

Aus dem
Institut für Geschlechterforschung in der Medizin (GiM)
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchungen zur 17 β -Östradiol-abhängigen
Regulation von Periostin in humanen kardialen
Fibroblasten**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jasmin Zernikow

aus Finsterwalde

Datum der Promotion: 03.12.2021

Diese Arbeit berücksichtigt eine geschlechtergerechte Sprache, wann immer möglich. Sie erkennt unterschiedliche Geschlechteridentitäten und deren gelebte Vielfalt an, bezieht sich aufgrund des molekularbiologisch fundierten Charakters dieser experimentellen Arbeit dabei vornehmlich auf die biologisch chromosomale, binäre Geschlechtsklassifizierung (Sex), wengleich auch diese ein grundsätzlich erweitertes Spektrum der Geschlechtlichkeit zulässt.

Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungsverzeichnis	VI
II	Abbildungsverzeichnis	IX
III	Tabellenverzeichnis	X
IV	Abstract/ Kurzfassung	XI
1	Einleitung.....	1
1.1	Klinischer Hintergrund: Gesundheitsrisiko Herzfibrose und seine biomedizinische Bedeutung	1
1.2	Molekularer und zellulärer Mechanismus der Entstehung einer Herzfibrose	3
1.2.1	Fibroblasten als zelluläre Effektoren der Herzfibrose	4
1.2.2	Pathomolekulare Veränderungen der Extrazellulärmatrix im fibrotischen Herz.....	5
1.2.3	Periostin – bedeutendes Markerprotein der Myokardfibrogenese und -fibrose	6
1.3	Geschlechtsspezifische Unterschiede in kardialen Umbauprozessen	8
1.3.1	Der Einfluss geschlechtsspezifischer Ausprägungen der Myokardhypertrophie auf die Herzmorphologie und -funktion	8
1.3.2	Unterschiede in der geschlechtsspezifischen Ausprägung einer Myokardfibrose und Periostin-Expression	9
1.4	17 β -Östradiol vermittelt geschlechtsspezifische Unterschiede in kardialen Umbauprozessen über Östrogenrezeptor-Signalwege.....	10
1.4.1	Die 17 β -Östradiol-vermittelte Abschwächung der Myokardfibrose als Östrogenrezeptor-abhängiger Mechanismus.....	11
1.4.2	Einfluss von 17 β -Östradiol und Östrogenrezeptoren auf die Regulation Fibrose-assoziiierter Gene in kardialen Fibroblasten.....	12
1.4.3	17 β -Östradiol abhängige Regulation von Periostin.....	13
1.5	Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Material.....	15
2.1.1	Geräte.....	15
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	16

2.1.3	Chemikalien	17
2.1.4	Antikörper.....	17
2.1.5	Zellen	17
2.1.6	Zellkulturmedien und -zusätze.....	19
2.1.7	Oligonukleotide	19
2.1.8	Softwareprogramme.....	21
2.2	Methoden	21
2.2.1	Zellkulturexperimente	21
2.2.1.1	Kultivierung	22
2.2.1.2	Zellzählung	23
2.2.1.3	Phasenkontrastmikroskopie	23
2.2.1.4	Kryokonservierung	23
2.2.1.5	Aktivkohle-Dextran Stripping des fetalen Kälberserums	24
2.2.1.6	Behandlung der humanen kardialen Fibroblasten mit 17 β -Östradiol und Östrogenrezeptor-Agonisten	24
2.2.1.7	Behandlung von hiPSC-Kardiomyozyten mit hCF- Zellkulturüberstand	27
2.2.2	Analyse der messenger RNA-Regulation mittels RT-qPCR.....	28
2.2.2.1	RNA-Isolation.....	28
2.2.2.2	Qualitative und quantitative Messung der Gesamt-RNA.....	29
2.2.2.3	Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR).....	30
2.2.2.4	Quantitative PCR in Echtzeit	31
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	32
2.2.3.1	Gewinnung und Aufreinigung von Gesamtprotein	32
2.2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Test .	33
2.2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	33
2.2.3.4	Proteintransfer mittels Western-Blot Methode	34
2.2.3.5	Immunologische Proteindetektion	35
2.2.3.6	Densitometrische Western-Blot Quantifizierung	36
2.3	Statistische Auswertung.....	36

3	Ergebnisse	37
3.1	Charakterisierung der humanen kardialen Fibroblastenkultur	37
3.2	Nachweis von <i>Periostin</i> mRNA und Protein in weiblichen und in männlichen humanen kardialen Fibroblasten	39
3.3	Effekt von 17 β -Östradiol in humanen kardialen Fibroblasten	40
3.3.1	Einfluss von 17 β -Östradiol auf die geschlechtsspezifische Periostin-Transkription.	40
3.3.2	Regulation der <i>Periostin</i> mRNA-Transkription durch spezifische ER-Agonisten	42
3.3.3	Effekte von 17 β -Östradiol auf das Periostin-Gesamtprotein in weiblichen und männlichen humanen kardialen Fibroblasten	43
3.3.4	Einfluss von 17 β -Östradiol auf die geschlechtsspezifische Sekretion von Periostin-Protein seitens humaner kardialer Fibroblasten.....	46
3.4	Effekte von Fibroblasten- Zellkulturüberstand auf die Aktivierung von hiPSC-CM.....	49
4	Diskussion	53
4.1	Bedeutsamkeit des gewählten Fibroblastenkultur-Modells.....	53
4.2	Die Analyse der basalen <i>Periostin</i> -Expression in kultivierten humanen kardialen Fibroblasten.....	54
4.3	Geschlechtsspezifische Regulation der Periostin-Transkription in humanen kardialen Fibroblasten durch 17 β -Östradiol.....	55
4.4	17 β -Östradiol induziert Periostin-Gesamtprotein in humanen kardialen Fibroblasten..	59
4.5	Der 17 β -Östradiol Effekt auf die Sekretion von Periostin-Protein in Fibroblasten	61
4.6	Effekt von Fibroblasten-abgeleitetem Kulturüberstand auf hiPSC-CM	65
5	Zusammenfassung und Ausblick	69
6	Literaturverzeichnis	71
V	Eidesstattliche Versicherung	XIV
VI	Lebenslauf	XV
VII	Publikationen und Präsentationen	XVI
VIII	Danksagung	XVII

I Abkürzungsverzeichnis

♀	weiblich
♂	männlich
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aortenklappenstenose
BCA	Bicinchoninsäure
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMP	Knochen morphogenetisches Protein (<i>Bone morphogenic protein</i>)
bp	Basenpaar (<i>base pair</i>)
c	Konzentration
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CF	kardiale Fibroblasten
CM	Kardiomyozyten (<i>cardiomyocytes</i>)
Dex	Dextrin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribunukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
E2	17β-Östradiol
ECL	Luminol-basierende verbesserte Chemilumineszenz (<i>Luminol-based Enhanced Chemiluminescent</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Östrogen-Rezeptor(en) (<i>estrogen receptor</i>)
ERα; ERβ	Östrogenrezeptor Alpha; Östrogenrezeptor Beta
ERB	chem.: 7-Ethenyl-2-(3-fluoro-4-hydroxyphenyl)-5-benzoxazolol; selektiver Östrogenrezeptor Beta Agonist
et al.	lat.: et alii, et aliae, et alium / dt.: und andere
EtOH	Ethanol
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor (<i>Fibroblastic Growth Factor</i>)
FW	vorwärts (<i>forward</i>)
GPER	G-protein-gekoppelter Östrogenrezeptor
hCF	humane kardiale Fibroblasten
HCl	Chlorwasserstoff
hiPSC	humane induzierte pluripotente Stammzellen (<i>human induced pluripotent stem cells</i>)
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
kDa	kilo-Dalton
LOX	Lysyl Oxidase

<i>M</i>	Molarität, Mol pro Liter
<i>mg, µg, ng</i>	Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
<i>ml, µl</i>	Milliliter, Mikroliter
<i>mM, nM</i>	millimolar, nanomolar <i>siehe M - Molarität</i>
<i>MM</i>	Molekülmasse
<i>MMP-1</i>	Matrix-Metalloproteinase Typ 1
<i>MCF-7</i>	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
<i>mRNA</i>	<i>messenger ribonucleic acid</i> , <i>siehe RNA</i>
<i>MW</i>	Mittelwert
<i>MYH6; MYH7</i>	<i>myosin heavy chain 6; myosin heavy chain 7</i>
<i>n</i>	Anzahl der Proben
<i>Na₃VO₄</i>	Natriumorthovanadat
<i>NaCl</i>	Natriumchlorid
<i>NaF</i>	Natriumfluorid
<i>NPPA; NPPB</i>	<i>natriuretic peptide A; natriuretic peptide B</i>
<i>OVX</i>	ovarektomiert
<i>p; p-Wert</i>	Signifikanzniveau; mathematische Kennzahl zur Auswertung des statistischen Signifikanzwertes
<i>P2, P3, P4...</i>	Zweite/ Dritte/ Vierte... Passage
<i>PAA</i>	Polyacrylamid
<i>PBS</i>	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate buffered saline</i>)
<i>PCR</i>	Polymerase Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
<i>pmol</i>	picomol
<i>POSTN</i>	HGNC (<i>HUGO Gen Nomenklatur Komitee</i>) -akzeptiertes Gen-Symbol für Periostin
<i>PPT</i>	chem.: 4,4',4''-(4-Propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol; selektiver Östrogenrezeptor Alpha Agonist
<i>prf</i>	Phenolrot-frei
<i>rCF</i>	kardiale Ratten-Fibroblasten
<i>RNA</i>	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
<i>rRNA</i>	ribosomale RNA, <i>siehe RNA</i>
<i>RT</i>	Raumtemperatur
<i>RT-PCR</i>	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
<i>RT-qPCR</i>	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit (<i>Real-time quantitative polymerase chain reaction</i>)
<i>RV</i>	zurück (<i>reverse</i>)
<i>SDS-PAGE</i>	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
<i>SEM</i>	Standardfehler des Mittelwertes (<i>standard error of mean</i>)

<i>TBST</i>	TBST-Puffer, Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20 (<i>Tris-buffered saline with Tween 20</i>)
<i>TEMED</i>	Tetramethylethyldiamin
<i>TGFβ</i>	Transformierender Wachstumsfaktor Beta (<i>Transforming Growth Factor beta</i>)
<i>U</i>	Einheiten (<i>Units</i>)
<i>U/min</i>	Umdrehungen pro Minute
<i>x g</i>	x-faches der Erdbeschleunigung ($g = 9,80665 \text{ m/s}^2$); Wert für relative Zentrifugalbeschleunigung
<i>ZKÜ</i>	Zellkulturüberstand

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schema der hCF- <i>in-vitro</i> Behandlung.....	26
Abbildung 2:	Exemplarische rRNA-Integritätsanalyse einer hCF-Probe nach RNA-Isolation.	30
Abbildung 3A-B:	Zellmorphologische Darstellung der humanen kardialen Fibroblasten im Phasenkontrast-Lichtmikroskop.....	38
Abbildung 4A-B:	Basale <i>POSTN</i> mRNA- und Proteinexpression in weiblichen und männlichen hCF.	40
Abbildung 5:	Relative <i>POSTN</i> mRNA-Menge in weiblichen hCF nach E2-Behandlung.	41
Abbildung 6:	Relative <i>POSTN</i> mRNA-Menge in männlichen hCF nach E2-Behandlung.	42
Abbildung 7A-B:	Relative <i>POSTN</i> mRNA Level in hCF nach PPT- oder ERB-Behandlung.	43
Abbildung 8:	Densitometrische Analyse des relativen <i>POSTN</i> -Gesamtproteins in weiblichen hCF nach E2-Behandlung.....	44
Abbildung 9:	Densitometrische Analyse des relativen <i>POSTN</i> -Gesamtproteins in männlichen hCF nach E2-Behandlung.	45
Abbildung 10:	Densitometrische Analyse des relativen sezernierten <i>POSTN</i> Proteins im Zellkulturüberstand (ZKÜ) weiblicher hCF unter basalen Bedingungen und nach E2-Behandlung	47
Abbildung 11:	Densitometrische Analyse des relativen sezernierten <i>POSTN</i> Proteins im Zellkulturüberstand (ZKÜ) männlicher hCF unter basalen Bedingungen und nach E2-Behandlung.	48
Abbildung 12A-D:	Relative <i>MYH6</i> und <i>MYH7</i> mRNA in weiblichen (♀) und männlichen (♂) hiPSC-CM nach Behandlung mit hCF-ZKÜ.	50
Abbildung 13A-D:	Relative <i>NPPA</i> und <i>NPPB</i> mRNA in weiblichen (♀) und männlichen (♂) hiPSC-CM nach Behandlung mit hCF-ZKÜ.	52

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste verwendeter Laborgeräte	15
Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien	16
Tabelle 3: Liste verwendeter Primär- und Sekundärantikörper	17
Tabelle 4: Liste verwendeter hCF-Zellen	18
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Zellkulturmedien und -zusätze für hCF	19
Tabelle 6: verwendete genspezifische humane Oligonukleotide für die RT-qPCR.....	20
Tabelle 7: verwendete Softwareprogramme	21
Tabelle 8: verwendete Agenzien zur Behandlung der kardialen Fibroblasten	27
Tabelle 9: Hauptschritte und Bedingungen für die RT-qPCR in Echtzeit.....	32

IV Abstract/ Kurzfassung

Analysis of the 17 β -Estradiol-dependent Periostin regulation in human cardiac fibroblasts

Background: Cardiac fibrosis contributes to heart failure progression. Men with aortic stenosis (AS) exhibit more fibrosis and significant higher Periostin (POSTN) protein levels than women. In addition, only male AS-patients show significant induction of POSTN mRNA compared to healthy controls. Moreover, it is known that 17 β -Estradiol (E2) and estrogen receptors (ER) contribute to sex differences in cardiac fibrosis in mice. Analysis of cardiac fibroblasts from rodents and humans indicate the direct regulation of cardiac fibrosis-associated genes by E2 and ER. So far, there are no data available whether E2 and ER regulate POSTN in human cardiac fibroblasts (hCF). Therefore, we aimed to unravel the effects of E2 and ER on POSTN expression and secretion in male and female hCF. We further tested whether a possible E2-mediated POSTN regulation in hCF affects cardiomyocytes (CM).

Methods: hCF from healthy donors ($n=3$ per sex) were treated with E2 (10nM), ER α - (10nM PPT), ER β -agonist (10nM ERB), or vehicle for 6h/12h/ 24h. POSTN mRNA and protein were measured in whole-cell lysates and cell culture supernatants (CCS). Induced human pluripotent stem cell-derived CM (hiPSC-CM) from both sexes were 24h incubated with CCS from hCF +/- 6h E2-treatment. NPPA, NPPB, MYH6, and MYH7 mRNA were measured as markers for CM-activation.

Results: In hCF, 12h E2-treatment down-regulated POSTN mRNA in female ($p<0.05$), but increased POSTN mRNA level in male cells compared to vehicle ($p<0.05$). 12h ER-agonist treatment showed no effect on POSTN mRNA. 6h E2-treatment increased POSTN protein in whole-cell lysate samples of both sexes ($p<0.01$), while secreted POSTN protein was regulated in a similar sex-specific manner as observed for mRNA level after 12h E2-treatment. CCS, derived from male and female hCF +/- E2-treatment, activated CM in a sex-specific manner. Incubation of hiPSC-CM with CCS derived from male and female hCF +/-6h E2-treatment regulated MYH6, MYH7, NPPA, and NPPB mRNA compared to control, but not in a sex-specific manner.

Conclusion: The E2-induced sex-specific regulation of POSTN mRNA and secretion in hCF is a novel mechanism, likely to contribute to sex-dependent cardiac fibrosis as observed in the clinic. Further analyses have to be carried out in order to better understand and unravel the sex-specific mechanisms leading to the sex-divergent regulation of POSTN by E2 and ER. A profound knowledge of how E2 and ER mediate sex-specific cardiac fibrosis development could help to design pharmacological interventions according to patient's sex.

Untersuchungen zur 17 β -Östradiol-abhängigen Periostin-Regulation in humanen kardialen Fibroblasten

Hintergrund: Die kardiale Fibrose trägt zur Progression einer zugrundeliegenden Herzerkrankung bis hin zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz bei. Männer mit Aortenstenose (AS) weisen im Vergleich zu Frauen eine vermehrte Fibrose und ein signifikant höheres Periostin (POSTN) Proteinniveau auf. Außerdem zeigten lediglich männliche AS-Patienten eine Induktion von *POSTN* mRNA im Vergleich zu gesunden Kontrollen ($p < 0,001$). Untersuchungen am Mausmodell zeigten, dass 17 β -Östradiol (E2) und Östrogenrezeptoren (ER) zu Geschlechterunterschieden in der Entstehung der kardialen Fibrose beitragen. Weitere Analysen in kardialen Fibroblasten aus Mensch und Maus weisen dabei auf eine direkte Beteiligung von E2 und den ER in der Regulation Fibrose-assoziiierter Gene hin. Bisher gibt es aber keine Daten darüber, ob E2 und ER *POSTN* in humanen kardialen Fibroblasten (hCF) regulieren. Daher war es Ziel dieser Arbeit, die Effekte von E2 und ER auf die *POSTN*-Expression und -Sekretion in männlichen und weiblichen hCF zu untersuchen. Ferner haben wir analysiert, ob eine mögliche E2-vermittelte *POSTN*-Regulation in hCF die Kardiomyozyten (CM)-Aktivierung beeinflusst.

Methoden: Kommerziell erworbene hCF von gesunden Spender*innen ($n=3$ pro Geschlecht) wurden mit 10nM E2, ER α - (10nM PPT), ER β -Agonist (10nM ERB) oder Vehikel für je 6h/12h/24h behandelt. *POSTN* mRNA und Protein wurden in Gesamtzelllysaten und Zellkulturüberständen (ZKÜ) gemessen. Humane induzierte, pluripotente Stammzell-CM (hiPSC-CM) beider Geschlechter wurden für 24h mit ZKÜ von hCF +/- 6h E2-Behandlung inkubiert. Die Messung der mRNA-Level von *NPPA*, *NPPB*, *MYH6* und *MYH7* dienten als Marker für eine CM-Aktivierung.

Ergebnisse: Eine 12h E2-Behandlung reprimierte die *POSTN* mRNA weiblicher hCF ($p < 0,05$), aber erhöhte das *POSTN* mRNA-Niveau in männlichen hCF gegenüber dem Vehikel ($p < 0,05$). Die 12-stündige ER-Agonisten-Behandlung zeigte keinen Effekt bezüglich der *POSTN* mRNA-Regulation. Eine 6h E2-Behandlung erhöhte das *POSTN*-Protein in Zelllysaten beider Geschlechter ($p < 0,01$), während das sezernierte *POSTN*-Protein in einer ähnlichen geschlechtsspezifischen Weise reguliert wurde wie die mRNA nach 12h E2-Behandlung. Die Inkubation der hiPSC-CM mit dem aus männlichen und weiblichen hCF +/- 6h E2-Behandlung gewonnenem ZKÜ führte zu einer Regulation der *MYH6*, *MYH7*, *NPPA* und *NPPB* mRNA gegenüber der Kontrolle. Geschlechtsspezifische Unterschiede konnten hier nicht beobachtet werden.

Schlussfolgerungen: Die E2-induzierte, geschlechtsspezifische Regulation von *POSTN* in hCF ist ein neuartiger Mechanismus, der wahrscheinlich zur geschlechtsabhängigen Ausprägung einer klinisch manifesten Herzfibrose beiträgt. Weitere Analysen der E2- und ER-vermittelten

geschlechtsspezifischen Regulation von POSTN sollten zum besseren Verständnis und zur detaillierten Aufklärung beitragen. Ein profundes Wissen darüber, wie E2 und ER die geschlechtsspezifische Entwicklung der Herzfibrose vermitteln, könnte helfen, pharmakologische Interventionen entsprechend dem Patient*innen-Geschlecht zu adressieren.

1 Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen führen seit vielen Jahren die Liste der Haupttodesursachen an: Auf sie entfielen für das Jahr 2019 rund 35% aller Sterbefälle in Deutschland. Dabei fällt auf, dass konstant zu den Vorjahren anteilig mehr Frauen als Männer an Herzerkrankungen versterben.¹ Insbesondere am Beispiel der Herzinsuffizienz wird dieser Unterschied deutlich: In Bezug auf das hohe Lebensalter offenbart der *Herzbericht 2019* erhöhte Morbiditäts- und Mortalitätsunterschiede für Frauen gegenüber Männern. Ihr Risiko an den Folgebeschwerden einer Herzinsuffizienz in einer Klinik behandlungspflichtig zu werden ist deutlich höher. Zudem sterben Frauen deutlich öfter an einer Herzinsuffizienz, ihre Sterbeziffer liegt 65,5% über derer von Männern (in absoluten Zahlen: 23.735 Frauen zu 13.974 Männern).²

Zum einen existieren epidemiologische Faktoren, die als Erklärungsansätze hinsichtlich des geschlechtsspezifischen Gefälles der Mortalitätsziffern dienen. Hier seien eine höhere Lebenserwartung für Frauen, welche jene von Männern im Jahr 2019 um durchschnittlich 5,9 Jahre überstieg³, sowie ein längeres Gesamtüberleben mit einer Herzinsuffizienz⁴ genannt. Andererseits ist nicht genau verstanden auf welchen primären, genetisch bedingten Faktoren jene Geschlechterunterschiede in Herzerkrankungen beruhen. Inwiefern molekulare Unterschiede in der geschlechtsdimorphen Ausprägung bestehen und ob diese eine Bedeutung hinlänglich der klinischen Penetranz haben, ist Grundlage aktueller Forschungsbemühungen und soll durch die vorliegende Arbeit dargestellt und ergänzt werden.

1.1 Klinischer Hintergrund: Gesundheitsrisiko Herzfibrose und seine biomedizinische Bedeutung

Die *kardiale Fibrose* (*syn. Herzfibrose, Myokardfibrose*) beschreibt eine veränderte Komposition an zellulären und extrazellulären Herzgewebekomponenten im Rahmen kardialer Umbauprozesse, die den Herzmuskel in seiner Morphologie und Funktion oft irreversibel und einschneidend beeinträchtigen können.⁵ Einerseits kann sie als physiologische Konsequenz von Ausdauertraining und biologischen Alterungsprozessen auftreten.⁶ Andererseits gilt die Herzfibrose als histopathologisches Kennzeichen für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität, denn eine fibrotische Gewebeausbildung ist beinahe allen Herz-Kreislaufferkrankungen immanent: Von führender Relevanz seien hier der Myokardinfarkt, die Herzinsuffizienz und hypertensive Herzkrankheit zu nennen.² Als häufigste degenerative Herzklappenerkrankung verursacht speziell die Aortenklappenstenose (AS)⁷ ventrikuläre Drucküberladungen und triggert so den fibrotischen Myokardumbau bis hin zu einer sekundären, dekompensierten Herzinsuffizienz.⁸

In der Herzpathologie gilt die Fibrosierung zunächst als zuträgliche, adaptive Komponente bei der Heilung von zerstörtem Myokard sowie in der allgemeinen Geweberegeneration. Dagegen gilt die andauernde und exzessive Ablagerung extrazellulärer Matrix (EZM) und Proliferation humaner kardialer Fibroblasten (hCF) jedoch als maladaptiver Prozess, denn er führt zu einer versteiften Gewebestruktur und damit eingeschränkten kontraktile Myokardfunktion⁹ – diesem Umstand wird der Begriff des ‚*pathologischen Remodelings*‘ zugeschrieben. Dieser Myokardumbau impliziert sodann eine kompensatorisch gesteigerte Herzfunktion, die sich kontinuierlich erschöpft, funktionell verschlechtert und für betroffene Patient*innen schließlich Ausdruck in der Diagnose einer Herzinsuffizienz oder eines plötzlichen Herztods findet.¹⁰ Darüber hinaus begünstigt die Fibrose eine elektromechanische Entkopplung der kardialen Myozyten (CM) und damit das Auftreten von Herzrhythmusstörungen, indem sie die Erregungsausbreitung und Repolarisation in CM stört.^{10, 11}

Gegenwärtig wird die Entität der Myokardfibrose in 3 Subtypen klassifiziert – diese histopathologische Einteilung hat auch eine therapeutische Konsequenz: (I) Die *reaktive interstitielle Fibrose* beschreibt die diffus-kollagenöse Volumenvermehrung des interstitiellen Kompartments ohne den Verlust funktioneller CM. Sie entsteht physiologisch im Alter, ist aber auch mit chronischen Druck- und Volumenbelastungen einer arteriellen Hypertonie, der degenerativen AS oder mit chronischen Ischämiebelastungen assoziiert. Bei therapeutischer Beseitigung der Stimuli gilt sie als reversibel.^{12, 13} (II) Die *Ersatzfibrose* bzw. *reparative Fibrose* entsteht aufgrund einer CM-Nekrose/ -Apoptose und beschreibt die Ausdehnung an EZM welche ehemals vorhandene CM ersetzt. Sie ist typische Folge eines akuten oder chronischen Perfusionsdefizits (akuter Myokardinfarkt, chronisch ischämische Herzkrankheit) und schließt immer einen unwiederbringlichen Kontraktilitätsverlust ein.^{12, 13} (III) Die *infiltrative, interstitielle Fibrose* umfasst seltener, hereditäre Fibroseerkrankungen wie zum Beispiel die Amyloidosen oder den Morbus Fabry.^{12, 13}

*Hinderer et al.*¹³ fassen zudem aktuelle Implikationen zur Diagnostik und Therapie einer multikausalen Myokardfibrose zusammen: Die Bildgebungstechnologie hat in den letzten Jahren bedeutende Schritte hinsichtlich der Fibrosediagnostik und -quantifizierung ermöglicht. Als Goldstandard gilt weiterhin eine bioptische Begutachtung seitens der Pathologie, ferner ist die Unterscheidung zwischen Reaktiver- und Ersatzfibrose auch durch eine zwar aufwändigere, aber nicht-invasive, Gadolinium-gestützte Kardio-Magnetresonanztomographie validiert worden.¹³ Schnell verfügbar und kontrastmittelfrei ist die ultraschallbasierte *Speckle-Tracking*-Software Echokardiografie, welche die quantitative Analyse über die Verfolgung fleckenartiger Muster während des Herzzyklus ermöglicht und Aussagen bezüglich Kontraktilitätsstörungen zulässt.^{13,14} Der indirekte Fibrosenachweis ist über Perfusionsdefizite mittels aufwändiger nuklearmedizinischer Emissionstomographien in der klinischen Praxis weniger verbreitet.¹³ Die

Etablierung verlässlicher Herzfibrose-Serummarker aus Patientenblut hat sich in Deutschland bisher nicht bewährt, wäre doch hinlänglich geringer Invasivität und Objektivierung von Therapieverläufen gewinnbringend. Während US-amerikanische Leitlinien des ACC (*American College of Cardiology*) und der AHA (*American Heart Association*) den Einsatz von Galektin-3 oder sST2 (löslicher ST2) als Myokardfibrose-spezifische Marker in der Herzinsuffizienzdiagnostik empfehlen¹⁵, spricht sich die ESC (*European Society of Cardiology*) bisher gegen ihren Einsatz im klinischen Standard aus¹⁶. Hauptsächlich aufgrund fehlender Organspezifität und uneindeutiger Hinweise bezüglich ihres Beitrages in der Myokardfibrogenese.^{17, 18}

Als konventionelle Basistherapie gegen die Zunahme einer bestehenden Herzfibrose im Rahmen einer Herzinsuffizienz gelten unter anderem klassische Antihypertensiva (ACE-Hemmer, AT1-Rezeptor-Antagonisten, β -Blocker) sowie Diuretika.^{13, 10, 19} Ein völlig neues Therapieziel wurde zuletzt durch den *Transformierender Wachstumsfaktor- β* (TGF β)-Signalweg blockierende Präparate vorgestellt: für sie sind Fibrose-reduzierende Effekte beschrieben, weisen jedoch noch starke Kardiotoxizitäten auf. Die Präparate Pirfenidon und Tranilast werden bereits im Off-label-Gebrauch in klinischen Studien geprüft, zeigen sich aber nicht unbedenklich gegenüber einer Lebertoxizität.¹⁹ Zudem offenbaren sich deutliche Fortschritte in der noch experimentellen Verwendung von biomaterialbasierten Gewebetechnologien in Form von Hydrogelen oder Herz-Patches zur Myokardregeneration.^{13, 19} Während Molekulartherapien direkte Akteure der Fibrose-Vermittlung beeinflussen und Teilerfolge in der antifibrotischen Beeinflussung der EZM-Komposition hatten¹³, zeigten Stammzell-basierte Therapien zur Regeneration von CM bisher wenig aussichtsreiche klinische Bilanzen¹⁹. Eine Strategie hinlänglich multimodaler Ansätze scheint in der zukünftigen Herzfibrose-Behandlung vielversprechend. Die Translation profunder fibromolekularer Erkenntnisse in die klinische Anwendbarkeit und Patient*innensicherheit bleibt Ziel aktueller Forschungsbestrebungen („vom Labortisch zum Krankenbett“).

1.2 Molekularer und zellulärer Mechanismus der Entstehung einer Herzfibrose

Die zellulären Komponenten des gesunden Myokards werden laut des kürzlich publizierten humanen kardialen Zellatlas von *Litviňuková et al.* auf 11 distinkte Hauptzellarten und jeweils weitere Subtypen beziffert. Das Ventrikelmyokard wird wesentlich zu rund 49% aus CM sowie nicht-kardiomyozytären Gefäßwandzellen (Perizyten, glatte Muskelzellen zu 21%) und zu 16% aus hCF gestellt. Kleinere Populationen stellen unter anderem Endothel- und Immunzellen.²⁰ Diese zelluläre Zusammensetzung verschiebt sich im pathologischen, fibrotischen Myokard drastisch, als dass die Akkumulation ehemals kleinerer Population von Immunzellen wie

Makrophagen und Mastzellen, und die Möglichkeit der Transdifferenzierung von Endothelzellen zu Myofibroblasten (*Endothelial-mesenchymale Transdifferenzierung*) die kardiale Struktur neu konstituieren.^{5, 21}

1.2.1 Fibroblasten als zelluläre Effektoren der Herzfibrose

Myokard-residente Fibroblasten sind die entscheidenden zellulären Effektoren des kardialen Remodelings und daher an der Herzfibrose-Entwicklung maßgeblich beteiligt.⁵ Kardiale Fibroblasten haben ihre konkrete Funktion in der Synthese und Degradation der dichten EZM und ihrer strukturgebenden Matrixproteine (wie Kollagenen, Proteoglykanen, Periostin, Vimentin, oder Fibronectin) und sind damit zur Homöostase der extrazellulären Myokardintegrität unentbehrlich.^{22,23} Auf diesem Wege bieten sie CM ein umgebendes Strukturgerüst und stellen eine funktionelle Gewebebasis zur Verteilung von dynamischen Pumpkräften und zur elektrophysiologischen Erregungsausbreitung.⁵ Im gesunden, adulten Herzen befinden sich hCF in einem ruhenden Zustand mit minimaler EZM-Syntheseaktivität.²⁴ Im Rahmen kardialer Umbauprozesse jedoch erfährt eine Teilmenge aktivierter hCF eine struktur- und funktionsveränderte Transition zum Myofibroblasten: Diesen Fibroblasten-Phänotypen widerfährt unter anderem durch eine TGF β -Induktion zunächst ein Proliferationsreiz, der sie zur vermehrten Synthese EZM-Proteine ganz im Sinne der profibrotischen Defektheilung befähigt. Kennzeichnend exprimieren Myofibroblasten glattmuskuläres Aktin (*alpha-smooth muscle Aktin*, α -SMA) – ein Protein, welches ihnen ähnlich zu glatten Muskelzellen eine Kontraktion ermöglicht.^{10, 24} Zudem exprimieren sie erhöhte Level von Periostin (POSTN) und Kollagen I, die zusammen mit α -SMA als myofibroblastäre Hauptmarker gelten.²⁴ Im Falle einer persistierenden und Defektareal-übergreifenden EZM-Proteinsynthese steuern aktivierte hCF damit maßgeblich zur Entwicklung einer maladaptiven Myokardfibrose bei.^{5, 25}

Eine Zellinteraktion ist zwischen CM und den ihnen umliegenden hCF beschrieben: So sind hCF und aktivierte Myofibroblasten generell in der Lage, die embryonale CM-Hyperplasie als auch die adulte Myozytenhypertrophie über die Initiierung des Fibronectin/ β 1-Integrin-Signalwegs zu stimulieren.^{26, 27} Spezialisierte, POSTN-exprimierende hCF-Subtypen sind essenziell zur postnatalen CM-Ausreifung.²⁸ Doch auch das parakrin wirkende TGF- β , ein POSTN-Signalmolekül, verstärkt die Interaktion zwischen hCF und CM während des kardialen Umbaus. Seine Freisetzung durch hCF vermittelt sowohl Hypertrophie-steigernde als auch apoptotische Signale in sodann dysfunktionalen CM.^{5, 27} Beide Ereignisse entwickeln sich in Abfolge in der Entstehung der pathophysiologischen Myokardhypertrophie.²⁹ Wird TGF- β umgekehrt durch CM exprimiert, verstärkt sich die Proliferation von hCF.²⁷

1.2.2 Pathomolekulare Veränderungen der Extrazellulärmatrix im fibrotischen Herz

Im gesunden Myokard besteht eine Balance zwischen Synthese und Abbau an kollagen-basierter EZM, die als zelluläres Strukturgerüst eine mechanisch uneingeschränkte Herzaktion gewährleistet.³⁰ Die großkalibrigen Kollagen I-Fibrillen stellen mit 80% den Hauptkollagentyp und verleihen dem physiologischen Myokard Stabilität durch eine hohe Zugfestigkeit. Das nur zu 10% vertretene Kollagen III ist charakterisiert durch einen dünneren Durchmesser und vermittelt vielmehr elastische Eigenschaften.^{10, 31} So beeinflussen beide Kollagene die biomechanischen Gewebeeigenschaften während der Kontraktions- (Systole) und Entspannungsphase (Diastole) des Herzzyklus. Kollagenmoleküle werden als inaktive Propeptide durch Fibroblasten sezerniert und räumlich ausgerichtet – durch komplexe Aneinanderordnung mehrerer helikaler Kollagenmoleküle entstehen organisierte Kollagenfibrillen, welche schließlich quervernetzt und damit in ihrer Formation fixiert werden.³² Die Degradierung kollagenöser Matrixkomponenten erfolgt durch ebenfalls Fibroblasten-sezernierte³³ Matrix-Metalloproteinasen (MMP), die durch ihre Enzymaktivitäten Kollagenfibrillen abbauen. Ihre endopeptidatische Aktivität wird wiederum durch gewebehemmende Proteinasen, die *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases* (TIMPs) gegenreguliert.³⁴ Auch das Gleichgewicht in der Aktivität zwischen Proteasen und ihren Inhibitoren ist von weitreichender Bedeutung für den Erhalt einer ausgeglichenen Matrixkomposition.³⁰

Der profibrotische Bindegewebeumbau im Rahmen des langfristigen kardialen Umbaus ist durch die Akkumulation fibrillärer Kollagene gekennzeichnet.²¹ Wie in *Kapitel 1.2.1* erwähnt, kommt es durch die Fibroblasten-Aktivierung zu einer exzessiven EZM-Synthese, zum Ungleichgewicht pro- und antikollagener Prozesse und daher zu einer veränderten Myokardarchitektur. So erklären sich auch Pump- und Relaxationsstörungen, die im Falle einer kollagenergen Überrepräsentation aus einer Gewebeversteifung resultieren.^{21, 30} Lokal überschüssige Kollagenablagerungen prädisponieren durch Abstandsvergrößerungen zwischen einzelnen CM zu Reizweiterleitungsstörungen²⁹, einer verminderten Kapillardichte und beeinträchtigen über erhöhte Diffusionsabstände zudem die Sauerstoffversorgung der CM.³³

Insbesondere für die frühe Phase der oft extensiven Ersatzfibrose ist die Sequenz des kardialen Gewebeumbaus eindrücklich beschrieben: Die bisherige EZM und der Verlust an CM werden durch eine *provisorische Matrix* ersetzt, die durch vaskuläre Einschwemmung der Plasmaproteine Fibrin und Fibronectin gekennzeichnet ist. Sie entspricht einer vorläufigen Strukturbeschaffenheit und initiiert über die Integrin-vermittelte Fibroblasten-Aktivierung den Weg zur anschließenden (kollagenbasierten) Defektregeneration.²¹ Letztlich wird der profibrotische Myokardumbau mittels Eingliederung matrizellulärer Makromoleküle vollzogen; Zu den prominentesten fibroseregulierenden Mediatoren zählen unter anderem Thrombospondine, Tenascin-C, POSTN und SPARC (*Secreted protein, acidic and rich in cysteine*). Sie vermitteln in der defekten EZM

hauptsächlich Zytokin-, Chemokin- und Wachstumsfaktorsignale zwischen Effektorzellen (wie hCF) und Matrixproteinen.²¹

1.2.3 Periostin – bedeutendes Markerprotein der Myokardfibrogenese und -fibrose

POSTN ist ein Protein-codierendes Gen, welches seine wesentliche Funktion als sezerniertes, extrazelluläres Matrixprotein mit einer Molekülgröße von ~90kDa ausübt und ubiquitär im kollagenreichen, kardialen Gewebe vorliegt. Dort wird es exklusiv durch hCF und Myofibroblasten exprimiert.^{23, 35, 36} Eine gesteigerte Aufmerksamkeit erlangte *POSTN* im letzten Jahrzehnt maßgeblich im Bereich der kardiovaskulären Erforschung zu seiner Beteiligung in Gewebeheilung und fibroproliferativen Erkrankungsbildern (Myokardhypertrophie, Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt).

POSTN zeigt sein variantes Expressionsverhalten in sich entwickelndem und adultem Herzgewebe. Im Mausmodell konnten während der embryonalen und fötalen Entwicklung vor allem in mesenchymalem Gewebe die höchsten Expressionsraten an intra- und extrazellulären *POSTN* nachgewiesen werden.³⁷⁻³⁹ Jenes Mesenchym gilt als Vorläufergewebe für reife, fibröskollagene Strukturen wie Herzklappen und für ventrikuläre Fibroblasten.^{40, 41} In Expressionsanalysen der unmittelbar folgenden neonatalen Phase präsentieren die Autor*innen anhaltend hohe *POSTN*-Muster im noch nicht ausentwickelten, interstitiellen Myokard.^{39, 42} In der Postneonatalphase sinkt die Expressionsrate in spezialisierten *POSTN*-exprimierenden Fibroblasten, welche die Kardiomyozytenreifung sicherstellen, dann drastisch und verbleibt fortan im physiologischen, adulten Herzgewebe lediglich gering exprimiert.^{28, 43} Abermals hohe *POSTN* Protein-Level finden sich als pathophysiologische Antwort auf einen eintretenden myokardschädigenden Stimulus und in Arealen zellulärer Reorganisation hin^{23, 42} – einschlägige Befunde bestätigen sich in Humanstudien.^{44, 45} Analog zu der Fibrose-Entstehung findet sich ein gleichsam erhöhtes Niveau an lokal exprimiertem *POSTN*⁴⁴, das durch Aktivierung von TGF β - und BMP- (*Bone morphogenic protein*) Signalwegen⁴⁶ als nachgeschaltetes Transduktionsprodukt in Myofibroblasten exprimiert und anschließend in das Interstitium sezerniert wird.^{47, 48}

POSTN ist grundlegend in der Vermittlung von Zell-Matrix-Interaktionen: Als extrazelluläres Matrixprotein interagiert es direkt mit Strukturmolekülen der kardialen Interzellulärmatrix wie Kollagen I und V, Fibronectin oder Tenascin-C. *POSTN* initiiert über den $\alpha\beta 3/5$ -Integrin-Signalweg in Myofibroblasten die Kollagen I-Produktion und damit die Fibrillogenese.^{23, 49} Dazu agiert *POSTN* auch intrazellulär, indem es Tenascin-C stimuliert und in Anwesenheit von Fibronectin die Bildung eines Strukturgeflechts anregt und so den Weg für eine effektive Kollagenvernetzung ebnet. Im Enzymkomplex mit *POSTN*/ BMP/ LOX (*Lysyl Oxidase*) wird

ebendiese intermolekulare Kollagenquervernetzung weiter katalysiert und stabilisiert.^{49, 50} Überblickend wird die Verstärkerfunktion von POSTN in der Geweberegeneration deutlich.⁵¹

Insbesondere durch Experimente an Gen-Knockout Mäusen wurden die wesentlichen Genfunktionen von POSTN zum einen in der Vermittlung der frühen Herzentwicklung und zum anderen in der Regulation des kardialen Umbaus überhaupt verständlich. Der Beitrag von POSTN in der Herzentwicklung wird zunächst in Gewebeproben von Kindern mit konnatalen Herzdefekt in Form einer bikuspiden Aortenklappe deutlich: Diese weisen fehlendes POSTN in Bereichen desorganisierter EZM-Komposition und reduziertem Elastinfaseranteil vor.⁵² Im Hinblick auf das Tiermodell wiederum wird die POSTN-Funktion spezifischer dargelegt. So exprimieren transgenetisch veränderte Mäuse mit *POSTN* Null-Allelen (folgend *POSTN*^(-/-)) valvuläre Defekte samt ektop eingewachsener CM und desorganisierter Matrixstruktur.^{39, 52} Auch zeigen *POSTN*^(-/-) Mäuse im induzierten Myokardinfarkt- und Drucküberlastungsmodell höhere, letale Raten von Ventrikelrupturen und aberranter Narbenbildung gegenüber Wildtypen. Überraschenderweise schienen überlebende *POSTN*^(-/-) Tiere von einer verbesserten Ventrikelfunktion (verminderten Fibrose-Raten, abgeschwächter Hypertrophie) hinsichtlich ihres Gesamtüberlebens zu profitieren.^{42, 53, 54} Eine profunde Erklärung für diese Beobachtung existiert nicht, jedoch spekulierten die Autor*innen, dass das Fehlen von POSTN langfristig als protektiver Faktor gewertet werden könnte. Insgesamt zeigt sich in Abwesenheit von POSTN die Kollagenquervernetzung profund gestört.^{48, 55} Die Ablation POSTN-sezernierender Myofibroblasten reduziert die Kollagenproduktion und adaptive Narbenausbildung drastisch.⁵⁶

Ferner wurde der Beitrag von POSTN in der Homöostase der EZM-Komposition durch Untersuchungen mit Überexpressionsmodellen unterstützt: In transgenen Nagern resultiert die POSTN-Induktion in einer kardialen Dysfunktion, einhergehend mit einer ausgeprägten Herzfibrose.^{53, 57} Überdies korreliert ein hohes POSTN-Expressionsniveau mit dem Phänotyp einer aktivierten kardialen Fibrose^{44, 54} und seine Re-Exprimierung gilt als gegenwärtiger, molekularer Indikator für aktivierte Myofibroblasten, von denen die Fibrose maßgeblich ausgeht.^{5, 56}

Zudem fördert POSTN die Durotaxis, ergo die Migration von Myofibroblasten in Areale strafferen Bindegewebes im Rahmen der Wundheilung, als auch die Aktivierung und Differenzierung von hCF.^{48, 58}

So sind die Übergänge von Fibrillogenese und pathophysiologischer Fibrose in Bezug auf POSTN fließend: Seine Rolle im Rahmen der frühen Myokardregeneration ist essenziell und kann eine Myokardruptur abwenden – fibrosevermittelnd kann eine prolongierte POSTN-Expression zu einer unausgewogenen Gewebesteifigkeit und konsekutiven Kardiomyopathie beitragen.⁴⁶

1.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede in kardialen Umbauprozessen

Der makro- und mikroskopische Aufbau des Herzens unterscheidet sich zwischen Frauen und Männern. Frauenherzen sind generell kleiner⁵⁹ und weisen auch unter Berücksichtigung der Körpergröße kleinere LV-Diameter bei höherer Auswurfraction als Männerherzen⁶⁰ auf. Auch die zelluläre Myokardzusammensetzung variiert schon im Physiologischen geschlechtsspezifisch, als dass weibliche Ventrikel im Mittel mehr CM (56%) und negativ korrelierend weniger hCF aufweisen als entsprechendes Ventrikelmyokard von Männern (47% CM).²⁰

Strukturelle Unterschiede in der Myokardbeschaffenheit spiegeln sich auch in der geschlechtsspezifischen, klinischen Ausprägung der kardialen Funktion und Morphologie wider. So offenbaren sich Unterschiede in der Fibrose des Herzens zwischen den Geschlechtern. Eine eher interstitielle, reaktive Fibrose geringeren Ausmaßes bei erhaltener CM-Zahl dominiert in den Herzen von Frauen im Vergleich zu Männern. Diese Beobachtung in weiblichen Herzen geht mit einer konzentrischen Hypertrophie bei besserer kontraktile Funktion und höheren Schlagvolumina einher. Männerherzen hingegen weisen höhere Dimensionen einer Ersatzfibrose bei eingeschränkter systolischer Pumpfunktion gegenüber gleichaltrigen Frauen auf.⁶¹⁻⁶⁵

1.3.1 Der Einfluss geschlechtsspezifischer Ausprägungen der Myokardhypertrophie auf die Herzmorphologie und -funktion

Für die bedeutendsten kardiovaskulären Erkrankungen (koronare Herzkrankheit, Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz oder hypertensive Herzkrankheit) sind mittels klinischer Untersuchungen und Tierexperimente geschlechtsdifferente Ausprägungen des kardialen Umbaus eruiert worden.

Verschiedene klinische Studien zeigten bei Männern mit einer chronischen Drucküberlastung des Herzens, wie im Rahmen einer degenerativen Aortenklappenstenose (AS), hypertrophen Kardiomyopathie⁶⁶ oder koronaren Herzerkrankung⁶⁷, eine höhergradige Fibrose sowie eine signifikant gesteigerte Kollagenablagerung im Herzen im Vergleich zu ebenfalls erkrankten Frauen.⁶⁸ Zudem konnte beobachtet werden, dass eine Druckbelastung im Falle einer AS^{69, 70} oder arteriellen Hypertonie⁷¹ in Frauenherzen typischerweise eine konzentrische Myokardhypertrophie⁷² hervorruft. Diese zeichnet sich durch einen dickeren Herzwanddiameter und kleinere Ventrikel mit geringerer Dilatation bei erhaltener systolischer Pumpfunktion aus. Im Kontrast dazu präsentieren Männerherzen häufiger eine exzentrische, gar maladaptive Form der Hypertrophie⁷²: Sie ist charakterisiert durch dünnwandigere, dilatierte Ventrikelwände mit eingeschränkter systolischer Pumpfunktion.

Durch Untersuchungen am Tiermodell mit Nagern lassen sich die klinisch objektivierbaren Befunde und die damit verbundenen Unterschiede in der geschlechtsspezifischen Adaptation und Ausbildung einer Myokardfibrose zwischen Männern und Frauen nachvollziehen. Ein hypertropher Myokardumbau kann mittels Druck-^{73, 74} als auch durch Volumenüberlastung⁷⁵ sowie einem induzierten Myokardinfarkt⁷⁶ im Tierversuch hervorgerufen werden. Die morphologischen und funktionellen Eigenschaften in Nagerherzen zeigen kongruent zu humanen Untersuchungen geschlechtsspezifische Ausprägungen. Herzen weiblicher Tiere zeigen eine konzentrische, adaptive Myokardhypertrophie mit erhaltener systolischer Pumpfunktion⁷⁴, während männliche Tiere eine exzentrische, maladaptive Herzhypertrophie mit schnellerer Progression einer Herzinsuffizienz exprimieren⁷³⁻⁷⁷. Darüber hinaus evozieren alle Methoden in vergleichbarer Weise eine deutlich stärkere Kollagenablagerung und verstärkte Expressierung von Fibrosegenen in den Herzen männlicher Tiere gegenüber Weibchen. Dabei scheinen weibliche Tiere kardioprotektive Reserven zu besitzen, welche die linksventrikuläre Pumpfunktion und Struktur erhalten.^{73, 74, 76}

Somit offenbart sich in der pathophysiologischen Myokardhypertrophie ein speziesübergreifender Geschlechtsdimorphismus: Das weibliche Geschlecht präsentiert hinsichtlich der klinischen Herzfunktion eine vorteilhaftere, nämlich konzentrische Hypertrophieform gegenüber männlichen Herzen, welche eine exzentrische, in der Pumpfunktion eingeschränkte Myokardhypertrophie aufweisen. Als Antwort auf Hypertrophiereize exprimieren Männerherzen zudem deutlich ausgeprägtere fibrotische Gewebeeigenschaften, während eine geringer ausgebildete Fibrose in weibliche Herzen mit einer erhaltenen Pumpfunktion einhergeht.

1.3.2 Unterschiede in der geschlechtsspezifischen Ausprägung einer Myokardfibrose und Periostin-Expression

Die geschlechtsdimorphe Ausprägung der Myokardfibrose scheint auch in Abhängigkeit von der geschlechtsspezifischen Expression Fibrose-assoziiierter Marker zu stehen.^{68, 69, 73, 78} In Patient*innen mit degenerativer AS konnte gezeigt werden, dass das POSTN-Protein in entnommenen linksventrikulären Biopsien deutlich erhöht gegenüber herzgesunden Kontrollen war. Zudem wiesen die Biopsieproben erkrankter Männerherzen signifikant höhere Grade an POSTN-Protein im Vergleich zu Proben ebenfalls erkrankter Frauen auf.⁷⁸ Diese Befunde korrelieren mit einem erhöhten histologischen Fibrosegehalt druckbelasteter Herzen von Männern.⁷⁸ Im Einklang dazu stehen Ergebnisse aus Analysen, die innerhalb derselben Kohorte durchgeführt worden sind: Hierbei wurde im Rahmen Chip-basierter Genexpressionsanalysen *POSTN* als das am stärksten exprimierte Gen in Gewebeproben erkrankter Männern identifiziert.⁶⁸ In unveröffentlichten Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gelang es zudem die erhöhte

Expression von POSTN in Gegenwart einer Myokardfibrose in einer unabhängigen Kohorte von AS-Patient*innen zu bestätigen: Die *POSTN*-mRNA (messenger RNA) zeigte sich in Herzgewebeprobe von Männern geschlechtsspezifisch heraufreguliert (mündliche Kommunikation PD Dr. rer. medic. Elke Dworatzek, Charité Universitätsmedizin).

Diese Daten zeigen, dass POSTN zu einem geringeren Maß in fibrotischen Herzen von Frauen exprimiert wird – dabei ist es unklar, ob dies einer natürlichen biologischen Variation⁷⁹ oder abweichenden Erkrankungsausprägung zuzuordnen ist. Somit bleibt offen, welchen Einfluss das Geschlecht auf die Expression von POSTN in Herzen gesunder Proband*innen und ferner hCF hat.

1.4 17 β -Östradiol vermittelt geschlechtsspezifische Unterschiede in kardialen Umbauprozessen über Östrogenrezeptor-Signalwege

Es existieren diverse Erklärungsansätze für die beobachteten geschlechtsdimorphen kardialen Umbauprozesse.⁷⁹ Ein ursächlicher Erklärungsansatz befasst sich dabei mit der regulatorischen Funktion des Sexualhormons 17 β -Östradiol (E2).

Epidemiologische Analysen lassen erkennen, dass Frauen in der Prämenopause einen besseren Schutz gegenüber einer myokardialen Hypertrophie und einen günstigeren, adaptiven Gewebeumbau nach einem Infarktgeschehen aufweisen als altersgleiche Männer.^{80, 81} Mit (insbesondere dem frühen) Einsetzen der Menopause und dem Umstand des östrogenen Hormonverlustes schwinden jene vorteilhaften Eigenschaften, scheinen jedoch durch eine frühe Initiation einer Hormonersatztherapie teilweise umkehrbar.^{81, 82} So gilt es aktuell als akzeptiert, dass E2 insbesondere Frauen vor der Menopause vor Herz-Kreislauf-Erkrankungen schützt.⁸³ *Wu et al.* subsumieren die antihypertrophen Eigenschaften von E2 vor allem im Sinne Fibrose-supprimierender und kontraktilitäts-verbessernder Effekte.⁸¹ Doch auch für das männliche Geschlecht spielt E2 eine modulierende Rolle, die sich hinsichtlich einer erhöhten Mortalität bei Herzinsuffizienz-Erkrankten mit auffällig niedrigen oder anormal hohen E2-Serumspiegeln offenbart.⁸⁴

Präklinische Untersuchungen an ovariectomierten (OVX)- und damit hormonabladierten Nagern erläuterten die im Menschen beobachtete kardioprotektive Rolle von E2 weiter: Eine OVX-bedingte E2-Defizienz allein bewirkte eine Ablagerung zugunsten des Kollagen I-Proteins, während es zu einer Abnahme von Kollagen III kam. Eine E2-Substitution in diesen OVX-Ratten vermochte diesen Effekt im Sinne einer Umkehr des kardialen Umbaus wieder abzuschwächen.⁸⁵ Die zusätzliche Induktion einer chronischen Volumenüberladung in OVX-Tieren rief eine deutliche Verschlechterung der linksventrikulären Pumpfunktion und einen ausgeprägten kardialen Umbau gegenüber nicht-OVX Kontrolltieren hervor. Diese Ausprägungen der OVX-Weibchen waren

vergleichbar mit dem symptomatischen Herzversagen männlicher Ratten.⁸⁶ Wurde der Versuch eines induzierten Myokardinfarkts um die anschließende Gabe von Niedrigdosis-E2 ergänzt, konnten erneut eine signifikant verbesserte Herzfunktion bei verminderter Fibrose in den OVX-Mäusen beobachtet werden.^{87, 88} Die Applikation von E2 führte auch in männlichen Ratten in volumeninduzierten Myokardhypertrophie- oder Infarktmodellen zu einem abgeschwächten pathologischen Umbau bei Erhalt der ventrikulären Funktion sowie protrahierten Ausbildung einer Herzinsuffizienz.^{89, 90} Somit konnten die zuträglichen Charakteristika von E2 auch im pathophysiologischen Modell mit Nagern für beide Geschlechter repliziert werden.

1.4.1 Die 17 β -Östradiol-vermittelte Abschwächung der Myokardfibrose als Östrogenrezeptor-abhängiger Mechanismus

Untermauert durch experimentelle Studien in Nagern besteht die Annahme, dass beschriebene vorteilhaftere Effekte vor allen in weiblichen Herzen durch E2 und E2-Rezeptor-induzierte Signalwege vermittelt werden. Die Expressierung der beiden Östrogen-Rezeptoren (ER), Östrogen-Rezeptor alpha (ER α) und Östrogen-Rezeptor beta (ER β), sind in CM und hCF nachgewiesen,^{91, 92} sodass über sie vermittelte, direkte E2-Effekte auslösbar sind. So konnte beispielsweise über die E2-induzierte Aktivierung des ER α im gesunden Herzen weiblicher Mäuse eine Herzvolumenzunahme beobachtet werden.⁹³

Abhängig von einem pathophysiologischen Stimulus scheinen ER α und ER β zudem abweichend exprimiert: Im Vergleich zu Gesunden waren beide ER im Herzgewebe von Aortenstenose- und Herzinsuffizienz- Patient*innen erhöht.^{91, 92}

Die spezifischeren Fibrose- und Hypertrophie-modulierenden Funktionen der ER wurden in sogenannten Gen-Knockout-Modellen über das Abschalten von ER-Allelen und deren Genfunktionen an Nagern untersucht oder auch unter Zuhilfenahme spezifischer ER-Agonisten objektiviert: Insbesondere der ER β scheint in pathophysiologischen Prozessen entscheidend an der E2-vermittelten Hypertrophie-modulation beteiligt⁹⁴, als dass Befunde in Mäusen mit deletierten ER β -Allelen eine stärkere Hypertrophie und einen fehlangepassten Umbau gegenüber Wildtypen aufweisen.^{95, 96} Die Gegenwart von ER β reprimiert Apoptose- und pro-inflammatorische Gene sodass die Autor*innen dem ER β eine vorteilhafte Rolle in der abgeschwächten Entwicklung einer Fibrose und Herzinsuffizienz zuschrieben.^{95, 97}

Diese Befunde zeigen sich laut *Fliegner et al.* jedoch nicht uneingeschränkt auf beide Geschlechter übertragbar: Ein ER β -Knockout schien männliche Mauserherzen, die einer Drucküberlastung ausgesetzt waren, vor überschießenden Fibroseausmaßen gegenüber männlichen Wildtypen sogar zu schützen.⁷³ Bei weiblichen Tieren bewirkte die Deletion von ER β unter medikamentös oder mechanisch induzierter Druckbelastung hingegen eine stärkere

Myokardfibrose als in weiblichen Wildtypen und männlichen Tieren.^{73, 96, 98} ER β vermittelt seine Effekte also ausgesprochen geschlechtsspezifisch, indem es die Fibroseentwicklung in weiblichen Herzen zu begrenzen, und im männlichen Geschlecht sogar zu verstärken scheint.⁷³

Es existieren auch präklinische Hinweise für die kardioprotektive Funktion von ER α in beiden Geschlechtern: Mittels induzierter Myokardinfarkt-Reperfusionen-Modelle zeigten Mäuse mit ER α -Knockout eine schlechtere Herzfunktion gegenüber Wildtypen, dabei wiesen insbesondere männliche Knockout-Tiere stärkere Myokardschäden auf.⁹⁹ Ferner sind auch für den ER α Fibrose-reduzierende Eigenschaften beschrieben: Die Applikation spezifischer ER α -Agonisten bewirkte nach einer druckinduzierten Myokardhypertrophie in OVX-Nagern eine Fibroseabschwächung gegenüber nicht behandelten Kontroll-Weibchen.¹⁰⁰

In der Zusammenschau sind sowohl der ER α als auch der ER β essenziell in der E2-vermittelten Transduktion fibrosemulierender Pathomechanismen in beiden Geschlechtern. Der separate, kardioprotektive Beitrag des jeweiligen ER scheint dabei eher abhängig vom betrachteten Modell und ist zudem geschlechtsdimorph. ER-Signaltransduktionsmechanismen sind komplex und hinlänglich physiologischer Anpassungsmechanismen des Herzens nicht endgültig verstanden.

1.4.2 Einfluss von 17 β -Östradiol und Östrogenrezeptoren auf die Regulation Fibrose-assoziiertes Gene in kardialen Fibroblasten

Die durch E2 und ER vermittelten Fibrose-modulierenden Eigenschaften scheinen im Herzen zellspezifisch: So konnte in kultivierten, kardialen Rattenfibroblasten (rCF) die Menge Fibrose-assoziiertes Proteine, wie TGF β -1 sowie Kollagen I und III, durch die Behandlung mit E2 oder einem ER β -Agonisten abgeschwächt werden.^{98, 101} Gleichermaßen ist eine über den ER α vermittelte, E2-abhängige Reprimierung der kollagendegradierenden MMP-2 in rCF impliziert worden.¹⁰² Die von Fibroblasten ausgehende Kollagensynthese selbst scheint jedoch geschlechtsspezifisch durch E2 reguliert: Dabei inhibierte E2 die Kollagen I- und III-Expression in CF von Frauen und weiblichen Nagern, während ebenjene Kollagen-mRNA in männlichen Zellen induziert wurden.^{69, 103} Die Kollagen-Reprimierung wurde durch ER α vermittelt, während ER β als induzierender Faktor der Kollagenexpression fungierte.¹⁰³

Resümierend zeigt sich die E2-vermittelte Regulation Fibrose-assoziiertes Genprodukte in CF als ein ER-abhängiger Mechanismus.

1.4.3 17 β -Östradiol abhängige Regulation von Periostin

Der Einfluss von E2 und seiner ER auf die geschlechtsspezifische Expressierung fibroseassoziiierter Gene konnte in kardialen Fibroblasten bereits objektiviert werden – hingegen existieren gegenwärtig keinerlei Beschreibungen für eine entsprechende Regulation von POSTN.

Lediglich in humanen parodontalen Ligamentzellen, den fibroblastenartigen Bindegewebszellen des Zahnhalteapparates, konnte eine *in-vitro* Behandlung mit E2 deutlich erhöhte Level an POSTN mRNA induzieren. Die Autor*innen präsentierten Hinweise, dass dieser Effekt zudem durch ER β vermittelt wird.¹⁰⁴ Vergleichbare Ergebnisse präsentieren neuere Untersuchungen in stromalen Knochenmarkszellen (mit bindegewebigen Anteilen) von OVX-Ratten, die ebenfalls eine POSTN-Induktion infolge einer E2-Behandlung erzielten.¹⁰⁵

Gegenwärtig fehlen Untersuchungen an insbesondere physiologischen hCF, welche die geschlechtsspezifische und putativ ER-spezifische Beeinflussung des Fibrose-vermittelnden POSTN genauer analysieren. Jene Untersuchungen könnten entscheidende Grundlagen für molekularbasierte, pharmakologische Therapieansätze in der geschlechtssensiblen Behandlung von fibrosebasierenden Herzerkrankungen wie der Herzinsuffizienz bilden.

1.5 Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit

Die Entwicklung einer kardialen Fibrose gilt als heterogener Mechanismus: Der adaptiven Gewebereparatur zur Aufrechterhaltung der Pumpfunktion des Herzens steht die Fehlanpassung als überschießende Fibrose, die in einer unumkehrbaren Gewebeversteifung und Herzinsuffizienz münden kann, gegenüber.⁹ Diese Umbauprozesse erweisen sich als geschlechtsspezifisch, wobei Männer ein signifikant höheres Niveau an Myokardfibrose und der Expression von Fibrose-assoziierten Genen wie Kollagenen, TGF- β oder POSTN gegenüber Frauen aufweisen.^{70, 78} Speziell POSTN erlangte zuletzt umfangreiche Beachtung in der Vermittlung fibroproliferativer Erkrankungen. Mausmodelle demonstrierten die Heraufregulierung von POSTN bei bestehender Herzerkrankung, während ein *POSTN*^(-/-) Knockout den Umbau des Herzgewebes begrenzte.^{42, 48, 54} Dabei vermochte E2 Fibrose-assoziierte Gene in hCF geschlechtsabhängig zu regulieren.^{102, 103} Eine Überexpression von ER β vermittelte in männlichen Mäusen abgeschwächte Fibrosegrade sowie eine verminderte Expression von POSTN.⁷⁷

Trotz der klinisch observierten und histologisch erkennbaren Unterschiede in der geschlechtsspezifischen Ausprägung einer kardialen Fibrose sind die zellulären und molekularen Mechanismen von POSTN in Abhängigkeit von E2 nicht abschließend verstanden und nur teilweise im Tiermodell untersucht. Die Basis für eine patientenzentrierte Therapie und

Präzisionsmedizin fußt auf fundierten Erkenntnissen in der Grundlagenforschung, um eine praxisrelevante, klinische Anwendung zu ermöglichen. Daher war es das Hauptziel dieser Arbeit in einem *in-vitro* Zellkulturmodell mit hCF den Einfluss von E2 auf die Transkriptions- und Proteinregulation des Fibrose-Markers *POSTN* zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde ein vergleichendes Behandlungsprotokoll zu verschiedenen Zeitpunkten entwickelt, welches den Anspruch hatte sich an organischen Gegebenheiten zu orientieren, indem kultivierte hCF mit einer *in-vivo* getreuen Konzentration an E2 behandelt wurden. Residente hCF existieren mit CM im einem funktionellen Gewebeverband und exprimieren parakrine Faktoren wie *POSTN* und dessen Signalmoleküle, die Einflüsse auf die Ausreifung und Hypertrophie von CM vermitteln.^{5, 27, 28} Daher sollte in einem weiteren Schritt der potenzielle Einfluss von Fibroblasten-sezerniertem *POSTN* auf die Aktivierung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen-abgeleiteten Kardiomyozyten (hiPSC-CM) prospektiv analysiert werden. Hierfür wurden die Hypertrophie-assoziierten Marker *NPPA*, *NPPB* (*Natriuretic peptide A/B*) sowie *MYH6* und *MYH7* (*Myosin heavy chain 6/7*) auf ihre Expressierung in hiPSC-CM hin untersucht.

Mit diesem Zellkulturmodell sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welchen Einfluss hat E2 auf die Regulation von *POSTN* auf transkriptioneller Ebene und auf die intra- und extrazelluläre Proteinexpression in hCF?
2. Wird ein E2-vermittelter Effekt auf *POSTN* über den ER α oder ER β bewirkt?
3. Erfolgt die putative Regulation von *POSTN* durch E2 geschlechtsspezifisch?
4. Beeinflusst das von hCF sezernierte *POSTN*-Protein die Aktivierung von hiPSC-CM insbesondere im Hinblick auf die Hypertrophiemarker *MYH6*, *MYH7* und *NPPA*, *NPPB*?

2 Material und Methoden

2.1 Material

Nachfolgend ist eine Auflistung der für den experimentellen Aufbau und die Versuchsdurchführung notwendigen Laborgeräte, Agenzien und Zellkulturmaterialien sowie benötigter Software aufgeführt.

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Liste verwendeter Laborgeräte

Geräte	Bezeichnung	hergestellt durch
Absaugsystem	<i>Vacusafe</i>	Integra Biosciences (Zizers, CH)
Bioanalyzer	<i>Agilent 2100 Bioanalyzer</i>	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Blottingsystem	<i>Trans-Blot</i>	Bio-Rad (München, DE)
Bodenzentrifuge	<i>Heraeus Sepatech</i>	Heraeus (Hanau, DE)
Chemilumineszenz Bildentwickler	<i>ChemiDoc XRS</i>	Bio-Rad (München, DE)
CO ₂ -Inkubator	<i>Heracell 150</i>	Heraeus (Hanau, DE)
ELISA-Spektrophotometer	<i>Benchmark Plus</i>	Bio-Rad (München, DE)
Elektrophoresekammer	<i>TV 200 Standard</i>	AlphaMetrix Biotech (Rödermark, DE)
Kompaktkamera	<i>DMC-LX7</i>	Panasonic (Kadoma, JPN)
Magnetrührer	<i>SB 302</i>	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Mikrozentrifuge	<i>5427R</i>	Eppendorf (Hamburg, DE)
Multipipette	<i>Multipipette E3</i>	Eppendorf (Hamburg, DE)
Gradientencycler	<i>Mastercycler gradient</i>	Eppendorf (Hamburg, DE)
PCR-System	<i>StepOnePlus</i>	Applied Biosystems (Waltham, USA)
	<i>Fast 7500</i>	Applied Biosystems (Waltham, USA)
Pipettierhilfe	<i>accu-jet pro</i>	BrandTech Scientific (Essex, USA)
Thermoblock	<i>Thermomixer comfort 5384</i>	Eppendorf (Hamburg, DE)
Thermocycler	<i>7500 Fast RT-PCR System</i>	Applied Biosystems (Waltham, USA)
Schüttler	<i>Duomax 1030</i>	Heidolph (Schwabach, DE)
	<i>WT16</i>	Biometra (Göttingen, DE)
Spektrophotometer	<i>NanoDrop 1000</i>	PeqLab (Erlangen, DE)
	<i>xMark Microplate Absorbance</i>	Bio-Rad (München, DE)
Sterile Werkbank	<i>Holten Lamin Air</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Geräte	Bezeichnung	hergestellt durch
Stromversorgung	<i>Power Pac 300</i>	Bio-Rad (München, DE)
Tischzentrifuge	<i>Mikro 22 R</i>	Hettich (Hanau, DE)
Vortexmischer	<i>Genie 2</i>	Scientific industries (Bohemia, USA)
Wasserbad	<i>WNB 14</i>	Memmert GmbH (Schwabach, DE)
Waage	<i>BL 1500S</i>	Sartorius AG (Göttingen, DE)
Zellkulturmikroskop	<i>Axiovert 25</i>	Carl Zeiss (Oberkochen, DE)
Zentrifuge	<i>Megafuge 1.0 R</i> <i>Varifuge 3.0</i>	Heraeus (Hanau, DE)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	hergestellt durch
6-Loch Zellkulturplatten Standard F	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
96-Loch Mikrotiterplatten UV-transparent	Corning (Corning, USA)
96-Loch PCR Platten <i>MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate</i>	Applied Biosystems (Waltham, USA)
Adhäsivfolie qPCR <i>MicroAmp Optical Adhesive film</i>	Applied Biosystems (Waltham, USA)
Kryo-Röhrchen <i>CryoPure 2,0ml</i>	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
<i>Mr.Frosty</i> Freezing Container	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Nitrocellulose-Membran <i>Amersham Protran</i>	GE Healthcare Life Sciences (Chicago, USA)
PCR 8er-Streifen 0,2ml flacher Deckel	neoLab (Heidelberg, DE)
Pipetten <i>Research Plus; Biomaster 4830</i>	Eppendorf (Hamburg, DE)
Pipettenspitzen <i>Combitips advanced</i> 0,5ml; 0,2ml; 0,1ml <i>ep T.I.P.S. Standard</i> 0,5-20µl, 2-200µl, 50-1000µl <i>ep Dualfilter T.I.P.S.</i> 0,1-10µl, 0,5-20µl, 2-100µl Gel-Pipettenspitzen 1-200µl	Eppendorf (Hamburg, DE)
Reaktionsgefäße 1,5ml; 2ml	Eppendorf (Hamburg, DE)
Serologische Pipetten 2-50ml	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Sterilfilter mit Filtratflasche: <i>Filtrationsgerät Bottle-Top-Filter Steritop und Stericup MILLIPORE Express Plus</i> ; 0,22µm Porengröße	Merck Millipore (Billerica, USA)
Zellkulturflasche T25; T75 Standard	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Zellschaber Größe S	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Zentrifugenröhrchen 15ml; 50ml	Sarstedt (Nümbrecht, DE)

2.1.3 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, erfolgte der Bezug aller verwendeten Chemikalien von den Firmen Invitrogen (USA), Merck (Darmstadt, D) Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen, D), Carl Roth (Karlsruhe, D), Serva (Heidelberg, D), Gibco Life technologies (Karlsruhe, D), BIOZOL Diagnostica GmbH (Echingen, D), Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) oder Pierce (Rockford, USA).

2.1.4 Antikörper

Tabelle 3: Liste verwendeter Primär- und Sekundärantikörper

Primärantikörper (eingesetzte Verdünnung)	Spezies	Bezeichnung	hergestellt durch
Anti-Periostin (1:200)	Maus monoklonal	sc-398631	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)
	Ziege polyklonal	sc-49480	
Anti-β-Tubulin (1:10.000)	Maus monoklonal	sc-5274	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)
Sekundärantikörper (Verdünnung)	Bezeichnung	hergestellt durch	
Hase-anti-Maus , biotinyliert (1:10.000)	ab7074	abcam (Cambridge, USA)	
Esel-anti-Ziege , HRP-gekoppelt (1:5000)	sc-2020	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)	

Erläuterung: Die Herstellung des Periostin Primärantikörpers SC-49480 Ziege polyklonal wurde durch Santa Cruz Biotechnology eingestellt und durch SC-398631 Maus monoklonal ersetzt. Es erfolgte fortan die Verwendung des Maus-monoklonalen Antikörpers.

2.1.5 Zellen

humane kardiale Fibroblasten

Für die Versuchsdurchführungen im Rahmen dieser Arbeit erfolgte der kommerzielle Erwerb von primären hCF der Firmen Lonza (Katalognummer CC-2904) und PromoCell (Katalognummer C-12375). Die hCF sind kryokonservierte Isolate aus gesundem Herzventrikel-Gewebe adulter Spender*innen kaukasischer Zugehörigkeit.

Tabelle 4: Liste verwendeter hCF-Zellen

Firma	Identifikationsnummer	biologisches Geschlecht	Alter in Jahren	Ø t für Zellteilung in h
Lonza (Basel, CH)	27277	weiblich	32	19,0
	30181	weiblich	60	30,0
	27741	männlich	52	19,0
PromoCell (Heidelberg, DE)	416Z006	weiblich	40	31,4
	421Z006.1	männlich	48	39,7
	3040802.1	männlich	52	46,7
		MW_{weiblich}	41 +/- 7	27,4 +/- 2,8
		MW_{männlich}	55 +/- 2	34,0 +/- 8,1

humane iPSC-Kardiomyozyten

Die hiPSC-CM wurden freundlicherweise durch Dr. Sebastian Diecke (*Core Facility Stammzellen-Technologieplattform des Berlin Institute of Health*) zur Verfügung gestellt. Diese entstammten einer hispanischen 38-jährigen Spenderin und einem asiatischen 20-jährigem Spender. Die Aussaatdichte pro cm²-Kreisfläche der Napfvertiefung wurde auf ~25.000 Zellen beziffert; die hiPSC-CM waren mit 500µl spezifischem CM-Vollmedium pro Vertiefung einer 24-Loch Platte bzw. 1ml Vollmedium pro Vertiefung einer 12-Loch Platte inkubiert (mündliche Kommunikation Dr. S. Diecke).

2.1.6 Zellkulturmedien und -zusätze

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Zellkulturmedien und -zusätze für hCF

Firma Lonza (Katalognummer)	Firma PromoCell (Katalognummer)	
Fibroblast Basal Medium (CC-3131)	Fibroblast Growth Medium 3 ready to use (C-23025) - enthält bereits FCS, FGF, Insulin	
Stroma Cell Basal Medium ohne Wachstumsfaktoren, phenolrotfrei (prf) (CC-3204)	Fibroblast Basal Medium 3,prf (C-23235)	
Supplemente: FGM-3 SingleQuots (CC-4525)	Fibroblast Growth Medium 3 SupplementPack (C-39350)	
– Fetales Kälberserum (FCS) (CC-4423WW)	– FCS	
– Fibroblastic Growth Factor (FGF), rekombinant human (CC-4065WW)	– Basic FGF, rekombinant human	
– Gentamicin/ Amphotericin-B (CC-4081WW)	– Insulin, rekombinant human	
– Insulin, rekombinant human (CC-4021WW)	Cryo-SFM – Gefriermedium (C-29912)	
sonstige Firmen		
Dimethylsulfoxid (DMSO)		Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Dulbecco's Phosphat Buffered Saline (DPBS)		Gibco Life Technologies (Carlsbad, USA)
Trypsin-EDTA mit Phenolrot	0,25%; 0,02% EDTA	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
L-Glutamin/ Penicillin/ Streptomycin	200mM; 10.000 U/ml; 10mg/ml	PAN Biotech (Aidenbach, DE)

2.1.7 Oligonukleotide

Der kommerzielle Erwerb der individuell synthetisierten Oligonukleotide erfolgte über die Biotechnologiefirmen BioTeZ Berlin-Buch GmbH und Eurofins Genomics (Hamburg, D). Sie wurden in 50 µmolare Lösung gebracht. Ihre Hybridisierungstemperatur wurde auf circa 60°C beziffert.

Das Design der genspezifisch bindenden Oligonukleotide (Primer) für die Quantifizierung von *POSTN* in der Real-Time quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) erfolgte basierend auf der ermittelten Gensequenz über die Gendatenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, USA), (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Eine zusätzliche Verifizierung der Spezifität der gewählten Primer-Sequenzen erfolgte mit Hilfe des BLAST-Algorithmus, der durch das NCBI, USA zur Verfügung gestellt wird. Zudem wurden die erhaltenen PCR-Amplifikate in einer Gelelektrophorese auf die korrekte Produktlänge bestimmt und mittels Sequenzierung auf ihre exakte Basensequenz hin validiert. Ebenfalls wurde auf eine intronüberspannende Lage der Primerpaare innerhalb der *POSTN*-Gensequenz geachtet. Die entsprechenden Oligonukleotide für *HPRT* (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase), *MYH6*, *MYH7* und *NPPA*, *NPPB*

lagen bereits vor. Für alle Primer ergab sich eine Spezifität zudem über die Schmelzkurve der RT-qPCR, welche die Amplifikation nur *eines* Produktes bestätigte (nicht gezeigte Daten).

Tabelle 6: verwendete genspezifische humane Oligonukleotide für die RT-qPCR.

Spalte 1: genspezifische Bezeichnung des Primerpaars; Spalte 2: Primersequenz in Sense (FW)- und Antisense (RV)- Richtung; Spalte 3: Primerlänge. Spalte 4: Angabe des Primerverhältnisses.

Name	Sequenz (5' → 3')	Länge	Primerverhältnis (FW:RV)
HPRT	FW: CTT TGC TGA CCT GCT GGA TT	20mer	5pmol:5pmol
	RV: TAT GTC CCC TGT TGA CTG GT	20mer	
POSTN	FW: GAA CCA AAA ATT AAA GTG ATT GAA GG	26mer	5pmol:5pmol
	RV: TGA CTT TTG TTA GTG TGG GTC CT	23mer	
MYH6	FW: TGC GCA TTG AGT TCA AGA AG	20mer	5pmol:15pmol
	RV: CTT CAT CCA GGG CCA ATT CT	20mer	
MYH7	FW: AGA GGG TGG CAA AGT CAC TG	20mer	5pmol:15pmol
	RV: GCC ATG TCC TCG ATT TTG TC	20mer	
NPPA	FW: TCT GCC CTC CTA AAA AGC AA	20mer	5pmol:15pmol
	RV: TCA GTA CCG GAA GCT GTT ACA G	22mer	
NPPB	FW: CAC CGC AAA ATG GTC CTC TA	20mer	5pmol:5pmol
	RV: TTA ATG CCG CCT CAG CAC T	19mer	

2.1.8 Softwareprogramme

Tabelle 7: verwendete Softwareprogramme

Software	Funktion	vertrieben durch
Agilent 2100 Expert	Auswertung gemessener RNA-Quantität und -Qualität	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
ABI 7300	Auswertung RT-qPCR Läufe	Applied Biosystems (Waltham, USA)
ImageLab™	Densitometrische Bestimmung detektierter Proteinbanden (Western-Blot)	Bio-Rad (München, DE)
Prism 7	Datenanalyse und statische Auswertung, grafische Abbildungen	Graphpad Software Inc. (La Jolla, USA)
EndNote X9	Zitiermanager	Thomson Reuters (Toronto, CAN)

2.2 Methoden

Im folgenden Kapitel werden die für diese Arbeit relevanten Methoden und deren Durchführung beschrieben.

2.2.1 Zellkulturexperimente

Als zahlenmäßig der am häufigsten vertretene Zelltyp im Herzen²², sind isolierte primäre hCF in der Grundlagenforschung ein etabliertes Zellkulturmodell zur Untersuchung von Aspekten des Herzzellstoffwechsels und (patho)physiologischen Prozessen. Nachfolgend sind Arbeitsweisen ihrer Kultivierung unter fortwährend morphologischer Beurteilung, ihre Kryokonservierung als auch das Protokoll der E2-Behandlung beschrieben. Die hCF wurden von den Firmen Lonza und PromoCell bezogen und ihre Behandlung erfolgte in der gleichen Vorgehensweise, jedoch unter entsprechender Verwendung der firmenspezifischen, zugehörigen Kulturmedien und -zusätze (Kennzeichnung im Text folgend).

Für die *in-vitro* Experimente wurden die adhärent wachsenden hCF in Zellkulturflaschen und -multischalen kultiviert. Die Zellinkubation im Begasungsbrutschrank erfolgte zu Bedingungen von 37°C und einer 5%igen CO₂-Konzentration bei 95%iger Luftfeuchtigkeit. Alle Arbeiten an den Zellkulturen wurden unter der sterilen Werkbank unter aseptischer Arbeitstechnik praktiziert. Alle Materialien wurden hierfür zuvor desinfiziert, sterilisiert oder autoklaviert. Für die Versuche wurden nur hCF zwischen der 3. und 5. Zellpassage (P3-P5) verwendet.

2.2.1.1 Kultivierung

Auftauen der Zellen

Die kryokonservierten hCF wurden zunächst für 2 Minuten zu 37°C im Wasserbad aufgetaut, anschließend mit 70%igem Ethanol (EtOH) oberflächendesinfiziert. Die Zellen wurden anschließend in eine 75cm² Kulturflasche überführt, welche mit 10ml an 37°C vorgewärmtem basalem Wachstumsmedium (folgend „Vollmedium“) der jeweiligen Firma (Lonza oder PromoCell, siehe nachfolgende Auflistung) befüllt war. Bei einer veranschlagten Aussaatdichte von 6666 Zellen/cm² befanden sich pro 75cm² Kulturflasche 500.000 hCF in Kultur. Zur Zelladhäsion erfolgte die Inkubation im Brutschrank; nach 16-24h wurde die Mischung aus DMSO-haltigem Kryomedium und Vollmedium abgesaugt, mit Dulbecco's phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS) gespült, und durch 12ml phenolrothaltiges Vollmedium der jeweiligen Firma zur Kultivierung substituiert.

Lonza-Vollmedium mit Phenolrot	PromoCell-Vollmedium mit Phenolrot
<ul style="list-style-type: none"> - Fibroblast Basal Medium-3 mit Phenolrot - 10% FCS - 1% L-Glutamin/ Penicillin/ Streptomycin - 0,1% FGF - 0,1% Gentamicin/ Amphotericin-B - 0,1% Insulin 	<ul style="list-style-type: none"> - Fibroblast Growth Medium 3 ready to use mit Phenolrot (enthält bereits FCS, FGF, Insulin) - 1% L-Glutamin/Penicillin/Streptomycin

Subkultivierung:

Das Vollmedium wurde im Abstand von 3 Tagen gewechselt und die Zellen wurden ab einer Konfluenz von 80-90% passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium aspiriert, der Zellmonolayer der 75cm²-Kulturflasche mit 6ml DPBS kurz gespült, dann mithilfe von 6ml an 0,05% verdünnter Trypsin-EDTA-Lösung die Zellablösung unter mikroskopischer Überwachung bei Raumtemperatur (RT) ermöglicht. Die Trypsinierung wurde durch Applikation von 12ml Vollmedium neutralisiert und die Zellsuspension nun aspiriert und in ein 50ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Im nächsten Schritt wurde für 5 Minuten bei 220 x g (*Megafuge 1.0R*) und 4°C zentrifugiert, der Überstand aspiriert, das Zellpellett dann in 1ml Vollmedium bei RT langsam resuspendiert. Es schloss sich eine Zellzählung an (*siehe Kapitel 2.2.1.2*). Für die Subkultivierung auf T75-Kulturflaschen wurde eine Aussaatdichte von 3500 Zellen/cm² angesetzt; Bei Überführung auf 6-Loch-Platten (9,5cm² Kreisfläche) wurde eine Aussaatdichte von 100.000 Zellen/cm² veranschlagt und die Zellen entsprechend auf 12ml (T75-Kulturschale) bzw. 2ml (pro Lochvertiefung) an 37°C vorgewärmtem Vollmedium gleichmäßig verteilt.

2.2.1.2 Zellzählung

Zur Zellzählung wurde ein Hämozytometer (*Neubauer-Zählkammer*) eingesetzt. Entsprechend Kapitel 2.2.1.1 wurde ein Aliquot von 10µl der Zellsuspension entnommen und in 90µl Vollmedium 1:10 verdünnt und durch Vortexen gemischt. Von der Lösung wurden 10µl in die Zählkammer aufgetragen. Die sich auf 4 x 16 Kleinquadraten (=4 Großquadraten) mittels Phasenkontrastmikroskops gezählten Zellen wurden addiert, dann der Mittelwert (MW) bestimmt. Die Zellzahl wurde dann laut folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{MW der Zellzahl aus 4 Großquadraten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerkonstante} (10^4)$$

2.2.1.3 Phasenkontrastmikroskopie

Die Fibroblastenkulturen wurden im geschlossenen Kulturgefäß täglich phasenkontrastmikroskopisch (*Axiovert 25, Zeiss*) auf ihre Morphologie, Wachstumsverhalten und Kontaminationsfreiheit hin untersucht. Ferner konnte sodann der Reinheitsgrad der kommerziell erworbenen hCF verifiziert werden. Die digitale Fotodokumentation erfolgte in Serie zu Zeitpunkten von verschiedenen Stadien der Konfluenz, postpassager und während der Behandlung mit E2 mit einer Mikroskop-kompatiblen Kamera (*DMC-LX7, Panasonic*).

2.2.1.4 Kryokonservierung

Im Rahmen der Passagierung oder der Vorbereitung der hCF für die E2-Behandlung wurden überschüssige Zellen zur längerfristigen Lagerung stets kryokonserviert. Dafür wurde die restliche Zellsuspension nach der Zellzählung erneut für 5 Minuten bei 220 x g (*Megafuge 1.0R*) zentrifugiert; der Überstand aspiriert. Das Zellpellet wurde in 1-3ml Kryomedium resuspendiert und je 1ml der Zellsuspension in ein 2,0ml-Kryoröhrchen überführt (~1x10⁶ Zellen/Röhrchen). Dieses wurde mittels *MrFrosty*-Gefrierbehälter (Thermo Fisher Scientific) zunächst für 24h bei -80°C kontinuierlich tiefgefroren und zur dauerhaften Lagerung in Flüssigstickstofftanks überführt.

Lonza-Einfriermedium

- 93% Fibroblast Basal Medium-3 mit Phenolrot
- 7% Dimethylsulfoxid (DMSO)

PromoCell-Einfriermedium

- Cryo-SFM (serumfreies, DMSO-haltiges Kryomedium)
-

2.2.1.5 Aktivkohle-Dextran Stripping des fetalen Kälberserums

Für die bevorstehende Behandlung der hCF mit E2 ist die Kultivierung der Zellen unter östrogenarmen Bedingungen für mehrere Tage eine Grundvoraussetzung. Aus diesem Grund mussten die im FCS enthaltenen Steroidhormone eliminiert werden. Hierfür wurden die kommerziell erworbenen Seren einer Filterbehandlung mit Aktivkohle und Dextran unterzogen und anschließend labortechnisch auf residuale Hormonkonzentrationen analysiert.

Initial erfolgte das Abwiegen von Aktivkohlepulver zu 250mg und Dextran 70 reinst zu 25mg (beide Carl Roth, [Karlsruhe, DE]) auf der Feinwaage; daran schloss sich die Zugabe von 100ml FKS, welches zuvor bei RT aufgetaut wurde. Die Suspension wurde für 30 Minuten bei 57°C schüttelinkubiert und anschließend für 1h zu 20°C und 4000 x g zentrifugiert (*Varifuge 3.0*). Der Serumüberstand wurde vorsichtig mit einer sterilen Pipette abgenommen und erneut in 0,25% Aktivkohle-/0,025-Dextran Suspension gebracht: Dafür wurden je 50ml FKS-Überstand in mit 125mg Aktivkohle und 12,5mg Dextran vorbeladene 50ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Wiederholt wurde die Suspension für 30 Minuten in einem 37°C-temperierten Wasserbad schüttelinkubiert, danach für 1h bei 4000 x g zentrifugiert (*Megafuge 1.0 R*). Die flüssige Phase an Aktivkohle-behandeltem FCS (*charcoal-stripped*; folgend cs-FCS) wurde sorgfältig abpipettiert und anschließend steril unter der Werkbank filtriert (Sterilfilter 0,22µm, *Merck Millipore*; siehe 0). Das gewonnene cs-FCS wurde zu 10ml-Aliquoten bei -20°C gefroren gelagert.

Zur Überprüfung der gelungenen Entfernung der Steroidhormone (Östradiol, Progesteron, [freies] Testosteron) durch die Aktivkohle-Filterbehandlung wurde jeweils eine aliquotierte Probe an unbehandeltem FCS und cs-FCS derselben Lotnummer an das *Labor Berlin* zur labortechnischen Analyse gereicht. Als erfolgreiche Elimination an nachweisbaren E2 im FCS wurde eine mittels Elektro Chemilumineszenz Immuno-Assay ermittelte E2-Konzentration der bezifferten Nachweisgrenze <18.4 pmol/l erachtet.

2.2.1.6 Behandlung der humanen kardialen Fibroblasten mit 17β-Östradiol und Östrogenrezeptor-Agonisten

Für die Versuchsdurchführung wurden ausschließlich sich in P4 oder P5 befindliche kardiale Fibroblasten verwendet. Um die Effekte der E2-Behandlung auf die Fibroblastenkultur bestmöglich *in-vitro* zu untersuchen, war es für einen effektiven und störfreien Versuchsaufbau essenziell, den Gehalt an E2 und sonstigen Hormonen außerhalb der fokussierten E2-Applikation so gering wie möglich zu halten: Dies wird einerseits durch die Verwendung phenolrotfreier (prf) Medien im Rahmen der Behandlung gewährleistet, da Phenolrot schwach östrogene Effekte vermittelt.¹⁰⁶ Um ferner hormonelle Rückstände, die sich in FCS als Bestandteil der Kulturmedien

befinden, zu eliminieren, erfolgte ausschließlich die Verwendung von steroidhormonfreiem cs-FCS.

Zur E2-Behandlung wurden die Fibroblasten auf 6-Loch Zellkulturplatten nach beschriebenem Schema laut *Kapitel 2.2.1.1* subkultiviert und allzeit im Brutschrank unter dort benannten Bedingungen kultiviert. Das sich anschließende E2-Behandlungsprotokoll der hCF ist in *Abbildung 1* dargestellt. Das phenolrothaltige Vollmedium wurde zur besseren Zelladhäsion zunächst für ca. 24h (Tag 1) in den Zellkulturschalen belassen, am Folgetag aspiriert und in einem zweimaligen Waschschrift mit DPBS restlos entfernt. Der Mediaustausch erfolgte ab Tag 2 auf phenolrotfreies, 10% cs-FCS haltiges Vollmedium, welches raumtemperiert war (firmenspezifische Zusammensetzung siehe Übersicht Abschnittsende). Am dritten Tag nach Subkultivierung betrug die Konfluenz der Zellen circa 70-80%, der Mediumwechsel erfolgte nun auf 2,5% cs-FCS haltiges Hungermedium. Die niedrigere Konzentration an Serum bezweckte eine Herabsetzung der unspezifischen Fibroblastenstimulation durch die im Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren¹⁰⁷. Für die Analysen des Zellkulturüberstandes (ZKÜ; siehe *Kapitel 2.2.3.3, 2.2.3.4* sowie *2.2.3.6*) erfolgte an Tag 3 der erste Teil der Abnahme von ZKÜ á 200µL pro Nöpfchen nach 6h, 12h oder 24h. Der gesammelte ZKÜ aus jeweils drei Napfvertiefungen wurde als Pool in ein 1,5ml Reaktionsröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, dann bei -80°C gelagert. Als interne Kontrolle wurde zudem 2,5%iges Hungermedium, welches sich nicht in Kultur befand, gesammelt.

Nach 24h Kultivierung in Hungermedium und einer erreichten Zellkonfluenz von 80-90% erfolgte am 4.Tag die Behandlung der hCF mit E2 in einer Endkonzentration zu 10nM in frisch substituiertem Hungermedium (folgend auch Stimulationsmedium genannt). Da E2 zur Löslichkeitserhöhung in Dextrin (Dex) eingekapselt vorlag, diente Dex als entsprechende Kontrolle. Dabei wurde die Menge an enthaltenem Dex in der 10nM E2-Lösung in gleichwertiger Konzentration im Kontrollansatz zu den Zellen appliziert.

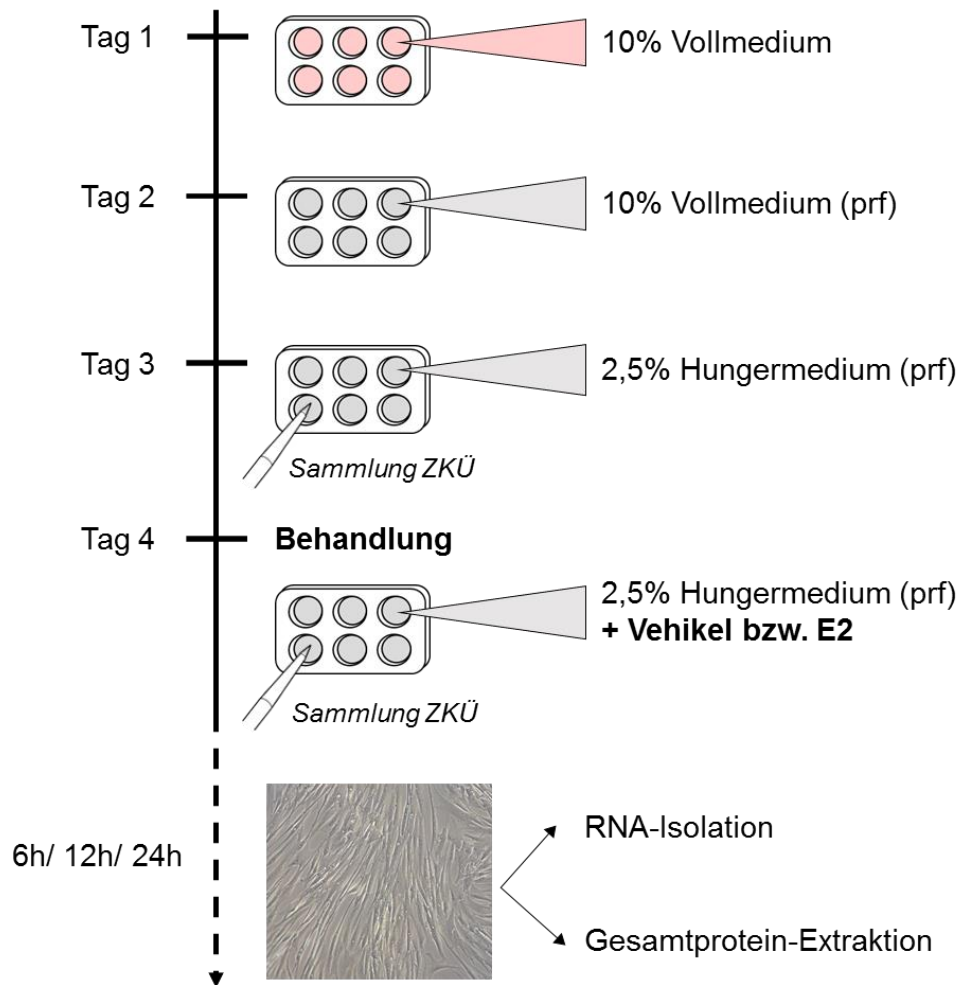


Abbildung 1: Schema der hCF-*in-vitro* Behandlung

Dargestellt ist die Kultivierung der hCF in der 5. Passagestufe zum entsprechenden Zeitpunkt (Zeitleiste links) in dem jeweiligen Kulturmedium (rot \triangleq phenolrothaltiges Medium, grau \triangleq phenolrotfreies Medium [prf]). Anschließende Behandlung an Tag 4 mit E2 oder Vehikel-Kontrolle für 6h/12h/24h und nachfolgender Zellernte.

Die Zellen wurden in einem erweiterten Versuch mit spezifischen ER-Agonisten bzw. mit 10nM EtOH als Kontrolle behandelt: PPT in Endkonzentration zu 10nM fungierte als spezifischer ER α -Agonist, ERB zu 10nM als spezifischer ER β -Agonist. Beide ER-Agonisten wurden zuvor in EtOH in Lösung gebracht.

Alle Substrate (siehe *Tabelle 8*) wurden jeweils in frischem 2,5%-Hungermedium (firmenspezifische Zusammensetzung siehe anschließende Übersicht) auf ihre Endkonzentration hin verdünnt und die hCF für jeweils 6h, 12h oder 24h im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der jeweiligen Behandlungszeit erfolgte der zweite Teil der ZKÜ-Kollektivierung: pro Napf wurden nun 500 μ l ZKÜ der E2- bzw. Vehikel-Kontrolle behandelten Zellen entnommen, und abermals ZKÜ aus drei verbundenen Napfvertiefungen gepoolt und in ein 2,0ml Reaktionsröhrchen überführt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und tiefgekühlt. Das restliche Medium wurde aspiriert, der

Zellrasen kurz mit kaltem DPBS gewaschen und die Zellen laut *Kapitel 2.2.2* und *2.2.3* gemäß der RNA (Ribonukleinsäure)- beziehungsweise Proteinisolation weiterverarbeitet.

Vollmedium ohne Phenolrot	Hungermedium
PromoCell:	
<ul style="list-style-type: none"> - Fibroblast Basal Medium 3, prf - 10% cs-FCS - 1% L-Glutamin/Penicillin/Streptomycin - 0,1% Insulin - 0,1% basic FGF 	<ul style="list-style-type: none"> - Fibroblast Basal Medium 3, prf - 2,5% cs-FCS - 1% L-Glutamin/Penicillin/Streptomycin
Lonza:	
<ul style="list-style-type: none"> - Stroma Cell Basal Medium, prf - 10% cs-FBS - 1% L-Glutamin/Penicillin/Streptomycin - 0,1% Insulin - 0,1% human FGF - 0,1% Gentamicin/ Amphotericin-B 	<ul style="list-style-type: none"> - Stroma Cell Basal Medium, prf - 2,5% cs-FBS - 1% L-Glutamin/Penicillin/Streptomycin - 0,1% Gentamicin/ 0,1% Amphotericin-B

Tabelle 8: verwendete Agenzien zur Behandlung der kardialen Fibroblasten

Agens	Produktnummer	vertrieben durch
17 β -Östradiol, wasserlöslich	E4389	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dextrin (2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin)	C0926	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
PPT (Propylpyrazoletriyl-trisphenol)	1426	Tocris Bioscience (Bristol, GBR)
ERB (ERB 041)	4276	Tocris Bioscience (Bristol, GBR)

2.2.1.7 Behandlung von hiPSC-Kardiomyozyten mit hCF- Zellkulturüberstand

Für diesen Teilversuch wurden hiPSC-CM der P11 verwendet (siehe *Kapitel 2.1.5*). Hierbei sollte untersucht werden, ob unterschiedliche Fraktionen an sezerniertem POSTN-Protein aus den weiblichen und männlichen hCF einen Einfluss auf die Aktivierung von CM haben. Dazu erfolgte eine 24-stündige Behandlung von weiblichen und männlichen hiPSC-CM mit hCF-ZKÜ, welcher seinerseits den Individuen beider Geschlechter infolge der 6-stündigen Vehikel- bzw. E2-Applikation entstammte. Die gesammelten hCF-Kulturüberstände wurden nach Geschlecht (weiblich oder männlich) und Behandlungsvariante (Vehikel oder E2) gepoolt, um dann den hiPSC-CM zugeführt zu werden. Beispielhaft ergibt sich eine Kulturüberstand-Variante „weiblich, E2“ aus den ZKÜ der weiblichen hCF-Individuen, die entsprechend für 6h ausschließlich mit E2 behandelt worden waren.

Pro Vertiefung einer mit 500µl vorbeladenen CM-Vollmedium 24-Loch Platte wurden zusätzlich 250µl an hCF-ZKÜ aufpipettiert und vorsichtig durch horizontales Schwenken verteilt. Entsprechend wurden die mit 1ml Vollmedium pro Napf inkubierten hiPSC-CM einer 12-Loch-Platte mit 500µl ZKÜ beladen. Das Mediumgemisch wurde für 24h zur Zellinkubation im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂-Konzentration und 95%iger Luftfeuchtigkeit belassen und die hiPSC-CM-Kultur am Folgetag gemäß *Kapitel 2.2.2* zur RNA-Isolation weiterverarbeitet.

2.2.2 Analyse der messenger RNA-Regulation mittels RT-qPCR

Die Arbeit mit freier RNA erforderte aufgrund der Ubiquität von Nukleasen eine besonders sorgfältige Arbeitsweise: Um Kontaminationen zu umgehen, wurden Oberflächen und Instrumente an ausgewiesenen RNA-Arbeitsplätzen vor der Verwendung mit der Dekontaminationslösung *RNase AWAY* (Thermo Scientific, USA) behandelt, Einmalhandschuhe regelmäßig gewechselt und ausschließlich RNase-freie Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen bzw. sterile Einwegprodukte benutzt. Diethylpyrocarbonat (DEPC) -behandeltes Wasser wurde zur RNA-Präparation (siehe Kapitel 2.2.2.1) eingesetzt, um etwaige Nukleaseaktivitäten zu hemmen. Der zusätzliche RNase-Hemmer *RNasin* (Promega, USA) kam während der Reversen Transkription zum Einsatz.

2.2.2.1 RNA-Isolation

Nach dem jeweiligen Behandlungszeitpunkt erfolgte zur Extraktion der Gesamt-RNA aus den kultivierten hCF bzw. hiPSC-CM zunächst die Aspiration des Kulturüberstandes und ein zweimaliger Waschschrift mit kaltem DPBS und der Transport der Kulturschalen auf Eis unter eine Abzug-Werkbank. Pro Napfvertiefung einer 6-Loch-Platte wurden 500µl *RNA-Bee*-Reagens (Tel-Test Inc., USA) auf den hCF-Zellrasen bzw. 500µl *TRIzol*® Reagens (Life Technologies-GIBCO BRL, USA) auf die kultivierten hiPSC-CM aufpipettiert, der Zellrasen dann mit einem sterilen Zellschaber geerntet und das Lysat aus 2 Vertiefungen in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Nach diesem Schritt erfolgte fakultativ ein Schockfrost des Lysats in Flüssigstickstoff und die vorübergehende Lagerung bei -80°C bis dieses meist am Folgetag zur Weiterverarbeitung auf Eis wieder aufgetaut wurde. Zu der lysierten Zell-Suspension wurden 100µl Chloroform pro Reagenzröhrchen gegeben; dieses für 2 Minuten gevortext. Daran schlossen sich eine 5-minütige Inkubation der Proben auf Eis und eine 10-minütige Zentrifugation bei 20.817 x g (*Mikrozentrifuge 5427R*) bei 4°C an. Dadurch wurden 3 Phasen abgrenzbar: eine unterste blaue Proteinphase, eine dünne weiße DNA-Phase und eine obere klare RNA-Phase, welche zu 250µl vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reagenzröhrchen überführt wurde. Die

RNA-Ausfällung erfolgte unter Zugabe von ebenfalls 250µl Isopropanol über Nacht bei -20°C und kurzem Vortexen. Am Folgetag wurde das Röhrchen zum Pelletieren zentrifugiert (5min., 20.817 x g, 4°C), der Überstand vorsichtig dekantiert und das Pellet unter Einpipettieren von 800µl 80%igem EtOH zum Flottieren gebracht. Abermals wurde zentrifugiert (5min, 6810 x g, 4°C), der Überstand dekantiert, das Pellet in EtOH gewaschen und unter dieser Bedingung nochmals zentrifugiert (*Mikrozentrifuge 5427R*), der EtOH-Überstand verworfen. Das Pellet am Boden des Röhrchens wurde nun für ~20 Minuten unter der Werkbank getrocknet. Unter Zugabe von 20µl DEPC-gereinigtem Aqua bidest wurde das RNA-Pellet gelöst und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2.2 Qualitative und quantitative Messung der Gesamt-RNA

Die quantitative Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte über die Messung der optischen Dichte mit dem *NanoDrop 1000*-Photometer. Dafür wurden 1,0µl Probenvolumen auf die Küvette aufgetragen. Die Probenkonzentration wurde basierend auf dem Beer'schen Gesetz bei einer Wellenlänge von $\lambda=260\text{nm}$ in ng/µl ausgegeben, da auch das im *RNA-Bee* enthaltene Guanidin-Isothiocyanat bei dieser Wellenlänge absorbiert. Gleichsam konnte die Reinheit der RNA mittels der 260nm/280nm-Ratio beurteilt werden: Ein Verhältnis von ~2,0 galt als anerkannt für das Vorliegen von ‚reiner‘ RNA bei niedriger Proteinkontamination, diese Proben wurden zur weiteren RNA-Analyse verwendet.

Zur Gewährleistung valider mRNA- Expressionsergebnisse der nachfolgenden RT-qPCR erfolgte in Vorbereitung eine qualitative Analyse der ribosomalen RNA (rRNA)-Integrität. Die RNA-Integrität wurde hier anhand der rRNA beurteilt, da diese gegenüber mRNA über 80% der Gesamt-RNA ausmacht.¹⁰⁸ Die Integrität der isolierten RNA wurde stichprobenweise mit dem *Agilent RNA 6000 Nano Reagent Kit* am *Agilent 2100 Bioanalyzer*-Spektrophotometer (Agilent Technologies, USA) analysiert, wobei sich die Durchführung nach Anweisungsinformationen richtete. Für das 28S:18S rRNA-Verhältnis zur Basislinie gilt ein Richtwert von 2:1 als kennzeichnend für eine hohe Probenqualität, auch eine scharfe Bandierung in der Elektrophorese ist stark suggestiv für intakte, nicht degradierte rRNA (siehe Abbildung 2). Aus diesen Parametern generiert die *2100 Expert* Software über einen Algorithmus eine RNA-Integritätsnummer (RIN), welche die RNA bezüglich ihrer Degradation auf einen Wert zwischen 1 - 10 beziffert, wobei 10 die geringste Degradation darstellt. In den isolierten Proben konnte gegenüber vorbekannten degradierten Proben (Negativkontrolle) keine RIN < 9,4 ermittelt werden.

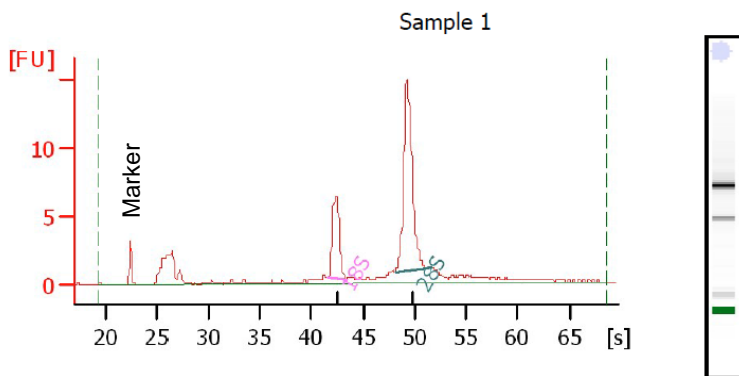


Abbildung 2: Exemplarische rRNA-Integritätsanalyse einer hCF-Probe nach RNA-Isolation. Dargestellt ist die Elektropherogrammspur (links) und das dazugehörige RNA-Banden Elektrophoresebild (rechts). Die 18S und 28S-Banden der ribosomalen RNA-Untereinheiten sind gegenüber der Markerbande deutlich abgrenzbar. Die rRNA-Ratio dieser Probe beträgt 2,4; die RIN ist auf 9,4 beziffert.

2.2.2.3 Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die genomische RNA wurde mittels einer Reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert, welche dann als Template-DNA für die sich anschließende RT-qPCR diente. Für die reverse Transkription wurde das *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Kat.# 4374966, Applied Biosystems, USA) genutzt und 500ng an isolierter Proben-RNA eingesetzt, mit DEPC-Aqua bidest auf 13,7µl Volumen verdünnt und 6,3µl an Mastermix-Enzymmischung für einen einfachen Ansatz von 20µl Gesamtvolumen hinzugefügt.

Zusammensetzung des RT-PCR-Mastermix-Reaktionsmischung (Probenanzahl n=1):

- 2,0µl 10x RT-Puffer
- 0,8µl 25x dNTP-Mix
- 2,0µl 10x Random Primer
- 1,0µl *Multiscribe* Reverse Transkriptase
- 0,5µl RNase Inhibitor: *Recombinant RNasin®* (Promega)

Zudem wurde eine Negativkontrolle mit 13,7µl DEPC-Aqua bidest und 6,3µl Mastermix, jedoch ohne RNA-Lösung mitgeführt. Alle Agenzien wurden in ein 0,2ml Reaktionsgefäß pipettiert, gevortext und abzentrifugiert. Die RT-PCR wurde im *Mastercycler gradient thermocycler* katalysiert (10min bei 25°C, gefolgt von 2h bei 37°C, danach 5min bei 85°C). Die cDNA-Proben in Endkonzentration von 25ng/µl wurden bei -20°C gelagert bzw. für die RT-qPCR Analyse weiterverwendet.

2.2.2.4 Quantitative PCR in Echtzeit

Die quantitative Echtzeit-PCR (RT-qPCR, *real-time quantitative PCR*) ermöglicht die mengenmäßige Bestimmung eines jeweils transkribierten, spezifischen Genprodukts einer Probe. Sie basiert auf der Amplifikation der cDNA-Zielabschnitte und der Detektion des Fluoreszenzsignals durch den hier verwendeten DNA-interkalierten *Power SYBR®-Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, USA) nach jedem Amplifikationszyklus. Die nach der Reversen Transkription (*Kapitel 2.2.2.3*) entstandene cDNA diente als Matrize für die genspezifischen Primerpaare für *HPRT*, *POSTN*, *MYH6*, *MYH7*, *NPPA* und *NPPB* (*Tabelle 6*). Um die optimalen Primerverhältnisse für die Quantifizierung zu ermitteln, wurden diese in einer verdünnten Ausgangskonzentration von 5pmol/μl in einer FW:RV-Ratio von 1:1, 1:3 und 3:1 getestet. Im Hinblick auf die entsprechenden Fluoreszenz-/Amplifikations- und Schmelzkurven wurde dann das passende Verhältnis erwählt. Ein Reaktionsansatz zur Ermittlung der exprimierten mRNA-Menge des jeweiligen Gens setzte sich wie folgt zusammen:

RT-qPCR-Reaktionsansatz (20μl Gesamtvolumen, Probenzahl n=1):

beispielhaft:

- 10μl *Power SYBR® PCR Master Mix*
 - 1μl FW-Primer (c= 5pmol/μl)
 - 1μl RV-Primer (c= 5pmol/μl)
 - xμl cDNA-Template (c= 0,5ng/μl)
 - ad 20μl Aqua bidest.
-

Die cDNA der Ausgangskonzentration von 25ng/μl wurde auf 5ng/μl (1:5) verdünnt und in einem zweiten Schritt auf 0,5ng/μl (1:10) für den finalen Einsatz in der RT-qPCR-Analyse verdünnt. Eine Standardreihe in 1:2-Verdünnungsschritten, erstellt aus einem Pool aller cDNA-Proben zu 5ng, war in jedem RT-qPCR-Ansatz inbegriffen (Spannbreite: 6,25ng-0,2ng für *HPRT*; 7,5ng-0,23ng für *POSTN*; 5,0ng-0,16ng für *NPPA*, *NPPB*, *MYH6*, *MYH7*). Alle Proben wurden im Doppelansatz mitgeführt. Zudem wurde als Negativkontrolle Aqua bidest. anstatt cDNA-Template eingesetzt.

Die Proben wurden auf Eis gelagert in eine 96-Loch-Platte mit vorgelegtem RT-qPCR-Reaktionsansatz pipettiert, diese kurz gevortext, abzentrifugiert und anschließend in den RT-qPCR-Thermocycler *Fast 7500* bzw. *StepOnePlus* verbracht. Der PCR-Zyklusprozess ist der *Tabelle 9* zu entnehmen:

Tabelle 9: Hauptschritte und Bedingungen für die RT-qPCR in Echtzeit

Stufe	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
I	1. primäre Denaturierung	95°C	10min
II	2. Denaturierung	95°C	15s
	3. Annealing	60°C	1min
	4. Elongation	72°C	1min/kb
	5. Amplifikation: 40-fache Zykluswiederholung (Schritte 2-4)		
III	Dissoziationskurve und finale Extension	95°C	15s
		60°C	1min
		95°C	15s
	Haltetemperatur	4°C	∞

Die Ermittlung der relativen mRNA-Menge in den Proben erfolgt anhand der jeweils mitgeführten Standardreihe, die von dem qPCR-Programm Applied Biosystems 7300 System SDS Software v1.4.1 bzw. *StepOnePlus* Software v2.3 ausgegeben wurde. Die quantifizierten Mittelwerte (MW) für das jeweilige Gen wurden auf die MW des Referenz- und Haushaltgens *HPRT* normalisiert. Die abschließende Gegenüberstellung der Quotienten der mit Vehikel oder E2-behandelten Proben ermöglichte die Bewertung der relativen mRNA-Expressionslevel in den hCF.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

Um zu vermeiden, dass die zu extrahierenden Proteine bzw. die im hCF-ZKÜ enthaltenden Proteine während der Präparation abgebaut werden, wurden alle Schritte bei Lagerung auf Eis/ bei 4°C durchgeführt.

2.2.3.1 Gewinnung und Aufreinigung von Gesamtprotein

Zur Zellyse und Extraktion von Gesamtprotein aus den hCF, wurden diese gemäß Kapitel 2.2.1.1 behandelt und zweimal mit kaltem DPBS gewaschen, auf Eis gelagert und 500µl Proteinlysis-Puffer auf 3 Napfvertiefungen verteilt pipettiert. Der Zellrasen wurde mit einem Zellschaber gelöst, die Suspension aus 3 Vertiefungen wurde in ein 1,5ml Reagenzröhrchen überführt und in Flüssigstickstoff schockgefroren, dann bis zur weiteren Proteinisolierung bei -80°C gelagert. Zur Isolierung wurden pro Probenröhrchen 5µl an 10%igem Natriumdodecylsulfat (SDS) in die Suspension pipettiert, kurz gevortext und anschließend für 30 Minuten auf Eis bei 4°C im Kühlraum inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (17.430 x g [*Mikrozentrifuge 5427R*], 10 Minuten, 4°C). Der Überstand enthielt das isolierte Gesamtprotein; dieser wurde zu 30µl aliquotiert und dauerhaft bei -80°C gelagert.

Rezeptur Proteinlysis-Puffer (pro 1ml Gesamtvolumen)

<ul style="list-style-type: none"> - 870µl RIPA (Radioimmun-präzipitationsassay) -Puffer (1x) <li style="padding-left: 20px;">- 50mM Tris-HCl Puffer <li style="padding-left: 20px;">- 150mM NaCl <li style="padding-left: 20px;">- 1mM EDTA <li style="padding-left: 20px;">- 1mM EGTA <li style="padding-left: 20px;">- 1% Nonident P-40 	+	<p><u>Vor Gebrauch frisch hinzugefügt:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 100µl PhosSTOP Phosphataseinhibitor (10x) (Roche, CH) - 20µl Complete mini Proteaseinhibitor (50x) (Roche, CH) - 1µl NaF (1M) - 10µl Na₃VO₄ (100mM)
--	---	---

2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Test

Die Konzentration des isolierten Gesamtproteins wurde mit dem *Pierce® BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, USA) laut den Benutzungsangaben des Produkts nach Standardprotokoll bestimmt. Bicinchoninsäure (BCA) bildet hierbei in Reaktion mit dem reduzierten Protein-Cu²⁺-Ionenkomplex der sogenannten Biuret-Reaktion einen violetten Farbstoffumschlag.¹⁰⁹ Die Extinktion dieser Farbreaktion wurde im *xMark Microplate Absorbance* Spektrophotometer (BioRad) dann bei einer Wellenlänge von $\lambda=562\text{nm}$ in Bezug auf eine Albumin-Standardreihe quantifiziert und darüber die Proteinkonzentration ermittelt.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung SDS-komplexierter, denaturierter Proteine nach ihrem Molekulargewicht (MG) in einem Polyacrylamidgel beschreibt die Methode der SDS-PAGE. Hierfür wurden die Protein- oder Zellkulturüberstandproben auf Eis aufgetaut. Dann wurde das äquivalente Volumen für 10µg Gesamtprotein den Proben entnommen und auf ein identisches Volumen mit destilliertem H₂O gebracht, anschließend mit SDS-haltigem 4x konzentriertem *ROTI®Load 1* Probenauftragspuffer im 1:4-Verhältnis versetzt. Für die ZKÜ-Proben wurden 10µl Probenvolumen pro Laufbahn veranschlagt, dann 1:2 mit destilliertem H₂O verdünnt und mit ebenfalls SDS-haltigem 1-fach Lämmli-puffer versetzt. Die Proben wurden anschließend gevortext, zentrifugiert und für 5 Minuten bei 95°C im Thermomix zwecks Denaturierung erhitzt. Die abgekühlten Proben wurden dann im Doppelansatz auf ein 8%iges Polyacrylamidgel der Trenngel-Lösung aufgetragen. Der vorgefärbte Proteinmarker *PageRuler Prestained Protein Ladder* oder *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* (beide Thermo Fisher Scientific, USA) wurde zum Abgleich der Proteingröße als Größenstandard genutzt. Bei 4°C Umgebungstemperatur wurden die Proteine bei einer Spannung von 80V im Sammelgel zunächst in der Ebene konzentriert, und ihre Lauffront dann bei 100V im Trenngel nach dem Molekularsiebeffekt aufgetrennt.

4x Lämmli-Puffer

- 5% SDS
- 0,4% Bromphenolblau
- 40% Glycerol
- 253mmol TRIS/HCl
- 200mmol DTT

SDS-Sammelgel (5%), 5ml

- 3,4ml Aqua bidest.
- 830µl 30% Polyacrylamid (PAA)
- 630µl 1M Tris-HCl, pH 6,8
- 50µl 10% SDS
- 50µl 10% APS (Ammoniumpersulfat)
- 5µl TEMED (Tetramethylethylendiamin)

SDS-Trenngel (8%), 20ml

- 9,3ml Aqua bidest.
- 5,3ml 30% PAA
- 5,0ml 1,5M Tris-HCl, pH 8,8
- 0,2ml 10% SDS
- 0,2ml 10% APS
- 12µl TEMED

Elektrophorese-Puffer (5x Tris-Glycin-Puffer)

- 15,1g Tris-Base pH 8,8
- 94g Glycerin
- 50ml 10% SDS
- ad 1l Aqua bidest., pH-Anpassung: 8,3
- 1:5 Verdünnen auf 1x mit Aqua bidest.

2.2.3.4 Proteintransfer mittels Western-Blot Methode

Im Anschluss an die Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der Proteine auf die *Amersham Protran* Nitrocellulose-Membran mittels Western-Blot Technik. Dazu wurden die Gele als auch die Membran zunächst für 5 Minuten in Transferpuffer inkubiert, danach das Gel kathodenseitig und luftblasenfrei auf die Membran disponiert und diese beidseits „sandwichartig“ mit Filterpapier sowie Schwamm pads geschichtet und in eine Kassette eingespannt. Die bestückte Kassette wurde in die Halterung der mit 5 Liter gekühltem 1x Blotting-Puffer befüllten Kammer verbracht und der nasse Proteintransfer auf die Membran bei 100V und 4°C Umgebungstemperatur für 1,5 Stunden für die Gesamtprotein-Proben bzw. für 2 Stunden für die Zellkulturüberstandproben durchgeführt. Danach wurde die Membran kurz mit Aqua bidest. gespült, dann der Erfolg des Proteintransfers durch das reversible Anfärben mit einer 0,1% Ponceaurot-Essigsäure-Färbung überprüft: Die Membran wurde für 2 Minuten auf dem Schüttler mit der Farblösung inkubiert und zweimal mit Aqua bidest. gespült, der Transfererfolg wurde Scan-fotoprotokolliert.

Blotting-Puffer (4x)

- 29,09g Tris Base, pH 8,8
- 138,38g Glycin
- Mit Aqua bidest. auf 2l auffüllen
- 1 Teil gebrauchsfertigen Puffer + 1 Teil Methanol auf 5l mit Aqua bidest. auffüllen

2.2.3.5 Immunologische Proteindetektion

Die Nitrocellulosemembran wurde zunächst in 5% Magermilch-Blockingpuffer zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen für 1 Stunde bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Zur Immunfärbung wurde der entsprechende spezifische Primärantikörper in 12ml der 5%-Magermilchlösung verdünnt (*Tabelle 3*) und die Membran über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler in dieser Suspension hybridisiert. Am nächsten Tag erfolgten drei Waschschriffe in TBST für jeweils 10 Minuten, an die sich die Hybridisierung mit dem Peroxidase-markierten Sekundärantikörper in entsprechender Verdünnung (*Tabelle 3*) für 1 Stunde bei RT auf dem Inkubationsschüttler schloss. Es folgten abermals 3 Waschschriffe mit TBS-T für insgesamt 30 Minuten.

Die Immunreaktion erfolgte über die einminütige Benetzung und lichtdichter Abdeckung der Membran mit Enhanced Chemilumineszenz-Lösung (ECL) *ROT[®] Lumin*, welche als Substrat der Sekundärantikörper-gekoppelten Meerrettich-Peroxidase die Chemilumineszenzreaktion hervorruft. Überschüssige ECL wurde über den Rand der Membran mit Filterpapier entfernt. Das emittierte Signal wurde anschließend im Bildentwickler *ChemiDoc XRS* detektiert. Um eine Detektion in der bereits gesättigten Phase auszuschließen, wurden bei Proteinbeladung eine entsprechende Verdünnungsreihe mitgeführt. Als Ladekontrolle, die sicher POSTN enthält, diente Proteinlysate der Brustzell-Krebslinie MCF-7 (Abkürzung für *Michigan Cancer Foundation-7*).¹¹⁰ Das Haushaltsprotein β -Tubulin sollte in allen Gesamtprotein-Proben aus dem hCF-Zelllysate gleich stark exprimiert sein, weshalb es als Ladekontrolle aussagekräftig gegenüber der gleichmäßigen Gelbeladung der SDS-PAGE war.

Zur Ablösung der Antikörper erfolgte das „Strippen“ der Membran in Stripping-Puffer für 30 Minuten bei 50°C unter Schütteln. Nach einem abschließenden Spülschritt in TBST für 3x 10 Minuten konnte die Membran erneut Antikörper-hybridisiert werden bzw. bei 4°C trocken gelagert werden.

TBS (10x)	TBST (1x) (Tris buffered Saline + Tween)
<ul style="list-style-type: none"> – 48,8gm Tris Base – 160g NaCl – 1600ml Aqua bidest. – pH-Wert auf 7,6 einstellen – ad 2l Aqua bidest. auffüllen 	<ul style="list-style-type: none"> – 100ml TBS (10x) – 900ml Aqua bidest. – 1ml Tween-20 für 0,1%-Endkonzentration
Glycin Stripping-Puffer	Magermilchbasierter Blocking-Puffer (5%)
<ul style="list-style-type: none"> – 1,87g Glycin – 100ml 10% SDS – ad 1l Aqua bidest. – pH-Wert auf 2,0 einstellen 	<ul style="list-style-type: none"> – 100ml TBST (1x) – 5g fettfreies Magermilchpulver

2.2.3.6 Densitometrische Western-Blot Quantifizierung

Die densitometrische Auswertung der detektierten Intensität der Proteinbande erfolgte mit Hilfe der Software *ImageLab 6.1* (BioRad, USA). Die ermittelten einzelnen POSTN-Bandenintensitäten wurden durch die dazugehörige Intensität der β -Tubulin Banden ins Verhältnis gesetzt, anschließend der MW der technischen Replikate/ Doppelansätze gebildet. Dieser POSTN/Tubulin-Quotient wurde schließlich über die Bestimmung der Ratio von E2-behandelten zu Vehikel-behandelten Proben grafisch veranschaulicht. Dazu wurden die errechneten Werte für den Vehikel-Kontrollansatz für jeden Zeitpunkt unabhängig gleich Eins gesetzt und die Werte der E2-behandelten hCF darauf in Bezug gesetzt.

Für die ZKÜ-Proben der hCF diente pures, nicht in Kultur gebrachtes 2,5%iges Hungermedium als Referenzkontrolle. Von allen ermittelten POSTN-Bandenintensitäten wurde das schwache Signal jenes nicht kultivierten Hungermediums als basales „Hintergrundsignal“ subtrahiert. Die Mittelwerte der Bandenintensitäten im Doppelansatz wurden gebildet, und der zum jeweiligen Zeitpunkt (6h/12h/24h) aus E2- bzw. Vehikel-Behandlung entstammende Stimulationsmedium-Überstand (Tag 4) gegen den Hungermedium-Überstand (Tag 3) in Relation gesetzt (siehe *Kapitel 2.2.1.6* und *Abbildung 1*). Da POSTN außerhalb von Stimulationsbedingungen konstitutiv aus den hCF sezerniert wurde, konnte das POSTN-Signal, welches im Hungermedium-basierenden ZKÜ detektiert wurde (Tag 3), als basal synthetisierte Menge an sezerniertem Protein angesehen werden. Aus diesem Grund diente die Bandenintensität für Hungermedium-basierenden ZKÜ als interne Ladekontrolle zum relativen Zeitpunkt $t=0h$. Dieser Stimulationsmedium/Hungermedium-Quotient wurde schließlich über die Bestimmung der Ratio von E2-behandelten zu Vehikel-behandelten Proben grafisch veranschaulicht.

2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und grafische Darstellung wurde durch die GraphPad Prism 7 Software unterstützt. Alle Messwerte sind als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler (*Standard Error of the Mean = SEM*) als Streuungsmaß dargestellt. Für die statistische Analyse von ungepaarten Stichproben in der Auswertung der mRNA- und Proteinexpression wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Zum Vergleich mehrerer Gruppen kam zudem eine einfache Varianzanalyse (*One-Way analysis of variance = ANOVA*) mit Dunnett's-Korrektur zur Vermeidung des α -Fehlers zur Anwendung.

p-Werte $\leq 0,05^*$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

Im Rahmen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen zur E2-vermittelten Regulation des pro-fibrotischen Faktors POSTN in männlichen und weiblichen hCF, wurden ebendiese zunächst bis in die P5 subkultiviert. Während des Kultivierungszeitraumes von der P2 bis P5 erfolgte eine lichtmikroskopische Begutachtung und Beurteilung von Wachstumsverhalten sowie Morphologie der Fibroblastenkultur. Nach der Behandlung der in der P5 befindlichen hCF mit E2 oder der Vehikel-Kontrolle (Dex) für 6h, 12h oder 24h wurden die relativen mRNA-Level von *POSTN* mittels RT-qPCR-Analyse gemessen. Um die E2-vermittelten Effekte auf die Proteinmenge von POSTN in den hCF zu analysieren, erfolgte eine Messung des intrazellulären als auch des sezernierten Protein-Niveaus via Western-Blot. Abschließende Untersuchungen an hiPSC-CM beider Geschlechter dienten dazu, den Effekt des sezernierten POSTN aus weiblichen und männlichen hCF auf die Aktivierung der hiPSC-CM zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden nach 24-stündiger Inkubation der hiPSC-CM mit dem ZKÜ der mit E2- und Vehikel-behandelten hCF die CM-spezifischen Aktivierungsmarker *MYH6*, *MYH7* und *NPPA*, *NPPB* auf ihre relative mRNA-Menge mittels RT-qPCR Analyse bestimmt.

3.1 Charakterisierung der humanen kardialen Fibroblastenkultur

Die in der vorliegenden Arbeit kultivierten hCF präsentierten sich morphologisch in einer für sie charakteristischen Zellkonformation.^{22, 111} *Abbildung 3* zeigt eine exemplarische, lichtmikroskopische Bildaufnahme einer Fibroblastenkultur: Von dem spindelförmigen, glattwandigem Zellkörper zweigten sich feine, sternförmigen Ausläufer ab. Diese Zytoplasma-Ausläufer bildeten vereinzelt Kontakte mit Fortsätzen anderer Fibroblasten und formierten somit netzähnliche Verbände. Das Zytoplasma zeigte sich reichlich feingranulär strukturiert, während sich der ovale Nukleus deutlich kondensiert darstellte. Die Zellen wuchsen in einer Monoschicht. Die maßstabsgetreue, lichtmikroskopische Größeneinordnung des einzelnen Fibroblasten von circa 150-200µm in seiner längsten Ausdehnung ist vereinbar mit einschlägigen Literaturangaben.¹¹²

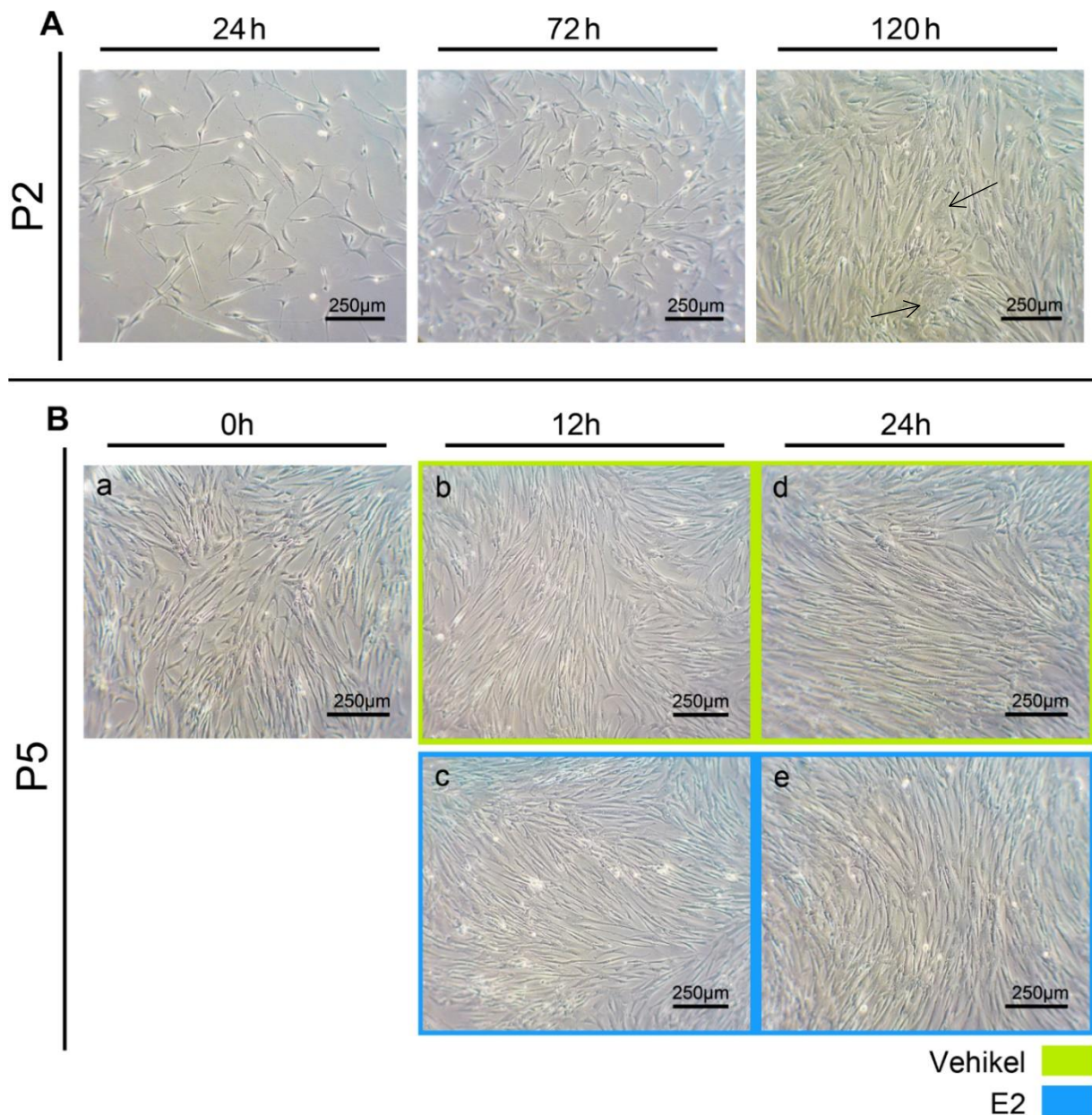


Abbildung 3A-B: Zellmorphologische Darstellung der humanen kardialen Fibroblasten im Phasenkontrast-Lichtmikroskop

(A) In P2 erfolgte die zellmorphologische Beurteilung zu den Zeitpunkten 24/ 72/ 120h nach Kultivierung. (B) Zellmorphologie in P5 zu den Behandlungszeitpunkten **a:** 0h = vor Behandlung; **b/ c:** 12h nach Behandlung; **d/ e:** 24h nach Behandlung. Die Behandlung erfolgte mittels Vehikel-Kontrolle oder E2. Darstellung unter 40- facher Vergrößerung. Maßstabsbalken: 250µm. Pfeile: Markierung Myofibroblasten.

Zudem zeigten die hCF ein adhärentes Wachstum in den Zellkulturflaschen/-schalen während sich ihre Morphologie in Abhängigkeit vom Grad der Konfluenz veränderte: Bei zunehmender Zelldichte im Verlauf der Kultivierungszeit, formierten sich die Zellfortsätze von einem sternförmigen Muster hin zu einer uni- bis bipolaren Anordnung (Abbildung 3A-B:

Zellmorphologische Darstellung der humanen kardialen Fibroblasten im Phasenkontrast-Lichtmikroskop *Abbildung 3A:* Vergleich 72h zu 120h und *Abbildung 3B:* Vergleich *a* zu *b,c* und zu *d,e*). Wenngleich die in niedriger Dichte frisch kultivierten hCF

einzelstehend und verstreut wuchsen, formierten sich die zunehmend konfluent wachsenden Zellen sodann in parallel-ausgerichteten Clustern, da die Expansionsfläche abnahm. Passend zum Phänotyp eines Myofibroblasten¹¹¹ präsentierten sich an einigen Stellen innerhalb der Kulturschale einige Zellkörper eher flächig und großskalibrig mit vergrößerter Zellwand, das Zytoplasma war gröber granuliert, die Ausläufer eher breitbasig und kurz (siehe exemplarische Pfeilmarkierungen *Abbildung 3A*) im Vergleich zur Konformation der überzähligen spindelförmigen Zelleiber. Diese Beobachtung häufte sich mit steigender Passage und voranschreitender Kultivierungszeit. Die Zellkontaktinhibition und die damit verbundene Einstellung des Zellwachstums und der Zellteilung war darüber hinaus ab circa 80% Konfluenz beobachtbar.

Aufgrund der typischen Zellmorphologie wurde schließlich von einer vornehmlich reinen Fibroblastenkultur ausgegangen. Zudem zeigte sich nach der Behandlung mit E2 bzw. der Vehikel-Kontrolle keine auffälligen Unterschiede in Zellmorphologie oder -teilung zwischen den beiden Gruppen (siehe *Abbildung 3B b,d* versus *c,e*).

3.2 Nachweis von *Periostin* mRNA und Protein in weiblichen und in männlichen humanen kardialen Fibroblasten

Zunächst galt es zu analysieren, ob die hCF der verschiedenen Proband*innen *POSTN* auf mRNA- und Proteinebene exprimieren. Des Weiteren sollte ermittelt werden, ob unter jenen basalen Bedingungen geschlechtsspezifische Unterschiede in der Expressionsmenge von *POSTN* zwischen den weiblichen und den männlichen hCF bestehen. Dazu erfolgte die Isolierung von Gesamt-RNA zur Quantifizierung der Menge an transkribierter mRNA mittels RT-qPCR und die Kollektion von Gesamtzelllysaten zur Bestimmung der relativen Proteinmenge mit Hilfe der SDS-PAGE und Western-Blot Methode.

In allen hCF-Proben konnte ein spezifisches PCR- Produkt sowie ein Signal im Western-Blot für *POSTN* nachgewiesen werden (*Abbildung 4A-B*). Vergleichend zeigte sich, dass hCF weiblicher Individuen geringere Mengen an *POSTN* mRNA aufweisen als männliche Fibroblasten – dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant (*Abbildung 4A*). Die densitometrische Quantifizierung des exprimierten *POSTN* -Gesamtproteins ergab für die weiblichen hCF ebenfalls eine geringere relative *POSTN*-Proteinmenge im Vergleich zu den männlichen hCF (*Abbildung 4B*). Auch dieser Unterschied erwies sich als nicht signifikant.

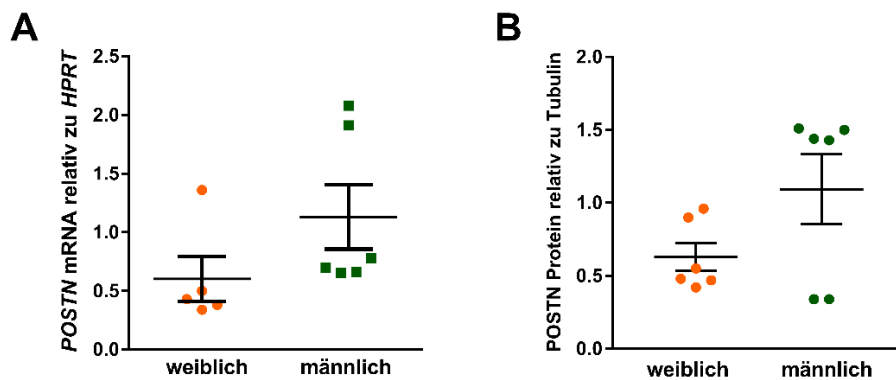


Abbildung 4A-B: Basale *POSTN* mRNA- und Proteinexpression in weiblichen und männlichen hCF. Dargestellt ist die *POSTN* mRNA-Expression relativ zu *HPRT* (Abb. 3A) und die Expression an *POSTN* Gesamtprotein relativ zu β -Tubulin (Abb. 3B) in weiblichen und männlichen hCF. Das dargestellte Punktdiagramm repräsentiert den Mittelwert \pm SEM der Einzelmesswerte der jeweilig behandelten drei weiblichen und drei männlichen Individuen, wobei jeweils eine Doppelbestimmung erfolgte. Ausnahme: Abb. 4A 1 weibliches Individuum nur in Einzelbestimmung. Mann-Whitney Test.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass *POSTN* in den hCF aller untersuchten Individuen exprimiert ist und dass unter basalen Bedingungen die Menge an *POSTN* mRNA- und Protein in männlichen Individuen in Tendenz höher als in weiblichen hCF sind.

3.3 Effekt von 17 β -Östradiol in humanen kardialen Fibroblasten

Im nächsten Schritt der Arbeit wurden die kultivierten in der P5 befindlichen hCF mit E2 oder der Vehikel-Kontrolle (Dex) für 6h, 12h oder 24h behandelt. Anschließend wurden die relativen mRNA-Level von *POSTN* mittels RT-qPCR-Analyse gemessen. Dargestellt wurde die relative *POSTN* mRNA-Menge, normiert auf die mRNA-Menge von *HPRT*. Der errechnete Wert für den Vehikel-Kontrollansatz wurde für jeden Zeitpunkt unabhängig gleich Eins gesetzt und die Werte der E2-behandelten hCF darauf bezogen.

3.3.1 Einfluss von 17 β -Östradiol auf die geschlechtsspezifische Periostin-Transkription

Um den Einfluss der Behandlung mit E2 auf die mRNA-Transkription von *POSTN* zu prüfen, erfolgte die Bestimmung der *POSTN* mRNA-Level in weiblichen und männlichen hCF (Abbildung 5 und Abbildung 6).

POSTN mRNA-Regulation nach E2-Behandlung in weiblichen hCF:

Die 6-stündige Behandlung der weiblichen Fibroblasten mit E2 bewirkte eine verminderte Expression der *POSTN* mRNA gegenüber der Kontrolle (0,91fach) (Abbildung 5). Nach 12h zeigte sich ein 0,90-fache, signifikante *POSTN* mRNA-Reprimierung durch E2 gegenüber der Kontrolle, die auch nach 24h signifikant gehemmt (0,94-fach) persistierte. Dies lässt annehmen, dass E2 in weiblichen hCF einen reduzierenden Effekt auf die transkriptionelle *POSTN*-Genexpression besitzt.

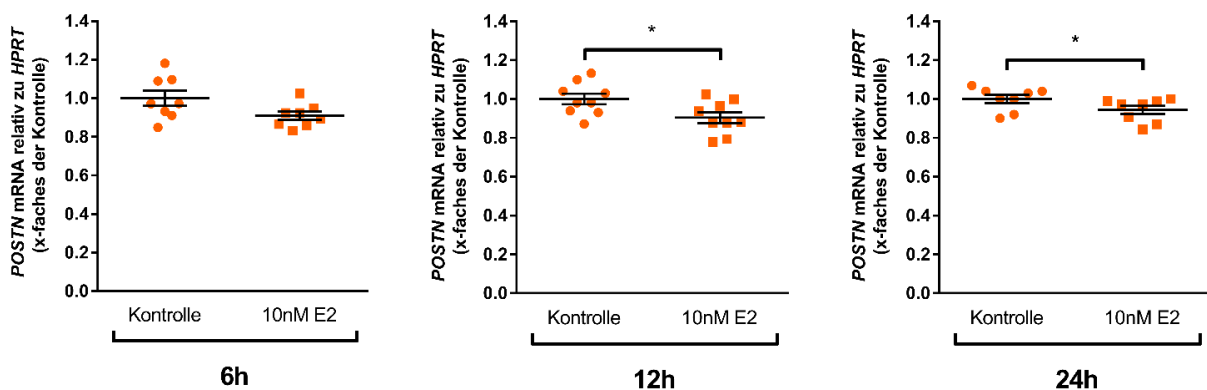


Abbildung 5: Relative *POSTN* mRNA-Menge in weiblichen hCF nach E2-Behandlung.

Abgebildet ist die relative *POSTN* mRNA-Expression in weiblichen hCF nach 6h, 12h und 24h Behandlung mit 10nM E2 oder Vehikel-Kontrolle, normalisiert auf das Haushaltsgen *HPRT*. Das dargestellte Punktdiagramm repräsentiert den Mittelwert \pm SEM der Messwerte der unabhängig behandelten weiblichen Individuen ($n=3$), wobei jeweils eine Dreifachbestimmung erfolgte. (1 Individuum nur in Doppelbestimmung zu 6h und 24h). Der errechnete Messwert für die Kontrolle wurde =1 gesetzt und die durch E2-Behandlung ermittelten Werte darauf bezogen. Mann-Whitney Test: * $p \leq 0,05$ in Bezug auf die Kontrolle.

POSTN mRNA-Regulation nach E2-Behandlung in männlichen hCF:

Eine E2-Behandlung der männlichen hCF für 6h führte zu keiner Veränderung der relativen Menge an *POSTN* mRNA gegenüber der Kontrollgruppe (Abbildung 6). Die 12-stündige E2-Applikation induzierte einen signifikanten 1,5-fachen Anstieg der relativen *POSTN* mRNA Level im Vergleich zur Kontrolle. Nach 24h konnte zwischen den beiden Gruppen kein Unterschied mehr in der Genexpression für *POSTN* mRNA ermittelt werden.

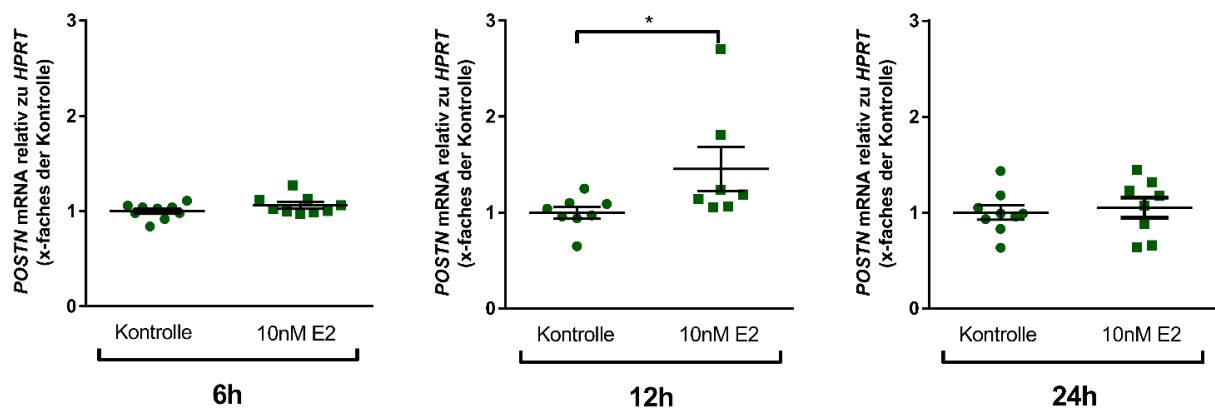


Abbildung 6: Relative *POSTN* mRNA-Menge in männlichen hCF nach E2-Behandlung.

Dargestellt ist das relative *POSTN* mRNA-Level in männlichen hCF nach 6h, 12h und 24h Behandlung mit 10nM E2 oder Vehikel-Kontrolle, normalisiert auf das Haushaltsgen *HPRT*. Das abgebildete Punktdiagramm repräsentiert den Mittelwert \pm SEM der Messwerte der unabhängig behandelten männlichen Individuen ($n=3$), jeweils in Dreifachbestimmung ausgeführt. (1 Individuum nur in Doppelbestimmung zu 12h sowie 1 weiteres für E2 zu 12h und 24h). Der errechnete Messwert für die Kontrolle wurde =1 gesetzt und die durch E2-Behandlung ermittelten Werte darauf bezogen. Mann-Whitney Test: $*p \leq 0.05$ in Bezug auf die Kontrolle.

In der Zusammenschau ergibt sich durch die E2-Behandlung der hCF eine geschlechtsspezifische Regulation nach 12h und 24h: E2 induzierte einerseits eine signifikante Abnahme der relativen *POSTN* mRNA in den weiblichen hCF nach 12h und 24h. Hingegen war eine statistisch signifikante Zunahme der Menge an transkribierter *POSTN* mRNA in den männlichen Fibroblasten nach 12h E2-Inkubation zu beobachten.

3.3.2 Regulation der *Periostin* mRNA-Transkription durch spezifische ER-Agonisten

In darauffolgenden Untersuchungen sollte differenzierter analysiert werden, wie E2 die geschlechtsspezifische *POSTN*-Transkription in männlichen und weiblichen hCF vermittelt. Da E2 seine Effekte hauptsächlich über den ER α und ER β vermittelt¹¹³, wurde analysiert *ob* und folglich *welcher* ER-Subtyp an dem hierfür verantwortlichen Mechanismus beteiligt ist. Hierfür erfolgte die 12-stündige Stimulation der hCF-Kultur beider Geschlechter ferner mit einem spezifischem ER α -Agonisten PPT oder dem ER β -Agonisten ERB. Anschließend wurden die Menge der *POSTN* mRNA infolge der PPT bzw. ERB-Behandlung via RT-qPCR quantifiziert, auf *HPRT* normalisiert und mit der EtOH-behandelten Kontrollgruppe verglichen (*Abbildung 7*).

Anmerkung: Der Vorab-Nachweis des Vorhandenseins beider ER auf Gen- und Proteinexpressionsebene erfolgte in Vorarbeit der Arbeitsgruppe und ist im unveröffentlichten Ergebnisteil der Dissertationsschrift von Frau Lisa Kramer verfasst (Institut für Geschlechterforschung in der Medizin, Charité Universitätsmedizin, mündliche Übermittlung Frau PD Dr. rer. medic. Elke Dworatzek). Mittels Western-Blot und RT-qPCR-Analysen konnte sowohl

der ER α als auch der ER β auf mRNA- als auch Proteinebene in den hCF beider Geschlechter nachgewiesen werden.

In weiblichen hCF führte die 12-stündige Behandlung mit PPT und ERB zu einer geringfügigen Senkung der *POSTN* mRNA-Level gegenüber der EtOH-Kontrolle, diese war in der einfachen Varianzanalyse jedoch nicht signifikant (*Abbildung 7A*). In männlichen hCF führte die Applikation von PPT bzw. ERB zu keinerlei Unterschieden in der Menge der *POSTN* mRNA-Expression in Bezug zur Kontrolle (*Abbildung 7B*). Die Ergebnisse aus der 12-stündigen Behandlung mit E2 in den weiblichen und männlichen hCF konnten durch die separate Behandlung der hCF mit dem ER α -Agonist PPT oder dem ER β -Agonist ERB allein nicht reproduziert werden.

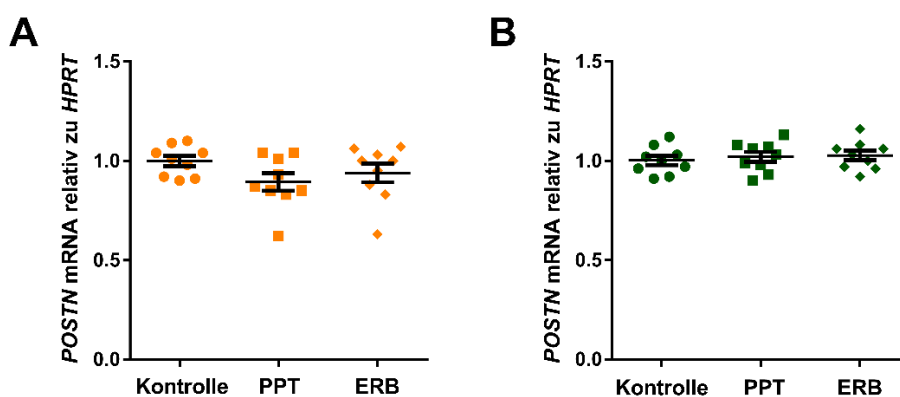


Abbildung 7A-B: Relative *POSTN* mRNA Level in hCF nach PPT- oder ERB-Behandlung. (A) Weibliche und (B) männliche hCF nach 12h-Behandlung mit 10nM EtOH = Kontrolle, 10nM PPT = ER α -Agonist oder 10nM ERB = ER β -Agonist. *POSTN* mRNA Expression dargestellt als x-fache Induktion zur EtOH-Kontrolle, normalisiert auf *HPRT*. Das abgebildete Punktdiagramm repräsentiert den Mittelwert \pm SEM der Messwerte der unabhängig behandelten männlichen Individuen (n=3), jeweils in Dreifachbestimmung ausgeführt. Ordinary One-Way ANOVA.

3.3.3 Effekte von 17 β -Östradiol auf das Periostin-Gesamtprotein in weiblichen und männlichen humanen kardialen Fibroblasten

Der Analyse der E2-abhängigen, geschlechtsspezifischen *POSTN*-Regulation im Transkriptom folgend, sollte ergründet werden, ob die hierbei ermittelten Geschlechterunterschiede nun auch auf Protein-Ebene in den hCF zu detektieren sind. Dazu erfolgte die Behandlung der hCF beider Geschlechter ebenfalls mit E2 bzw. der Vehikel-Kontrolle zu denselben Behandlungszeitpunkten (6h/ 12h/ 24h). Daran schlossen sich Zellernte, Zellyse und Denaturierung des Gesamtproteins vor der Durchführung der SDS-PAGE und Western-Blot Methode (siehe *Kapitel 2.2.3*). Im Immunoblot erfolgte die Detektion des Haushaltsproteins β -Tubulin im Sinne einer quantifizierbaren Ladekontrolle und die Detektion von *POSTN*. Die anschließenden densitometrisch, semiquantitativen Messungen der relativen *POSTN*-Proteinexpression gegenüber β -Tubulin in den weiblichen und männlichen hCF sind jeweils in *Abbildung 8* und

3.3.4 Einfluss von 17 β -Östradiol auf die geschlechtsspezifische Sekretion von Periostin-Protein seitens humaner kardialer Fibroblasten

Da die kardialen Fibroblasten POSTN ebenfalls als extrazelluläres Matrixprotein sezernieren⁵², erfolgte die Gewinnung von ZKÜ aus den hCF-Kulturen beider Geschlechter infolge der 6h/ 12h/ 24h- Behandlung mit E2 bzw. der Vehikel-Kontrolle. Die ZKÜ wurden für die anschließende Proteinquantifizierung mittels Immunoblots zu mehreren Zeitabschnitten gesammelt (siehe auch *Abbildung 1* und *Kapitel 2.2.1.6*):

- (i) 24h vor Beginn der eigentlichen Applikation von E2 bzw. Vehikel-Kontrolle, als sich das 2,5%ige Hungermedium bereits für 6h/ 12h/ 24h auf der hCF-Kultur befand
- (ii) Kollektivierung des eigentlichen Stimulationsmediums, welches mit E2 bzw. Vehikel-Kontrolle versetzt war, mit Ende der Behandlungsphasen (6h/ 12h / 24h); aus denselben Napfvertiefungen aus (i) abgenommen

Anschließend erfolgte die Western-Blot Analyse mittels Chemilumineszenz. Dabei wurde zum jeweiligen Zeitpunkt (6h/ 12h/ 24h) der aus E2- bzw. Vehikel-Behandlung entstammende Stimulationsmedium-Überstand gegen den Hungermedium-Überstand verglichen (siehe *Kapitel 2.2.3.6*) und die so ermittelte Fraktion exemplarisch in *Abbildung 10A* und *Abbildung 11A* dargestellt. Die Abbildungen der Ponceau-S-Färbung dienen als visuelle Ladekontrolle. Die Punktdiagramme (*Abbildung 10B*, *Abbildung 11B*) zeigen die relative POSTN Protein-Menge im Stimulationsmedium-Überstand, normiert auf die Menge von POSTN im „basalen“ Hungermedium-Überstand. Der errechnete Wert für den Vehikel-Kontrollansatz wurde für jeden Zeitpunkt unabhängig gleich Eins gesetzt und die Werte der E2-behandelten hCF darauf bezogen.

Die Regulation von sezerniertem POSTN Protein durch E2 in weiblichen hCF:

Wie in *Abbildung 10B* zu erkennen ist, bewirkte die 6-stündige Applikation von E2 tendenziell eine Senkung auf das 0,8-fache der sezernierten Menge an relativem POSTN Protein gegenüber der Kontrolle. Nach 12h zeigten sich keine Unterschiede zwischen der E2- und Vehikel-Kontrolle behandelten Gruppe. Die Applikation von E2 führte nach 24h zu einer im Mittel 1,2-fachen Zunahme an relativ sezerniertem POSTN Protein, wenngleich sich diese Differenz als nicht signifikant erwies (*Abbildung 10B*).

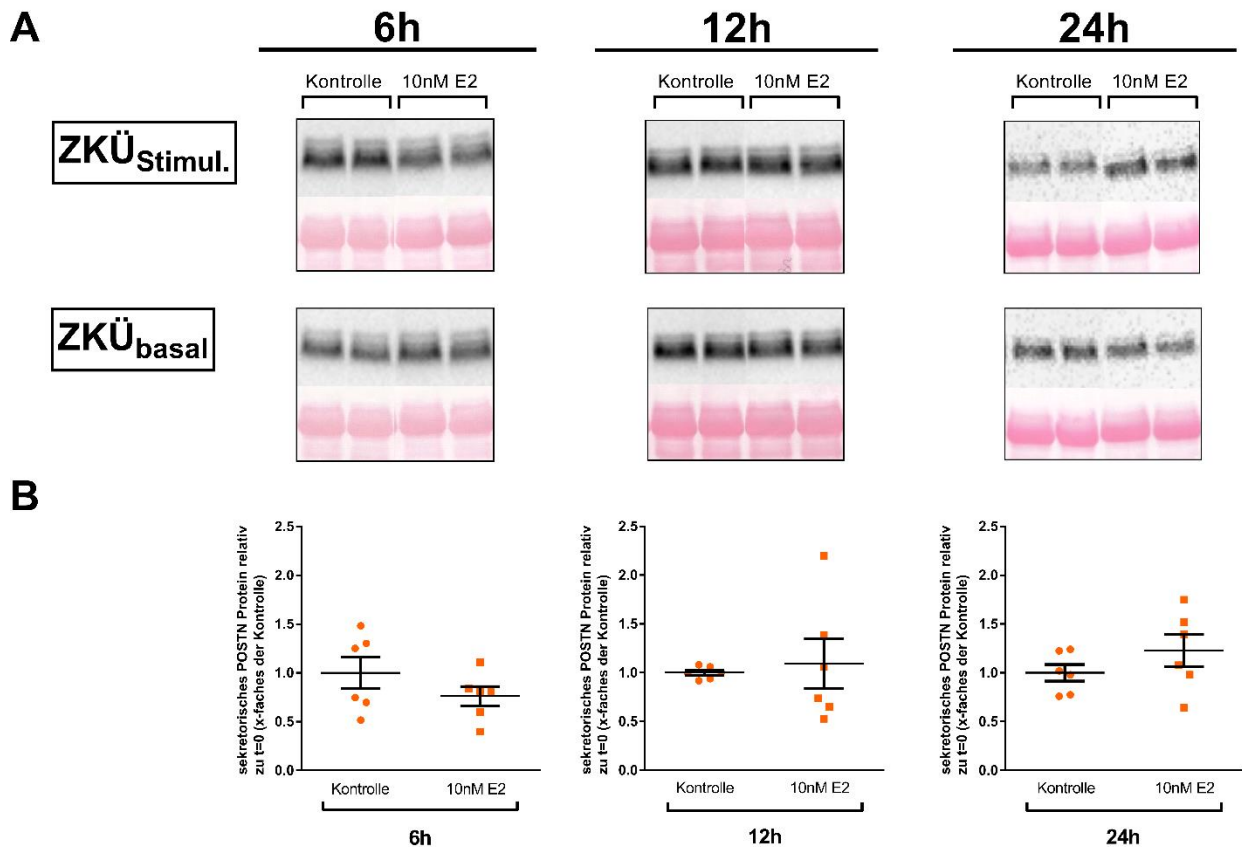


Abbildung 10: Densitometrische Analyse des relativen sezernierten POSTN Proteins im Zellkulturüberstand (ZKÜ) weiblicher hCF unter basalen Bedingungen und nach E2-Behandlung

(A) Repräsentative Western-Blot Analyse der POSTN- Expression im ECL-Nachweis in der oberen Reihe mit zugehöriger Ponceau-S-Färbung als visuelle Ladekontrolle in unterer Reihe. POSTN-Fraktion unter Stimulationsbedingungen mit E2 bzw. Vehikel-Kontrolle („ZKÜ_{stimul.}“) zu t=6h/ 12h/ 24h im Vergleich zu basalen Bedingungen im Hungermedium („ZKÜ_{basal}“) zu t=0h respektive. (B) Relatives POSTN Protein im ZKÜ nach 6h/ 12h/ 24h-Behandlung mit 10nM E2 oder Vehikel-Kontrolle. Punktdiagramm basierend auf Western-Blot Daten unter Berücksichtigung der relativen Intensitäten der POSTN-Proteinmenge im Stimulationsmedium-basierenden ZKÜ im Vergleich zum Hungermedium-basierenden ZKÜ (vor der Behandlung). Mittelwert ± SEM der densitometrisch ermittelten Messwerte der unabhängig behandelten weiblichen Individuen (n=3), jeweils in Doppelbestimmung ausgeführt.

Die Regulation von sezerniertem POSTN Protein durch E2 in männlichen hCF:

Während sich durch die 6-stündige E2-Applikation eine im Mittel 1,3-fache Menge an sezerniertem POSTN-Matrixprotein in den männlichen hCF ergab, konnte nach 12-stündiger E2-Behandlung eine Abnahme auf das 0,7-fache gegenüber der Kontrolle verzeichnet werden (Abbildung 11B). Diese Differenzen waren nicht signifikant. Nach 24h zeigten sich keine Unterschiede für extrazelluläres POSTN-Protein zwischen der E2- bzw. Vehikel-Kontrolle behandelten Gruppe männlicher hCF.

3.4 Effekte von Fibroblasten- Zellkulturüberstand auf die Aktivierung von hiPSC-CM

In diesem erweiterten Experiment sollte untersucht werden, ob geschlechtsspezifische Unterschiede in der Aktivierung von hiPSC-CM infolge einer Behandlung mit hCF-ZKÜ bestehen. Dazu erfolgte die 24-stündige Inkubation von weiblichen und männlichen hiPSC-CM mit hCF-ZKÜ, welcher den Individuen beider Geschlechter infolge der 6-stündigen E2- beziehungsweise Vehikel-Applikation entstammte (*siehe Kapitel 2.2.1.7*). Außerdem diente ein Ansatz von hiPSC-CM ohne Zugabe von ZKÜ als Nativ-Kontrolle. Anschließend wurde als Nachweis einer Aktivierung die mRNA von *MYH6*, *MYH7* als auch *NBBA* und *NBBP* als Hypertrophiemarker der CM mittels RT-qPCR quantifiziert. Dargestellt wurde die relative mRNA-Menge, normiert auf die mRNA-Menge von *HPRT*.

MYH6 und *MYH7* mRNA in hiPSC-CM nach Inkubation mit hCF-ZKÜ

Wie in *Abbildung 12A* zu erkennen ist, reduzierte sich die relative Menge an *MYH6* mRNA tendenziell in weiblichen hiPSC-CM durch die Applikation von E2- oder Vehikel-ZKÜ in Bezug auf die Nativ-Kontrolle, und zwar unabhängig vom geschlechtlichen Ursprung der originären hCF-Kultur. In den männlichen hiPSC-CM hatte die ZKÜ-Applikation keinen Einfluss auf die *MYH6* mRNA Level gegenüber der Kontrolle (*Abbildung 12B*). Vergleichbar zu *MYH6*, ergab sich durch die Applikation von ZKÜ eine diskret verminderte Menge an *MYH7* mRNA in den weiblichen hiPSC-CM im Vergleich zur Kontrolle (*Abbildung 12C*). Insbesondere in den weiblichen hiPSC-CM ergaben sich nach Behandlung mit männlichen, E2-basierenden ZKÜ niedrigere Level an *MYH7* als in den weiblichen, E2-originären ZKÜ. In den männlichen hiPSC-CM kam es ebenfalls zu einer niedrigeren Genexpression für *MYH7* in allgemeiner Anwesenheit von ZKÜ (*Abbildung 12D*). In Kontrast zu den weiblichen hiPSC-CM ergab die Applikation von männlichem, E2-abkömmligen ZKÜ gegenüber der Vehikel-Kontrolle hier höhere *MYH7* mRNA-Level.

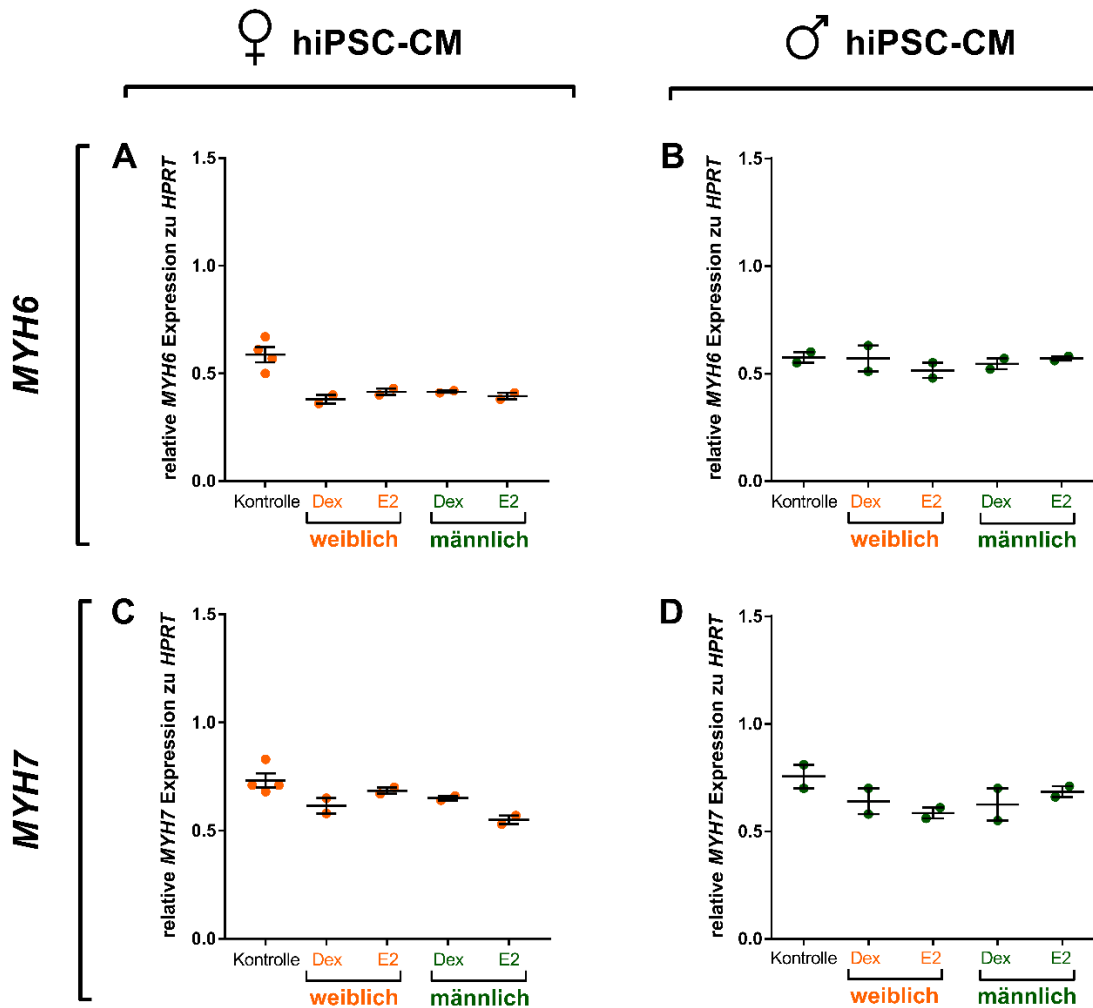


Abbildung 12A-D: Relative MYH6 und MYH7 mRNA in weiblichen (♀) und männlichen (♂) hiPSC-CM nach Behandlung mit hCF-ZKÜ.

Gezeigt sind (A) relative MYH6 mRNA in weiblichen hiPSC-CM und (B) männlichen hiPSC-CM sowie (C) relative MYH7 mRNA in weiblichen hiPSC-CM und (D) männlichen hiPSC-CM. Normalisierung auf Haushaltsgen HPRT. Kontrolle \triangleq hiPSC-CM bei belassenem Nativmedium ohne ZKÜ. hCF-abgeleitete ZKÜ entstammten Stimulationsbedingungen mit 10nM E2 oder Vehikel-Kontrolle. Das abgebildete Punktdiagramm repräsentiert den Mittelwert \pm SEM der Messwerte für jeweils 1 weibliches (orange, A/C) und 1 männliches (grün, B/D) Individuum, jeweils in Doppelbestimmung ausgeführt. Ausnahme: weibliche Kontrolle in Vierfachbestimmung. Keine statistische Testung.

NPPA und NPPB mRNA in hiPSC-CM nach Inkubation mit hCF-ZKÜ

Des Weiteren führte die Applikation von ZKÜ zu einem allgemein höheren Niveau an NPPA mRNA in den weiblichen hiPSC-CM gegenüber der nativ belassenen Kontrolle (Abbildung 13A). Dieses Niveau war durch Behandlung mit männlichem, E2-basiertem ZKÜ tendenziell am geringsten ausgeprägt. Auch in den männlichen hiPSC-CM evozierte die Zugabe von ZKÜ deutlich gesteigerte Level an NPPA mRNA im Vergleich zur Nativkontrolle (Abbildung 13B). Insbesondere männlicher, E2-basierter ZKÜ führte zum höchsten Transkriptionsniveau von NPPA. Vergleichbar zu NPPA führte die Applikation von hCF-ZKÜ zu einer allgemein höheren

Genexpression der *NPPB* mRNA in den hiPSC-CM des weiblichen Individuums im Vergleich zur Nativkontrolle (*Abbildung 13C*). Die Transkription von *NPPB* war in der CM-Subgruppe, die mit abgeleitetem ZKÜ aus originär männlichen hCF behandelt wurde, niedriger gegenüber der CM-Subgruppe, die mit originär weiblich abgeleitetem ZKÜ inkubiert wurde. Analog zu *NPPA* zeigten sich nach Zugabe von männlichem, E2-basiertem ZKÜ die niedrigsten *NPPB*-Level. Abermals in männlichen hiPSC-CM ergab die alleinige Zugabe von ZKÜ analog gesteigerte *NPPB* mRNA Level (*Abbildung 13D*). Vergleichbar zu *NPPA* fand sich durch originär männlichen, E2-basierten ZKÜ die höchste Transkription an *NPPB* mRNA, die - wenngleich weniger ausgeprägt - auch durch originär weiblichen, E2-basierten ZKÜ hervorgerufen wurde.

Diese vorläufigen Ergebnisse erheben zunächst den Anspruch einer orientierenden Grundlage für folgende Versuchsausweitungen.

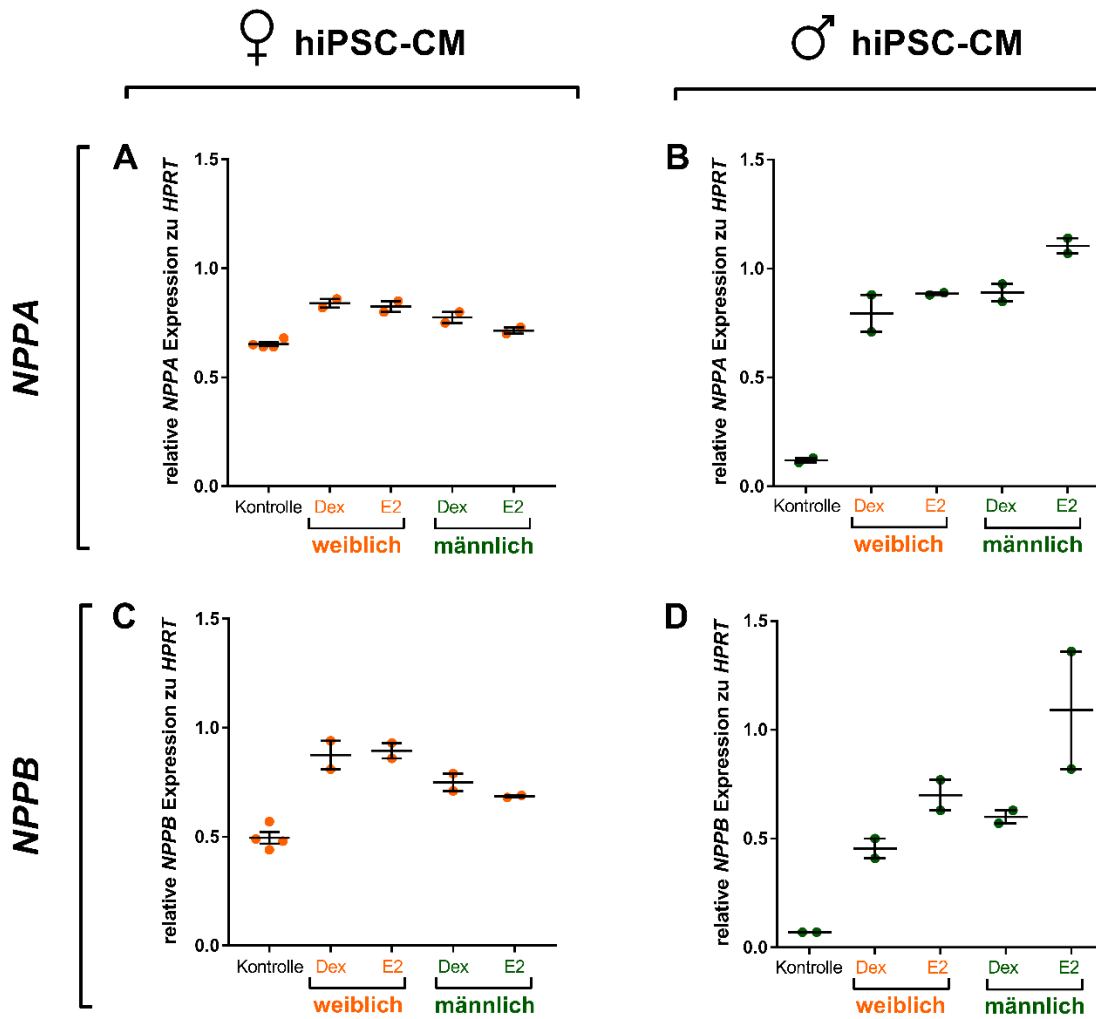


Abbildung 13A-D: Relative NPPA und NPPB mRNA in weiblichen (♀) und männlichen (♂) hiPSC-CM nach Behandlung mit hCF-ZKÜ.

Gezeigt sind (A) relative NPPA mRNA in weiblichen hiPSC-CM und (B) männlichen hiPSC-CM sowie (C) relative NPPB mRNA in weiblichen hiPSC-CM und (D) männlichen hiPSC-CM. Normalisierung auf Haushaltsgen HPRT. Kontrolle \cong hiPSC-CM bei belassenem Nativmedium ohne ZKÜ. hCF-abgeleitete ZKÜ entstammten Stimulationsbedingungen mit 10nM E2 oder Vehikel-Kontrolle. Das abgebildete Punktdiagramm repräsentiert den Mittelwert \pm SEM der Messwerte für jeweils 1 weibliches (orange, A/C) und 1 männliches (grün, B/D) Individuum, jeweils in Doppelbestimmung ausgeführt. Ausnahme: weibliche Kontrolle in Vierfachbestimmung. Keine statistische Testung.

4 Diskussion

4.1 Bedeutsamkeit des gewählten Fibroblastenkultur-Modells

Zur Versuchsdurchführung wurden ventrikuläre hCF von jeweils drei weiblichen und drei männlichen gesunden Individuen bezogen (siehe *Tabelle 4*). Fibroblastenkulturen gelten als gut etabliertes *in-vitro* Modell.¹¹⁴ Es besteht durch kontrollierbare, gleichbleibende Untersuchungsbedingungen und wahrt dabei die biologische interindividuelle Diversität der einzelnen Spender*innen. Wenngleich systemisch bestehende Konditionen nur bedingt nachgeahmt werden können, ist das Wachstum der Fibroblasten abseits eines myokardialen Zellverbandes auch zum Vorteil: Die Zellkultur ermöglicht eine zunächst differenzierte, gesonderte Betrachtung von Regulationsmechanismen in hCF allein, während interzelluläre, unbekannte Variablen die zwischen hCF und den sie umgebenden Zellen (wie unter anderem CM, Endothelzellen, Immunzellen²⁰) bestehen können, unter Vorbehalt bleiben.

Durch die kontinuierliche lichtmikroskopische Begutachtung der hCF-Kulturen während der Versuche, wurde die Morphologie der Zellen durchgehend überwacht. Vorbeschriebene Veränderungen konnte beobachtet werden (*Abbildung 3*): Die Morphologie der hCF stellte sich hauptsächlich in der typisch langgestreckten Form mit schmalen Zytoplasmaausläufern dar.^{22, 111} Mitunter stellten sich vereinzelt Phänotypen mit einem breiten, rau begrenzten Zellkörper und reichlich granulärem Zytoplasma dar (*Kapitel 3.1*). Diese Befunde deuten auf eine teilweise Aktivierung der hCF zu einer Myofibroblasten-Konfiguration hin.^{22, 111} Dies scheint wenig überraschend, als dass für dehnungssensible und in Kulturschalen gezüchtete CF über die Dauer der Kultivierung eine entsprechende Differenzierung bekannt ist.^{10, 115} Zudem beschreiben *Camelliti et al.* in ihrer Übersichtsarbeit eine generelle Induktion von EZM-Genen für die in Kultur befindlichen mechanosensitiven hCF.²² Daher ist für die in dieser Arbeit untersuchten hCF-Populationen eine gewisse Aktivierung anzunehmen. Diese ist für den Versuchsaufbau zur Analysierung speziell *pathophysiologischer* Mechanismen einer kardialen Fibroseregulierung bezüglich der Übertragbarkeit als vorteilig zu bewerten.

Das in dieser Arbeit untersuchte Spender*innenkollektiv unterschied sich, als dass das Alter der Männer jenes der Frauen um im Mittel 14 Jahre überstieg. Auch die übermittelten Zellteilungsraten waren in Männern gemittelt langsamer. Somit könnte auch angenommen werden, dass die unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten und Zellzahlen einen Einfluss auf die Ergebnisse der zu untersuchenden POSTN-Expression haben. Diese Annahme kann mittels durchgeführter Proliferationsanalysen durch *Dworatzek et al.* entkräftet werden, denn auch hier hatte eine schnellere Zellteilungsrate in weibliche Fibroblasten keinen Einfluss auf die nachfolgende Expression des Zielmoleküls; dies war dazu unabhängig von einer E2-Applikation.¹⁰³

Zudem gelten CF als hormonsensibel²² und es wird uneinheitlich berichtet, dass E2 die Differenzierung und somit die Morphologie von CF beeinflussen kann:^{98, 116-119} Die Behandlung der in dieser Arbeit untersuchten hCF mit E2 oder seiner Vehikel-Kontrolle (Dex) schien in unseren Versuchen mittels lichtmikroskopischer Erfassung keinen eindrücklichen Einfluss auf die Zellmorphologie zu haben oder gar den Anteil myofibroblastärer Konfigurationen zu beeinflussen (siehe *Abbildung 3*). Diese Ergebnisse zeigen sich im Einklang zu Befunden in rCF, in denen die Behandlung derselben E2-Konzentration (10nM) keine Veränderung des Myofibroblasten-Anteils gegenüber E2-naiven rCF hervorbrachte.⁹⁸ Der Einfluss von E2 auf die Proliferation von CF wird in der Literatur kontrovers dargestellt, hierbei konnten entweder keinerlei^{115, 117}, inhibierende¹¹⁶ oder gar steigernde¹¹⁸ Effekte von E2 auf die CF-Proliferation von Ratten beschrieben werden. Zum Beispiel zeigten Proliferationsassays von *Mercier et al.* und *Grohé et al.*, dass zumindest niedrigere physiologische E2-Konzentrationen zwischen 1-100nM das Wachstum von rCF beider Geschlechter nicht beeinflussten.^{117, 119} Hingegen berichten *Dubey et al.* über ein E2-vermitteltes, moderat vermindertes Zellwachstum von weiblichen rCF, das erst nach mindestens doppelt so langer Behandlungszeit ab 48h einsetzte.¹¹⁶ Im Kontrast dazu stehen Befunde von *Lee et al.*, welche in Proliferationsassays mit weiblichen rCF einen auf 12h zeitbegrenzten, proliferationssteigernden Effekt durch E2 verzeichneten, welcher über längere Zeiträumen (ab 48h) jedoch nicht fortbestand.¹¹⁸

Unsere lichtmikroskopischen Einschätzungen konnten keinen pro- oder antiproliferativen Einfluss infolge einer Applikation von E2 auf die hCF beider Geschlechter feststellen. Daher kann angenommen werden, dass kein nennenswerter Einfluss von E2 zu den von uns genutzten Konzentrationen auf die Proliferation von hCF besteht; dies steht auch im Einklang mit vorangegangenen Untersuchungen, die ebenfalls keinen E2-Effekt auf die Proliferation von männlichen oder weiblichen CF fanden. Divergierende, durch E2-vermittelte Zellwachstumsbeschränkungen oder -proliferationsreize waren in anderen Untersuchungen zudem stark zeitlich begrenzt, auch sind Ergebnisse in CF neonataler Ratten nur bedingt auf die von uns analysierten hCF übertragbar.

4.2 Die Analyse der basalen *Periostin*-Expression in kultivierten humanen kardialen Fibroblasten

Vorab einer anstehenden Behandlung mit E2 konnten in allen untersuchten hCF weiblicher und männlicher Individuen basale POSTN-Transkriptions- und Proteinprodukte nachgewiesen werden (*Abbildung 4*). Der erlangte Befund ist im Einklang zur Literatur, die zeigt, dass POSTN stark und spezifisch in CF exprimiert wird.^{28, 52, 120-122} Gesichert durch unveröffentlichte

Expressionsanalysen seitens Frau Prof. Dr. Susanne Lutz (externe Kommunikation; Universitätsmedizin Göttingen, Institut für Pharmakologie und Toxikologie) ist zunächst, dass sich *POSTN* mRNA in einem hohen Maß vor allem in CF nachweisen lässt (gegenüber seiner minimalen Expression in dermalen Fibroblasten oder embryonalen Stammzell-abgeleiteten CM). Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die grundlegenden Raten an *POSTN* mRNA und -Gesamtprotein geschlechtsspezifisch ausgeprägt sind: Gegenüber Männern exprimieren weibliche, in Kultur gebrachte hCF tendenziell niedrigere *POSTN*-Level (*Abbildung 4A-B*). Die oben vorerwähnten veröffentlichten Daten zur *POSTN*-Expression in CF führen jedoch keine Ergebnisse zu Geschlechterunterschieden in der basalen Expressionsrate an.

Überblickend können die eher geringeren *POSTN*-mRNA Level in den hCF weiblicher Individuen eine niedrigere biologische Grundaktivität in Frauen implizieren. Für den erstmals durch uns gezeigten Umstand der tendenziell geschlechtsspezifischen basalen *POSTN* Expressierung in hCF gibt es bis dato keine eindeutige Erklärung, sodass mögliche Gründe spekulativ bleiben.

4.3 Geschlechtsspezifische Regulation der Periostin-Transkription in humanen kardialen Fibroblasten durch 17 β -Östradiol

Die Applikation von E2 resultierte in unserem hCF-Kulturmodell in einer geschlechtsspezifischen mRNA-Expression von *POSTN*: In weiblichen Fibroblasten wurde die Transkription der *POSTN*-mRNA durch eine 12- oder 24-stündige Behandlung mit E2 signifikant inhibiert (*Abbildung 5*). Hingegen präsentierte sich in männlichen hCF nach 12h-Inkubation mit E2 ein signifikanter Anstieg von *POSTN*-Transkripten (*Abbildung 6*).

Bislang existieren nur zwei veröffentlichte Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation von *POSTN* durch E2.^{104, 105} Erstmals wurde durch *Mamalis et al.* ein Zusammenhang zwischen E2 und *POSTN* in humanen parodontalen Ligamentzellen beschrieben: In ebenjenen fibroblastenartigen Zellen gesunder, junger Frauen und Männer konnte durch E2 ein Anstieg der *POSTN*-mRNA Expression nach 48h und 72h verzeichnet werden.¹⁰⁴ Über eine E2-abhängige, geschlechts-spezifische Regulation, wie sie in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde, berichten die Autor*innen im Gegensatz zu unseren Befunden nicht.¹⁰⁴ Auch eine erst kürzlich veröffentlichte Arbeit von *Li et al.* zur postmenopausalen Osteoporose zeigte die E2-abhängige Induktion von *POSTN*-Transkripten in Knochenmark-abgeleiteten, mesenchymalen Stammzellen von weiblichen Ratten. Die *in-vitro* Substitution von E2 für 48h in zuvor isolierten, hormonabladierten mesenchymalen Stammzellen aus Ratten nach OVX konnte das ursprüngliche *POSTN*-Transkriptionsniveau ovar-intakter Tiere wieder abbilden.¹⁰⁵

Unsere Befunde einer E2-vermittelten Induktion von *POSTN* stehen folglich nicht in Widerspruch zu anderen Forschungsarbeiten, die ebenfalls erhöhte *POSTN*-Transkripte durch E2 beschreiben. Jedoch lässt sich keine geschlechtsspezifische Ausprägung durch E2 auf *POSTN* aus diesen Untersuchungen ableiten, da diese entweder nicht nachgewiesen werden konnten oder überhaupt in ihre Untersuchungen miteinbezogen wurden. Dies könnte auf den zellspezifischen Regulationsmechanismus von E2 zurückzuführen sein.⁷⁹ Bei den in den zwei erwähnten Arbeiten^{104, 105} analysierten Zelltypen handelt es sich in beiden Fällen nicht um Fibroblasten, sondern um parodontale Ligamentzellen, die sowohl fibroblastische als auch osteogene Zellursprünge aufweisen¹⁰⁴ und um Knochenmarksstammzellen mesenchymalen Ursprungs¹⁰⁵. So wäre demnach auch zu spekulieren, dass die positive Korrelation zwischen E2 und *POSTN*-mRNA folglich zelltypübergreifend in männlichen Zellen besteht. Die Reprimierung von *POSTN*-Transkripten durch E2 scheint lediglich weiblichen hCF zuschreibbar.

Dass E2 Herzfibrose-assoziierte Gene in isolierten CF aus Ratte und Mensch in einer geschlechtsspezifischen Weise reguliert, konnte darüber hinaus in bereits veröffentlichten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden.^{69, 103, 123} So zeigte zum Beispiel die Arbeit von *Queiros et al.* wie E2 die Expression Fibrose-assoziiierter mikro-RNA- (miRNA) Profile geschlechtsabhängig in isolierten rCF regulierte.¹²³ In Analogie zu der in dieser Arbeit gezeigten E2-vermittelten, geschlechtsspezifischen Regulation der *POSTN*-mRNA, vermochte E2 die Kollagen I und III-Genexpression speziesübergreifend in männlichen humanen und Ratten-Fibroblasten zu verstärken, jedoch wurde sie in weiblichen Zellen durch E2 vermindert.^{69, 103} Weiterhin konnte von *Dworatzek et al.* gezeigt werden, dass eine geschlechtsdimorphe, E2-vermittelte Aktivierung der ER in den CF für die Geschlechterunterschiede in der E2-abhängigen Kollagen I und III-Regulation verantwortlich ist.¹⁰³ In dieser Arbeit gelang es nachzuweisen, dass ER α -Agonisten, jedoch nicht ER β -Agonisten eine Kollagenreprimierung in weiblichen rCF induzierten. Dagegen rief die Applikation mit ER β -Agonisten, jedoch nicht ER α -Agonisten, eine Induktion von Kollagen I und III in männlichen Fibroblasten hervor. Schlussfolgernd wurden dem ER α kollagenreprimierende Eigenschaften in weiblichen rCF und dem ER β kollageninduzierende Eigenschaften in männlichen rCF zugeschrieben. Die Ergebnisse wurden durch eine nachgewiesene geschlechtsdimorphe, nukleäre Bindung beider ER an estrogenresponsive Elemente des Kollagenpromotors untermauert.¹⁰³

Bezugnehmend auf diese Ergebnisse wurde im Rahmen dieser Arbeit über einen ähnlichen zugrundeliegenden Mechanismus für die geschlechtsdimorphe *POSTN*-Regulation spekuliert. Um zu ermitteln, ob E2 seine geschlechtsspezifischen, regulatorischen Effekte auf die *POSTN* mRNA in den hCF über eine geschlechtsdimorphe Aktivierung der Rezeptoren ER α oder ER β vermittelt, wurde eine Behandlung der Zellen mit entweder einem spezifischen ER α -Agonist PPT

oder ER β -Agonist ERB durchgeführt. Anschließend wurde das Transkriptionslevel von *POSTN* re-evaluiert. Es zeigte sich, dass die separate Applikation des ER α - oder ER β -Agonisten weder in weiblichen noch in männlichen hCF das Ergebnis der E2-vermittelten Inhibition der *POSTN*-mRNA nicht wieder abbilden konnte (*Abbildung 7*). Grundsätzlich ist die Voraussetzung für eine ER α - oder ER β -vermittelte Regulation in den von uns analysierten hCF gegeben; Hierbei sei nochmals erwähnt, dass beide ER in den hCF der weiblichen und männlichen Individuen nachweislich auf mRNA- und Protein-Ebene vorhanden sind (siehe Anmerkung *Kapitel 3.3.2*, unveröffentlichte Dissertation Frau Lisa Kramer, Institut für Geschlechterforschung in der Medizin, Charité Universitätsmedizin, mündliche Übermittlung Frau PD Dr. rer. medic. Elke Dworatzek).

Der Grund der nicht nachzubildenden E2-vermittelten, geschlechtsspezifischen *POSTN* mRNA-Regulation in den hCF durch nunmehr Verwendung von ER-Agonisten könnte auf mehrere Ursachen zurückzuführen sein. Eine Möglichkeit liegt in der Komplexität, in der E2 und die durch E2-aktivierten ER ihre zelluläre Wirkung über verschiedene Signalwege vermitteln können.⁹⁹ Voraussetzung hierfür ist es, dass es nach der E2-vermittelten Aktivierung der Steroidhormonrezeptoren ER α oder ER β zu einer Transformation der Rezeptor-Bindungsdomänen und zur anschließenden Rezeptordimerisierung kommt.^{124 113} Hierbei ist es besonders hervorzuheben, dass es dabei zur Kombination verschiedener Dimerkomplexe (ER α /ER α , ER β /ER β , ER α /ER β) kommen kann, über die E2 seine spezifischen Effekte zu vervielfachen vermag.¹¹³ Die Entstehung verschiedener ER-Dimerkomplexe kann auf eine selektive Aktivierung einer der beiden ER-Subtypen zurückzuführen sein. So zeigen *Powell et al.* dass es nach einer selektiven Aktivierung des ER α zur Bildung eines ER α -Homodimers oder eines ER-Heterodimers kommen kann.¹²⁵ Im Gegensatz führt eine alleinige Aktivierung der ER β zu einer ER β -Homodimer-Bildung.¹²⁵ Auch *Paulmurugan et al.* konnten in transfizierten ER α - und ER β -koexprimierenden Nierenkarzinom-Zellen für die Applikation subtypeselektiver ER α -Agonisten ebenfalls eine Bildung von ER α -Homodimeren und ER-Heterodimeren zeigen.¹²⁶ Die selektive Aktivierung des ER β trug in einem schwächeren Maß zur Bildung von ER β -Homodimeren oder ER-Heterodimeren bei.¹²⁶

Daher kann für die in dieser Arbeit beobachtete geschlechtsspezifische Regulation der *POSTN* mRNA die These in Betracht gezogen werden, dass E2 seine Effekte über die Bindung an *beide* ER im Heterodimerkomplex (ER α /ER β) vermittelt. Ein Versuch, in dem beide ER-Agonisten in Kombination appliziert werden, könnte Aufschluss darüber geben. Ergänzend sollte als Alternativhypothese geprüft werden, ob die beiden ER überhaupt an dem E2-vermittelten Effekt beteiligt sind. Dafür eignen sich beispielsweise Versuche mit dem ER-Antagonisten ICI 182,780 (auch: *Fulvestrant*).¹²⁷ Eine ausbleibende Regulation der *POSTN*-mRNA in den weiblichen und

männlichen hCF infolge der Behandlung mit ICI 182,780 würde im Umkehrschluss die Beteiligung beider ER an der E2-vermittelten *POSTN*-Regulation eindeutig nachweisen.

Für den Umstand, dass die separate Applikation der ER α - oder ER β -Agonisten die nach E2-Behandlung vermittelte *POSTN*-mRNA-Inhibition nicht reproduzieren konnte, gibt es eine weitere mögliche Erklärung: Es lässt die Anwesenheit komplementärer Faktoren mutmaßen, die diesen E2-abhängigen Effekt modulieren könnten. Von der Plasmamembran ausgehend kann E2 neben einer Bindung an die ER auch an membranäre Rezeptorproteine wie G-Protein-gekoppelte Östrogenrezeptoren (GPER; GPR) oder an Ionenkanäle binden, sowie als zytosolischer E2/ER-Komplex Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Wege (MAPK) beeinflussen.¹¹³ Über all diese zytosolischen Pfade beschreitet E2 damit nicht-genomische Signalwege und vermittelt rasche, das heißt sekunden-bis minutenabhängige, Steroidwirkungen.¹¹³ Dies lässt die Alternativhypothese für unsere Daten zu, dass E2 die *POSTN*-Transkription potenziell unabhängig von ER über schnelle, non-genomische Signalwege reguliert. Bisher existieren keine Veröffentlichungen, welche die Beeinflussung E2-ER-unabhängiger, alternativer Signalwege speziell zur Regulation des *POSTN*-Gens in Fibroblasten behandeln. Um zu klären, ob die zuvor genannten alternativen E2-Signalwege an der E2-abhängigen *POSTN*-mRNA Regulation beteiligt sind, eignen sich beispielsweise Versuche mit anderen spezifischen Agonisten oder Antagonisten, wie sie schon für den E2-ligandären, membrangebundenen GPR-30¹²⁸ in Bezug auf andere Herzfibrose-assoziierte Gene existieren. So konnte durch *Wang et al.* nicht nur eine Expressierung des GPR-30 in männlichen rCF gezeigt werden, sondern auch eine durch den spezifischen GPR-30-Agonisten vermittelte Reprimierung von Kollagenen oder Aktivierung von MMP.¹²⁹ Im Rahmen zuvor genannter, ergänzender Versuche mit dem ER-Antagonisten ICI 182,780 ist zudem zu beachten, dass für diesen zelltypübergreifend auch eine sekundäre, agonistische Wirkung am GPR30 bekannt ist.¹³⁰ Sollte es unter dessen Verwendung nicht zu der erwarteten Aufhebung der *POSTN*-Regulation kommen, so könnte dies ein Hinweis für eine agonistische Wirkung des GPR-30 sein, die entsprechend offenbart wird.

Es bietet sich eine weitere Möglichkeit um den Beitrag der spezifischen ER-Subtypen an der geschlechtsspezifischen *POSTN*-mRNA Regulation in hCF zu prüfen: Experimente mit RNA-interferierenden Molekülen können durch den subsequenten Ausfall einer Genantwort offenlegen, ob ein ER die observierte Gentranskription auch tatsächlich vermittelt.¹³¹ So nutzten *Mamalis et al.* eben diese Methode um zu zeigen, dass in parodontalen Ligamentzellen die unter *Kapitel 4.2* diskutierte Induktion der E2-responsiven *POSTN*-Genexpression dem ER β zuordnen ist. Den Negativ-Nachweis erbrachten sie über Transfektion von kleinen ER β -interferierenden RNA-Molekülen (*small interfering RNA*), die den Abbau der ER β -mRNA hervorrufen (und die subsequente *POSTN*-Antwort ausfallen ließen).¹⁰⁴ Diese Methode bietet durch induzierten Ausfall

der ER-Genexpression (Stummschaltung) gewiss eine exaktere Variante zum Nachweis seiner molekularen Funktion, sie ist aber auch in ihrer Durchführung komplexer und aufwendiger als die von uns gewählte Methode.

Sollte sich durch solche Experimente herausbilden, dass eine Beteiligung beider ER im Heterodimer-Komplex an der E2-vermittelten *POSTN*-Regulation beteiligt sind, bieten sich weiterführend sogenannte Chromatin-Immunopräzipitations- (ChIP) Analysen an. Diese können DNA-Protein-Interaktionen offenbaren und Proteine identifizieren, die an bestimmte Genregionen infolge einer Behandlung der hCF mit E2 assoziiert sind.^{132, 133} Zusätzlich zum Bestehen einer ER-Bindung an nicht-codierende *POSTN*-Promotor-Abschnitte spielen solche DNA-gebundenen Proteine als Kofaktoren eine wichtige Rolle in der Expression oder Reprimierung der Transkription.¹³⁴ Eine unterschiedliche Zusammensetzung an intrazellulären Kofaktoren in männlichen oder weiblichen hCF könnte die geschlechtsspezifische, E2-induzierte Regulation unabhängig von einer geschlechtsgleichen Bindung der ER an den Promotor von *POSTN* erklären. Eine ungleiche Expression von Kofaktoren zwischen den Geschlechtern konnte in der Hypophyse männlicher und weiblicher Ratten beschrieben werden.¹³⁵

Die Hypothese, dass die geschlechtsdimorphe, E2-abhängige *POSTN*- Transkription durch eine geschlechtsspezifische Aktivierung der ER vermittelt wird, ließ sich nicht eindeutig bestätigen. Insgesamt bedarf es weiterer Versuche mit ER-Antagonisten oder eine gleichzeitige Applikation von ER α - und ER β -Agonisten in Kombination, um die Fragestellung, ob E2 eine *POSTN*-Regulation durch beide ER vermittelt, abschließend beantworten zu können. Außerdem könnte zur effizienten ER-Genausschaltung die Durchführung von RNA-Interferenz-Techniken begutachtet werden. Darüber hinaus ist auch die Möglichkeit des Beitrags von GPER-30 in E2-vermittelten Signalwegen in Betracht zu ziehen.

4.4 17 β -Östradiol induziert Periostin-Gesamtprotein in humanen kardialen Fibroblasten

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen nach einer 6-stündigen E2-Behandlung eine signifikant gesteigerte Expression von *POSTN*-Gesamtprotein in weiblichen und männlichen hCF (*Abbildung 8 und Abbildung 9*). Diese Ergebnisse der *POSTN*-Gesamtproteinregulation korrelieren nicht mit den Ergebnissen der ausbleibenden *POSTN* mRNA-Regulation nach 6h E2-Behandlung (siehe *Abbildung 5 und Abbildung 6*). Über eine vorangehende Regulation auf mRNA-Niveau zu einem früheren Zeitpunkt ist nur zu spekulieren. Es existieren Arbeiten von *Ben-Ari et al.* die orientierend und methodenabhängig zeigen, dass eine mRNA-Regulation innerhalb von 1-3 Stunden stattfindet und eine nachfolgende Proteinexpression je nach

vorbestehendem Bestand intrazellulärer mRNA-Reservoirs ab 20-30 Minuten bis 2-3h erfolgt.¹³⁶ Daher müssten Kurzzeit-E2-Behandlungen zu 30 Minuten oder 1h-3h Zeiträumen durchgeführt werden, sowie eine POSTN mRNA und POSTN-Proteinregulation in gleicher Weise rekapituliert werden.

Weiterhin ist zu erwähnen, dass obgleich *POSTN* auf Genexpressionsebene nach 12-stündiger Behandlung mit E2 unterschiedlich in hCF von Männern und Frauen reguliert ist (*Abbildung 5, Abbildung 6*), eine geschlechtsdimorphe *POSTN*-Regulierung nun auf Translationsebene nicht eindeutig fortzubestehen scheint. Nach einer 24-stündigen E2-Inkubation replizierten sich in der *POSTN*-Gesamtproteinregulation beider Geschlechter die Ergebnisse der *POSTN*-mRNA-Regulation aus der vorangegangenen 12-stündigen E2-Behandlung: Ein niedrigeres Level an *POSTN*-mRNA nach 12h E2-Behandlung folgte einem im Trend reprimiertem *POSTN*-Gesamtprotein nach 24h E2-Behandlung in weiblichen hCF. Gleichmaßen war in männlichen hCF eine höhere *POSTN* mRNA Expression nach 12h E2-Applikation von einem höheren *POSTN*-Gesamtproteinniveau nach 24h E2-Behandlung gefolgt. Gleichzeitig offenbarte sich die Abwesenheit von Geschlechterunterschieden in der *POSTN*-mRNA-Menge nach 24h E2-Inkubation und in der *POSTN*-Gesamtproteinregulation nach 12h E2-Inkubation. Diese Befunde lassen die Vermutung folgen, dass eine Fortsetzung der *POSTN* mRNA- und Gesamtproteinregulation in reprimierter Weise in hCF von Frauen fortläuft und sich als positive Regulation in männlichen hCF fortsetzt. Ob sich zeitversetzt abzeichnende, geschlechtsdimorphe *POSTN*-Gesamtproteinlevel infolge der E2-Behandlung weiter manifestieren, muss durch weitere Versuche mit einer E2-Behandlung der hCF für einen längeren Zeitraum (48h, 72h) analysiert werden.

Unterschiedliche Mengen an *POSTN* konnten auch in Patient*innen mit einer AS durch *Petrov et al.* sowie *Kararigas et al.* gezeigt werden: Gegenüber gesunden Kontrollen ist das *POSTN*-Gesamtprotein in linksventrikulären Biopsieproben beider Geschlechter signifikant erhöht. Zudem zeigte sich die *POSTN* mRNA-Menge und das *POSTN*-/ α -Tubulin- Proteinniveau in Männern signifikant höher exprimiert als in Frauen. Diese Befunde waren auch mit einer stärker ausgeprägten Myokardfibrose in Männern gegenüber Frauen assoziiert.^{68, 78} Sollte sich die gezeigte Regulation von *POSTN* durch E2 in unserer Arbeit durch weitere Analysen bestätigen, als dass *POSTN* im Verlaufstrend negativ in Frauen und weiter positiv in männlichen Fibroblasten reguliert scheint, könnten diese Ergebnisse auch eine Erklärung für die beobachteten geschlechtsdimorphen Unterschiede in der Fibroseentwicklung liefern. Dafür würden jedoch auch weitere Untersuchungen in beispielsweise Tiermodellen nötig werden.

Dass *POSTN*-Protein auch in anderen Zelltypen E2-abhängig reguliert ist zeigten *Li et al.*: In den von ihnen analysierten weiblichen knochenmarksabgeleiteten Stammzellen zeigte sich

eine eindeutige Induktion von *POSTN* mRNA und intrazellulärem POSTN-Protein gleichermaßen infolge einer 48-stündigen E2-Behandlung.¹⁰⁵ Die Studienergebnisse unterscheiden sich methodisch zu unserer Arbeit, da die Autor*innen über keine weiteren Zeitpunkte der E2-Behandlungsphasen berichten und ferner die Proteinbestimmung über optische Dichtewerte aus Immunfluoreszenzbildern ermittelt wurde.¹⁰⁵ Vielmehr ist die Studie geeignet, um zu zeigen, dass POSTN auf mRNA- und Proteinniveau nachweislich E2-abhängig und zelltypübergreifend reguliert wird. Befunde aus mesenchymalen Stammzellen sind jedoch nicht auf adulte, ausgereifte hCF übertragbar, zumal POSTN in mesenchymalen, noch ausdifferenzierungsfähigen Zellen die höchsten Proteinexpressionsraten aufweist.^{38, 39}

Die Befunde der 6-stündigen, E2-induzierten Expression von POSTN-Gesamtprotein in hCF beider Geschlechter korreliert nicht mit *POSTN*-mRNA Expressionsergebnissen zum respektiv selben Zeitpunkt. Letztlich ergibt sich annähernd eine zeitversetzte Fortsetzung der mRNA-Regulation von POSTN auf Proteinebene in beiden Geschlechtern zu einem 12-stündigen E2-Behandlungszeitraum. Auch dieser sich abzeichnende Trend muss in weiteren Untersuchungen durch Ausweitung der Behandlungszeiträume aufgelöst werden.

4.5 Der 17 β -Östradiol Effekt auf die Sekretion von Periostin-Protein in Fibroblasten

POSTN wird von CF nicht nur synthetisiert, sondern ebenfalls als extrazelluläres Matrixprotein sezerniert.⁵² Im Extrazellulärraum interagiert es mit anderen kardialen Strukturproteinen wie Kollagenen und kann als Ligand über Integrin-Signalwege die Kollagenproduktion in Myofibroblasten initiieren.^{23, 49, 53} Somit hat das sezernierte POSTN-Matrixprotein einen direkten Einfluss auf die Beschaffenheit der EZM und ist in der Analyse des fibrogenen kardialen Umbaus wertvoll.

Da eine durch E2 vermittelte Induktion des intrazellulären POSTN-Proteins in hCF beider Geschlechter zu beobachten war (*Abbildung 8, Abbildung 9*), sollte anschließend untersucht werden, ob diese observierte Regulation auch für die extrazelluläre POSTN-Protein Fraktion fortbesteht. Daher erfolgte nach der Behandlung der männlichen und weiblichen hCF mit E2 ebenfalls eine Analyse der sezernierten POSTN-Proteinmenge zu den drei etablierten Behandlungszeiträumen. Überraschenderweise erbrachte die Behandlung der hCF mit E2 weder in weiblichen noch in männlichen Zellen einen statistisch signifikanten Unterschied an extrazellulärem POSTN-Protein gegenüber der unbehandelten Kontrolle zu allen untersuchten Zeitpunkten (*Abbildung 10, Abbildung 11*). Jedoch war zu beobachten, dass sich infolge der 6-stündigen E2-Applikation in weiblichen hCF in Tendenz zunächst supprimierte Level an

ausgeschiedenem POST-Matrixprotein abzeichneten, die über den weiteren Behandlungszeitraum tendenziell anstiegen. In männlichen hCF dagegen bildeten sich E2-vermittelt frühe (6h), eher erhöhte Level an sezerniertem POSTN-Protein ab, die über die getestete Zeitspanne bis 24h abflachten. Diese Ergebnisse, wenngleich sie sich als nicht statistisch signifikant erwiesen, lassen hier über einen geschlechtsdimorphen Mechanismus der E2-abhängigen POSTN-Matrixproteinregulation spekulieren. Die Versuchsergebnisse geben Hinweise darauf, dass jene nach 6h signifikant induzierten POSTN-Gesamtproteinlevel in weiblichen hCF nicht die im ZKÜ exprimierte Menge an extrazellulärem POSTN-Protein wiederabbilden. Dagegen zeigen sich in männlichen hCF nach E2-Behandlung gegenüber der Vehikel-Kontrolle signifikant induzierte POSTN-Gesamtproteinlevel neben im Trend ebenfalls vermehrten POSTN-Matrixproteinleveln. Die Korrelation zwischen intra- und extrazellulärem POSTN-Proteinniveau könnte eine sich fortsetzende Regulation des Proteinniveaus in männlichen hCF implizieren. Erklärungen für den Widerspruch zwischen der verstärkten intrazellulären POSTN-Proteinexpression und tendenziell verminderten extrazellulären POSTN-Sekretion in weiblichen hCF, finden sich in Ansätzen in der Literatur wiedergegeben.

Für diesen Umstand liefert die Übersichtsarbeit von *Akira Kudo* und Kolleg*innen zur POSTN-Struktur mögliche Argumente.¹³⁷ Für POSTN sind 8 Splicevarianten bekannt, die sich anhand ihrer Sequenzabfolge und -länge unterscheiden lassen (*UniProt-ID: Q15063*).¹³⁷ Es ist wahrscheinlich, dass unterschiedliche POSTN-Isoformen in zeitlich dissoziierter Reihenfolge auch auf Proteinebene exprimiert werden. In einem induzierten Myokardinfarkt-Modell in Mäusen konnte die frühe Expression einer spezifischen POSTN-Splicevariante in der unmittelbaren Infarktphase gezeigt werden, die im Extrazellulärraum dann frühe Heilungsprozesse induziert.⁴⁸ Das Vollängen-POSTN-Protein (welches sich durch Abwesenheit von Exondeletionen in der C-terminalen Region unterscheidet¹³⁷) wird hingegen erst in späteren Phasen zur entscheidenden Initiation von Fibroseprozessen exprimiert und verbleibt dabei intrazellulär.^{48, 137}

Die eigenen Daten über die zwischen männlichen und weiblichen hCF tendenziell entgegengesetzte Menge an sezernierten POSTN-Matrixproteinleveln im Verlauf der E2-Behandlungszeiträume, sind daher möglicherweise vereinbar mit den Ergebnissen der hier zitierten Literatur. Für das extrazelluläre POSTN-Matrixprotein zeigt sich eine frühe, bereits nach 6 Stunden E2-vermittelte Reprimierung in weiblichen Zellen und eher eine Induktion in männlichen hCF: Dieses frühe POSTN-Matrixprotein könnte möglicherweise der in der Literatur beschriebenen, früh exprimierten POSTN-Splicevariante entsprechen. In Übertragung zu den genannten Befunden von *Norris et al.* könnte das intrazelluläre POSTN-Gesamtprotein der Vollängen-POSTN-Isoform entsprechen, denn es zeigt sich weitestgehend spät erst nach 24 Stunden in weiblichen Zellen E2-vermittelt reprimiert, jedoch tendenziell verstärkt exprimiert in

männlichen hCF. Es ist also zu mutmaßen, dass wir dieselbe, geschlechtsspezifische POSTN-Proteinregulation zu zeitversetzten Zeitpunkten in Form unterschiedlicher POSTN-Splicevarianten in den jeweiligen Zellkompartimenten (intra- und extrazellulär) detektierten.

Bedauerlicherweise sind zum Zeitpunkt der Durchführung der experimentellen Arbeiten die verschiedenen POSTN-Isoformen nicht mit der von uns angewandten Western-Blot Methode und den kommerziell zu erwerbenden POSTN-spezifischen Antikörpern zu differenzieren. Die beiden POSTN-Antikörper (sc-398631 Maus monoklonal, sc-49480 Ziege polyklonal; beide Santa Cruz Biotechnology, USA), riefen regelhaft zwei dicht angrenzende bis ineinander übergehende Bandenmuster im Bereich von ~90kDa hervor. Diese separaten Banden könnten mit allen 8 bekannten Isoformen¹³⁷ des humanen POSTN-Proteins korrelieren. Um welche der alternativen Spliceformen zwischen 80kDa bis 93kDa (Vergleich *UniProt-ID: Q15063*) es sich in den detektierten Immunoblots handelt, könnte nur durch vergleichende Analysen der im Zellysat bzw. ZKÜ enthaltenen POSTN-Proteinspliceformen mittels Proteinsequenzierung differenziert werden.

Dass sich in den vorliegenden Ergebnissen der POSTN-Proteinsekretion weiblicher und männlicher hCF nach 6-stündiger E2-Behandlung keine statistische Signifikanz ergab, könnte eventuell auch auf die hier angewandte Methodik mittels Western-Blot zur POSTN-Protein Analyse im ZKÜ zurückzuführen sein. In der Analyse des ZKÜ-POSTN-Proteins ist von einem „Hintergrundrauschen“ auszugehen, dem durch Berücksichtigung in folgend beschriebenen Berechnungen versucht wurde, entgegenzuwirken: Auch das Hungermedium selbst, welches nicht auf die hCF-Kulturen aufgebracht war, rief ein jeweils sehr schwaches Bandensignal hervor. Es ist davon auszugehen, dass sich im Kälberserum physiologische POSTN-Residuen befinden. Die firmengeschützte Zusammensetzung war darüber hinaus nicht näher zu ermitteln. Jenes Hintergrund-POSTN-Signal wurde aus allen analysierten ZKÜ-basierten Bandenintensitäten subtrahiert. Die ins Verhältnis gesetzten „basalen“- und „Stimulations“-POSTN-Protein Banden entstammen Kulturüberständen, die in 24-stündigem Abstand zueinander kollektiert wurden (siehe Schema laut *Abbildung 1*). Das bedeutet auch, dass die angewandte Bezugsberechnung den fortschreitenden Zellkonfluenzgrad, ein exponentielles Wachstum und mutmaßlich auch das exponentiell exprimierte POSTN-Level nicht perfekt abbildet, und das Risiko der Übernahme von Messungenauigkeiten aus schwachen Bandenintensitäten besteht. Diese grundlegende Konstellation wurde zugunsten der Vergleichbarkeit der stimulationsabhängigen Sekretion von extrazellulärem POSTN-Protein vernachlässigt.

Eine erweiterte Betrachtungsweise gilt dem extrazellulär sezernierten POSTN-Protein auch als zirkulierender Bestandteil im Blutserum – So ist POSTN nicht nur in lokalen Biopsieproben nachweisbar, sondern wird über die Gewebe auch in den peripheren Blutstrom abgegeben.¹³⁸ Es

existieren unterschiedliche Hinweise, wie das extrazellulär sezernierte POSTN folgend im Blutserum reguliert ist und ob es unterschiedlich zwischen den Geschlechtern exprimiert ist. Die eingangs unter *Kapitel 4.2* erwähnten Studien beschrieben für die extrazellulären POSTN-Level in Serumproben gesunder und anderenfalls herzinsuffizienter Proband*innen signifikant erhöhte Konzentrationen im Serum von Männern gegenüber dem von Frauen.^{139, 140} In Diskrepanz zu diesen Ergebnissen weisen zwei weitere Studien unter Einbeziehung gesunder Kohorten, keinerlei geschlechtsspezifische Unterschiede in der Höhe des extrazellulären Serum-POSTN-Levels auf.^{141, 142} Die abweichenden Unterschiede in den gesunden Kohorten von *Bonnet et al.*, *Okamoto et al.* und *Walsh et al.* in Bezug auf die Geschlechtsspezifität der POSTN-Serumlevel können sich möglicherweise durch die Proband*innencharakteristika erklären: Das durchschnittliche Alter des Kollektivs beider Studien von *Bonnet et al.* und *Okamoto et al.* war bei ~65 Jahren gleich, doch *Bonnet et al.* inkludierten auch eine junge Kohorte im Alter von durchschnittlich 37,9 Jahren, die im übrigen 2,5-fach höhere POSTN-Level gegenüber der älteren Kohorte aufwies. *Walsh et al.* observierten nur jüngere Proband*innen unter 30 Jahren und eine deutlich ältere Teilkohorte von im Mittel 75 Jahren. Die Geschlechterverteilung unterschied sich zudem, als dass das Patient*innenkollektiv von *Bonnet et al.* 88% Frauen betrachtete, während das Kollektiv von *Okamoto et al.* nur rund 32% Frauen inkludierte und *Walsh et al.* ein geschlechterausgeglichenes Kollektiv vorwies.^{139, 141, 142} Alle aufgeführten Studien verwendeten zur Ermittlung des Serum-POSTN-Proteins jedoch das Enzymimmunoassay-Verfahren (ELISA). Die infolge eines längeren E2-Behandlungszeitraums (24h) tendenziell erhöhten extrazellulären POSTN-Proteinlevel in hCF von Frauen aus unseren Versuchen zeigen sich damit in ähnlicher Weise wie das POSTN-Serumprotein in gesunden¹²² und herzinsuffizienten¹²³ Frauen aus den Studien von *Bonnet et al.* und *Meyer et al.* exprimiert. Zuletzt lässt sich aber nur eine bedingte Schlussfolgerung zu unseren Daten ziehen, da das POSTN-Protein im Serum möglicherweise an Transportproteine gebunden ist und nicht zuletzt durch *in-vivo* Verstoffwechslungsprozesse einer anderen Aktivität unterliegt. Es ist zudem nicht differenziert, welchen Anteil das sezernierte POSTN-Protein aus anderen Geweben zu der Gesamtserum-Konzentration von POSTN beitragen, sodass die durch hCF sezernierte POSTN-Fraktion nicht genau bekannt ist.

Letztlich haben die *in-vitro* Messungen keine statistische Signifikanz für eine E2-vermittelte Regulation von POSTN-Matrixprotein ergeben. Die Ergebnisse sind dennoch bedeutsam, da sie die Notwendigkeit für Versuchsausweitungen im Sinne der Analyse von Splicevarianten, ausgedehnteren Analysezeiträumen und voll-quantitativen Analysemethoden verdeutlichen. Ferner konnten die Ergebnisse zumindest in Tendenz eine geschlechtsspezifische Regulation erkennen lassen, die mit Vorbefunden zur geschlechtsdimorphen Verteilung von POSTN-Serumbefunden und zuletzt der geschlechtsdifferenten Fibroseausbildung im Einklang stehen.

4.6 Effekt von Fibroblasten-abgeleitetem Kulturüberstand auf hiPSC-CM

In der gegenwärtigen Literatur wird postuliert, dass CF und CM in einem parakrinen Austausch miteinander stehen.^{10, 26, 27} Studien, welche die Beteiligung extrazellulär applizierten POSTN-Proteins auf die Aktivierung von CM in postinfarziellen Stadien untersuchten, konnten Effekte auf die Proliferation (Mitoserate, DNA-Synthese, Zellzyklus-Wiedereintritt) von differenzierten, murinen sowie porcinen CM verzeichnen.^{143, 144} Die POSTN-Ablation in CF postnataler Mäuse führte hingegen zu einer Abnahme der CM-Größe und -Mitoserate, sodass durch die Autor*innen ein Beitrag von POSTN im CM-Wachstum abgeleitet wurde.²⁸ POSTN-Matrixprotein-vermittelte Effekte in CM wurden außerdem Integrin-abhängigen Signalwegen zugeschrieben.¹⁴³ Untersuchungen, welche die Analyse der durch POSTN-Protein beeinflussten CM-Größe und -proliferation um die Einbeziehung anderer Hypertrophie-Parameter erweiterten, sind in bisherigen Veröffentlichungen nicht berücksichtigt worden.

So sollte im letzten Teil unserer prospektiven Versuchsausweitung objektiviert werden, ob unterschiedliche Mengen sezernierten POSTN-Proteins aus weiblichen und männlichen hCF möglicherweise einen Einfluss auf die Translation der Hypertrophiemarker *MYH6*, *MYH7* und *NPPA*, *NPPB* in CM vermitteln und ob dieser Einfluss eventuell geschlechtsdimorph ausfällt. *NPPA* und *NPPB* sind CM-spezifische Gene, die in postnatalen Herzentwicklungsstadien zunächst reprimiert werden und erst auf eine kardiale Belastung und Hypertrophie hin wieder induziert werden.¹⁴⁵ Die Myosin-Schwerketten codierenden *MYH6* und *MYH7*-Gene werden aufgrund ihrer unterschiedlichen topografischen Expression im Herzen auch als atriales Myosin-Schwerketten-Gen (α -MHC, *MYH6*) und als ventrikuläres Myosin-Schwerketten Gen (β -MHC, *MYH7*) bezeichnet.^{146, 147} Im Rahmen myokardialer Stressoren wie bei einer Herzinsuffizienz zeigt sich vor allem die atriale *MYH6*-mRNA reprimiert während die ventrikuläre *MYH7*-mRNA verstärkt exprimiert ist.¹⁴⁶

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bildeten nun ab, wie sich die Applikation von Fibroblasten-ZKÜ beider Geschlechter auf die Expression der oben genannten Hypertrophiemarker in weiblichen und männlichen hiPSC-CM auswirkt. Zu erwähnen sei an dieser Stelle nochmals, dass es sich um einen einmaligen Versuch handelte und die gewonnenen Ergebnisse schon aus diesem Grund nicht signifikant sein können und nur einen beobachteten Trend darstellen.

Interessanterweise zeigten die weiblichen hiPSC-CM infolge der Applikation von Fibroblasten-ZKÜ, unabhängig vom Geschlecht oder der initialen Behandlung (+/-E2) der hCF, insgesamt eine tendenzielle Reprimierung der *MYH6*- und *MYH7* Gene gegenüber ZKÜ-naiven CM (*Abbildung 12A und C*). Die hiPSC-CM des männlichen Probanden exprimierten nach Hinzugabe des fibroblastären ZKÜ unveränderte Level an *MYH6*-mRNA bei einem allgemeinen Trend der

Reprimierung der *MYH7*-Transkripte. Dies war unabhängig davon, ob der ZKÜ weiblichen oder männlichen hCF oder einer (+/-E2) Behandlung entstammte (*Abbildung 12B und D*). Insgesamt scheinen die beiden Hypertrophie-assoziierten Gene *MYH6* und *MYH7* in den hiPSC-CM beider Geschlechter reprimiert, sobald sie Fibroblasten-ZKÜ ausgesetzt waren (*Abbildung 12*). Sollten sich infolge wiederholter, unabhängiger Versuche weiterhin keine Geschlechterunterschiede in der Expressierung von *MYH6* und *MYH7* mRNA in den hiPSC-CM abzeichnen, könnte sich auch die Einbeziehung der geschlechtlichen und +/-E2 behandelten Herkunft des ZKÜ als vernachlässigbar erweisen. Es gibt bisher keine veröffentlichten Untersuchungen, welche den Einfluss von hCF-ZKÜ auf die *MYH6*- und *MYH7* mRNA-Expression in CM untersuchen. Dennoch könnten die Ergebnisse dafürsprechen, dass im hCF-ZKÜ parakrine Faktoren existent sind, die zu allgemein supprimierten *MYH6*- und *MYH7* mRNA-Leveln in CM beitragen.

Im Gegensatz zur Unterdrückung der *MYH6*- und *MYH7* mRNA in hiPSC-CM durch die Zugabe von hCF-ZKÜ, zeigten sich für *NPPA* und *NPPB* in den hiPSC-CM beider Geschlechter deutlich erhöhte Transkriptionslevel durch die Zugabe von hCF-ZKÜ, unabhängig von Geschlecht und initialer (+/-E2) Behandlung der hCF, gegenüber der ZKÜ-naiven Kontrolle (*Abbildung 13*). In Anbetracht dieser einmalig durchgeführten Experimente müssten wiederholt unabhängige Versuche ausgeführt werden, um eindeutige Ergebnisse über E2-vermittelte Effekte im hCF-ZKÜ auf die Expressierung von *NPPA*- und *NPPB* mRNA in CM erlangen zu können. Auch in Bezug auf die *NPPA*- und *NPPB* mRNA Expression in CM infolge einer Behandlung mit CF-ZKÜ, gibt es derzeit keine veröffentlichten Untersuchungen. Die sich uns präsentierenden Ergebnisse könnten wiederum implizieren, dass im hCF-ZKÜ parakrine Faktoren existent sind, die zu einer allgemein gesteigerten Expression der *NPPA*- und *NPPB* mRNA-Menge in CM beitragen und in diesen daher vielmehr hypertrophiesteigernde Effekte vermitteln. Da *NPPA* und *NPPB* zudem spezifische Marker im sich entwickelnden, embryonalen Myokard sind,¹⁴⁸ ist zu spekulieren, dass die Anwesenheit von hCF-ZKÜ und seinen Faktoren möglicherweise auch die Ausdifferenzierung der unreifen hiPSC-CM fördert.

Im Hinblick auf die Umstände im lebenden Organismus hingegen ist speziell der Einfluss des POSTN-Proteins auf die Regulierung der CM-Hypertrophiemarker untersucht worden. *Kaur et al.* führten am männlichen Mausmodell Untersuchungen mit POSTN-abladierten CF durch: Infolge eines induzierten Myokardinfarktes oder durch Volumenbelastung kam es zu erhöhten *MYH7*-Transkriptionsleveln und einer tendenziell verminderten *MYH6*-Expression. Interessanterweise führte die Verminderung der POSTN-Expressierung in CF zu einer gesteigerten CM-Größe im Infarktareal. Die Autor*innen konnten im Falle reduzierter POSTN-Level eine myokardiale Hypertrophievermittlung und Regeneration erkennen, können einen gesicherten Zusammenhang dem POSTN-Genprodukt allein jedoch nicht zuschreiben.⁵⁴ Über

diese Untersuchung hinaus präsentierten die eingangs genannten Autor*innen um *Morkin* im Falle einer Herzinsuffizienz ebenfalls verminderte *MYH6*- und verstärkte *MYH7*-Level.¹⁴⁶ Obwohl nicht von den Autor*innen untersucht, ist bekannt, dass ein Herzinsuffizienz-bedingter, kardialer Umbau sogar mit einer Erhöhung von *POSTN* einhergeht.⁴⁴ Wird die mutmaßliche Anwesenheit von *POSTN* in dieser Studie nun in Bezug auf die Studie mit der *POSTN*-Ablation von *Kaur et al.* gesetzt, ist zu vermuten, dass allein das Fehlen von *POSTN* keinen Einfluss auf die Regulation der *MYH6*- und *MYH7*-Transkripte hat. Insgesamt betrachtet, sind die Studien stark hinweisend, dass im Falle einer Fibroblasten-Kardiomyozyten Koexistenz wahrscheinlich andere Faktoren und nicht allein *POSTN* zu einer Regulation der Hypertrophiemarker beitragen.

Es existieren jedoch auch *POSTN*-Überexpressionsversuche, welche eine andere als die vorgenannte Regulation der von uns analysierten Hypertrophie-Marker aufzeigen. Myokardiale *POSTN*-Transfektionsstudien in männlichen Ratten von *Katsuragi et al.* verursachten einen 50%igen Anstieg des Bone Natriuretic Peptide (BNP), das ein Genprodukt von *NPPB*³³ darstellt.⁵³ Zudem präsentierten sich die *MYH6* und *MYH7*-Transkripte trotz initial starker Reprimierung im langfristigen Verlauf kaum reguliert im Vergleich zu Kontrolltieren, die normale Level an *POSTN* exprimierten.⁵³ Tendenziell sehen wir auch in den von uns analysierten hiPSC-CM, die mit *POSTN*-enthaltendem ZKÜ behandelt wurden, einen Anstieg der *NPPB*-Expression und ein niedrigeres *MYH6* und *MYH7*-Niveau. Dennoch sind all die in den Studien gezeigten Zellkontaktspezifischen Effekte in einer Fibroblasten-Kardiomyozyten Ko-Anwesenheit schwieriger auf unsere Befunde anwendbar. Grundsätzlich besteht unser Modell zur Analyse parakriner hCF-seitiger Effekte, da es lediglich den unidirektionalen Beitrag von fibroblasten-abgeleiteten Faktoren gen CM-Aktivierung untersuchte.

Subsummierend bleibt zu erwähnen, dass das in der vorliegenden Arbeit verwendete Modell möglicherweise zu komplex und in seiner Aussagekraft eingeschränkt ist, um den spezifischen Beitrag des geschlechtsdimorph exprimierten *POSTN*-Matrixproteins auf die Aktivierung von CM zwischen den Geschlechtern zu objektivieren. Einerseits enthielt der ZKÜ allermindestens Residuen des E2-Hormons oder des Kohlenhydratabkömmlings Cyclodextrin, die bereits für sich genommen von den hiPSC-CM verstoffwechselt werden. Allein für E2 in 10nM-Konzentration ist eine Zunahme der CM-Größe gezeigt, wenngleich die Expressierung der *NPPA*-mRNA unbeeinflusst von E2 war.¹⁴⁹ Immunofluoreszenz-basierende Ergebnisse von *Mahmoodzadeh et al.* zeigten hingegen, dass 10nM an E2 zu einer verstärkten Menge an *NPPA* in kardiomyozytären AC16-Zellen führen kann.¹⁵⁰ Die Effekte, die E2-Residuen im Fibroblasten-ZKÜ auf die Expression von Hypertrophie-assoziierten Genen wie *NPPA* haben, sind wahrscheinlich nicht trivial. Außerdem sind auch E2-vermittelte Effekte auf die Regulation anderer Wachstumsfaktoren (wie zum Beispiel TGF β ,¹¹⁹ Angiotensin II¹⁵¹) in CF beschrieben, was die

Beschränkung des POSTN-Effekts auf die CM-Aktivierung zusätzlich erschwert. Ferner kommt hinzu, dass mögliche koexistente, hypertrophie-modulierende Wachstumsfaktoren und Proteine von den kultivierten hCF in unbekanntem Maße exprimiert wurden oder Bestandteile des Kulturmediums waren und daher ihrerseits Effekte in den hiPSC-CM hervorrufen können. Um all diese ZKÜ-koexistenten Variablen in weiteren Versuchen möglichst auszugrenzen, könnte POSTN als rekombinantes Peptidprotein in verschiedenen Konzentrationen zu den weiblichen und männlichen hiPSC-CM appliziert werden. Falls die unter *Kapitel 4.5* diskutierte Ermittlung der spezifischen POSTN-Isoformen im hCF- ZKÜ über massenspektroskopische Analysen gelingt, könnte eine anschließende Behandlung der hiPSC-CM mit ebenjenen hCF-sezernierten POSTN-Proteinisofomen einen adäquaten Versuchsaufbau gewährleisten.

Die Übertragbarkeit der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse auf physiologische Gegebenheiten, ist durch die immanente Eigenschaft von hiPSC-CM, unreife Zellentwicklungsstadium zu repräsentieren, grundsätzlich begrenzt. Versuchsausweitungen mit adulten CM sowie die Hinzunahme von Fibroblasten-Kardiomyozyten Ko-Kulturen sind für Folgeversuche anzudenken.

Nichtsdestotrotz zeigen die gewonnenen Ergebnisse im Rahmen der vorliegenden Arbeit, dass Fibroblasten-ZKÜ die Genexpression von *MYH6*, *MYH7* und *NPPA*, *NPPB* in hiPSC-CM moduliert: Seine Applikation mit den darin enthaltenen Faktoren führte zu einer allgemeinen Induktion von *NPPA* und *NPPB* in den hiPSC-CM beider Geschlechter, während die Hypertrophie-assoziierten Marker *MYH6* und *MYH7* eher reprimiert waren. Somit sind die hier erhobenen Daten im Einklang mit vorangegangenen Studien^{53, 54} zu sehen und suggerieren das Vorhandensein löslicher, parakriner Faktoren im Fibroblasten- ZKÜ, welche die CM-Hypertrophie beeinflussen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die kardiale Fibrose ist fast allen Herz- Kreislauf- Erkrankungen immanent, treibt die Progression der zugrundeliegenden Herzerkrankung massiv an und kann in einer Herzinsuffizienz münden.^{13, 21} Unterschiede in der Ausprägung einer kardialen Fibrose zwischen Männern und Frauen sind bei der hypertrophen Kardiomyopathie⁶⁶, koronaren Herzerkrankung⁶⁷ und Atherosklerose¹⁵² sowie der Aortenstenose (AS)^{70, 153} zu beobachten: Diese Untersuchungen zeigten dabei in männlichen Patienten eine höhere Fibrosierung gegenüber den weiblichen Herzen. Interessanterweise zeigte sich in vorangegangenen Studien, dass Männer mit AS einen höheren Grad der Fibrosierung im Vergleich zu Frauen mit AS aufweisen; dies war mit einem signifikant höherem Proteinniveau des pro-fibrotischen Faktors Periostin (POSTN) assoziiert.⁷⁸ Untersuchungen im Mausmodell konnten die beobachteten Geschlechterunterschiede im Fibrosierungsgrad zwischen Männern und Frauen bestätigen⁷³ und zeigten, dass 17 β -Östradiol (E2) und Östrogenrezeptoren (ER) zu Geschlechtsunterschieden in der Entstehung der kardialen Fibrose beitragen.^{73, 100} Weitere Analysen in kardialen Fibroblasten aus Mensch und Maus weisen dabei auf eine direkte Beteiligung von E2 und den ER in der Regulation Fibrose-assoziiierter Gene wie Kollagen I und III, MMP-2 und Fibrose-assoziiierter micro-RNA hin.^{69, 103, 123}

Es galt zu analysieren wie E2 und ER den Fibrose-Marker POSTN in humanen kardialen Fibroblasten (hCF) regulieren. Dazu wurde in einem Zellkulturmodell mit weiblichen und männlichen hCF durch Behandlung mit E2 und spezifischen ER zu verschiedenen Behandlungszeitpunkten der Einfluss auf die Transkriptions- und Proteinregulation von POSTN untersucht. Ferner wurde untersucht, ob eine mögliche E2-vermittelte POSTN-Regulation in hCF die Kardiomyozyten (CM)-Aktivierung beeinflusst.

Anhand des hCF-Zellkulturmodells konnte demonstriert werden, dass E2 einen Einfluss auf die Regulation von POSTN auf transkriptioneller Ebene, auf intrazellulärem Proteinniveau, sowie wahrscheinlich auch auf die Expression des extrazellulären Proteins hat. Diese E2-vermittelte Regulation erfolgte dabei nicht durch die separate Beteiligung der ER α oder ER β , sodass ferner schnelle, nicht-genomische E2-Signalwege die ungewisse Signaltransduktion auflösen könnten. Die E2-vermittelte POSTN-Regulation erfolgte auf allen Ebenen in einer geschlechtsabhängigen Weise: Während männliche hCF zu späteren Zeitpunkten tendenziell höhere POSTN-mRNA- und Gesamtproteinlevel exprimierten, war das extrazelluläre POSTN-Protein zu einem frühen Zeitpunkt stärker exprimiert. Weibliche hCF hingegen wiesen späte, und tendenziell niedrigere POSTN mRNA- und Gesamtproteinlevel bei einer im Trend frühen Repression des extrazellulären POSTN-Proteins auf. Die Behandlung von männlichen und weiblichen CM mit dem von männlichen und weiblichen hCF gewonnenem Kulturüberstand infolge einer E2- bzw. Vehikel-Behandlung, führte insgesamt zu einer Regulation der Hypertrophie-assoziierten *MYH6*, *MYH7*,

NPPA und *NPPB* mRNA gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Expression der CM-Hypertrophiemarker offenbarten sich dabei nicht, insgesamt zeigten sich nach Applikation von hCF-Kulturüberstand die *NPPA*- und *NPPB*-Level verstärkt exprimiert und das Niveau der *MYH6*- und *MYH7* mRNA reprimiert.

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass das zentrale Schlüsselprotein in der Vermittlung profibrogener Prozesse, POSTN, in hCF E2-abhängig und geschlechtsdimorph reguliert wird. Dass POSTN auf mRNA-Ebene sowie als Gesamt- und Matrixprotein unterschiedlich exprimiert ist, könnte auf eine losgelöste Regulation von POSTN auf den verschiedenen Expressionsebenen hindeuten. Ein tiefes Verständnis dieses Mechanismus ist für die genaue Differenzierung des Beitrags von POSTN in der geschlechtsspezifischen Ausprägung einer Fibrose notwendig. Die Ergebnisse in den Studien mit Fibroblasten-abgeleiteten Mediumüberständen auf CM-Hypertrophiemarker, auch im Hinblick auf den Beitrag von POSTN, sind uneindeutig und außerhalb des Organismus kaum untersucht oder verstanden.

Eine eingehende Kenntnis der exakten E2-vermittelten Signalwege unter Einbeziehung der geschlechtsspezifischen Regulation ist bisher ausstehend und so bedarf es weiterer Experimente, welche die Beteiligung der ER beispielsweise durch RNA-Inferenztechniken oder Analyse der Transkriptionsfaktor-DNA-Interaktionen mittels Präzipitations-Assays objektivieren. Ungeklärt bleibt ferner der genaue Einfluss des von hCF sezernierten POSTN-Proteins auf die Aktivierung von CM.

Um sich als therapeutisches Zielmolekül auch in Zukunft zu qualifizieren, bedarf es für die E2-abhängige POSTN-Regulation einer genauen Auflösung der Signalwege in hCF und seiner exakten fibrose- und hypertrophie modulierenden Einflüsse im kardiomyozytären Gewebeverband. Für die Entwicklung einer vielversprechenden, geschlechtersensiblen Präzisionsmedizin oder Etablierung als Biomarker ist die molekularbiologische Grundlagenforschung von POSTN essenziell.

6 Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt (Destatis); Anzahl der Gestorbenen nach Kapiteln der ICD-10 und nach Geschlecht für 2019 (Homepage-Auszug). (Zitiert am 30.01.2021). Verfügbar unter: https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/gestorbene_anzahl.html.
2. Deutscher Herzstift e.V., 31. Deutscher Herzbericht 2019. Frankfurt, 2020.
3. Statistisches Bundesamt (Destatis); Durchschnittliches Sterbealter Jahr 2019: Deutschland, Jahre, Geschlecht (Homepage-Auszug). (Zitiert am 30.01.2021). Verfügbar unter: https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Bevoelkerung/Sterbefaelle-Lebenserwartung/_inhalt.html.
4. Martinez-Selles M, Doughty RN, Poppe K, Whalley GA, Earle N, Tribouilloy C, McMurray JJ, Swedberg K, Kober L, Berry C, Squire I, Meta-Analysis Global Group In Chronic Heart F. Gender and survival in patients with heart failure: interactions with diabetes and aetiology. Results from the MAGGIC individual patient meta-analysis. *European journal of heart failure*. 2012;14(5):473-479.
5. Travers JG, Kamal FA, Robbins J, Yutzey KE, Blaxall BC. Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. *Circ Res*. 2016;118(6):1021-1040.
6. Thomas DP, Zimmerman SD, Hansen TR, Martin DT, McCormick RJ. Collagen gene expression in rat left ventricle: interactive effect of age and exercise training. *J Appl Physiol (1985)*. 2000;89(4):1462-1468.
7. Korntner S, Zeugolis DI. Wound healing and fibrosis - State of play. *Adv Drug Deliv Rev*. 2019;146:1-2.
8. Dweck MR, Boon NA, Newby DE. Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;60(19):1854-1863.
9. Murtha LA, Schuliga MJ, Mabotuwana NS, Hardy SA, Waters DW, Burgess JK, Knight DA, Boyle AJ. The Processes and Mechanisms of Cardiac and Pulmonary Fibrosis. *Front Physiol*. 2017;8:777.
10. Brown RD, Ambler SK, Mitchell MD, Long CS. The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2005;45:657-687.
11. Spach MS, Boineau JP. Microfibrosis produces electrical load variations due to loss of side-to-side cell connections: a major mechanism of structural heart disease arrhythmias. *Pacing Clin Electrophysiol*. 1997;20(2 Pt 2):397-413.
12. Mewton N, Liu CY, Croisille P, Bluemke D, Lima JA. Assessment of myocardial fibrosis with cardiovascular magnetic resonance. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011;57(8):891-903.
13. Hinderer S, Schenke-Layland K. Cardiac fibrosis - A short review of causes and therapeutic strategies. *Adv Drug Deliv Rev*. 2019;146:77-82.
14. Geyer H, Caracciolo G, Abe H, Wilansky S, Carerj S, Gentile F, Nesser HJ, Khandheria B, Narula J, Sengupta PP. Assessment of myocardial mechanics using speckle tracking echocardiography: fundamentals and clinical applications. *J Am Soc Echocardiogr*. 2010;23(4):351-369; quiz 453-355.
15. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Drazner MH, Fonarow GC, Geraci SA, Horwich T, Januzzi JL, Johnson MR, Kasper EK, Levy WC, Masoudi FA, McBride PE, McMurray JJV, Mitchell JE, Peterson PN, Riegel B, Sam F, Stevenson LW, Tang WHW, Tsai EJ, Wilkoff BL. 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure: A

- Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(16):e147-e239.
16. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, Gonzalez-Juanatey JR, Harjola VP, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GMC, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P, Group ESCSD. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European heart journal*. 2016;37(27):2129-2200.
 17. Hara A, Niwa M, Noguchi K, Kanayama T, Niwa A, Matsuo M, Hatano Y, Tomita H. Galectin-3 as a Next-Generation Biomarker for Detecting Early Stage of Various Diseases. *Biomolecules*. 2020;10(3).
 18. Sarhene M, Wang Y, Wei J, Huang Y, Li M, Li L, Acheampong E, Zhengcan Z, Xiaoyan Q, Yunsheng X, Jingyuan M, Xiumei G, Guanwei F. Biomarkers in heart failure: the past, current and future. *Heart failure reviews*. 2019;24(6):867-903.
 19. Park S, Nguyen NB, Pezhouman A, Ardehali R. Cardiac fibrosis: potential therapeutic targets. *Transl Res*. 2019;209:121-137.
 20. Litvinukova M, Talavera-Lopez C, Maatz H, Reichart D, Worth CL, Lindberg EL, Kanda M, Polanski K, Heinig M, Lee M, Nadelmann ER, Roberts K, Tuck L, Fasouli ES, DeLaughter DM, McDonough B, Wakimoto H, Gorham JM, Samari S, Mahbubani KT, Saeb-Parsy K, Patone G, Boyle JJ, Zhang H, Zhang H, Viveiros A, Oudit GY, Bayraktar OA, Seidman JG, Seidman CE, Nosedá M, Hubner N, Teichmann SA. Cells of the adult human heart. *Nature*. 2020;588(7838):466-472.
 21. Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(4):549-574.
 22. Camelliti P, Borg TK, Kohl P. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovascular research*. 2005;65(1):40-51.
 23. Snider P, Standley KN, Wang J, Azhar M, Doetschman T, Conway SJ. Origin of cardiac fibroblasts and the role of periostin. *Circ Res*. 2009;105(10):934-947.
 24. Herum KM, Lunde IG, McCulloch AD, Christensen G. The Soft- and Hard-Heartedness of Cardiac Fibroblasts: Mechanotransduction Signaling Pathways in Fibrosis of the Heart. *J Clin Med*. 2017;6(5).
 25. Sun Y, Weber KT. Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovascular research*. 2000;46(2):250-256.
 26. Ieda M, Tsuchihashi T, Ivey KN, Ross RS, Hong TT, Shaw RM, Srivastava D. Cardiac fibroblasts regulate myocardial proliferation through beta1 integrin signaling. *Dev Cell*. 2009;16(2):233-244.
 27. Cartledge JE, Kane C, Dias P, Tesfom M, Clarke L, McKee B, Al Ayoubi S, Chester A, Yacoub MH, Camelliti P, Terracciano CM. Functional crosstalk between cardiac fibroblasts and adult cardiomyocytes by soluble mediators. *Cardiovascular research*. 2015;105(3):260-270.
 28. Hortells L, Valiente-Alandi I, Thomas ZM, Agnew EJ, Schnell DJ, York AJ, Vagnozzi RJ, Meyer EC, Molkenstein JD, Yutzey KE. A specialized population of Periostin-expressing cardiac fibroblasts contributes to postnatal cardiomyocyte maturation and innervation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(35):21469-21479.

29. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* 1999;79(1):215-262.
30. Frangogiannis NG. The Extracellular Matrix in Ischemic and Nonischemic Heart Failure. *Circ Res.* 2019;125(1):117-146.
31. Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *Journal of the American College of Cardiology.* 1989;13(7):1637-1652.
32. Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 7):1341-1353.
33. Manabe I, Shindo T, Nagai R. Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 2002;91(12):1103-1113.
34. Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res.* 2002;90(5):520-530.
35. POSTN Tissue Expression overview (Datenbank-Auszug). *Human Protein Atlas Datenbank.* (Zitiert am: 23.12.2020). Verfügbar unter: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000133110-POSTN/tissue>.
36. Landry NM, Cohen S, Dixon IMC. Periostin in cardiovascular disease and development: a tale of two distinct roles. *Basic Res Cardiol.* 2018;113(1):1.
37. Kruzynska-Frejtag A, Machnicki M, Rogers R, Markwald RR, Conway SJ. Periostin (an osteoblast-specific factor) is expressed within the embryonic mouse heart during valve formation. *Mech Dev.* 2001;103(1-2):183-188.
38. Lindsley A, Snider P, Zhou H, Rogers R, Wang J, Olaopa M, Kruzynska-Frejtag A, Koushik SV, Lilly B, Burch JB, Firulli AB, Conway SJ. Identification and characterization of a novel Schwann and outflow tract endocardial cushion lineage-restricted periostin enhancer. *Dev Biol.* 2007;307(2):340-355.
39. Norris RA, Moreno-Rodriguez RA, Sugi Y, Hoffman S, Amos J, Hart MM, Potts JD, Goodwin RL, Markwald RR. Periostin regulates atrioventricular valve maturation. *Dev Biol.* 2008;316(2):200-213.
40. Souders CA, Bowers SL, Baudino TA. Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res.* 2009;105(12):1164-1176.
41. Snarr BS, Kern CB, Wessels A. Origin and fate of cardiac mesenchyme. *Dev Dyn.* 2008;237(10):2804-2819.
42. Oka T, Xu J, Kaiser RA, Melendez J, Hambleton M, Sargent MA, Lorts A, Brunskill EW, Dorn GW, 2nd, Conway SJ, Aronow BJ, Robbins J, Molkentin JD. Genetic manipulation of periostin expression reveals a role in cardiac hypertrophy and ventricular remodeling. *Circ Res.* 2007;101(3):313-321.
43. Norris RA, Moreno-Rodriguez R, Hoffman S, Markwald RR. The many facets of the matricellular protein periostin during cardiac development, remodeling, and pathophysiology. *J Cell Commun Signal.* 2009;3(3-4):275-286.
44. Zhao S, Wu H, Xia W, Chen X, Zhu S, Zhang S, Shao Y, Ma W, Yang D, Zhang J. Periostin expression is upregulated and associated with myocardial fibrosis in human failing hearts. *J Cardiol.* 2014;63(5):373-378.
45. Litvin J, Blagg A, Mu A, Matiwala S, Montgomery M, Berretta R, Houser S, Margulies K. Periostin and periostin-like factor in the human heart: possible therapeutic targets. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology.* 2006;15(1):24-32.

46. Frangogiannis NG. Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease. *Physiol Rev.* 2012;92(2):635-688.
47. Wu H, Chen L, Xie J, Li R, Li GN, Chen QH, Zhang XL, Kang LN, Xu B. Periostin expression induced by oxidative stress contributes to myocardial fibrosis in a rat model of high salt-induced hypertension. *Mol Med Rep.* 2016;14(1):776-782.
48. Shimazaki M, Nakamura K, Kii I, Kashima T, Amizuka N, Li M, Saito M, Fukuda K, Nishiyama T, Kitajima S, Saga Y, Fukayama M, Sata M, Kudo A. Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction. *J Exp Med.* 2008;205(2):295-303.
49. Kudo A, Kii I. Periostin function in communication with extracellular matrices. *J Cell Commun Signal.* 2018;12(1):301-308.
50. Kudo A. Periostin in fibrillogenesis for tissue regeneration: periostin actions inside and outside the cell. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(19):3201-3207.
51. Conway SJ, Izuhara K, Kudo Y, Litvin J, Markwald R, Ouyang G, Arron JR, Holweg CT, Kudo A. The role of periostin in tissue remodeling across health and disease. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(7):1279-1288.
52. Snider P, Hinton RB, Moreno-Rodriguez RA, Wang J, Rogers R, Lindsley A, Li F, Ingram DA, Menick D, Field L, Firulli AB, Molkentin JD, Markwald R, Conway SJ. Periostin is required for maturation and extracellular matrix stabilization of noncardiomyocyte lineages of the heart. *Circ Res.* 2008;102(7):752-760.
53. Katsuragi N, Morishita R, Nakamura N, Ochiai T, Taniyama Y, Hasegawa Y, Kawashima K, Kaneda Y, Ogihara T, Sugimura K. Periostin as a novel factor responsible for ventricular dilation. *Circulation.* 2004;110(13):1806-1813.
54. Kaur H, Takefuji M, Ngai CY, Carvalho J, Bayer J, Wietelmann A, Poetsch A, Hoelper S, Conway SJ, Mollmann H, Looso M, Troidl C, Offermanns S, Wettschureck N. Targeted Ablation of Periostin-Expressing Activated Fibroblasts Prevents Adverse Cardiac Remodeling in Mice. *Circ Res.* 2016;118(12):1906-1917.
55. Norris RA, Damon B, Mironov V, Kasyanov V, Ramamurthi A, Moreno-Rodriguez R, Trusk T, Potts JD, Goodwin RL, Davis J, Hoffman S, Wen X, Sugi Y, Kern CB, Mjaatvedt CH, Turner DK, Oka T, Conway SJ, Molkentin JD, Forgacs G, Markwald RR. Periostin regulates collagen fibrillogenesis and the biomechanical properties of connective tissues. *J Cell Biochem.* 2007;101(3):695-711.
56. Kanisicak O, Khalil H, Ivey MJ, Karch J, Maliken BD, Correll RN, Brody MJ, SC JL, Aronow BJ, Tallquist MD, Molkentin JD. Genetic lineage tracing defines myofibroblast origin and function in the injured heart. *Nat Commun.* 2016;7:12260.
57. Li L, Fan D, Wang C, Wang JY, Cui XB, Wu D, Zhou Y, Wu LL. Angiotensin II increases periostin expression via Ras/p38 MAPK/CREB and ERK1/2/TGF-beta1 pathways in cardiac fibroblasts. *Cardiovascular research.* 2011;91(1):80-89.
58. Hara M, Yokota K, Saito T, Kobayakawa K, Kijima K, Yoshizaki S, Okazaki K, Yoshida S, Matsumoto Y, Harimaya K, Nakashima Y, Okada S. Periostin Promotes Fibroblast Migration and Inhibits Muscle Repair After Skeletal Muscle Injury. *J Bone Joint Surg Am.* 2018;100(16):e108.
59. Prabhavathi K, Selvi KT, Poornima KN, Sarvanan A. Role of biological sex in normal cardiac function and in its disease outcome - a review. *J Clin Diagn Res.* 2014;8(8):BE01-04.
60. Petitto M, Esposito R, Sorrentino R, Lembo M, Luciano F, De Roberto AM, La Mura L, Pezzullo E, Maffei S, Galderisi M, Lancellotti P. Sex-specific echocardiographic reference values: the women's point of view. *J Cardiovasc Med (Hagerstown).* 2018;19(10):527-535.

61. Chung AK, Das SR, Leonard D, Peshock RM, Kazi F, Abdullah SM, Canham RM, Levine BD, Drazner MH. Women have higher left ventricular ejection fractions than men independent of differences in left ventricular volume: the Dallas Heart Study. *Circulation*. 2006;113(12):1597-1604.
62. Hung CL, Goncalves A, Shah AM, Cheng S, Kitzman D, Solomon SD. Age- and Sex-Related Influences on Left Ventricular Mechanics in Elderly Individuals Free of Prevalent Heart Failure: The ARIC Study (Atherosclerosis Risk in Communities). *Circ Cardiovasc Imaging*. 2017;10(1).
63. Mallat Z, Fornes P, Costagliola R, Esposito B, Belmin J, Lecomte D, Tedgui A. Age and gender effects on cardiomyocyte apoptosis in the normal human heart. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001;56(11):M719-723.
64. Olivetti G, Giordano G, Corradi D, Melissari M, Lagrasta C, Gambert SR, Anversa P. Gender differences and aging: effects on the human heart. *Journal of the American College of Cardiology*. 1995;26(4):1068-1079.
65. Claessens TE, Rietzschel ER, De Buyzere ML, De Bacquer D, De Backer G, Gillebert TC, Verdonck PR, Segers P. Noninvasive assessment of left ventricular and myocardial contractility in middle-aged men and women: disparate evolution above the age of 50? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292(2):H856-865.
66. Varnava AM, Elliott PM, Sharma S, McKenna WJ, Davies MJ. Hypertrophic cardiomyopathy: the interrelation of disarray, fibrosis, and small vessel disease. *Heart*. 2000;84(5):476-482.
67. Campbell DJ, Somaratne JB, Jenkins AJ, Prior DL, Yui M, Kenny JF, Newcomb AE, Kelly DJ, Black MJ. Differences in myocardial structure and coronary microvasculature between men and women with coronary artery disease. *Hypertension*. 2011;57(2):186-192.
68. Kararigas G, Dworatzek E, Petrov G, Summer H, Schulze TM, Baczko I, Knosalla C, Golz S, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Sex-dependent regulation of fibrosis and inflammation in human left ventricular remodeling under pressure overload. *European journal of heart failure*. 2014;16(11):1160-1167.
69. Petrov G, Regitz-Zagrosek V, Lehmkühl E, Krabatsch T, Dunkel A, Dandel M, Dworatzek E, Mahmoodzadeh S, Schubert C, Becher E, Hampf H, Hetzer R. Regression of myocardial hypertrophy after aortic valve replacement: faster in women? *Circulation*. 2010;122(11 Suppl):S23-28.
70. Villari B, Campbell SE, Schneider J, Vassalli G, Chiariello M, Hess OM. Sex-dependent differences in left ventricular function and structure in chronic pressure overload. *European heart journal*. 1995;16(10):1410-1419.
71. Krumholz HM, Larson M, Levy D. Prognosis of left ventricular geometric patterns in the Framingham Heart Study. *Journal of the American College of Cardiology*. 1995;25(4):879-884.
72. Kessler EL, Rivaud MR, Vos MA, van Veen TAB. Sex-specific influence on cardiac structural remodeling and therapy in cardiovascular disease. *Biol Sex Differ*. 2019;10(1):7.
73. Flegner D, Schubert C, Penkalla A, Witt H, Kararigas G, Dworatzek E, Staub E, Martus P, Ruiz Noppinger P, Kintscher U, Gustafsson JA, Regitz-Zagrosek V. Female sex and estrogen receptor-beta attenuate cardiac remodeling and apoptosis in pressure overload. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298(6):R1597-1606.
74. Ruppert M, Korkmaz-Icoz S, Loganathan S, Jiang W, Lehmann L, Olah A, Sayour AA, Barta BA, Merkely B, Karck M, Radovits T, Szabo G. Pressure-volume analysis reveals characteristic sex-related differences in cardiac function in a rat model of aortic banding-

- induced myocardial hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2018;315(3):H502-H511.
75. Karatas A, Hegner B, de Windt LJ, Luft FC, Schubert C, Gross V, Akashi YJ, Gurgun D, Kintscher U, da Costa Goncalves AC, Regitz-Zagrosek V, Dragun D. Deoxycorticosterone acetate-salt mice exhibit blood pressure-independent sexual dimorphism. *Hypertension.* 2008;51(4):1177-1183.
76. Cavasin MA, Tao Z, Menon S, Yang XP. Gender differences in cardiac function during early remodeling after acute myocardial infarction in mice. *Life Sci.* 2004;75(18):2181-2192.
77. Schuster I, Mahmoodzadeh S, Dworatzek E, Jaisser F, Messaoudi S, Morano I, Regitz-Zagrosek V. Cardiomyocyte-specific overexpression of oestrogen receptor beta improves survival and cardiac function after myocardial infarction in female and male mice. *Clin Sci (Lond).* 2016;130(5):365-376.
78. Petrov G, Dworatzek E, Schulze TM, Dandel M, Kararigas G, Mahmoodzadeh S, Knosalla C, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Maladaptive remodeling is associated with impaired survival in women but not in men after aortic valve replacement. *JACC Cardiovascular imaging.* 2014;7(11):1073-1080.
79. Regitz-Zagrosek V, Kararigas G. Mechanistic Pathways of Sex Differences in Cardiovascular Disease. *Physiol Rev.* 2017;97(1):1-37.
80. Patrizio M, Marano G. Gender differences in cardiac hypertrophic remodeling. *Ann Ist Super Sanita.* 2016;52(2):223-229.
81. Wu J, Dai F, Li C, Zou Y. Gender Differences in Cardiac Hypertrophy. *J Cardiovasc Transl Res.* 2020;13(1):73-84.
82. Hayward CS, Kelly RP, Collins P. The roles of gender, the menopause and hormone replacement on cardiovascular function. *Cardiovascular research.* 2000;46(1):28-49.
83. Mosca L, Benjamin EJ, Berra K, Bezanson JL, Dolor RJ, Lloyd-Jones DM, Newby LK, Pina IL, Roger VL, Shaw LJ, Zhao D, Beckie TM, Bushnell C, D'Armiento J, Kris-Etherton PM, Fang J, Ganiats TG, Gomes AS, Gracia CR, Haan CK, Jackson EA, Judelson DR, Kelepouris E, Lavie CJ, Moore A, Nussmeier NA, Ofili E, Oparil S, Ouyang P, Pinn VW, Sherif K, Smith SC, Jr., Sopko G, Chandra-Strobos N, Urbina EM, Vaccarino V, Wenger NK. Effectiveness-based guidelines for the prevention of cardiovascular disease in women--2011 update: a guideline from the american heart association. *Circulation.* 2011;123(11):1243-1262.
84. Jankowska EA, Rozentryt P, Ponikowska B, Hartmann O, Kustrzycka-Kratochwil D, Reczuch K, Nowak J, Borodulin-Nadziejka L, Polonski L, Banasiak W, Poole-Wilson PA, Anker SD, Ponikowski P. Circulating estradiol and mortality in men with systolic chronic heart failure. *JAMA.* 2009;301(18):1892-1901.
85. Xu Y, Arenas IA, Armstrong SJ, Davidge ST. Estrogen modulation of left ventricular remodeling in the aged heart. *Cardiovascular research.* 2003;57(2):388-394.
86. Brower GL, Gardner JD, Janicki JS. Gender mediated cardiac protection from adverse ventricular remodeling is abolished by ovariectomy. *Mol Cell Biochem.* 2003;251(1-2):89-95.
87. Zhan E, Keimig T, Xu J, Peterson E, Ding J, Wang F, Yang XP. Dose-dependent cardiac effect of oestrogen replacement in mice post-myocardial infarction. *Exp Physiol.* 2008;93(8):982-993.
88. Iwakura A, Shastry S, Luedemann C, Hamada H, Kawamoto A, Kishore R, Zhu Y, Qin G, Silver M, Thorne T, Eaton L, Masuda H, Asahara T, Losordo DW. Estradiol enhances

- recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9. *Circulation*. 2006;113(12):1605-1614.
89. Gardner JD, Murray DB, Voloshenyuk TG, Brower GL, Bradley JM, Janicki JS. Estrogen attenuates chronic volume overload induced structural and functional remodeling in male rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;298(2):H497-504.
 90. Cavasin MA, Sankey SS, Yu AL, Menon S, Yang XP. Estrogen and testosterone have opposing effects on chronic cardiac remodeling and function in mice with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284(5):H1560-1569.
 91. Nordmeyer J, Eder S, Mahmoodzadeh S, Martus P, Fielitz J, Bass J, Bethke N, Zurbrugg HR, Pregla R, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Upregulation of myocardial estrogen receptors in human aortic stenosis. *Circulation*. 2004;110(20):3270-3275.
 92. Mahmoodzadeh S, Eder S, Nordmeyer J, Ehler E, Huber O, Martus P, Weiske J, Pregla R, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Estrogen receptor alpha up-regulation and redistribution in human heart failure. *FASEB J*. 2006;20(7):926-934.
 93. Kararigas G, Nguyen BT, Jarry H. Estrogen modulates cardiac growth through an estrogen receptor alpha-dependent mechanism in healthy ovariectomized mice. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;382(2):909-914.
 94. Skavdahl M, Steenbergen C, Clark J, Myers P, Demianenko T, Mao L, Rockman HA, Korach KS, Murphy E. Estrogen receptor-beta mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(2):H469-476.
 95. Kararigas G, Fliegner D, Gustafsson JA, Regitz-Zagrosek V. Role of the estrogen/estrogen-receptor-beta axis in the genomic response to pressure overload-induced hypertrophy. *Physiol Genomics*. 2011;43(8):438-446.
 96. Gurgen D, Hegner B, Kusch A, Catar R, Chaykovska L, Hoff U, Gross V, Slowinski T, da Costa Goncalves AC, Kintscher U, Gustafsson JA, Luft FC, Dragun D. Estrogen receptor-beta signals left ventricular hypertrophy sex differences in normotensive deoxycorticosterone acetate-salt mice. *Hypertension*. 2011;57(3):648-654.
 97. Pedram A, Razandi M, Narayanan R, Levin ER. Estrogen receptor beta signals to inhibition of cardiac fibrosis. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;434:57-68.
 98. Pedram A, Razandi M, O'Mahony F, Lubahn D, Levin ER. Estrogen receptor-beta prevents cardiac fibrosis. *Mol Endocrinol*. 2010;24(11):2152-2165.
 99. Dworatzek E, Mahmoodzadeh S. Targeted basic research to highlight the role of estrogen and estrogen receptors in the cardiovascular system. *Pharmacological Research*. 2017;119:27-35.
 100. Westphal C, Schubert C, Prella K, Penkalla A, Fliegner D, Petrov G, Regitz-Zagrosek V. Effects of estrogen, an ERalpha agonist and raloxifene on pressure overload induced cardiac hypertrophy. *PLoS One*. 2012;7(12):e50802.
 101. Zhou L, Shao Y, Huang Y, Yao T, Lu LM. 17beta-estradiol inhibits angiotensin II-induced collagen synthesis of cultured rat cardiac fibroblasts via modulating angiotensin II receptors. *Eur J Pharmacol*. 2007;567(3):186-192.
 102. Mahmoodzadeh S, Dworatzek E, Fritschka S, Pham TH, Regitz-Zagrosek V. 17beta-Estradiol inhibits matrix metalloproteinase-2 transcription via MAP kinase in fibroblasts. *Cardiovascular research*. 2010;85(4):719-728.

103. Dworatzek E, Mahmoodzadeh S, Schriever C, Kusumoto K, Kramer L, Santos G, Fliegner D, Leung YK, Ho SM, Zimmermann WH, Lutz S, Regitz-Zagrosek V. Sex-specific regulation of collagen I and III expression by 17beta-Estradiol in cardiac fibroblasts: role of estrogen receptors. *Cardiovascular research*. 2019;115(2):315-327.
104. Mamalis A, Markopoulou C, Lagou A, Vrotsos I. Oestrogen regulates proliferation, osteoblastic differentiation, collagen synthesis and periostin gene expression in human periodontal ligament cells through oestrogen receptor beta. *Archives of Oral Biology*. 2011;56(5):446-455.
105. Li C, Li X, Wang X, Miao P, Liu J, Li C, Li D, Zhou W, Jin Z, Cao M. Periostin Mediates Oestrogen-Induced Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells in Ovariectomised Rats. *Biomed Res Int*. 2020;2020:9405909.
106. Berthois Y, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(8):2496-2500.
107. Olivera A, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature*. 1993;365(6446):557-560.
108. Bhagavan NV, Ha C-E. Chapter 23 - RNA and Protein Synthesis. In: Bhagavan NV, Ha C-E, editors. *Essentials of Medical Biochemistry*. San Diego: Academic Press; 2011. p. 301-320.
109. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150(1):76-85.
110. Ratajczak-Wielgomas K, Grzegorzolka J, Piotrowska A, Matkowski R, Wojnar A, Rys J, Ugorski M, Dziegiel P. Expression of periostin in breast cancer cells. *Int J Oncol*. 2017;51(4):1300-1310.
111. Baum J, Duffy HS. Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about? *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011;57(4):376-379.
112. Levina EM, Kharitonova MA, Rovensky YA, Vasiliev JM. Cytoskeletal control of fibroblast length: experiments with linear strips of substrate. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 23):4335-4341.
113. Yasar P, Ayaz G, User SD, Gupur G, Muyan M. Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reprod Med Biol*. 2017;16(1):4-20.
114. Fernandes IR, Russo FB, Pignatari GC, Evangelinellis MM, Tavolari S, Muotri AR, Beltrao-Braga PC. Fibroblast sources: Where can we get them? *Cytotechnology*. 2016;68(2):223-228.
115. Santiago JJ, Dangerfield AL, Rattan SG, Bathe KL, Cunnington RH, Raizman JE, Bedosky KM, Freed DH, Kardami E, Dixon IM. Cardiac fibroblast to myofibroblast differentiation in vivo and in vitro: expression of focal adhesion components in neonatal and adult rat ventricular myofibroblasts. *Dev Dyn*. 2010;239(6):1573-1584.
116. Dubey RK, Gillespie DG, Zacharia LC, Rosselli M, Imthurn B, Jackson EK. Methoxyestradiols mediate the antimitogenic effects of locally applied estradiol on cardiac fibroblast growth. *Hypertension*. 2002;39(2 Pt 2):412-417.
117. Grohe C, Kahlert S, Lobbert K, van Eickels M, Stimpel M, Vetter H, Neyses L. Effects of moexiprilat on oestrogen-stimulated cardiac fibroblast growth. *Br J Pharmacol*. 1997;121(7):1350-1354.
118. Lee HW, Eghbali-Webb M. Estrogen enhances proliferative capacity of cardiac fibroblasts by estrogen receptor- and mitogen-activated protein kinase-dependent pathways. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1998;30(7):1359-1368.

119. Mercier I, Colombo F, Mader S, Calderone A. Ovarian hormones induce TGF-beta(3) and fibronectin mRNAs but exhibit a disparate action on cardiac fibroblast proliferation. *Cardiovascular research*. 2002;53(3):728-739.
120. Ivey MJ, Tallquist MD. Defining the Cardiac Fibroblast. *Circulation Journal*. 2016;80(11):2269-2276.
121. Ma Y, Iyer RP, Jung M, Czubryt MP, Lindsey ML. Cardiac Fibroblast Activation Post-Myocardial Infarction: Current Knowledge Gaps. *Trends Pharmacol Sci*. 2017;38(5):448-458.
122. Yano T, Miura T, Ikeda Y, Matsuda E, Saito K, Miki T, Kobayashi H, Nishino Y, Ohtani S, Shimamoto K. Intracardiac fibroblasts, but not bone marrow derived cells, are the origin of myofibroblasts in myocardial infarct repair. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*. 2005;14(5):241-246.
123. Queiros AM, Eschen C, Fliegner D, Kararigas G, Dworatzek E, Westphal C, Sanchez Ruderisch H, Regitz-Zagrosek V. Sex- and estrogen-dependent regulation of a miRNA network in the healthy and hypertrophied heart. *International journal of cardiology*. 2013;169(5):331-338.
124. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Strom A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev*. 2007;87(3):905-931.
125. Powell E, Xu W. Intermolecular interactions identify ligand-selective activity of estrogen receptor alpha/beta dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(48):19012-19017.
126. Paulmurugan R, Tamrazi A, Massoud TF, Katzenellenbogen JA, Gambhir SS. In vitro and in vivo molecular imaging of estrogen receptor alpha and beta homo- and heterodimerization: exploration of new modes of receptor regulation. *Mol Endocrinol*. 2011;25(12):2029-2040.
127. Wakeling AE, Dukes M, Bowler J. A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res*. 1991;51(15):3867-3873.
128. Bologna CG, Revankar CM, Young SM, Edwards BS, Arterburn JB, Kiselyov AS, Parker MA, Tkachenko SE, Savchuck NP, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER. Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nat Chem Biol*. 2006;2(4):207-212.
129. Wang H, Zhao Z, Lin M, Groban L. Activation of GPR30 inhibits cardiac fibroblast proliferation. *Mol Cell Biochem*. 2015;405(1-2):135-148.
130. Prossnitz ER, Arterburn JB. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVII. G Protein-Coupled Estrogen Receptor and Its Pharmacologic Modulators. *Pharmacol Rev*. 2015;67(3):505-540.
131. Mack GS. MicroRNA gets down to business. *Nat Biotechnol*. 2007;25(6):631-638.
132. Kuo MH, Allis CD. In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods*. 1999;19(3):425-433.
133. Orlando V, Strutt H, Paro R. Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. *Methods*. 1997;11(2):205-214.
134. Lee JW, Lee YC, Na SY, Jung DJ, Lee SK. Transcriptional coregulators of the nuclear receptor superfamily: coactivators and corepressors. *Cell Mol Life Sci*. 2001;58(2):289-297.

135. Pfaff DW, Kow LM, Zhu YS, Scott RE, Wu-Peng SX, Dellovade T. Hypothalamic cellular and molecular mechanisms helping to satisfy axiomatic requirements for reproduction. *J Neuroendocrinol.* 1996;8(5):325-336.
136. Ben-Ari Y, Brody Y, Kinor N, Mor A, Tsukamoto T, Spector DL, Singer RH, Shav-Tal Y. The life of an mRNA in space and time. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 10):1761-1774.
137. Kudo A. Introductory review: periostin-gene and protein structure. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(23):4259-4268.
138. Kii I. Practical Application of Periostin as a Biomarker for Pathological Conditions. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1132:195-204.
139. Bonnet N, Biver E, Durosier C, Chevalley T, Rizzoli R, Ferrari S. Additive Genetic Effects on Circulating Periostin Contribute to the Heritability of Bone Microstructure. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(7):E1014-1021.
140. Meyer S, van der Meer P, van Deursen VM, Jaarsma T, van Veldhuisen DJ, van der Wal MH, Hillege HL, Voors AA. Neurohormonal and clinical sex differences in heart failure. *European heart journal.* 2013;34(32):2538-2547.
141. Okamoto M, Hoshino T, Kitasato Y, Sakazaki Y, Kawayama T, Fujimoto K, Ohshima K, Shiraishi H, Uchida M, Ono J, Ohta S, Kato S, Izuhara K, Aizawa H. Periostin, a matrix protein, is a novel biomarker for idiopathic interstitial pneumonias. *Eur Respir J.* 2011;37(5):1119-1127.
142. Walsh JS, Gossiel F, Scott JR, Paggiosi MA, Eastell R. Effect of age and gender on serum periostin: Relationship to cortical measures, bone turnover and hormones. *Bone.* 2017;99:8-13.
143. Kuhn B, del Monte F, Hajjar RJ, Chang YS, Lebeche D, Arab S, Keating MT. Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. *Nat Med.* 2007;13(8):962-969.
144. Ladage D, Yaniz-Galende E, Rapti K, Ishikawa K, Tilemann L, Shapiro S, Takewa Y, Muller-Ehmsen J, Schwarz M, Garcia MJ, Sanz J, Hajjar RJ, Kawase Y. Stimulating myocardial regeneration with periostin Peptide in large mammals improves function post-myocardial infarction but increases myocardial fibrosis. *PLoS One.* 2013;8(5):e59656.
145. Man J, Barnett P, Christoffels VM. Structure and function of the Nppa-Nppb cluster locus during heart development and disease. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(8):1435-1444.
146. Morkin E. Control of cardiac myosin heavy chain gene expression. *Microsc Res Tech.* 2000;50(6):522-531.
147. Wessels A, Vermeulen JL, Viragh S, Kalman F, Lamers WH, Moorman AF. Spatial distribution of "tissue-specific" antigens in the developing human heart and skeletal muscle. II. An immunohistochemical analysis of myosin heavy chain isoform expression patterns in the embryonic heart. *Anat Rec.* 1991;229(3):355-368.
148. Sergeeva IA, Christoffels VM. Regulation of expression of atrial and brain natriuretic peptide, biomarkers for heart development and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(12):2403-2413.
149. Donaldson C, Eder S, Baker C, Aronovitz MJ, Weiss AD, Hall-Porter M, Wang F, Ackerman A, Karas RH, Molkentin JD, Patten RD. Estrogen attenuates left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy by an estrogen receptor-dependent pathway that increases calcineurin degradation. *Circ Res.* 2009;104(2):265-275, 211p following 275.
150. Mahmoodzadeh S, Pham TH, Kuehne A, Fielitz B, Dworatzek E, Kararigas G, Petrov G, Davidson MM, Regitz-Zagrosek V. 17beta-Estradiol-induced interaction of ERalpha with

- NPPA regulates gene expression in cardiomyocytes. *Cardiovascular research*. 2012;96(3):411-421.
- 151.** Stewart JA, Jr., Cashatt DO, Borck AC, Brown JE, Carver WE. 17beta-estradiol modulation of angiotensin II-stimulated response in cardiac fibroblasts. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2006;41(1):97-107.
- 152.** Ambale Venkatesh B, Volpe GJ, Donekal S, Mewton N, Liu CY, Shea S, Liu K, Burke G, Wu C, Bluemke DA, Lima JA. Association of longitudinal changes in left ventricular structure and function with myocardial fibrosis: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis study. *Hypertension*. 2014;64(3):508-515.
- 153.** Treibel TA, Lopez B, Gonzalez A, Menacho K, Schofield RS, Ravassa S, Fontana M, White SK, DiSalvo C, Roberts N, Ashworth MT, Diez J, Moon JC. Reappraising myocardial fibrosis in severe aortic stenosis: an invasive and non-invasive study in 133 patients. *European heart journal*. 2018;39(8):699-709.

V Eidesstattliche Versicherung

Ich, Jasmin Zernikow, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „*Untersuchungen zur 17 β -Östradiol-abhängigen Regulation von Periostin in humanen kardialen Fibroblasten*“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autor*innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Erstbetreuerin, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

.....

Datum

.....

Unterschrift

VI Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

VII Publikationen und Präsentationen

Kongressbeitrag mit Abstract-Veröffentlichung

Dworatzek E, **Zernikow J**, Reichhardt J, Santos G, Regitz-Zagrosek V, Lutz S.

The sex-specific regulated myofibroblast marker periostin regulates in conjunction with BMP1 the activation of lysyl oxidase. *Clin Res Cardiol* 108, Suppl. 1, April 2019

85. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK), Mannheim, April 2019

Posterpräsentationen

J. Zernikow, V. Regitz-Zagrosek, S. Diecke, S. Lutz, E. Dworatzek

17 β -Estradiol regulates periostin in a sex-specific manner in human cardiac fibroblasts

5th Young DZHK Retreat + 6th DZHK Retreat, Königstein (Taunus), September 2018

J. Zernikow, V. Regitz-Zagrosek, S. Diecke, S. Lutz, E. Dworatzek

17 β -Estradiol regulates periostin in a sex-specific manner in human cardiac fibroblasts

2nd DZHK Conference on Translational Medicine, Berlin, Januar 2019

J. Zernikow, V. Regitz-Zagrosek, S. Diecke, S. Lutz, E. Dworatzek

17 β -Estradiol regulates periostin in a sex-specific manner in human cardiac fibroblasts

30th European Students' Conference (ESC), Berlin, September 2019

VIII Danksagung

An erster Stelle möchte ich Frau Privatdozentin Dr. rer. medic. Elke Dworatzek für die beständige und außerordentlich gewissenhafte Betreuung sowie das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken. Ihre Anregungen und Ratschläge haben maßgeblich zum Gelingen aller praktischen Versuche sowie der Verschriftlichung dieser Arbeit beigetragen. Ihr Engagement ist mir zum Vorbild, dass Fleiß und Beharrlichkeit lohnende Voraussetzungen für wissenschaftliche Erfolge sind.

Frau Professorin Dr. med. Dr. h.c. Vera Regitz-Zagrosek danke ich für die Überlassung der interessanten Thematik und zur Möglichkeit diese Arbeit an dem von ihr geleiteten Institut ausführen zu können. Danke auch für ihre kritischen Denkanstöße und die wissenschaftliche Betreuung.

Für die Möglichkeit der Durchführung eines Teils meiner ergänzenden Versuche danke ich herzlich Herrn Professor Dr. Ingo Morano und seiner allzeit hilfsbereiten, motivierten Arbeitsgruppe sowie Frau Privatdozentin Dr. rer. nat. Shokoufeh Mahmoodzadeh, die freundlicherweise die Mitbetreuung dieser Arbeit übernommen hat und deren konstruktive Ratschläge eine Bereicherung waren.

Ich bedanke mich bei Lisa Kramer, die mich in meiner praktischen Laborarbeit begleitet und mich gewissenhaft in die methodologische Umsetzung eingeführt hat. Dank auch Dr. Vignesh Jayarajan, Cindy Schriever sowie Anne und Pavelas Breiter deren Herzlichkeit, Kollegialität und experimenteller Austausch für eine vertraute Arbeitsatmosphäre gesorgt haben.

Herrn Dr. Sebastian Diecke als Leiter der *Core Facility Stammzellen*-Technologieplattform des Berlin Institute of Health (BIH) danke ich für die Bereitstellung der Stammzell-abgeleiteten Kardiomyozyten.

Besonders danke ich meinem Stipendiengeber, dem Deutschen Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung (DZHK), das mir durch seine finanzielle Förderung eine volle Konzentration auf meine Forschungsarbeit ermöglicht hat und darüber hinaus meinen wissenschaftlichen Anreiz durch ihr Nachwuchsprogramm und die Vernetzung mit anderen jungen Wissenschaftler*innen nachhaltig gefördert hat.

Ich möchte mich bei meiner Familie und besonders bei meiner Mutter Janet bedanken, die mir eine Fokussierung auf mein Humanmedizinstudium und mein wissenschaftliches Engagement ermöglicht hat. Meinem Freund Christian Scheifler gilt Dank für das Aufspüren jedes überschüssigen Leerzeichens und für seine unerschütterliche Bestärkungskraft in allen Lebenslagen.