwiesen, was für einen verstärkte Synthese- und Sekretionsleistung spricht [137]. Unsere Daten zeigen einen deutlichen Anstieg des Kollagengehaltes im Myokard nach TAC, welcher bei den RKIP defizienten Tieren nicht zu verzeichnen ist. Mechanistisch liegt dieser Fibrose unter anderem eine Erhöhung der Fibroblasten pro mm<sup>2</sup> zugrunde, welche nach TAC auftritt und bei RKIP Defizienz weniger stark ausgeprägt ist. Die Erhöhung der Fibroblastendichte und damit die Augmentation kardialer Fibrose geht dabei regelhaft mit einem Anstieg der Fibrozyten, also zirkulierender mesenchymaler Progenitorzellen einher [138]. Dies bestätigt die Durchflusszytometrie zur Identifizierung CD45 und Kollagen positiver Zellen. Einen wichtigen Mediator stellt in diesem Kontext SDF- 1 dar, was an CXCR4 bindet um dadurch Fibrozyten in das geschädigte Gewebe zu locken [139, 140]. Die Daten zeigen auch, dass die Anzahl der zirkulierenden Fibroblasten bei RKIP-Knockout – zumindest im Vergleich der mit TAC behandelten Gruppen – erniedrigt ist, dies zeigt sich sowohl im Anteil der CXCR4 positiven Fibroblasten als auch in der Durchflusszytometrie zur Identifizierung von Fibrozyten. Zur Untersuchung der Fibroblastenproliferation bleibt noch zu erwähnen, dass diese anders als in der CCl<sub>4</sub>- Gruppe durch die TAC nach 5 Wochen nicht beeinflusst wird.

Neben der Charakterisierung der beiden verschiedenen Fibrosemodelle untersuchten wir auch die Migrationskapazität von Fibroblasten aus der Zellkultur. Hier zeigte sich, dass die RKIP defizienten Fibroblasten signifikant weniger migrieren als die WT Zellen. Aktuelle Forschungen weisen sowohl einen negativen Effekt [117] als auch einen positiven Effekt [118] von RKIP auf die Zellmigration nach. Vorherige Experimente zeigten, dass L-NAME (NG-Nitro-L-arginine methyl ester) die Kollagenproduktion in Fibroblasten anregt und so eine Fibrose induziert und dabei auch die Migrationskapazität von Fibroblasten steigert [136], sodass eine Fibrogenese in diesem – wie auch in unserem Falle – mit einer gesteigerten Migration der Fibroblasten einhergeht. Die Tatsache, dass eine Defizienz von RKIP

zu einer verminderten Migrationskapazität der Fibroblasten führt, passt wiederum auch zu den oben besprochenen Auswirkungen auf die zirkulierenden Fibroblasten, welche sich bei mit transaortaler Konstriktion behandelten RKIP defizienten Tieren signifikant vermindert darstellen.

Des Weiteren untersuchten wir die Matrixproduktion von isolierten Fibroblasten in der Zellkultur, welche für acht Stunden mit Angiotensin II behandelt wurden. Hierbei konnten wir zeigen, dass RKIP defiziente Fibroblasten nach Angiotensin II Behandlung signifikant weniger Fibronectin produzierten als die WT-Fibroblasten. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Matrixproduktion der Fibroblasten durch RKIP-Defizienz signifikant herunterreguliert wird.

Zusammenfassend ergibt sich, dass eine Defizienz von RKIP sowohl interstitielle als auch Ersatzfibrose reduziert. Dies zeigt sich in beiden Fällen durch eine Reduktion des Gesamtkollagen im Myokard und der verminderten Expression von Kollagen  $\alpha 2$  RNA. Sowohl bei interstitieller Fibrose als auch für Ersatzfibrose zeigt sich eine signifikante Abnahme der Fibroblastendichte bei RKIP Defizienz in der behandelten Gruppe. Im Falle von Proliferation und Anteil der zirkulierenden Fibroblasten zeigen sich Unterschiede zwischen den beiden Fibrosemodellen: In der Versuchsgruppe der interstitiellen Fibrose kommt es zu einer Abnahme der Fibroblastenproliferation, während die Ersatzfibrose einen verminderten Anteil an zirkulierenden Fibroblasten aufweist. Unabhängig vom Fibrorestimulus kann bei RKIP Defizienz eine verminderte Fibroblastenmigration nachgewiesen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass durch eine Defizienz des Raf-Kinase-Inhibitor-Proteins signifikant weniger Matrixproduktion der Fibroblasten nach Behandlung mit Angiotensin II vorhanden war.

Als Fazit unserer Experimente zum Einfluss von RKIP auf kardiale Fibrogenese zeigt sich folglich eine Abhängigkeit von der Ätiologie der Fibrose. Während die Reduktion der Fibrogenese bei RKIP-Defizienz im Rahmen einer toxisch erzeugten interstitiellen Fibrose primär auf eine Verminderung der Fibroblastenproliferation zurückzuführen ist, scheinen im Falle der Ersatzfibrose durch Erhöhung der Nachlast vor allem zirkulierende Fibroblasten im Fokus zu stehen. Diese Ergebnisse werden durch die allgemeinen Auswirkungen der RKIP Defizienz auf die Migration und Matrixproduktion der Fibroblasten ergänzt.

### 7.3. Verbesserung des kardialen Remodelings bei Defizienz des Raf-Kinase-Inhibitor-Proteins

Eine anhaltend zu hohe Nachlast, wie beispielsweise bei Aortenstenose oder Bluthochdruck, führt zu maladapтивem kardialem Remodeling [141, 142]. Als wissenschaftliches Modell wird hierfür die TAC eingesetzt, welche durch eine aortale Konstriktion eine erhöhte Nachlast generiert und somit zum eben erwähnten myokardialen Remodeling beiträgt.

Ein wichtiger Parameter im Remodeling Vorgang ist die myokardiale und kardiomyozytäre Hypertrophie. Erstere wird hierbei in der Regel durch den Quotienten aus Herzgewicht und Tibialänge quantifiziert, während die kardiomyozytäre Hypertrophie anhand von Messungen der Kardiomyozytenoberfläche ermittelt wird. Es ist nachgewiesen, dass mit einer Zunahme der pathologischen Hypertrophie eine Abnahme der Auswurfleistung des Herzens einhergeht, welche letztendlich eine Herzinsuffizienz bedingt [137].

Wir konnten in unseren Versuchen zeigen, dass bei Defizienz von RKIP sowohl die kardiomyozytäre als auch die myokardiale Hypertrophie nach TAC signifikant vermindert waren. Während eine Verminderung der Hypertrophie durch RKIP Defizienz zunächst – aufgrund der positiven Auswirkung von Raf auf das zelluläre Wachstum [143] – verwundert, konnte schon belegt werden, dass hierbei komplexere Mechanismen zugrunde liegen und dass beispielsweise eine Defizienz von Raf mit einer normalen ERK Aktivität einhergehen kann, obwohl ERK als Downstream Mediator von Raf bekannt ist [80, 144]. Für die mit CCl<sub>4</sub> behandelten Tiere bleibt zu erwähnen, dass eine Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff weder Auswirkungen auf die myokardiale noch auf die kardiomyozytäre Hypertrophie hatte.

Ein weiterer Faktor des maladapтiven kardialen Remodeling ist die Kapillarisierung. Erwiesenermaßen trägt eine verminderte Angiogenese zu maladapтivem kardialen Remodeling bei [145]. Es ist bekannt, dass die Kapillardichte nach TAC Behandlung abnimmt [137], was unter anderem dadurch begründet werden kann, dass die Massenzunahme der Kardiomyozyten bei ca. 49% liegt, während die Kapillare nur um 36% zunehmen [131]. Dass das Zusammenspiel mit der Hyper-

trophie eine wichtige Rolle spielt, zeigt sich auch darin, dass es in der CCl<sub>4</sub>- Versuchsreihe (in welcher keine Hypertrophie nachgewiesen werden konnte) zu keiner signifikanten Abnahme der Kapillarisation nach Behandlung kam.

Jedoch konnte sowohl bei den TAC behandelten als auch bei den Tetrachlorkohlenstoff behandelten Mäusen signifikant mehr Kapillare pro mm<sup>2</sup> und auch endotheliale (CD 31 positive) Zellen in der Gruppe der RKIP defizienten Tiere gezählt werden. Diese Ergebnisse passen zur Rolle von RKIP als Tumorsuppressor, welche eine antiangiogenetische Funktion suggeriert [146].

Betrachtet man die kardiale Hypertrophie, wird in der Literatur häufig zwischen physiologischer und pathologischer Hypertrophie unterschieden. Physiologische Hypertrophie, wie sie beispielsweise bei durch Ausdauertraining trainierten Herzen auftritt (Sportlerherz) zeichnet sich dabei dadurch aus, dass es zu keinem Anstieg der Fibrose und Apoptose im Myokard kommt und so eine normale oder sogar erhöhte Auswurfleistung generiert wird. Pathologische Hypertrophie hingegen, welche beispielsweise Folge von Bluthochdruck (in unserem Modell TAC) ist, zeichnet sich durch eine verminderte Auswurfleistung aus, welche unter anderem durch verstärkte kardiale Fibrose und Apoptose zu erklären ist. [147]

Apoptose spielt also eine relevante Rolle beim maladaptiven Remodeling des Herzens. So konnten die Versuche zeigen, dass die Rate der apoptotischen Zellen nach TAC sowohl bei den Kardiomyozyten als auch bei den nicht-kardiomyozytären Zellen im Myokard signifikant erhöht war. Dies unterstreicht auch nochmals die Tatsache, dass der Fibrogenese Mechanismus nach aortaler Konstriktion die sogenannte Ersatzfibrose ist, das heißt die apoptotischen Kardiomyozyten und Nichtkardiomyozyten werden durch Fibroblasten und kollagenes Bindegewebe ersetzt. Im Falle der CCl<sub>4</sub>- Behandlung hingegen kommt es zu keinem signifikanten Anstieg der Apoptose Raten im Myokard, da hier keine Ersatzfibrose, sondern eine diffuse interstitielle Fibrogenese vorliegt.

Die Daten zeigen weiterhin, dass RKIP defiziente Mäuse nach der TAC Behandlung signifikant weniger Apoptose der sowohl kardiomyozytären als auch nicht kardiomyozytären Zellen aufweisen, sodass RKIP eine proapoptotische Rolle zu haben scheint. Auch dieses Ergebnis passt wiederum zur Rolle von RKIP als

natürlicher Tumorsuppressor [96]. Des Weiteren konnten Studien zeigen, dass die Raf-1 Kinase, welche durch RKIP inhibiert wird, eine große Rolle beim Überleben von Kardiomyozyten nach TAC Behandlung hat [143], sodass es bei RKIP Defizienz aufgrund einer verminderten Inhibition von Raf-1 Kinase zu verminderten Apoptose Raten kommt.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die untersuchten Parameter des maladaptiven kardialen Remodeling sich je nach Trigger der Maladaptation stark unterscheiden.

Bei der durch CCl<sub>4</sub>- Behandlung induzierten toxischen Fibrose, welche sich morphologisch als diffus interstitiell darstellt kommt es zu keiner signifikanten Hypertrophie. Dies könnte ein wichtiger Mechanismus sein, welcher begründet, dass auch Kapillarisierung und Apoptose durch eine toxische Fibrogenese nicht affiziert werden.

Eine durch aortale Konstriktion hervorgerufene Ersatzfibrose hingegen zeigt eine signifikante Hypertrophie, eine verminderte Kapillarisierung sowie erhöhte Level von Apoptose im Myokard. Die Defizienz von RKIP sorgt in den durch TAC behandelten Mäusen zu einem signifikanten Rückgang der Hypertrophie, während die Kapillarisierung im Vergleich zur WT Gruppe zunimmt. Außerdem kommt es bei RKIP defizienten Tieren zu einer verminderten Rate an Apoptose.

Insgesamt lässt sich also schlussfolgern, dass eine Defizienz des Raf-Kinase-Inhibitor-Proteins in zwei verschiedenen Fibrosemodellen durch eine Verminderung der Hypertrophie und der Apoptose sowie einer Vermehrung der Kapillarisierung im Myokard entscheidend zum Rückgang von maladapтивem Remodeling des Myokards beitragen kann.

## 7.4. Verminderung des oxidativen Stresses bei Defizienz des Raf-Kinase-Inhibitor-Proteins

Zur Identifikation der Mechanismen, welche zum kardialen Remodeling beitragen, untersuchten wir den oxidativen Stress im Myokard. Wir konnten zeigen, dass nach TAC Behandlung sowohl in Fibroblasten als auch in Kardiomyozyten das Level an 8-OHdG positiven Zellen, welches ein Marker für oxidativer Stress darstellt, signifikant erhöht ist. Diese Ergebnisse passen dazu, dass für Krankheitsbilder mit erhöhter Nachlaste, wie zum Beispiel die Aortenstenose, bereits erhöhte Level oxidativen Stresses beobachtet werden konnten [148] und dass sich oxidativer Stress als eine der wichtigsten Faktoren zur Entwicklung von nachlastinduzierter Hypertrophie herausgestellt hat [149]. Insgesamt suggeriert die aktuelle Forschung immer mehr eine entscheidende Rolle von oxidativem Stress im Kontext der Entwicklung und Aggravation einer Herzinsuffizienz [150].

Eine RKIP Defizienz wirkt sich dabei entscheidend auf den oxidativen Stress im Myokard aus: Sowohl die Fibroblasten als auch die Kardiomyozyten der defizienten Mäuse zeigen nach TAC signifikant weniger oxidativen Stress. Einen Mediator dieses Schutzes vor dem für die maladaptiven Remodelingvorgänge mitverantwortlichem oxidativen Stress, konnten wir in Nrf-2 nachweisen. Der Transkriptionsfaktor Nrf-2 kontrolliert die Expression aller antioxidativen Gene, wie zum Beispiel HO-1 (heme oxygenase-1), SOD (superoxide dismutase), GPx (glutathione peroxidase) sowie GST (glutathione-S-transferases) [151], und spielt somit – durch den Schutz vor oxidativem Stress – eine große Rolle für die Homöostase des kardiovaskulären Systems [152]. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Nrf-2 defiziente Mäuse nach TAC signifikant mehr Hypertrophie, Fibrose, oxidativen Stress und Apoptose entwickelten [153, 151]. Wir konnten nun eine Akkumulation von Nrf-2 im Nukleus zeigen, welche in RKIP defizienten Tieren nach TAC signifikant erhöht war. Diese vermehrte nukleäre Nrf-2 Expression bzw. Akkumulation schützt die RKIP defizienten Mäuse erwiesenermaßen vor oxidativem Stress. Der Zusammenhang zwischen RKIP und Nrf-2 Expression konnte dabei schon gezeigt werden: Eine Studie zur Resistenz vor chemotherapeutischen Arzneimitteln konnte veranschaulichen, dass ein Verlust von RKIP zu einer nukleären Akkumulation von Nrf-2 führt, außerdem konnte im Gegenzug

auch gezeigt werden, dass eine vermehrte Expression von RKIP eine Verminderung der Nrf-2 Expression zur Folge hat [154].

Der oxidative Stress als Vermittler eines maladptiven kardialen Remodeling nach TAC scheint ein wichtiger Mechanismus zu sein, der die Entstehung von Hypertrophie, Fibrose und anderen maladptiven kardialen Umbauprozessen entscheidend triggert. N-Typ Mäuse, wie sie bei unseren Versuchen genutzt wurden weisen – im Gegensatz zu J-Typ Mäusen – nach TAC signifikant erhöhte Hypertrophie, Fibrose und Level an oxidativem Stress vor. Der Schutz vor oxidativem Stress kommt den J-Typ Mäusen dabei durch eine Mutation im Gen für die Nikotinamid Nukleotid Transhydrogenase (Nnt) zu Gute. [130] Diese Erkenntnisse werden durch andere Forschungsarbeiten gestützt, welche sich ebenfalls mit den kardialen Auswirkungen einer RKIP Defizienz beschäftigten. Hierbei wurde unter der Verwendung von J-Typ Mäusen ein verstärktes maladptives Remodeling in Form von Fibrose und Hypertrophie bei RKIP defizienten Tieren nachgewiesen. [155]

Gegenstand aktueller Forschung ist es die Unterschiede im kardialen Remodeling bei RKIP defizienten J-Typ Mäusen im Vergleich zu RKIP defizienten N-Typ Mäusen aufzuarbeiten. Dass sich die beiden Mauslinien hauptsächlich in der Entwicklung von oxidativem Stress unterscheiden, suggeriert das eben dieser oxidative Stress in unserem Versuchskontext einen sehr wichtigen Mechanismus darstellt, welcher weiterer Forschung bedarf.

Zusammenfassend identifizieren unsere Forschungsarbeiten das Raf Kinase Inhibitor Protein als einen wichtigen Regulator der myokardialer Fibrogenese sowie des kardialen Remodelings. Eine systemische Defizienz von RKIP zeigt bei den von uns verwendeten C57Black6N-Albino Mäusen eine signifikante Verbesserung in der Augmentation kardialen Fibrose sowie beim maladptiven kardialen Remodeling in Form der myokardialen Hypertrophie, des oxidativen Stresses sowie der Apoptose und Kapillarisation.

## 8. Literaturverzeichnis

- [1] G. Ertl und F. Ruschitzka, „The Year in Cardiology 2013: heart failure,“ *European Heart Journal*, Nr. 35, pp. 470-473, 2014.
- [2] H. Eriksson, „Heart failure: a growing public health problem,“ *Journal of Internal Medicine*, Nr. 237, pp. 135-141, 1995.
- [3] M. Cowie, *Essentials of Heart Failure*, 2013.
- [4] Statistisches Bundesamt, „Todesursachen in Deutschland,“ 2013.
- [5] G. Bleumink, A. Knetsch, M. Sturkenboom, S. Straus, A. Hofman, J. Deckers, J. Witteman und B. Stricker, „Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure,“ *Heart Failure Reviews*, Nr. 25, pp. 1614-1619, 2000.
- [6] W. Kannel, „Incidence and epidemiology of heart failure,“ *Heart Failure Reviews*, Nr. 3, pp. 167-173, 2000.
- [7] J. Mc Murray und S. Stewart, „Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure,“ *Heart*, Nr. 85, pp. 596-602, 2000.
- [8] F. Alla, F. Zannad und G. Filippatos, „Epidemiology of acute heart failure syndroms,“ *Heart Failure Reviews*, Nr. 12, pp. 91-95, 2007.
- [9] B. Maisch und H. Rupp, „Myokardfibrose: ein kardiopathophysiologischer Januskopf,“ *Herz*, Nr. 31, pp. 260-268, 2006.
- [10] T. Baudino, W. Carver, W. Giles und T. Borg, „Cardiac fibroblasts: friend or foe?,“ *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, Nr. 291, pp. H1015-H1026, 2006.
- [11] G. Krenning, E. Zeisberg und R. Kalluri, „The Origin of Fibroblasts and Mechanism of Cardiac Fibrosis,“ *Journal of Cellular Physiology*, Nr. 225, pp. 631-637, 2010.
- [12] K. Weber, „Fibrosis and hypertensive heart disease,“ *Current Opinion in Cardiology*, Nr. 15, pp. 264-272, 2000.
- [13] B. Berk, K. Fujiwara und S. Lehoux, „ECM remodeling in hypertensive heart disease,“ *Journal of Clinical Investigation*, Nr. 117, pp. 568-575, 2007.
- [14] P. Kong, P. Christia und N. Frangogiannis, „The pathogenesis of cardiac fibrosis,“ *Cellular and Molecular Life Sciences*, Nr. 4, pp. 549-574, 2013.

- [15] K. Weber, „Fibrosis in hypertensive heart disease: focus on cardiac fibroblasts,“ *Journal of Hypertension*, Nr. 22, pp. 27-50, 2004.
- [16] K. Weber, „The proinflammatory heart failure phenotype: a case of integrative physiologie,“ *American Journal of the Medical Sciences*, Nr. 330, pp. 219-226, 2005.
- [17] K. Weber, Y. Sun und R. Guntaka, „Rebuilding and remodeling following myocardial infarction: the good, the bad, and the ugly of tissue repair,“ *Dialogues in cardiovascular medicine*, Nr. 4, pp. 3-19, 1999.
- [18] J. Diez, R. Querejeta, B. Lopez, A. Gonzalez, M. Larman und J. Martinez Ubago, „Losartan-dependent regression of myocardial fibrosis is associated with reduction of left ventricular chamber stiffness in hypertensive patients,“ *Circulation*, Nr. 105, pp. 2512-2517, 2002.
- [19] J. de Bakker, F. van Capelle, M. Janse, S. Tasseron, J. Vermeulen, N. de Jonge und J. Lahpor, „Fractionated electrograms in dilated cardiomyopathy: Origin and relation to abnormal conduction,“ *Journal of the American College of Cardiology*, Nr. 27, pp. 1071-1078, 1996.
- [20] M. Spach und J. Boineau, „Microfibrosis produces electrical load variations due to loss of side-to-side cell connections: A major mechanism of structural heart disease arrhythmias,“ *Pacing and Clinical Electrophysiology*, Nr. 20, pp. 397-413, 1997.
- [21] S. Isoyama und Y. Nitta-Komatsubara, „Acute and chronic adaption to hemodynamic overload and ischemia in the aged heart,“ *Heart Failure Reviews*, Nr. 7, pp. 63-69, 2002.
- [22] C. Souders, S. Bowers und T. Baudino, „Cardiac Fibroblast: The Renaissance Cell,“ *Circulation Research*, Nr. 105, pp. 1164-1176, 2009.
- [23] A. Wessels und J. Perez-Pomares, „The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as cardiac stem cells,“ *Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*, Nr. 276, pp. 43-57, 2004.
- [24] B. Eyden, „The myofibroblast: An assessment of controversial issues and a definition usefull in diagnosis and research,“ *Ultrastructural Pathology*, Nr. 25, pp. 39-50, 2001.
- [25] R. Norris, T. Borg, J. Butcher, T. Baudino, I. Banerjee und R. Markwald, „Neonatal and adult cardiovascular pathophysiological remodeling and repair: Developmental role of periostin,“ *Annals of the New York Academy of Sciences*, Nr. 1123, pp. 30-40, 2008.
- [26] R. Munoz-Chapuli, J. Perez-Pomares, D. Macias, L. Garcia-Garrido, R. Carmona und M. Gonzalez-Iriarte, „The Epicardium as a source of

mesenchyme for the developing heart," *Italian journal of anatomy and embryology*, Nr. 106, pp. 187-196, 2001.

- [27] H. Olivey, N. Mudell, A. Austin und J. Barnett , „Transforming growth factor-beta stimulates epithelial-mesechymal transformation in the proepicardium," *Developmental Dynamics*, Nr. 235, pp. 50-59, 2006.
- [28] F. de Lange, A. Moorman, R. Anderson, J. Manner, A. Soufan, V. de Gier-de, M. Schneider, S. Webb, M. van den Hoff und Christoffels VM, „Lineage and morphogenetic analysis of the cardiac valves," *Circulation Research*, Nr. 95, pp. 645-654, 2005.
- [29] E. Armstrong und J. Bischoff, „Heart valve development: Endothelial cell signaling and differentiation," *Circulation Research*, Nr. 95, pp. 193-200, 2004.
- [30] A. Armulik, A. Abramsson und C. Betsholtz, „Endothelial/pericyte interactions.," *Circulation Research*, Nr. 97, pp. 512-523, 2005.
- [31] T. Wynn und K. Vanella, „Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis," *Immunity*, Nr. 44, pp. 450-462, 2016.
- [32] A. Bellini und S. Mattoli, „The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses," *Laboratory Investigations*, Nr. 87, pp. 858-870, 2007.
- [33] R. Abe, S. Donnelly und T. Peng, „Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites," *Journal of Immunology*, Nr. 166, p. 7556–7562, 2001.
- [34] R. Bucala, L. Spiegel, J. Chesney, M. Hogan und A. Cerami, „Circulating fibrocytes define a leukocyte subpopulation that mediates tissue repair," *Molecular Medicine*, Nr. 1, pp. 71-81, 1994.
- [35] M. van Amerongen , G. Bou-Gharios, E. Popa, J. van Ark, A. Petersen, G. van Dam, M. van Luyn und M. Harmsen, „Bone marrow-derived myofibroblasts contribute functionally to scar formation after myocardial infarction," *Journal of Pathology*, Nr. 214, pp. 377-386, 2007.
- [36] S. Corda, J. Samuel und L. Rappaport, „Extracellular matrix and growth factors during heart growth," *Heart Failure Reviews*, Nr. 5, pp. 119-130, 2000.
- [37] S. Bowers, I. Benerjee und T. Baudino, „The extracellular matrix: At the center of it all," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Nr. 48, pp. 474-482, 2010.

- [38] F. Bosman und I. Stamenkovic, „Functional structure and composition of the extracellular matrix,“ *Journal of Pathology*, Nr. 200, pp. 423-428, 2003.
- [39] Z. Vadasz, O. Kessler, G. Akiri, S. Gengrinovitch, H. Kagan, Y. Baruch, O. Izhak und G. Neufeld, „Abnormal disposition of collagen around hepatocytes in Wilson’s disease is associated with hepatocyte specific expression of lysyl oxidase and lysyl oxidase like protein-2,“ *Journal of Hepatology*, Nr. 43, pp. 499-507, 2005.
- [40] H. Lucero und H. Kagan, „Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function,“ *Cellular and Molecular Life Sciences*, Nr. 63, pp. 2304-2316, 2006.
- [41] P. Sivakumar, S. Gupta, S. Sarkar und S. Sen, „Upregulation of lysyl oxidase and MMPs during cardiac remodeling in human dilated cardiomyopathy,“ *Molecular and Cellular Biochemistry*, Nr. 307, pp. 159-167, 2008.
- [42] T. Tsuruda, L. Costello-Boerrigter und J. J. Burnett, „Matrix metalloproteinases: Pathway of induction by bioactive molecules,“ *Heart Failure Reviews*, Nr. 9, pp. 53-61, 2004.
- [43] D. Fan, A. Takawale, J. Lee und Z. Kassiri, „Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease,“ *Fibrogenesis & Tissue Repair*, Nr. 5, pp. 15-28, 2012.
- [44] L. Moore, D. Fan, R. Basu, V. Kandalam und Z. Kassiri, „Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in heart failure,“ *Heart Failure Reviews*, Nr. 17, pp. 693-706, 2012.
- [45] G. Diaz-Araya, T. Borg, S. Lavandero, M. Loftis und W. Carver, „IGF-1 modulation of rat cardiac fibroblast behavior and gene expression is age-dependent,“ *Cell Communication & Adhesion*, Nr. 10, pp. 155-165, 2003.
- [46] O. Bergmann, R. Bhardwaj, S. Bernard, S. Zdunek, F. Barnabe-Heider, S. Walsh, J. Zupicich, K. Alkass, B. Buchholz, H. Druid, S. Jovinge und J. Frisen, „Evidence for cardiomyocyte renewal in humans,“ *Science*, Nr. 324, pp. 98-102, 2009.
- [47] F. Engel, M. Schebesta, M. Duong, G. Lu, S. Ren, J. Madwed, H. Jiang, Y. Wang und W. Keating, „p38 MAP kinases exhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes,“ *Genes & Development*, Nr. 19, pp. 1175-1187, 2005.
- [48] B. Kuhn, F. del Monte, R. Hajjar, Y. Chang, D. Lebeche, S. Arab und M. Keating, „Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes

- and promotes cardiac repair," *Nature Medicine*, Bd. 13, pp. 962-969, 2007.
- [49] L. Zhao und M. Eghbali-Webb, „Release of pro- and antiangiogenic factors by human cardiac fibroblasts: Effects on DNA synthesis and protection under hypoxia in human endothelial cells," *Biochimica et Biophysica Acta*, Nr. 1538, pp. 273-282, 2001.
- [50] V. Chintalgattu, D. Nair und L. Katwa, „Cardiac myofibroblasts: A novel source of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors Flt-1 and KDR," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Nr. 35, pp. 277-286, 2003.
- [51] I. Inoki, T. Shiomi, G. Hashimoto, H. Enomoto, H. Nakamura, K. Makino, E. Ikeda, S. Takata, K. Kobayashi und Y. Okada, „Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis," *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, Nr. 16, pp. 219-221, 2002.
- [52] B. Hinz, „The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell," *Journal of Biomechanics*, Nr. 43, pp. 146-155, 2010.
- [53] B. Hinz, S. Phan, V. Thannickal, A. Galli, M. Bochaton-Piallat und G. Gabbiani, „The myofibroblast: one function, multiple origins," *American Journal of Pathology*, Nr. 170, pp. 1807-1816, 2007.
- [54] J. Tomasek, G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier und R. Brown, „Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Nr. 3, pp. 349-363, 2002.
- [55] G. Li, Y. Li, J. Sun, W. Lin und R. Zhou, „ILK–PI3K/AKT pathway participates in cutaneous wound contraction by regulating fibroblast migration and differentiation to myofibroblast," *Laboratory Investigation*, 2016.
- [56] J. Baum und H. Duffy, „Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about?," *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, Nr. 57, pp. 376-379, 2011.
- [57] A. Calderone, S. Bel-Hadj, J. Drapeau, V. El-Helou, H. Gosselin, Clement R und L. Villeneuve, „Scar myofibroblasts of the infarcted rat heart express natriuretic peptides," *Journal of Cell Physiology*, Nr. 207, pp. 165-173, 2006.
- [58] S. Julius, L. Krause und N. Schork, „Hyperkinetic borderline hypertension in Tecumseh," *Journal of Hypertension*, Nr. 9, pp. 77-84, 1991.

- [59] H. Rupp und B. Maisch, „Radiotelemetric characterization of overweight-associated rises in blood pressure and heart rate,“ *American Journal of Physiology*, Nr. 277, pp. 1540-1545, 1999.
- [60] A. Theiss, J. Simmons und C. Jobin, „Tumor necrosis factor (TNF) alpha increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2,“ *Journal of Biological Chemistry*, Nr. 280, pp. 36099-36109, 2005.
- [61] K. Arakawa und H. Urata, „Hypothesis regarding the pathophysiological role of alternative pathways of angiotensin II formation in atherosclerosis,“ *Hypertension*, Nr. 36, pp. 638-641, 2000.
- [62] G. Hasenfuss, „Animal models of human vascular disease, heart failure and hypertrophy,“ *Cardiovascular Research*, Nr. 39, pp. 60-76, 1998.
- [63] N. Frangogiannis, „The immune system and cardiac repair,“ *Pharmacological Research*, Nr. 58, pp. 88-111, 2008.
- [64] N. Koitabashi, T. Danner, A. Zaiman, Y. Pinto, J. Rowell, J. Mankowski, D. Zhang, T. Nakamura, E. Takimoto und D. Kass, „Pivotal Role of cardiomyocyte TGF-beta signaling in the murine pathological response to sustained pressure overload,“ *Journal of Clinical Investigation*, Nr. 121, pp. 2301-2312, 2011.
- [65] DFG, „KFO 196: Signaltransduktion bei adaptiven und maladaptiven kardialen Remodeling-Prozessen,“ [Online]. Available: <http://gepris.dfg.de/gepris/projekt/35635434>.
- [66] DFG, „Identifizierung und Charakterisierung von zellulären Mechanismen und genetischen Determinanten der kardialen und systemischen Fibrogenese,“ [Online]. Available: <http://gepris.dfg.de/gepris/projekt/179590735>.
- [67] C. T. Consortium, O. Abiola und e. al., „The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view.,“ *Nature Reviews: Genetics*, Nr. 4, pp. 911-916, 2003.
- [68] L. Peters, R. Robeldo, C. Blut, G. Churchill, B. Paigen und K. Svenson, „The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis,“ *Nature Reviews: Genetics*, Nr. 8, pp. 58-69, 2007.
- [69] S. Hillebrandt, H. Wasmuth, R. Weiskirchen, C. Hellerbrand, H. Keppeler, A. Werth, R. Schirin-Sokhan, G. Wilkens, A. Geier, J. Lorenz, J. Köhl, A. Gressner, S. Matern und F. Lammert, „Complement factor 5 is a quantitative trait gene that modifies liver fibrogenesis in mice and humans,“ *Nature Genetics*, Nr. 37, pp. 835-843, 2005.

- [70] H. Wasmuth, F. Lammert, M. Zaldivar, R. Weiskirchen, C. Hellerbrand, D. Scholten, M. Berres, H. Zimmermann, K. Streetz, F. Tacke, S. Hillebrand, P. Schmitz, H. Keppeler, T. Berg, E. Dahl, N. Gassler, S. Friedman und C. Tauwein, „Antifibrotic effects of CXCL9 and its receptor CXCR3 in livers of mice and humans,“ *Gastroenterology*, Nr. 137, pp. 309-319, 2009.
- [71] S. Weber, O. Gressner, R. Hall, F. Grünhage und F. Lammert, „Genetic determinants in hepatic fibrosis: from experimental models to fibrogenic gene signatures in humans,“ *Clinical Liver Disease*, Nr. 12, pp. 747-757, 2008.
- [72] Welcome Trust, „<http://www.well.ox.ac.uk/mouse/>,“ [Online].
- [73] Complex Trait Consortium, G. Churchill und et al., „The Collaborative Cross, a community resource for the genetic analysis of complex traits,“ *Nature Genetics*, Nr. 36, pp. 1133-1137, 2004.
- [74] Virtuelles Helmholtz-Zentrum für Systemgenetik und GeNeSys, „<http://www.helmholtz-hzi.de/de/genesys/genesys/>,“ [Online].
- [75] Europäisches Netzwerk für Systemgenetik und SysGenet, „[http://www.cost.esf.org/domains\\_actions/bmbs/Actions/](http://www.cost.esf.org/domains_actions/bmbs/Actions/),“ [Online].
- [76] X. Fu, S. Koller, J. Abd Alla und U. Qwitterer, „Inhibition of G-protein coupled receptor kinase 2 (GRK2) triggers the growth promoting activated protein kinase (MAPK) pathway,“ *Journal of Biological Chemistry*, Nr. 288, pp. 7738-7755, 2013.
- [77] F. Al-Mulla, M. Bitar, Z. Taqi und K. Yeung, „RKIP: much more than Raf kinase inhibitory protein,“ *Journal of Cellular Physiology*, Nr. 228, pp. 1688-1702, 2013.
- [78] J. Yun, C. Frankenberger, W. Kuo, M. Boelens, E. Eves, N. Cheng, H. Liang, W. Li, H. Ishwaran, A. Minn und M. Rosner, „Signalling pathway for RKIP and Let-7 regulates and predicts metastatic breast cancer,“ *EMBO Journal*, Nr. 30, pp. 4500-4514, 2011.
- [79] L. Zeng, A. Imamoto und M. Rosner, „Raf kinase inhibitory protein (RKIP): a physiological regulator and future therapeutic target,“ *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, Nr. 12, pp. 1275-1287, 2008.
- [80] A. Muslin, „Role of raf proteins in cardiac hypertrophy and cardiomyocyte survival,“ *Trends in Cardiovascular Medicine*, Nr. 15, pp. 225-229, 2005.
- [81] P. Dhandapany, M. Razzaque, U. Muthusami, K. Sreejith, J. Edwards, S. Mulero-Navarro, I. Riess, S. Pardo, J. Sheng, D. Rani, B. Rani, P. Govindaraj, E. Flex, T. Yokota, M. Furutani, T. Nishizawa, T. Nakanishi, J. Robbins, G. Limongelli, R. Hajjar, D. Lebeche, A. Bahl, M. Khullar, A.

- Rathinavel, K. Sadler, M. Tartaglia, R. Matsuoka, K. Thangaraj und B. Gelb, „RAF1 mutations in childhood-onset dilated cardiomyopathy,“ *Nature Genetics*, Nr. 46, pp. 635-639, 2014.
- [82] V. Sala, S. Gallo, C. Leo, S. Gatti, B. Gelb und T. Crepaldi, „Signaling to cardiac hypertrophy: insights from human and mouse RASopathies,“ *Molecular Medicine*, Nr. 18, pp. 938-947, 2012.
- [83] W. Tidyman und K. Rauen, „Mutational and functional analysis in human Ras/MAP kinase genetic syndromes,“ *Methods in Molecular Biology*, Nr. 661, pp. 433-447, 2010.
- [84] J. Terry, K. Rauen und M. Nowaczyk, „Fetal autopsy findings of cardiofaciocutaneous syndrome with a unique BRAF mutation,“ *Pediatric and Developmental Pathology*, Nr. 17, pp. 59-63, 2014.
- [85] L. Serre, K. Pereira de Jesus, C. Zelwer, N. Bureaud, F. Schoentgen und H. Benedetti, „Crystal structures of YBHB and YBCL from *Escherichia coli*, two bacterial homologues to a Raf kinase inhibitor protein,“ *Journal of Molecular Biology*, Nr. 310, pp. 617-634, 2001.
- [86] G. Odabaei, D. Chatterjee, A. Jazirehi, L. Goodglick, K. Yeung und B. Bonavida, „Raf-1 kinase inhibitor protein: Structure, function, regulation of cell signaling, and pivotal role in apoptosis,“ *Advances in Cancer Research*, Nr. 91, pp. 169-200, 2004.
- [87] F. Ponten, K. Jirstrom und M. Uhlen, „The human protein atlas - A tool for pathology,“ *Journal of Pathology*, Nr. 216, pp. 387-393, 2008.
- [88] S. Hagan, F. Al-Mulla, E. Mallon, K. Oien, R. Ferrier, B. Gusterson, J. Garcia und W. Kolch, „Reduction of Raf-1 kinase inhibitor protein expression correlates with breast cancer metastasis,“ *Clinical Cancer Research*, Nr. 11, pp. 7392-7397, 2005.
- [89] J. Zhao, V. O'Donnell, S. Balzar, C. St Croix, J. Trudeau und S. Wenzel, „15-Lipoxygenase 1 interacts with phosphatidylethanolamin-binding protein to regulate MAPK signaling in human airway epithelial cells,“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Nr. 108, pp. 14246-14251, 2011.
- [90] K. Wright und A. Vella, „RKIP contributes to INF-gamma synthesis by CD8+ T cells after serial TCR triggering in systemic inflammatory response syndrom,“ *Journal of Immunology*, Nr. 191, pp. 708-716, 2013.
- [91] H. Yasuda, M. Terada, K. Maeda, S. Kogawa, M. Sanada, M. Haneda, A. Kashiwagi und R. Kikkawa, „Diabetic neuropathy and nerve regeneration,“ *Progress in Neurobiology*, Nr. 69, pp. 229-285, 2003.

- [92] E. Moen, S. Wen, T. Anwar, S. Cross-Knorr, K. Brilliant, F. Birnbaum, S. Rahmann, J. Sedivy, S. Moss und D. Chatterjee, „Regulation of RKIP function by *Helicobacter pylori* in gastric cancer,“ *Public Library of Science One*, Nr. 7, p. e37819, 2012.
- [93] K. Lorenz, M. Lohse und U. Qwitterer, „Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2,“ *Nature*, Nr. 426, pp. 574-570, 2003.
- [94] K. Okita, N. Matsukawa, M. Maki, H. Nakazawa, E. Katada, M. Hattori, H. Akatsu, C. Borlongan und K. Ojika , „Analysis of DNA variations in promotor region of HCNP gene with Alzheimer´s disease,“ *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Nr. 379, pp. 272-276, 2009.
- [95] M. Rosner, „Preface: RKIP and Oncogenesis,“ *Critical Reviews in Oncogenesis*, Nr. 19, 2014.
- [96] A. Yesilkanal und M. Rosner, „Raf Kinase Inhibitory Protein (RKIP) as a Metastasis Suppressor: Regulation of Signaling Networks in Cancer,“ *Critical Reviews in Oncogenesis*, Nr. 19, pp. 447-454, 2014.
- [97] G. Pearson, F. Robinson und T. Beers Gibson, „Mitogen-activated (MAP) kinases pathway: regulation and physiological function,“ *Endocrine Reviews*, Nr. 22, pp. 153-183, 2001.
- [98] C. Wellbrock, M. Karasarides und R. Marais, „The RAF Protein take centre stage,“ *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Nr. 11, pp. 875-885, 2004.
- [99] D. Matallanas, M. Birtwistle, D. Romano, A. Zebisch, J. Rauch, A. von Kriegsheim und W. Kolch, „Raf family kinases: Old dogs have learned new tricks,“ *Genes & Cancer*, Nr. 2, pp. 232-260, 2011.
- [100] E. Eves und M. Rosner, „MAP kinase regulation of the mitotic spindle checkpoint,“ *Methods in Molecular Biology*, Nr. 661, pp. 497-505, 2010.
- [101] E. Eves, P. Shapiro, K. Naik, U. Klein, N. Trakul und M. Rosner, „Raf kinase inhibitory protein regulates aurora B and the spindle checkpoint,“ *Molecular Cell*, Nr. 23, pp. 561-574, 2006.
- [102] R. Adams, M. Carmena und W. Earnshaw, „Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis,“ *Trends in Cell Biology*, Nr. 11, pp. 49-54, 2001.
- [103] F. Al-Mulla, S. Hagan, W. Ali-Ali, S. Jacob, A. Behbehani, M. Bitar, A. Dallol und W. Kolch, „Raf kinase inhibitor protein: Mechanism of loss of expression and associations with genomic instability,“ *Journal of Clinical Pathology*, Nr. 61, pp. 524-529, 2008.

- [104] C. Ribas, P. Penela, C. Murga, A. Salcedo, C. Gracia-Hoz, M. Jurado-Pueyo, I. Aymerich und F. Mayor, „The G Protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: Role of GRKs in GPCR regulation and signaling,“ *Biochimica et Biophysica Acta*, Nr. 1768, pp. 913-922, 2007.
- [105] K. Corbit, N. Trakul, E. Eves, B. Diaz, M. Marshall und M. Rosner, „Activation of Raf-1 signaling by protein kinases C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein,“ *Journal of Biological Chemistry*, Nr. 278, pp. 13061-13068, 2003.
- [106] K. Deiss, C. Kisker, M. Lohse und K. Lorenz, „Raf kinase inhibitor protein (RKIP) dimer formation controls its target switch from Raf1 to G protein-coupled receptor kinase (GRK) 2,“ *Journal of Biological Chemistry*, Nr. 287, pp. 23407-23417, 2012.
- [107] J. Skinner und M. Rosner, „RKIP Structure Drives Its Function: A Three-State Model for Regulation of RKIP,“ *Critical reviews in oncogenesis*, Nr. 19, pp. 483-488, 2014.
- [108] A. Granovsky, M. Clark, D. McElheny, G. Heil, J. Hong, X. Liu, Y. Kim, G. Joachimiak, A. Joachimiak, S. Koide und M. Rosner, „Raf kinase inhibitory protein function is regulated via a flexible pocket and novel phosphorylation-dependent mechanism,“ *Molecular and Cellular Biology*, Nr. 29, pp. 1306-1320, 2009.
- [109] H. Dyson und E. Komives, „Role of disorder in I $\kappa$ B-NF $\kappa$ B interaction,“ *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, Nr. 64, pp. 499-505, 2012.
- [110] M. Karin, Y. Cao, F. Greten und Z. Li, „NF- $\kappa$ B in cancer: From innocent bystander to major culprit,“ *Nature Reviews Cancer*, Nr. 2, pp. 301-310, 2002.
- [111] K. Yeung, D. Rose, A. Dhillon, D. Yaros, M. Gustafsson, D. Chatterjee, B. McFerran, J. Wyche, W. Kolch und J. Sedivy, „Raf kinase inhibitor protein interacts with NF- $\kappa$ B-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF- $\kappa$ B activation,“ *Molecular and Cellular Biology*, Nr. 21, pp. 7207-7217, 2001.
- [112] A. Beshir, G. Ren, A. Magpusao, L. Barone, K. Yeung und G. Fenteany, „Raf kinase inhibitor protein suppresses nuclear factor- $\kappa$ B-dependent cancer cell invasion through negative regulation of matrix metalloproteinase expression,“ *Cancer Letters*, Nr. 299, pp. 137-149, 2010.
- [113] H. Xinzhou, Y. Ning, W. Ou, L. Xiaodan, Y. Fumin, L. Huitu und Z. Wei, „RKIP inhibits the migration and invasion of human prostate cancer PC-

- 3M cells through regulation of extracellular matrix," *Molecular Biology*, Nr. 45, pp. 1004-1011, 2011.
- [114] D. Zhao, J. Ma, J. Shi, L. Cheng, F. Li, X. Jiang und H. Jiang, „Raf kinase inhibitor protein inhibits esophageal cancer cell invasion through downregulation of matrix metalloproteinase expression," *Oncology reports*, Nr. 30, pp. 304-312, 2013.
- [115] F. Al-Mulla, M. Bitar, M. Al-Maghrebi, A. Behbehani, W. Al-Ali, O. Rath, B. Doyle, K. Tan, A. Pitt und W. Kolch, „Raf kinase inhibitor protein RKIP enhances signaling by glykogen synthase kinase-3beta," *Cancer Research*, Nr. 71, pp. 1334-1343, 2011.
- [116] M. Schuierer , F. Bataille und S. Hagan, „Reduction in Raf kinase inhibitor protein is associated with increased Ras-extracellular signal-regulated kinase signaling in melanoma cell lines," *Cancer Research*, Nr. 64, pp. 5186-5192, 2004.
- [117] H. Lee , B. Tian und J. Sedivy, „Loss of Raf kinase inhibitor protein promotes cell proliferation and migration of human hepatoma cells," *Gastroenterology*, Nr. 131, pp. 1208-1217, 2006.
- [118] S. Zhu, K. McHenry, W. Lane und G. Fenteany, „A chemical inhibitor reveals the role of Raf kinase inhibitor protein in cell migration," *Chemistry & Biology*, Nr. 12, pp. 981-991, 2005.
- [119] S. Dangi-Garimella, J. Yun, E. Eves, M. Newman, S. Erkland, S. Hammond, A. Minn und M. Rosner, „Raf kinase inhibitory protein suppresses a metastasis signalling cascade involving LIN28 and let-7," *EMBO Journal*, Nr. 28, pp. 347-358, 2009.
- [120] Y. Kang, P. Siegel, W. Shu, M. Drobnjak, S. Kakonen, C. Cordon-Cardo, T. Guise und J. Massague, „A multigenic programm mediating breast cancer metastasis to bone," *Cancer Cell*, Nr. 3, pp. 537-549, 2003.
- [121] N. Trakul und M. Rosner, „Modulation of the MAP kinases signaling cascade by Raf Kinase inhibitor protein," *Cell Research*, Nr. 15, pp. 19-23, 2005.
- [122] S. Baylin und J. Hermann, „DNA hypermethylation in tumorigenesis: Epigenetics joins genetic," *Trends in Genetics*, Nr. 16, pp. 168-174, 2000.
- [123] P. Minoo, K. Baker, R. Goswami, G. Chong, W. Foulkes, A. Ruskiewicz, M. Barker, D. Buchanan, J. Young und J. Jass, „Extensive DNA methylation in normal colorectal mucosa in hyperplastic polyposis," *Gut*, Nr. 55, pp. 1467-1474, 2006.

- [124] S. Beach, H. Tang, S. Park, A. Dhillon, E. Keller, W. Kolch und K. Yeung, „Snail is a repressor of RKIP transcription in metastatic prostate cancer cells,“ *Oncogenesis*, Nr. 27, pp. 2243-2248, 2008.
- [125] G. Ren, S. Baritaki, H. Marathe, J. Feng, S. Park, S. Beach, P. Bazeley, A. Beshir, G. Fenteany, R. Mehra, S. Daignault, F. Al-Mulla, E. Keller, B. Bonavida, I. de la Serna und K. Yeung, „Polycomb protein EZH2 regulates tumor invasion via the transcriptional repression of the metastasis suppressor RKIP in breast and prostate cancer,“ *Cancer Research*, Nr. 72, pp. 3091-3104, 2012.
- [126] S. Das, S. Bhutia, U. Sokhi, B. Azab, Z. Su, H. Boukerche, T. Anwar, E. Moen, D. Chatterjee, M. Pellecchia, D. Sakar und P. Fisher, „Raf kinase inhibitor RKIP inhibits MDA9/syntenin-mediated metastasis in melanoma,“ *Cancer Research*, Nr. 72, pp. 6271-6226, 2012.
- [127] H. Zhang, J. Wu, J. Keller, K. Yeung, E. Keller und Z. Fu, „Transcriptional regulation of RKIP expression by androgen in prostate cells,“ *Cellular Physiology and Biochemistry*, Nr. 30, pp. 1340-1350, 2013.
- [128] J. Yook, X. Li, I. Ota, E. Fearson und S. Weiss, „Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail,“ *Journal of Biological Chemistry*, Nr. 280, pp. 11740-11748, 2005.
- [129] S. Namimatsu, M. Ghazizadeh und Y. Sugisaki, „Reversing the Effects of Formalin Fixation with Citraconic Anhydride and Heat: A Universal Antigen Retrieval Method,“ *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, Nr. 53, pp. 3-11, 2005.
- [130] A. Nickel, A. von Hardenberg, M. Hohl, J. Löffler, M. Kohlhaas, J. Becker, J. Reil, A. Kazakov, J. Bonnekoh, M. Stadelmaier, S. Puhl, M. Wagner, I. Bogeski, S. Cortassa, R. Kappl, B. Pasioka, M. Lafontaine, C. Lancaster, T. Blacker, A. Hall, M. Duchon, L. Kästner, P. Lipp, T. Zeller, C. Müller, A. Knopp, U. Laufs, M. Böhm, M. Hoth und C. Maack, „Reversal of Mitochondrial Transhydrogenase Causes Oxidative Stress in Heart Failure,“ *Cell Metabolism*, Nr. 22, pp. 1-13, 2015.
- [131] K. Weber, W. Clark, J. Janicki und S. Shroff, „Physiologic Versus Pathologic Hypertrophy and the Pressure-Overloaded Myocardium,“ *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, Nr. 10, pp. 37-49, 1987.
- [132] H. Chang, Y. Chiu, Y. Lin, R. Chen, J. Lin, F. Tsai, C. Tsai, Y. Kuo, J. Liu und C. Huang, „Herbal Supplement Attenuation of Cardiac Fibrosis with CCl<sub>4</sub>-Induced Liver Cirrhosis,“ *Chinese Journal of Physiology*, Nr. 57, pp. 41-47, 2014.
- [133] C. Yang, W. Ting, C. Day, D. Ju, Y. Yeh, L. Chung, F. Tsai, H. Tsai, Y. Tsai und C. Huang, „SHSST Cyclodextrin Complex Prevents the Fibrosis Effect on CCl<sub>4</sub>-Induced Cirrhotic Cardiomyopathy in Rats through TGF- $\beta$

Pathway Inhibition Effects," *International Journal of Molecular Sciences*, Nr. 15, pp. 8037-8048, 2014.

- [134] K. Weber, C. Brilla und J. Janicki, „Myocardial fibrosis: functional signigicance and regulatory factors," *Cardiovascular Research*, Nr. 27, pp. 341-348, 1993.
- [135] P. Fedak, S. Verma, R. Weisel und R.-K. Li, „Cardiac remodeling and failure From molecules to man (Part II)," *Cardiovascular Pathology*, Nr. 14, pp. 49-60, 2005.
- [136] A. Kazakov, R. Hall, P. Jagoda, K. Bachelier, P. Müller-Best, A. Semenov, F. Lammert, M. Böhm und U. Laufs , „Inhibition of endothelial nitric oxide synthase induces and enhances myocardial fibrosis," *Cardiovascular Research*, Nr. 100, pp. 211-221, 2013.
- [137] C. Sounders, T. Borg, I. Banerjee und T. Baudino, „Pressure Overload Induces Early Morphological Changes in the Heart," *American Journal of Pathology*, Nr. 181, pp. 1226-1235, 2012.
- [138] E. Keeley, B. Mehrad und R. Strieter, „The role of circulating mesenchymal progenitor cells (fibrocytes) in the pathogenesis of fibrotic disorders," *Thrombosis and Haemostasis*, Nr. 101, pp. 613-618, 2009.
- [139] R. Phillips, M. Burdick, K. Hong, M. Lutz, L. Murray und Y. Xue, „Circulating fibrocytes traffic to the lung in response to CXCL12 and mediate fibrosis," *Journal of Clinical Investigation*, Nr. 114, pp. 438-446, 2004.
- [140] B. Mehrad, M. Burdick und R. Strieter, „Fibrocyte CXCR4 regulation as a therapeutic target in pulmonary fibrosis," *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Nr. 41, pp. 1708-1718, 2009.
- [141] W. Kannel, T. Gordon und D. Offutt, „Left ventricular hypertrophy by electrocardiogram. Prevalence, incidence and mortality in the Framingham study," *Annals of Internal Medicine*, Bd. 71, pp. 89-105, 1969.
- [142] D. Lloyd-Jones, M. Larson, E. Leip, A. Beiser, R. D`Agostino und W. Kannel, „Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study," *Circulation*, Bd. 106, pp. 3068-3072, 2002.
- [143] I. Harris, Z. Shaosong, I. Treskov, A. Kovacs, C. Weinheimer und A. Muslin, „Raf-1 Kinase is required for cardiac hypertrophy and cardiomyocyte survival in response to pressure overload," *Circulation*, Nr. 110, pp. 718-723, 2004.

- [144] M. Mikula, M. Schreiber und Z. Husak, „Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene,“ *EMBO Journal*, Nr. 20, pp. 1952-1962, 2001.
- [145] N. Takeda und I. Manabe, „Cellular Interplay between Cardiomyocytes and Nonmyocytes in Cardiac Remodeling,“ *International Journal of Inflammation*, Nr. 535241, 2011.
- [146] E. Keller, „Metastasis suppressor genes: a role for raf kinase inhibitor protein (RKIP),“ *Anticancer drugs*, Nr. 15, pp. 663-669, 2004.
- [147] B. Bernado, K. Weeks, L. Pretorius und J. Mc Mullen, „Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies,“ *Pharmacology & Therapeutics*, Nr. 128, pp. 191-227, 2010.
- [148] C. Memet, D. Gerege, M. Ozenci, I. Akbulut, A. Acibuca, M. Kiliçkap und C. Erol, „Evaluation of the Role of Oxidative Stress in Degenerative Aortic Stenosis,“ *Journal of heart valve disease*, Nr. 24, pp. 445-450, 2015.
- [149] S. Maulik und S. Kumar, „Oxidative stress and cardiac hypertrophy: a review,“ *Toxicology Mechanisms and Methods*, Nr. 22, pp. 359-366, 2012.
- [150] F. Giordano, „Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure,“ *The Journal of Clinical Investigation*, Nr. 115, pp. 500-508, 2005.
- [151] J. Li, T. Ichikawa, L. Villacorta, J. Janicki, G. Brower, M. Yamamoto und T. Cui, „Nrf2 Protects Against Maladaptive Cardiac Responses to Hemodynamic Stress,“ *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, Nr. 29, pp. 1843-1850, 2009.
- [152] B. Hybertson, B. Gao, S. Bose und J. McCord, „Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation,“ *Molecular Aspects of Medicine*, Nr. 32, pp. 234-246, 2011.
- [153] S. Zhou, W. Sun, Z. Zhang und Y. Zheng, „The Role of Nrf2-Mediated Pathway in Cardiac Remodeling and Heart Failure,“ *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Nr. 260429, 2014.
- [154] F. Al-Mulla, M. Bitar, J. Feng, S. Park und K. Yeung, „A New Model for Raf Kinase Inhibitory Protein Induced Chemotherapeutic Resistance,“ *PLOS one*, Nr. 29532, 2012.
- [155] E. Schmid, S. Neef, C. Berlin, A. Tomasovic, K. Kahlert, P. Nordbeck, K. Deiss, S. Denzinger, S. Herrmann, E. Wettwer, M. Weidendorfer, D. Becker, F. Schäfer, N. Wagner, S. Ergün, J. Schmitt, H. Katus, F. Weidemann, U. Ravens, C. Maack, L. Hein, G. Ertl, O. Müller, L. Maier, M. Lohse und K. Lorenz, „Cardiac RKIP induces a beneficial  $\beta$ -

- adrenoceptor-dependent positive inotropy," *Nature Medicine*, Nr. 21, pp. 1298-1306, 2015.
- [156] D. Chatterjee, Y. Bai und Z. Wang, „RKIP sensitizes prostate and breast cancer cells to drug-induced apoptosis," *Journal of Biological Chemistry*, Nr. 279, pp. 17515-17523, 2004.
- [157] A. Jazirehi, M. Vega und D. Chatterjee, „Inhibition of Raf-MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway, Bcl-xL down-regulation, and chemosensitization of non-Hodgkin's lymphoma B cells by rituximab," *Cancer Research*, Nr. 64, pp. 7117-7126, 2004.
- [158] S. Baritaki, A. Katsman und D. Chatterjee, „Regulation of tumor cell sensitivity to TRAIL-induced apoptosis by the metastatic suppressor Raf kinase inhibitor protein via Ying Yang 1 inhibition and death receptor 5 up-regulation," *Journal of Immunology*, Nr. 179, pp. 5441-5453, 2007.
- [159] S. Hagan, R. Garcia, A. Dhillon und W. Kolch, „Raf kinase inhibitor protein regulation of raf and MAPK signaling," *Methods in Enzymology*, Nr. 407, pp. 248-259, 2006.
- [160] A. Kazakov, P. Müller, P. Jagoda, A. Semenov, M. Böhm und U. Laufs, „Endothelial nitric oxide synthase of bone marrow regulates myocardial hypertrophy, fibrosis, and angiogenesis," *Cardiovascular Research*, Nr. 93, pp. 397-405, 2011.
- [162] T. Wynn und T. Ramalingam, „Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease," *Nature Medicine*, Nr. 18, pp. 1028-1040, 2012.
- [163] I. Bahcecioglu, „Hepatoprotective effect of infliximab, an anti-TNF- $\alpha$  agent, on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis," *Inflammation*, Nr. 31, pp. 215-221, 2008.
- [164] J. Zhao und S. Wenzel, „Interactions of RKIP with Inflammatory Signaling Pathways," *Critical Review on Oncology*, Nr. 19, pp. 497-504, 2014.

## 9. Publikationen

### 9.1. Originalarbeiten

Kazakov A, **Meier T**, Werner C, Hall R, Klemmer B, Körbel C, Lammert F, Maack C, Böhm M, Laufs U (2015)  
C-kit(+) resident cardiac stem cells improve left ventricular fibrosis in pressure overload  
Stem Cell Research; 15:700-711

A. Kazakov, **T. Meier**, R. Hall, A. Trouvain, S. Rodionycheva, F. Lammert, H. Schäfers, C. Maack, K. Lorenz, M. Böhm, U. Laufs  
Raf kinase inhibitor protein regulates interstitial and replacement cardiac fibrosis  
Publikation in Vorbereitung

### 9.2. Abstracts

A. Kazakov, R. Hall, **T. Meier**, F. Lammert, M. Böhm, U. Laufs (2016)  
Raf kinase inhibitor protein regulates interstitial and replacement cardiac fibrosis  
Clin Res Cardiol 105, Suppl 1, March 2016: P382

A. Kazakov, **T. Meier**, C. Werner, R. Hall, B. Klemmer, C. Körbel, F. Lammert, C. Maack, M. Böhm, U. Laufs (2016)  
C-kit+ resident cardiac stem cells ameliorate left ventricular fibrosis in pressure overload  
Clin Res Cardiol 105, Suppl 1, March 2016: P383

A. Kazakov, R. Hall, **T. Meier**, F. Lammert, M. Böhm, U. Laufs (2015)  
Raf kinase inhibitor protein regulates interstitial and replacement cardiac fibrosis  
European Heart Journal (2015) 36 (Abstract Supplement), 362: P2160

A. Kazakov, R. Hall, **T. Meier**, F. Lammert, M. Böhm, U. Laufs (2015)  
Raf kinase inhibitor protein regulates interstitial and replacement cardiac fibrosis  
Clinical Research in Cardiology 104, Suppl 1, April 2015: P1387

## 10. Danksagungen

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Ulrich Laufs dafür danken, dass er mir dieses spannende Thema überlassen hat und ich in seiner Arbeitsgruppe erste wissenschaftliche Erfahrungen sammeln durfte. Besonders bedanken möchte ich mich für die anregenden Gespräche, die meine Arbeit immer wieder vorangetrieben haben.

Ebenfalls großer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. Andrey Kazakov, der rund um die Uhr ein offenes Ohr für mich hatte und mit seiner wissenschaftlichen Erfahrung und Kompetenz großen Anteil an der Fertigstellung dieser Dissertation trägt.

Auch den Mitarbeitern des kardiologischen Forschungslabors möchte ich herzlich dafür danken, dass sie mich so kompetent und geduldig in die wissenschaftlichen Methoden eingelernt haben.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, Brüdern und meinem Großvater sowie meiner Verlobten danken, die mich durch ständige Unterstützung sowohl mental als auch finanziell entlasteten und mir somit den Weg für diese Arbeit ebneten.