

**Analyse und RNAi- vermittelte Suppression von CTGF als
proinflammatorischer und profibrotischer Mediator in
murinen und humanen kardialen Fibroblasten**

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität
Berlin



Vorgelegt von Juliane Tank
aus Oranienburg
im Dezember 2016

Die vorliegende Arbeit wurde von August 2009 bis Dezember 2013 in der Abteilung für Kardiologie und Pulmologie der Charité-Universitätsmedizin unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Poller angefertigt. Teile dieser Arbeit wurden bereits im Artikel „*Single-target RNA interference for the blockade of multiple interacting proinflammatory and profibrotic pathways in cardiac fibroblasts*“ im *Journal for Molecular and Cellular Cardiology* veröffentlicht.

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Poller
Abteilung für Kardiologie und Pulmologie
Charité Universitätsmedizin

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Rupert Mutzel
Institut für Biologie
Freie Universität Berlin

Disputation am: 31.05.2017

Für Jakob

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Poller für das interessante Thema, die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können und den wissenschaftlichen Austausch.

Des Weiteren gebührt mein besonderer Dank Xiaomin Wang, Leona Gilke, Dr. Madlen Löbel, Dr. Diana Lindner, Dr. Christin Zietsch und Dr. Moritz Becher für ihre Hilfsbereitschaft und den produktiven wissenschaftlichen Austausch in kollegialer Atmosphäre. Ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Für die Begutachtung dieser Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel und Herrn Prof. Dr. Wolfgang Poller.

Für die Isolation und Bereitstellung adulter muriner Kardiomyozyten bedanke ich mich besonders bei Saskia Reichert aus der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. Torsten K. Röpke.

Meinen Eltern Brigitte und Uwe Tank, meinem Bruder Alexander und dessen Frau Kathrin Tank danke ich für ihre aufopfernde Unterstützung. Ohne die vielen Stunden, in denen sie sich um die Betreuung meines Sohnes gekümmert haben, hätte ich diese Arbeit nicht beenden können. Ich danke ihnen für den familiären Zusammenhalt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Myokard	1
1.1.1	Fibroblasten	1
1.1.2	Myofibroblasten	2
1.2	Fibrose und Remodeling	3
1.2.1	Kardiale Fibroblasten und Remodeling	4
1.3	Definition und Klassifikation von Kardiomyopathien	4
1.3.1	AHA und ESC	4
1.3.2	MOGE(S)	6
1.3.3	Dilatative Kardiomyopathie (DCM)	6
1.4	Die CCN- Familie	9
1.4.1	Strukturelle Domänen der CCN- Proteine	10
1.4.2	CCN1/ Cyr61	12
1.4.3	CCN2/CTGF	12
1.4.4	CCN3/ Nov	14
1.4.5	CCN4/ WISP1	15
1.4.6	CCN5/WISP2	15
1.4.7	CCN6/WISP3	16
1.5	Gentherapie.....	16
1.5.1	Gentherapeutische Vektorsysteme.....	17
1.6	RNA-Interferenz.....	21
1.6.1	Biogenese und RNAi von miRNA	21
1.6.2	Biogenese und RNAi von siRNA	22
1.6.3	RNAi als therapeutischer Ansatz	25
2	Material.....	27
2.1	Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen	27
2.2	Spezielle Verbrauchsmaterialien	29
2.3	Kits - Kommerzielle Test-Systeme und Lösungen.....	29
2.4	Puffer und Lösungen.....	30
2.4.1	Allgemeine Puffer und Lösungen	30
2.4.2	Northern Blot.....	31
2.4.3	Western Blot.....	32

2.4.4	<i>Präparation neonataler Rattenkardiofibroblasten:</i>	33
2.4.5	<i>Kryokonservierung von Zellen</i>	33
2.5	<i>Nukleinsäuren</i>	33
2.5.1	<i>Kommerzielle humane RNA</i>	33
2.5.2	<i>Plasmide</i>	34
2.6	<i>Virale Vektoren</i>	35
2.7	<i>Bakterienstämme</i>	36
2.7.1	<i>Bakterienmedien</i>	36
2.8	<i>Antibiotika</i>	36
2.9	<i>Enzyme</i>	36
2.10	<i>Standards für Agarose- und Proteingele</i>	37
2.10.1	<i>DNA-Größenstandards</i>	37
2.10.2	<i>Proteingrößenstandard</i>	37
2.11	<i>Zelllinien</i>	37
2.11.1	<i>Permanente Zelllinien und Kulturmedien</i>	37
2.11.2	<i>Primäre Zellen und Kulturmedien</i>	38
2.12	<i>Taqman® Gene Expression Assays</i>	39
2.13	<i>Antikörper</i>	40
2.14	<i>Geräte</i>	41
3	<i>Methoden</i>	43
3.1	<i>Arbeiten mit Bakterien</i>	43
3.1.1	<i>Herstellung chemisch kompetenter Bakterien</i>	43
3.1.2	<i>Transformation chemisch kompetenter Bakterien</i>	43
3.1.3	<i>Kryokonservierung von Bakterien</i>	44
3.2	<i>DNA- und RNA-Techniken</i>	44
3.2.1	<i>Plasmid- DNA-Isolation aus Bakterien</i>	44
3.2.2	<i>Isolierung eukaryotischer DNA aus Zellen</i>	44
3.2.3	<i>Isolierung viraler DNA</i>	45
3.2.4	<i>Isolation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen</i>	45
3.2.5	<i>Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration und -reinheit</i>	46
3.2.6	<i>Agarosegelelektrophorese</i>	46
3.2.7	<i>DNA-Extraktion aus Agarosegelen</i>	47
3.2.8	<i>Klonierung von DNA-Fragmenten</i>	47
3.2.9	<i>Sequenzierung von DNA</i>	48
3.2.10	<i>Genexpressionsanalyse mittels quantitative PCR</i>	49

3.2.11	<i>RNA-Agarose-Gelelektrophorese und Northern Blot</i>	50
3.2.12	<i>Radioaktive Hybridisierung zum Nachweis von spezifischen RNA- Fragmenten</i>	51
3.2.13	<i>Konstruktion von pAd5-mmu-miR-30c-1 und pAd5-mmu-miR-133b</i>	52
3.3	<i>Konstruktion und Produktion adenoviraler Vektoren</i>	53
3.3.1	<i>Generierung des RR5-Longarm</i>	53
3.3.2	<i>Restriktion, Phenolreinigung und Ligation</i>	54
3.3.3	<i>Adenoviruspräparation</i>	55
3.3.4	<i>Adenovirus-Reinigung durch Ultrazentrifugation über CsCl-Dichtegradienten</i>	55
3.3.5	<i>Entfernung des CsCl-Salzes</i>	56
3.4	<i>Zellbiologische Methoden</i>	57
3.4.1	<i>Präparation primärer muriner und humaner adulter Kardiofibroblasten</i>	57
3.4.2	<i>Präparation primärer muriner embryonaler Kardiofibroblasten und Kardiomyozyten</i> ...	57
3.4.3	<i>Präparation von primären neonatalen Rattenkardiofibroblasten</i>	58
3.4.4	<i>Passagierung von primärer und permanenter Zellen</i>	58
3.4.5	<i>Bestimmung der Zellzahl</i>	59
3.4.6	<i>Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen</i>	59
3.4.7	<i>Transfektion eukaryotischer Zellen</i>	59
3.4.8	<i>Transduktion von Zellkulturen mit rekombinanten Adenoviren</i>	60
3.4.9	<i>Transduktion mit TransMAX als Enhancer</i>	60
3.4.10	<i>Transduktion mit Polybrene als Enhancer</i>	61
3.4.11	<i>Transduktion mit Na-Caprato als Enhancer</i>	61
3.4.12	<i>Mechanische Stimulation von murinen adulten Kardiofibroblasten</i>	61
3.4.13	<i>Isolation primärer muriner Splenozyten</i>	61
3.4.14	<i>Migrationsassay</i>	62
3.5	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	62
3.5.1	<i>Isolation von Proteinen</i>	62
3.5.2	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration</i>	63
3.5.3	<i>SDS-PAGE und Western Blot</i>	63
3.5.4	<i>Immunfluoreszenz-Färbung</i>	65
3.6	<i>Statistik</i>	65
4	<i>Ergebnisse</i>	67
4.1	<i>Expressionsanalyse der CCN- Familie</i>	67
4.1.1	<i>Expressionsprofil der CCN- Familie in humanen Geweben</i>	67
4.1.2	<i>Expression und Regulation der CCN- Proteine bei Myokardinfarkt, Myokarditis und Kardiomyopathie</i>	69

4.2	<i>Identifikation und Charakterisierung des CTGF- exprimierenden Zelltyps im Myokard</i>	84
4.3	<i>Etablierung nichthumaner fibroblastischer Zellsysteme</i>	85
4.3.1	<i>NIH- 3T3- Zellen</i>	85
4.3.2	<i>Primärzellkulturen kardialer Fibroblasten</i>	86
4.4	<i>Evaluierung der shRNAs gegen CTGF</i>	92
4.4.1	<i>miRNAs als Regulatoren der CTGF- Expression</i>	93
4.5	<i>Mechanische Aktivierung adulter muriner Kardiofibroblasten</i>	95
4.5.1	<i>Mechanische Kurzzeitstimulation adulter muriner Kardiofibroblasten</i>	95
4.5.2	<i>Mechanische Langzeitstimulation adulter muriner Kardiofibroblasten</i>	101
4.5.3	<i>Verifizierung des antiinflammatorischen Effekts der RNAi- vermittelten CTGF- Depletion</i>	108
4.5.4	<i>Transfer des gentherapeutischen RNAi- Ansatzes in Homo sapiens</i>	109
5	<i>Diskussion</i>	119
5.1	<i>Veränderte Expressionsmuster bei Mitgliedern der CCN- Familie in Folge von Kardiomyopathien</i>	119
5.2	<i>CTGF als therapeutisches Target bei Kardiomyopathien</i>	123
5.2.1	<i>CTGF als profibrotischer und proinflammatorischer Faktor</i>	123
5.3	<i>Adulte kardiale Fibroblasten als Schlüssel bei der Behandlung von Kardiomyopathien</i>	127
5.4	<i>Etablierung kardiofibroblastischer Zellkultursysteme</i>	129
5.5	<i>Effizienter Gentransfer als Grundlage einer erfolgreichen Gentherapie</i>	130
5.6	<i>RNA- Interferenz- basierter Ansatz zur Depletion von CTGF</i>	132
5.7	<i>Mechanische Stimulation adulter muriner Kardiofibroblasten</i>	134
5.8	<i>Auswirkungen der CTGF- Depletion auf die Expression fibrose- und inflammationsassoziiertes Gene in aktivierten Fibroblasten</i>	137
5.9	<i>RNA- Interferenz bei Kulturen individueller humaner Kardiofibroblasten</i>	139
6	<i>Zusammenfassung</i>	143
7	<i>Summary</i>	145
8	<i>Literaturverzeichnis</i>	147
9	<i>Publikationsverzeichnis</i>	180
9.1	<i>Artikel</i>	180
9.2	<i>Poster</i>	180
10	<i>Anhang</i>	181

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziierte Viren
A. bidest.	zweifach destilliertes Wasser
ACK	<i>ammonium-chloride-potassium</i>
ADAMTS	<i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>
Ad5, AdV	Adenovirus Serotyp 5, adenoviraler Vektor
AGO	Argonaute
AmpR	Ampicillinresistenz
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaar
BMP	<i>bone morphogenetic</i> Protein
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CAR, CXADR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
CCL, CCR	<i>chemokine (C-C motif) ligand, CC chemokine receptor</i>
CCN1/Cyr61	<i>cysteine-rich angiogenic inducer 61</i>
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
CIP	<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i>
CMV	Cytomegalievirus
Co	<i>control</i> , Kontrolle
Col	Kollagen
CT	Carboxyl-terminale Domäne
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
CVB3	Coxsackievirus-B3
DCM, DCMi	dilatative Kardiomyopathie, inflammatorische DCM
dCTP, dNTP	Deoxycytidintriphosphat, Desoxyribonukleotidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome chromosomal (or critical) region 8</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemilumineszenz
ECM	extrazelluläre Matrix
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FKS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>

GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HBGF	<i>heparin binding growth factor</i>
HBSS	<i>Hank's buffered salt solution</i>
H/E	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HSPG	<i>heparan sulfate proteoglycan</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
Hz	Hertz
IGFBP	<i>insulin-like growth factor binding protein</i>
IL	Interleukin
ITR	<i>inverted terminal repeat</i>
JAK	Janus Kinase
kb	Kilobase
kDa	Kilo-Dalton
LRP	<i>low density lipoprotein receptor- related proteins</i>
M, mM, μ M	Molar, Milli-, Mikromolar
mA	Milli-Ampere
MAP, MAPK	<i>mitogen activated protein, MAP Kinase</i>
MCP	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
mg, μ g	Milli-, Mikrogramm
MI	Myokardinfarkt
min	Minute
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
miRNA	<i>microRNA</i>
ml, μ l	Milli-, Mikroliter
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
ng	Nanogramm
NGF	<i>nerve growth factor</i>
nm	Nanometer
NOV	<i>nephroblastoma overexpressed gene</i>
nt	Nukleotide
N-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
OTCD	Ornithin- Transcarbamylase-Defizienz
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PACT	<i>protein kinase R- activating protein</i>
P-Bodies	<i>processing bodies</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR, RT-qPCR	Polymerase Kettenreaktion, Real-Time quantitative PCR
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
VI	

<i>pfu</i>	<i>plaque forming units</i>
pH	pondus Hydrogenii
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
piRNA	<i>piwi- interacting RNA</i>
PKC	Proteinkinase C
Pol	Polymerase
poly A	Polyadenylierungssignal
pre-miRNA	<i>precursor miRNAs</i>
pri-miRNA	primäre miRNA
P/S	Penicillin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RCA	<i>replication competent adenovirus</i>
RdRP	<i>RNA- depending RNA- Polymerase</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA, mRNA, rRNA	Ribonukleinsäure, <i>messenger RNA</i> , ribosomale RNA
RNAi	RNA- Interferenz
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	reverse Transkriptase, Raumtemperatur
RR5	adenovirales Wildtypgenom Ad-d1309
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
shRNA, siRNA	<i>short hairpin-RNA, small interfering-RNA</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SSC	<i>saline-sodium citrate</i>
ssDNA, ssRNA	einzelsträngige DNA, RNA
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAR	<i>Trans-activation response element</i>
TBS, TBST	<i>Tris buffered saline, TBS with Tween 20</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TIMP	<i>tissue inhibitors of metalloproteinase</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRBP	TAR RNA binding protein
TSP	Thrombospondin
U	<i>unit</i>
UTR	untranslatierte Region
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial cell growth factor</i>
Vol	Volumenteil
v/v, w/v	<i>volume/volume, weight/volume</i>
vWC	<i>von Willebrand factor type C</i>
WISP	<i>Wnt-inducible secreted protein</i>

1 Einleitung

1.1 Das Myokard

Das Myokard stellt den muskulären Bestandteil des Herzens dar, dessen zelluläre Zusammensetzung in Abhängigkeit von der Spezies variiert. So setzt es sich bei der Ratte aus rund 30 % Myozyten und 70 % anderer Zelltypen (Banerjee *et al.*, 2007; Baudino *et al.*, 2006; Camelliti *et al.*, 2005; Nag, 1980; Zak, 1974) oder bei der Maus aus 55 % Myozyten und 45 % anderer Zelltypen zusammen (Banerjee *et al.*, 2007). Die hauptsächlichen nichtmyozytären zellulären Bestandteile des Herzens umfassen kardialen Fibroblasten sowie Endothelzellen und vaskuläre glatte Muskelzellen (Baudino *et al.*, 2006; Camelliti *et al.*, 2005). Diese Zelltypen sind essentiell für die elektrischen, chemischen und biomechanischen Eigenschaften des Organs und bewahren dessen Struktur durch Zell-Zell-Interaktionen sowie die autokrine und parakrine Wirkung von sezernierten Faktoren (Baudino *et al.*, 2006; Camelliti *et al.*, 2004, 2005; Gaudesius *et al.*, 2003; Harvey and Rosenthal, 1999; Manabe *et al.*, 2002; Sussman *et al.*, 2002). Während der Herzfunktion interagieren die Zellen des Herzens dynamisch um auf homöostatische und pathologische Stimuli zu reagieren. Werden biochemische oder biomechanische Komponenten des Myokards modifiziert, kann es zu adaptiven, kompensatorischen oder schädlichen Veränderungen des Herzens kommen.

1.1.1 Fibroblasten

Bei Fibroblasten handelt es sich um Zellen des Bindegewebes, die in allen Vertebraten gefunden werden. Eigentlich sollten sie als Zellen mesenchymalen Ursprungs definiert werden, die eine Vielzahl von ECM (*extracellular matrix*; extrazelluläre Matrix)-Komponenten wie Kollagene und Fibronectin produzieren (Kanekar *et al.*, 1998). Meist erfolgt die Definition jedoch aufgrund morphologischer Charakteristika, die, abhängig von der Lokalisation innerhalb eines Organismus, eine große Heterogenität im Phänotyp und Expressionsprofil aufweisen können (Chang *et al.*, 2002; Fries *et al.*, 1994).

1.1.1.1 Kardiale Fibroblasten

Morphologisch sind kardiale Fibroblasten flache, spindelförmige Zellen mit vielen, vom Zellkörper ausgehenden Fortsätzen. Sie zeichnen sich durch das Fehlen einer Basalmembran aus und unterscheiden sich somit von anderen permanenten Zelltypen des Herzens, welche alle eine Basalmembran besitzen (Souders *et al.*, 2009). Des Weiteren zeigen sie einen deutlich ausgebildeten Golgi-Apparat und ein umfangreiches raues endoplasmatisches Retikulum. Abhängig vom

Entwicklungsstadium können kardiale Fibroblasten aus verschiedenen Quellen stammen. Es wird angenommen, dass sie während der Zelldifferenzierung aus dem proepikardialen Organ hervorgehen. Diese epikardial abgeleiteten Zellen gelten als eine der Hauptquellen für kardiale Fibroblasten (Moorman and Christoffels, 2003; Norris *et al.*, 2008). Weitere Studien zeigten außerdem, dass kardiale Fibroblasten auch von Mesangioblasten abstammen können. Diese multipotenten Vorläuferzellen aus dem Knochenmark gehen aus hämatopoetischen Stammzellen hervor und haben die Fähigkeit, sowohl in vaskuläre (Endothelzellen) als auch in mesodermale (Fibroblasten) Zellen zu differenzieren (Cossu and Bianco, 2003).

Kardiale Fibroblasten sind unerlässlich bei der kardialen Entwicklung, der strukturellen und funktionellen Manifestation sowie dem *Remodeling* des Herzens. Dabei sind sie sowohl Quelle als auch Empfänger für verschiedene Stimuli, die bei der Koordination von chemischen, mechanischen und elektrischen Signalen zwischen zellulären und nichtzellulären Komponenten wichtig sind. Sie erfüllen globale Aufgaben bei der Proliferation, Migration, Myofibroblastendifferenzierung, Bildung und Degradation von Matrix sowie der Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Fibroblasten dienen also nicht nur als matrixproduzierende reparative Zellen, sondern erfüllen auch im Rahmen von Inflammation und Immunantwort (Smith *et al.*, 1997) sowie Angiogenese (Ito *et al.*, 2007) und Neoplasie verschiedenste Funktionen (Shinde and Frangogiannis, 2014).

Durch ihre Fortsätze bilden Fibroblasten innerhalb des endomyosialen Kollagennetzwerkes ein eigenes Netzwerk aus. Durch Zell- Zell- Kontakte und Zell- Matrix- Interaktionen, durch Proliferation sowie ECM- Synthese und Abbau erhalten sie die strukturelle Integrität aufrecht (Baxter *et al.*, 2008; Brown *et al.*, 2005; Camelliti *et al.*, 2005; Weber, 2004). So können sie auf chemische, mechanische und elektrische Signale reagieren und durch diese dynamischen Interaktionen die Form und Funktion des Herzens aufrecht erhalten (Banerjee *et al.*, 2006; Chilton *et al.*, 2007; Kohl, 2003; Louault *et al.*, 2008). Werden diese Signalwege gestört, kann dies zur kardialen Dysfunktion führen.

Eingebettet in die interstitielle und perivaskuläre extrazelluläre Matrix enthält das adulte Myokard auch eine große Anzahl von ruhenden Fibroblasten (Souders *et al.*, 2009). In Folge einer Gewebeschädigung werden diese Zellen aktiviert und sind an Narbenbildung und Matrix- *Remodeling* beteiligt.

1.1.2 Myofibroblasten

Mit Ausnahme der Herzklappensegel werden Myofibroblasten nicht im normalen, gesunden kardialen Gewebe gefunden (Souders *et al.*, 2009). Sie exprimieren kontraktile Proteine und sind deutlich mobiler als normale Fibroblasten. Der Phänotyp eines Myofibroblasten ist charakterisiert durch die Expression von α -SMA (*smooth muscle actin*), Kontraktilität, eine höhere Synthese- und

Sekretionsrate von ECM- Komponenten und einer Apoptoseresistenz (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014). Des Weiteren zeigen Myofibroblasten eine erhöhte Expression von Zytokinen, Chemokinen und Zelloberflächenrezeptoren (Abraham and Varga, 2005; Strehlow and Korn, 1998) sowie Veränderungen auf epigenetischer Ebene (Wang *et al.*, 2006). Sehr gut charakterisiert ist die Myofibroblastendifferenzierung aus residenten Fibroblasten als Antwort auf die profibrotische Stimulierung in Form von TGF β 1, Zytokinen, ECM- Veränderungen oder andere Wachstumsfaktoren (Kaden *et al.*, 2005; Serini *et al.*, 1998; Tamaoki *et al.*, 2005; Walker *et al.*, 2004). Zusätzlich wurde beschrieben, dass sie auch aus verschiedenen anderen Vorläuferzellen wie Epithelzellen (Jinde *et al.*, 2001; Liu, 2004; Ng *et al.*, 1998), Endothelzellen (Piera-Velazquez *et al.*, 2011), Perizyten (Hung *et al.*, 2013), multipotenten Monozyten (Pilling and Gomer, 2012) oder Fibrozyten (Quan *et al.*, 2004) differenzieren können.

Myofibroblasten spielen eine entscheidende Rolle bei der reparativen Fibrose nach einer Schädigung des Myokards (Calderone *et al.*, 2006) und sind eng mit hypertrophen fibrotischen Narben in verschiedenen Operationsmodellen assoziiert. Nach einer Gewebeschädigung nehmen diese transdifferenzierten Zellen eine wichtige Funktion bei der Wundheilung ein indem sie die ECM kontrahieren und so essentiell beim Wundverschluss und der strukturellen Integrität von heilenden Wunden sind (Gabbiani, 2003; Midwood *et al.*, 2004; Sun and Weber, 2003). Da Myofibroblasten kontraktile Proteine exprimieren, haben sie die Fähigkeit, mechanischen Zug auf die sich umbildende Matrix auszuüben und unterstützen so beim Verschluss der Wunde und der Reduktion der Vernarbung (Brown and Dejana, 2003; Gabbiani, 2003; Sun and Weber, 2003).

Myofibroblasten sind vermehrt an geschädigten Arealen lokalisiert, wo die Synthese und Deposition von Kollagen die Narbenbildung und Fibrose fördert (Sun and Weber, 2000). Wenn sich die Narbe gebildet hat, durchleben alle Zellen in der Narbe mit Ausnahme der Myofibroblasten Apoptose und hinterlassen ein Gewebe, die hauptsächlich aus Kollagen und ECM- Proteinen besteht (Gurtner *et al.*, 2008). Somit sind Myofibroblasten stark in die Regulation von kardialen Umbauprozessen, kardialer Dysfunktion und letztlich Herzinsuffizienz involviert.

1.2 Fibrose und Remodeling

Als Fibrose versteht man die Verdickung der ECM als Folge von Inflammation oder physischer Gewebeschädigung (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014). Sie spielt eine signifikante Rolle in vielen Fällen von Organversagen wie z.B. systemischer Sklerose, idiopathischer pulmonarer Fibrose, Leberzirrhose, Nierenfibrose oder kardialer Fibrose bei kardialer Hypertrophie, welche letztlich zu Herzversagen führen kann (Hoyles *et al.*, 2011). Die Zunahme von ECM oder Fibrose kann reparativ in Arealen mit Myozytenverlust erfolgen oder reaktiv sein, indem die Zunahme an anderen Stellen

erfolgt. Fibrose hat signifikante Folgen für die Herzfunktion, da die Synthese und Deposition von ECM in einer stärkeren mechanischen Steifheit resultiert und so zur diastolischen Dysfunktion beiträgt. Progressiv fortschreitende Fibrose kann zu systolischer Dysfunktion und linksventrikulärer Hypertrophie führen. Außerdem können erhöhte Kollagenlevel die elektrophysiologische Kommunikation zwischen Myozyten stören (Souders *et al.*, 2009).

1.2.1 Kardiale Fibroblasten und Remodeling

Remodeling wird als Veränderung der Organisation des Myokards definiert und erlaubt dem Herzen, sich an Veränderungen von chemischen, mechanischen und elektrischen Signalen anzupassen (Brower *et al.*, 2002; Chancey *et al.*, 2002; Stewart *et al.*, 2003). Fibroblasten gelten als Schlüsselkomponenten bei diesem Prozess, da sie die Fähigkeit besitzen, ECM zu sezernieren und auch abzubauen. Die Degradation von Kollagen erfordert die Anwesenheit von Matrixmetalloproteasen (MMPs) (Raffetto and Khalil, 2008; Visse and Nagase, 2003). Im normal funktionierenden Herzen ist die Expression und Funktion von MMPs streng reguliert, wohingegen die MMP- Expression und Aktivität unter pathologischen Bedingungen deutlich erhöht ist, was letztlich zur Degradation der ECM führt und tief greifende Konsequenzen für die kardiale Funktion hat. In Folge einer kardialen Schädigung wird eine Aktivierung und Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten beschrieben (Brown *et al.*, 2005; Frangogiannis *et al.*, 2000; Weber, 2004), was wiederum mit einer Zunahme der Zytokin- und Wachstumsfaktorsekretion assoziiert ist. Als Antwort auf diese Faktoren proliferieren Myofibroblasten, migrieren und bauen das myokardiale Interstitium durch eine vermehrte Sekretion von MMPs und Kollagen um (Brown *et al.*, 2005; Lindsey *et al.*, 2006; Raizman *et al.*, 2007; Weber, 2004). Um den Umbauprozess weiter zu fördern, sezernieren Fibroblasten große Mengen von Wachstumsfaktoren und Zytokinen wie IL-1 β , IL-6 und *tumor necrosis factor α* (TNF α), welche dann wiederum MMPs aktivieren und so zu weiterem kardialen *Remodeling* führen. Zunächst sind all diese Veränderungen für eine reparative Wundheilung notwendig, aber mit der Zeit werden sie maladaptiv und führen zu Fibrose und reduzierter kardialer Funktion.

1.3 Definition und Klassifikation von Kardiomyopathien

1.3.1 AHA und ESC

Kardiomyopathien stellen eine wichtige und heterogene Gruppe von Erkrankungen dar, die von der *World Health Organisation* und der *International Society and Federation* (WHO/ ISFC) als Herzmuskelerkrankungen definiert werden, die mit einer Fehlfunktion des Herzens einhergehen

(Richardson *et al.*, 1996). Diese Klassifikation unterteilt primäre Kardiomyopathien in dilatative Kardiomyopathie (DCM), hypertrophe Kardiomyopathie (HCM), restriktive Kardiomyopathie (RCM), arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVCM) und nicht klassifizierbare Kardiomyopathien (NCCM). Diese Kardiomyopathien können durch invasive und nichtinvasive bildgebende Verfahren evaluiert werden. Als sekundäre Kardiomyopathien galten Herzmuskelerkrankungen bekannter Ursache und umfassten inflammatorische Herzmuskelerkrankungen (Myokarditis, Perimyokarditis), hypertensive Kardiomyopathie, ischämische Kardiomyopathie und andere Formen von Herzinsuffizienz (*Heart Failure*, HF). Aufgrund der zunehmenden Kenntnisse von genetischen Ursachen für Kardiomyopathien und der Weiterentwicklung der nichtinvasiven phänotypischen Charakterisierung haben die *American Heart Association* (AHA) (Maron *et al.*, 2006) und die *European Society of Cardiology* (ESC) (Elliott *et al.*, 2008) die Klassifikation nochmals überarbeitet. Die AHA beschreibt 2006 Kardiomyopathien ausgehend von den genetischen Grundlagen die Ätiologie gefolgt von der phänotypischen Beschreibung der Myokardbeteiligung als heterogene Gruppe von Erkrankungen des Myokards, die mit einer mechanischen und/oder elektrischen Dysfunktion einhergeht. Sie weisen in der Regel eine inadäquate ventrikuläre Hypertrophie oder Dilatation auf und sind auf eine Vielzahl, meist genetischer Ursachen zurückzuführen (Maron *et al.*, 2006). Primäre Kardiomyopathien beziehen sich auf die alleinige oder hauptsächliche Betroffenheit des Herzens, während sekundäre Kardiomyopathien solche sind, bei denen die myokardiale Dysfunktion Teil eines systemischen Prozesses ist.

Im Gegensatz dazu behält die ESC im Jahr 2008 die Unterteilung in morphofunktionelle Kategorien bei und unterteilt diese weiter in genetische und nichtgenetische Gruppen. Von einer Unterteilung in primäre und sekundäre Kardiomyopathien wurde hier abgesehen, da es durchaus zu Überschneidungen kommen kann. In der ESC- Klassifikation wird Kardiomyopathie als myokardiale Störung beschrieben, bei welcher der Herzmuskel strukturelle und funktionelle Anomalitäten aufweist. Die Aufteilung in morphofunktionelle Phänotypen beinhaltet dilatative, hypertrophe, restriktive und arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie sowie nicht klassifizierte Formen. Jede dieser Klassen wird weiter unterteilt in familiäre, erbliche und nichtfamiliäre, nichterbliche Formen. Als familiär definiert die ESC eine Kardiomyopathie dann, wenn mehr als ein Familienmitglied betroffen ist. Beide Klassifikationen schließen spezifische Herzmuskelerkrankungen aufgrund von koronaren, hypertensiven, kongenitalen oder die Herzklappen betreffenden Erkrankungen aus.

1.3.2 MOGE(S)

Aufgrund der zugrundeliegenden Genmutationen wurden 2013 bei der durch die *World Heart Federation* (WHF) anerkannten Phänotyp- Genotyp- basierten Klassifikation von Kardiomyopathien einige neue Begriffe wie Sarkomyopathien (Pankuweit *et al.*, 2009) oder Kardiodystrophenopathien (Diegoli *et al.*, 2011) eingeführt. Da diese jedoch auch die Beschreibung der Kardiomyopathien immer undurchsichtiger werden lassen, ist es umso wichtiger, eine einheitliche Nomenklatur zu entwickeln. Die Phänotyp- Genotyp- basierte Klassifikation beschreibt Kardiomyopathien als Erkrankungen, die durch ein morphologisch und funktionell anormales Myokard charakterisiert werden und die Abwesenheit anderer Erkrankungen voraussetzen, welche den beobachteten Phänotyp hervorrufen könnten. Die Klassifikation zielt auf 5 einfache Merkmale einer kardiomyopathischen Erkrankung ab. Diese umfassen die morphofunktionelle Charakteristik (M), Organbeteiligung (O), genetische oder familiäre Vererbungsmuster (G) und eine genaue ätiologische Erläuterung (E) mit Details über genetische Defekte und zugrundeliegende Ursachen oder Erkrankungen. Informationen über den funktionellen Status (S) werden anhand der Einteilung der *American College of Cardiology /American Heart Association* (ACC/ AHA) in die Stadien A bis D und der funktionellen Klassen I bis IV der *New York Heart Association* (NYHA) vorgenommen. Aufgrund der 5 Merkmale wird diese neue Klassifikation MOGE(S) genannt.

1.3.3 Dilatative Kardiomyopathie (DCM)

Die DCM wird charakterisiert durch das Vorhandensein einer Dilatation und systolischen Dysfunktion des linken Ventrikels (LV) sowie das Nichtvorhandensein anderer Erkrankungen, die eine globale systolische Störung verursachen können. Eine rechtsventrikuläre Dilatation und Dysfunktion kann vorliegen, ist aber für die Diagnose nicht notwendig (Elliott *et al.*, 2008). Die Prävalenz liegt bei 1 von 2500 und die Mortalität in 5 Jahren in Abhängigkeit von der Behandlung bei 30% bis 50%. Echokardiographische Kriterien für die Diagnose sind eine verminderte Ejektionsfraktion (EF) von weniger als 55% und ein linksventrikulärer Durchmesser bei Enddiastole (LVEDD) größer als 117%, ausgehend vom normalen Wert bezogen auf Alter und Körperoberfläche (Maisch *et al.*, 2012). Die Ätiologie des klinischen Phänotyps der dilatativen Kardiomyopathie umfasst genetische, autoimmune und virale Faktoren, wobei diese Faktoren im unterschiedlichen Ausmaß zusammenspielen (Arbustini *et al.*, 2000; Burkett and Hershberger, 2005; Mason, 2003; Mestroni *et al.*, 1999; Pankuweit *et al.*, 2000; Shaw *et al.*, 2002).

Mehr als 50% der DCM- Fälle haben genetische Ursachen (Charron *et al.*, 2010). Bisher wurden mehr als 40 Gene beschrieben, deren Mutation eine DCM zur Folge hat. Dies führt zu einer extremen genetischen Heterogenität (Hershberger *et al.*, 2009). Dabei werden die Defekte meist autosomal-

dominant vererbt, eine X-chromosomal rezessive oder autosomal- rezessive Vererbung sind eher selten (Charron *et al.*, 2010).

1.3.3.1 DCMi

In den Industrieländern sind etwa ein bis zwei Prozent der Gesamtbevölkerung von Herzinsuffizienz betroffen. Trotz des medizinischen Fortschritts ist die Prognose schlecht (Mosterd *et al.*, 1999; Redfield *et al.*, 2003). Bei einem Zehntel der Betroffenen wird eine inflammatorische dilatative Kardiomyopathie (DCMi) diagnostiziert (Felker *et al.*, 2000). Sie stellt eine der Hauptursachen für Herzinsuffizienz und plötzlichem Herztod bei Kindern und jungen Erwachsenen dar (Kallwellis-Opara *et al.*, 2007). Eine DCMi kann sich aus einer Myokarditis entwickeln. Dabei ist das klinische Bild einer Myokarditis sehr variabel und reicht vom asymptomatischen Verlauf, über fulminante Herzinsuffizienz bis zum plötzlichen Herztod (Morgera *et al.*, 1992). Als Ursache kommen meist kardiotope Infektionen gefolgt von einer Autoimmunantwort gegen Myokardgewebe in Betracht (Kania *et al.*, 2013). Neben Infektionen können Myokarditiden auch durch lokale Traumata, systemischen *Lupus erythematoses* (Wijetunga and Rockson, 2002) oder auch durch arzneimittelinduzierte Hypersensitivität verursacht werden. Dabei spielen insbesondere Diuretika, Antibiotika, Neuroreaktiva (Ben m'rad *et al.*, 2009; Pursnani *et al.*, 2009; Taliercio *et al.*, 1985) und TNF-Antagonisten eine Rolle (Slattery *et al.*, 2011), (Tabelle 1.1). Eine DCMi wird, neben den inflammatorischen Prozessen, durch eine zunehmende Verminderung der kardialen Kontraktilität, fortschreitender Fibrose und Dilatation der Ventrikel charakterisiert. Durch die Färbung von CD3⁺/CD45⁺- Zellen und einer Trichromfärbung können Fibrose und Inflammation histologisch nachgewiesen werden (Kania *et al.*, 2013).

Tabelle 1.1: Ursachen einer Myokarditis (nach Kania *et al.*, 2013)

Infektiös:	
Viral	Coxsackievirus B3; Parvovirus B19; Humanes Herpesvirus 6; Cytomegalivirus; Hepatitis C Virus; Adenovirus; Influenzavirus; Epstein-Barr Virus
Bakteriell	<i>Borellia burgdorferi</i> ; <i>Corynebacterium diphtheriae</i> ; rheumatisches Fieber (A- Streptokokken)
Parasitär	<i>Trypanosoma</i> ; <i>Babesia</i>
Nicht- infektiös:	
Toxisch	Strahlung; Alkohol; spezifische Arzneimitteltoxizität (Doxorubicin, Cyclophosphamide)
Hypersensitivität	Zahlreiche Arzneimittel (z.B. Penicilline, Sulphonamide, trizyklische Antidepressiva); Impfstoffe
Autoimmunerkrankungen	Rheumatoide Arthritis; Churg- Strauss- Syndrom; Kawasaki- Syndrom; (Dermato-)Myositis; systemischer <i>Lupus erythematoses</i> ; Sklerodermie

Inflammatorische und nach Infektionen auftretende Kardiomyopathien werden als spezielle Subtypen (Elliott *et al.*, 2008) der dilatativen Kardiomyopathie angesehen, wobei eine Inflammation des Myokards durch die WHF mit 14 oder mehr Lymphozyten (z.B. CD3, CD4+CD8 oder CD45R0) und Makrophagen (CD14, CD11c, CD68) pro mm² definiert wird. Dabei sollte beachtet werden, dass bei, durch Parvovirus B19 oder HHV6 verursachter Myokarditis und Persistenz überwiegend Makrophagen anzutreffen sind, wohingegen eine enterovirale oder adenovirale Infektion eher eine lymphozytische Inflammation verursacht (Maisch *et al.*, 2012). Die Ätiologie der Inflammation kann durch die Anwesenheit von mikrobieller RNA oder DNA mittels PCR, *in situ*- Hybridisierung oder Dot Blot bestimmt werden (Maisch *et al.*, 1999, 2000). In Europa zeigen die Häufigkeiten der Ätiologien in den letzten 15 Jahren eine epidemiologische Verschiebung von enteroviralen (CVB3; Coxsackie Virus Serotyp B3) und adenoviralen Infektionen zu Infektionen mit Parvovirus B19, HHV6 (humanes Herpesvirus 6) und CMV (Cytomegalievirus) (Kühl *et al.*, 2005; Pankuweit *et al.*, 2000, 2003, 2009). Der größte Teil der Patienten erkranken jedoch an einer autoreaktiven, d.h. virusnegative Form der Myokarditis (Maisch *et al.*, 2012). Die Prognose der DCM ist u.a. abhängig von der zugrundeliegenden Infektion, des Inflammationsprozesses und der Behandlung (Maisch *et al.*, 1991, 2002, 2003). Das klinische Bild einer dilatativen Kardiomyopathie kann sich also durch einzelne oder

multiple Ätiopathogenesen mit oder ohne viraler Persistenz und mit oder ohne Inflammation darstellen.

1.3.3.2 Therapieoptionen der DCMi

Die Behandlung einer DCMi erfolgt meist symptomatisch nach den Richtlinien für systolische Herzinsuffizienz der *European Society of Cardiology* (McMurray *et al.*, 2012). Dabei kommen ACE- (*angiotensin converting enzyme*) Hemmer, β -Blocker, Aldosteron- Antagonisten und Diuretika zum Einsatz. Werden bei einer DCMi Viren nachgewiesen, kommt eine antivirale Therapie mittels Interferon β in Frage (Kühl *et al.*, 2003, 2012). Im fortgeschrittenen Stadium kann auch die Implantation eines intrakardialen Defibrillators und/ oder eine kardiale Resynchronisierung indiziert sein (Kania *et al.*, 2013). Bei schweren Fällen erfolgt zur Überbrückung der Wartezeit bis zur Herztransplantation oder Erholung die vorübergehende Implantation eines externen ventrikulären Unterstützungssystems (VAD; *ventricular assist device*) (Chen *et al.*, 1999).

1.4 Die CCN- Familie

Die CCN- Familie stellt eine komplexe Familie von multifunktionalen, matrizellulären Proteinen dar, welche sechs Mitglieder umfasst. Das Akronym CCN leitet sich von Cyr61 (*cysteine rich protein 61*, CCN1), CTGF (*connective tissue growth factor*; CCN2) und Nov (*nephroblastoma overexpressed gene*, CCN3) als die drei erstentdeckten Mitgliedern der Familie ab (Bork, 1993). Die weiteren Mitglieder sind WISP1 (*Wnt-inducible secreted protein 1*, CCN4), WISP2 (*Wnt-inducible secreted protein 2*, CCN5) und WISP3 (*Wnt-inducible secreted protein 3*, CCN6). Sie sind an vielen verschiedenen biologischen Prozessen wie Adhäsion, Mitogenese, Migration und Chemotaxis, Überleben von Zellen, Differenzierung, Angiogenese, Chondrogenese, Tumorgenese sowie Wundheilung beteiligt (Brigstock *et al.*, 2003). Diese funktionelle Bandbreite der CCN- Proteine lässt sich auf ihren modularen Aufbau und das komplexe Spektrum von intra- und intermolekularen Interaktionen mit einer Vielzahl von regulatorischen Proteinen und Liganden zurückführen (Holbourn *et al.*, 2008). Im adulten Organismus werden die CCN- Gene in sich ständig erneuernden Geweben sowie bei der Schädigung, Reparatur oder Erkrankung von Gewebe unterschiedlich reguliert (Chaour and Goppelt-Strube, 2006).

1.4.1 Strukturelle Domänen der CCN- Proteine

Wie viele Proteine der extrazellulären Matrix bestehen auch die cysteinreichen Proteine der CCN-Familie aus einer Reihe eigenständiger Domänen (Abbildung 1.1). Sie teilen dieselbe modulare Struktur voneinander abgegrenzter Domänen, die sowohl trunkiert als auch als alleinstehend stabil vorliegen (Kubota *et al.*, 2006). Einem N- terminalen sekretorischen Signalpeptid schließen sich dabei vier multifunktionale Domänen an. Für diese Domänen sind eine Vielzahl von Bindungspartnern bekannt, die Einfluss auf multiple Signaltransduktionsprozesse nehmen können (Brigstock, 1999). Proteine, die zum Beispiel mit CTGF durch Erkennung dieser Domänen interagieren können, sind Integrine, LRP (low density lipoprotein receptor-related proteins), Wachstumsfaktoren und Komponenten der ECM (Hall-Glenn and Lyons, 2011). Die erste Domäne weist Homologien mit insulin-like growth factor binding Proteinen (IGFBPs) auf, hat aber nur eine sehr geringe Affinität zu IGF (insulin like growth factor) (Vorwerk *et al.*, 2002). Daran schließt sich ein von Willebrand factor Type C repeat- Modul (VWC) an. Dieses Motiv vermittelt z.B. die CTGF- Interaktionen mit den Integrinen $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ sowie mit Wachstumsfaktoren wie bone morphogenetic Proteinen (BMPs) und dem transforming growth factor β 1 (TGF β 1) (Abreu *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2004a; Gao and Brigstock, 2004; Leu *et al.*, 2002). Bei der dritten Domäne handelt es sich um ein type-1 thrombospondin (TSP) repeat von dem bekannt ist, dass er die Bindung von TSP an ECM- Proteine, MMPs und Integrine ermöglicht. Diese Domäne vermittelt die Interaktion von CTGF mit vascular endothelial growth factor (VEGF) und low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) (Gao and Brigstock, 2004; Hashimoto *et al.*, 2002). Das abschließende C- terminale (CT) Motiv beinhaltet eine cysteinreiche Region, welche denen in vielen Wachstumsfaktoren wie der TGF β 1- Superfamilie, platelet derived growth factor (PDGF) und nerve growth factor (NGF) ähnelt. Diese Domäne findet man auch in anderen sekretorischen Proteinen (Bork, 1993; Itasaki *et al.*, 2003; Katsube *et al.*, 2009). Sie vermittelt die Interaktion mit LRP6, Fibronectin, Perlecan und Fibulin- 1 (Mercurio *et al.*, 2004; Nishida *et al.*, 2003; Perbal *et al.*, 1999) und ist wahrscheinlich an der Dimerisierung und Heparinbindung beteiligt (Vilmos *et al.*, 2001). Strukturell nimmt WISP2 bei den CCN- Proteinen eine Sonderstellung ein, denn hier fehlt die CT- Domäne.

Das komplette CCN- Molekül wird durch einen flexiblen und proteasesensiblen Linker in eine N-terminale Hälfte mit der IGFBP- und der VWC- Domäne und die C- terminale Hälfte mit der TSP- und CT- Domäne unterteilt (Bork, 1993; Lau and Lam, 1999). Diese Linkerregion weist in Länge und Aminosäurezusammensetzung eine erhebliche Variabilität auf und kann durch bestimmte Matrixmetalloproteasen (MMP1, 2, 3, 7, 9, 13) proteolytisch gespalten werden (Hashimoto *et al.*, 2002). Zusätzliche Proteasen wie Elastase und Plasmin können die Linker zwischen den Domänen 1 und 2 bzw. 3 und 4 angreifen (Ball *et al.*, 1998a; Brigstock *et al.*, 1997; Hashimoto *et al.*, 2002; de Winter *et al.*, 2008). Durch die Spaltung dieser Stellen entstehen verkürzte bioaktive Komponenten,

die als Marker in einigen Erkrankungsarten wie fibrotische Erkrankungen (N- terminale Fragmente) (Gao and Brigstock, 2004) oder bei manchen Formen des Pankreaskarzinom (C- terminale Fragmente) (Gao and Brigstock, 2006) genutzt werden können. Diese verkürzten Komponenten können unterschiedliche biologische Eigenschaften aufweisen und könnten eine zusätzliche Option zur Regulation der biologischen Aktivität der CCN- Proteine darstellen (Brigstock, 1999; Perbal, 2001, 2004; Tong and Brigstock, 2006). Während jedes Modul seine eigene spezifische biologische Rolle erfüllt, sind viele funktionale Effekte der CCN- Familie durch das Zusammenspiel der Module begründet. Hier spielt vor allem der kumulative Effekt der Interaktion zwischen den verschiedenen Domänen und Rezeptoren eine entscheidende Rolle (Brigstock, 1999; Lau and Lam, 1999; Perbal, 2001). Terminal oder intern verkürzten Proteinen werden verschiedene biologische Aktivitäten zugeordnet, die auch mit pathologischen Prozessen verknüpft sein können (Perbal, 2001).

Die CCN- Proteine weisen eine 40 bis 60%ige Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz auf. Dies beinhaltet auch 38 Cysteinresten, welche in ihrer Position und Anzahl hoch konserviert sind und verteilt über die Primärstruktur der Moleküle 17 Disulfidbrücken bilden (Holbourn *et al.*, 2008). Davon Ausgenommen sind CCN5 mit nur 28 Cysteinen und CCN6, dem 4 Cysteine in der VWC- Domäne fehlen (Brigstock, 1999).

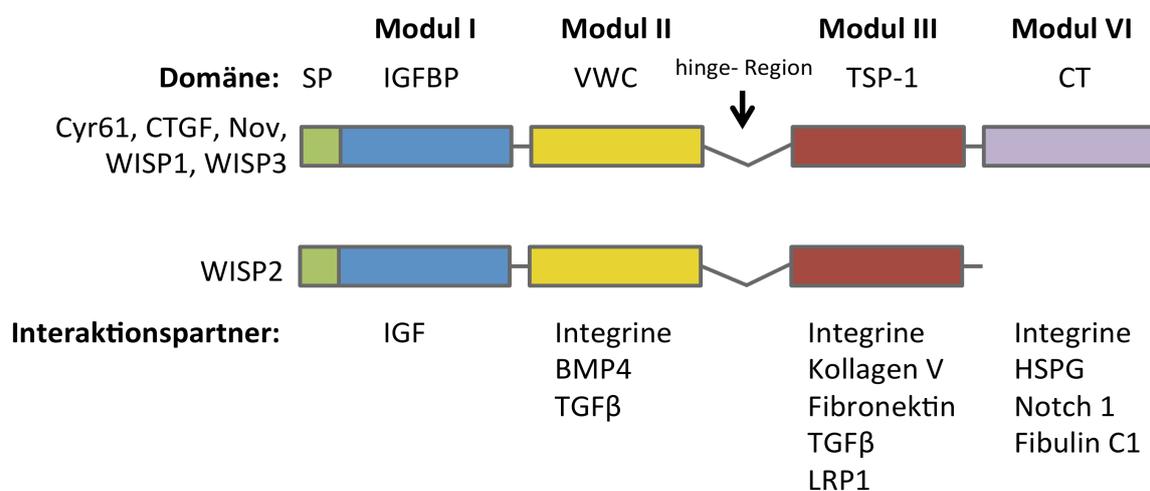


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der modularen Struktur der CCN-Familie Dargestellt sind die einzelnen Module und deren Interaktionspartner. Nähere Erläuterungen finden sich im Text (1.4.1). IGFBP – *insulin-like growth factor binding protein*; vWC – *von Willebrand factor C repeat domain*; TSP-1 – *thrombospondin repeat domain*; CT – *C-terminal cysteine knot domain*, HSPG – *heparan sulfate proteoglycan*, BMP4 - *bone morphogenetic protein 4*; TGFβ1 - *transforming growth factor β* (nach Leask and Abraham, 2006a und Malik *et al.*, 2015).

1.4.2 CCN1/Cyr61

Das humane Cyr61- Gen ist auf Chromosom 1 lokalisiert. Die Deletion von Cyr61 in Mäusen führt zu schweren Defekten des atrioventrikulären Septums (AVSD, *atrioventricular septal defects*) (Mo and Lau, 2006). Typisch für AVSDs ist das teilweise oder vollständige Fehlen der atrioventrikulären Klappe. Sie sind die häufigste genetische Ursache für kongenitale Herzfehler. Auf molekularer Ebene scheint Cyr61 als Adapter oder Gerüst zu agieren, welches Zytokine und Wachstumsfaktoren in die unmittelbare Nähe der Zelloberfläche bringt, indem es an Integrine, HSPGs und Rezeptortyrosinkinasen bindet (Chen and Du, 2007; Lau, 2012; Wolf *et al.*, 2010). Zusammen mit den adhäsiven und chemotaktischen Eigenschaften des rekombinanten Proteins liegt es nahe, dass Cyr61 die gerichtete Zellmigration während der Gewebenachbildung und Differenzierung unterstützt. Das Cyr61- *Signaling* resultiert letztlich in der Expressionssteigerung einer Vielzahl von Genen, die Zellwachstum, Zelldifferenzierung oder *Remodeling*- Prozesse des Bindegewebes modulieren (z.B. MMPs, TIMPs, Integrine, VEGF) (Si *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2005). Sowohl experimentelle als auch klinische Daten haben gezeigt, dass das Cyr61- Gen bei Inflammation und Gewebereparatur besonders hoch exprimiert wird. Zahlreiche chronische inflammatorische Erkrankungen wie Kolitis (Choi *et al.*, 2015), rheumatoide Arthritis (Komatsu *et al.*, 2015) und Atherosklerose (Lee *et al.*, 2007; Schober *et al.*, 2002) sind mit einem erhöhten Cyr61- Level assoziiert.

1.4.3 CCN2/CTGF

CTGF wurde als erstes aus HUVECs (*human umbilical vascular endothelial cells*) isoliert (Brigstock, 2002). Das Gen ist innerhalb eines Segments auf Chromosom 6 (q22.1- 23.1) lokalisiert, welches bei Patienten mit abdominalem Aortenaneurysma häufig deletiert ist (Biros *et al.*, 2014).

CTGF vermittelt durch das Integrin $\alpha_v\beta_3$ die Adhäsion, gerichtete Migration und Proliferation von Endothelzellen (Shi-Wen *et al.*, 2008). Über die Integrine $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_5\beta_1$ ist es außerdem ein Ligand für die Bildung der endothelialen Basalmembran und der Gefäßstabilisierung *in vitro* (Babic *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2004b). Darüber hinaus beeinflusst CTGF auch die Aktivität von verschiedenen anderen ECM- Komponenten wie VEGF, TGF β 1 und dem Wnt- Signalweg (Holbourn *et al.*, 2008).

Bei adulten Ratten liegt die CTGF- mRNA in Milz, Ovarien, Gastrointestinaltrakt, Prostata, Hoden und Herz in besonders hohem Level vor. In Thymus, Plazenta, Lunge, Skelettmuskulatur, Nieren und Pankreas sind die Transkriptionslevel geringer (Xu *et al.*, 2000). Die Korrelation zwischen hohem CTGF- Proteinlevel und der exzessiven Akkumulation und Deposition von ECM- Proteinen in fibrotischem Gewebe legt eine pathogene Rolle von CTGF in fibroproliferatorischen Erkrankungen nahe (Leask *et al.*, 2009). Es ist in der Lage, die Umwandlung von differenzierten Zellen wie

Endothelzellen oder Fibroblasten in aktive Myofibroblasten zu stimulieren (Abu El-Asrar *et al.*, 2015; Sonnylal *et al.*, 2013). Dabei werden fibrilläre Kollagene und α -smooth muscle actin (α -SMA) als typischer Marker für Myofibroblasten exprimiert (Leask and Abraham, 2006). Es gibt Hinweise, dass eine anti-CTGF-Therapie fibrotische Reaktionen erfolgreich abschwächen und somit den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen kann (Leask *et al.*, 2009).

1.4.3.1 Funktionen von CTGF

Analysen der CTGF-Funktion *in vivo* haben sich auf seine Funktion als Mediator der ECM-Synthese in verschiedenen fibrotischen Erkrankungen fokussiert. Aber CTGF und seine verwandten Familienmitglieder werden auch während der Entwicklung exprimiert und modulieren durch die Interaktion mit den Bindungspartnern Adhäsion, Proliferation, Überleben und Migration sowie die Produktion der ECM bei verschiedenen Zelltypen (Leask and Abraham, 2006). Bisher konnte *in vivo* keine der CTGF-Aktivitäten einer dieser spezifischen Interaktionen zugeordnet werden, da zum Einen die Rolle von CTGF bei der Entwicklung und Homöostase noch nicht vollständig geklärt ist und zum Anderen CTGF seine Effekte höchstwahrscheinlich durch multiple gewebespezifische Mechanismen vermittelt (Hall-Glenn and Lyons, 2011). CTGF wird sowohl während der embryonalen und postnatalen Entwicklung als auch in adulten Geweben exprimiert. Bei pathologischen Prozessen wie Fibrose, Atherosklerose, Osteoarthritis und auch verschiedene Krebserkrankungen zeigt sich eine deutlich erhöhte CTGF-Expression (Chen and Lau, 2009).

1.4.3.2 CTGF und Fibrose

In vivo Untersuchungen der CTGF-Funktion konzentrieren sich meist auf seine Rolle bei fibrotischen Prozessen. Durch aktivierte kontraktile Fibroblasten, sogenannte Myofibroblasten, erfolgt eine exzessive Deposition von extrazellulärer Matrix (Shi-Wen *et al.*, 2008). Die Überexpression von CTGF ist in verschiedenen Geweben ein Kennzeichen von Fibrose und gilt als Mediator der profibrotischen Effekte von TGF β 1. Ob CTGF nun fibrotische Prozesse verursacht oder lediglich als Marker für Fibrose dient, ist noch unklar (Igarashi *et al.*, 1993; Leask and Abraham, 2006; Mori *et al.*, 1999). Jedoch haben verschiedene transgene Mausmodelle unerwartete Funktionen von CTGF bei der Entstehung und dem Fortschreiten von Fibrose aufgedeckt. So erschienen Mäuse, die CTGF in der Leber überexprimierten, gesund. Erst nach Verletzung des Gewebes zeigte sich eine vermehrte Fibrosierung (Tong *et al.*, 2009). Dies deutet darauf hin, dass ein Überschuss von CTGF in diesem Organ nicht ausreichend ist oder insgesamt die Höhe der CTGF-Expression nicht ausreichend war, um fibrotische Prozesse zu induzieren. Letzteres wird durch ein transgenes Mausmodell unterstützt,

bei welchem CTGF unter der Kontrolle eines fibrosespezifischen *Enhancers* des Typ 1 Kollagens steht. Die Tiere entwickelten dosisabhängig, d.h. abhängig von der Zahl der Transgeninsertionen, eine systemische Multiorganfibrose mit einer exzessiven Produktion in Dermis, Nieren und Lunge (Sonnylal *et al.*, 2010). Liu *et al.* generierten ein konditionelles Mausmodell, bei welchem CTGF spezifisch in Fibroblasten und *smooth muscle cells* (glatten Muskelzellen) deletiert wurde (Liu *et al.*, 2011). Übereinstimmend mit den Ergebnissen, dass eine Überexpression von CTGF in Fibroblasten systemische Fibrose induziert (Sonnylal *et al.*, 2010), führt der Verlust von CTGF zu einer deutlich reduzierten Ausbildung von Bleomycin- induzierter Hautfibrose (Liu *et al.*, 2011). Dieser Effekt war TGF β 1- unabhängig und der Verlust von CTGF beeinflusste nicht die Fähigkeit von TGF β 1, die Expression von α -SMA oder Kollagen Typ 1 zu induzieren.

Transgene Mausmodelle ermöglichen auch unerwartete Einblicke in die CTGF- Funktionen im Herzen. CTGF ist im sich entwickelnden Herzen zwar hoch exprimiert, doch ist bisher unbekannt, warum es für die kardiale Entwicklung notwendig ist. Die Expression von CTGF ist auch während kardialer Fibrose deutlich erhöht und kann die Proliferation kardialer *smooth muscle cells* stimulieren (Teekakirikul *et al.*, 2010). Bisher wurden zwei transgene Mausmodelle mit kardialer Überexpression von CTGF entwickelt (Ahmed *et al.*, 2011; Panek *et al.*, 2009). Dabei konnten keine Anzeichen für fibrotische Veränderungen festgestellt werden, weder basal noch als Antwort auf kardiale Ischämie- und Reperfusionsschäden oder akuter Hypertonie. Beim Modell von Ahmed *et al.* zeigten CTGF- transgene Herzen eine erhöhte myokardiale Expression von Prokollagen und Fibronectin in Verbindung mit erhöhtem MMP3- Level (Ahmed *et al.*, 2011). Wurde eine Schädigung durch kardiale Ischämie oder Reperfusion herbeigeführt, stellte sich die CTGF- Überexpression als kardioprotektiv dar. CTGF ist demnach nicht immer profibrotisch, sondern kann auch protektive Funktionen in adulten Geweben erfüllen. Die Effekte von einer CTGF- Überexpression sind dabei sowohl dosisabhängig als auch kontextspezifisch. Angesichts der großen Anzahl von Wachstumsfaktoren, ECM- Komponenten, Integrinen und anderen Rezeptoren, die *in vitro* mit CTGF interagieren können, ist es naheliegend, dass CTGF abhängig von der Dosis viele verschiedene Funktionen innerhalb eines Gewebes ausüben kann (Hall-Glenn and Lyons, 2011).

1.4.4 CCN3/Nov

Nov wird auf Chromosom 8 des humanen Genoms kodiert. Während der Embryonalentwicklung wird es in Derivaten aller drei Keimblätter exprimiert und weist besonders hohe Level in Skelettmuskulatur, der glatten Muskulatur der Blutgefäße, dem Nervensystem, der Nebennierenrinde und differenzierten Chondrozyten auf (Perbal, 2015; Su *et al.*, 2001). Mäuse, bei denen Exon 3 für die VWC- Domäne deletiert wurde, sind nicht in der Lage, Nov in Volllänge zu

exprimieren. Sie zeigen bei der kardialen Entwicklung eine Deformation der Endokardkissen, welche mit Septumdefekten und einer verzögerten Fusion einhergehen. Bei adulten Tieren zeigte sich eine Kardiomyopathie mit Hypertrophie und Kalzifikation des Septums sowie der Dilatation des linken Ventrikels (Heath *et al.*, 2008).

1.4.5 CCN4/ WISP1

WISP1 wird, wie auch WISP2 und WISP3 durch WNT1 induziert (Pennica *et al.*, 1998). Während der Entwicklung wird es ausschließlich von Osteoblasten und osteoblastischen Progenitorzellen exprimiert (French *et al.*, 2004). In Adulten wird WISP1 unter anderem in Epithelien, Herz, Lunge, Niere, Pankreas, Placenta, Ovarien, Milz und Gehirn exprimiert (Katoh and Katoh, 2005). Durch WISP1 wird der AKT Kinase- Signalweg aktiviert, was zu einer signifikanten Induktion der Zellproliferation, ECM- Produktion und Expression profibrotischer Marker führt (Berschneider and Königshoff, 2011). Die Reduktion der WISP1 - Aktivität durch spezifische Antikörper resultiert in einer verminderten Expression fibrosetypischer Gene und mildert den Verlauf von Lungenfibrose signifikant (Königshoff *et al.*, 2009).

1.4.6 CCN5/WISP2

WISP2 nimmt strukturell eine Sonderstellung in der CCN- Familie ein, denn ihm fehlt die carboxyterminale Domäne (Abbildung 1.1). Diese ist für die proliferative Aktivität bei Cyr61 und CTGF essentiell (Russo and Castellot, 2010). Dieses Mitglied der CCN- Familie wird in nahezu allen embryonalen Entwicklungsstufen exprimiert und bleibt auch in verschiedenen adulten Organen präsent (Ball *et al.*, 1998). Dabei liegt es zum Einen nahe mit der Zelloberfläche assoziiert vor, zum Anderen ist es auch im Nukleus nachweisbar (Gray *et al.*, 2007). Besonders hohe Spiegel werden in Endothel und glatter Muskulatur der Venen, Arterien und im Myokard exprimiert. Es inhibiert sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Proliferation und Migration von vaskulären glatten Muskelzellen (Lake and Castellot, 2003; Mason *et al.*, 2004) indem es die Aktivität von MMPs reduziert (Banerjee *et al.*, 2008). Es wird davon ausgegangen, dass die antiproliferatorische Aktivität von WISP2 als Gegengewicht zur mitogenen Aktivität der anderen CCN-Mitglieder fungiert (Ball *et al.*, 1998). Auch der TGF β 1- Signalweg wird durch WISP2 gehemmt. Dabei wird auch der Fortschritt von CTGF-vermittelter Fibrose supprimiert (Yoon *et al.*, 2010). Yoon *et al.* zeigten auch, dass die Deletion der C-terminalen Domäne von CTGF dieses in ein WISP2-ähnliches Molekül transformiert und die Fusion der CT-Domäne von CTGF an den Carboxyterminus von WISP2 dieses in ein CTGF- ähnliches Molekül umwandelt, welches auf Kardiomyozyten prohypertroph wirkt und Fibrose fördert.

1.4.7 CCN6/WISP3

WISP3 ist essentiell für den Erhalt der Gelenkknorpel (Baker *et al.*, 2012). Es scheint an der Genregulation von Proteinase wie die ADAMTSs (*A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) und MMPs beteiligt zu sein (Baker *et al.*, 2012; Fang *et al.*, 2014). In immortalisierten, WISP3- überexprimierenden Chondrozytenzelllinien wird die Expression von ADAMTS4 und ADAMTS5 deutlich reduziert, während die Expression von MMP1 und MMP10 gesteigert ist. Es ist nicht bekannt, welche Funktionen WISP3 im kardiovaskulären System hat.

1.5 Gentherapie

Als Gentherapie wird die Nutzung von Nukleinsäuren (DNA oder RNA) für die Behandlung, Heilung oder Prävention von Erkrankungen bezeichnet. Abhängig von der Art der Erkrankung kann dies entweder durch die Einbringung eines funktionellen therapeutischen Gens zur Substitution des defekten oder fehlenden endogenen Gegenstücks erfolgen oder durch die Expressionsreduktion eines schädlichen oder defekten Genprodukts mittels nackter Oligonukleotide, viraler oder nichtviraler Vektoren (Kaufmann *et al.*, 2013). Anfänglich lag der Fokus auf monogenen Defekten wie primäre Immundefizienzen, für die es keine andere Behandlungsoption gab. Mit zunehmender Zahl erfolgreicher Anwendungen weitete sich das Anwendungsspektrum auf Krebserkrankungen (Lam *et al.*, 2013) und chronische oder progressive Erkrankungen wie Herzinsuffizienz, neurodegenerative Erkrankungen wie Parkinson oder metabolische Erkrankungen wie Diabetes aus (Elsner *et al.*, 2012; Jessup *et al.*, 2011; LeWitt *et al.*, 2011) (Abbildung 1.2).

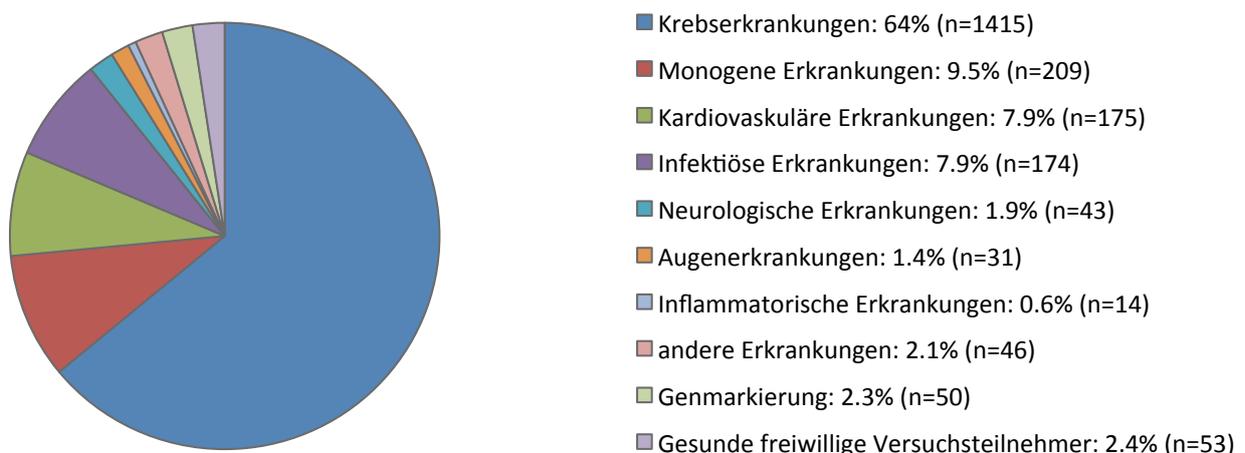


Abbildung 1.2: Indikationen für gentherapeutische Ansätze in klinischen Studien (nach The Journal of Gene Medicine, 2015).

Aufgrund einer Vielzahl von Tiermodellen, welche die humanen Bedingungen für Herzinsuffizienz nachstellen, ist es möglich, potentielle gentherapeutische Ansätze hinreichend zu untersuchen bevor die Transition in die klinische Forschung erfolgt (Mitchell *et al.*, 1997; Pfeffer *et al.*, 1991; Takewa *et al.*, 2009). Für eine erfolgreiche Gentherapie im Patienten müssen dann drei Kriterien erfüllt werden. Zunächst muss ein geeignetes Gen identifiziert werden. Dann bedarf es eines Vektor- oder Verpackungssystems, welches in der Lage ist, dass genetische Material zu verpacken und an den Zielort zu transportieren. Die Eigenschaften des Vektors bestimmen, welche Zielzellen erreicht und transduziert werden können. Des Weiteren bestimmen sie Effizienz, Menge und Dauer der Transgenexpression (Rosenzweig, 2003; Sakoda *et al.*, 1999; Svensson *et al.*, 1999). Zu guter Letzt muss eine geeignete Applikationsmethode gewählt werden, mit welcher eine möglichst große Zellzahl effizient transduziert werden kann (Chaanine *et al.*, 2010).

1.5.1 Gentherapeutische Vektorsysteme

Applikationssysteme für genetisches Material werden in nichtvirale und rekombinante virale Vektoren unterteilt (Abbildung 1.3) (Kay *et al.*, 2001; Nishikawa and Huang, 2001). Nichtvirale Vektoren beinhalten Plasmid- DNA, liposomale DNA- Komplexe, polymere DNA- Komplexe oder auch kleine Nukleinsäuren wie siRNAs (Felgner, 1997; Ruponen *et al.*, 2009). Die Vorteile nichtviraler Vektorsysteme liegen bei der einfachen Produktion, der weniger begrenzten Größe der Expressionskassette und dem relativ geringen biologischen Sicherheitsrisiko. Limitierend sind ihre geringe Transfektionseffizienz und ihr transientser Effekt in Folge von intrazellulärer Degradation. Sie kommen zum Beispiel für die transiente Expression von angiogenen Faktoren bei Angiopathien zum Einsatz (Chaanine *et al.*, 2010).

Mittlerweile stehen für den Gentransfer verschiedene virale Vektorsysteme zur Verfügung. Bei viralen Vektoren ersetzt eine konstruierte Expressionskassette einen Großteil des ursprünglichen viralen Genoms. Kann der Defekt zum Beispiel durch die Expression eines einzelnen Gens in postmitotischem Gewebe kompensiert werden, fällt die Wahl auf ein nichtintegrierendes Vektorsystem. Das Einbringen der DNA erfolgt dann transient und sie liegt episomal vor (Lyon *et al.*, 2008; Rapti *et al.*, 2011). Hierzu zählen auch die adenoviralen und die auf AAV-basierenden Vektoren. Eine der ersten *in vivo*- Anwendungen erfolgte mit einem abgeschwächten adenoviralen Vektor bei der Behandlung der Ornithin- Transcarbamylase-Defizienz (OTCD) (Raper *et al.*, 2002). Bei dieser Pilotstudie verstarb jedoch einer der 17 Probanden an einer massiven Immunreaktion aufgrund des adenoviralen Kapsids (Raper *et al.*, 2003). Dieses nichtintegrierende Vektorsystem wurde daher weiterentwickelt, um eine Immunreaktion zu minimieren und so bei der Gentherapie von Krebserkrankungen erfolgreich angewendet werden können (Cattaneo *et al.*, 2008; Russell *et al.*,

2012). Derzeit werden eher AAV-basierte Vektoren für die Behandlung monogener Erkrankungen in postmitotischen Geweben genutzt, da sich diese durch eine nur geringe inflammatorische Aktivität und ein gutes Sicherheitsprofil auszeichnen (Kaufmann *et al.*, 2013).

Für den stabilen Gentransfer in proliferierenden Zellen werden retrovirale Vektoren bevorzugt, da diese in das Wirtsgenom integrieren können. Dafür werden dem Patienten Zellen entnommen, welche nach ihrer genetischen Modifikation außerhalb des Körpers als autologes Transplantat dem Patienten wieder zugeführt werden (Gentherapie *ex vivo*). Dies reduziert das Risiko unerwünschter *off-target*- Effekte wie die Toxizität durch ektopische Expression des therapeutischen Genes in *off-target*- Organen oder die Übertragung auf die Keimzellen (Kaufmann *et al.*, 2013).

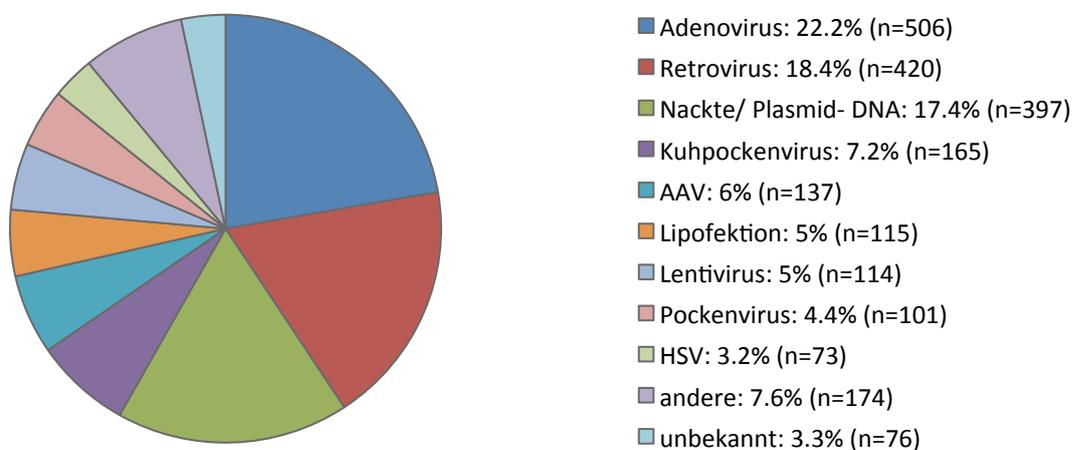


Abbildung 1.3: Prozentualer Anteil verwendeter Vektorsysteme in klinischen Studien (Quelle: The Journal of Gene Medicine, 2015).

1.5.1.1 Kardiale Gentherapie

Viele kardiovaskuläre Erkrankungen wie die Herzinsuffizienz erfordern eine großflächige und kontinuierliche Transgenexpression um den gewünschten therapeutischen Effekt zu erzielen (Tabelle 1.2). Dafür sind virale Vektoren das Mittel der Wahl. Sie bieten eine hohe Gentransfereffizienz und eine Langzeittransgenexpression. Dem entgegen stehen ihre begrenzte Verpackungskapazität, Unregelmäßigkeiten in Bioaktivität und Reinheit der Vektorchargen sowie Risiken in der biologischen Sicherheit. Das Vorhandensein von neutralisierenden Antikörpern gegen virale Vektoren erschwert es zusätzlich, einen viralen Vektor zu konstruieren, welcher der Immunantwort entgeht und gleichzeitig eine große Zahl kardialer Zellen erreicht (Chaanine *et al.*, 2010). Bei kardiovaskulären Erkrankungen werden meist adenovirale Vektoren, AAV- basierte Vektoren und lentivirale Vektoren eingesetzt (Rosenzweig, 2003; Sakoda *et al.*, 1999; Svensson *et al.*, 1999).

Tabelle 1.2: Charakterisierung der für gentherapeutische Anwendungen meist genutzten Vektoren.
(modifiziert nach Hajjar, 2013; Limberis, 2012; Rincon *et al.*, 2015)

	Plasmid	Lentiviraler Vektor	AAV- Vektor	Adenoviraler Vektor
Genom	DNA	RNA	ssDNA	dsDNA
Kapazität	Keine Angaben.	±10kb	±4,7kb	±36kb
Tropismus	-----Teilende/ nicht- teilende Zellen-----			
Persistenz	Transient	Stabil	Stabil	Transient
Expressionsdauer	max. 2 Monate	-----Langzeitexpression-----		max. 2 Wochen
Expressionsmaximum	2- 4 Tage	4- 6 Tage	2- 4 Wochen	2- 4 Tage
Immunantwort	Schwach	Moderat	Schwach	Stark
Vorteile	<ul style="list-style-type: none"> • Geringe Immunogenität 	<ul style="list-style-type: none"> • Große Verpackungs- kapazität • Langzeit- expression 	<ul style="list-style-type: none"> • Hohe Produktionsrate • Geringe Immunogenität • Langzeit- expression 	<ul style="list-style-type: none"> • Hohe Produktionsrate • Große Verpackungs- kapazität
Nachteile	<ul style="list-style-type: none"> • Geringe Transfektions- effizienz • Transiente Expression 	<ul style="list-style-type: none"> • Risiko der Insertions- mutagenese 	<ul style="list-style-type: none"> • Risiko von neutrali- sierenden Antikörpern und T- Zellantwort • Geringe Kapazität 	<ul style="list-style-type: none"> • Starke Antikörper- und Inflammations- reaktion • Transiente Expression
Kardialer Gentransfer	Geringe Transfektion	Geringe Transduktion	Kardiotrope Serotypen	Hohe Transduktion
Verwendung in klinischen Studien zu kardiovaskulären Erkrankungen	+	-	+	+

Derzeit ist eine klinische Studie zur Behandlung von Herzinsuffizienz im Endstadium mit adenoviralen Vektoren bekannt. Die gentherapeutische Phase I/II- Studie (Ad5.hAC6 Gentransfer bei kongestiver Herzinsuffizienz; NCT00787059) hat sich auf die Adenylatzyklase 6 fokussiert und diese mit Hilfe adenoviraler Vektoren exprimiert (Jaski *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2012).

1.5.1.2 Adenovirale Vektoren

Rekombinante adenovirale Vektoren sind vom Adenovirus Serotyp 5 (Ad5) abgeleitet. Es handelt sich dabei um nichtintegrierende Vektoren mit doppelsträngigem DNA- Genom und einem Kapsid ohne Hülle. Die Partikel Aufnahme in die Zelle erfolgt durch Clathrin- vermittelte Endozytose über die Interaktion mit dem Coxsackie- Adenovirus- Rezeptor (CAR) sowie den Integrinen $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ (Liu and Opavsky, 2000; Rincon *et al.*, 2015). Die Transduktionseffizienz wird an dieser Stelle durch die Anzahl der Rezeptoren auf der Zelloberfläche beeinflusst (Ylä-Herttuala and Alitalo, 2003). Anschließend erfolgt der Transport der dsDNA in den Nukleus, so dass eine effiziente Transduktion mitotischer und postmitotischer Zellen wie Kardiomyozyten, Skelettmuskelzellen oder glatten Muskelzellen möglich ist (Du *et al.*, 2011; Parker *et al.*, 2008; Wasala *et al.*, 2011) Aufgrund ihres breiten Zelltropismus und der vergleichsweise einfachen Produktion werden sie meist bei präklinischen Gentherapiemodellen eingesetzt (Gao *et al.*, 2004; Isner, 2002). Das Transgen wird nach adenoviraler Transduktion im Herzen stark, aber nur transient für ein bis zwei Wochen exprimiert (Hajjar, 2013; Wright *et al.*, 2001), was die Anwendung bei Herzinsuffizienz einschränkt, aber zum Beispiel für kurzzeitige proangiogene Therapieansätze bei kardialer Ischämie von Vorteil ist (Kilian *et al.*, 2010). Ein großer Nachteil adenoviraler Vektoren besteht in dem Risiko, eine inflammatorische Reaktion auszulösen, wodurch ihre Effizienz und Sicherheit beeinträchtigt werden können (Gahéry-Ségard *et al.*, 1998; Krause *et al.*, 2006). Die früheren Generationen adenoviraler Vektoren (1. und 2. Generation) tragen noch Reste adenoviraler Gene im Vektorrückgrat, welche *in vivo* induziert werden und so eine T- Zell- Immunantwort gegen die modifizierten Zellen auslösen können. Durch die Eliminierung aller viralen Gene bei helferabhängigen adenoviralen Vektoren der neusten Generation wird neben einer vergrößerten Verpackungskapazität (30kb) eine verminderte Immunantwort erreicht (Schiedner *et al.*, 1998). Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems kann aber auch hier nicht ausgeschlossen werden und kann unter Umständen letal sein (Raper *et al.*, 2003). Zwar kann das Risiko zum Beispiel durch die gezielte Applikation in das Myokard mittels Katheter minimiert werden (Kaski and Consuegra-Sanchez, 2013;), doch durch den vielfältigen Zelltropismus der adenoviralen Vektoren (zum Beispiel Hepatozyten, Antigen- präsentierende Zellen) bleibt ein nicht zu unterschätzendes Restrisiko bestehen (Chuah *et al.*, 2003).

1.6 RNA-Interferenz

Bei RNA- Interferenz (RNAi) handelt es sich um einen natürlichen, ubiquitären, zellulären Mechanismus zur posttranskriptionalen Gensuppression (*gene silencing*) und Abwehr von Viren, Transgenen und Transposons, der durch doppelsträngige kleine RNA- Moleküle (*small RNA*, sRNA) vermittelt wird (Fire *et al.*, 1998; Montgomery *et al.*, 1998). Dieser Mechanismus wurde das erste Mal im Nematoden *Caenorhabditis elegans* charakterisiert (Fire *et al.*, 1998) und konnte auch in einer Vielzahl anderer Eukaryoten nachgewiesen werden (Cerutti and Casas-Mollano, 2006). Die sRNAs können anhand ihrer Biogenese und Funktion in *short interfering RNAs* (siRNAs), Mikro-RNAs (miRNAs) und *Piwi- interacting RNAs* (piRNAs) unterteilt werden (Carthew and Sontheimer, 2009). Dabei sind endogene siRNAs und piRNAs hauptsächlich an der Suppression von invasiven Nukleinsäuren wie Transposons und viraler RNA beteiligt, während miRNAs auf posttranskriptioneller Ebene in die Regulation der zellulären Genexpression involviert sind (Kim *et al.*, 2009; Lau, 2010). Die Gruppe der piRNAs ist in der Keimbahn aktiv und wird in dieser Arbeit außer Acht gelassen (Carthew and Sontheimer, 2009).

MiRNAs und siRNAs unterscheiden sich in zwei wesentlichen Punkten. So werden miRNAs als endogene und gezielt exprimierte Genprodukte des Zellgenoms gesehen, während angenommen wird, dass siRNAs primär exogenen Ursprungs sind. Des Weiteren werden miRNAs durch die Prozessierung von *stem loop*- Vorläufern mit unvollständigem Doppelstrangcharakter generiert, wohingegen siRNAs durch Zerschneiden von langen, vollständig komplementären dsRNAs entstehen (Tomari and Zamore, 2005). Abgesehen von diesen Unterschieden lassen die ähnliche Größe und die sequenzspezifische inhibitorische Funktion auf Gemeinsamkeiten in Biogenese und Wirkung schließen. So sind beide Klassen von den gleichen zwei Enzymfamilien *Dicer* und *Argonaute* abhängig, welche sie aus ihren Vorläufern umwandeln (*Dicer*) und ihren Silencing- Funktion ermöglichen (*Argonaute*- Proteine) (Meister and Tuschl, 2004; Tomari and Zamore, 2005).

1.6.1 Biogenese und RNAi von miRNA

Bei Mammalia spielt die miRNA- vermittelte Genregulation in vielen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle. Bisher wurden über 1000 humane miRNAs identifiziert, welche etwa 30% der humanen Gene durch RNA- Interferenz regulieren könnten (Krek *et al.*, 2005). Diese miRNAs werden endogen als lange primäre miRNA- Transkripte (pri- miRNAs) exprimiert, welche markante unvollständige Haarnadelstrukturen (*hair pins*) bilden. Diese werden durch die nukleäre, RNase III- ähnliche Endonuklease *Drosha* im Komplex mit ihrem Kofaktor DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*) in Vorläufer- miRNAs (*precursor*, pre- miRNAs) mit einer Länge von etwa 70 Nukleotiden prozessiert (Han *et al.*, 2004). Anschließend erfolgt der Export der pre- miRNAs aus

dem Nukleus ins Zytoplasma (Lund *et al.*, 2004; Yi *et al.*, 2003) und dort durch einen Endonukleasekomplex bestehend aus Dicer, dem Kofaktor TRBP (*TAR (transactivating response) RNA binding protein*) und PACT (*protein kinase R- activating protein*) ihre weitere Prozessierung in unvollständig gepaarte miRNA- Duplexe mit einer Länge von etwa 22 Nukleotiden und einem charakteristischen 3'- Überhang von 2 Nukleotiden (Chendrimada *et al.*, 2005; Haase *et al.*, 2005; Lund *et al.*, 2004; Yi *et al.*, 2003). In letzter Zeit wurden auch alternative Wege der miRNA- Biogenese beschrieben, welche von *Drosha* und *Dicer* unabhängig sind (Berezikov *et al.*, 2007; Cheloufi *et al.*, 2010; Cifuentes *et al.*, 2010; Ruby *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2010).

Die prozessierten miRNA- Duplexe gelangen dann in den *RNA- induced silencing complex* (RISC), wo sie sich mit einem der 4 Argonaute- Proteine (AGO1-4) zusammenschließen (Hutvágner and Simard, 2008). Beinhaltend miRNA zentrale Fehlpaarungen, erfolgt die Interaktion bevorzugt mit AGO1, während vollständig gepaarte miRNAs und siRNAs mit AGO2 assoziieren (Höck and Meister, 2008; Rivas *et al.*, 2005). Im RISC wird der *passenger*- Strang entfernt und die reife miRNA leitet den aktivierten RISC zu den mRNAs mit partiell komplementären Zielsequenzen in der 3'- UTR (*untranslated region*). Die Bindung hat die Repression der Translation (Hutvágner *et al.*, 2001; Mourelatos *et al.*, 2002) und/ oder eine mRNA- Destabilisierung zur Folge (Lee *et al.*, 1993; Lim *et al.*, 2005; Wightman *et al.*, 1991). Eine nahezu perfekte Basenpaarung der miRNA mit der mRNA führt zur Spaltung der Ziel- mRNA durch AGO2 (Davis *et al.*, 2005; Yekta *et al.*, 2004). Die Spezifität der miRNA zu ihren Ziel- mRNA wird dabei hauptsächlich durch die *seed*- Sequenz (2 bis 8 Nukleotide vom 5'- Ende der miRNA) und mehrere Zielsequenzen in der 3'- UTR bestimmt (Brennecke *et al.*, 2005; Grimson *et al.*, 2007; Krek *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 2003). Die Ziel- mRNA wird dann in zelluläre *P (processing)- bodies* transloziert, wo dann deren Speicherung, Deadenylierung, *de- capping* und Degradation erfolgt (Liu *et al.*, 2005).

1.6.2 Biogenese und RNAi von siRNA

Zunächst muss endogen doppelsträngige RNA zum Beispiel durch konvergente Transkription oder komplementäre Transkripte entstehen (Castel and Martienssen, 2013) oder von extern in die Zelle aufgenommen werden (Mello and Conte, 2004). Für die Biogenese von siRNA ist neben dsRNA das als RNase III- agierende Enzym *Dicer* unabdingbar. *Dicer* spaltet als Endoribonuklease primäre dsRNA in 20 bis 25 Nukleotide lange siRNA- Duplexe mit 2 Nukleotiden 3'-OH- Überhang und 5'- Monophosphat (Colmenares *et al.*, 2007; Pak and Fire, 2007). *Dicer*- unabhängige Mechanismen der siRNA- Bildung werden bei *Neurospora* (Lee *et al.*, 2010), *Schizosaccharomyces pombe* (Halic and Moazed, 2010) und *Caenorhabditis elegans* (Aoki *et al.*, 2007) vermutet. Während in niederen Organismen Transkription, Prozessierung, RdRP (*RNA- depending RNA- Polymerase*)- Amplifikation

und *Argonaute*-vermittelte Spaltung im Nukleus erfolgen können (Barraud *et al.*, 2011; Colmenares *et al.*, 2007; Emmerth *et al.*, 2010; Irvine *et al.*, 2006; Kato *et al.*, 2005), findet die Prozessierung in komplexeren Organismen meist im Zytoplasma statt (Kim *et al.*, 2009). Die siRNA-Duplexe bilden mit *Dicer*, TRBP und AGO2 einen Komplex. Durch das Entfernen des *passenger*-Strangs entsteht der funktionelle RISC (MacRae *et al.*, 2008). Der verbliebene siRNA-Strang leitet den RISC zu vollständig komplementären RNA-Zielsequenz, welche dann degradiert wird. Die Degradation wird durch die PIWI-Domäne des Ago-Proteins induziert und dann durch zelluläre Exonukleasen vervollständigt (Orban and Izaurralde, 2005). Nach erfolgter Induktion dissoziiert die geschnittene RNA von der siRNA, so dass der RISC weitere Zielsequenzen angreifen kann (Förstemann *et al.*, 2007; Rivas *et al.*, 2005). Bei nichtkomplementären Paarungen wird die endonukleolytische Spaltung zwar supprimiert (Tomari and Zamore, 2005), jedoch kann das *Gene silencing* auf posttranskriptionaler Ebene durch Translationsrepression oder exonukleolytische Degradation, ähnlich wie beim miRNA-vermittelten *Silencing*, erfolgen (Carthew and Sontheimer, 2009). Diese miRNA-ähnlichen Mechanismen scheinen für die meisten „*off-target*“-Effekte ursächlich sein.

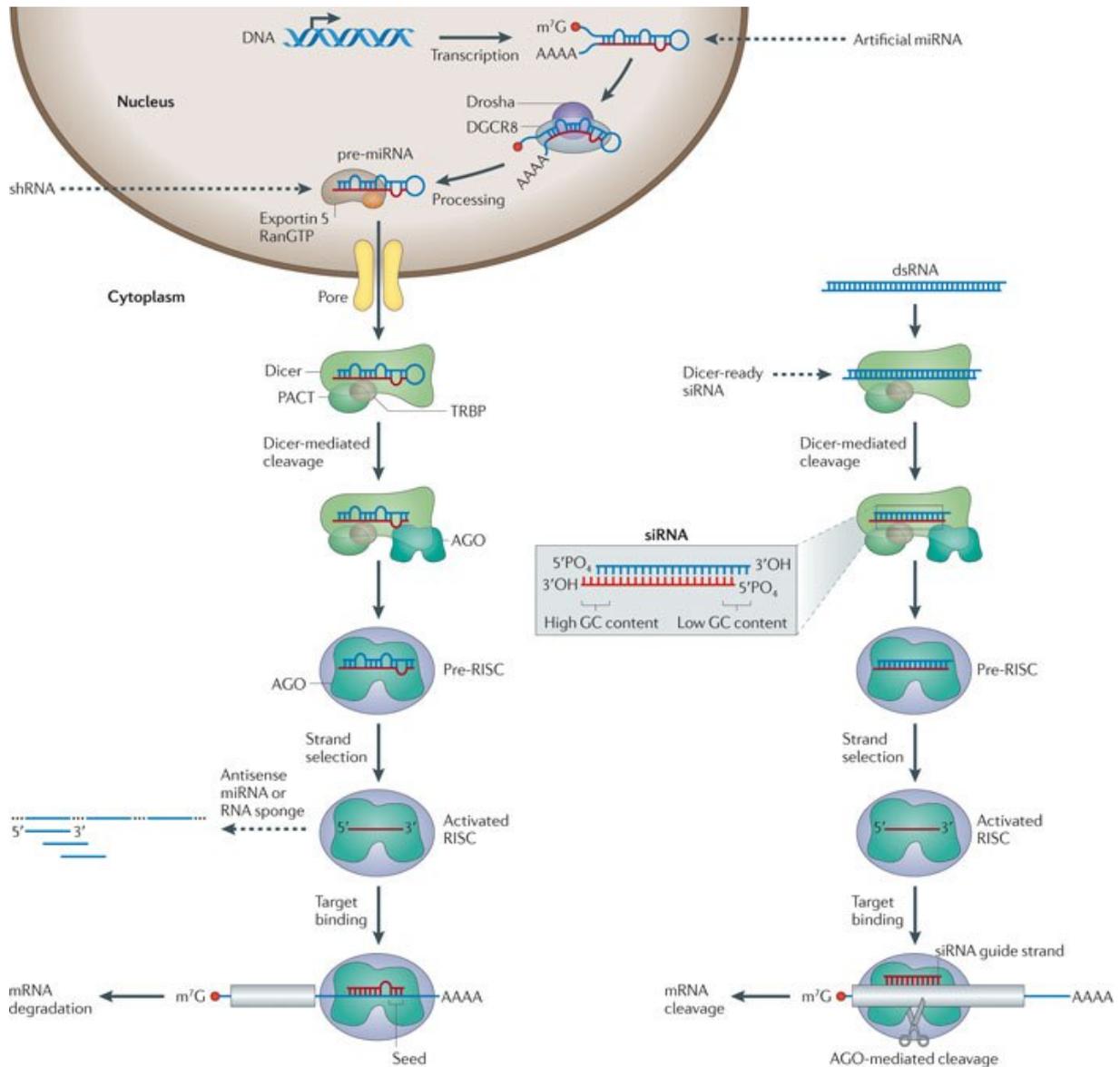


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der durch miRNAs und siRNAs vermittelten RNA- Interferenz in Mammalia. Bei miRNA- vermittelter RNA- Interferenz werden primäre miRNAs durch RNA- Polymerasen transkribiert und vom *Drosha/DCGR8*- Komplex in etwa 70 Nukleotide lange pre- miRNAs prozessiert. Diese werden mittels Exportin 5 in das Zytoplasma exportiert, dort von einem Komplex aus *Dicer*, TRBP und PACT in miRNA- Duplexe prozessiert, Die Duplexe assoziieren mit einem AGO- Protein im pre- RISC. Der *passenger*- Strang des Duplexes wird entfernt und der reife RISC wird durch den verbleibenden miRNA- Strang zur Ziel- mRNA geleitet um posttranskriptionelles *Gene silencing* zu induzieren. Für RNA- Interferenz über siRNAs werden lange dsRNAs durch *Dicer*, TRBP und PACT in siRNAs prozessiert, welche 20 bis 24 Nukleotide lang sein können. Im pre- RISC spaltet ein AGO- Protein den *passenger*- Strang ab und der reife RISC assoziiert über den verbleibenden siRNA- Strang mit der Ziel- mRNA um diese zu schneiden und so dessen Degradation durch Exonukleasen zu initiieren. *DCGR8* (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*); *TRBP* (*TAR (transactivating response) RNA binding protein*); *PACT* (*protein kinase R- activating protein*), *AGO* (*Argonaut*); *RISC* (*RNA- induced silencing complex*), *dsRNA* (*double stranded RNA*); *siRNA* (*short interfering RNA*), *miRNA* (*microRNA*) (Davidson and McCray, 2011).

1.6.3 RNAi als therapeutischer Ansatz

RNA- Interferenz rückt bei der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze immer weiter in den Fokus (Elbashir *et al.*, 2001a). So kommen Ribozyme, antisense RNAs (asRNAs), Aptamere, Spiegelmere, miRNAs und siRNAs bei der Gensuppression zum Einsatz (Poller *et al.*, 2010). Um einen erfolgreichen Therapieansatz zu entwickeln, sind das Design und die Applikationswege der Effektormoleküle essentiell für eine sichere und effektive Behandlung humane Erkrankungen (Kim and Rossi, 2007). Außerdem werden an die Selektivität, Stabilität und Sicherheit besondere Anforderungen gestellt.

Bei der Generierung der etwa 21 Nukleotide langen siRNA- Sequenzen werden bestimmte Algorithmen verwendet, die eine perfekte Sequenz-Komplementarität zur Ziel-mRNA, mögliche Sekundärstrukturen, die Stabilität der siRNA-Duplex sowie potenzielle sequenzabhängige „*off target*“-Effekte berücksichtigen (Kim and Rossi, 2007).

Die erste klinische Phase- III- Studie mit siRNAs zielte auf die altersbedingte Makuladegeneration ab (McFarland *et al.*, 2004). Aufgrund unzureichender Ergebnisse wurde diese vorzeitig beendet und machte die Notwendigkeit von shRNA- Expressionskassetten und geeigneten Vektorsystemen deutlich. Als erste Generation von RNAi- Therapeutika wies die Verwendung synthetischer siRNA- Duplexe in Hinblick auf eine gentherapeutische Anwendung mehrere kritische Aspekte auf. So werden freie und unmodifizierte RNA- Moleküle im Serum von RNasen degradiert und die Aufnahme in die Zelle durch die negative Ladung der siRNAs erschwert, so dass effiziente Transporter benötigt werden. Des Weiteren kommt es häufig zu *off target*- Effekten, welche jedoch mit *backbone*- Modifikationen reduziert oder verhindert werden können (Echeverri and Perrimon, 2006; Echeverri *et al.*, 2006; Lubini *et al.*, 1994; Monia *et al.*, 1993). Die Gensuppression erfolgt transient und wird in sich schnell teilenden Zellen für bis zu 7 Tagen, in ruhenden Zellen für bis zu mehrere Wochen aufrechterhalten (Bartlett and Davis, 2006, 2007), so dass ein langfristiger Ansatz ohne erneute Applikation nicht möglich ist.

Im Gegensatz dazu bieten intrazellulär exprimierte shRNAs eine deutlich länger andauernde Suppression der Genexpression. Besonders bei der Behandlung chronischer Erkrankungen ist dies entscheidend. Ein ideales Gentransfervehikel für shRNAs sollte dafür den endosomalen Weg der Zelle nutzen und die Nukleusmembran überwinden können. Viren und von ihnen abgeleitete Vektoren erfüllen genau diese Voraussetzungen und werden daher bevorzugt für die Einbringung einer *short hairpin* RNA- Transkriptionseinheit in die Zelle und deren intrazelluläre Expression verwendet (Sliva and Schnierle, 2010). Bei shRNAs besteht eine solche Transkriptionseinheit aus der *sense*- und *antisense*- Sequenz einer shRNA, welche über einen *loop* aus ungepaarten Nukleotiden getrennt werden. Um eine effektive konstitutive shRNA- Expression zu erreichen, können RNA-Polymerase-III- Promotoren wie U6 oder H1 vor die Einheit gesetzt werden (Mäkinen *et al.*, 2006). Soll RNAi mittels

einer miRNA erfolgen, besteht die Einheit aus einem Template für ein größeres Primärtranskript (pre-miRNA) (Zeng *et al.*, 2002). Da diese artifiziellen miRNAs den endogenen RNAi- Effektoren mehr gleichen und für eine Polymerase II- Transkription besser zugänglich sind, wurden sie zunächst für therapeutische Zwecke präferiert (Cai *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2006). Es zeigte sich jedoch, dass die Auswahl von der Strategie und dem erwarteten Ergebnis abhängig ist (Boden *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2005).

2 Material

2.1 Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen

Substanz	Hersteller
Agar	DIFCO Laboratories, Lawrence, USA
Agarose	Biozym, Oldendorf, Deutschland
Alexa Fluor [®] 488 Phalloidin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure	Millipore, MA, USA
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Chloroform:Isoamylalkohol (24:1)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Promega, Mannheim, Deutschland
DNA-Loading Buffer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
EDTA Solution	BD Biosciences, San Jose, USA
Ethanol absolut	J.T. Baker, Philipsburg, USA
Ethidiumbromidlösung	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Express Hyb-Hybridisierungslösung	Clontech, Mountain View, USA
Fluoromount-G [™]	SouthernBiotech, Birmingham, USA
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Formaldehyd (37 %)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Formamid	Fluka, Buchs, Schweiz
FuGene HD	Promega, Madison, USA
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	J.T. Baker, Philipsburg, USA
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Lipofectamine [®] LTX & PLUS [™]	Thermo Fischer, Braunschweig, Deutschland
Low Melting point Agarose	Promega Corporation, Madison, USA
Magermilchpulver	Bio-Rad, Hercules, USA

Material

Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
β-Mercaptoethanol	J.T. Baker, Philipsburg, USA
Methanol	J.T. Baker, Philipsburg, USA
Morpholinpropansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumacetat-Lösung	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Fluka, Buchs, Schweiz
N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2- ethanesulfonic acid (HEPES)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Nonidet P 40	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
PBS Dulbecco's (1x)	PAA, Pasching, Österreich
PBS Dulbecco's (10x)	PAA, Pasching, Österreich
Phenol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol 25:24:1	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Phosphatase-Inhibitor	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Polybrene (Hexadimethrine bromide)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ponceaurot	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Protease-Inhibitor	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Taqman® PreAmp Master Mix	Applied Biosystems, Austin, USA
Taqman® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Austin, USA
TBS	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
<i>TransMAX</i>	Sirion Biotech Martinsried, Deutschland
Triton X 100	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
TRizol® Reagent	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Tween-20	Promega, Mannheim, Deutschland
X-tremeGene 9	Roche, Basel, Schweiz

2.2 Spezielle Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
BioFlex 6-well culture plates (Collagen type 1 coated)	FlexCell International Cooperation, USA
Cell strainer	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
Eppendorf-Cryo-Röhrchen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
MicroAmp [®] Optical 96-Well-Platten	Applied Biosystems/Ambion, Austin, USA
NuPage 4 - 12 % Bis-Tris Gele	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Pre-Separation-Filter MiniMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
PVDF Membran	Bio-Rad, Hercules, USA
Transwell Permeable Supports	Corning, Corning, USA
Quick-Seal Bell-Top Tubes (Polyallomer)	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Whatman-Papier	Whatman International, Großbritannien

2.3 Kits - Kommerzielle Test-Systeme und Lösungen

Kit- Bezeichnung	Hersteller
ACK Lysing Buffer	Lonza, Basel, Schweiz
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fischer, Braunschweig, Deutschland
BigDye [®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Austin, USA
CloneJET [™] PCR Cloning Kit	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
EndoFree [®] Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
High-Capacity [®] RNA-to-cDNA Kit	Applied Biosystems, Austin, USA
MBS Mammalian Transfection Kit	Agilent, Santa Clara, USA
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Phalloidin 488	Thermo Fischer, Braunschweig, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Rodeo [™] ECL Western Blotting reagent	usb Cooperation, Santa Clara, CA, U.S.A
Taqman [®] MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Austin, USA
Taqman [®] PreAmp Master Mix	Applied Biosystems, Austin, USA

2.4 Puffer und Lösungen

2.4.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösung	Bestandteile
1 x TBS	10 mM Tris-HCl 2 mM CaCl ₂ 2 mM MgCl ₂ 150 mM NaCl 10 x TE Puffer 100 mM Tris-HCl 10 mM EDTA pH 8.0 autoklaviert
50 x TAE	2 M Tris-HCl 0.5 M NaCl 50 mM EDTA pH 8.0
2 x HBS	280 mM NaCl 50 mM HEPES 150 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7.05

2.4.2 Northern Blot

Puffer/ Lösung	Bestandteile
10 x RNA-Ladepuffer	720 µl Formamid 80 µl gesättigte Bromphenolblau-Lösung 180 µl 37 %ige Formaldehyd-Lösung 160 µl 10 x MOPS-Puffer 1.5 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) A:bidest ad 1.5 ml
10 x MOPS-Puffer	50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA 200 mM MOPS pH 7.0
20 x SSC	3 M NaCl 0.3 M Natrium-Citrat pH 7.0
Waschlösung I	2 x SSC 0.05 % SDS
Waschlösung II	0.1 x SSC 0.1 % SDS
Stripping-Lösung	0.5 % SDS

2.4.3 Western Blot

Puffer/ Lösung	Bestandteile
4 x Ladepuffer	NuPage™ LDS Sample Puffer (Invitrogen) DTT 1:5
„General“-Lysepuffer	20 mM Tris (pH 8) 10 mM NaCl 0.5 Triton X-100 5 mM EDTA 3 mM MgCl ₂ + Protease-Inhibitor 1:100
Transferpuffer	1 x NuPAGE TransferBuffer (Invitrogen) 20% (v/v) Methanol
Ponceau Lösung	20 g/l Ponceau S 300 g/l Trichloressigsäure 300 g/l Sulfosalicylsäure
Blockpuffer	1 x PBST 5% (v/v) Magermilchpulver
Waschpuffer	(1 x PBST) 1 x PBS 0.05% (v/v) Tween-20
Stripping-Puffer	15 g Glycine 100 ml 10% (w/v) SDS 0.1% (v/v) Tween-20 pH 3.2 ad 1 l dH ₂ O

2.4.4 Präparation neonataler Rattenkardiofibroblasten:

Puffer/ Lösung	Bestandteile
ZIM-Lösung	120 mM NaCl 4.56 mM KCl 0.44 mM KH ₂ PO ₄ 0.42 mM Na ₂ HPO ₄ 25 mM NaHCO ₃ 5.55 mM Glukose pH 7.5
ZIM/PS-Lösung	ZIM- Lösung 3830 U/ml Streptomycin 5000 U/ml Penicillin

2.4.5 Kryokonservierung von Zellen

Puffer/ Lösung	Bestandteile
2 x Freezingmedium	60% (v/v) Medium 20% (v/v) FKS 20% (v/v) DMSO

2.5 Nukleinsäuren

Bezeichnung	Hersteller
dNTPs	Rapidozym, Berlin, Deutschland
³² P-dCTP	Amersham, München, Deutschland

2.5.1 Kommerzielle humane RNA

Panel	Hersteller
FirstChoice Human Total RNA Survey Panels	Applied Biosystems/Ambion, Austin, USA

2.5.2 Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Hersteller
pAd5-mmu-miR-30c-1	Amp ^R , CMV- Promotor, Expressionsplasmid für mmu- miR30c-1	AG Poller
pAd5-mmu-miR-133b	Amp ^R , CMV- Promotor, Expressionsplasmid für mmu- miR133b	AG Poller
pAd5-PZS2	Amp ^R , CMV-Promotor, bGH, Basisplasmid für adenovirale Expressionsvektoren	AG Poller; Zeg Sheng, Dallas, USA
pAd5-Tet07-U6-NCshRNA	Amp ^R , U6- Promotor, Expressionsplasmid für <i>negative control</i> shRNA	AG Fechner / Poller
pAd5-Tet07-U6-shCTGF-A	Amp ^R , U6- Promotor, Expressionsplasmid für CTGF- spezifische shRNA	AG Poller
pAd5-Tet07-U6-shCTGF-B	Amp ^R , U6- Promotor, Expressionsplasmid für CTGF- spezifische shRNA	AG Poller
pEGP-mmu-miR-30c-1	Amp ^R , EF-1a Promotor, GFP-Puro Fusion Marker, SV40pA, pUC Origin, ' miRNA Processing	BioCat GmbH, Heidelberg, Deutschland
pEGP-mmu-miR-133b	Amp ^R , EF-1a Promotor, GFP-Puro Fusion Marker, SV40pA, pUC Origin, ' miRNA Processing	BioCat GmbH, Heidelberg, Deutschland

pJet 2.1/ blunt	Amp ^R , T7 Promotor, Multiple cloning site (MCS), Lethales Gen <i>eco47IR</i> zur Selektion von positive Rekombinanten, Blunt- End Insertion site	Thermo Fischer, Braunschweig, Deutschland
pJet-mmu-miR-30c-1	Amp ^R , T7 Promotor, Multiple cloning site (MCS), Lethales Gen <i>eco47IR</i> zur Selektion von positive Rekombinanten, Klonierungsplasmid für mmu-miR-30c-1	AG Poller
pJet-mmu-miR-133b	Amp ^R , T7 Promotor, Multiple cloning site (MCS), Lethales Gen <i>eco47IR</i> zur Selektion von positive Rekombinanten, Klonierungsplasmid für mmu-miR-133b	AG Poller
pSIPO-GFP-R2	Amp ^R , CMV- Promotor, Expressionsplasmid für GFP	AG Poller

2.6 Virale Vektoren

Vektor	Hersteller
Ad5-CMV-GFP	Prof. Dr. Wolfgang Poller, Charité Berlin
Ad5-NCshRNA	Prof. Dr. Wolfgang Poller, Charité Berlin
Ad5-miR30c-1	Prof. Dr. Wolfgang Poller, Charité Berlin
Ad5-miR133b	Prof. Dr. Wolfgang Poller, Charité Berlin
Ad5-shCTGF-A	Prof. Dr. Wolfgang Poller, Charité Berlin
Ad5-shCTGF-B	Prof. Dr. Wolfgang Poller, Charité Berlin

2.7 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> Top 10	F { <i>lacIq</i> Tn10 (TetR)} <i>mcrA</i> (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS-mcrBC</i>) F80 <i>lacZ</i> M15 <i>lacX74 recA1 deoR</i> <i>araD139 (araleu) 7697 galU</i> <i>galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.7.1 Bakterienmedien

Medium	Hersteller
LB-Agar	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.8 Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Penicillin/ Streptomycinsulfat	Biochrom, Berlin, Deutschland

2.9 Enzyme

Enzym	Hersteller
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIP)	Roche, Mannheim, Deutschland
DNase I peqGOLD	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Liberase TH	Roche, Mannheim, Deutschland
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
Proteinase K	Boehringer Mannheim, Deutschland
Restriktionsenzyme	New England Biolab (NEB), Ipswich, England
T4-DNA-Ligase	NEB, Ipswich, England
Trypsin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Alle Enzyme wurden mit den mitgelieferten Puffern laut Herstellerangaben verwendet.

2.10 Standards für Agarose- und Proteingele

2.10.1 DNA-Größenstandards

Marker	Hersteller
1kb DNA-Leiter	Peqlab, Erlangen, Deutschland
DNA-Leiter Mix	Peqlab, Erlangen, Deutschland

2.10.2 Proteingrößenstandard

Marker	Hersteller
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland

2.11 Zelllinien

2.11.1 Permanente Zelllinien und Kulturmedien

Zelllinie	Beschreibung	Kulturmedium
HEK 293T	Humane embryonale Nierenzellen (exprimieren das SV40 T-Antigen)	DMEM
NIH- 3T3	Aus gesamtembryonalen Gewebe von Mäusen generierte immortalisierte fibroblastische Zelllinie	DMEM

Wenn nicht anders erwähnt, wurde das Medium für die permanenten Zelllinien mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt.

2.11.2 Primäre Zellen und Kulturmedien

Zellen	Beschreibung	Kulturmedium
amCM	Adulte murine Kardiomyozyten (Köhncke <i>et al.</i> , 2013)	∅
emCM	Embryonale murine Kardiomyozyten	∅
(a)mPCFB	Adulte murine Kardiofibroblasten	DMEM
emPCFB	Embryonale murine Kardiofibroblasten	DMEM
hPCFB	Humane kardiale Fibroblasten	Iscove's Basalmedium, versetzt mit 10% humanem Serum, 10% FKS, 100 U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin
RNCF	Neonatale Kardiofibroblasten der Ratte	DMEM

∅= Diese Zellen wurden nicht kultiviert, sondern nach Präparation direkt der RNA- Isolation zugeführt.

Wenn nicht anders erwähnt, wurde Gibco- DMEM als Medium zur Kultivierung der Primärzellen mit 20 % FKS, 100 U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin versetzt.

2.12 Taqman® Gene Expression Assays

Für Genexpressionsanalysen wurden *Taqman® Gene Expression Assays* der Firma Applied Biosystems (Austin, USA) verwendet.

Gen	Assay- ID*
Acta2 (α-SMA)	Mm00725412_s1
CASP3	Hs00234387_m1
Ccl2	Hs00234140_m1, Mm99999056_m1
Ccl20	Hs01011368_m1
Ccl7	Hs00171147_m1, Mm00443113_m1
Ccl8	Hs00271615_m1, Mm01297183_m1
CCR5	Hs00152917_m1
CCR6	Hs00171121_m1
CD55	Hs00892618_m1, Mm00438377_m1
Col1α1	Hs00164004_m1*
Col1α2	Hs00164099_m1, Mm00483937_m1
Col3α1	Hs00943809_m1, Mm01254476_m1
CTGF	Hs00170014_m1, <i>Mm01192933_g1</i>
CXADR (CAR)	Hs00154661_m1, Mm00438361_m1
Cyr61	Hs00155479_m1, Mm00487498_m1
ELN (Elastin)	Hs00355783_m1, Mm01196344_m1
GAPDH	Hs99999905_m1
GJA1 (Cx43= Connexin 43)	Hs00748445_s1, Mm00439105_m1
HPRT	Hs99999909_m1, Mm01318743_m1
IL10	Hs99999035_m1
IL4	hs00174122_m1
IL6	Hs00174131_m1
JAK1	Hs01026983_m1
MMP1	Hs00233958_m1
MMP2	Hs00234422_m1, Mm00439506_m1
MMP9	Hs00957562_m1, Mm00442991_m1
Nov	Hs00159631_m1, Mm00456855_m1
Spp1 (Osteopontin)	Hs00959010_m1, Mm00436767_m1
STAT1	Hs00234829_m1
STAT2	Hs01013123_m1

STAT3	Hs01047580_m1
STAT4	Hs01028017_m1
STAT5	Hs00273500_m1
TGFβ	Hs00998133_m1
TIMP4	Hs00162784_m1
TNFα	Hs00174128_m1
WISP1	Hs04234730_m1, Mm00457574_m1
WISP2	Hs00180242_m1, Mm00497471_m1
WISP3	Hs00365646_m1, Mm01193669_m1

*Hs= humanspezifisch; Mm= murinspezifisch

2.13 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
CD31	Dako, Dänemark	Primär- AK, Immunfluoreszenz
Col1	Chemicon, Deutschland	Primär- AK, Immunfluoreszenz
CTGF (L-20), goat polyclonal antibody	Santa Cruz Biotechnology, USA	Primär-AK, Western Blot
Desmin	Santa Cruz Biotechnology, USA	Primär- AK, Immunfluoreszenz
Goat anti-mouse-Ig/HRP	Dako, , Dänemark	Sekundär-AK, Western Blot (gekoppelt mit HRP)
Goat anti-rabbit-Ig/HRP	Dako, , Dänemark	Sekundär-AK, Western Blot (gekoppelt mit HRP)
Polyclonal rabbit anti sheep-Ig/HRP	Dako, , Dänemark	Sekundär-AK, Western Blot (gekoppelt mit HRP)
β-Actin , mouse monoclonal antibody	Sigma- Aldrich, Deutschland	Primär-AK, Western Blot

2.14 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Perkin Elmer, Wellesley, USA
Agarosegel-Kammer Hoefer [®] HE 33	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Axiovert 25 Mikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Brutschrank Modell 5420	Labotect, Göttingen, Deutschland
Cryo 1 °C Freezing Container	NALGENE [®] Labware, Roskilde, Dänemark
DNA Thermal Cycler	Perkin Elmer, Wellesley, USA
Elektrophoreseeinheit PP3000	Biometra, Göttingen, Deutschland
FACS Calibur	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Feinwaage BL 310	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Flexcell System FX 4000 Tension Plus	FlexCell International Cooperation, USA
Fluoreszenzmikroskop Olympus IX 50	Olympus, Hamburg, Deutschland
Gene Amp [®] PCR System 9700	Applied Biosystems, Austin, USA
Genesys 6 UV-Spektrophotometer	Thermo Electron Corp., Waltham, USA
Heizplatte IKAMAG [®] RH	Janke IKA, Staufen, Deutschland
Hybridisierungssofen Compact Line OV 4	Biometra, Göttingen, Deutschland
Image Reader LAS-4000mini	FUJIFILM, Düsseldorf, Deutschland
Kamera Coolpix 990	Nikon, Tokio, Japan
Kamera XR-Mega 10	Stanford Photonics, Palo Alto, USA
Mikroskop Eclipse TE 2000-U	Nikon, Tokio, Japan
Mikrowelle	Bosch, München, Deutschland
NanoDrop [®] ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Novex Mini-Cell	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Olympus BX60 Mikroskop	Olympus, Hamburg, Deutschland
<i>pellet pestle</i>	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
pH-Meter HI 8314 membrane pHmeter	HANNA instruments, Woonsocket, USA
Phospho-Imager Fuji-Bas 2000	FUJIFILM GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Primus 25 DNA-Amplifyer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
PTC-100 Programmable Thermal Controller	MJ Research, Inc., Watertown, Mass., USA
StepOnePlus System	Applied Biosystems, Austin, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transilluminator BioDoc Analyze	Biometra, Göttingen, Deutschland
Ultrazentrifuge Optima TLX-120	Beckman Coulter, Fullerton, USA

Material

UV-Stratalinker® 1800	Stratagene, LaJolla, USA
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zählkammer Neubauer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge 5415D, 5415R und 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Avanti J-25	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Zentrifuge Varifuge RF	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit Bakterien

3.1.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Um bei einer Transformation die Aufnahme von negativ geladener DNA in Bakterienzellen zu ermöglichen, werden diese mit $MgCl_2$ und $CaCl_2$ behandelt um so die negative Ladung der Bakterienhülle zu maskieren und eine chemische Kompetenz zu erreichen. Zunächst werden bei $-80^\circ C$ gelagerte *E.coli* (*Escherichia coli*) auf Eis aufgetaut und mit einer Impföse auf eine antibiotikafreie Agarplatte ausgestrichen. Diese inkubiert dann über Nacht bei $37^\circ C$. Dann wird eine Einzelkolonie in 5 ml antibiotikafreies LB-Medium transferiert und wiederum bei $37^\circ C$ unter Schütteln eine weitere Nacht inkubiert. Nun werden mit 500 μl dieser Vorkultur 50ml antibiotikafreies LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben angeimpft und bei $37^\circ C$ so lange geschüttelt bis die logarithmische Wachstumsphase (OD595 von 0.5) erreicht wird. Anschließend wird die Kultur in ein 50 ml-Zentrifugen-Röhrchen überführt und 10 min auf Eis inkubiert um dann bei $4^\circ C$ und 3000 g für 5 min zentrifugiert zu werden. Das Pellet wird nun in 50 ml eiskalter 0,1 M $MgCl_2$ - Lösung vorsichtig resuspendiert und erneut bei $0^\circ C$ und 3000 g 5 min zentrifugiert. Dann wird das Pellet in 50 ml eiskalter 0,1 M $CaCl_2$ - Lösung resuspendiert und für 20 min auf Eis gestellt. Abschließend erfolgt ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 3000 g und $0^\circ C$ für 5 min, nach welchem das Pellet in 5 ml eiskalter 0,1 M $CaCl_2$ / 14 % [v/v] Glycerin-Lösung resuspendiert wird. Die Suspension kann nun in gekühlten 1.5 ml- Reaktionsgefäßen zu 50 μl aliquotiert und bei $-80^\circ C$ gelagert werden.

3.1.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Die Transformation dient der Einbringung von Plasmid-DNA in Bakterienzellen. Für die Transformation chemisch kompetenter Zellen des *E.coli*-Stammes TOP 10 wird zunächst je Transformationsansatz ein 50 μl Aliquot auf Eis aufgetaut. Diesem werden dann 10 bis 25 μl eines Ligationsansatzes oder für eine Retransformation 0.5 bis 1 μg Plasmid- DNA zugesetzt, vorsichtig durch Rühren gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA wird durch einen anschließenden Hitzeschock für 90 Sekunden bei $42^\circ C$ induziert. Hierbei bilden sich Poren in der Zellhülle, durch welche die Aufnahme der DNA erfolgt. Nach dem Hitzeschock wird der Ansatz für 2 min auf Eis gehalten, dann mit 250 μl vorgewärmten LB-Medium ohne Selektionsantibiotikum versetzt und 30 bis 60 min bei $37^\circ C$ unter Schütteln zur Expression der Resistenzgene vorinkubiert. Durch kurzes Zentrifugieren wird der Ansatz etwas konzentriert und kann zur Selektion von Einzelkolonien auf Agarplatten mit 100 $\mu g/ml$ Ampicillin als Selektionsantibiotikum ausplattiert werden. Abschließend werden die Platten bei $37^\circ C$ für 18 bis 24 h inkubiert.

3.1.3 Kryokonservierung von Bakterien

Zur Konservierung von Bakterienzellen wurden Glycerinstocks der Flüssigkultur angelegt. Dafür wurde 800 µl einer Übernacht-Kultur in ein steriles Kryo-Röhrchen überführt, mit 200 µl 75%igem [v/v] Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

3.2 DNA- und RNA-Techniken

3.2.1 Plasmid- DNA-Isolation aus Bakterien

Die Isolation von Plasmid- DNA beruht auf einer modifizierten alkalischen Lyse von Bakterien und der anschließenden DNA- Aufreinigung mittels reversibler Bindung an eine Silikamembran (Mini-Präparation) oder über Anionenaustauschersäulen (Maxi- Präparation).

Um das Resultat einer Ligation schnell überprüfen zu können, werden zunächst sogenannte Minipräparationen, die Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab, mittels einem peqGOLD Plasmid Mini Prep Kit I durchgeführt. Dazu werden 3 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mit einer Einzelkolonie von einer LB-Platte mit Ampicillin als Selektionsantibiotikum beimpft. Nach der Inkubation bei 37°C über Nacht auf einem Schüttler bei 225 rpm werden 1.5 ml der Kultur in ein 1.5 ml-Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid- DNA isoliert.

Für Klonierungen oder die Transfektion von eukaryotischen Zellen werden größere Mengen hochreiner Plasmid- DNA benötigt. Diese werden mit Hilfe einer 250 ml- Übernachtkultur und des EndoFree® Plasmid Kits nach Angaben des Herstellers gewonnen. Die 250 ml- Übernachtkultur wird mit Selektionsantibiotikum versetzt und mit 250 µl der 3 ml- Minikultur beimpft.

3.2.2 Isolierung eukaryotischer DNA aus Zellen

Um während der Herstellung adenoviraler Vektoren mittels PCR das Vorhandensein des Inserts zu überprüfen und eine RCA-Kontamination auszuschließen, wurde aus sekundärem Zelllysat die DNA mit dem E.Z.N.A.Tissue DNA Kit II nach Angaben des Herstellers isoliert. Anschließend erfolgt die Aufkonzentration der DNA. Hierfür werden zunächst 8 µl 5 M NaCl und danach 800 µl absoluter Ethanol zugegeben, der Ansatz durch Vortexen sorgfältig gemischt und für 30 min oder über Nacht bei -20°C inkubiert. Nachfolgend wird der Ansatz 15 min bei 10000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 700 µl 80 % [v/v] Ethanol gewaschen sowie bei 10000 g für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wird wieder verworfen und das Pellet 2 min luftgetrocknet um dann in 30 µl sterilem deionisierten Wasser gelöst zu werden. Nach der Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle mit dem Nanodrop® kann die Kontroll-PCR durchgeführt werden.

3.2.3 Isolierung viraler DNA

Die Überprüfung der produzierten Adenoviren auf eine mögliche Kontamination mit replikationskompetenten Adenoviren (RCAs) und das Vorhandensein des RR5-Hintergrundes sowie des Inserts wird mittels PCR durchgeführt. Zur Lyse der adenoviralen Partikel werden zu 200 µl Virus-Suspension 17.6 µl 10 % [v/v] SDS, 6 µl 0.5 M EDTA, 1.5 µl Proteinase K (20 ng/ml) und 74.9 µl TBS gegeben. Der Ansatz wurde zwei bis vier Stunden bei 37°C inkubiert und die virale DNA im Anschluss durch Phenol-Chloroform extrahiert. Hierfür werden 300 µl (1 Vol) Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, [v/v]) hinzugefügt und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Dem schließt sich die Zentrifugation bei 800g für 5 min an. Die obere wässrige Phase wird in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der DNA 15 µl 5 M NaCl sowie 2 Vol absoluter Ethanol zugegeben. Die Fällung erfolgt über Nacht bei -20°C. Dann erfolgt das Pelletieren der DNA bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit für 30 min. Der Überstand wird vorsichtig entfernt, das Pellet mit 1 ml 75 % [v/v] Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, der Überstand wieder entfernt und das Reaktionsgefäß kopfüber getrocknet um dann in 20 µl sterilem deionisierten Wasser gelöst zu werden. Nach der Konzentrationsbestimmung erfolgt die Analyse mittels PCR.

3.2.4 Isolation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

Die Isolation der Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen mittels TRIzol[®] Reagent erfolgte nach den Angaben des Herstellers und stellt eine Weiterentwicklung der von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 2006) etablierten *single step method* (Einzelschrittmethode) dar. Die monophasische Lösung TRIzol[®] enthält Guanidinisothiocyanat (GTC), welches mit seiner chaotropen Eigenschaft Wasserstoffbrücken auflöst und so Zellen lysiert, Proteine denaturiert und somit RNasen inaktiviert, und Phenol, welches für ein saures Milieu sorgt, so dass denaturierte Proteine und DNA-Fragmente aus dem Lysat entfernt werden.

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen wird das Medium aus der Kulturplatte abgesaugt und die Platte entweder sofort der RNA-Isolierung zugeführt oder für eine spätere Isolation bei -80°C gelagert. Das gewonnene RNA-Pellet wird in nukleasefreiem Wasser resuspendiert, für 10 min bei 58°C inkubiert und bei -80°C gelagert. Die Konzentration und Qualität wird mittels NanoDrop[®] bestimmt.

3.2.5 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration und -reinheit

3.2.5.1 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration und -reinheit

Das NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer bestimmt absorptionspektrometrisch über die Messung der OD (optische Dichte) bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm die Konzentration von Nukleinsäuren. Mittels des Quotienten der OD bei 260 und 280 nm kann eine Aussage über die Qualität der Nukleinsäurelösung und Kontamination mit Proteinen getroffen werden. Dabei wird ein Wert von 1.8 bis 2.0 angestrebt.

3.2.6 Agarosegelelektrophorese

Mit der Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Diese Auftrennung beruht zum einen auf der negativen Ladung der DNA bei neutralen pH-Werten, zum anderen auf der porösen Gelmatrix, welche die Wanderung der Fragmente im elektrischen Feld entsprechend deren Größe verzögert. Über die Agarosekonzentration kann die Größe der Poren variiert werden. So wird eine höhere Konzentration (2-3 %) für die Auftrennung kleiner Fragmente im Bereich von mehreren 100 Basenpaaren, eine niedrigere Konzentration (0.8-1.5 %) für die Auftrennung mittlerer Fragmente im Bereich von einigen Kilobasen eingesetzt (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Trennkapazität verschiedener Agarosekonzentrationen

Fragmentlänge in bp	Agarosekonzentration in 1xTAE-Puffer in %
1000-30000	0.5
800-12000	0.7
500-10000	1
400-7000	1.2
200-400	1.4
50-2000	2

Je nach Volumen und Konzentration wird zunächst Agarose in einen Erlenmeyerkolben abgewogen und mit 1x TAE Puffer versetzt. Das Gemisch wird dann so lange in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Durch gelegentliches Schwenken des Kolbens wird dies unterstützt. Nach kurzem Abkühlen wird der Lösung Ethidiumbromid (Endkonzentration 0.005 % [v/v]) zugesetzt um dann in den vorbereiteten Gelschlitten gegossen zu werden. Zum Formen der Geltaschen wird ein Kamm eingesetzt. Ist das Agarosegel fest, wird der Kamm entfernt und der Gelschlitten in die Agarosegelkammer eingesetzt und soweit mit 1x TAE- Puffer gefüllt, dass das Gel bedeckt ist. In die

Taschen werden die mit 1/5 Volumen 5x DNA-Ladepuffer versetzten Proben pipettiert. Anschließend wird die Kammer mit einem Deckel verschlossen und die DNA bei 140 V/200 mA aufgetrennt. Im Anschluss an die Elektrophorese werden die DNA-Fragmente mit einem Transilluminator unter UV-Licht dokumentiert.

3.2.7 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel werden die gewünschten DNA-Banden mit UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem so gewonnenen Gelstück wird mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Abschließend wird die Konzentration und Qualität der DNA mit dem Nanodrop® bestimmt.

3.2.8 Klonierung von DNA-Fragmenten

Durch das Einfügen eines DNA-Fragment in einen Klonierungsvektor kann dieses Fragment vielfach Vermehrung werden. Das DNA-Fragment kann entweder als PCR-Produkt mit geeigneten Primern, welche Restriktionsschnittstellen enthalten, generiert werden oder entsteht beim Verdau eines Shuttle-Vektors mit geeigneten Restriktionsenzymen. Nach dem Verdau des PCR-Produktes bzw. des Shuttlevektors und des Empfängerplasmids erfolgt die Ligation der zuvor durch Gelelektrophorese und Gelextraktion aufgereinigten Komponenten. Der Ligationsansatz wird dann in chemisch-kompetente Bakterien transformiert, welche entsprechend erst auf Agarplatten ausgestrichen und später als Mini-Präparation und Maxi-Präparation kultiviert werden. Der Erfolg der Klonierung wird mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft.

3.2.8.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente durch thermostabile DNA-Polymerasen. Abhängig von der Primerlänge und deren Basenzusammensetzung sowie den Eigenschaften des Templates werden die Bedingungen der Reaktion angepasst. Die *Annealing*-Temperatur sollte dabei 5 bis 10°C unter der jeweiligen Schmelztemperatur der Primer liegen und die Elongationszeit an die Länge des erwarteten Produkts angepasst werden. Als Grundlage dient die Elongationsleistung von 0.5 bis 1 min pro kb Länge bei der *Taq*-Polymerase und 2 min je kb bei der *Pfu*-Polymerase.

Für analytische PCRs wird eine *Taq*-DNA-Polymerase verwendet. Sollen jedoch Fragmente für eine Klonierung erzeugt werden, kommt eine *Pfu*-DNA-Polymerase zum Einsatz, da diese über eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (*proofreading*) verfügt und so im Vergleich zur *Taq*-Polymerase deutlich genauer arbeitet. Beide Polymerasen werden nach Angaben der Hersteller benutzt. Die eigentliche Reaktion wird mit dem Gene Amp Thermocycler 9700 durchgeführt.

3.2.8.2 Restriktionsverdau von DNA

Für den Restriktionsverdau werden Restriktionsendonukleasen des Typs II nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Anhand spezifischer, palindromischer Erkennungssequenzen können je nach Enzym glatte („*blunt ends*“) oder überstehende („*sticky ends*“) Enden mit 5'- oder 3'-Überhang entstehen. Die Vollständigkeit des Verdau wird mit einem Agarosegel überprüft.

3.2.8.3 Dephosphorylierung von DNA-Molekülen mit CIP

Zur Unterbindung der Religation der DNA nach dem Restriktionsverdau wurde die DNA mit Hilfe der alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIP, *calf intestine alkaline phosphatase*) nach Angaben des Herstellers an den 5'-Enden dephosphoryliert. Zum Stoppen der Dephosphorylierung wird EDTA-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 5 mM hinzugegeben und der Ansatz für 20 min bei 75°C inkubiert. Anschließend wird die dephosphorylierte DNA auf einem Agarosegel aufgetrennt und das entsprechende Fragment extrahiert.

3.2.8.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgt mit T4-Ligase nach Angaben des Herstellers für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C. Für eine effektive Ligation von Insert und Plasmid wird für die Anzahl der Moleküle ein Verhältnis von 3:1 nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Masse}_{\text{Insert}} [\text{ng}] = 3 \times \text{Masse}_{\text{Vektor}} [\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Insert}} [\text{bp}] / \text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]$$

Anschließend wird der Ligationsansatz in chemisch-kompetente *E. coli* transformiert.

3.2.9 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen wurden von der Firma LGC durchgeführt. Die Plasmide wurden entsprechend der Angaben des Dienstleisters mit den entsprechenden Primern versetzt und versandt.

3.2.10 Genexpressionsanalyse mittels quantitative PCR

3.2.10.1 DNase Verdau

Ob ein DNase- Verdau notwendig ist, hängt davon ab, welches Taqman[®] Gene Expression Assay verwendet werden soll. Überspannt es zwei Exons, kann es keine genomische DNA detektieren, da diese Introns enthält und ein DNase- Verdau ist hier nicht notwendig. Liegen aber Sonden und Primer innerhalb eines Exon, könnte das Assay auch genomische DNA detektiert. Daher muss hier vor der cDNA- Synthese ein Verdau erfolgen um genomische DNA zu eliminieren. Nach erfolgter RNA- Aufreinigung wird der DNase- Verdau nach Herstellerangaben mit peqGOLD DNase I durchgeführt. Die Inaktivierung der DNase I wird durch 25 mM EDTA je 10 µl Reaktionsansatz und Erhitzen auf 65°C für 15 min gewährleistet.

3.2.10.2 Reverse Transkription/cDNA-Synthese

Für die quantitative Genexpressionsanalyse auf Transkriptionsebene muss RNA zunächst durch reverse Transkription mittels dem High Capacity[®] RNA-to-cDNA Kit nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben werden. Dabei wird eine RNA-abhängige DNA-Polymerase eingesetzt, die ausgehend von einzelsträngiger RNA einen RNA/DNA-Hybridstrang synthetisiert. Durch eine RNase H-Aktivität der Transkriptase wird der RNA-Anteil des Hybridstranges abgebaut.

3.2.10.3 Präamplifikation

Aufgrund der geringen RNA- Mengen, die aus Endomyokardbiopsien von DCM- Patienten gewonnen werden kann, schließt sich für diese Proben eine Präamplifikation nach einem Protokoll von Noutsias *et al.* an (Noutsias *et al.*, 2008). Die dabei entstehenden PCR- Produkte werden gleichmäßig von cDNA- Templates ohne das Einfügen eines Bias amplifiziert. Dafür wird ein Pool aus allen geplanten Taqman[®]- Assays erstellt und der Taqman[®] PreAmp Master Mix nach Herstellerangaben verwendet. Die gepoolten Taqman- Assays werden 0.2 fach mit 1x Tris- EDTA (TE)- Puffer verdünnt. In einen Gesamtvolumen von 25 µl, bestehend aus 6.25 µl cDNA, 12.5 µl Taqman[®] PreAmp Master Mix und 6.25 µl der gepoolten Primer wird die Präamplifikation über 14 Zyklen in einem PTC-100 Programmable Thermal Controller durchgeführt. Im Einzelnen erfolgt die Denaturierung für 10 min bei 95°C und die Amplifikation über 14 Zyklen bei 95°C für 15 Sekunden gefolgt von 60°C für 4 min. Das Amplifikationsprodukt wird anschließend mit Tris- EDTA- Puffer im Verhältnis 1:20 verdünnt und als Template für die quantitative PCR- Analyse eingesetzt.

3.2.10.4 Taqman[®]-PCR/Real-Time quantitative PCR (RT-qPCR)

Aufgrund der bei einer PCR geltenden mathematischen Grundsätze des exponentiellen Wachstums ist die Quantifizierung der PCR-Produkten möglich. Die Quantifizierung von mRNA erfolgt mittels Taqman[®]-Real-Time quantitativer PCR unter Verwendung von spezifischen fluoreszenzmarkierten Sonden und den dazugehörigen PCR-Primern nach Angaben des Herstellers. Die Methode beruht auf der Ausnutzung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (Cardullo *et al.*, 1988). Dabei wird ein Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und strahlt die aufgenommene Energie in Form von Licht einer anderen Wellenlänge wieder ab.

Als endogene Referenz wurde ein *Housekeeping*-Gen (GAPDH: Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase oder HPRT: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase) mitgeführt.

Die Taqman[®]-PCR wird im StepOnePlus System mit dem dazugehörigen Programm StepOne Software v2.1 durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgt in Abhängigkeit vom Versuch mit den Formeln $2^{-\Delta\Delta CT}$ oder $2^{-\Delta CT}$. Erstere wird bei der vergleichenden Auswertung mit einem Kontrollversuchsansatz angewendet, Letztere bei Betrachtung der Expressionslevel (Livak and Schmittgen, 2001; Schmittgen and Livak, 2008).

3.2.11 RNA-Agarose-Gelelektrophorese und Northern Blot

Als Northern Blot wird die Übertragung von RNA mittels Kapillarkräften auf eine Membran bezeichnet. Mit Hilfe eines Northern Blots kann RNA nach der gelelektrophoretischen Auftrennung auf eine Nylonmembran übertragen werden um anschließend bestimmte RNA-Fragmente durch die Hybridisierung mit radioaktiv- oder fluoreszenzmarkierten Sonden spezifisch detektieren zu können.

Zunächst werden 10 µg Gesamt-RNA mit 5 µl RNA-Ladepuffer in einem 1 %-igen Agarosegel in MOPS-Puffer mit 6 % Formaldehyd unter RNase-freien Bedingungen der Länge nach aufgetrennt. Formaldehyd sorgt dabei für denaturierende Bedingungen zur Auflösung bzw. Verhinderung von Sekundärstrukturen innerhalb eines RNA-Moleküls. Nach der Gelelektrophorese wird das Gel zur Entfernung des Formaldehyds zweimal gewässert und anschließend mittels UV-Licht überprüft, um eine Degradation auszuschließen und das Ergebnis der Auftrennung zu überprüfen. Als eigentlicher Northern Blot wird für den Transfer der RNA Whatman-Papier unter das Gel und eine Nylonmembran luftblasenfrei auf das Gel platziert und mit einem Stapel aus Whatman-Papier und Papiertüchern bedeckt, welcher abschließend beschwert wird. Als Transferpuffer wird 10x SOC-Puffer verwendet, der über Nacht bei Raumtemperatur mittels Kapillarkräfte durch das Gel und die Membran in das Papier gesogen wird. Dabei löst sich die RNA aus dem Gel und wird auf die Membran transferiert (Abbildung 3.1).

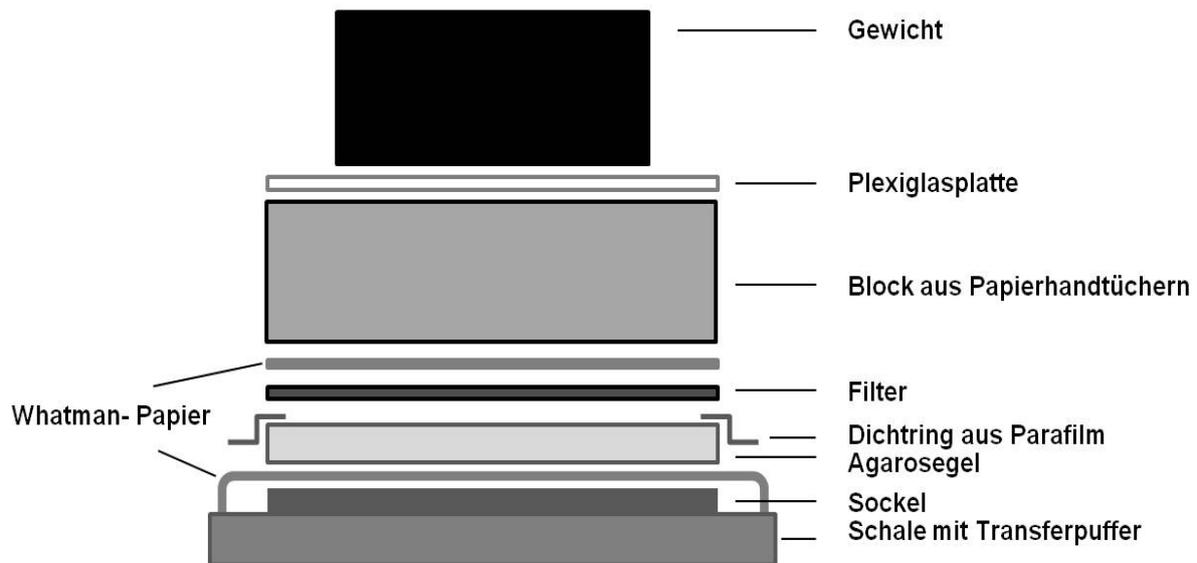


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Northern Blots. Die Nylonmembran wird hier als Filter bezeichnet.

Am darauffolgenden Tag wird die Membran zunächst 30 Minuten an der Luft getrocknet und anschließend die RNA im Strata-Linker 1200 durch zweimaliges *crosslinken* unter UV-Licht bei 150 mJoule/cm^2 kovalent an die Membran gebunden. Nun können die 18S- und 28S rRNA-Banden unter UV-Licht auf der Nylonmembran mit einem Bleistift markiert und die Membran nach Einschlagen in Plastikfolie bis zur Hybridisierung bei 4°C gelagert werden.

3.2.12 Radioaktive Hybridisierung zum Nachweis von spezifischen RNA-Fragmenten

3.2.12.1 Herstellung eines radioaktiven Sondenfragments

Um spezifische RNA-Abschnitte durch radioaktive Markierung detektieren zu können, wird zunächst das gewünschte DNA-Fragment mit einer Größe von etwa 300 bp mittels PCR unter Auswahl geeigneter Primer amplifiziert, im Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert. Anschließend wird mit diesem Fragment in einer weiteren PCR unter Verwendung von ^{32}P -dCTP und dem Antisense-Primer der vorhergehenden PCR eine radioaktiv markierte Einzelstrang-DNA-Sonde generiert. Diese wird über eine Sephadex-Säule gelchromatographisch aufgereinigt. So werden nicht eingebaute Nukleotide entfernt. Insgesamt werden 10 Fraktionen mit je etwa $500 \mu\text{l}$ aufgefangen und die Radioaktivität mit dem Bioscan QC 2000 bestimmt. Die Fraktionen mit der höchsten Radioaktivität werden dann gepoolt und als Sonde verwendet.

3.2.12.2 Radioaktive Prähybridisierung und Hybridisierung

Die Nylonmembran wird zunächst in Hybridisierungsröhren mit ca. 10 ml ExpressHyb Hybridization Solution für 30 min bei 68°C im Hybridisierungssofen zur Blockierung noch freier Bindungsstellen auf der Membran prähybridisiert. Die eigentliche Hybridisierung erfolgt nach Zugabe der radioaktiv markierten Sonde für eine Stunde bei 68°C. Anschließend wird die Membran für 15 min in 20 ml Waschlösung I bei Raumtemperatur gewaschen und dann zweimal in je 20 ml Waschlösung II für 15 min bei 50°C gewaschen. Abschließend wird die hybridisierte Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen und in eine Filmkassette gelegt.

3.2.12.3 Nachweis und Quantifizierung der Hybridisierungsprodukte

zur Detektion der radioaktiv hybridisierten RNA- Fragmente wird ein Röntgenfilm für eine Stunde bis mehrere Tage aufgelegt. Dabei kann eine Verstärkerfolie eingesetzt werden, wobei die Filmkassette bei -80°C gelagert wird. Nach dem Entwickeln des Röntgenfilms kann die Quantifizierung der Banden mittels Scion Image Gelplot2 Software (Scion Corporation, Frederick, USA) erfolgen.

3.2.12.4 Ablösen radioaktiver Sonden von Nylonmembranen

Um die Membran mit einer weiteren Sonde hybridisieren zu können, wird diese durch *Stripping* in 0.5 %iger SDS-Lösung in einem Wasserbad bei 98°C von den radioaktiv markierten Sondenfragmenten befreit. Dabei erfolgt die Inkubation jeweils für 10 min bis keine Radioaktivität mehr gemessen werden kann.

3.2.13 Konstruktion von pAd5-mmu-miR-30c-1 und pAd5-mmu-miR-133b

Um adenovirale Vektoren zur Expression der murinen miRNAs 30c-1 und 133b generieren zu können, werden zunächst die kommerziell erworbenen Plasmide durch die Transformation von Bakterien vermehrt und anschließend isoliert. Dem schließt sich der Restriktionsverdau mit den Enzymen BamHI und NheI an. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung und Aufreinigung des Restriktionsprodukts wird dieses in pJET zwischenkloniert und nach dessen Vermehrung, Aufreinigung und Verdau mit HindIII und BamHI in das Plasmid pZS2 eingefügt und als pAd5-mmu-miR-30c-1 und pAd5-mmu-miR-133b benannt.

Alle verwendeten und konstruierten Plasmide wurden durch einen Restriktionsverdau und eine Sequenzierung überprüft.

3.3 Konstruktion und Produktion adenoviraler Vektoren

Adenovirale Vektoren wurden Durch die *in-vitro*-Ligation eines *Shuttle*-Plasmids mit dem RR5-*Longarm* (*Xba*I-Fragment) werden adenovirale Vektoren konstruiert und in HEK 293-Zellen produziert (Abbildung 3.2). Bei RR5 handelt es sich um das adenovirale Wildtypgenom Ad-d1309 mit einer einzelnen *Xba*I-Schnittstelle an Nukleotidposition 3333. Die E1- (Nukleotide 445 bis 3333) sowie die E3- Region (Nukleotide 30 005 bis 30 750) sind dabei deletiert (Hatfield und Hearing, 1993), so dass RR5 replikationsdefizient ist. Die Aufreinigung der viralen Vektoren wird mittels einer Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dem schließt sich die Entfernung der Salzurückstände an. Danach wird mittels Photometer und Plaque Assay die Konzentration der adenoviralen Vektorpartikel bestimmt.

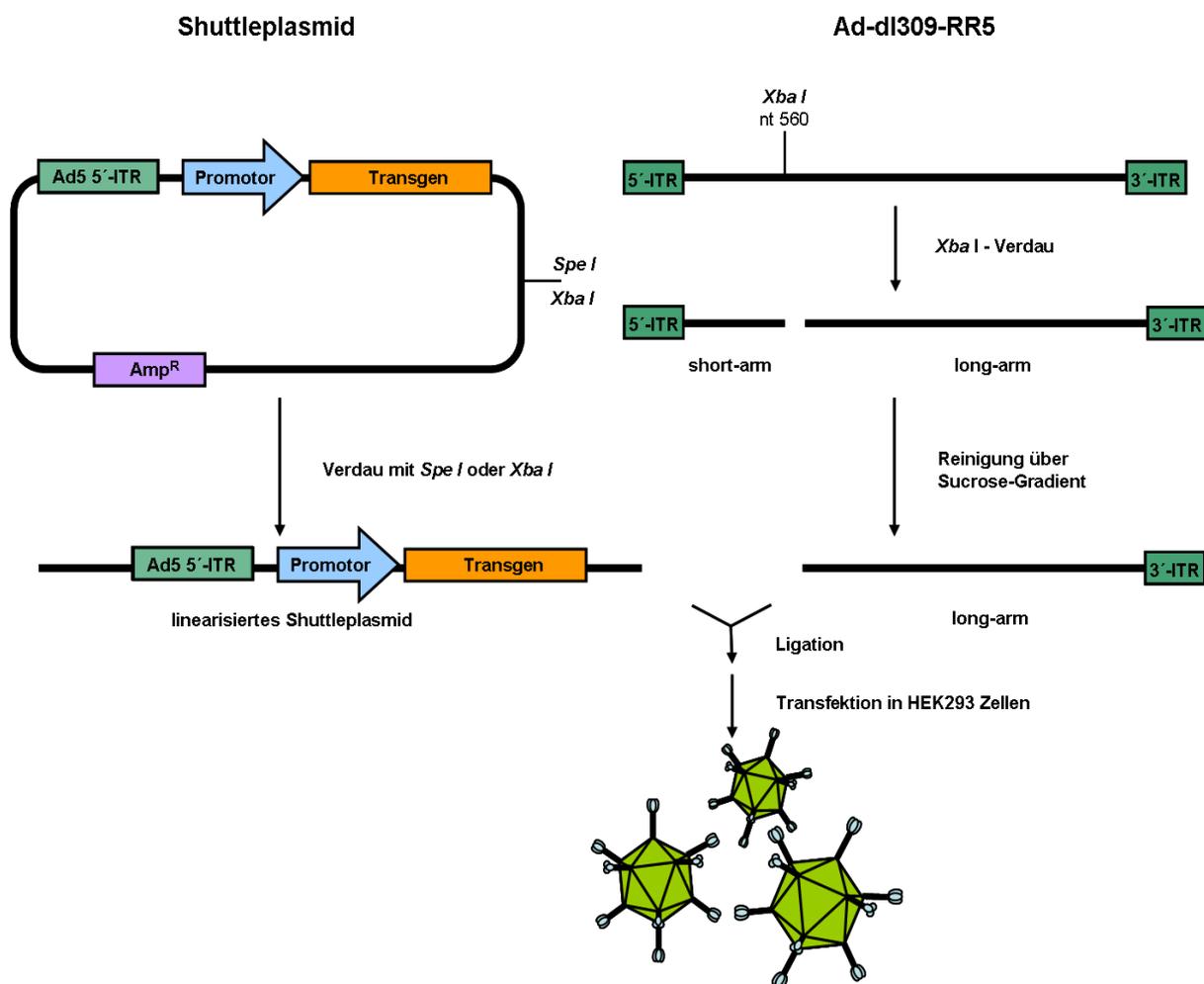


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Herstellung adenoviraler Vektoren.

3.3.1 Generierung des RR5-Longarm

Zunächst wird aus 5×10^{12} RR5-Viruspartikeln die DNA isoliert und mit *Xba*I bei 37°C über Nacht geschnitten. Am nächsten Tag erfolgt nochmals die Zugabe von *Xba*I und der weitere Verdau für vier

Stunden bei 37°C. Dem schließt sich die Inaktivierung des Enzyms bei 60°C für fünf Minuten an. Die Vollständigkeit des Restriktionsverdau wird durch die elektrophoretische Auftrennung eines Aliquots überprüft. Als erwartete Fragmente zeigen sich das RR5- *Longarm*- Fragment bei 33.33 kb und das RR5- *Shortarm*- Fragment bei 0.57 kb. Anschließend werden die Fragmente dephosphoryliert und im Sucrose- Gradienten in der Ultrazentrifuge getrennt. Die 33.33-kb-Bande des RR5- *Longarm* wird gesammelt, gefällt und in TE- Puffer gelöst. Bis zur weiteren Verarbeitung wird es in Aliquots zu je 1 µg bei -20°C gelagert.

3.3.2 Restriktion, Phenolreinigung und Ligation

Im nächsten Schritt wird das adenovirale *Shuttle*-Plasmid mit *Xba*I (pZS2) linearisiert, mit Phenol gereinigt und mit Alkohol gefällt. Die Ligation des linearisierten Plasmids mit dem RR5-*Longarm* erfolgt bei 4°C über Nacht. Parallel wird eine Zellkulturschale mit HEK293- Zellen vorbereitet. Am Folgetag werden diese Zellen mit dem Ligationsansatz mittels Calciumphosphat- Transfektion mit dem MBS Mammalian Transfection Kit nach Angaben des Herstellers transfiziert und über Nacht bei 37°C und 5 %iger CO₂-Sättigung inkubiert. Am nächsten Tag werden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 5 ml 1.25 %iger *low-melting-point* Agarose überschichtet. Hierfür wurde 5 %ige *low-melting-point* Agarose-Lösung mit DMEM- Medium (5 % FKS und 1 % P/S) hergestellt und im Wasserbad auf 42°C temperiert und mit 37°C warmen Medium im Verhältnis 1:4 gemischt. Nach Abbinden der Agarose werden die Zellen bei 37 °C inkubiert.

Nach ein bis zwei Wochen bilden sich viralen Plaques. Diese werden gepickt indem der Agar im Bereich des Plaques mit einer sterilen abgeschnittenen 1 ml-Pipettenspitze ausgestochen wird. Die gepickten Plaques werden in 1.5 ml DMEM Low Medium mit 2 % FKS und 1 % P/S aufgenommen und durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen im 37°C warmen Wasserbad aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation bei 500 g für fünf Minuten wird der Überstand auf, am Vortag in Kulturschalen mit 60 mm Durchmesser ausgesäten, konfluenten, mit PBS gewaschenen HEK 293- Zellen gegeben. Durch diesen Schritt werden die enthaltenden viralen Vektoren amplifiziert. Nach etwa vier Stunden wird mit DMEM Low Medium auf ein Endvolumen von 5 ml pro Schälchen aufgefüllt und diese weiter im Brutschrank inkubiert. Nach fünf bis sieben Tagen sind die Zellen durch den zytopathogenen Effekt (CPE) lysiert. Das Zelllysats kann nun geerntet, in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und wie oben beschrieben dreimal eingefroren und aufgetaut werden. Von diesem Primärlysats wird zur weiteren Amplifikation 1 ml auf neue 60 mm-Kulturschalen mit HEK 293- Zellen gegeben und mit 4 ml DMEM Low Medium mit 2 % FKS und 1 % P/S aufgefüllt. Vom entstehenden Sekundärlysats werden 500 µl zur weiteren Amplifikation verwendet. Aus 1.5 ml des zweiten oder dritten Lysats wird nach der Zentrifugation für zehn Minuten bei 4000 g mit Hilfe

des peqGOLD Tissue DNA Mini Kit die DNA nach Angaben des Herstellers isoliert und eine Kontroll-PCR durchgeführt. Dabei wird überprüft, ob der virale Vektor das gewünschte Transgen enthält. Zur Überprüfung des Inserts werden die spezifischen Primer verwendet. Des Weiteren wird überprüft, ob eine RR5-Kontamination vorliegt (Primerpaar Ad5 324s *Bgl* II/Ad5 4600a) oder ob replikationskompetente Adenoviren (RCA) (Primerpaar Ad5 3315s / Ad5 4600a) vorhanden sind. Das auf das Transgen positiv getestete und RCA- sowie RR5- freie Sekundär- bzw. Tertiärlsyt wird weiter vermehrt und für die Adenoviruspräparation verwendet.

3.3.3 Adenoviruspräparation

Vom positiv getestetes Sekundär- bzw. Tertiärlsyt wurden 500 µl mit 4.5 ml DMEM Low Medium versetzt und auf, am Vortag in einer 60 mm-Kulturschale ausgesäte, HEK 293-Zellen gegeben und vier bis fünf Tage inkubiert. Von diesem Lysat werden 1.5 ml mit 15 ml DMEM Low Medium gemischt und auf drei 60 mm-Schalen mit 90 % konfluenten HEK 293- Zellen gegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von vier bis fünf Tagen wird das Zelllysyt dieser drei Kulturschalen mit 165 ml DMEM Low Medium gemischt und je 20 ml auf neun große, mit HEK 293- Zellen konfluent bewachsene Schalen (Durchmesser 14,5 cm) gegeben. Als Zellkontrolle wird bei den einzelnen Amplifikationsschritten eine Schale ohne Viruszugabe mitgeführt. Vier Tagen darauf werden von dem Virus-Lysat fünf Aliquots à 1.5 ml als Virusstarter für spätere Viruspräparationen in Kryo-Röhrchen bei -80°C eingelagert. Das übrige Lysat wird in einem sterilen Erlenmeyerkolben gesammelt und zur Zersetzung der Zellmembranen Nonidet- P40 in einer Endkonzentration von 0.5 % zugesetzt. Im Anschluss an eine 10- minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Suspension zwölf Minuten bei 13 000 rpm und 4°C zentrifugiert und der virushaltige Überstand in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt. Die Präzipitation der Viruspartikel erfolgt über Nacht bei 4°C durch die Zugabe von 0.5 Vol eiskalter PEG/NaCl-Lösung (20 % PEG, 2.5 M NaCl). Nach Zentrifugation bei 13 000 rpm für 15 min bei 4°C werden die Viruspellets in 4 ml TBS aufgenommen und bei RT für zehn Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Aufreinigen der Viruspartikel erfolgt durch Ultrazentrifugation über einen Dichtegradienten.

3.3.4 Adenovirus-Reinigung durch Ultrazentrifugation über CsCl-Dichtegradienten

Für die Ultrazentrifugation wird der virushaltige Überstand der lysierten Zellen mit 2 g CsCl versetzt und das Gewicht mit einer Waage bestimmt. Anschließend wird weiter CsCl hinzugefügt, bis eine Dichte der Lösung von genau 1.34 g/ml erreicht ist.

Der Ansatz ruht für eine Stunde bei 4°C und es folgt zur Pelletierung der Zellbruchstücke eine Zentrifugation bei 3000 rpm für zehn Minuten bei RT. Mit einer Pasteur-Pipette werden je 2 ml in zwei Beckman-Ultrazentrifugen-Röhrchen pipettiert, genau austariert und mit einem *Tube-Topper-Heater* versiegelt. Durch die Ultrazentrifugation bei 90 000 rpm für drei Stunden bei 20°C (Beckman Ultrazentrifuge, TLA-120 Rotor) bildet die CsCl-Lösung im Zentrifugenröhrchen einen kontinuierlichen Dichtegradienten (Konzentration von oben nach unten zunehmend), und die Viruspartikel sammeln sich ihrer Dichte entsprechend in einem weißen Ring. Dieser wird mit einer sterilen Insulinspritze abgezogen (ca. 1 ml) und über eine NAPTM-Säule aufgereinigt.

3.3.5 Entfernung des CsCl-Salzes

Über eine NAPTM-Säule wird die Adenovirusfraktion mittels Gelfiltrationschromatographie extrahiert. Im Anschluss an die Äquilibration der Säule mit TBS wird die Viruslösung auf die Säule gegeben und der Durchfluss mit 2.5 ml TBS aufgefüllt. Dann wird die Säule mit weiteren 6 ml TBS gewaschen und 12 Fraktionen des Eluats von je 0.5 ml aufgefangen. 10 µl jeder Fraktion werden im Verhältnis 1:10 mit TBS verdünnt und die Absorption bei 260 nm im Genesys 6 UV-Spectrophotometer bestimmt. Die Fraktionen mit der höchsten optischen Dichte werden dann vereinigt und erneut gemessen. Unter Einbezug des Verdünnungsfaktors kann dann die adenovirale Partikelkonzentration (Partikel/ µl) bestimmt werden, indem die Gesamtzahl der Viruspartikel (*optical particle units, opu*) ermittelt wird. Die OD wird mit dem Verdünnungsfaktor und 10⁹ multipliziert. Um die Viruslösung für die Lagerung bei -80°C zu stabilisieren, erfolgt die Zugabe von BSA (Rinderserum-Albumin) in einer Endkonzentration von 1 mg/ml. Abschließend wird nochmals eine Kontroll- PCR durchgeführt.

3.3.5.1 Plaque- Assay zur Bestimmung der biologisch aktiven adenoviralen Partikelkonzentration

Zur Bestimmung der Konzentration biologisch aktiver (infektiöser) Viruspartikel wird ein Plaque-Assay auf adhären Zellen durchgeführt. Unter Ausnutzung des zytopathischen Effekts lassen sich die *plaque forming units* (pfu) ermitteln. Hierfür werden am Vortag HEK 293-Zellen so in einer 6-Well- Zellkulturplatte ausgesät, dass sie einen konfluenten *Monolayer* bilden. Dann wird von der Virussuspension eine dekadische Verdünnungsreihe von 10⁻² bis 10⁻⁹ hergestellt und als Doppelbestimmung auf die Zellen gegeben. Nach zwei Stunden im Brutschrank wird die Viruslösung wieder abgenommen und die Zellen mit 3 ml 1.25 %iger *low-melting-point* Agaroselösung überschichtet. Nachdem die Agarose bei RT fest geworden ist, werden die Platten bei 37°C weitere zehn bis 14 Tage im Brutschrank inkubiert. Nun können die Plaques ausgezählt und der Titer nach

folgender Formel berechnet werden. Die Anzahl der infektiösen Viruspartikel wird in *plaque forming units* (pfu) angegeben:

$$\text{Virus-Titer (pfu/ml)} = (\text{N} \times \text{F}) / \text{V}^*$$

*N: Anzahl der gebildeten Plaques; F: Verdünnungsfaktor; V: Volumen der zur Infektion verwendeten Virus-Suspension

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Präparation primärer muriner und humaner adulter Kardiofibroblasten

Sowohl murine als auch humane adulte Kardiofibroblasten wurden mittels Auswachsen aus Gewebestückchen gewonnen (Lindner *et al.*, 2012). Dazu wurde linksventrikuläres Myokardgewebe der 12 Wochen alten Maus (C57BL/6j) bzw. Gewebe einer Endomyokardbiopsie mit einem Skalpell zunächst zerteilt und dann in Zellkulturplatten durch Einritzen fixiert. Aufgrund der proliferatorischen Eigenschaften der Fibroblasten wachsen diese adhärent aus den Gewebestückchen aus. Bis zur Konfluenz der murinen Kardiofibroblasten wird regelmäßig das Medium mit 20 % FKS gewechselt. Anschließend werden die Fibroblasten trypsiniert und in eine Zellkulturflasche überführt. Humane Kardiofibroblasten werden in Iscove's Basalmedium mit 10 % humanem Serum, 10 % FKS und P/S kultiviert. Alle Versuche werden zwischen Passage 2 und 6 bzw. 7 bei den murinen Zellen durchgeführt. Murine Kardiofibroblasten werden in DMEM mit 20 % FKS und P/S kultiviert. Alle Versuche werden in Gegenwart von 10 % FKS durchgeführt.

3.4.2 Präparation primärer muriner embryonaler Kardiofibroblasten und Kardiomyozyten

Als Nebenprodukt der Präparation von murinen embryonalen Kardiomyozyten ergeben sich nach einem Protokoll von Westermann *et al.* embryonale Kardiofibroblasten (Westermann *et al.*, 2011a). Bei diesem Protokoll werden tragende Mäuseweibchen 12 Tage nach dem Decken mit CO₂ euthanasiert und die Embryonen entnommen. Nach der Präparation des Herzens wird dies in ein Gefäß mit kaltem Trypsin/ EDTA auf Eis überführt und über Nacht bei 4°C verdaut. Anschließend erfolgt eine 15minütige Inkubation bei 37°C und die Zugabe von FKS und P/S- komplettierten DMEM ohne L- Glutamin. Nach der Resuspension werden die lysierten Herzen gepoolt und in eine Zellkulturflasche überführt. Nach 60 min unter Standardzellkulturbedingungen sind die Fibroblasten adhärent und der Überstand kann gegen frisches Vollmedium ersetzt werden. Um die RNA aus den Kardiomyozyten isolieren zu können, wurden die Zellen aus dem Überstand pelletiert und bis zur RNA- Isolation bei -80°C gelagert.

3.4.3 Präparation von primären neonatalen Rattenkardiofibroblasten

Neonatale Kardiofibroblasten ergeben sich als Nebenprodukt der Präparation von neonatalen Kardiomyozyten nach einem von *Vetter et al.* etablierten Protokoll (*Vetter et al.*, 1998). Dabei wird aus ein bis drei Tage alten Wistar-Ratten das ventrikuläre Gewebe isoliert. Dafür werden die Tiere zuerst mit 70 % Ethanol gereinigt, in Rückenlage mit einer Pinzette fixiert und mit einer Schere dekapitiert. Mit einem Sternalschnitt bis zum Zwerchfell erfolgt die Eröffnung des Brustkorbes. Durch gezielten Druck mit beiden Seiten einer Pinzette auf die Ränder des eröffneten Brustkorbs tritt das Herz an der Schnittstelle hervor und kann entnommen werden. Die entnommenen Herzen werden in eiskalter 1 x ZIM/P/S-Lösung gesammelt, von den Vorhöfen und eventuell noch vorhandenen Fett-, Bindegewebs- und Gefäßresten befreit und in 1 x ZIM/P/S-Lösung gewaschen. Dann werden die Ventrikel in ca. 1 mm³ Stücke zerkleinert, zweimal in Antibiotika-freier ZIM-Lösung gewaschen und in einen 50 ml- Erlenmeyerkolben überführt. Der Gewebeaufschluss wird in je 15 ml 1 x ZIM/Trypsin-Lösung für je 15 min bei 37 °C unter Rühren in einem Wasserbad durchgeführt. Der erste Verdau wird verworfen, dann wird aber nach je 15 min der Überstand abgenommen und in ein 50 ml Röhrchen mit 4 ml eiskaltem FKS überführt. Nach Zentrifugation bei 400 g für zehn Minuten bei RT wird das Pellet in 2 ml CMRL 1415-Medium mit FKS (1:1) resuspendiert und die Suspension auf Eis gelagert. Der Verdau mit 1x ZIM/Trypsin-Lösung wurde sechs bis acht Mal wiederholt, bis die Ventrikelstückchen fast vollständig aufgelöst waren. Die gesammelten Zellsuspensionen wurden vereinigt und erneut für zehn Minuten bei 400 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Kompletmedium resuspendiert (je Herz 1 ml Medium) und in 75 cm²-Zellkulturflaschen übertragen. Im Brutschrank bei 37 °C, 0 %iger CO₂- und 5 %iger O₂-Sättigung erfolgte für 90 min ein selektives Anheften aller Zellen außer der Herzmuskelzellen (z. B. Fibroblasten). Nach 90 min wurde der Überstand mit den Kardiomyozyten und die verbliebenen Zellen mit frischen DMEM bedeckt und bis zur Konfluenz kultiviert.

3.4.4 Passagierung von primärer und permanenter Zellen

Permanente Zelllinien werden in Zellkulturflaschen bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Bei einer 80 bis 100 %iger Konfluenz werden die Zellen alle drei bis fünf Tage passagiert. Hierfür wird der Zellrasen vorsichtig mit PBS gewaschen und der Zellrasen durch Trypsinierung bei 37°C abgelöst. Durch Zugabe von Kulturmedium mit 10 % FKS wird die Trypsinierung gestoppt. Die durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt Zellen werden auf neue Zellkulturflaschen verteilt und das entsprechende Medium zugesetzt oder je nach benötigter Zelldichte für Experimente in Zellkultur-Platten ausgesät. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer.

3.4.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Hierfür werden tote Zellen mit Trypanblau gefärbt und entsprechend nicht mitgezählt. Alle vier Großquadrate (Q) werden ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl (Zellen/ml)} = (Q1+Q2+Q3+Q4)/4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

3.4.6 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

Um eukaryotische Zellen längerfristig lagern zu können, werden die mit PBS gewaschenen und trypsinisierten Zellen nach Abstoppen der Trypsinwirkung durch FKS gezählt und anschließend für fünf Minuten bei 1000 rpm und 4°C pelletiert. Das Pellet wird dann in Einfriermedium (95 % FKS, 5 % DMSO) aufgenommen und zu je 1 ml in sterilen Kryo-Röhrchen mit Hilfe eines *Freezing-Containers* mit einer Kühlungsrate von 1°C/min auf -80°C heruntergekühlt. Nach zwei Tagen erfolgte die Lagerung der Zellen in Stickstoff bei -196°C.

Die Reaktivierung dieser Zellen erfolgt, indem die Zellen im Wasserbad bei 37°C zügig aufgetaut und anschließend mit reichlich Medium in eine Zellkulturflasche überführt werden. Nach dem Anwachsen der Zellen wird das Medium gewechselt und nach einigen Tagen erfolgt die Passagierung der Zellen.

3.4.7 Transfektion eukaryotischer Zellen

Eine Transfektion dient der Aufnahme von Plasmid- DNA in eukaryotische Zellen. Dabei wird eine transiente Genexpression mit einem Maximum nach 48 bis 72 Stunden herbeigeführt. Danach wird die fremde DNA zum einen durch die Zellproliferation ausgedünnt, zum anderen in der Zelle degradiert. In Einzelfällen kann es aber auch zu einer Integration in das Wirtsgenom kommen.

3.4.7.1 Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Calciumphosphat

Diese Methode macht sich die phagozytotische Aufnahme von an Calciumphosphatkristallen gebundene DNA in eukaryotische Zellen zu Nutze. Bei Verwendung einer 6- Well- Zellkulturplatte werden für jede Vertiefung 2 µg DNA mit 250 µl 0.25M CaCl₂-Lösung gemischt und dann 250 µl 2x HBS tropfenweise hinzugegeben. Der pH-Wert des HBS-Puffers wird kurz vor der Transfektion auf exakt 7.05 eingestellt und die Lösung durch Filtrieren sterilisiert. Nach einer Minute Inkubation bei RT wird der Transfektionsansatz tropfenweise zum Zellkulturmedium gegeben. Am nächsten Tag wird ein Mediumswechsel durchgeführt.

3.4.7.2 Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)

Auch die Methode macht sich die Phagozytose eukaryotischer Zellen zunutze. Hierfür bildet das kationische Polymer Polyethylenimin mit DNA-Molekülen lösliche Komplexe, die von den Zellen aufgenommen werden.

Für die Transfektion mit Polyethylenimin wird für eine Vertiefung einer 6- Well- Zellkulturplatte 150 µl 150 mM NaCl mit 2µg Plasmid-DNA (Lösung A) und 1ml 150 mM NaCl mit 3 µl PEI (2.58 µg/µl) gemischt (Lösung B). Die Lösung A wird zur Lösung B hinzu pipettiert und der Ansatz anschließend für 15 min bei RT inkubiert um dann tropfenweise auf die Zellen gegeben zu werden.

3.4.7.3 Transfektion mit kommerziellen Transfektionsagenzien

Die kommerziellen Transfektionsagenzien Lipofectamine, RotiFect Plus, FuGene und X-tremeGene9 werden nach Herstellerangaben verwendet. Dabei handelt es sich um polymer- oder liposombasierte Transfektionsagenzien mit geringer Zelltoxizität. Die Transfektionsrate wird mit Hilfe eines GFP-exprimierenden Plasmids nach 72 Stunden unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops überprüft.

3.4.8 Transduktion von Zellkulturen mit rekombinanten Adenoviren

Für den Adeno- Vektor-vermittelten Gentransfer wird die gewünschte Partikelzahl pro Zelle oder die MOI (*multiplicity of infection*) unter Zuhilfenahme der im Plaque-Assay bestimmten *plaque forming units* berechnet. Die Vektoren werden dann tropfenweise auf die mit Kulturmedium bedeckten Zellen gegeben. Anschließend werden die Zellkulturplatten bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Als Transduktionskontrolle wird immer ein Ansatz mit einem GFP- exprimierender Vektor mitgeführt und der Transduktionserfolg am Fluoreszenzmikroskop kontrolliert und dokumentiert. Die quantitative Auswertung erfolgt mit dem Programm ImageJ (*National Institutes of Health*).

3.4.9 Transduktion mit TransMAX als Enhancer

Der Transduktionsenhancer *TransMAX* wird nach Angaben des Herstellers benutzt. Mit diesem Reagenz kann bei Zellen, deren Transduktionsrate mit Adenoviren nicht zufriedenstellend ist, die Aufnahme von Viruspartikeln erheblich gesteigert werden. Dabei wird die Oberfläche der adenoviralen Partikel modifiziert. Es ist zu beachten, dass das Herstellerprotokoll chargenspezifisch ist.

3.4.10 Transduktion mit Polybrene als Enhancer

Das kationische Polymer Polybrene soll die ladungsbedingte Abstoßung von Viruspartikel und Zelloberfläche reduzieren. Es wird mit einer Konzentration von 8 µg/ml Zellkulturüberstand eingesetzt. Die Zellen werden zuvor entweder mit Vollmedium oder mit „Hungermedium“ für 7 Stunden inkubiert.

3.4.11 Transduktion mit Na-Caprato als Enhancer

Humane Fibroblasten werden vor der eigentlichen Transduktion mit 30 mM Na- Caprato präinkubiert. Anschließend erfolgen ein Mediumswechsel und die Zugabe der adenoviralen Vektoren.

3.4.12 Mechanische Stimulation von murinen adulten Kardiofibroblasten

Die Versuche zur mechanischen Stimulation wurden unter Verwendung von Kollagen 1-beschichteten 6- Well- Zellkulturplatten mit flexiblem Boden und dem Flexcell System FX 4000 Tension Plus durchgeführt. Dieses Gerät nutzt ein reguliertes Vakuum zur Deformation der kultivierten Zellen. Zunächst werden je Well 5×10^5 murine adulte Kardiofibroblasten in den Bioflex-Platten über Nacht kultiviert. Anschließend erfolgen die Transduktion der Zellen mittels adenoviraler Vektoren und die erneute Inkubation über Nacht im Brutschrank. Nun wird das Medium gewechselt und die Platten der mechanischen Stimulation mit einer Frequenz von 1Hz für 3, 6 oder 168 Stunden unter Zellkulturbedingungen zugeführt. Als nichtstimulierte Kontrolle werden Zellen in denselben Platten kultiviert, die mechanische Stimulation jedoch nicht durchgeführt. Abschließend wird der Überstand abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Platten können nun der RNA- Isolation zugeführt werden oder für eine spätere Isolation bei -80°C gelagert werden.

3.4.13 Isolation primärer muriner Splenozyten

Zur Präparation von Splenozyten werden adulte Mäuse euthanasiert und die Milz entnommen. Die Anzahl richtet sich dabei nach dem geplanten Umfang des Migrationsassays. In der Regel wird eine Milz pro 96- Well- Migrationsplatte verwendet. Je Milz werden zunächst 10 ml PBS in eine 10 cm- Zellkulturschale gegeben. Anschließend wird die Milz in einen 100 µm Nylon-Cell Strainer transferiert und mit dem Kolben einer Spritze passiert. Die Suspension wird dann in eine Spritze aufgezogen und durch eine 25G- Kanüle gespritzt, so dass die Zellen vereinzelt werden. Mittels eines Pre- Separation- Filters werden die Zellen weiter separiert. Nach der Pelletierung bei 1300 rpm für 7 min bei

Raumtemperatur erfolgt die Lyse der Erythrozyten mit Hilfe von 3 ml ACK Lysing Buffer pro Milz und eine erneute Zentrifugation. Abschließend wird das Zellpellet in DMEM mit 0.5% FKS und P/S resuspendiert und die Zellen gezählt. Die so gewonnenen Splenozyten werden beim Migrationsassay eingesetzt.

3.4.14 Migrationsassay

Migrationsassays werden mittels *Transwell® Permeable Supports* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. In die untere 96-Well-Platte wurden 0,235 ml konditionierter Zellkulturüberstand von Ad5-shCTGF-A- oder Ad5-NCshRNA- transduzierten adulten murinen Kardiofibroblasten pipettiert und das *transwell insert* eingesetzt (Abbildung 3.3). Dieses Insert besteht aus einer Membran mit Poren und fasst 75µl Zellsuspension mit 10^5 Splenozyten. Nach 24 Stunden werden die durch die poröse Membran in die Vertiefung der Zellkulturplatte gewanderten Zellen resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und mit Hilfe des FACS-Gerätes ausgezählt.

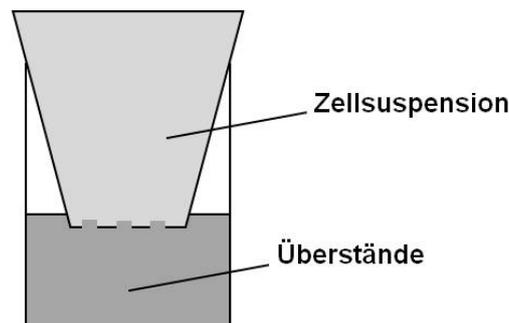


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des Transwell- Migrationsassays

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Isolation von Proteinen

Für die Proteinisolierung werden kultivierte eukaryotische Zellen zunächst vorsichtig mit PBS gewaschen, dann mit 1 ml PBS resuspendiert und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Nach der Zentrifugation bei 10 000 rpm für drei Minuten und 4°C wurde das Pellet in 50 µl „General“-Lysepuffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird das Lysat bei 14 000 rpm für 20 min und 4 °C zentrifugiert und aus dem abgenommenen Überstand die Proteinkonzentration mittels BCA-Test bestimmt.

3.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Quantifizierung der Proteinkonzentration erfolgt mit dem BCA Protein Assay Kit nach Angaben des Herstellers. Dabei reduzieren die Proteine Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung. Die Absorption der letztlich entstehenden violett gefärbten Lösung wird bei 562nm gemessen. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wird eine Standardkurve mit BSA erstellt.

3.5.3 SDS-PAGE und Western Blot

3.5.3.1 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

Für die Auftrennung mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden 30 μg des Proteins verwendet. Um die Disulfidbrücken der Proteine zu spalten, werden die Proben in NuPage™ LDS Probenpuffer mit 1/10 Vol DTT (Dithiothreitol) für fünf Minuten bei 99°C erhitzt. Die dadurch reduzierten und denaturierten Proteine werden dann bis zur Beladung des NuPAGE 4 bis 12 %igen Bis-Tris Gels auf Eis gestellt. Die Auftrennung erfolgt unter Verwendung von *Laufpuffer* bei 90 bis 140 V für ca. 1.5 h. Als Größenmarker wird Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder verwendet.

3.5.3.2 Western-Blot

Die Übertragung (*blotting*) von Proteinen auf eine PVDF-Trägermembran wird als Western Blot bezeichnet. Für den Transfer werden Schwämmchen und 3MM Whatman-Papier in Transferpuffer getränkt und luftblasenfrei in die *Blotting*-Halterung gelegt (Abbildung 3.4). Die Nylonmembran wird zunächst zehn Sekunden in Methanol aktiviert und danach in A. bidest. gespült. Der Transfer der Proteine auf die Nylonmembran erfolgt im, mit Transferpuffer gefüllten Tank unter Kühlung bei 200 mA (100 V) für 1.5 h.

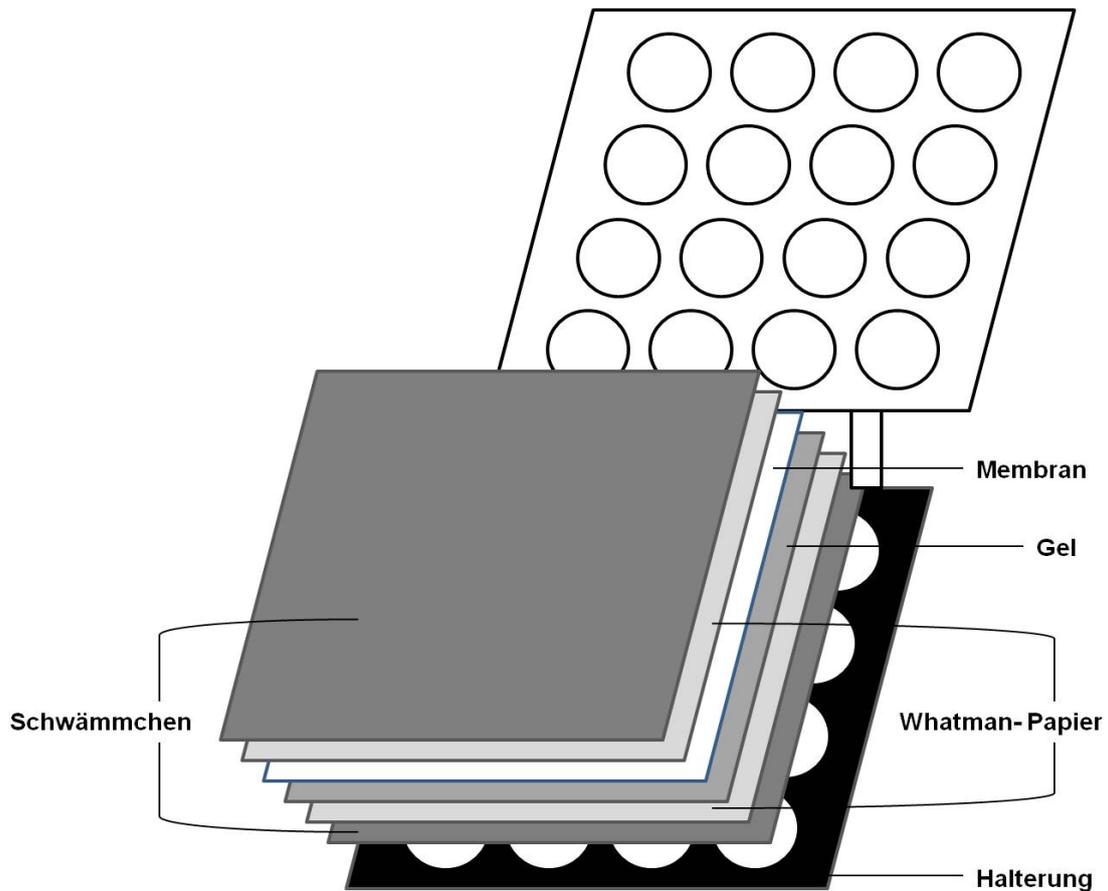


Abbildung 3.4: Schematischer Aufbau eines nassen Western Blots

Um spezifische Proteinbanden nachweisen zu können, werden zunächst die unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der PVDF-Membran mit 5 % Magermilchpulver/PBST für 30 min bei RT oder 4°C über Nacht blockiert. Der Primärantikörper wird in der benötigten Konzentration in 5 % Magermilchpulver/PBST verdünnt und die Membran damit für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBST wird die Membran im sekundären HRP (*horseradish- peroxidase*)-konjugierten Antikörper, der in 5 % Milchpulver/PBST verdünnt wird, für eine Stunde bei RT inkubiert. Darauf folgte dreimaliges Waschen mit PBST für 10 min bei Raumtemperatur. Die spezifisch gebundenen Antikörper werden abschließend mit Rodeo™ ECL Western Blotting Reagent und einem Image Reader LAS-4000mini mittels Chemilumineszenz nachgewiesen. Die relative Quantifizierung der Proteinmenge erfolgt mit der Software ImageJ. Je nach Bedarf kann die PVDF Membran mit den gebundenen Proteinen bei 4°C in PBST gelagert oder *gestriipt* werden, um eine erneute Antikörperbindung mit einem anderen spezifischen Antikörper durchführen zu können. Hierfür wird die Membran eine Stunde bei 55 °C in „Stripping“-Puffer inkubiert.

3.5.4 Immunfluoreszenz-Färbung

Die adulten murinen Kardiofibroblasten wurden zu je 500 000 Zellen auf sterilen Deckgläschen in Zellkulturschalen mit 60 mm Durchmesser ausgesät und bei 37°C inkubiert. Nach 72 Stunden wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit 2 ml PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml Lösung A zur Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellkulturschälchen zehn Minuten bei RT inkubiert und anschließend dreimal mit 3 ml TBS gewaschen. Anschließend werden die Deckgläschen in eine feuchte Kammer, bestehend aus einer mit feuchten Papier und Parafilm® ausgelegten verschließbaren Box, transferiert. Auf die Deckgläschen werden 50 µl Blockierungslösung B pipettiert und 20 min bei RT inkubiert. Der primäre Antikörper wird in Lösung B verdünnt und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS wird analog der sekundäre Antikörper appliziert und lichtgeschützt inkubiert. Abschließend wurden die Zellen dreimal mit TBS gewaschen und mit einem Tropfen DAPI- haltigem Fluoromount-G™ auf einem Objektträger befestigt. Für die Fluoreszenzanalyse mechanisch stimulierter muriner Kardiofibroblasten wird die Silikonmembran der BioFlex- Platten mit einem Skalpell ausgeschnitten und in eine 6- Well- Zellkulturplatte transferiert, um dort die weiteren Schritte durchzuführen. Zum Nachweis des Zytoskeletts wurden die Zellen für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit Phalloidin inkubiert.

3.6 Statistik

Die statistischen Auswertungen werden mit dem Programm Graph Pad Prism 5.0™ durchgeführt und die Daten als Balken mit Mittelwert und Standardabweichung, Streudiagramm mit Mittelwert, Punkte oder Box- Whisker- Plot mit Mittelwert sowie Minimum und Maximum dargestellt. Nach der Überprüfung auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov- Smirnov- Test wird der Mann-Whitney- U- Test (2- tailed) zum Vergleich verschiedener Gruppen durchgeführt. Ein p- Wert kleiner als 0.05 wird als signifikant interpretiert. Die Korrelationsanalysen werden mittels Spearman Korrelationskoeffizient durchgeführt. Die Interpretation des Koeffizienten ist Tabelle 3.2 zu entnehmen.

Tabelle 3.2: Interpretation des Spearman- Korrelationskoeffizienten (modifiziert nach Zou *et al.*, 2003)

Spearman- Korrelationskoeffizient r	Interpretation
-1.0/+1.0	Perfekte negative/ positive Korrelation
-0.7/+0.7	Starke negative/ positive Korrelation
-0.5/+0.5	Moderate negative/ positive Korrelation
-0.2/+0.2	Schwache negative/ positive Korrelation
0.0	Kein Zusammenhang

4 Ergebnisse

4.1 Expressionsanalyse der CCN- Familie

4.1.1 Expressionsprofil der CCN- Familie in humanen Geweben

Um zunächst ein Expressionsprofil der CCN-Familie von verschiedenen humanen Geweben zu erstellen, wurden mittels RT-PCR Genexpressionsanalysen bei einem *FirstChoice* Human Total RNA Survey Panel (Ambion®) durchgeführt. Dieses Panel umfasst jeweils die totale RNA von 20 verschiedenen normalen humanen Geweben, wobei jeweils 3 Gewebesponder gepoolt vorlagen.

Die Untersuchung der CCN- mRNA- Expression in den zur Verfügung stehenden Geweben zeigte, dass vor allem Cyr61 und CTGF im Vergleich zu Nov, WISP1, WISP2 und WISP3 deutlich dominanter exprimiert werden. Je nach Gewebetyp können die Mengen aber unterschiedlich sein. Die WISP3- mRNA-Expression lag in Gehirn, Herz, Leber, Lunge, Skelettmuskulatur und Milz unterhalb der Detektionsgrenze (Abbildung 4.1).

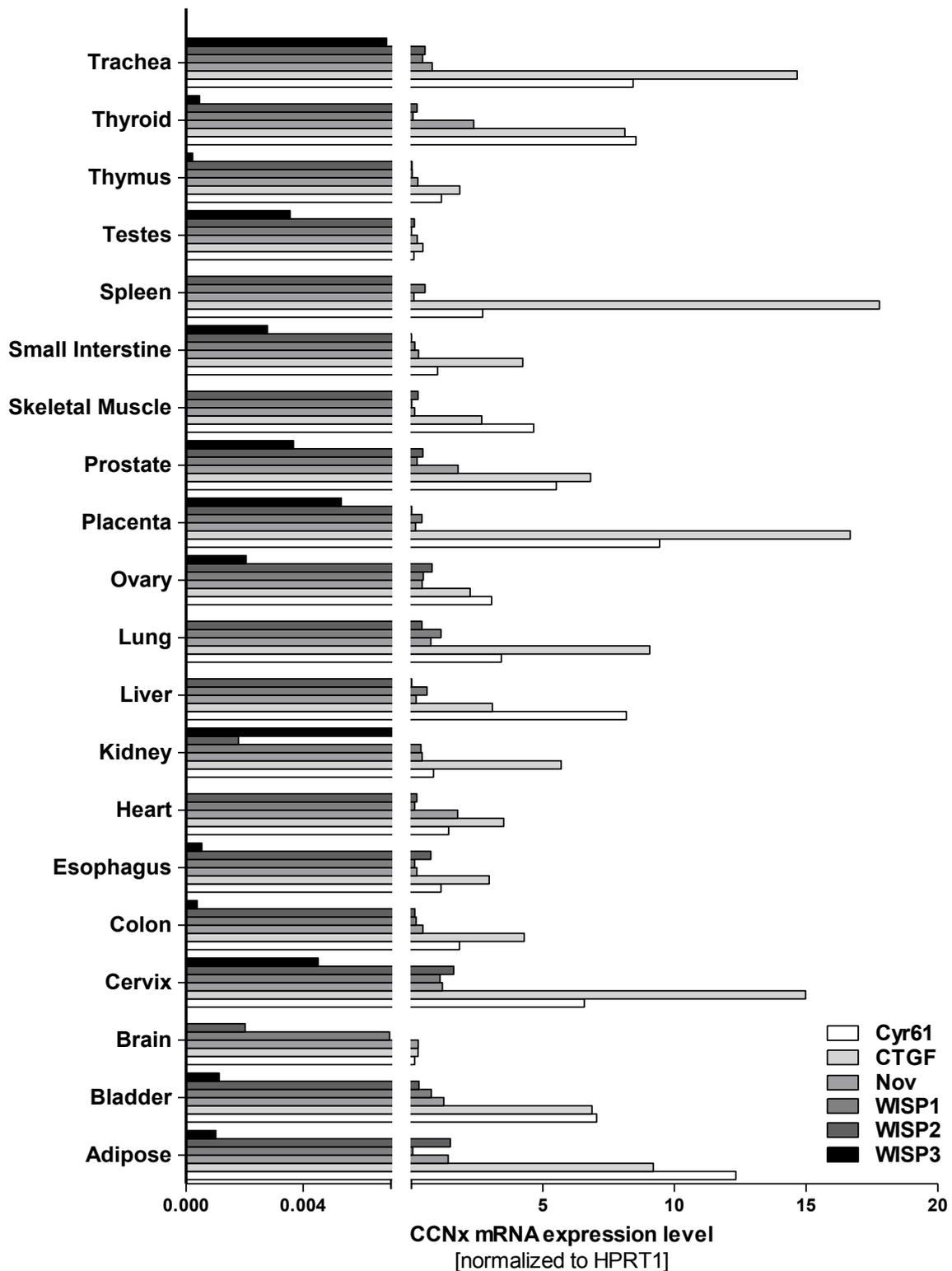


Abbildung 4.1: CCN- Genexpression in verschiedenen humanen Geweben. Für die Analyse der Expression von Cyr61, CTGF, Nov, WISP1, WISP2 und WISP3 wurde die RNA von 20 verschiedenen Geweben eines FirstChoice Human Total RNA Survey Panels (Ambion®) mittels RT-qPCR und spezifischer Sonden (Taqman®) untersucht. Die Normalisierung erfolgte gegen das *housekeeping*- Gen HPRT1 (*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1*) mit der Formel $2^{-\Delta Ct}$.

4.1.2 Expression und Regulation der CCN- Proteine bei Myokardinfarkt, Myokarditis und Kardiomyopathie

In einer umfassenden Mikroarray- Studie von Kardiomyopathiepatienten konnten bei 3 Mitgliedern der CCN- Genfamilie (Cyr61, CTGF, WISP1) erhöhte Expressionslevel im Myokard festgestellt werden (Wittchen *et al.*, 2007). Daher sollten nun die kardialen Expressionslevel aller CCN-Mitglieder in murinen Modellen des Myokardinfarkts und der CVB3-Myokarditis sowie bei Kardiomyopathie-Patienten detailliert untersucht werden.

4.1.2.1 Expression der CCN- Familie nach Myokardinfarkt im Mausmodell

Zur Untersuchung der mRNA- Expression der CCN-Genfamilie nach Myokardinfarkt (MI) wurden die Herzen von scheinoperierten (sham, n= 6) sowie von MI-operierten (MI LV, n= 6) C57Bl/6j-Mäusen 4 Tage nach der Operation entnommen und die RNA aus den linken Ventrikeln analysiert. Cyr61 und Nov zeigten hier keine signifikant veränderte Expression, wohingegen CTGF (um 722,3%), WISP1 (um 1400,1%) und WISP2 (um 738.3%) mit einer signifikanten Erhöhung der mRNA-Expression reagierten. Bei der ohnehin schon sehr geringen WISP3- Expression konnte eine signifikante Reduktion der Genexpression verzeichnet werden (um 47,9%) (Abbildung 4.2).

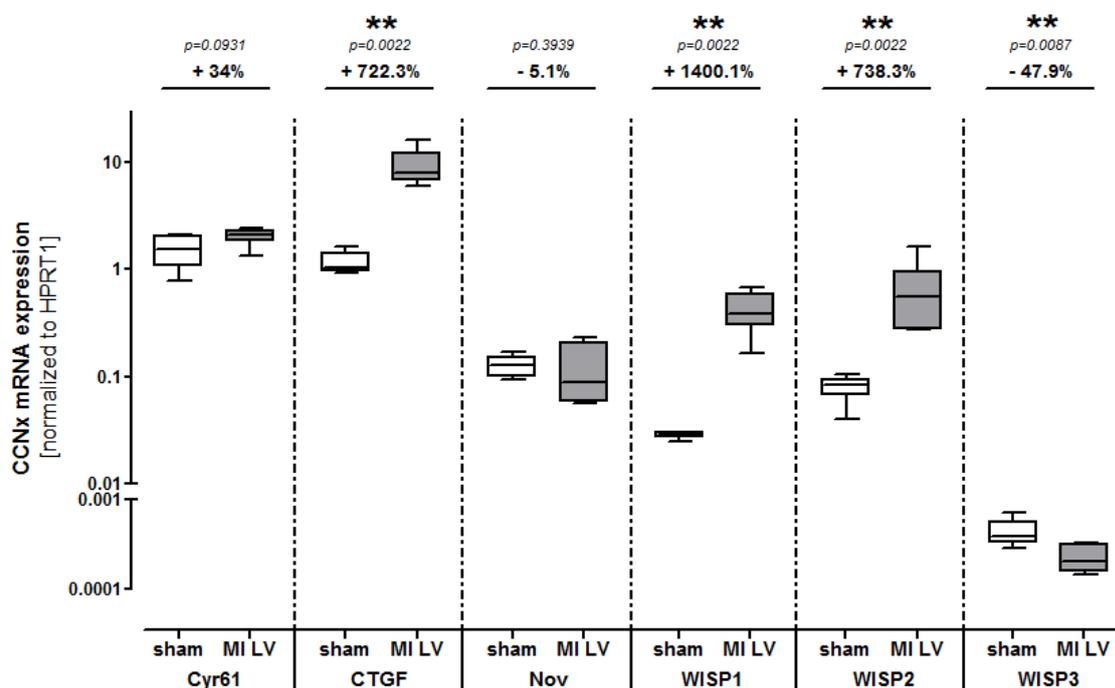


Abbildung 4.2: CCN-mRNA- Expression im murinen Myokardinfarktmodell. Die Entnahme des Herzens erfolgte am Tag 4 nach Infarktsetzung. Die Expressionsanalyse von Cyr61, CTGF, Nov, WISP1, WISP2 und WISP3 im linken Ventrikel wurde mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman®) durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte gegen das *housekeeping*- Gen HPRT1 (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1) mit der Formel $2^{-\Delta Ct}$. ** $p \leq 0.01$; nicht signifikant, wenn $p > 0.05$.

4.1.2.2 Expression der CCN- Familie im Verlauf einer CVB3-Myokarditis im Mausmodell

Um die CCN-mRNA-Expression im linken Ventrikel bei einer CVB3-Myokarditis beurteilen zu können, wurden CVB3-infizierte Tiere (CVB3, n= 9) mit Kochsalzlösung- injizierten Tieren (sham, n= 8) 7 Tage nach Injektion verglichen. Es zeigte sich für CTGF (um 582.6%) und WISP2 (um 221%) eine signifikant erhöhte mRNA-Expression. Für Cyr61 und Nov war keine Veränderung feststellbar. Im Gegensatz zum MI Modell war die Induktion von WISP1 nur marginal (um 68.7%). WISP3 war bei diesen Tieren nicht detektierbar (Abbildung 4.3).

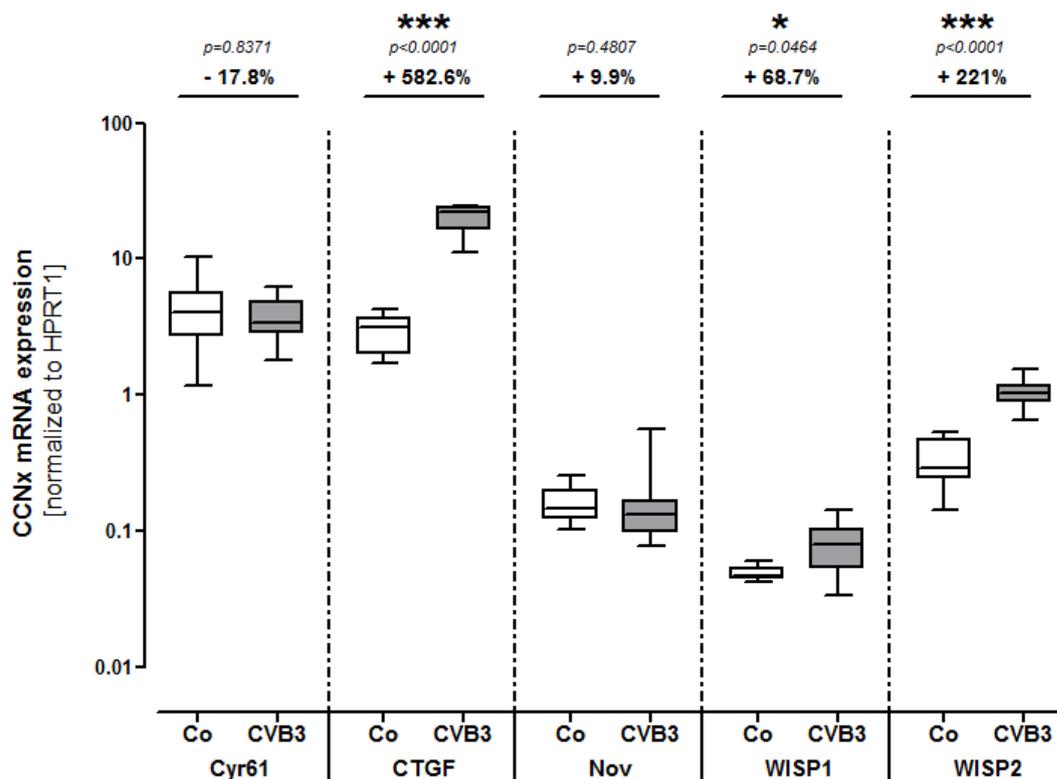


Abbildung 4.3: CCN- mRNA- Expression im murinen Modell der CVB3- induzierten Myokarditis. Die Entnahme des Herzens erfolgte am Tag 7 nach Injektion von CVB3 oder NaCl- Lösung (Co). Die Expressionsanalyse von Cyr61, CTGF, Nov, WISP1, WISP2 und WISP3 im linken Ventrikel wurde mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman®) durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte gegen das *housekeeping*- Gen HPRT1 (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1) mit der Formel $2^{-\Delta Ct}$. * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$; nicht signifikant, wenn $p > 0.05$.

4.1.2.3 Expressionsprofil der CCN- Familie bei Patienten mit Kardiomyopathie

Anhand von Endomyokardbiopsien (EMB) von 40 Kardiomyopathiepatienten und 8 Patienten, deren Symptome zunächst als kardialen Ursprungs vermutet wurden, aber in der EMB keine pathologischen Veränderungen des Herzens nachgewiesen werden konnten, wurde von der CCN-Familie ein kardiales Expressionsprofil erstellt. Vor der RT- qPCR- Quantifizierung mit spezifischen Sonden (Taqman®) erfolgte die Präamplifikation der Gesamt- RNA. Bei der Quantifizierung zeigte sich, dass die mRNA von Cyr61, CTGF, Nov und WISP1 bei einer Kardiomyopathie signifikant erhöht ist. Besonders CTGF ist hier hervorzuheben, da eine Expressionssteigerung von 2852.9% festgestellt wurde (Abbildung 4.4 B). Die mRNA- Expression von Cyr61 war um 277.2% erhöht (Abbildung 4.4 A), die von Nov um 740.9% (Abbildung 4.4 C) und die von WISP1 um 505.3% (Abbildung 4.4 D). Die Expression von WISP2 und WISP3 zeigte keine signifikante Veränderung (Abbildung 4.4 E und F). Des Weiteren war auffällig, dass die einzelnen CCN- Gene bei den gesunden Probanden unterschiedlich hohe Expressionslevel aufwiesen (Cyr61> CTGF> Nov> WISP2> WISP1> WISP3) und diese für Cyr61, CTGF, Nov und WISP1 durch ihre Homogenität auffielen (Abbildung 4.4 A- F).

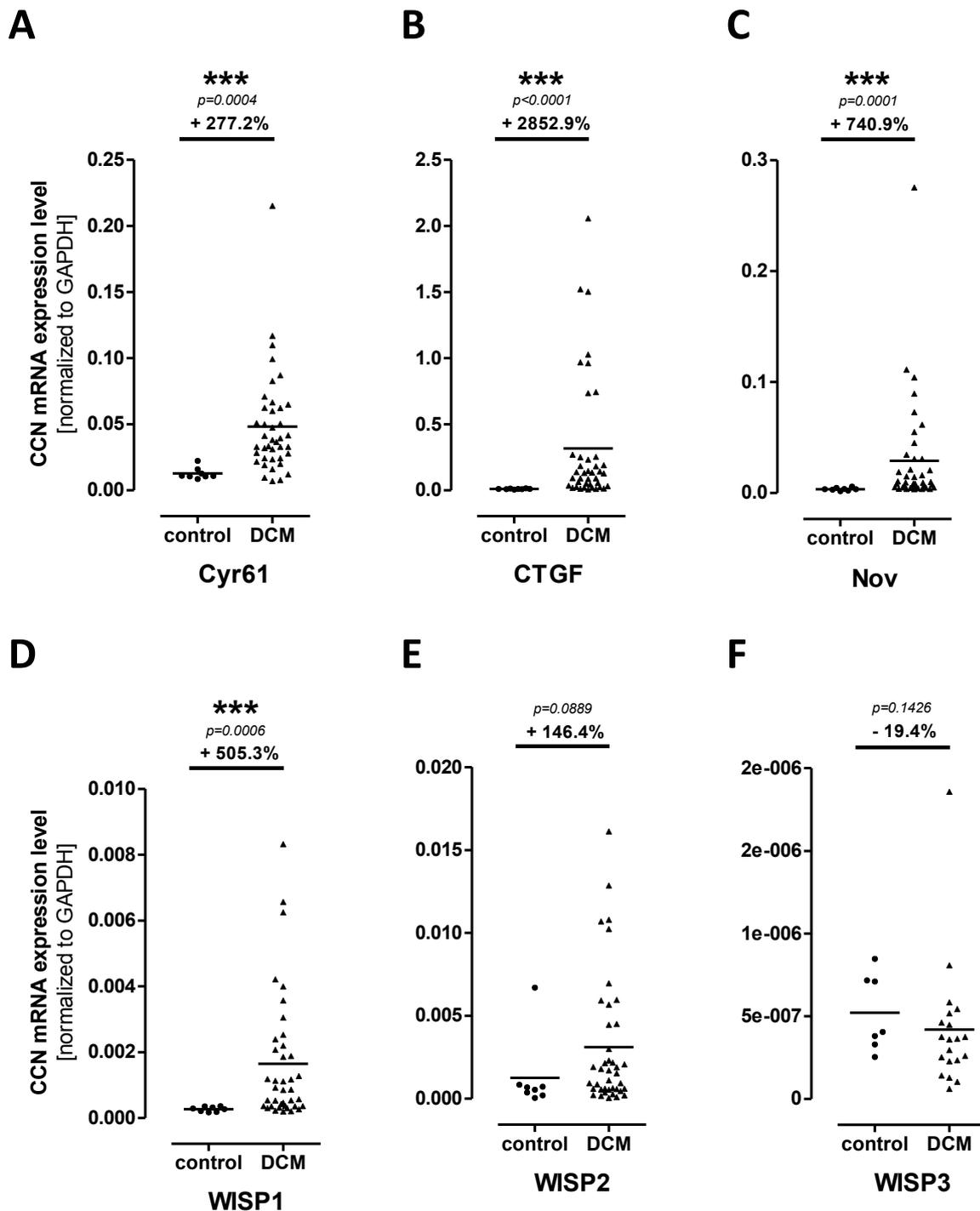


Abbildung 4.4: CCN- mRNA- Expression bei Kardiomyopathiepatienten. Die Entnahme der Endomyokardbiopsie erfolgte bei Kardiomyopathiepatienten und herzgesunden Kontrollprobanden im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung aus der rechten Seite des ventrikulären Septums. Die Expressionsanalyse von Cyr61, CTGF, Nov, WISP1, WISP2 und WISP3 wurde mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman®) durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) mit der Formel $2^{-\Delta Ct}$. Die mittlere Veränderung der Expression wurde in Prozent angegeben. $*** p \leq 0.001$; nicht signifikant, wenn $p > 0.05$.

Neben den Genen der CCN- Familie wurde eine Reihe von Genen untersucht, welche bei Kardiomyopathien eine Rolle spielen könnten. Hier zeigten sich mit Ausnahme von Ccl7 (-87.1%, $p=0.0428$), CD55 (-49.4%, $p=0.0338$), STAT1 (-62.7%, $p=0.0454$), STAT3 (-56.2%, $p=0.0158$) und STAT4 (-52.0%, $p=0.0429$) bei Kardiomyopathiepatienten keine weiteren signifikanten Veränderungen (Tabelle 10.2).

4.1.2.4 EF und LVEDD als klinische Parameter der dilatativen Kardiomyopathie

Bei der diagnostischen Untersuchung der Patienten wurden auch die Ejektionsfraktion (EF) und der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD) bestimmt. Die Auswertung zeigte bei den DCM- Patienten eine um 44.6% ($p=0.0004$) verringerte EF und einen um 21.4% ($p=0.0004$) größeren LVEDD gegenüber der Kontrollgruppe (Abbildung 4.5).

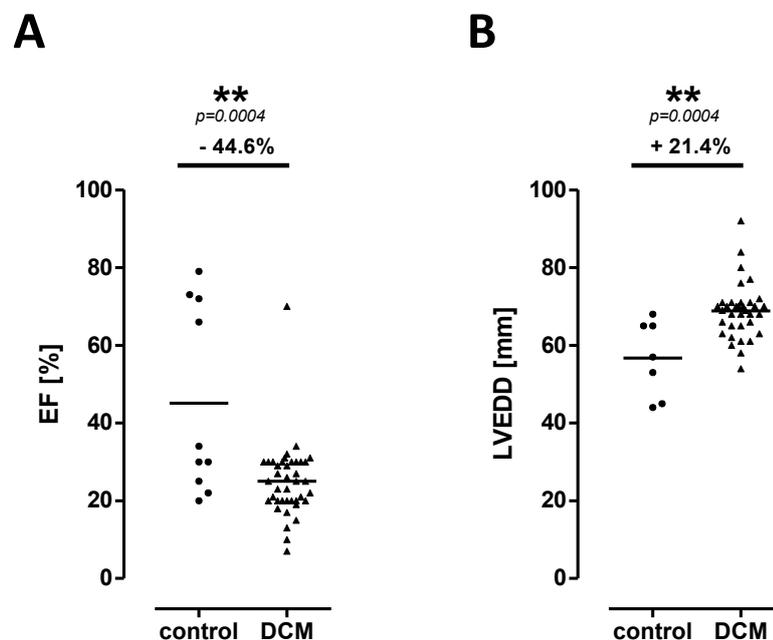


Abbildung 4.5: EF und LVEDD bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie. Vor der Endomyokardbiopsie (EMB) wurden im Rahmen der diagnostischen Untersuchung die Ejektionsfraktion (EF) und der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD) bestimmt. Die Werte der DCM- Patienten wurden mit denen von Patienten verglichen, deren Symptome zunächst als kardialen Ursprungs vermutet wurden, aber in der EMB keine pathologischen Veränderungen des Herzens nachgewiesen werden konnten. $**p \leq 0.01$.

Da CTGF sowohl in den Mausmodellen zum Myokardinfarkt und CVB3- Myokarditis als auch bei den Untersuchungen der Endomyokardbiopsien von Kardiomyopathiepatienten eine deutliche Deregulation zeigte, lag der Fokus der weiteren Untersuchungen auf diesem Mitglied der CCN- Familie.

4.1.2.5 Korrelationsanalysen der CTGF- Expression bei humaner Kardiomyopathie

Um mögliche Zusammenhänge zwischen der Expression von CTGF und den übrigen gemessenen Genen sowie klinischen Parametern wie EF (Ejektionsfraktion) und LVEDD (Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser) und Immuneinfiltraten darzustellen, wurden Korrelationsanalysen nach Spearman durchgeführt. Die Korrelationsanalyse trifft eine Aussage darüber, wie stark ein Zusammenhang ist und ob dieser positiv oder negativ ausfällt. Der Koeffizient trifft keine Aussage über die Art des Zusammenhangs, also ob CTGF die übrigen Werte beeinflusst oder umgekehrt oder ob eine dritte Variable eine Rolle spielt. Für die weitere Auswertung wurden die Werte des Spearman- Koeffizienten in Kategorien unterteilt (Tabelle 3.2) (Zou *et al.*, 2003). Abgebildet wurden hier nur die Zusammenhänge, welche signifikant sind. Da zwischen verschiedenen Immuneinfiltraten und CTGF keine signifikante Korrelation nachweisbar war, werden diese nicht abgebildet. Die Werte können der Tabelle im Anhang entnommen werden (Tabelle 10.1).

4.1.2.5.1 Expressionskorrelation von CTGF und den übrigen CCN- Mitgliedern

Zunächst wurde der Zusammenhang zwischen dem Expressionslevel von CTGF und den übrigen CCN- Genen analysiert. Dabei zeigte sich mit Ausnahme von WISP3 eine hoch signifikante moderate bis starke positive Korrelation zwischen den übrigen CCN- Mitgliedern und CTGF (Abbildung 4.6). Nov und WISP1 sind dabei besonders hervorzuheben, denn hier war die Korrelation mit Werten von $r=0.8604$ (Nov) und $r=0.7897$ (WISP1) besonders stark ausgeprägt (Abbildung 4.6 B und C).

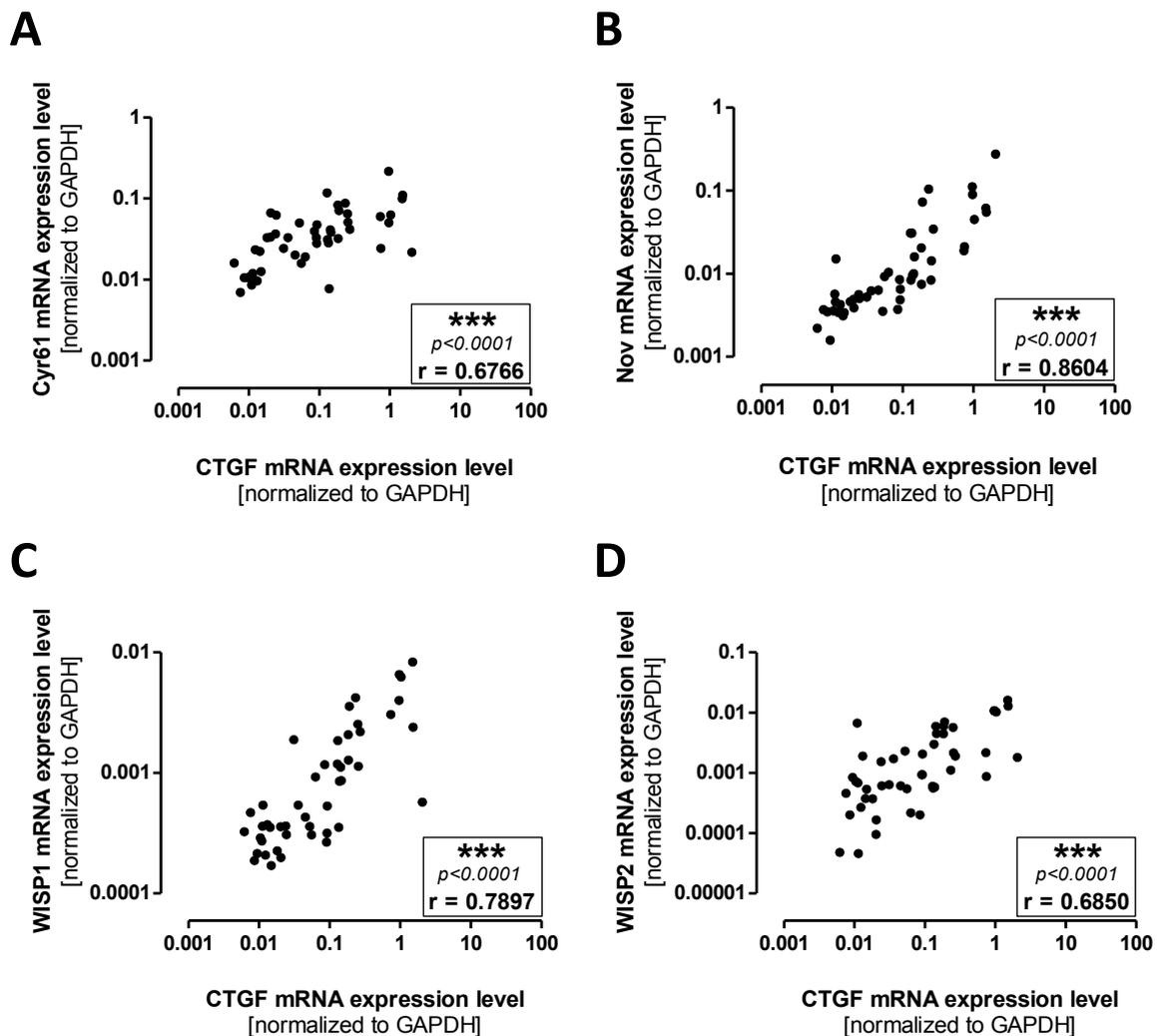


Abbildung 4.6: Korrelationsanalyse der Genexpression von CCN- Mitgliedern zu CTGF. Die Entnahme der Endomyokardbiopsie erfolgte bei Kardiomyopathiepatienten und herzgesunden Kontrollprobanden im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung aus der rechten Seite des ventrikulären Septums. Die Expressionsanalyse der Gene CTGF, Cyr61, Nov, WISP1 und WISP2 wurde mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman®) durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) mit der Formel $2^{-\Delta Ct}$. Die Korrelationsanalyse erfolgte nach Spearman mit Darstellung des Spearman- Koeffizienten r . *** $p \leq 0.001$.

4.1.2.5.2 Expressionskorrelation von CTGF und ECM- Komponenten

Die Extrazelluläre Matrix (ECM) spielt bei Kardiomyopathien eine essentielle Rolle, da hier die fibrotischen Umbauprozesse stattfinden. Daher wurde die mRNA- Expression von Col1 α 1, Col3 α 1 und Osteopontin (Spp1) in den Endomyokardbiopsien gemessen. Die Korrelationsanalyse ergab sowohl für Col1 α 1 als auch Col3 α 1 eine hochsignifikante ($p < 0.0001$) starke Korrelation zur mRNA- Expression von CTGF mit Spearman- Korrelationskoeffizienten von $r = 0.7090$ (Col1 α 1) und $r = 0.7988$ (Col3 α 1) (Abbildung 4.7 A und B). Der Zusammenhang zwischen der mRNA- Expression vom matrizellulären Protein Osteopontin und CTGF fiel mit $r = 0.4448$ signifikant ($p = 0.0020$) schwach aus (Abbildung 4.7 C).

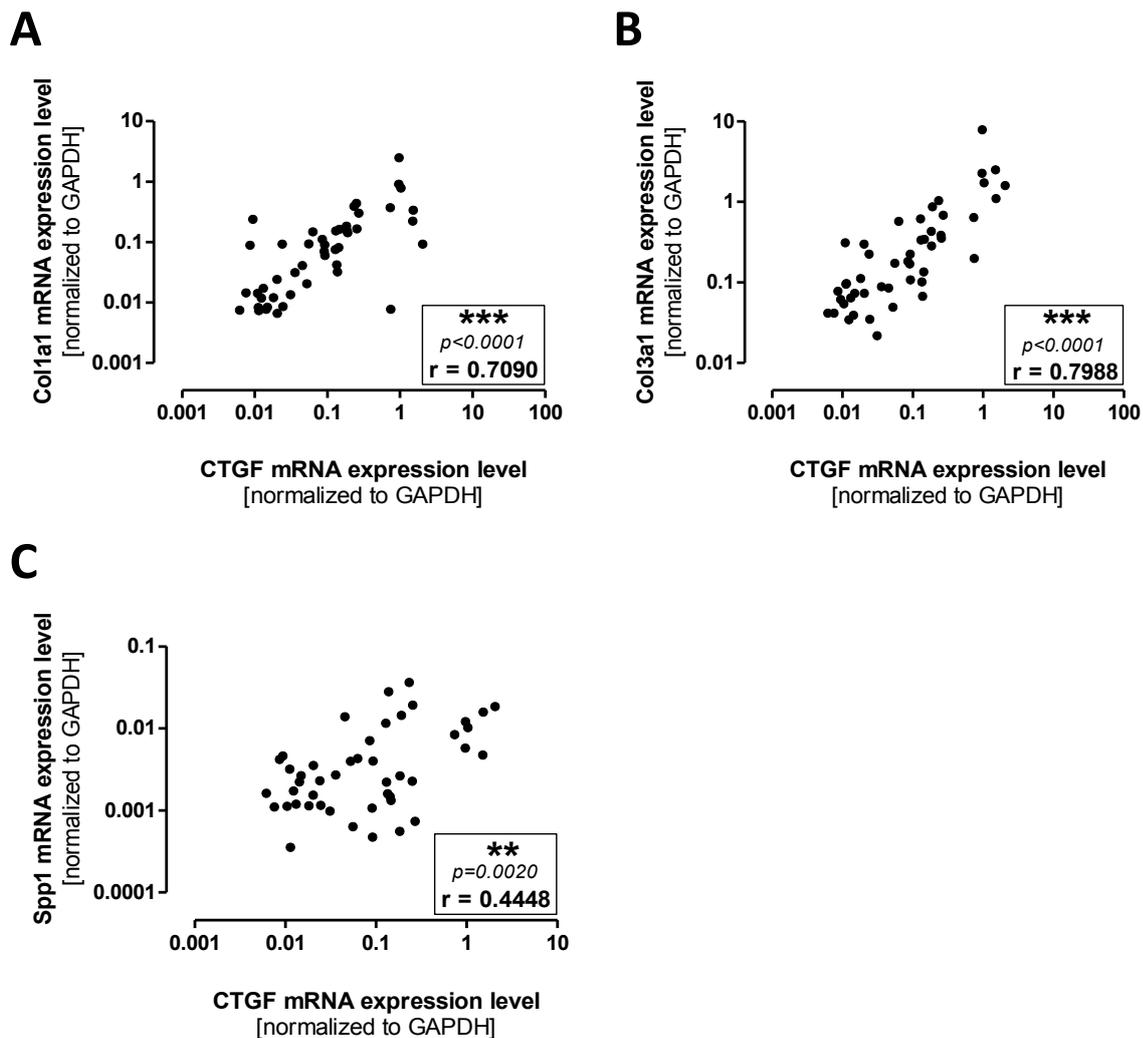


Abbildung 4.7: Korrelationsanalyse der Genexpression von ECM- Komponenten zu CTGF. Die Entnahme der Endomyokardbiopsie erfolgte bei Kardiomyopathiepatienten und herzgesunden Kontrollprobanden im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung aus der rechten Seite des ventrikulären Septums. Die Expressionsanalyse der Gene CTGF, Col1 α 1, Col3 α 1 und Spp1 wurde mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman[®]) durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) mit der Formel $2^{-\Delta Ct}$. Die Korrelationsanalyse erfolgte nach Spearman mit Darstellung des Spearman- Koeffizienten r. ***p \leq 0.001; **p \leq 0.01.

4.1.2.5.3 Expressionskorrelation von CTGF und Genen der ECM- Homöostase

Nach der Erfassung der mRNA- Expression von MMP1, MMP2, MMP9 und TIMP4 in Endomyokardbiopsien wurde diese mit der Expression von CTGF in Korrelation gesetzt. Im Fall von MMP1 zeigte sich eine nur schwache Korrelation mit $r=0.2995$, deren Signifikanz ($p=0.0571$) als grenzwertig einzustufen war (Tabelle 10.). In Bezug auf CTGF zeigte sich für MMP2 ($r=0.5214$) und MMP9 ($r=0.5962$) bei der mRNA- Expression ein moderater Zusammenhang mit hoher Signifikanz ($p=0.0002$ bzw. $p<0.0001$) (Abbildung 4.8 A und B). Für TIMP4 konnte ein starker, hochsignifikanter Zusammenhang ($r=0.7254$; $p<0.0001$) ermittelt werden (Abbildung 4.8 C).

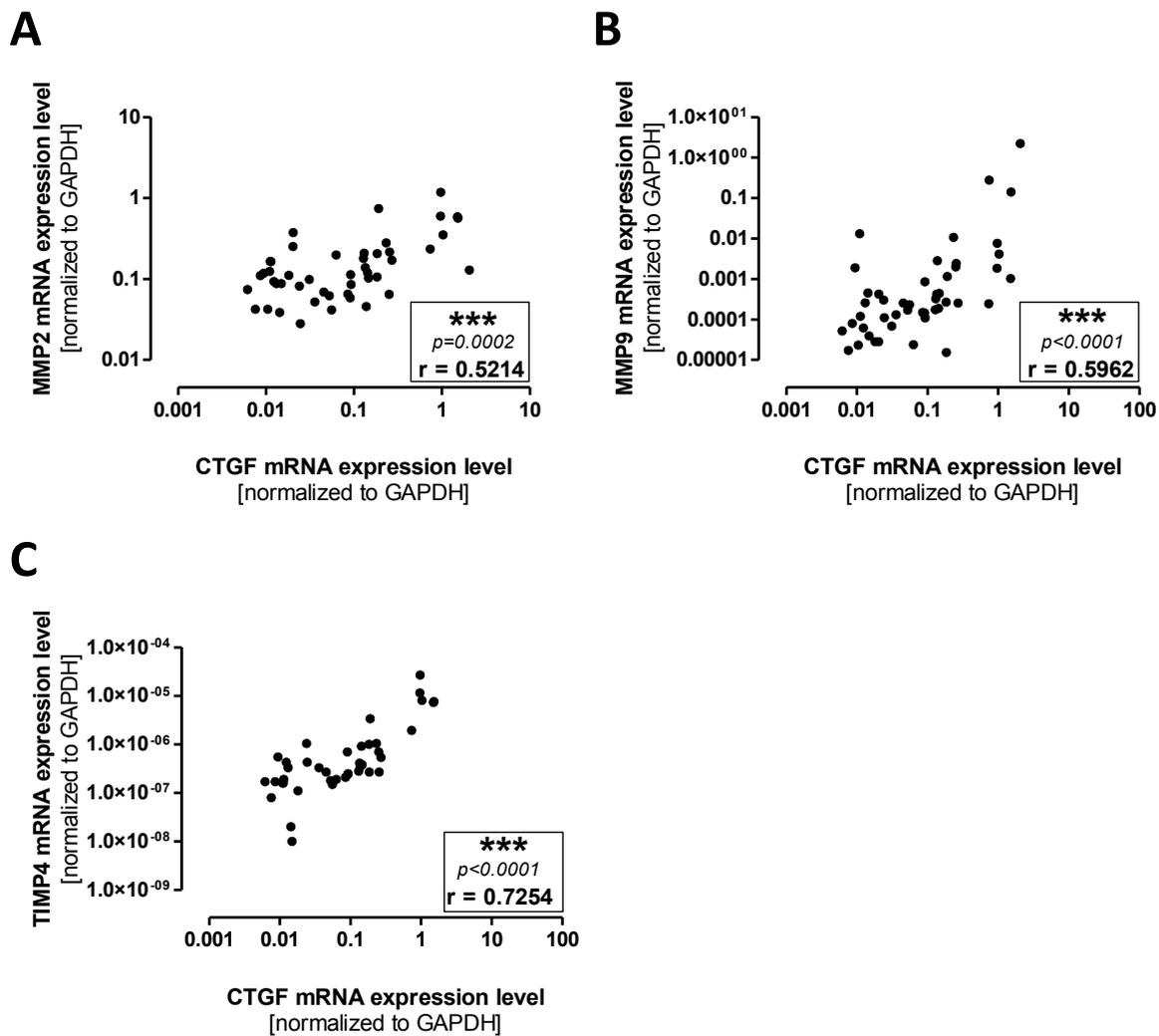


Abbildung 4.8: Korrelationsanalyse der Expression von Genen der ECM- Homöostase zu CTGF. Die Entnahme der Endomyokardbiopsie erfolgte bei Kardiomyopathiepatienten und herzgesunden Kontrollprobanden im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung aus der rechten Seite des ventrikulären Septums. Die Expressionsanalyse der Gene CTGF, MMP2, MMP9 und TIMP4 wurde mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman®) durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) mit der Formel $2^{-\Delta Ct}$. Die Korrelationsanalyse erfolgte nach Spearman mit Darstellung des Spearman- Koeffizienten r . *** $p \leq 0.001$.

4.1.2.5.4 Expressionskorrelation von CTGF und Cx43

Auch wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen CTGF und dem Membranprotein Connexin 43 analysiert, da dieses Protein wichtige Funktionen bei der homo- und heterogenen Zell- Zell-Interaktion von Kardiofibroblasten und Kardiomyozyten hat. Der Spearman- Koeffizient betrug $r=0.6645$ und war mit $p<0.0001$ hoch signifikant. Die Korrelation war somit negativ, d.h. je weniger CTGF- mRNA detektiert wurde, desto höher war der Wert für Cx43 (Abbildung 4.9).

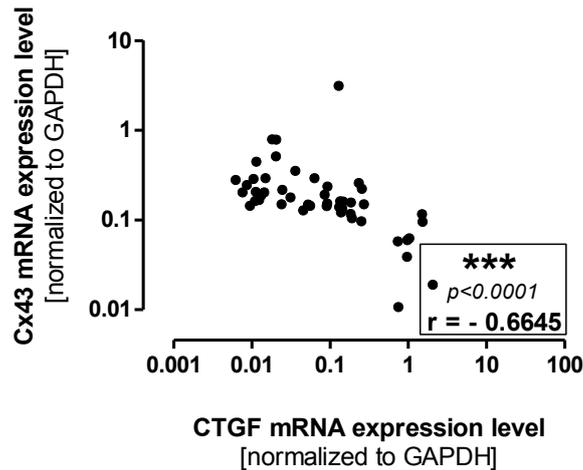


Abbildung 4.9: Korrelationsanalyse der Genexpression von Cx43 zu CTGF. Die Entnahme der Endomyokardbiopsie erfolgte bei Kardiomyopathiepatienten und herzgesunden Kontrollprobanden im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung aus der rechten Seite des ventrikulären Septums. Die Expressionsanalyse der Gene CTGF und Cx43 wurde mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman®) durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) mit der Formel $2^{-\Delta Ct}$. Die Korrelationsanalyse erfolgte nach Spearman mit Darstellung des Spearman-Koeffizienten r . *** $p \leq 0.001$.

4.1.2.5.5 Expressionskorrelation von CTGF und Chemokinen sowie Chemokinrezeptoren

Zunächst wurde die Expression verschiedener Chemokine und Chemokinrezeptoren im Myokard auf mRNA- Ebene gemessen und deren Korrelation mit CTGF analysiert. Für Ccl2 und Ccl8 ergab sich ein nicht signifikanter, schwach positiver Zusammenhang mit der CTGF- Expression (Ccl2: $r=0.2524$, $p=0.0869$; Ccl8: $r=0.2508$, $p=0.0856$) (Tabelle 10.1). Die Chemokine Ccl7 und Ccl20 wiesen eine signifikante schwache Korrelation zu CTGF auf (Ccl7: $r=0.4315$, $p=0.0246$; Ccl20: $r=0.4301$, $p=0.0045$) (Abbildung 4.10 A und B). Bei den Chemokinrezeptoren konnte sowohl für CCR5 mit $r=0.5373$ ($p<0.0001$), als auch für CCR6 mit $r= 0.6719$ ($p=0.0001$) eine hochsignifikante moderate Korrelation gezeigt werden (Abbildung 4.10 C und D).

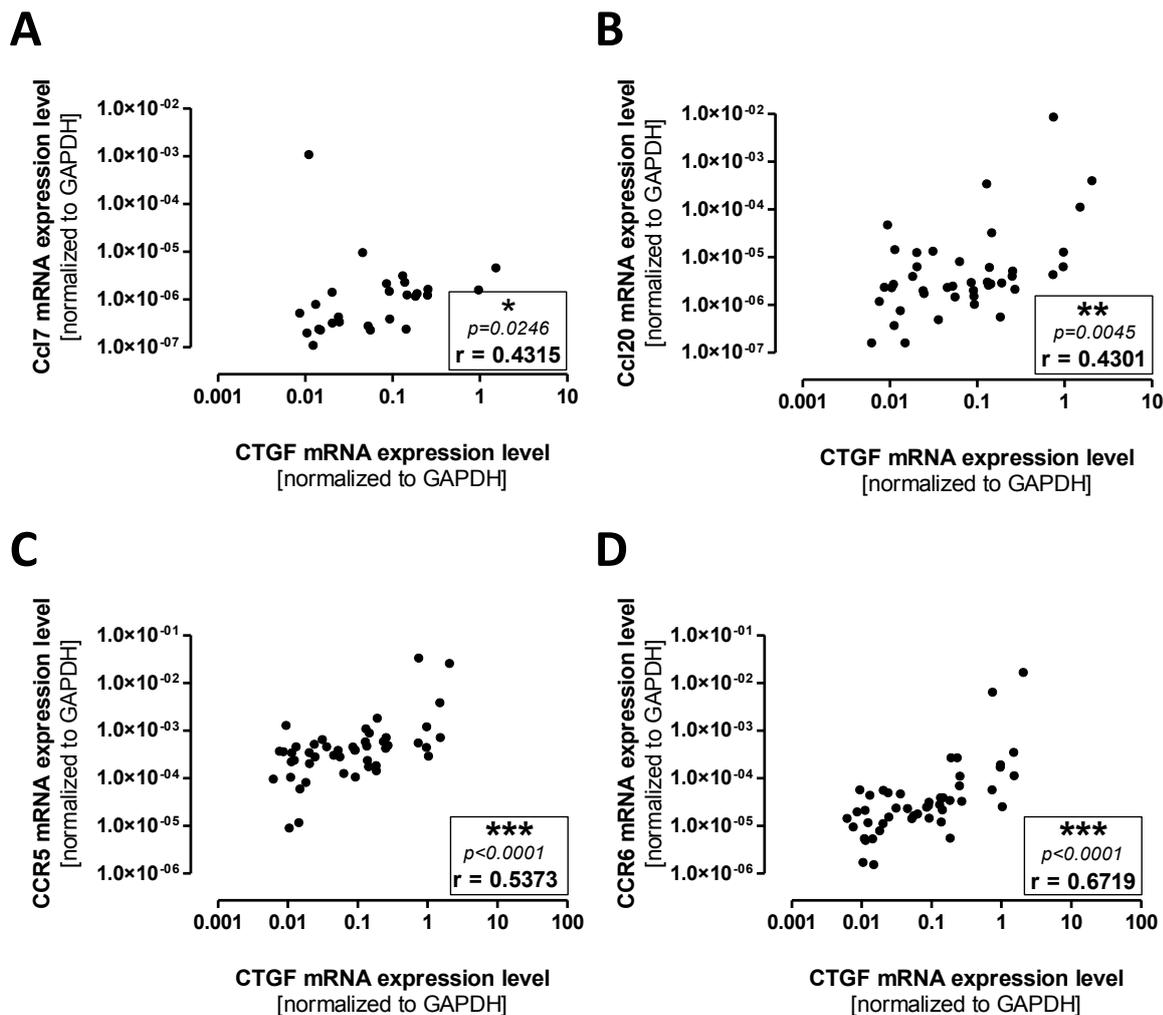


Abbildung 4.10: Korrelationsanalyse der Genexpression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren zu CTGF.

Die Entnahme der Endomyokardbiopsie erfolgte bei Kardiomyopathiepatienten und herzgesunden Kontrollprobanden im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung aus der rechten Seite des ventrikulären Septums. Die Expressionsanalyse der Gene CTGF, Ccl7, Ccl20, CCR5 und CCR6 wurde mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman®) durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) mit der Formel $2^{-\Delta Ct}$. Die Korrelationsanalyse erfolgte nach Spearman mit Darstellung des Spearman- Koeffizienten r . *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$.

4.1.2.5.6 Expressionskorrelation von CTGF und Komponenten des JAK- STAT- Signalweges

Da der JAK- STAT- Signalweg Informationen von extrazellulären chemischen Signalen zum Nukleus überträgt und so die Transkription von Genen vermittelt, welche an der Immunantwort, Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Onkogenese beteiligt sind, wurde auch hier eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Dabei zeigte sich bei allen untersuchten Komponenten eine hoch signifikante ($p < 0.0001$) positive moderate bis starke Korrelation (Abbildung 4.11 A-F). Im Einzelnen wurde für JAK1 ein Spearman- Koeffizient von $r=0.6575$, für STAT1 von $r=0.6926$, für STAT2 von $r=0.7297$, für STAT3 von $r=0.6458$, für STAT4 von $r=0.6473$ und für STAT5 von $r=0.6059$ ermittelt.

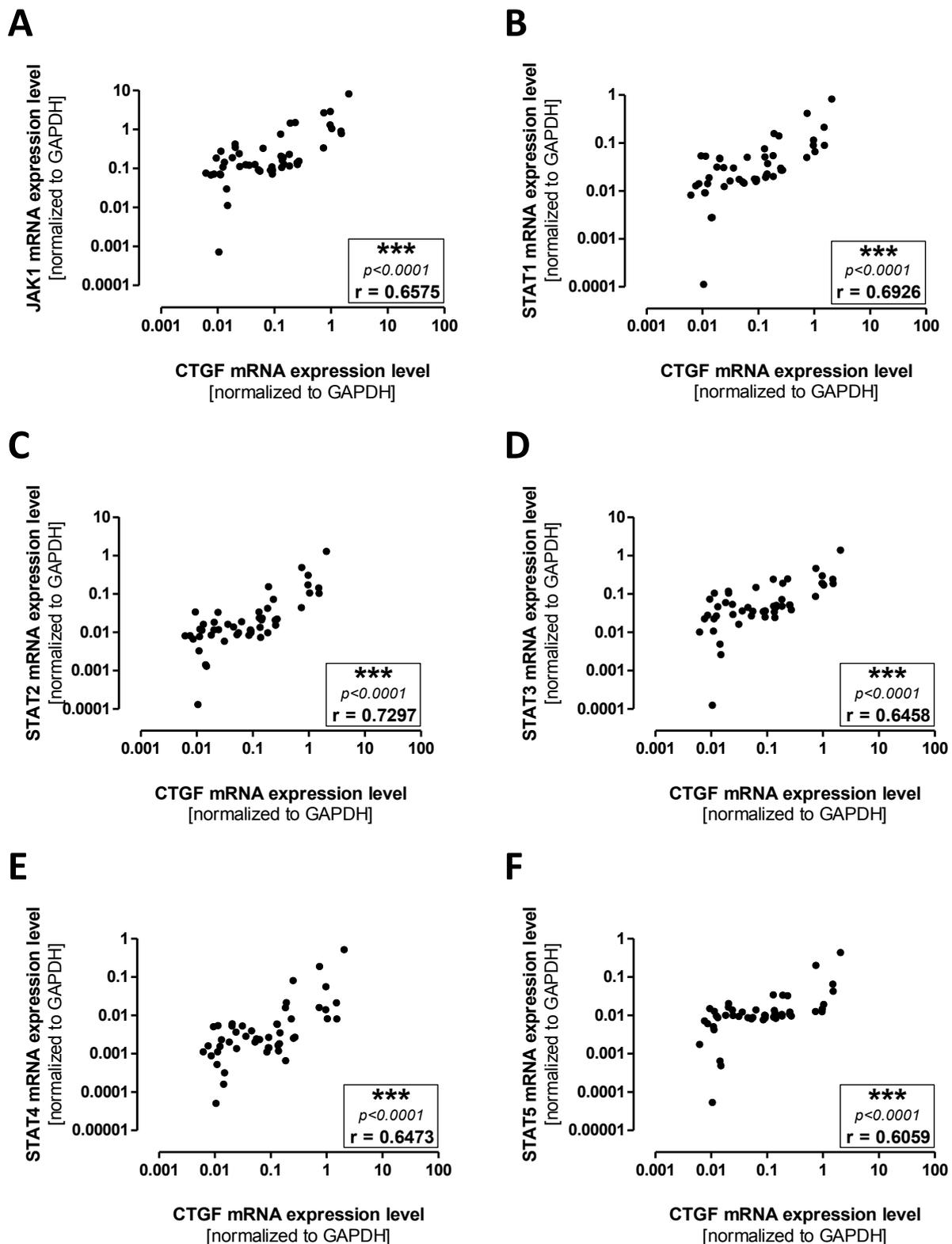


Abbildung 4.11: Korrelationsanalyse der Genexpression von Komponenten des JAK- STAT- Signalweges zu CTGF. Die Entnahme der Endomyokardbiopsie erfolgte bei Kardiomyopathiepatienten und herzgesunden Kontrollprobanden im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung aus der rechten Seite des ventrikulären Septums. Die Expressionsanalyse der Gene des JAK- STAT- Signalweges und CTGF wurde mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman®) durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) mit der Formel $2^{-\Delta Ct}$. Die Korrelationsanalyse erfolgte nach Spearman mit Darstellung des Spearman- Koeffizienten r . *** $p \leq 0.001$.

4.1.2.5.7 Expressionskorrelation von CTGF und Zytokinen

Die Analyse der Korrelation von Zytokinen und CTGF auf mRNA- Ebene zeigte bei allen Zytokinen eine hohe Signifikanz des Korrelationskoeffizienten ($p < 0.0001$). Im Einzelnen ergab sich für IL4 ($r=0.06019$), IL6 ($r=0.6442$), IL10 ($r=0.5879$) und TNF α ($r=0.6447$) eine moderate Korrelation mit CTGF. Nur zwischen der mRNA- Expression von TGF β 1 und CTGF war nach Spearman eine starke Korrelation nachweisbar ($r=0.7844$) (Abbildung 4.12 A-E).

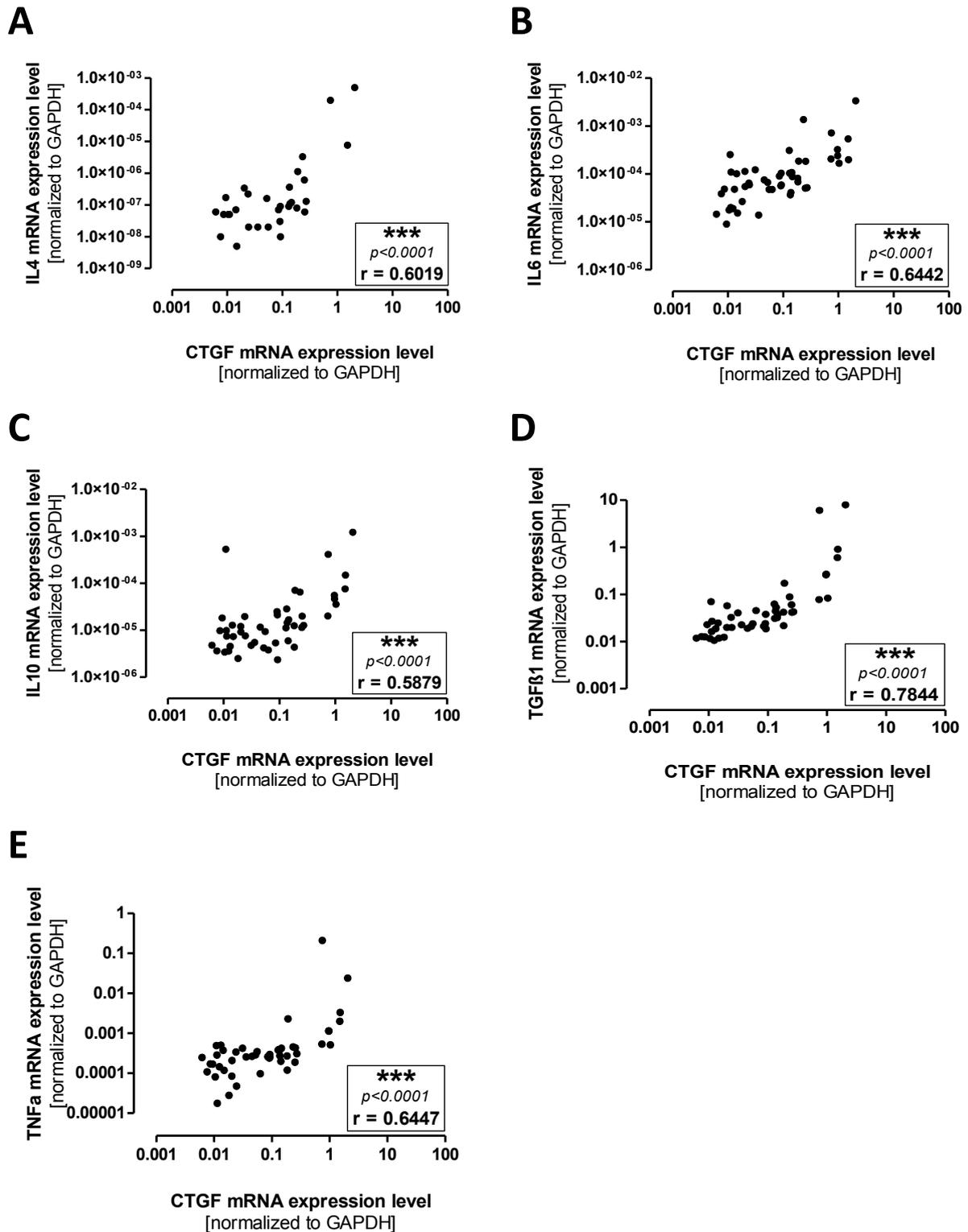


Abbildung 4.12: Korrelationsanalyse der Genexpression von Zytokinen zu CTGF. Die Entnahme der Endomyokardiobiopsie erfolgte bei Kardiomyopathiepatienten und herzgesunden Kontrollprobanden im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung aus der rechten Seite des ventrikulären Septums. Die Expressionsanalyse der Gene IL4, IL6, IL10, TNFα, TGFβ1 und CTGF wurde mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman®) durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) mit der Formel $2^{-\Delta Ct}$. Die Korrelationsanalyse erfolgte nach Spearman mit Darstellung des Spearman- Koeffizienten r . *** $p \leq 0.001$.

4.1.2.5.8 Expressionskorrelation von CTGF und Caspase 3

Abschließend sollte die Expressionskorrelation zwischen CTGF und Caspase 3 analysiert werden. Caspasen erfüllen wichtige Funktionen innerhalb apoptotischer und inflammatorischer Signalwege (Lamkanfi *et al.*, 2002). Die Analyse der Expressionskorrelation zwischen CTGF und Caspase 3 zeigte einen signifikante mäßigen positiven Zusammenhang ($r=0.4052$; $p=0.0043$) (Abbildung 4.13).

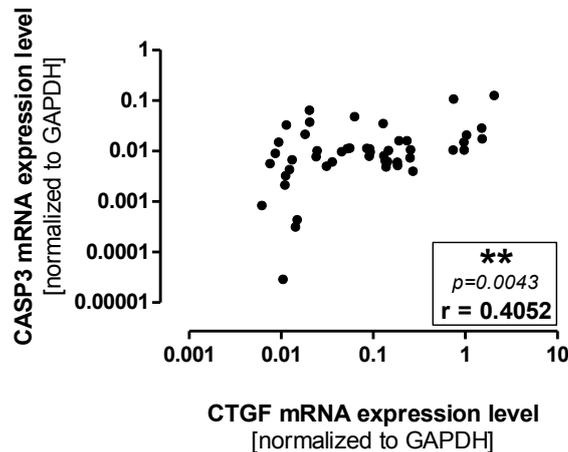


Abbildung 4.13: Korrelationsanalyse der Genexpression von CASP3 zu CTGF. Die Entnahme der Endomyokardbiopsie erfolgte bei Kardiomyopathiepatienten und gesunden Kontrollprobanden im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung aus der rechten Seite des ventrikulären Septums. Die Expressionsanalyse der Gene CASP3 und CTGF wurde mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman®) durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) mit der Formel $2^{-\Delta Ct}$. Die Korrelationsanalyse erfolgte nach Spearman mit Darstellung des Spearman-Koeffizienten r . *** $p \leq 0.001$.

4.1.2.5.9 Korrelationsanalyse der CTGF- Expression mit EF und LVEDD

Die Korrelationsanalyse der CTGF- Expression zur Ejektionsfraktion (EF) ergab einen hochsignifikanten moderaten negativen Zusammenhang ($r= -0.5134$, $p<0.0001$) und zur LVEDD eine signifikanten schwach positive Korrelation ($r=0.3183$, $p=0.0453$) (Abbildung 4.14).

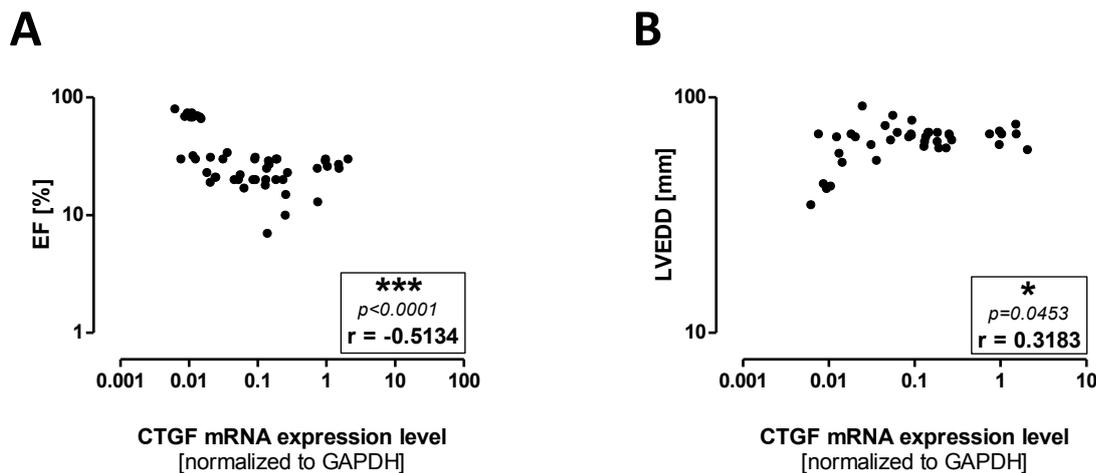


Abbildung 4.14: Korrelationsanalyse der Genexpression von CTGF zu EF und LVEDD. Die Entnahme der Endomyokardbiopsie erfolgte bei Kardiomyopathiepatienten und herzgesunden Kontrollprobanden im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung aus der rechten Seite des ventrikulären Septums. Die Expressionsanalyse von CTGF wurde mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman®) durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) mit der Formel $2^{-\Delta Ct}$. Die Korrelationsanalyse zu EF bzw. LVEDD erfolgte nach Spearman mit Darstellung des Spearman- Koeffizienten r . *** $p \leq 0.001$, * $p \leq 0.05$.

4.2 Identifikation und Charakterisierung des CTGF- exprimierenden Zelltyps im Myokard

In Abhängigkeit von der Spezies setzt sich das Myokard aus Myozyten und aus bis zu 70% anderer Zelltypen zusammen. Davon nehmen Fibroblasten einen großen Anteil ein (Banerjee *et al.*, 2007; Baudino *et al.*, 2006; Camelliti *et al.*, 2005; Nag, 1980; Zak, 1974). Um zu klären, von welchem Zelltyp CTGF hauptsächlich exprimiert wird, wurde die mRNA- Expression von Kardiofibroblasten und Kardiomyozyten des embryonalen und adulten Myokards analysiert. Sowohl bei den embryonalen als auch den adulten Zellen war die Expression der CTGF- mRNA in Kardiomyozyten im Vergleich zu den Kardiofibroblasten deutlich niedriger. Die embryonalen Kardiomyozyten wiesen eine um 73.5%, die adulten Kardiomyozyten eine um 68.0% geringere Expression auf (Abbildung 4.15). Des Weiteren war festzustellen, dass CTGF unabhängig vom Zelltyp im embryonalen Stadium deutlich höher exprimiert wird als im adulten Myokardgewebe.

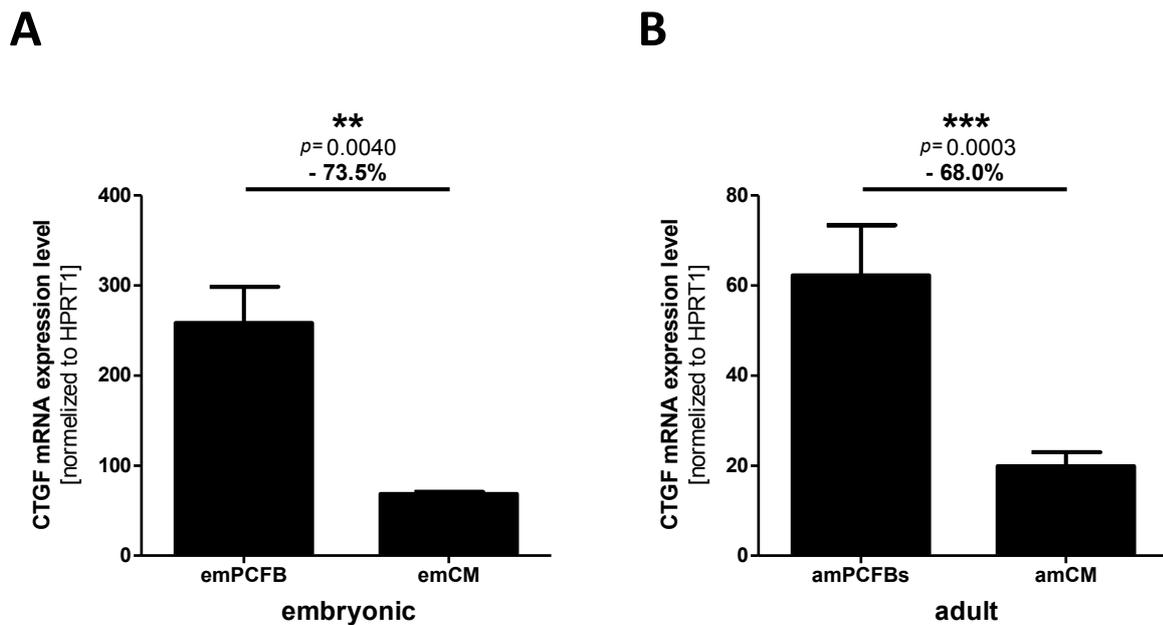


Abbildung 4.15: CTGF- Expressionsanalyse in Fibroblasten und Myozyten des embryonalen und adulten Myokardgewebes. Nach Isolation der Fibroblasten und Myozyten durch enzymatischen Verdau von embryonalem und adulten murinen Myokardgewebe wurde die Expressionsanalyse von CTGF mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman®) durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen HPRT1 (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1) mit der Formel $2^{-\Delta Ct}$. *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$.

4.3 Etablierung nichthumaner fibroblastischer Zellsysteme

Für die weiteren Untersuchungen sollte ein geeignetes fibroblastisches Zellsystem gefunden werden. Dieses hatte verschiedene Anforderungen zu erfüllen. Dazu gehörte die Nähe zum *in vivo*- Modell für eine einfache Translation ins Tiermodell oder die Klinik, ein effektives und reproduzierbares Protokoll zur Isolation der Zellen, ein effektiver Transgentransfer, die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und natürlich auch die möglichst einfache Kultivierung der Zellen. Dafür war auch die Stabilität der zellulären Eigenschaften über mehrere Passagen wichtig. Des Weiteren wurde angestrebt, die Primärzellen auch nach Kryokonservierung wieder in Kultur nehmen zu können.

4.3.1 NIH- 3T3- Zellen

Bei NIH- 3T3- Zellen handelt es sich um eine kommerzielle immortalisierte fibroblastische Zelllinie, welche aus gesamtem embryonalem Gewebe von Swiss- Albino- Mäusen generiert wurde (Todaro and Green, 1963). Aufgrund des Zellliniencharakters und der sehr guten Kultivierbarkeit wurden diese Zellen in den Auswahlprozess einbezogen. Dafür wurde sowohl der plasmid- als auch der vektorbasierte Transgentransfer anhand der CMV- Promoter- vermittelten Expression von GFP untersucht. Als Transfektionsreagenz kam das Polymer PEI zum Einsatz. Nach 48h betrug die Transfektionsrate etwa 30% (Abbildung 4.16).

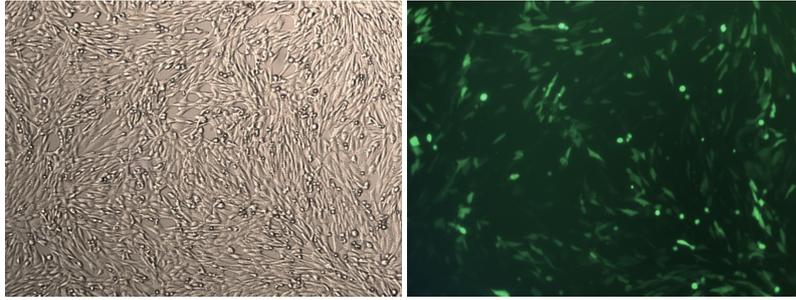


Abbildung 4.16: Evaluierung der Transfizierbarkeit von NIH- 3T3- Zellen. NIH- 3T3- Zellen wurden mit einer Zelldichte von 300000 Zellen/ well in eine 6- well- Zellkulturplatte eingesät. Nachdem die Zellen adhärent waren, erfolgte die Transfektion von pSIPO-GFP-R2. Das Verhältnis PEI:DNA betrug 3:2. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch nach 48 Stunden. Die Transfektionsrate lag bei etwa 30%.

Unter Verwendung von 25MOI des GFP- exprimierenden adenoviralen Vektors Ad5-CMV-GFP war der Transgentransfer mit etwa 10% deutlich weniger effizient (Abbildung 4.17).

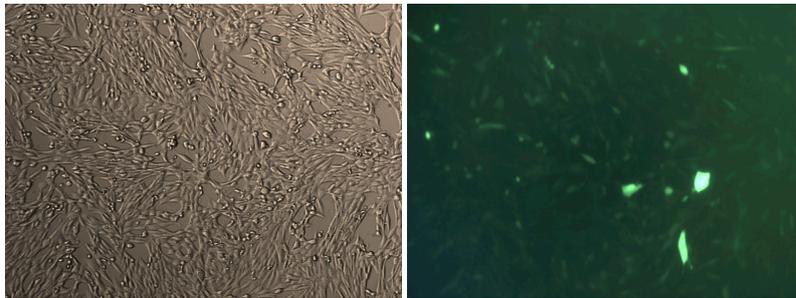


Abbildung 4.17: Evaluierung der Transduzierbarkeit von NIH- 3T3- Zellen. NIH- 3T3- Zellen wurden mit einer Zelldichte von 300000 Zellen/ well in eine 6- well- Zellkulturplatte eingesät. Nachdem die Zellen adhärent waren, erfolgte die Transduktion mit 25MOI Ad5-CMV-GFP. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch nach 48 Stunden. Die Transduktionsrate lag bei etwa 10%.

Zusammenfassend war diese Zelllinie sehr gut kultivierbar, der plasmid- oder vektorvermittelte Gentransfer mit etwa 30% bzw. 10% ist eher ineffizient. Da es sich dabei nicht um eine reine Kardiofibroblastenkultur handelte, erfolgten keine weiteren Untersuchungen zur Charakterisierung.

4.3.2 Primärzellkulturen kardialer Fibroblasten

Unter dem Aspekt, ein Zellsystem zu etablieren, welches möglichst nah am *in vivo*- Modell ist, wurden verschiedene Primärzellansätze hinsichtlich ihrer Kultivierbarkeit und Gentransferrate evaluiert.

4.3.2.1 Embryonale murine Kardiofibroblasten

Embryonale Kardiofibroblasten fallen als Nebenprodukt bei der Präparation embryonaler Kardiomyozyten an. Es zeigte sich, dass sowohl die längere Kultivierung als auch das Passagieren dieser Zellen nicht möglich war. Aufgrund mangelnder Proliferation konnte für Transfektions- und Transduktionsversuche keine ausreichende Zellzahl erreicht werden. Demnach wurde von weiteren Untersuchungen mit diesen Zellen abgesehen.

4.3.2.2 Neonatale Kardiofibroblasten von *Rattus norvegicus*

Bei neonatalen Kardiofibroblasten (RNCF- *rattus norvegicus cardiac fibroblast*) handelt es sich um Primärzellen, welche aus linksventrikulärem Herzgewebe ein bis drei Tage alter Wistar- Ratten durch enzymatischen Verdau des Gewebes isoliert werden (Vetter *et al.*, 1998). Nach Isolation zeigten die Kulturen ein gutes Wachstum, konnten aber ebenso wie rekultivierte Kryokonservate nur einmalig passagiert werden.

Für den plasmidbasierten Gentransfer wurden, neben PEI auch als kommerziell erhältliche Transfektionsreagenzien FuGene HD (Promega®) und X-tremeGene 9 (Roche®) getestet. Im Gegensatz zum Polymer PEI waren sowohl FuGene HD als auch X-tremeGene 9 zytotoxisch. Dies wird beim Vergleich der unbehandelten RNCF mit den transfizierten Zellen deutlich. Des Weiteren zeigte sich für alle untersuchten Transfektionsansätze eine sehr geringe Transfektionsrate von maximal 4 % (Abbildung 4.18).

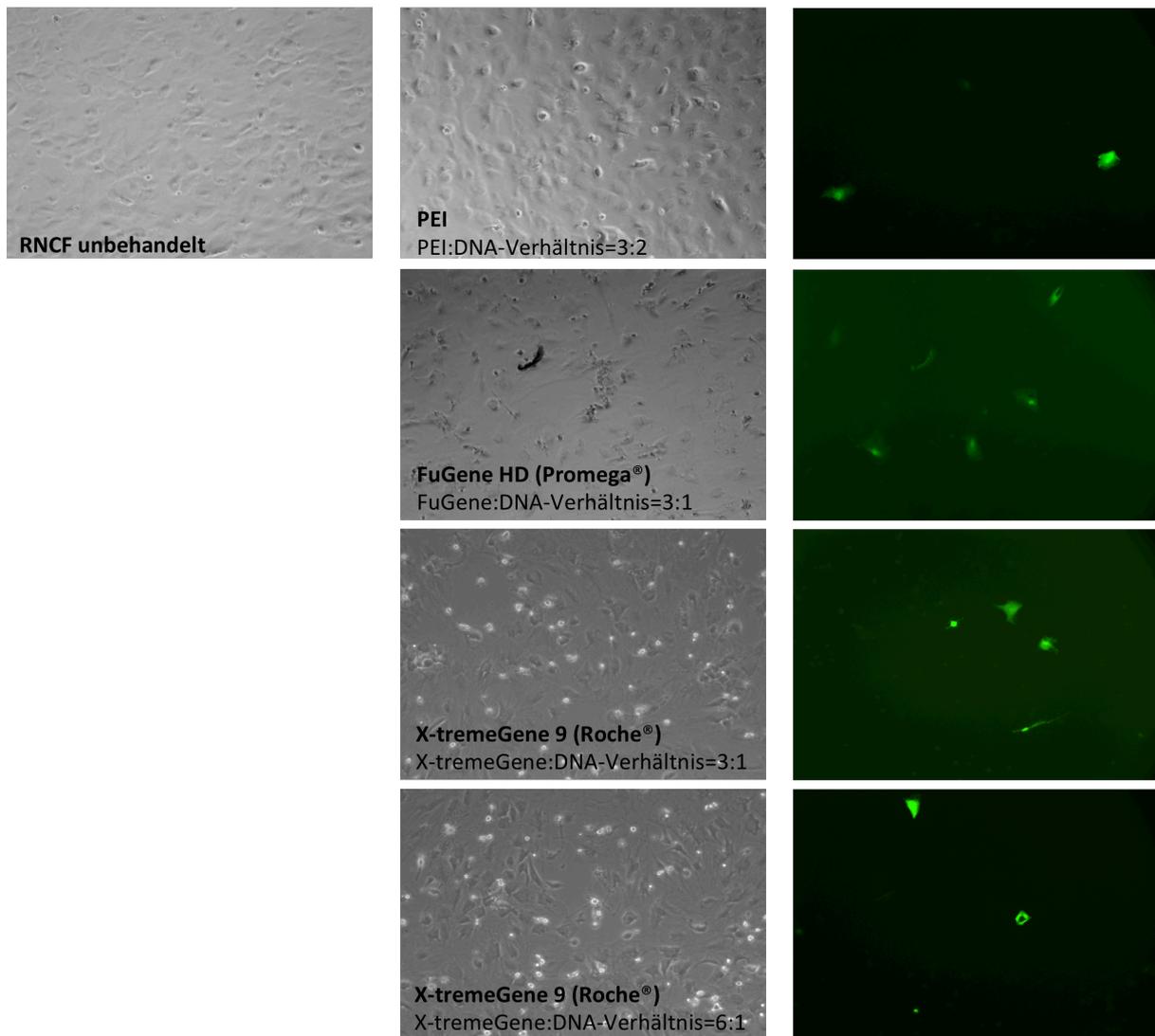


Abbildung 4.18: Evaluierung der Transfizierbarkeit von neonatalen Kardiofibroblasten der Ratte. Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 300000 Zellen/ well in eine 6- well- Zellkulturplatte eingesät. Nachdem die Zellen adhärent waren, erfolgte die Transfektion von pSIPO-GFP-R2. Das Verhältnis PEI:DNA betrug 3:2, FuGene HD: DNA betrug 3:1, X- tremeGene 9:DNA betrug 3:1 und 6:1. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch nach 72 Stunden. Die Transfektionsrate lag bei maximal 4 %.

Der Gentransfer mit adenoviralen Vektoren zeigte nach 72 h bei der lichtmikroskopischen Analyse bei 5 MOI eine Transduktionsrate von etwa 10 %. Mit 25 MOI zeigten 38 % der Zellen eine Transgenexpression, welche bei 50 MOI auf etwa 48 % gesteigert werden konnte (Abbildung 4.19). Die Expression von GFP schien mit steigender MOI leicht zytotoxisch zu sein.

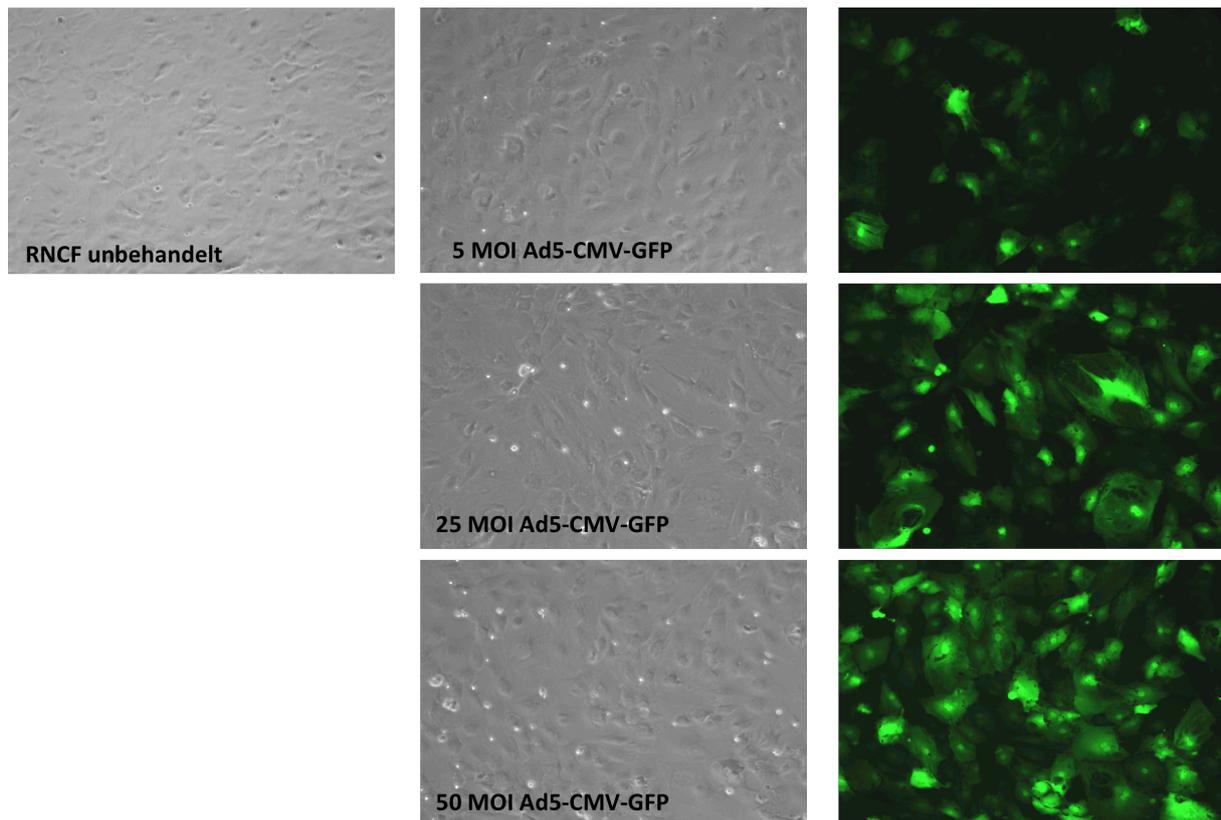


Abbildung 4.19: Evaluierung der Transduzierbarkeit von neonatalen Kardiofibroblasten der Ratte. Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 300000 Zellen/ well in eine 6- well- Zellkulturplatte eingesät. Nachdem die Zellen adhären waren, erfolgte die Transduktion mit 5, 25 oder 50MOI Ad5-CMV-GFP. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch nach 72 Stunden. Die Transduktionsrate lag bei etwa 10, 38 oder 48 %.

4.3.2.3 Adulte murine Kardiofibroblasten

Da *Remodeling* und fibrotische Prozesse hauptsächlich adultes Herzgewebe betrifft, wurde ein entsprechendes Zellmodell gesucht. Dabei fiel die Wahl auf linksventrikuläre Kardiofibroblasten adulter Mäuse des Stammes C57BL/6j, welche durch Auswachsen generiert wurden. Diese Zellen waren mit ausreichender Zellzahl sehr gut kultivierbar und konnten nach Kryokonservierung unkompliziert rekultiviert und bis Passage 7 gehalten werden, ohne dass morphologische Veränderungen beobachtet wurden (Abbildung 4.20). Ab Passage 8 zeigte sich ein zunehmend spindelförmiger Phänotyp der Fibroblasten.

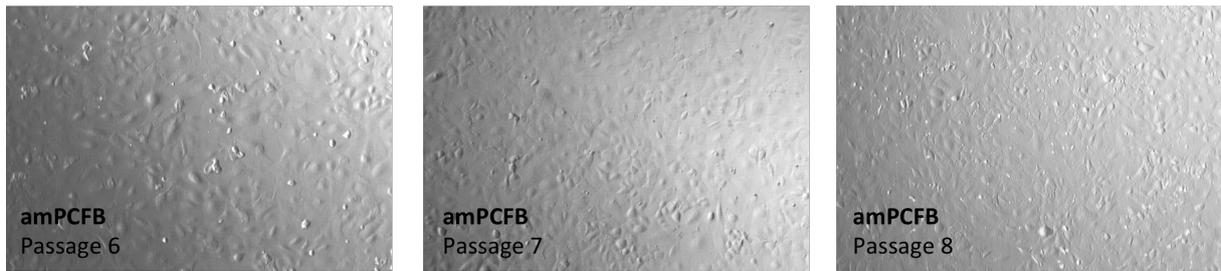


Abbildung 4.20: Adulte murine Kardiofibroblasten in Kultur. Die Primärzellen aus linksventrikulärem Myokardgewebe 12 Wochen alter Mäuse zeigten bis Passage 7 keine morphologischen Veränderungen. Ab Passage 8 wurde ein zunehmend spindelförmiger Phänotyp beobachtet.

4.3.2.3.1 Gentransfer

Bei der Evaluierung des plasmidvermittelten Gentransfers mittels PEI erfolgte die Expression des Transgens in etwa 2 % der Zellen (Abbildung 4.21). Unter Verwendung von Lipofectamine LTX & PLUS Reagent (Invitrogen) lag die Transferrate bei etwa 10 %. Morphologische Veränderungen wurden nicht beobachtet.

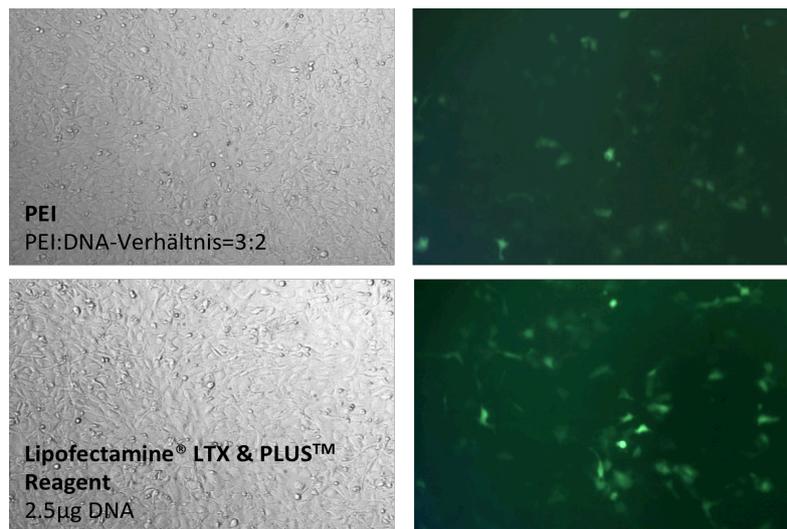


Abbildung 4.21: Transfektionsevaluierung adulter muriner Kardiofibroblasten. Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 500000 Zellen/ well in eine 6- well- Zellkulturplatte eingesät. Nachdem die Zellen adhärent waren, erfolgte die Transfektion von pSIPO-GFP-R2. Das Verhältnis PEI:DNA betrug 3:2. Mit Hilfe von Lipofectamine® LTX & PLUS™ Reagent wurden 2.5 µg Plasmid- DNA transfiziert. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch nach 72 Stunden. Die Transfektionsraten lagen bei etwa 2 % und 10 %.

Erfolgte der Transgentransfer unter Verwendung adenoviraler Vektoren, war mit 25 MOI in 40 %, mit 50 MOI in etwa 45 % und mit 100 MOI in rund 53 % der Zellen die Transgenexpression sichtbar (Abbildung 4.22). Beim Einsatz von 50 MOI und 100 MOI zeigten die Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abbildung 4.20) sowie zu, mit 25 MOI transduzierten, Zellen morphologische Veränderungen und eine vermehrte Zahl abgestorbener Zellen im Überstand.

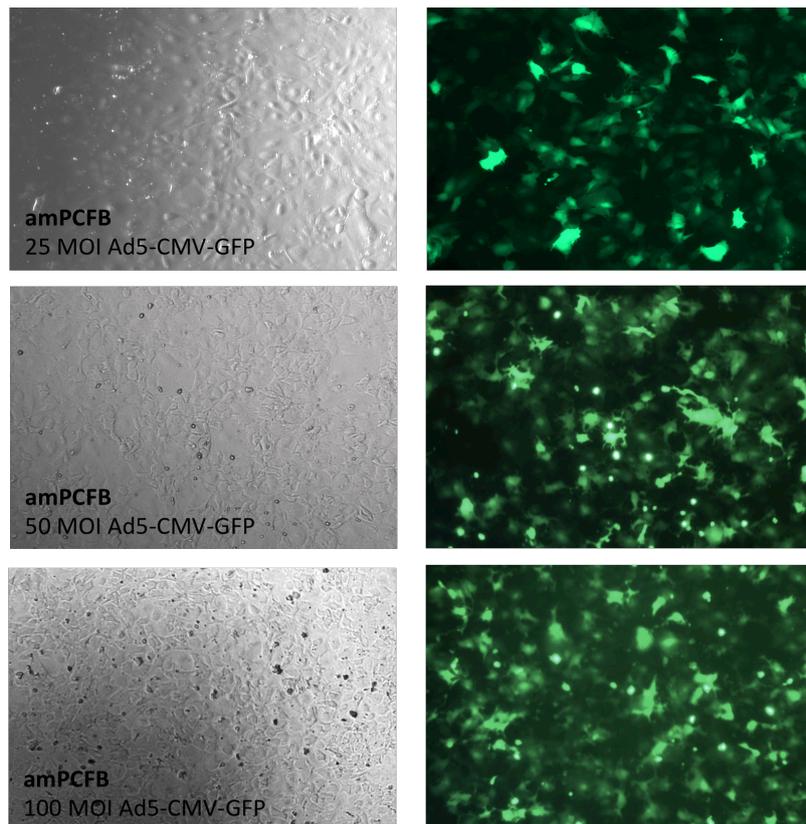


Abbildung 4.22: Evaluierung der Transduzierbarkeit von adulter muriner Kardiofibroblasten. Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 500000 Zellen/ well in eine 6- well- Zellkulturplatte eingesät. Nachdem die Zellen adhärent waren, erfolgte die Transduktion mit 25, 50 oder 100 MOI Ad5-CMV-GFP. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch nach 72 Stunden. Die Transduktionsrate lag bei etwa 40, 45 oder 53 %.

Aufgrund der guten Kultivierbarkeit und der hohen Transduktionsrate erfolgten die weiteren Untersuchungen hauptsächlich an murinen Kardiofibroblasten. Um sicher zu stellen, dass diese einen fibroblastischen Phänotyp aufweisen, wurde im Rahmen einer Kooperation für diese sowie für Kardiomyozyten eine Immunfärbung auf Kollagen 1, den endothelialen Marker CD31 und den Muskelzellmarker Desmin durchgeführt. Die murinen Kardiofibroblasten zeigten eine positive Färbung für Kollagen 1, aber nicht für CD31 oder Desmin. Bei Kardiomyozyten konnte nur Desmin gezeigt werden (Abbildung 4.23).

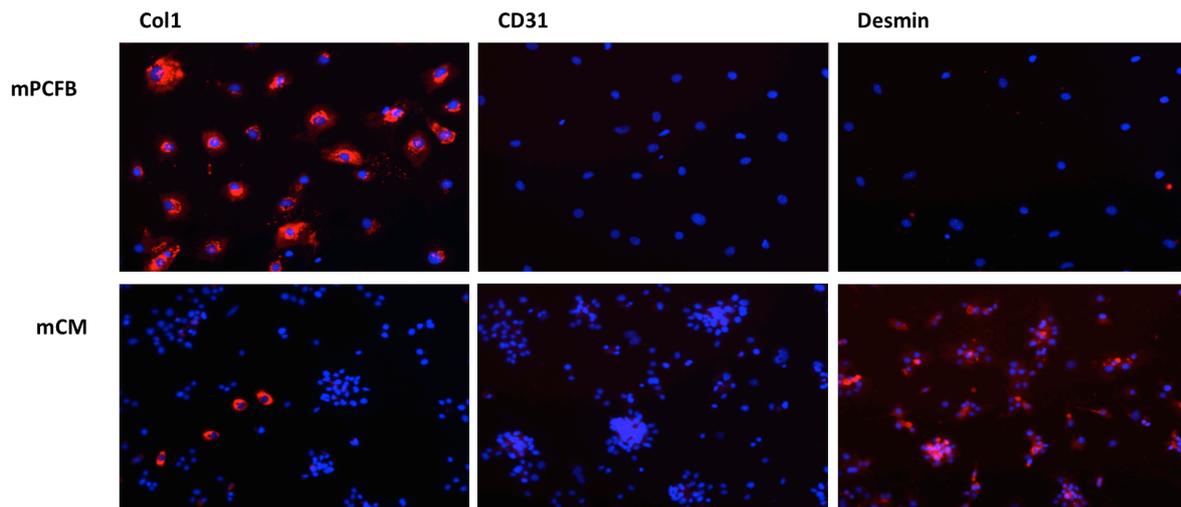


Abbildung 4.23: Immunfluoreszenzfärbung von murinen Kardiofibroblasten und Kardiomyozyten. Murine Kardiofibroblasten (mPCFB) und Kardiomyozyten (mCM) wurden mit Primärantikörpern gegen Kollagen 1 (Col1), dem endothelialen Marker CD31 oder dem Muskelzellmarker Desmin sowie fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern (rot) und DAPI (blau) inkubiert. Fibroblasten waren positiv für Col1 und negativ für Desmin und CD31. Kardiomyozyten wurden nur für Desmin positiv gefärbt.

4.4 Evaluierung der shRNAs gegen CTGF

Im Verlauf des Projektes wurden innerhalb der Arbeitsgruppe verschiedene shRNA- Sequenzen gegen murines CTGF selektiert und kloniert. Bei der Suppression von plasmidexprimiertem murinen CTGF in Zellen der Linie 293T wies shCTGF-A (shA) im Vergleich zu den übrigen 3 Konstrukten die höchste Repression der Genexpression auf (Tank *et al.*, 2014). Bei weiteren Untersuchungen auf 3T3- Zellen zeigte der adenovirale Vektor Ad5-shCTGF-B ebenfalls eine effektive Repression, so dass adulte murine Kardiofibroblasten mit verschiedenen MOI (*multiplicity of infection*) der adenoviralen Vektoren Ad5-shCTGF-A und Ad5-shCTGF-B inkubiert wurden. Dabei wurde mit 25 MOI des Vektors Ad5-shCTGF-A die CTGF- Expression am stärksten supprimiert (Abbildung 4.24).

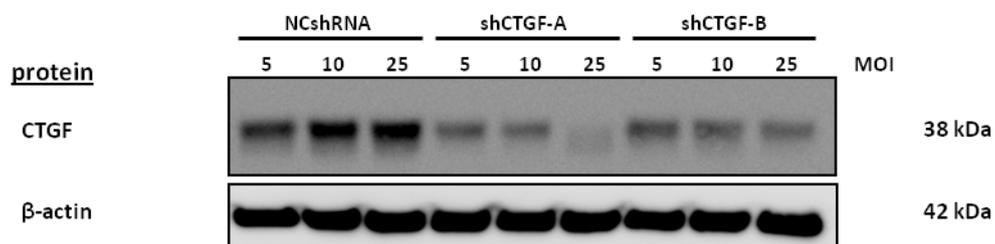


Abbildung 4.24: Analyse der endogenen CTGF- Proteinexpression nach Transduktion mit Ad5-shCTGF-A oder Ad5-shCTGF-B. Murine Kardiofibroblasten wurden mit 5, 10 oder 25 MOI der adenoviralen shRNA- Vektoren transduziert und anschließend die Proteinexpression mittels Westernblot analysiert. Als endogene Kontrolle diente β-Aktin. Als Negativkontrolle dienten Ad5-NCshRNA- transduzierte Zellen. Bei beiden shCTGF- Konstrukten wurde mit 25 MOI die stärkste Repression der CTGF- Expression erzielt.

Sowohl auf mRNA- Ebene als auch auf Proteinebene zeigten 25 MOI Ad5-shCTGF-A eine deutliche Inhibition der CTGF- Expression (Abbildung 4.25). Die Quantifizierung mittels RT- qPCR ergab ein um 79.1 % verringertes CTGF- mRNA- Level. Eine weitere Erhöhung der MOI erbrachte im Vergleich zu 25 MOI keine weitere signifikante Suppression (Abbildung 4.25 B).

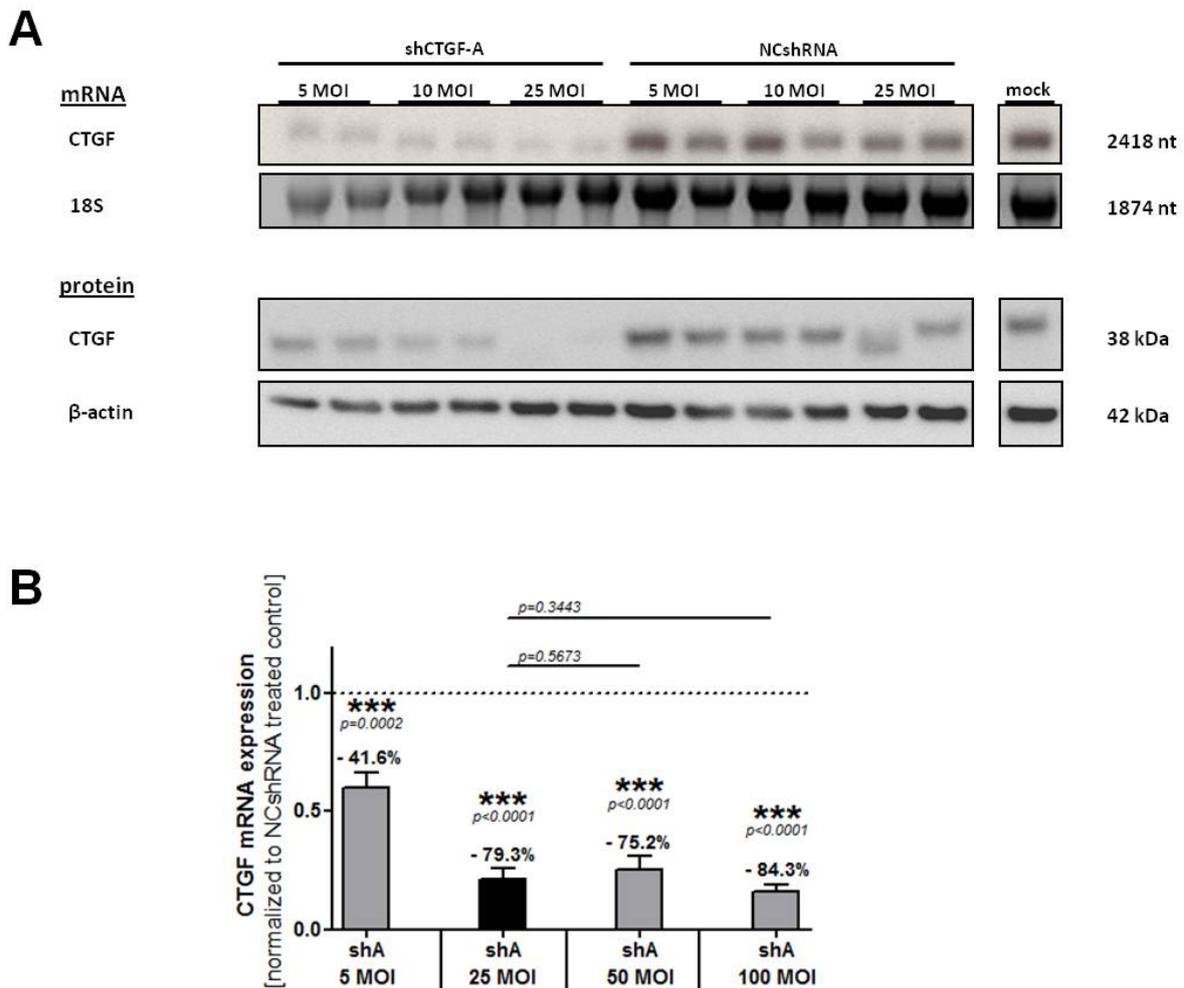


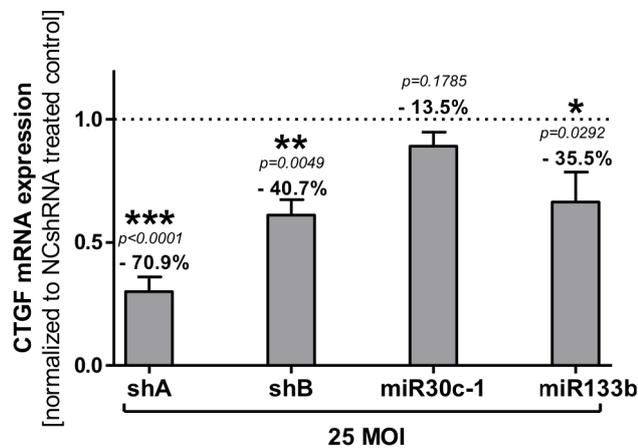
Abbildung 4.25: Effizienzanalyse und Dosisfindung von Ad5-shCTGF-A auf mRNA- und Proteinebene. Die Untersuchung der CTGF- mRNA erfolgte mittels Northern Blot (A) unter Verwendung radioaktiv markierter spezifischer Sonden. Als endogene Kontrolle erfolgte die Darstellung von ribosomaler 18s- RNA. Analog erfolgte die Westernblotanalyse mittels spezifischer Antikörper zur Darstellung der CTGF- Expression auf Proteinebene (A). Nach Transduktion mit 5, 25, 50 oder 100 MOI der adenoviralen Vektoren shCTGF-A oder NCshRNA erfolgte die Evaluierung der optimalen Dosis von Ad5-shCTGF-A in murinen Kardiofibroblasten mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman®). Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen HPRT1 (*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1*) und Ad5-NCshRNA- transduzierten Zellen mit der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (B). *** $p \leq 0.001$.

4.4.1 miRNAs als Regulatoren der CTGF- Expression

Als Alternative zum shRNA- basierten *Silencing*- Ansatz wurden für eine miRNA- basierte Strategie adenovirale Vektoren, welche die miRNAs miR30c-1 oder miR133b exprimieren, innerhalb der

Arbeitsgruppe entwickelt. Anschließend wurden adulte murine Kardiofibroblasten entweder mit 25 MOI eines dieser Vektoren, Ad5-shCTGF-A, Ad5-shCTGF-B oder einem Kontrollvektor mit einer unspezifischen shRNA transduziert. Nach 72 Stunden war die CTGF- Expression auf RNA- Ebene durch shCTGF-A um über 70 % hoch signifikant verringert. Mit shCTGF-B konnte eine signifikante Reduktion um über 40 % erreicht werden. Die vermehrte Expression von miR30c-1 führte zu keiner signifikanten Veränderung der CTGF- Expression, wohingegen nach der vektorvermittelten Expression von miR133b eine Verringerung um etwa 35 % beobachtet werden konnte (Abbildung 4.26 A). Auch auf Proteinebene zeigten shCTGF-A und shCTGF-B eine deutliche Inhibition des CTGF- Proteins. Hier konnte eine Verringerung um 57.9 % bzw. 39.6 % detektiert werden, während mit den miRNAs jeweils eine Reduktion um etwa 20 % erreicht wurde (Abbildung 4.26 B).

A



B

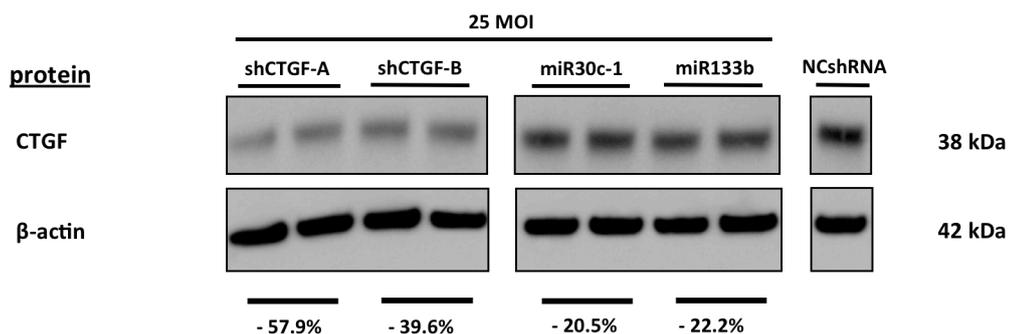


Abbildung 4.26: Vergleich von miRNA- und shRNA- exprimierender adenoviraler Vektoren auf mRNA- und Proteinebene. Nach Transduktion von 25 MOI der Vektoren erfolgte die Evaluierung mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman®). Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen HPRT1 (*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1*) und Ad5-NCshRNA- transduzierten Zellen mit der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (A). Die Westernblotanalyse erfolgte mit Antikörpern gegen CTGF sowie gegen β-Aktin als endogene Kontrolle. Die quantitative Auswertung erfolgte mit ImageJ (B). Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene wurde die CTGF- Expression durch shCTGF-A und shCTGF-B stärker gehemmt als mit den miRNAs miR30c-1 und miR133b. *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$.

4.5 Mechanische Aktivierung adulter muriner Kardiofibroblasten

Kardiofibroblasten können durch mechanische Beanspruchung in Form von zyklischen equibiaxialen Stretch aktiviert werden. Dabei werden komplexe Veränderungen der zellulären Genexpression induziert. Untersuchungen zeigten, dass bei einer mechanischen Beanspruchung von 10 % die Expression von CTGF deutlich induziert wurde (Tank *et al.*, 2014). Daher wurden adulte murine Kardiofibroblasten für 3 Stunden, 6 Stunden oder 168 Stunden diesem Stimulus ausgesetzt. Dafür wurden die Fibroblasten in Kollagen- beschichtete Zellkulturplatten mit flexiblem Boden kultiviert. Des Weiteren wurden sie am Folgetag entweder mit 25 MOI Ad5-NCshRNA als Kontrolle oder Ad5-shCTGF-A transduziert. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die mechanische Aktivierung.

4.5.1 Mechanische Kurzzeitstimulation adulter muriner Kardiofibroblasten

Nach 3 Stunden war auf Transkriptionsebene für CTGF eine hochsignifikante Expressionsinduktion von 62.6 % ($p < 0.0001$) detektierbar (Abbildung 4.27). Nach 6 Stunden wurde ein signifikanter Rückgang um 20.7% gemessen. Damit war die mRNA- Expression noch um 29.0 % ($p < 0.0001$) gegenüber der unstimulierten Kontrolle erhöht. Das CTGF- mRNA- Level war mit der shRNA shCTGF-A ohne 3- stündige bzw. 6- stündige mechanische Stimulation um 52 % ($p < 0.0001$) bzw. 43.4 % ($p < 0.0001$) verringert. Bei zusätzlicher mechanischer Stimulation für 3 Stunden oder 6 Stunden war diese im Vergleich um 92.7 % ($p < 0.0001$) oder 20.3 % ($p = 0.5101$) höher. Damit lag nach 3 Stunden mechanischer Stimulation in Gegenwart von shCTGF-A die CTGF- Expression auf einem vergleichbaren Level wie die nicht aktivierten NCshRNA- inkubierten Fibroblasten. Die shRNA wirkte hier der Stretch- induzierten CTGF- Expression um 43.1 % ($p = 0.0004$) entgegen. Nach 6 Stunden wurde eine Verminderung um 47.2 % festgestellt. Erfolgte die 6- stündige mechanische Beanspruchung in Gegenwart von shCTGF-A, war die CTGF- Expression um 31.9 % ($p = 0.0009$) geringer als bei nicht aktivierten Zellen.

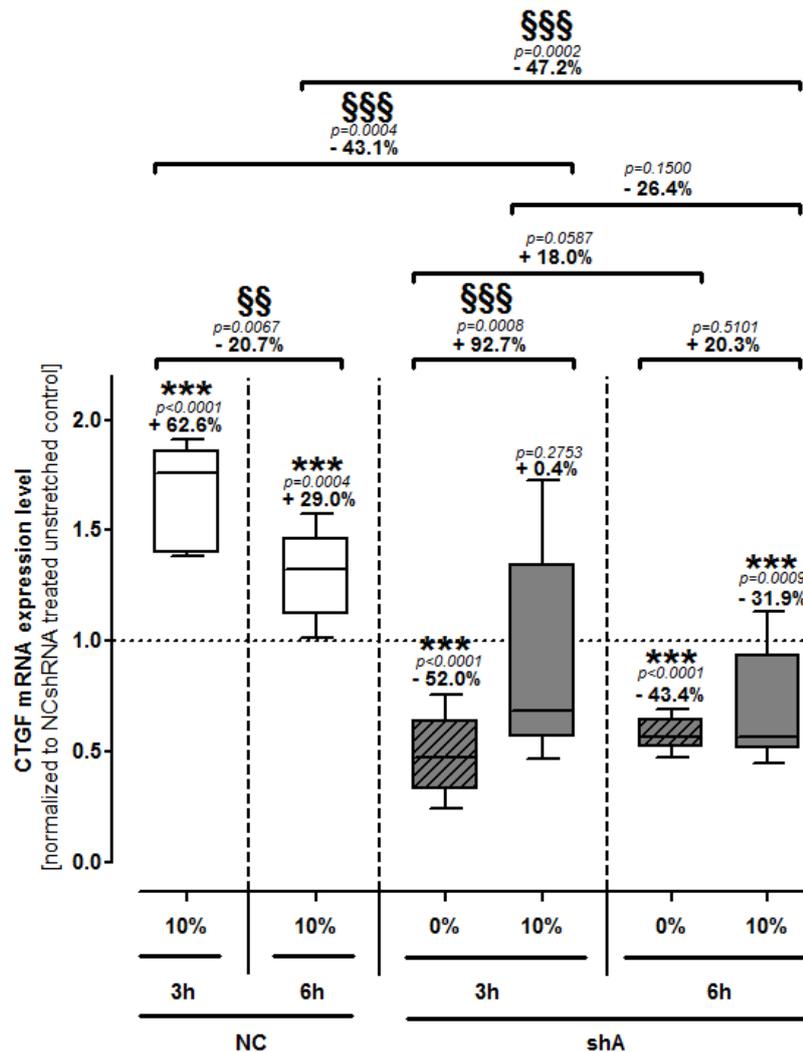


Abbildung 4.27: CTGF- mRNA- Expression nach mechanischer Kurzzeitstimulation mit oder ohne shCTGF-A-Behandlung. Nach Transduktion von 25 MOI Ad5-shCTGF-A oder Ad5-NCshRNA wurden murine Kardiofibroblasten für 3 oder 6 Stunden zyklischen equibiaxialen Stretch ausgesetzt. Anschließend erfolgte die Evaluierung mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman®). Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen HPRT1 (*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1*) und unstimulierten Ad5-NCshRNA- transduzierten Zellen mit der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$. \$\$\$ oder *** $p \leq 0.001$; \$\$ oder ** $p \leq 0.01$.

Die Expressionsanalyse von WISP2 als Inhibitor der profibrotischen Eigenschaften von CTGF (Leask, 2010) zeigte sowohl nach 3 Stunden (-38.1 %, $p < 0.0001$) als auch nach 6 Stunden (-43.9 %, $p < 0.0001$) eine hochsignifikante Reduktion der Genexpression. Die Manipulation der CTGF- Expression mittels RNAi zeigte bei der mechanischen Kurzzeitstimulation keine weitere Auswirkung auf WISP2 (Abbildung 4.28).

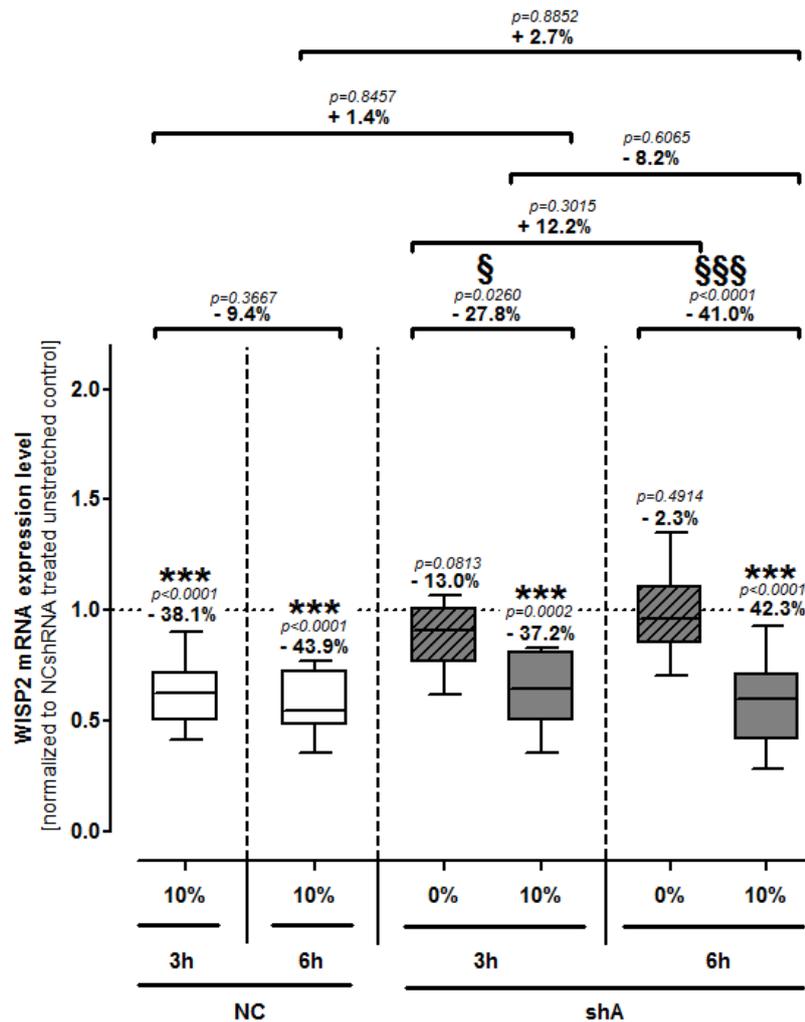


Abbildung 4.28: WISP2- mRNA- Expression nach mechanischer Kurzzeitstimulation mit oder ohne shCTGF-A-Behandlung. Nach Transduktion von 25 MOI Ad5-shCTGF-A oder Ad5-NCshRNA wurden murine Kardiofibroblasten für 3 oder 6 Stunden zyklischen equibiaxialen Stretch ausgesetzt. Anschließend erfolgte die Evaluierung mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman®). Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen HPRT1 (*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1*) und unstimulierten Ad5-NCshRNA- transduzierten Zellen mit der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$. §§§ oder ***p < 0.001; §§ oder **p < 0.01.

Bei der Transdifferenzierung kardialer Fibroblasten kann *alpha smooth muscle actin* (α -SMA) als Marker herangezogen werden (Hinz *et al.*, 2012; Lindner *et al.*, 2014; Matthijs Blankesteyn, 2015). Nach 3 Stunden mechanischer Stimulierung war dessen mRNA- Expression um 82.6 % (p < 0.0001) erhöht, nach 6 Stunden lag das mRNA- Level wieder auf dem Niveau unstimulierter Zellen. Die Behandlung der Zellen mit adenoviral exprimiertem shCTGF-A zeigte keinen Einfluss auf die mRNA- Expression von α -SMA (Abbildung 4.29).

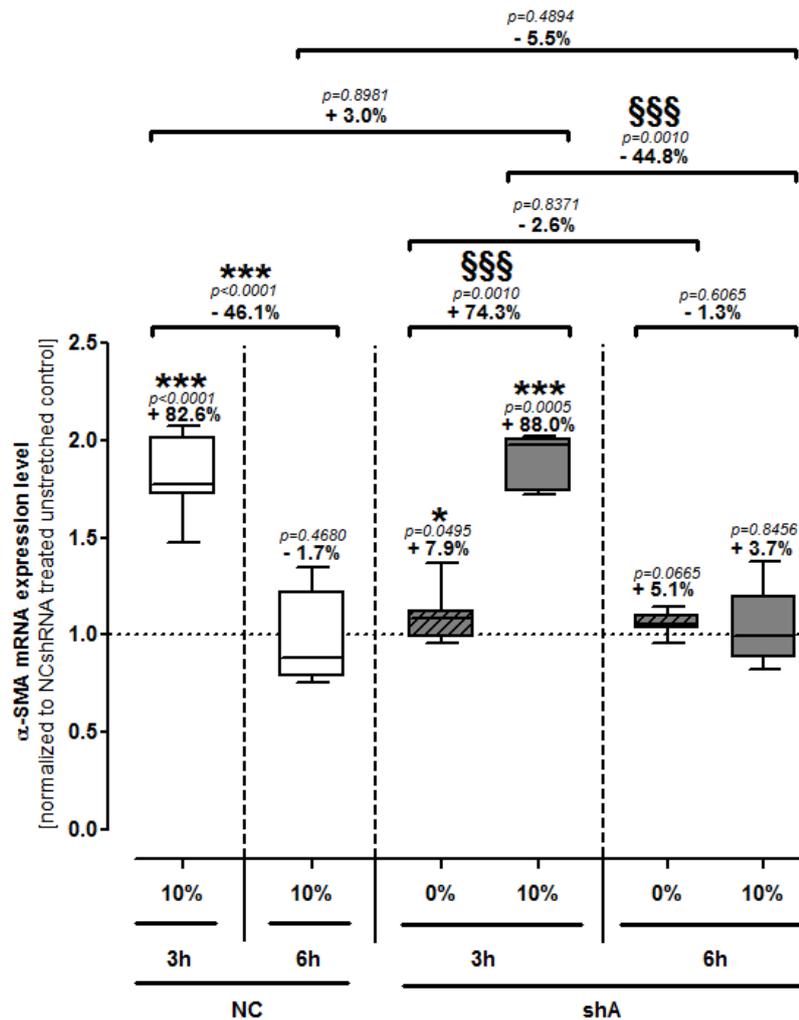


Abbildung 4.29: α -SMA- mRNA- Expression nach mechanischer Kurzzeitstimulation mit oder ohne shCTGF-A-Behandlung. Nach Transduktion von 25 MOI Ad5-shCTGF-A oder Ad5-NCshRNA wurden murine Kardiofibroblasten für 3 oder 6 Stunden zyklischen equibiaxialen Stretch ausgesetzt. Anschließend erfolgte die Evaluierung mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman®). Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen HPRT1 (*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1*) und unstimulierten Ad5-NCshRNA- transduzierten Zellen mit der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$. SSS oder ***p \leq 0.001; SS oder **p \leq 0.01.

Auch wurde der mögliche Einfluss des antifibrotischen shRNA- Ansatzes auf die Expression der Chemokine Ccl2, Ccl7 und Ccl8 in mechanisch aktivierten adulten murinen Fibroblasten quantifiziert. Nach 3 Stunden mechanischer Aktivierung konnte für Ccl2 mit 25.5 % (p < 0.0001) eine hoch signifikante Steigerung des mRNA- Levels detektiert werden (Abbildung 4.30). Nach 6 Stunden zeigte sich eine Abnahme um 11.6 % (p = 0.3565), so dass die Expression um 10.9 % (p = 0.0058) gegenüber unstimulierten Zellen signifikant erhöht war. Durch die Transduktion mit Ad5-shCTGF-A wurde ohne mechanische Aktivierung eine hoch signifikante Reduktion um 15.9 % (p = 0.0007) erreicht. Dem gegenüber erzielte die zusätzliche Aktivierung eine hochsignifikante Expressionsteigerung um 59.9 % (p = 0.0002), so dass das mRNA- Level im Vergleich zur nicht aktivierten, NCshRNA- behandelten

Kontrolle um 34.4 % ($p=0.0001$) erhöht war. Nach 6 Stunden konnte sowohl ohne als auch mit mechanischer Aktivierung keine signifikante Veränderung gegenüber der Kontrolle festgestellt werden. Der Vergleich der stimulierten shCTGF-A- Gruppe mit der stimulierten NCshRNA-Kontrolle ergab jedoch eine signifikante Reduktion um 14.1 % ($p=0.0040$).

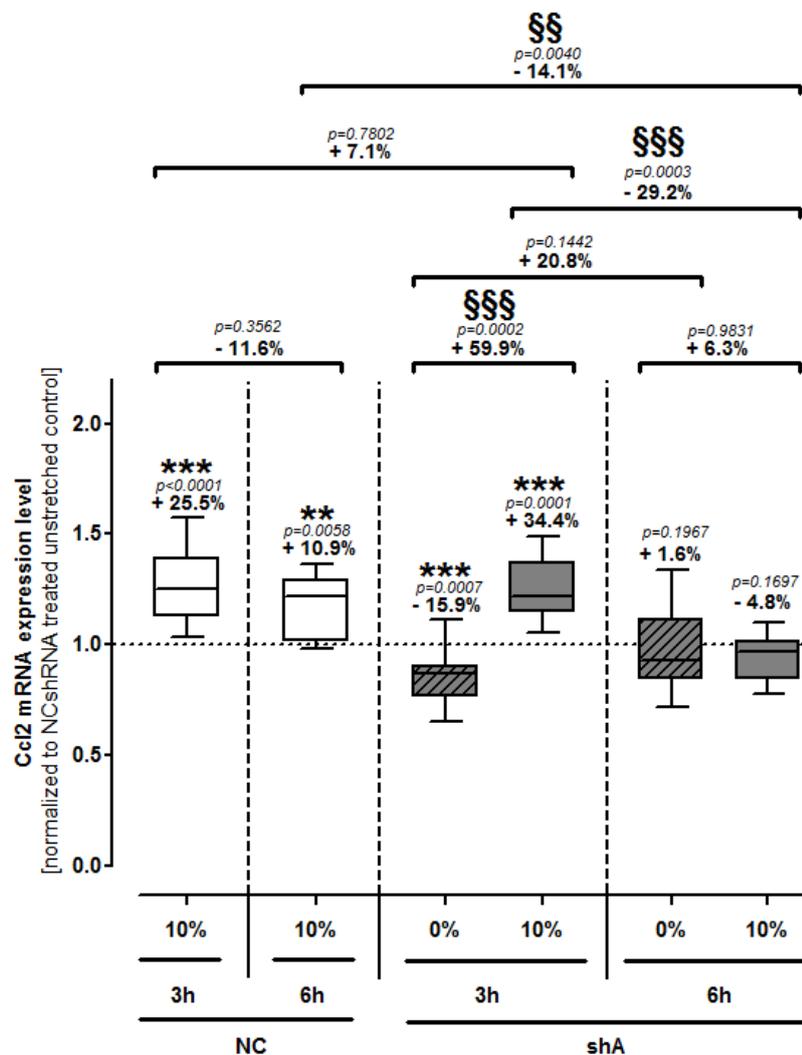


Abbildung 4.30: Ccl2- mRNA- Expression nach mechanischer Kurzzeitstimulation mit oder ohne shCTGF-A-Behandlung. Nach Transduktion von 25 MOI Ad5-shCTGF-A oder Ad5-NCshRNA wurden murine Kardiofibroblasten für 3 oder 6 Stunden zyklischen equibiaxialen Stretch ausgesetzt. Anschließend erfolgte die Evaluierung mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman®). Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen HPRT1 (*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1*) und unstimulierten Ad5-NCshRNA- transduzierten Zellen mit der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$. §§§ oder *** $p \leq 0.001$; §§ oder ** $p \leq 0.01$.

Die quantitative Analyse der mRNA- Expression von Ccl7 ergab nach 3 Stunden mechanischer Aktivierung keine Veränderung (Abbildung 4.31). Erfolgte die Stimulation der NCshRNA- behandelten Zellen über 6 Stunden, zeigte sich eine um 17.4 % ($p=0.0315$) signifikant gesteigerte Transkriptmenge. Die Transduktion mit Ad5-shCTGF-A führte zu einer Reduktion um 20.7 %

($p=0.0018$) bzw. 12.9 % ($p=0.0174$). Die zusätzliche mechanische Stimulation über 3 oder 6 Stunden zeigte keine weitere signifikante Veränderung. Bei 6 stündiger Stimulation wurde gegenüber der NCshRNA- behandelten Zellen durch shCTGF-A eine signifikante Reduktion um 27.2 % ($p=0.0196$) erreicht.

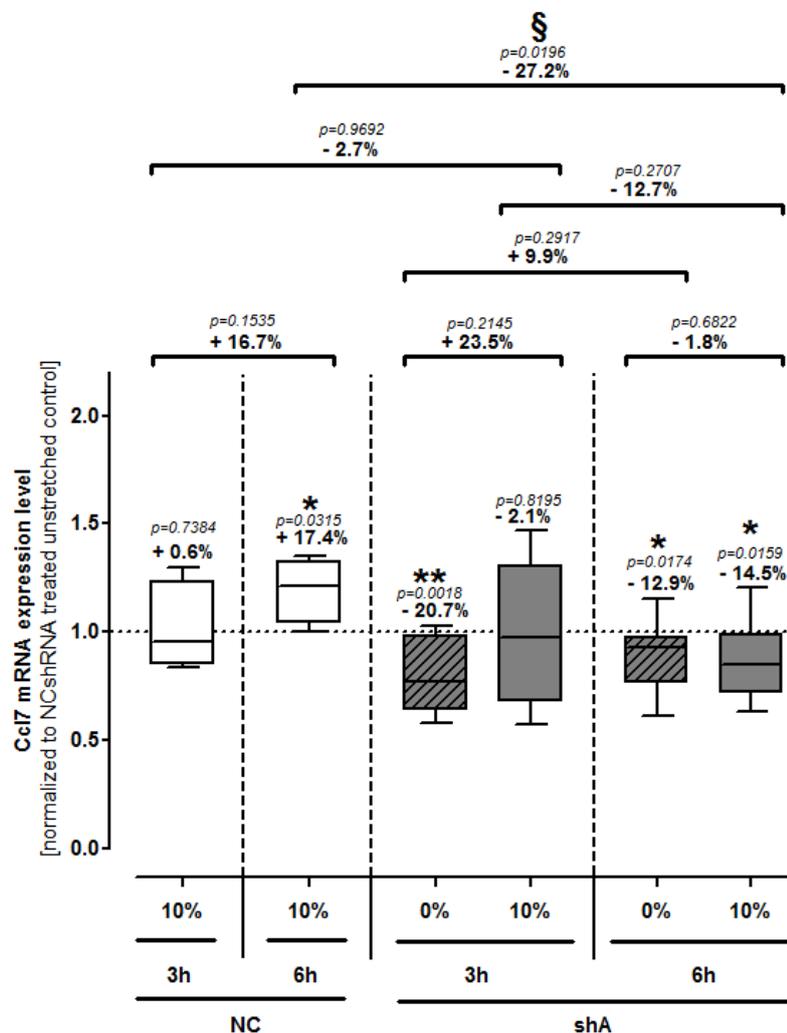


Abbildung 4.31: Ccl7- mRNA- Expression nach mechanischer Kurzzeitstimulation mit oder ohne shCTGF-A-Behandlung. Nach Transduktion von 25 MOI Ad5-shCTGF-A oder Ad5-NCshRNA wurden murine Kardiofibroblasten für 3 oder 6 Stunden zyklischen equibiaxialen Stretch ausgesetzt. Anschließend erfolgte die Evaluierung mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman®). Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen HPRT1 (*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1*) und unstimulierten Ad5-NCshRNA- transduzierten Zellen mit der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$. §§§ oder *** $p \leq 0.001$; §§ oder ** $p \leq 0.01$.

Durch die mechanische Aktivierung adulter muriner Kardiofibroblasten ergab sich nach 3 Stunden eine um 15.9 % ($p=0.0228$) signifikant verminderte Ccl8- Expression (Abbildung 4.32). Nach 6 Stunden war eine hoch signifikante Reduktion um 30.9 % ($p=0.0003$) feststellbar, so dass eine weitere signifikante Abnahme um 17.9 % ($p=0.0392$) erreicht wurde. In Gegenwart von shCTGF-A ergab sich ohne mechanischen Stimulus eine hoch signifikante Reduktion um 36.9 % ($p < 0.0001$) bzw.

28,5 % ($p < 0.0001$). Durch zusätzliche mechanische Stimulation war nach 3 Stunden eine Repression um 53.8 % ($p < 0.0001$) und nach 6 Stunden um 47.4 % ($p < 0.0001$) detektierbar. Somit lag das mRNA-Level um rund 27 % unter dem der unstimulierten, shCTGF-A- behandelten Zellen. Der additive Effekt zeigte sich auch beim Vergleich der NCshRNA- und shCTGF-A- behandelten Zellen nach 3 stündiger Aktivierung. Die Reduktion lag hier signifikant bei 45.1 % ($p = 0.0015$).

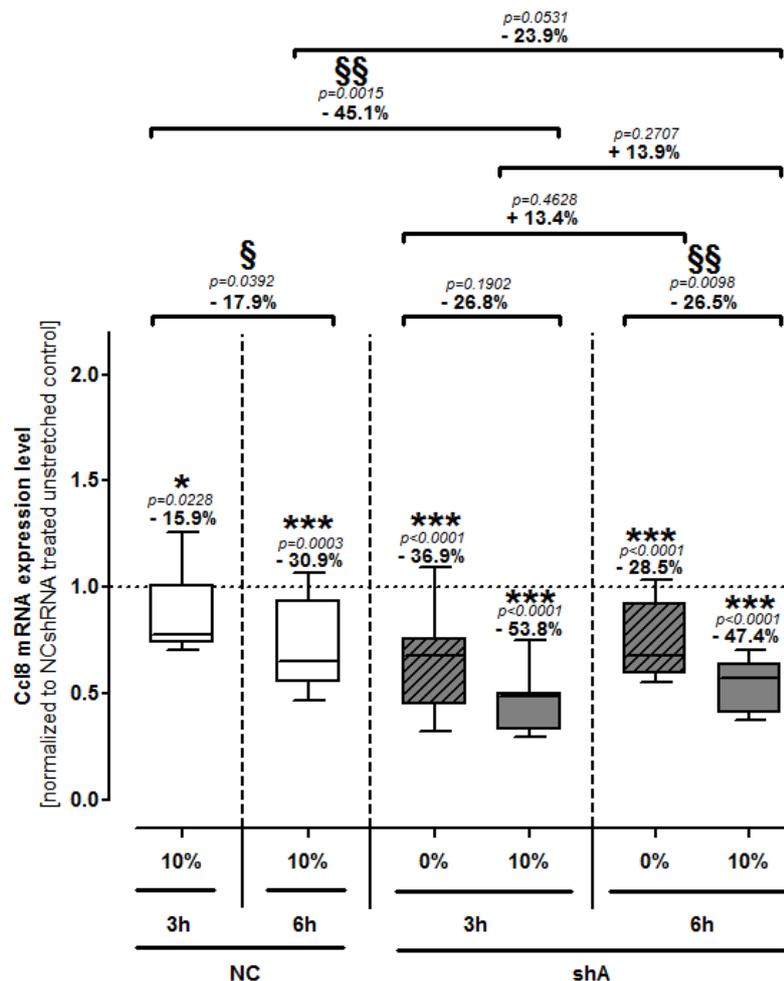


Abbildung 4.32: Ccl8- mRNA- Expression nach mechanischer Kurzzeitstimulation mit oder ohne shCTGF-A-Behandlung. Nach Transduktion von 25 MOI Ad5-shCTGF-A oder Ad5-NCshRNA wurden murine Kardiofibroblasten für 3 oder 6 Stunden zyklischen equibiaxialen Stretch ausgesetzt. Anschließend erfolgte die Evaluierung mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman®). Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen HPRT1 (*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1*) und unstimulierten Ad5-NCshRNA- transduzierten Zellen mit der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$. §§§ oder *** $p \leq 0.001$; §§ oder ** $p \leq 0.01$.

4.5.2 Mechanische Langzeitstimulation adulter muriner Kardiofibroblasten

Um den Einfluss der mechanischen Langzeitstimulation auf die Morphologie der adulten murinen Kardiofibroblasten zu beurteilen, wurde nach erfolgter Stimulation zum Einen die doppelsträngige DNA des Zellkerns mittels DAPI (blau) markiert, zum Anderen filamentöses Aktin mit Hilfe von Alexa

Fluor 488-markiertem Phalloidin (grün) fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht (Abbildung 4.33). Die Langzeitstimulation adulter kardialer Fibroblasten führte zu einer veränderten Organisation des Zellverbandes. Schienen die Fibroblasten ohne mechanische Beeinflussung eher ungeordnet zu wachsen, bewirkte der Stimulus in Form von zyklischem equibiaxialem Stretch eine netzartige Anordnung der Zellen. Dabei veränderte sich auch die Morphologie der einzelnen Zelle von einem eher flächigen Habitus hin zu einer spindelförmigen Form mit Ausläufern, über die der Kontakt zu benachbarten Zellen hergestellt wurde. Wurde vor der mechanischen Aktivierung CTGF mittels 25MOI Ad5-shCTGF-A inhibiert, war das Netzwerk nur ansatzweise ausgebildet. Außerdem fiel auf, dass während der Präparation der Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie deutlich mehr Zellen abgelöst wurden.

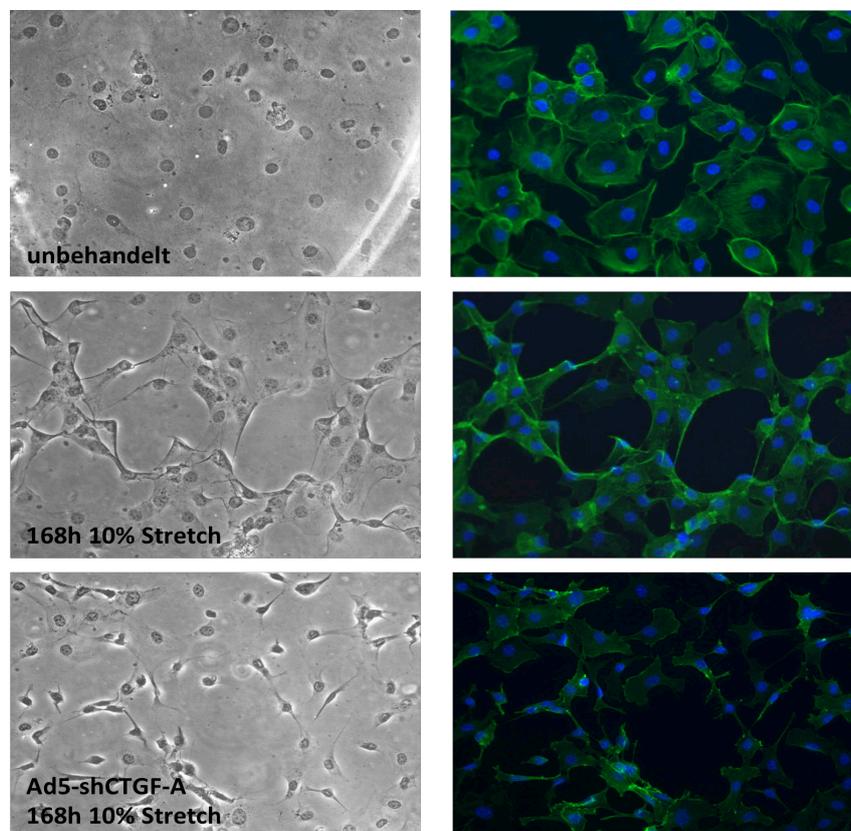


Abbildung 4.33: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung muriner Kardiofibroblasten nach mechanischer Langzeitstimulation. Murine Kardiofibroblasten wurden in BioFlex- Zellkulturplatten ohne oder mit mechanischer Stimulation für 168 Stunden kultiviert. Bei den in der unteren Reihe abgebildeten Zellen erfolgte zusätzlich die CTGF- Depletion mittels Ad5-shCTGF-A. Anschließend erfolgte die Fluoreszenzfärbung mit DAPI und Phalloidin zur Darstellung von Zellkern und Aktinskelett. In Folge der zyklischen equibiaxialen Stimulation kam es zu einer netzartigen Anordnung der Zellen.

Die mechanische Langzeitstimulation über 168 Stunden resultierte in komplexen Veränderungen der Genexpression. So ergab sich bei der CTGF- Expression ein um 59.4 % ($p=0.0043$) verringertes mRNA-Level. In Gegenwart von shCTGF-A wurde eine weitere Reduktion um 69.1 % festgestellt. Somit lag

die detektierte mRNA- Menge 87.4 % ($p=0.0022$) unter der unstimulierten, NCshRNA-behandelten Kontrolle (Abbildung 4.34).

Neben CTGF wurden auch die übrigen Mitglieder der CCN- Familie im Anschluss an die Langzeitstimulation analysiert (Abbildung 4.34). Dabei zeigte sich für Cyr61 eine stimulationsbedingte Reduktion um 49.3 % ($p=0.0043$). Die zusätzliche Behandlung mit shCTGF-A zeigte keine signifikante Veränderung. Bei Nov und WISP3 konnte weder die mechanische Stimulation noch die CTGF-spezifische shRNA eine signifikante Veränderung im Expressionsprofil hervorrufen. Im Gegensatz dazu erfolgte für WISP1 und WISP2 bei mechanischer Aktivierung eine signifikante Induktion der mRNA- Expression um 182.9 % ($p=0.0043$) und 420.7 % ($p=0.0079$). Durch die Inhibition von CTGF mittels RNA- Interferenz wurde für WISP2 eine weitere Induktion um 277.9 % ($p=0.0079$) erreicht, so dass die Genexpression gegenüber der unstimulierten, NCshRNA- behandelten Kontrolle um 1867,7 % gesteigert war.

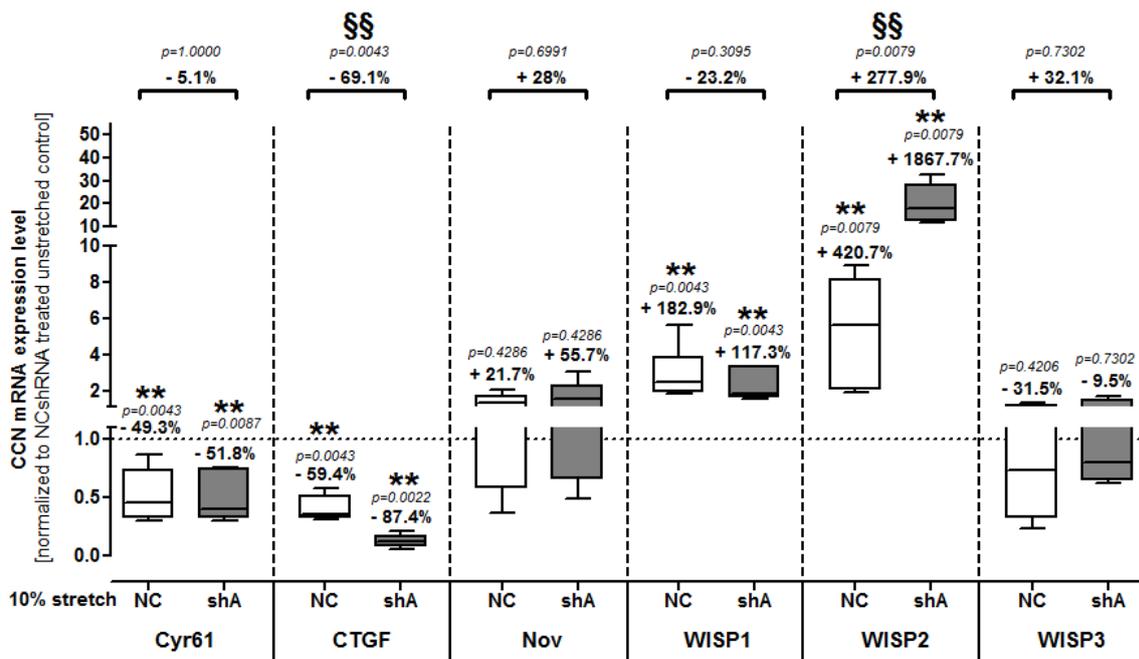


Abbildung 4.34: CCN- mRNA- Expression nach mechanischer Langzeitstimulation mit oder ohne shCTGF-A-Behandlung. Nach Transduktion von 25 MOI Ad5-shCTGF-A oder Ad5-NCshRNA wurden murine Kardiofibroblasten für 168 Stunden zyklischen equibiaxialen Stretch ausgesetzt. Anschließend erfolgte die Evaluierung mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman®). Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen HPRT1 (*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1*) und unstimulierten Ad5-NCshRNA- transduzierten Zellen mit der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$. §§ oder $**p \leq 0.01$.

Durch die mechanische Stimulation über einen Zeitraum von 168 Stunden werden die Chemokine Ccl2 um 77.8 % ($p=0.0043$), Ccl7 um 190.4 % ($p=0.0022$) und Ccl8 um 2108.7 % ($p=0.0079$) signifikant induziert (Abbildung 4.35). Das *Silencing* von CTGF mittels shCTGF-A wirkte dieser Induktion anscheinend entgegen, so dass die Genexpression von Ccl2 nun um 18.5 % ($p=0.2468$) erhöht war,

die von Ccl7 um 78.8 % ($p=0.0022$) und die von Ccl8 um 545.3 % ($p=0.0079$). Dies entsprach jeweils einer signifikanten Verminderung um 33.3 % ($p=0.0022$), 38.4 % ($p=0.0022$) und 70.8 % ($p=0.0079$) gegenüber den stimulierten NCshRNA- behandelten Kardiofibroblasten.

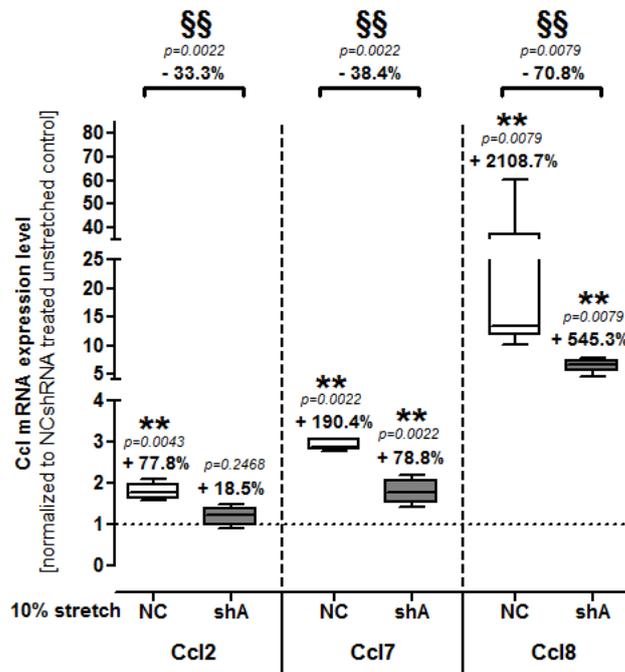


Abbildung 4.35: Ccl- mRNA- Expression nach mechanischer Langzeitstimulation mit oder ohne shCTGF-A-Behandlung. Nach Transduktion von 25 MOI Ad5-shCTGF-A oder Ad5-NCshRNA wurden murine Kardiofibroblasten für 168 Stunden zyklischen equibiaxialen Stretch ausgesetzt. Anschließend erfolgte die Evaluierung mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman®). Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen HPRT1 (*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1*) und unstimulierten Ad5-NCshRNA- transduzierten Zellen mit der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$. $\S\S$ oder $**p \leq 0.01$.

Des Weiteren wird durch die mechanische Stimulation die Kollagenexpression induziert. Die quantitative Untersuchung der mRNA- Expression zeigte für Col1 α 2 eine signifikante Erhöhung um 40.8 % ($p=0.0095$). Col3 α 1 war um 169.2 % ($p=0.0043$) stärker exprimiert. Die Gegenwart von shCTGF-A blieb die Induktion aus. Die mRNA- Expression zeigte keine signifikante Veränderung gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Die mechanisch bedingte Deregulation der ECM-Komponenten Elastin und Osteopontin wurde durch die Manipulation der CTGF- Expression nicht signifikant beeinflusst. Im Einzelnen war das mRNA- Level von Elastin um 74.6 % ($p=0.0043$) verringert und von Osteopontin um 719.4 % ($p=0.0043$) erhöht (Abbildung 4.36).

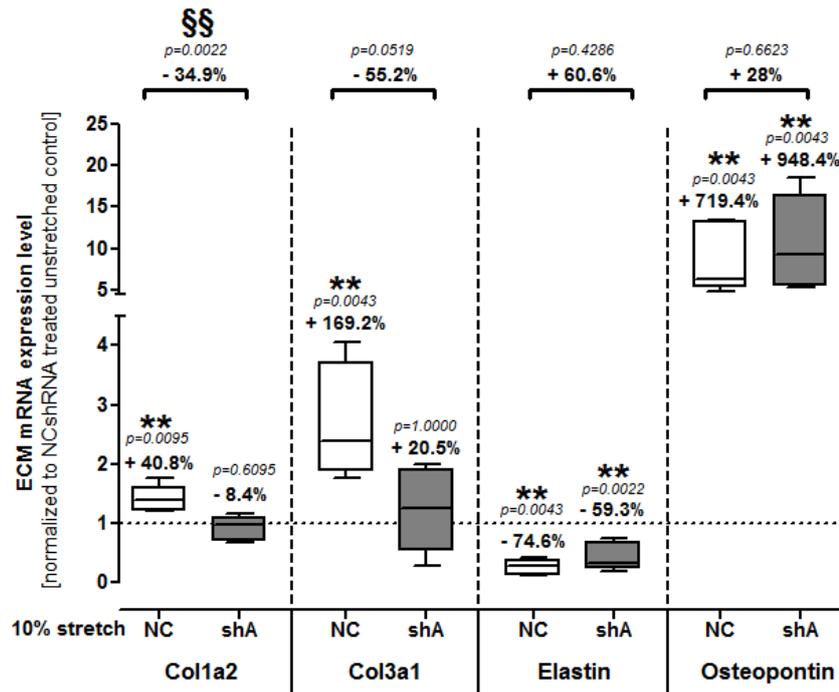


Abbildung 4.36: ECM- mRNA- Expression nach mechanischer Langzeitstimulation mit oder ohne shCTGF-A-Behandlung. Nach Transduktion von 25 MOI Ad5-shCTGF-A oder Ad5-NCshRNA wurden murine Kardiofibroblasten für 168 Stunden zyklischen equibiaxialen Stretch ausgesetzt. Anschließend erfolgte die Evaluierung mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman®). Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen HPRT1 (*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1*) und unstimulierten Ad5-NCshRNA- transduzierten Zellen mit der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$. §§ oder ** $p \leq 0.01$.

Wie die Chemokine reagierte auch die Expression der Matrixmetalloproteasen MMP2 und MMP9 auf die mechanische Aktivierung mit einer signifikanten Induktion der Genexpression (Abbildung 4.37). Die Gelatinase MMP2 reagierte mit einer um 1701.6 % ($p=0.0079$) erhöhten Transkription, die Kollagenase MMP9 mit 310.3 % ($p=0.0173$). Die RNAi- vermittelte Suppression von CTGF führte im Vergleich zu einer signifikanten Reduktion um 73.7 % ($p=0.0159$) und 78.6 % ($p=0.0317$). Die MMP9- Expression war somit ähnlich der unstimulierten, NCshRNA- behandelten Kontrolle. Die massive Induktion von MMP2 konnte durch die Inhibition der CTGF- Expression nicht vollständig entgegengewirkt werden. Die Expression der mRNA lag noch um 373.7 % ($p=0.0159$) über der Kontrolle.

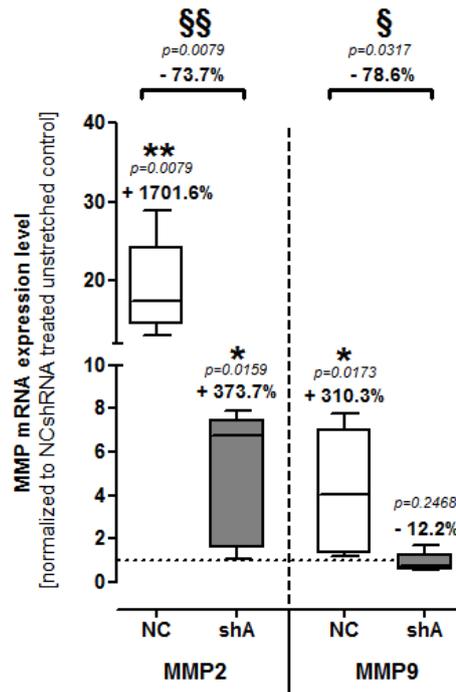


Abbildung 4.37: MMP- mRNA- Expression nach mechanischer Langzeitstimulation mit oder ohne shCTGF-A-Behandlung. Nach Transduktion von 25 MOI Ad5-shCTGF-A oder Ad5-NCshRNA wurden murine Kardiofibroblasten für 168 Stunden zyklischen equibiaxialen Stretch ausgesetzt. Anschließend erfolgte die Evaluierung mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman®). Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen HPRT1 (*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1*) und unstimulierten Ad5-NCshRNA- transduzierten Zellen mit der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$. §§ oder ** $p \leq 0.01$.

In Folge der mechanischen Aktivierung über 168 Stunden ergab sich für die Zell- Zell- Kontakt-Komponente Connexin 43 (Cx43) eine Induktion der mRNA- Expression um 333.9 % ($p=0.0022$) (Abbildung 4.38). In Gegenwart von shCTGF-A war die mRNA um 98.7 % ($p=0.0022$) erhöht. Der Stretch- bedingten Induktion wurde somit um 54.2 % ($p=0.0022$) entgegengewirkt.

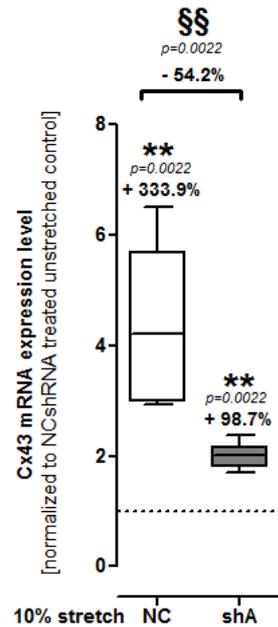


Abbildung 4.38: Cx43- mRNA- Expression nach mechanischer Langzeitstimulation mit oder ohne shCTGF-A-Behandlung. Nach Transduktion von 25 MOI Ad5-shCTGF-A oder Ad5-NCshRNA wurden murine Kardiofibroblasten für 168 Stunden zyklischen equibiaxialen Stretch ausgesetzt. Anschließend erfolgte die Evaluierung mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman[®]). Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen HPRT1 (*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1*) und unstimulierten Ad5-NCshRNA- transduzierten Zellen mit der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$. §§ oder ** $p \leq 0.01$.

Der Transdifferenzierungsmarker α -SMA zeigte im Gegensatz zur kurzzeitigen mechanischen Stimulation nach 168 Stunden eine um 62.6 % ($p=0.0043$) verringerte mRNA- Expression (Abbildung 4.39). As Silencing von CTGF nahm darauf keinen nachweisbaren Einfluss.

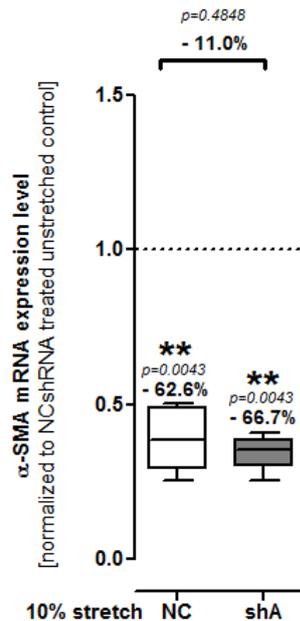


Abbildung 4.39: α -SMA- mRNA- Expression nach mechanischer Langzeitstimulation mit oder ohne shCTGF-A-Behandlung. Nach Transduktion von 25 MOI Ad5-shCTGF-A oder Ad5-NCshRNA wurden murine Kardiofibroblasten für 168 Stunden zyklischen equibiaxialen Stretch ausgesetzt. Anschließend erfolgte die Evaluierung mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman[®]). Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen HPRT1 (*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1*) und unstimulierten Ad5-NCshRNA- transduzierten Zellen mit der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$. §§ oder ** $p \leq 0.01$.

4.5.3 Verifizierung des antiinflammatorischen Effekts der RNAi- vermittelten CTGF- Depletion

Ergänzend zur veränderten Ccl- und CTGF- Expression wurde *in vitro* das Migrationsverhalten von murinen Splenozyten hin zu CTGF- depletierten kardiofibroblastischen Zellkulturüberständen als Chemoattraktant untersucht. Die durchflußzytometrische Quantifizierung der migrierten Splenozyten ergab, dass 31.4 % ($p=0.0023$) weniger Zellen als bei der NCshRNA- behandelten Kontrolle die Membran des Transwellassays passiert hatten (Abbildung 4.40).

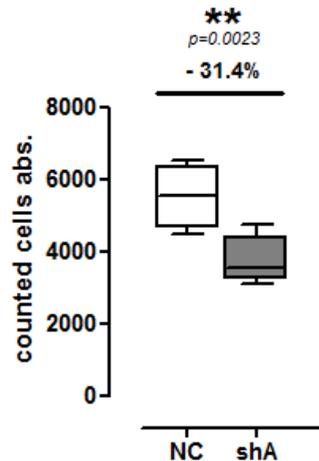


Abbildung 4.40: Migrationsanalyse von murinen Splenozyten mit CTGF- depletierten Überständen muriner Kardiofibroblasten. Zunächst wurden konditionierte Überstände durch Transduktion von murinen Kardiofibroblasten mit 25 MOI Ad5-shCTGF-A oder Ad5-NCshRNA generiert. Diese Überstände dienten dann als Chemoattraktant im Transwell- Migrationsassay mit murinen Splenozyten. Die quantitative Auswertung erfolgte mittels Durchflußzytometrie. In Folge der CTGF- Depletion wurde eine verminderte Zahl migrierter Splenozyten festgestellt. $**p \leq 0.01$.

4.5.4 Transfer des gentherapeutischen RNAi- Ansatzes in *Homo sapiens*

Der spezieübergreifende Sequenzabgleich der generierten shRNA- Konstrukte mit der CTGF- Sequenz von *Homo sapiens* ergab, dass shCTGF-B auch für das *Silencing* von humanen CTGF in Frage kommt. Daher sollten für einen möglichen Transfer des gentherapeutischen Ansatzes *in vivo* evaluative Untersuchungen mit humanen Kardiofibroblasten durchgeführt werden.

4.5.4.1 Adulte humane Kardiofibroblasten

Um für *in vitro*- Untersuchungen adulte humane Kardiofibroblasten zu erhalten, wurde Kardiomyopathie- Patienten zunächst Myokardgewebe im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung entnommen. Diese patientenspezifischen Kardiofibroblasten wurden dann durch Auswachsen unter geeigneten Zellkulturbedingungen in Zellkulturplatten über mehrere Wochen vermehrt (Lindner *et al.*, 2012). Dabei war festzustellen, dass sich humanen Fibroblasten in Wachstumsverhalten und Morphologie sehr heterogen darstellten und das Erzielen einer ausreichenden Zellzahl für *in vitro* Untersuchungen sehr diffizil war.

4.5.4.1.1 Gentransfer durch Transfektion

Für den Plasmid- basierten Gentransfer wurden Roti®Fect PLUS (Carl Roth®), X- tremeGene 9 (Roche®) und PEI hinsichtlich der Transfereffizienz bei zwei individuellen humanen

Fibroblastenkulturen (6263 und 6294) untersucht. Die Kultur 6294 wies für alle eingesetzten Transfektionsreagenzien eine bessere Transgenexpression auf. Sowohl die Transfektion mit Hilfe von Roti®Fect PLUS (Carl Roth®) (Abbildung 4.41) als auch mittels X-tremeGene 9 (Roche®) (Abbildung 4.42) resultierte bei beiden dargestellten Kulturen zu einer marginalen GFP- Expression. Unter Verwendung des Transfektionsreagenz PEI lag die mikroskopisch detektierte Fluoreszenzrate bei etwa 5 % in der Kultur 6263 und bei etwa 14 % für die Kultur 6294 (Abbildung 4.43).

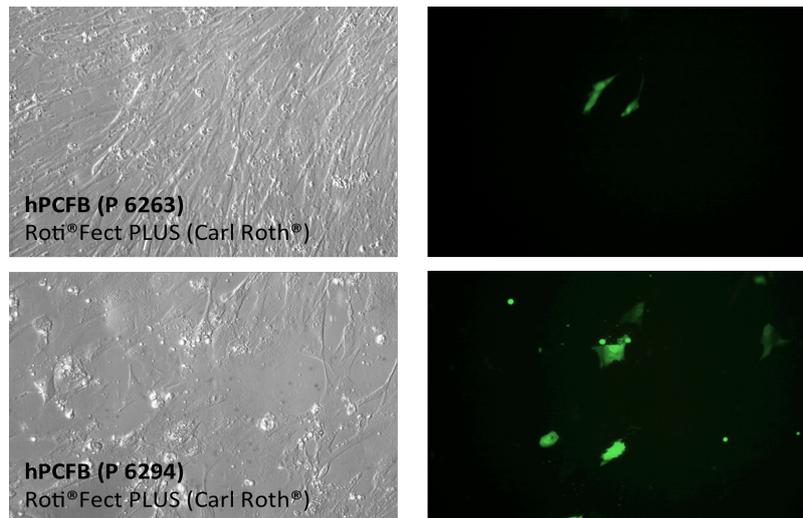


Abbildung 4.41: Transfektionsevaluierung adulter humaner Kardiofibroblasten. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in 12-well- Zellkulturplatten kultiviert. Mittels Roti®Fect PLUS wurden 1.5µg des GFP-exprimierenden Plasmids pSIPO-GFP-R2 transfiziert. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch nach 72 Stunden. Die Transfektionsraten waren bei beiden Kulturen marginal.

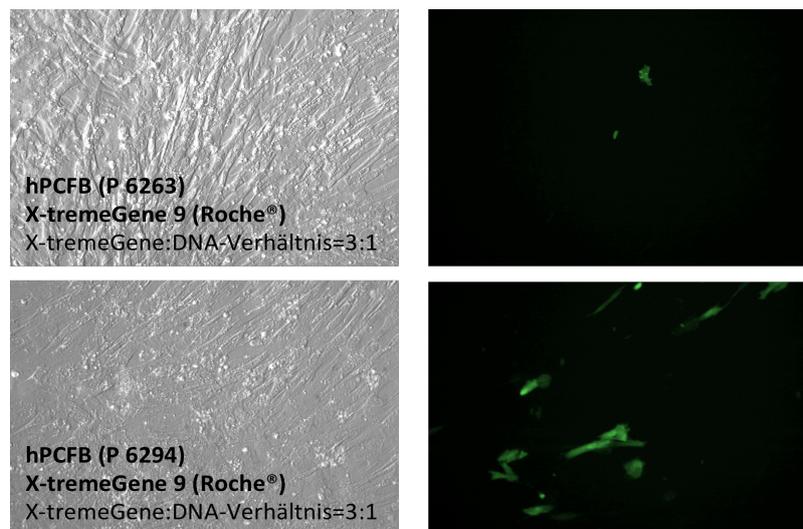


Abbildung 4.42: Transfektionsevaluierung adulter humaner Kardiofibroblasten. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in 12-well- Zellkulturplatten kultiviert. Mittels X-tremeGene 9 (Roche®) wurden 1.5µg des GFP-

exprimierenden Plasmids pSIPO-GFP-R2 transfiziert. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch nach 72 Stunden. Die Transfektionsraten waren bei beiden Kulturen marginal.

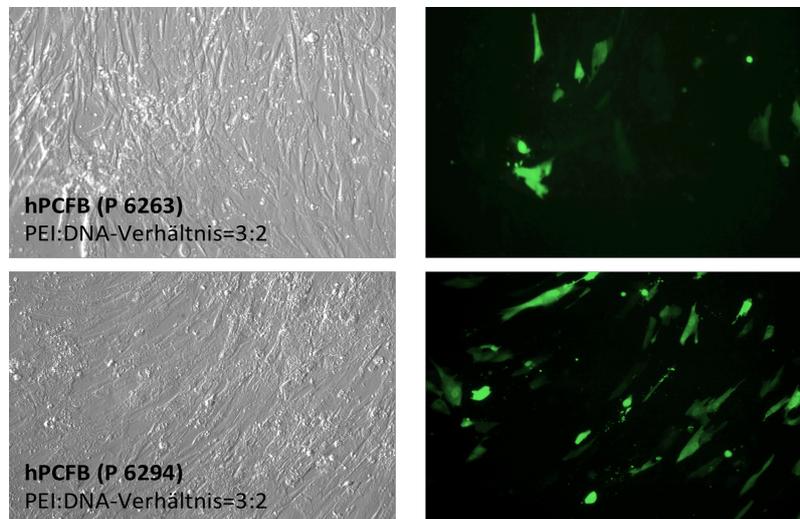


Abbildung 4.43: Transfektionsevaluierung adulter humaner Kardiofibroblasten. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in 12-well- Zellkulturplatten kultiviert. Mittels PEI wurden 1.5µg des GFP- exprimierenden Plasmids pSIPO-GFP-R2 im Verhältnis 3:2 transfiziert. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch nach 72 Stunden. Die Transfektionsrate lag bei etwa 5 % (P 6263) bzw. 14 % (P 6294).

4.5.4.1.2 Gentransfer durch Transduktion

Um die Effekte des RNAi- vermittelten CTGF- *silencing* in humanen Kardiofibroblastenkulturen untersuchen zu können, musste eine effektive und effiziente Transduktionsmethode für diese Zellen entwickelt werden.

Erfolgte der Transgentransfer unter Verwendung von 10^7 pfu des GFP- exprimierenden adenoviraler Vektor Ad5-CMV-GFP, war ohne Verwendung eines Transduktionenhancers keine Transgenexpression detektierbar (Abbildung 4.46). Um einen erfolgreichen Gentransfer zu gewährleisten, musste ein geeigneter Transduktionenhancer gefunden werden. Zunächst wurde die Gentransferrate unter Verwendung des kommerziell erhältlichen *Enhancers* TransMAX (Sirion) untersucht. Hier war zu beachten, dass das vom Hersteller vorgegebene Protokoll chargenspezifische Modifikationen enthielt, so dass eine gleichbleibende Anwendung nicht gewährleistet werden konnte. Zur Evaluation von TransMAX wurden Kardiofibroblasten eines Patienten mit Ad5-CMV-GFP unter Verwendung verschiedener Chargen des Enhancers transduziert. Dabei zeigte sich, dass die Transgenexpression und die Zellmorphologie in Abhängigkeit der verwendeten Charge variierten. Exemplarisch sind zwei Chargen dargestellt (Abbildung 4.44).

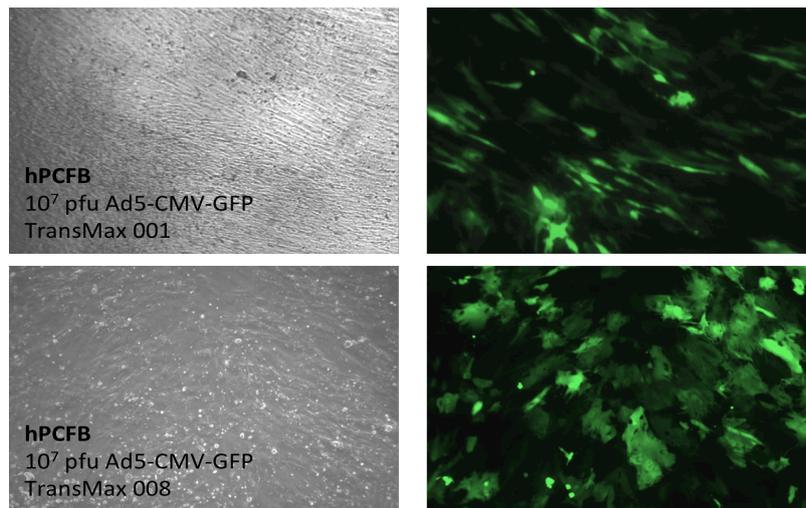


Abbildung 4.44: Transduktion humaner Kardiofibroblasten mittels TransMAX als Enhancer. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in 12-well- Zellkulturplatten kultiviert und mit 10^7 pfu Ad5-CMV-GFP unter Verwendung verschiedener Chargen TransMAX transduziert. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch nach 72 Stunden. Die Transfektionsrate lag bei etwa 15 % (TransMAX 001) bzw. 47 % (TransMAX 008).

Angesichts der Chargenheterogenität von TransMAX in humanen Kardiofibroblasten wurden als Permeabilisationsagens Natriumcaprate und als kationisches Polymer Polybrene (Hexadimethrinbromid) als weitere Transduktionsenhancer untersucht. Bei Natriumcaprate handelt es sich um das Natriumsalz einer mittelkettigen Fettsäure, welches durch öffnen der *tight junctions* die Vektoraufnahme vermitteln soll (Gregory *et al.*, 2003; Sakai *et al.*, 1997). Die Präinkubation der Zellen mit 30mM Natriumcaprate führte zum Ablösen der humanen Kardiofibroblasten, so dass keine weiteren Untersuchungen mit Natriumcaprate durchgeführt wurden.

Das kationische Polymer Polybrene soll die ladungsbedingte Abstoßung von Viruspartikel und Zelloberfläche reduzieren und wurde mit einer Konzentration von $8 \mu\text{g/ml}$ Zellkulturüberstand eingesetzt. Zur Optimierung der Transduktionsrate wurden verschiedene Zellkulturbedingungen getestet. Dabei zeigte sich, dass die Präinkubation der Zellen mit „Hungermedium“, also mit Medium ohne Zusatz von Serum, im Vergleich zu Vollmedium zu einer deutlich erhöhten Transgenexpression führte. Die Gentransferrate schien dabei unabhängig von der Zelldichte zu sein (Abbildung 4.45).

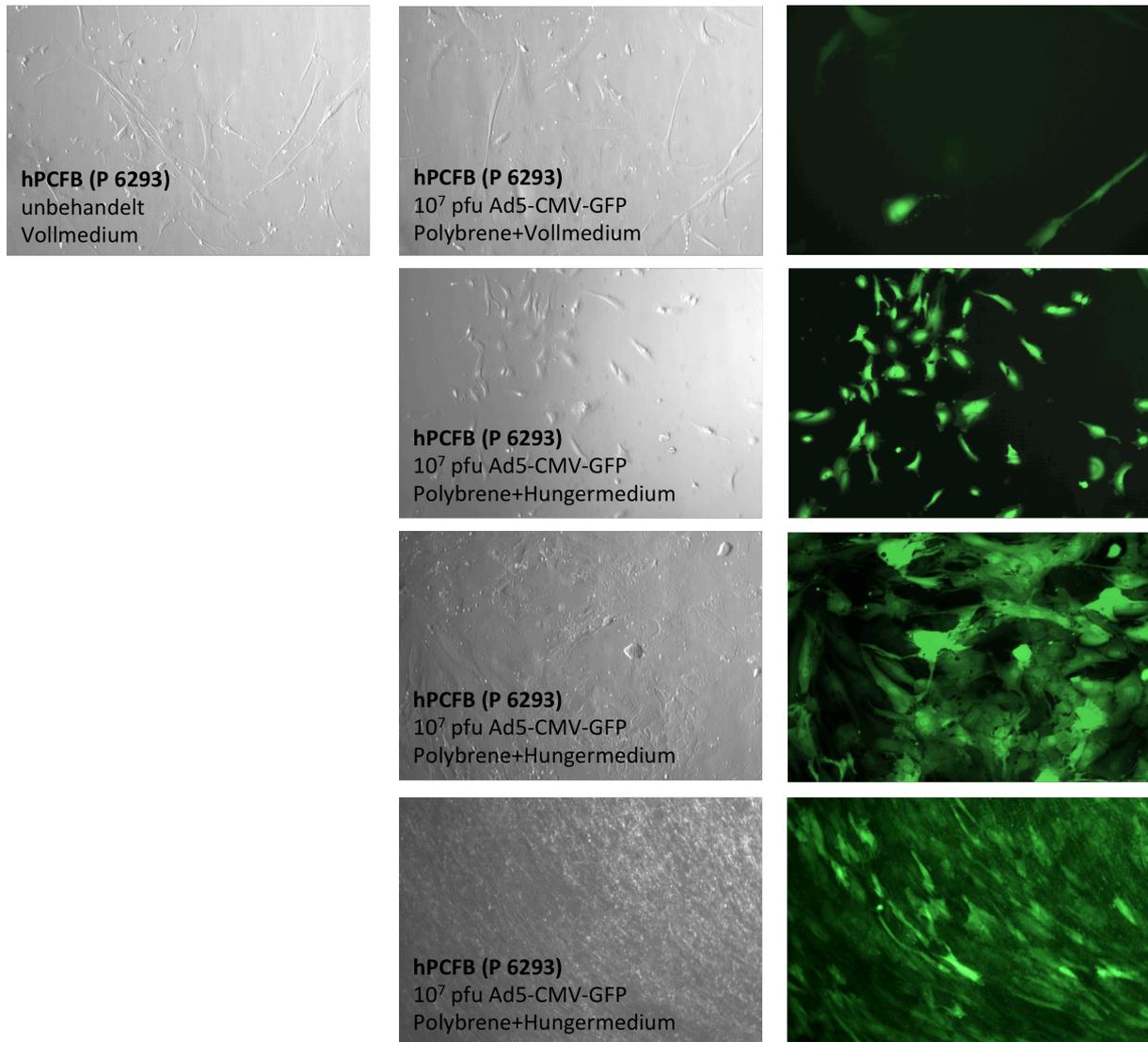


Abbildung 4.45: Transduktion humaner Kardiofibroblasten mittels Polybrene als Enhancer. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in 12-well- Zellkulturplatten kultiviert und mit 10⁷ pfu Ad5-CMV-GFP unter Verwendung von Polybrene und verschiedener Zellkulturbedingungen transduziert. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch nach 72 Stunden. Die Transfektionsrate war unabhängig von der Zelldichte und lag bei 89 % bis 95 %.

Der direkte Vergleich von TransMAX und Polybrene zeigte, dass unter Verwendung von Polybrene im Vergleich zu TransMAX eine deutlich bessere Transgenexpression detektiert werden konnte (Abbildung 4.46).

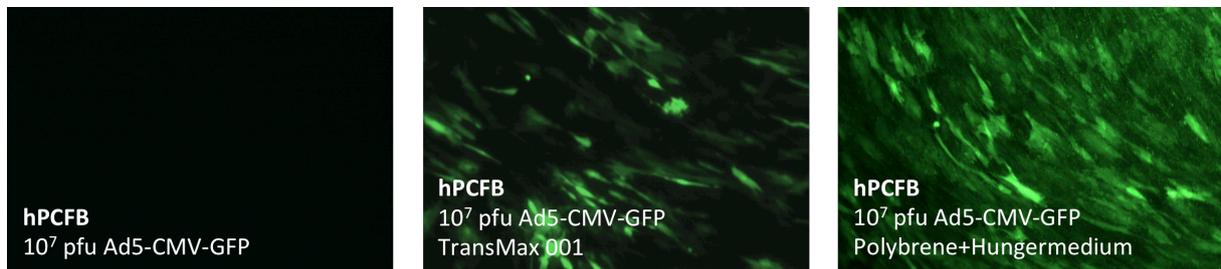


Abbildung 4.46: Vergleichende Darstellung der Transduktion von humanen Kardiofibroblasten unter Verwendung von Transduktionenhancern. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in 12-well- Zellkulturplatten kultiviert und mit 10^7 pfu Ad5-CMV-GFP unter Verwendung von Polybrene und verschiedener Zellkulturbedingungen der TransMAX transduziert. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch nach 72 Stunden.

4.5.4.2 Analyse der CAR-Expression bei murinen und humanen Kardiofibroblasten

Im Gegensatz zu murinen Kardiofibroblasten war bei humanen Kardiofibroblasten die Verwendung eines Transduktionenhancers notwendig, um einen effektiven Gentransfer mittels adenoviraler Vektoren zu gewährleisten. Da für die Aufnahme adenoviraler Vektoren der Rezeptor CAR essentiell ist, wurde dessen Expression bei beiden Zelltypen untersucht. Es zeigte sich, dass CAR bei humanen Kardiofibroblasten um 86.2 % ($p=0.0075$) geringer ist als bei murinen Kardiofibroblasten (Abbildung 4.47).

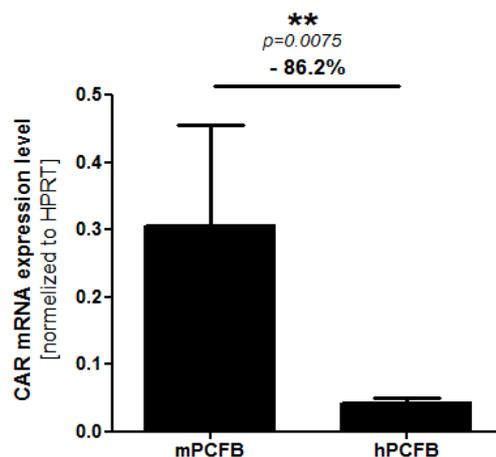


Abbildung 4.47: CAR- Expression bei murinen und humanen Kardiofibroblasten. Die Evaluierung wurde mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman[®]) durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen HPRT1 (*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1*) mit der Formel $2^{-\Delta Ct}$. Der Rezeptor CAR wird im Vergleich zu humanen Kardiofibroblasten bei murinen Kardiofibroblasten deutlich stärker exprimiert. $**p \leq 0.01$.

4.5.4.3 Gentherapeutisches RNAi- Silencing von CTGF bei individuellen Kardiofibroblastenkulturen von DCM- Patienten

Aufgrund der Sequenzübereinstimmung von shCTGF-B mit humanem CTGF wurden mit dem entsprechenden adenovirale Vektor individuelle Kardiofibroblastenkulturen von DCM- Patienten transduziert. Wie bereits in Abschnitt 4.5.4.1.2 beschrieben, war dies nur in Gegenwart eines Transduktionsenhancers erfolgreich. Dabei wurde mit Polybrene ein Enhancer gefunden, der zum Einen gute Transduktionsraten ermöglichte und zum Anderen von den sensiblen Kulturen toleriert wurde. Da eine Bestimmung der Zellzahl nicht möglich war, wurden die Kulturen bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 80 % für 7 Stunden mit serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurde dem Medium das Polykation Polybrene in einer Endkonzentration von 8 µg/ml zugesetzt und die Zellen mit 10^7 pfu Ad5-NCshRNA oder Ad5-shCTGF-B transduziert. Nach 24 Stunden erfolgte der Wechsel auf Vollmedium und nach weiteren 48 Stunden die Genexpressionsanalyse. Obwohl mittels eines GFP- exprimierenden Vektor für alle individuellen Kulturen eine hohe Transduktionseffizienz gezeigt werden konnte, war die CTGF- Repression eher heterogen (Abbildung 4.48). So zeigten 5 der 8 behandelten Kulturen ein starkes *Silencing* der CTGF- Genexpression. Die Kulturen der Patienten 6026 und 5959 reagierten eher mäßig. Die kardialen Fibroblasten des Patienten 5833 wiesen entgegen der Erwartung eine Induktion der CTGF- Expression auf.

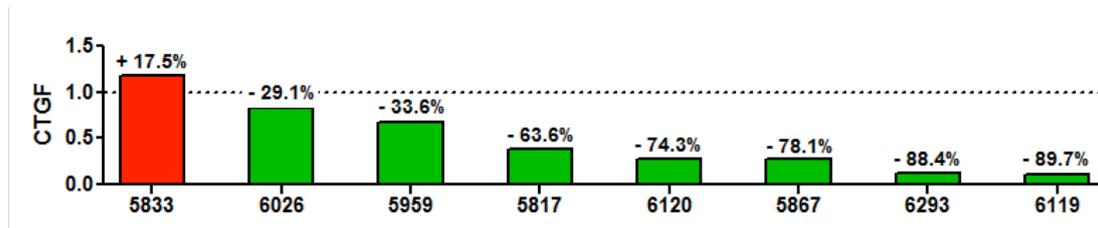


Abbildung 4.48: CTGF- Expression bei individuellen humanen Kardiofibroblastenkulturen nach Transduktion von Ad5-shCTGF-B. Die Evaluierung wurde mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman®) durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen HPRT1 (*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1*) mit der Formel $2^{-\Delta Ct}$. Trotz homogener Transduktionseffizienz stellte sich das CTGF- silencing heterogen dar.

Bei dem Patient 5833 wurde eine DCM im Endstadium mit massiver Dilatation des Herzens diagnostiziert, welche durch einen LVEDD (linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser) von 77 mm und einer linksventrikulären EF (Ejektionsfraktion) von 32 % bestimmt wurde (Abbildung 4.49). Für die Bewertung des LVEDD galten ein Normbereich von 38 bis 52 mm (Bereich zwischen den gepunkteten Linien) für Frauen und 42 bis 58 mm für Männer (grau hinterlegter Bereich) (Lang *et al.*, 2015). Bei den männlichen Patienten 5959 (62 mm) und 6119 (61 mm) sowie den weiblichen Patienten 6120 (58 mm), 5867 (55 mm) und 6293 (53 mm) lag der LVEDD über diesem Normbereich. Bei den Patienten 6026 (57 mm) und 5817 (58 mm) war der LVEDD im oberen Grenzbereich

angesiedelt (Abbildung 4.49 A). Alle Patienten wiesen als diagnostisches Kriterium eine EF von unter 55% auf (Maisch *et al.*, 2012) (Abbildung 4.49 B).

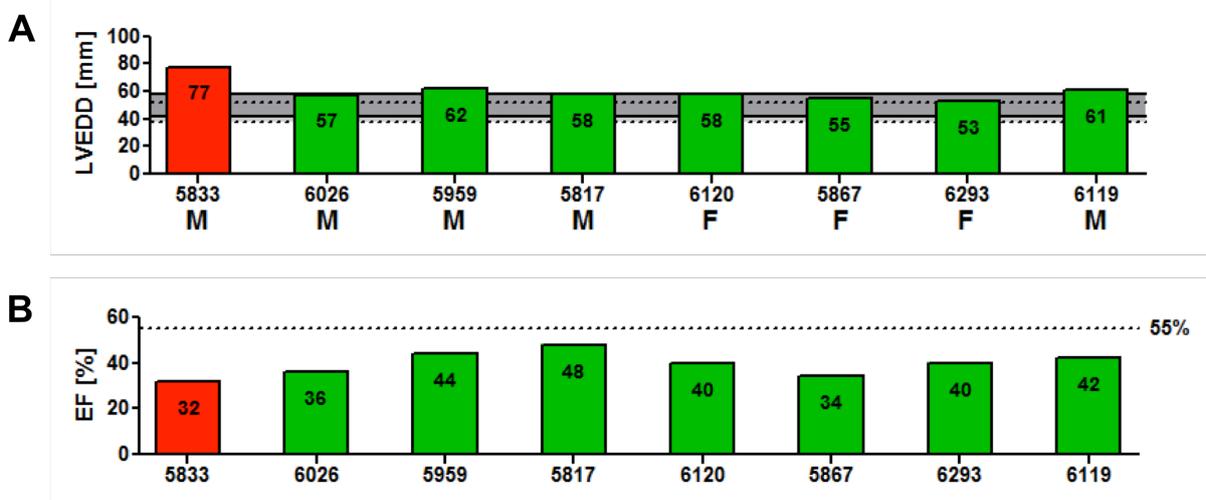


Abbildung 4.49 : Darstellung des LVEDD (A) und der EF (B) der humanen Kardiofibroblastenspender. Der Normbereich des LVEDD (linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser) wurde für Frauen mit 38 bis 52 mm (Bereich zwischen den gepunkteten Linien) und für Männer mit 42 bis 58 mm (grau hinterlegter Bereich) definiert (Lang *et al.*, 2015). Als diagnostisches Kriterium lag die EF (Ejektionsfraktion) unter 55 % (Maisch *et al.*, 2012). Der Patient 5833 wies eine massive Dilatation mit deutlich reduzierter EF auf.

Bei Betrachtung der Chemokinexpression zeigte sich, dass bei 6 der 7 Patientenkulturen, welche mit einer verminderten CTGF- Expression reagiert hatten, auch die Expression von Ccl2, Ccl7 und Ccl8 eine variable, meist aber starke Reduktion des mRNA- Levels aufwiesen. Die Fibroblasten des Patienten 6026 reagierte hingegen mit einer massiven Induktion der Chemokinexpression (Abbildung 4.50 A-C).

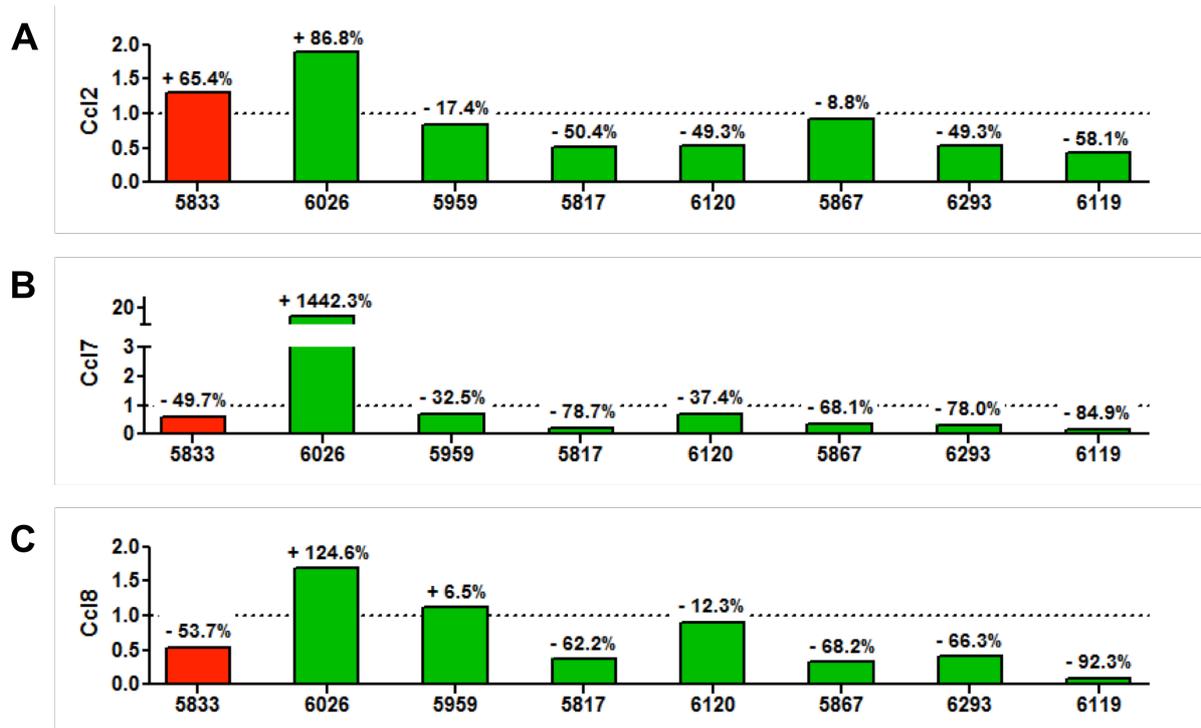


Abbildung 4.50: Ccl- Expression bei individuellen humanen Kardiofibroblastenkulturen nach Transduktion von Ad5-shCTGF-B. Die Evaluierung wurde mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman®) durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen HPRT1 (*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1*) mit der Formel $2^{-\Delta Ct}$. Bei 6 von 7 Patienten mit CTGF- *Silencing* wurde eine heterogene Reduktion der Ccl- Expression gezeigt.

Die Analyse der mRNA- Expression von Col1 α 2, Col3 α 1, Osteopontin, MMP2 und Cx43 zeigte eine sehr individuelle Reaktion auf die shRNA- vermittelte CTGF- Depletion (Abbildung 4.51 A-E). So reagierte Patient 6026 hier mit einer Reduktion, wohingegen Patient 6120 durchweg eine Induktion der Genexpression aufwies.

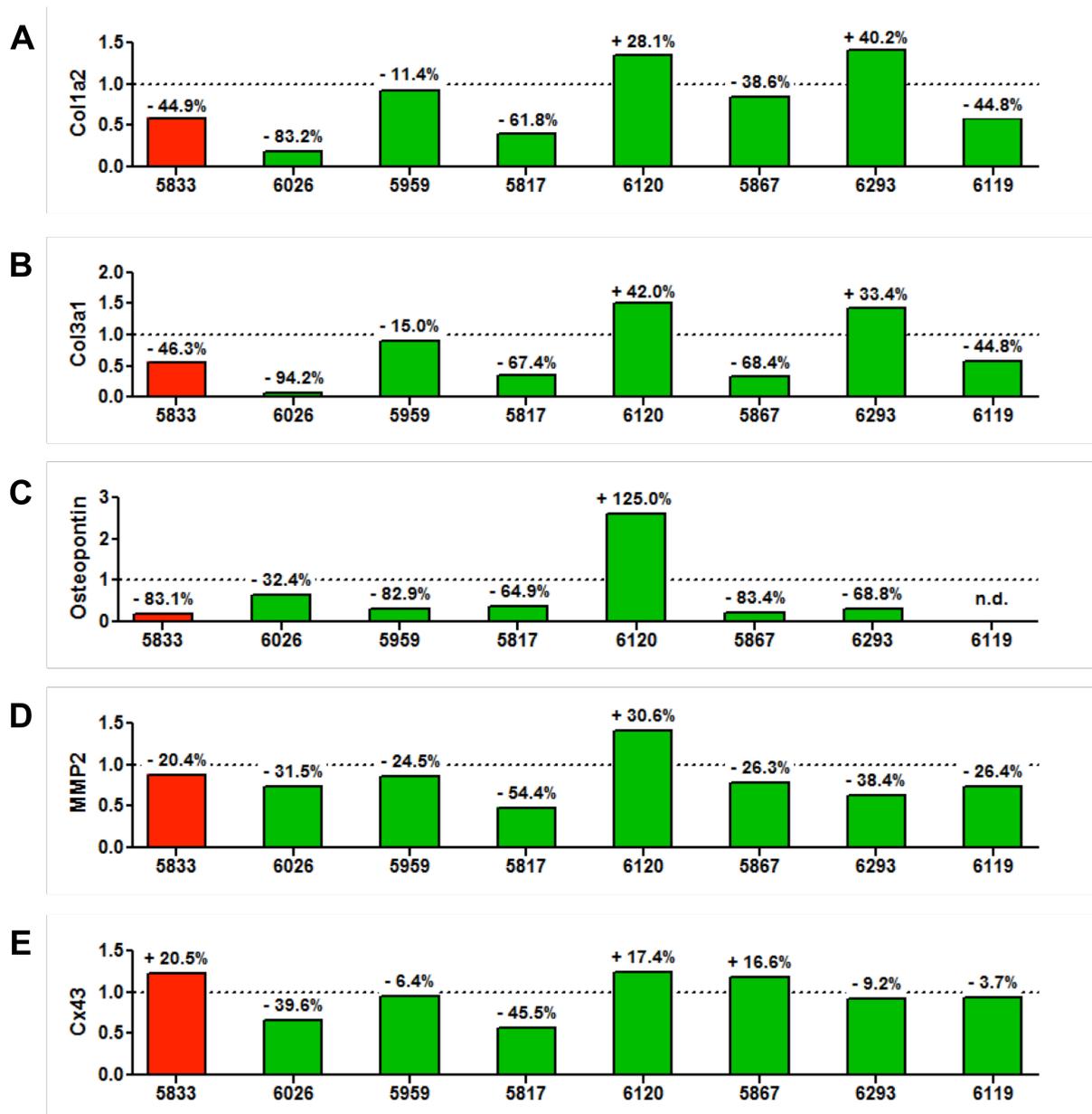


Abbildung 4.51: Expression von Col1a2, Col3a1, Osteopontin, MMP2 und Cx43 bei individuellen humanen Kardiofibroblastenkulturen nach Transduktion von Ad5-shCTGF-B. Die Evaluierung wurde mittels RT- qPCR und spezifischer Sonden (Taqman®) durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte gegen das housekeeping- Gen HPRT1 (*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1*) mit der Formel $2^{-\Delta Ct}$. Die Expressionsprofile stellten sich sehr individuell dar.

5 Diskussion

Fibrose ist ein häufiger Grund für Organversagen in vielen Erkrankungen. Es wird davon ausgegangen, dass etwa 45% aller Todesfälle in den Industrieländern mit chronischer Fibrose assoziiert sind (Wynn, 2008). Fibrotische Prozesse können z.B. durch eine vorhergehende Inflammation hervorgerufen werden, bei der Immunzellen die Transdifferenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten initiieren. Zytokine wie Interleukine oder TGF β 1 und Chemokine wie Ccl2 sowie Wachstumsfaktoren wirken dabei als Regulatoren (Wynn, 2008).

Im Gegensatz zu anderen Organen hat das Herz nach einer Schädigung nur eine limitierte Regenerationskapazität. Die Reparaturprozesse beinhalten unter anderem den Austausch nekrotischer Kardiomyozyten durch fibrotisches Narbengewebe, um so die strukturelle und funktionelle Integrität zu wahren. Kardiofibroblasten nehmen eine entscheidende Rolle bei der kardialen Antwort auf eine Schädigung ein, bei der auch eine inflammatorische Reaktion wesentlich ist. So werden nach einer Schädigung verschiedene proinflammatorische Zytokine und profibrotische Faktoren vermehrt exprimiert, welche die Transition vom Fibroblast zum Myofibroblast fördern (Kawaguchi *et al.*, 2011). In Folge sekretieren Myofibroblasten vermehrt Kollagene sowie andere ECM- Proteine und helfen, eine profibrotische Umgebung zu schaffen. Mit fortschreitender Narbenbildung nimmt die Reißfestigkeit der Kollagene zu (van den Borne *et al.*, 2010) und die Myofibroblasten zeigen mit der Expression des kontraktilen Proteins α -SMA neue phänotypische Eigenschaften (Calderone *et al.*, 2006; Tomasek *et al.*, 2002). Diese zunächst adaptiven Veränderungen können wiederum zu pathologischen Veränderungen wie Fibroblastenakkumulation und exzessiver Deposition von ECM- Proteinen führen, welche in Dilatation und kardiomyozytärer Hypertrophie, Apoptose und letztlich kongestiver Herzinsuffizienz resultieren (Baudino *et al.*, 2006; Cleutjens *et al.*, 1995; Cohn *et al.*, 2000, Travers *et al.*, 2016).

5.1 *Veränderte Expressionsmuster bei Mitgliedern der CCN- Familie in Folge von Kardiomyopathien*

Die Erstellung des Expressionsprofils anhand eines *FirstChoice* Human Total RNA Survey Panel (Ambion®) aus totaler RNA von 20 verschiedenen humanen Geweben zeigte, dass besonders die CCN- Mitglieder Cyr61, CTGF, Nov, WISP1 und WISP2 global exprimiert werden. Vor allem die Gene Cyr61 und CTGF fielen im Vergleich zu den übrigen CCN- Genen mit einer hohen Transkriptionsrate auf (Abbildung 4.1). Dies deutet ihre Schlüsselfunktion bei verschiedensten zellulären Funktionen wie der Proliferation und Differenzierung sowie der ECM- Synthese, inflammatorische und fibrotische Prozesse an (Chaour *et al.*, 2002).

Verschiedene Genexpressionsanalysen haben bereits Hinweise auf eine Deregulation der CCN-Mitglieder bei vielen Erkrankungen gegeben, welche mit chronischer Inflammation und reparativen Prozessen assoziiert sind (Jun and Lau, 2011). Die vermehrte Expression von CTGF bei humaner Herzinsuffizienz und auch in verschiedenen Tiermodellen scheint dabei mit myokardialer Fibrose assoziiert zu sein (Chuva de Sousa Lopes *et al.*, 2004; Koshman *et al.*, 2013). Expressionsanalysen von Endomyokardbiopsien humaner Patienten mit Kardiomyopathie haben gezeigt, dass neben CTGF auch andere Gene der CCN-Familie vermehrt transkribiert werden (Wittchen *et al.*, 2007). Bei der differenzierten Untersuchung der CCN-Expression bei Myokardinfarkt und CVB3-Myokarditis stellten sich Unterschiede im Expressionsmuster heraus (Tabelle 5.1). So wurden im murinen Myokardinfarktmodell CTGF, WISP1 und WISP2 signifikant induziert, wohingegen die WISP3-Transkription abnahm (Abbildung 4.2). Für Cyr61 und Nov konnte in diesem Modell und auch bei der CVB3-induzierten Myokarditis keine Veränderung festgestellt werden (Abbildung 4.3). Eine deutliche Induktion von CTGF und WISP2 war hier ebenfalls feststellbar. Anders als beim Myokardinfarkt zeigte WISP1 eine mäßige Induktion. Bei den Endomyokardbiopsien der Patienten mit Kardiomyopathie zeigten bis auf WISP3 alle CCN-Mitglieder eine vermehrte Expression.

Tabelle 5.1: Zusammenfassende Darstellung der CCN-Expression unter pathologischen Bedingungen *in vivo*

	MI	CVB3- Myokarditis	Humane DCM
Cyr61	∅	∅	↑
CTGF	↑	↑	↑
Nov	∅	∅	↑
WISP1	↑	↗	↑
WISP2	↑	↑	↑
WISP3	↓	n.d.	∅

∅= keine Veränderung; ↑= starke Induktion; ↗= mäßige Induktion; ↓= Suppression; n.d.= nicht detektierbar

Um das Expressionsmuster der CCN-Mitglieder besser verstehen zu können, darf der Ablauf der Wundheilung und Gewebereparatur nicht außer Acht gelassen werden. Dieser Prozess kann in drei Phasen unterteilt werden. Nach einer initialen Inflammation folgt die Bildung von granulärem Gewebe sowie die Deposition von ECM und schließt mit Matrixremodeling und Auflösung des granulären Gewebes ab (Gurtner *et al.*, 2008). Am Ort der Schädigung differenzieren aktivierte Fibroblasten zu Myofibroblasten, welche proliferieren und ECM-Proteinen exprimieren um den Heilungsprozess zu unterstützen und die Gewebeintegrität während der Reparatur zu gewährleisten.

Kommt es zu einer exzessiven ECM- Produktion, führt dies zu Fibrose, Vernarbung und Verlust der Gewebefunktion. Fibrotische Prozesse werden durch chronische Inflammation oder Gewebeschädigung gefördert und bestimmen das pathologische Erscheinungsbild vieler chronischer Erkrankungen (Stramer *et al.*, 2007). Verschiedene Studien weisen auf pro- oder antifibrotische Eigenschaften der CCN- Mitglieder hin. So wird CTGF generell bei Fibrose vermehrt exprimiert. Da die Höhe des CTGF- Level im Serum und anderen Körperflüssigkeiten mit der Schwere der Fibrose korreliert, kann dies durchaus als nicht- invasiver Marker für fibrotische Veränderungen genutzt werden (Leask *et al.*, 2009; Phanish *et al.*, 2010). Es fällt aber immer wieder auf, dass eine Überexpression von CTGF allein nicht ausreicht, um eine Fibrose auszulösen, die fibrotische Reaktion in Folge einer Verletzung dann aber deutlich stärker ausfällt (Sonnyal *et al.*, 2010). Eine Deletion von CTGF kann wiederum das Entstehen von Fibrose verhindern (Liu *et al.*, 2011).

Über die Funktion von WISP1 ist wenig bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Mitglied der CCN- Familie bei Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose und auch im Mausmodell der Bleomycin- induzierten pulmonalen Fibrose vermehrt exprimiert wird. Außerdem fördert rekombinantes WISP1 die ECM- Deposition in humanen Fibroblasten (Königshoff *et al.*, 2009).

WISP1 schien weniger mit einer akuten, virusinduzierten Inflammation als mit dem akuten Krankheitsbild des Myokardinfarktes und subakuten oder chronischen Kardiomyopathien assoziiert zu sein. Auch bei der Expressionsanalyse humaner Endomyokardbiopsien wurde eine positive Deregulation von WISP1 und den übrigen Mitgliedern der CCN- Familie bei Patienten mit DCM detektiert (Abbildung 4.4). Die positive WISP1- Deregulation könnte für eine Funktion in Folge einer akuten Gewebeschädigung sprechen, in deren Verlauf es auch zu einer Inflammation kommen könnte. Somit wäre es denkbar, dass WISP1 bei einer initialen Inflammation zunächst eine untergeordnete Rolle spielt, aber durchaus an den folgenden Prozessen beteiligt ist. So induziert WISP1 die Expression des Zytokins IL6 (Hou *et al.*, 2013), welches regulatorisch auf das Zellwachstum, Apoptose, Differenzierung und Zellüberleben im Herzen wirkt und im Myokard die Interaktion von Fibroblasten und Myozyten fördert (Banerjee *et al.*, 2009). Über einen JAK- STAT- Signalweg kann IL6 kardiale Hypertrophie bedingen, Infarktfolgen reduzieren und den ECM- Umsatz unterstützen (Coles *et al.*, 2007; Souders *et al.*, 2009; Tsuruda *et al.*, 2004). In diesem Zusammenhang konnte bei Korrelationsanalysen von CTGF und WISP1 sowie verschiedenen Zytokinen jeweils eine starke Korrelation gezeigt werden (Abbildung 4.6 und Abbildung 4.12).

Im Gegensatz zu den profibrotischen Eigenschaften von CTGF und WISP1 wurden für Cyr61 fibroseindämmende Funktionen beschrieben, indem es die Seneszenz von Myofibroblasten induziert (Jun and Lau, 2010). Während der Wundheilung akkumuliert Cyr61 zunächst im granulären Gewebe, um ab einem bestimmten Level die Seneszenz der Myofibroblasten zu induzieren und so den Abbau des granulären Gewebes und das ECM- *Remodeling* zu ermöglichen. Dabei werden MMPs

vermehrt und Kollagen 1 reduziert exprimiert. Wird Cyr61 inhibiert, kommt es zu exzessiver Fibrose. Bei Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie wurde eine vermehrte Expression von Cyr61 beobachtet. Der Transfer dieser Überexpression in ein transgenes Mausmodell zeigte einen milderen Verlauf bei einer Autoimmunmyokarditis, da die Infiltration von Makrophagen und Lymphozyten ins Myokard verringert war (Rother *et al.*, 2010).

Die antifibrotischen Eigenschaften von Nov und WISP2 scheinen durch andere Mechanismen vermittelt zu werden. So supprimiert Nov *in vitro* die Expression von CTGF und Kollagen 1 in mesangialen Zellen (Riser *et al.*, 2009) und inhibiert die Proliferation von *smooth muscle* Zellen (Shimoyama *et al.*, 2010). WISP2 wurde als Gegenspieler von CTGF beschrieben (Xu *et al.*, 2015a, 2015b; Yoon *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014). Daher ist es denkbar, dass WISP2 aufgrund seiner antifibrotischen und migrationsinhibierenden Eigenschaften zum Ausgleich der profibrotischen und proinflammatorischen Eigenschaften von CTGF ebenfalls vermehrt transkribiert wird und es so zu einer hoch signifikanten Korrelation beider Gene bei Patienten mit Kardiomyopathie kommt (Abbildung 4.6). Wird WISP2 überexprimiert, reduziert dies durch die Inhibition des TGF β 1- SMAD-Signalweges die CTGF- induzierte kardiale Hypertrophie und Fibrose in transgenen Mäusen (Yoon *et al.*, 2010). Dies führt zu der Überlegung, dass WISP2 und CTGF entgegengesetzte Funktionen erfüllen. WISP2 ist das einzige CCN- Mitglied, dem die CT- Domäne fehlt. Wird bei CTGF diese Domäne deletiert, verhält es sich wie WISP2. Durch die Fusion der CT- Domäne an WISP2 zeigt dieses wiederum Eigenschaften des CTGF. Somit scheinen die profibrotischen Eigenschaften des CTGF durch die CT- Domäne vermittelt zu werden.

Mit Ausnahme von WISP3 besteht auch bei den übrigen Mitgliedern eine Korrelation mit der CTGF- Expression. Dies macht deutlich, dass es zwischen allen Mitgliedern dieser Genfamilie ein Zusammenspiel gibt und sie bei pathologischen Veränderungen während einer Kardiomyopathie gleichermaßen positiv dereguliert werden (Abbildung 4.6).

Zusammenfassend besteht die CCN-Familie aus den antifibrotisch agierenden Cyr61, Nov und WISP2 und den profibrotischen CTGF und WISP1. Für WISP3 wurden bisher keine Funktionen bei Inflammation und Fibrose gezeigt. Die Gegensätzlichen Eigenschaften der CCN- Proteine machen deutlich, wie wichtig eine spezifische Manipulation ist, um den Verlauf pathologischer Veränderungen positiv zu beeinflussen. Da CCN- Proteine bei einer Inflammation oder Gewebeschädigung vermehrt exprimiert und oft dereguliert sind, wenn diese Prozesse chronifizieren, stellen sie vielversprechende Ziele von therapeutischen Ansätzen dar.

5.2 CTGF als therapeutisches Target bei Kardiomyopathien

Die Mitglieder der matrizellulären CCN- Familie besitzen aufgrund ihres modularen Aufbaus und dem umfangreichen Spektrum von inter- und intrazellulären Interaktionen ein weites Wirkungsspektrum (Holbourn *et al.*, 2008). So steuern sie die embryonale und postnatale Entwicklung und regulieren eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie Mitogenese, Migration und Chemotaxis oder Wundheilung (Brigstock *et al.*, 2003). Des Weiteren übernehmen die CCN- Proteine unter pathologischen Bedingungen wie Inflammation, Fibrose und Krebs wichtige Schlüsselfunktionen (Jun and Lau, 2011; Kubota and Takigawa, 2013; Wells *et al.*, 2015). So sind sie in der Lage, Zelloberflächenrezeptoren und deren Antwort auf Zytokine, Wachstumsfaktoren und Proteine der ECM zu modulieren (Leask and Abraham, 2006b).

CTGF ist seit der Erstellung von kardialen Expressionsprofilen humaner Kardiomyopathie- Patienten als therapeutisches Target in den Fokus gerückt (Jun and Lau, 2011; Wittchen *et al.*, 2007). Des Weiteren wurde seine zentrale Rolle bei der Fibrose in verschiedenen murinen Modellen zur renalen, pulmonalen und Multiorganfibrose herausgestellt (Wang *et al.*, 2011). Es wird angenommen, dass CTGF eine pathologische Rolle bei mit Fibrose, Inflammation und Remodeling assoziierten vaskulären Erkrankungen einnimmt (Ponticos, 2013). Multivariante statistische Analysen weisen darauf hin, dass die Expression von CTGF ein bestimmender Faktor bei der Expression verschiedener anderer inflammations- und fibroseassoziiierter Gene ist (Tank *et al.*, 2014).

5.2.1 CTGF als profibrotischer und proinflammatorischer Faktor

Auch die Korrelationsanalyse der CTGF- mRNA- Expression mit dem mRNA- Level verschiedener anderer Gene in Endomyokardbiopsien von DCM- Patienten, für welche Funktionen bei pathologischen Gewebeveränderungen beschrieben wurden, hat gezeigt, dass die CTGF- Expression zur Expression einiger der quantifizierten Gene in einem moderaten oder starkem Zusammenhang steht, zu anderen hingegen eine signifikant mäßige oder schwache Korrelation zu bestehen scheint. Diese Art der Analyse kann jedoch keine Aussage über die Art des Zusammenhangs geben. Also ist hier noch unklar, ob CTGF die korrelierten Gene beeinflusst oder umgekehrt oder ob eine dritte Variable eine Rolle spielt.

Die Korrelationsanalyse ergab sowohl für Col1a1 als auch für Col3a1 eine hochsignifikant starke Korrelation zur mRNA- Expression von CTGF (Abbildung 4.7). Die Kollagene des Typs 1 und 3 stellen die Hauptkomponenten der ECM im Myokard dar (Weber *et al.*, 1994). Kommt es zu einer pathophysiologischen Zunahme des Kollagengehaltes und somit zu einer zunehmenden Versteifung des Gewebes, spricht man von Fibrose (Gilbane *et al.*, 2013; McKleroy *et al.*, 2013). Die verminderte Pumpleistung des Herzens ist dabei mit einer vermehrten CTGF- Expression assoziiert (Abbildung

4.14). Dies verdeutlicht, dass die Extrazelluläre Matrix (ECM) bei Kardiomyopathien eine essentielle Rolle spielt, da hier die fibrotischen Umbauprozesse stattfinden. An diesen Umbauprozessen sind Matrixmetalloproteasen und TIMPs als deren Inhibitoren wesentlich beteiligt (Li *et al.*, 1998). Dabei spaltet die Kollagenase MMP1 zunächst Kollagenfilamente in Gelatinfragmente, welche dann durch MMP2 und MMP9 weiter degradiert werden. Des Weiteren sind MMP2 und MMP9 in der Lage, den proteasesensiblen Linker der CCN- Proteine proteolytisch zu spalten (Hashimoto *et al.*, 2002). Im Myokard wird die Aktivität der MMPs hauptsächlich durch TIMP4 als Inhibitor gesteuert (Li *et al.*, 1998). Daher wurde die mRNA- Expression von MMP1, MMP2, MMP9 und TIMP4 in Endomyokardbiopsien erfasst und mit der Expression von CTGF in Korrelation gesetzt (Abbildung 4.8). In Bezug auf die MMPs konnte lediglich ein schwacher bis moderater Zusammenhang festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich aber eine deutlich positive Korrelation mit TIMP4. Das legt nahe, dass eine vermehrte CTGF- Transkription mit der TIMP4- Expression gekoppelt ist und TIMP4 so ebenfalls vermehrt exprimiert wird.

Da CTGF die fibroseassoziierte Deposition von ECM fördert (Leask *et al.*, 2009), wäre eine positiv gekoppelte MMP- Expression nur bedingt zielführend, da dann die produzierten kollagenösen Komponenten sofort wieder degradiert werden würden. Jedoch darf die Funktion der MMPs beim Umbau der ECM und damit bei der Veränderung der ECM- Zusammensetzung nicht vernachlässigt werden. Zwar gibt es keinen deutlichen Zusammenhang mit der Expression von CTGF, dies trifft aber keine Aussage über die Aktivierung von MMPs durch die Abspaltung des Propeptids von pro-MMPs (Nagase and Woessner, 1999). Die gleichzeitig vermehrte Expression von TIMP4 unterstützt hingegen den Bestand der ECM, da es die Aktivität von MMPs im Myokard inhibiert. Die unter physiologischen Bedingungen bestehende Homöostase wird aufgehoben. An diesem Punkt wird deutlich, dass eine verminderte CTGF- Expression einer exzessiven ECM- Synthese und damit Fibrose entgegenwirken könnte.

Als wesentlicher Bestandteil von homo- und heterogenen Zell- Zell- Interaktion von Kardiofibroblasten und Kardiomyozyten wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Membranprotein Connexin 43 und CTGF analysiert (Abbildung 4.9). Der Spearman- Koeffizient war negativ, d.h. je weniger CTGF- mRNA detektiert wurde, desto höher war der Wert für Cx43 und umgekehrt. Das *gap junction* Protein Connexin 43 ermöglicht die Weiterleitung eklektischer, chemischer und mechanischer Signale (Camelliti *et al.*, 2005; Gaudesius *et al.*, 2003). In neonatalen Kardiomyozyten und Fibroblasten der Ratte wurde eine Induktion der Cx43- Expression durch rekombinantes CTGF gezeigt (Adam *et al.*, 2010). Die negative Korrelation ist mit der von Adam *et al.* beschriebenen Induktionsbeobachtung in neonatalen kardialen Rattenzellen nicht konform. Vielmehr ist es denkbar, dass durch die zunehmende ECM- Deposition Zell- Zell- Kontakte über *gap junctions* aufgelöst und verhindert werden, da es zu einer räumlichen Entfernung der Zellen kommt. So konnte

Mueller *et al.* zeigen, dass es bei Herzinsuffizienz zu einer Zerstörung der normalen Impulskopplung kommt (Mueller *et al.*, 2011). Die Größe des fibrotischen Bereichs im Myokard ist eng mit einem erhöhten Risiko von Arrhythmien und plötzlichen Herztod assoziiert (Assomull *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2006). Bei der Myokardfibrose kommt es einerseits zum Austausch von geschädigten Myozyten durch fibrotisches Gewebe, zum Anderen werden noch intakte Myozyten durch eine exzessive ECM- Deposition voneinander isoliert. So werden Arrhythmien induziert, da eine synchronisierte Kontraktion nicht mehr gewährleistet wird. Außerdem werden Kardiomyozyten von einer ausreichenden Sauerstoff- und Nährstoffversorgung abgeschnitten, so dass es zur Apoptose und einer weiteren Ausbreitung der Fibrose führt (Miragoli *et al.*, 2006, 2007). Daran sind Proteine wie Caspase 3 wesentlich beteiligt, so dass eine vermehrte CTGF- Expression mit einer vermehrten Transkription von Caspase 3 zusammenzuhängen scheint (Abbildung 4.13). In Folge der myokardialen Umbauprozesse erfolgt eine negative Regulation der Expression von *gap junction* Proteinen (Trayanova *et al.*, 2014).

Die Kommunikation von kardialen Fibroblasten mit kardialen Myozyten kann auch parakrin über die Sekretion von verschiedener Wachstumsfaktoren und Zytokinen wie IL6, TNF α oder TGF β 1 erfolgen (Kakkar and Lee, 2010). Eine akute oder chronische Schädigung des Myokards kann mit einer inflammatorischen Reaktion assoziiert sein (Frangogiannis *et al.*, 2007; Mehta and Li, 1999). Kardiale Fibroblasten erfüllen dabei wichtige Funktionen und steuern unter anderem die Rekrutierung von Immunzellen an den Ort der Gewebeerletzung. Leiden Patienten unter einer Kardiomyopathie, ist dies oft von myokardialen inflammatorischen Prozessen begleitet. Diese Inflammation ist dabei mit dem Grad der fibrotischen Veränderungen im Herzen assoziiert (Westermann, 2012). Auch in verschiedenen Formen der Herzinsuffizienz wie der akuten viralen Myokarditis oder Herzinsuffizienz mit normaler EF und diastolischer Dysfunktion konnte ein Zusammenhang zwischen Inflammation und Fibrose gezeigt werden (Escher *et al.*, 2011; Papageorgiou and Heymans, 2012; Westermann *et al.*, 2011b). So wird im Verlauf einer kardialen Erkrankung die inflammatorische Zytokinantwort aktiviert, was wiederum das Fortschreiten dilatativer Prozesse begünstigt und linksventrikuläre Dysfunktion und Herzinsuffizienz schreiten weiter voran (Knuefermann *et al.*, 2004). Daher wurde auf mRNA- Ebene die Korrelation dieser Zytokine mit CTGF analysiert (Abbildung 4.12). Bei allen zeigte sich eine hohe Signifikanz des Korrelationskoeffizienten. Im Einzelnen ergab sich für IL4, IL6, IL10 und TNF α eine moderate Korrelation mit CTGF und zwischen der mRNA- Expression von TGF β 1 und CTGF war nach Spearman eine starke Korrelation nachweisbar. Zytokine wie IL6 scheinen bei der myokardialen Funktion und Kardioprotektion von Bedeutung zu sein (Hirota *et al.*, 1995, 1999; Kamimura *et al.*, 2003; Lévy, 2006). So zeigten Studien mit Ratten, dass die konstante Stimulation des IL6- Rezeptors α die Größe eines Infarktes reduzieren kann und gegen Apoptose schützt (Heineke and Molkenin, 2006). Patienten mit Herzinsuffizienz zeigen im Blutkreislauf hohe Werte dieser Zytokine

(Nian *et al.*, 2004). IL4 werden beim kardialen *Remodeling* profibrotische Eigenschaften zugeschrieben (Kanellakis *et al.*, 2012; Roselló-Lletí *et al.*, 2007). Dabei kann es sowohl die TGF β 1-Expression induzieren als auch direkt auf Fibroblasten wirken und diese zur Kollagenproduktion veranlassen (Aoudjehane *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2004). Bei IL6 handelt es sich um ein von T- Zellen, Makrophagen, Skelettmuskelzellen und Fibroblasten produziertes proinflammatorisches Zytokin (Feghali and Wright, 1997). Es erfüllt Aufgaben bei Inflammation, zellulärer Differenzierung und Fibrose. Bei Patienten mit systemischer Sklerose korrelieren erhöhte IL6-Spiegel mit einer schlechteren Langzeitprognose. Daher IL6 wird als prognostischer klinischer Biomarker bei Patienten mit ähnlichen Erkrankungen eingesetzt (Khan *et al.*, 2012). IL6 kann Zellwachstum, Apoptose, Differenzierung und Zellüberleben im Herzen regulieren und fördert die Interaktion von Fibroblasten und Myozyten im Myokard (Banerjee *et al.*, 2009). Über einen JAK- STAT- Signalweg kann IL6 kardiale Hypertrophie bedingen, Infarktfolgen reduzieren und den ECM- Umsatz unterstützen (Coles *et al.*, 2007; Souders *et al.*, 2009; Tsuruda *et al.*, 2004). Ebenso wie IL6 kann TGF β 1 Zellproliferation, Differenzierung, Migration, Apoptose und ECM- Produktion induzieren. In Fibroblasten induziert TGF β 1 die Synthese von Fibronectin, Kollagen, Proteoglykan und CTGF. Des Weiteren veranlasst es die Umwandlung von Fibroblasten in Myofibroblasten (Eghbali *et al.*, 1991; Heimer *et al.*, 1995; Verrecchia *et al.*, 2001; Villarreal *et al.*, 1996). TNF α wird bei Gewebeschädigung lokal verstärkt exprimiert und es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen dem TNF α - Plasmalevel und der Progression von linksventrikulärem *Remodeling* bzw. Herzinsuffizienz (Torre-Amione *et al.*, 1996a, 1996b). IL10 kann wiederum die Synthese von TNF α inhibieren (de Waal Malefyt *et al.*, 1991).

Auch eine Chemokin- induzierte Rekrutierung von zirkulierenden Leukozyten ins Myokard durch die Interaktion mit deren Chemokinrezeptoren stellt einen kritischen Schritt bei der Entwicklung einer Inflammation dar. Daher wurde die Expression verschiedener Chemokine und Chemokinrezeptoren im Myokard auf mRNA- Ebene gemessen und deren Korrelation mit CTGF analysiert (Abbildung 4.10). Dabei stellte sich jeweils ein hochsignifikanter, moderater Zusammenhang zwischen den Chemokinrezeptoren CCR5 und CCR6 sowie CTGF heraus. Die Chemokine Ccl7 und Ccl20 wiesen lediglich eine signifikant schwache Korrelation auf.

Kardiale Reparaturprozesse hängen von regulatorischen Mechanismen ab, welche die inflammatorische Reaktion unterdrücken und eine exzessive Matrix- Degradation verhindern. Durch einen CCR5- vermittelten Signalweg kann einer unkontrollierten Entzündung verhindert werden und unerwünschtem *Remodeling* vorgebeugt werden (Dobaczewski *et al.*, 2010). Da Chemokinrezeptoren primär von Immunzellen exprimiert werden, deutet die mögliche Korrelation der Chemokinrezeptoren die vermehrte Immunzellinfiltration im Zusammenhang mit einer erhöhten CTGF- Transkription an und kann durch die Assoziation von Fibrose und Inflammation erklärt werden.

Das Immunsystem spielt so eine signifikante Rolle bei ventrikulären Umbauprozessen (Aukrust *et al.*, 2001; Caforio *et al.*, 2007; Diwan *et al.*, 2003).

Bei der Weiterleitung extrazellulärer Signale zum Nukleus spielt unter anderem der JAK- STAT- Signalweg eine große Rolle. Er vermittelt so die Transkription von Genen, welche an der Immunantwort, Proliferation, Differenzierung oder Apoptose beteiligt sind. Die drei Hauptkomponenten dieses Signalweges sind ein Zelloberflächenrezeptor, eine Janus Kinase (JAK) sowie einem *signal transducer and activator of transcription* (STAT) Protein (Aaronson and Horvath, 2002). Im Herz sowie kultivierten Kardiomyozyten und Kardiofibroblasten werden u.a. STAT1, STAT2, STAT3, STAT4 und STAT5 exprimiert (Boengler *et al.*, 2008; Xuan *et al.*, 2001). Die Korrelationsanalyse der verschiedenen Komponenten des JAK- STAT- Signalweges und CTGF zeigte bei allen untersuchten Komponenten eine hoch signifikante positive moderate bis starke Korrelation (Abbildung 4.11). Die Signalkaskade kann unter anderem von IL6 und IL10 aktiviert werden (Dostal *et al.*, 1997). Mechanischer Stretch und Hypertonus (Booz *et al.*, 2002; Pan *et al.*, 1997), Myokardinfarkt (Krishnamurthy *et al.*, 2009) und Angiotensin II- Behandlung (Marrero *et al.*, 1995) können den JAK- STAT- Signalweg aktivieren. Des Weiteren wurden bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) im Endstadium Veränderungen im JAK- STAT- Signalweg festgestellt (Podewski *et al.*, 2003). Über eine Verbindung des Signalweges mit CTGF ist bisher wenig bekannt. In STAT3- knock out- Mäusen wurde eine erhöhte CTGF- Expression gezeigt (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2004). Dies deutet darauf hin, dass der JAK- STAT- Signalweg eine Kontrollfunktion bei der CTGF- Expression einnehmen könnte. Die Arbeit von Tao *et al.* deutet auf eine gegenseitige Beeinflussung der CTGF- Expression durch JAK- STAT hin (Tao *et al.*, 2010). So könnte bei der Wirkung von CTGF auch eine vermittelnde Funktion von JAK- STAT bestehen.

5.3 Adulte kardiale Fibroblasten als Schlüssel bei der Behandlung von Kardiomyopathien

Das Myokard besteht speziesabhängig aus Kardiomyozyten und bis zu 70% anderer Zelltypen, zu denen Kardiofibroblasten, Endothelzellen und *smooth muscle cells* zählen (Banerjee *et al.*, 2007; Baudino *et al.*, 2006; Camelliti *et al.*, 2005; Nag, 1980; Souders *et al.*, 2009; Zak, 1974). Kardiofibroblasten machen dabei 2/3 die Zellpopulation aus, wohingegen Myozyten 2/3 des Myokardvolumens einnehmen (Camelliti *et al.*, 2005). Bisher haben sich zahlreiche Arbeiten eher auf Kardiomyozyten und im Speziellen auf die Kalziumhomöostase konzentriert, welche bei Herzinsuffizienz verschiedener Ätiologien gestört zu sein scheint (Hill and Olson, 2008; Koitabashi and Kass, 2012; Kranias and Hajjar, 2012). Unter physiologischen Bedingungen sorgen kardiale Fibroblasten für die Homöostase der ECM, welche als strukturelles Gerüst für Kardiomyozyten dient,

mechanische Kräfte im Myokard verteilt und die Weiterleitung der elektrischen Reize vermittelt (Camelliti *et al.*, 2005; Porter and Turner, 2009; Souders *et al.*, 2009).

Da Fibroblasten und Myozyten den wesentlichen Anteil des Myokards stellen, sollte festgestellt werden, welcher dieser Zelltypen für die hauptsächliche Produktion von CTGF verantwortlich ist. Dabei zeigte sich, dass sowohl bei murinen embryonalen als auch bei adulten Zellen die Fibroblasten deutlich mehr CTGF transkribieren als Kardiomyozyten (Abbildung 4.15). Daher konzentrierten sich die folgenden Untersuchungen auf diese Gruppe kardialer Zellen. Ein interessanter Nebenbefund dieser Expressionsbestimmung war die Erkenntnis, dass das CTGF- Expressionslevel in embryonalen Zellen etwa 5mal höher war als in adulten Zellen. Generell wird CTGF im sich entwickelnden Herzen sehr hoch exprimiert und spielt auch hier eine Rolle bei der ECM- Deposition, Zelladhäsion, Zellmigration und Proliferation. Postnatal ist die Expression dann hauptsächlich auf das Atrium und epikardiale Blutgefäße beschränkt (Chuva de Sousa Lopes *et al.*, 2004; Klenotic *et al.*, 2016). Es ist anzunehmen, dass im adulten Herzen unter physiologischen Bedingungen keine erhöhte Migration oder Proliferation notwendig ist und demnach auch die Expression von CTGF geringer sein kann. So ist die CTGF- Expression in den meisten adulten Geweben gering oder nicht nachweisbar, kann aber bei einer Schädigung sehr schnell induziert werden (Yan and Chaqour, 2013). Dies konnte auch in Kardiomyozyten in Folge akuter oder chronischer Beeinträchtigungen des Myokards beobachtet werden (Ahmed *et al.*, 2004, 2007; Recchia *et al.*, 2009).

Im Erwachsenenalter werden kardiale Fibroblasten im Zusammenhang mit der Regeneration eher zwiespältig betrachtet. Sie nehmen eine zentrale Rolle beim pathologischen *Remodeling* ein, da bei einer Vielzahl von Erkrankungen Fibrose ein Hauptsymptom darstellt (Berk *et al.*, 2007; Daskalopoulos *et al.*, 2014; Segura *et al.*, 2014). Die fibrotischen Prozesse verursachen phänotypische Veränderungen bei den kardialen Fibroblasten. Durch die vermehrte Expression von zytoskeletalem *smooth muscle actin* und die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen werden sie zu Myofibroblasten (Lajiness and Conway, 2014; Leask, 2010; Segura *et al.*, 2014). Viele funktionelle Effekte kardialer Fibroblasten werden durch diese Transdifferenzierung zu Myofibroblasten vermittelt, welche neben der Expression von kontraktilen Proteinen auf verletzungsbedingte proinflammatorische Zytokine, vasoaktive Peptide und Hormone mit Veränderungen bei der Proliferation, Migration, Sekretion bioaktiver Moleküle und dem erhöhten ECM- Metabolismus reagieren (Porter and Turner, 2009).

Kardiale Fibrose wird von einer gesteigerten Kollagendeposition begleitet, welches die myokardiale Steifheit erhöht und zu pathologischen Veränderungen in Form von Dilatation, Kardiomyozytenhypertrophie und Apoptose führt, welche letztlich in Herzinsuffizienz resultieren (Baudino *et al.*, 2006; Cleutjens *et al.*, 1995; Cohn *et al.*, 2000). Des Weiteren sind Fibroblasten in der Lage, sich untereinander und mit Kardiomyozyten über *gap junctions* zu verknüpfen. Es wird daher

angenommen, dass auch das Narbengewebe eine gewisse elektrische Leitfähigkeit aufweist (Kakkar and Lee, 2010; Kohl and Gourdie, 2014). Auch exprimieren kardiale Fibroblasten eine Vielzahl von Ionenkanälen und mit Calcium assoziierte Proteine. So scheinen sie in der Lage zu sein, elektrische Informationen aus der Umgebung umzuwandeln (Camelliti *et al.*, 2005) und Narbengewebe in die Lage zu versetzen, Arrhythmien durch die Weitergabe elektrischer Signale an gesundes Gewebe zu generieren (Kohl and Gourdie, 2014).

Die CTGF- Depletion in kardialen Fibroblasten kann also einen wichtigen Ansatzpunkt bei der Kontrolle fibrotischer und inflammatorischer Prozesse im Herzen darstellen.

5.4 Etablierung kardiofibroblastischer Zellkultursysteme

Um die Funktion von Fibroblasten *in vitro* differenziert betrachten zu können, war die Etablierung eines geeigneten Zellkultursystems notwendig. Dabei wurden verschiedene Anforderungen an das System gestellt. Dazu gehörte die Nähe zum *in vivo*- Modell für eine einfache Translation ins Tiermodell oder die Klinik, ein effektives und reproduzierbares Protokoll zur Isolation der Zellen, ein effektiver Transgentransfer, die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und natürlich auch die möglichst einfache Kultivierung der Zellen. Dafür war auch die Stabilität der zellulären Eigenschaften über mehrere Passagen wichtig. Zusätzlich wurde angestrebt, die Primärzellen auch nach Kryokonservierung wieder in Kultur nehmen zu können. Unter diesen Maßgaben wurden zunächst neben NIH- 3T3- Zellen als kommerziell erhältliche immortalisierte fibroblastische Zelllinie eine Reihe primärer Zellen der Maus und Ratte isoliert und untersucht. Aufgrund des Zellliniencharakters und der sehr guten Kultivierbarkeit wurden die NIH- 3T3- Zellen zunächst in den Auswahlprozess einbezogen (Abbildung 4.16 und Abbildung 4.17). Da es sich dabei aber um eine fibroblastische Zelllinie aus gesamtem embryonalem Gewebe von Swiss- Albino- Mäusen handelt (Todaro and Green, 1963), der kardiale Kontext fehlt und auch die Transduktionsrate mit adenoviralen Vektoren nicht zufriedenstellend war, wurde von einer weiteren Verwendung dieser Zellen abgesehen.

Bei der Isolation von embryonalen und neonatalen Kardiofibroblasten wurden etablierte Protokolle genutzt, die primär der Isolation von Kardiomyozyten dienen und Fibroblasten dabei eher als Nebenprodukt gewonnen werden können. Die gewonnenen murinen embryonalen Fibroblasten zeigten unter den gewählten Kulturbedingungen jedoch keine Proliferation. Und auch die neonatalen Kardiofibroblasten der Ratte waren mit einer Passage nur begrenzt kultivierbar und aus der Kryokonservierung nicht reaktivierbar (Abbildung 4.18 und Abbildung 4.19). Dies kann zum Einen an den gewählten Kulturbedingungen, zum Anderen an der entwicklungsstadiumbedingten Programmierung der Zellen liegen. Bei der Isolation der embryonalen und neonatalen kardialen Zellen wird vor allem auf optimale Bedingungen für die Kardiomyozyten geachtet. Nach neueren

Erkenntnissen waren die gewonnenen Zellen noch nicht enddifferenziert. Sie haben die Fähigkeit, sich als *smooth muscle* Zellen, Fibroblasten oder Endothelzellen zu entwickeln (Ramesh *et al.*, 2016). Somit wären diese Zellen für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht geeignet gewesen. Auch bei der Kultivierung neonataler Kardiofibroblasten der Ratte waren möglicherweise die Zellkulturbedingungen nicht ideal, was in einer Hemmung der Proliferation resultierte, so dass eine längere Kultivierung der Zellen nicht möglich war. Hinzu kommt, dass nach neusten Erkenntnissen so gewonnene Kardiofibroblasten ein vergleichsweise hohes multiples Differenzierungspotential aufweisen (Chang *et al.*, 2016) und demnach eine stabile Charakteristik nicht gewährleistet werden kann.

Im Gegensatz dazu wurden die verwendeten murinen und humanen adulten Kardiofibroblasten (Lindner *et al.*, 2014) mittels Immunfluoreszenz als Fibroblasten charakterisiert (Abbildung 4.23). Dabei wurde durch die Verwendung von etablierten Antikörpern (Lindner *et al.*, 2012) gezeigt, dass die verwendeten Zellen Kollagen 1 exprimieren, der endotheliale Marker CD31 und der Muskelzellmarker Desmin jedoch nicht nachweisbar waren. Somit konnte eine Kontamination mit Endothelzellen oder Kardiomyozyten ausgeschlossen werden. Dem fibroblastischen Zelltyp wird eine gute Proliferationsrate nachgesagt (Porter and Turner, 2009; Wong *et al.*, 2007; Yano *et al.*, 2005). Beim Vergleich der kardialen Fibroblasten mit beispielsweise denen der Haut, gibt es in Abhängigkeit von der Funktion des Quellorgans dennoch Unterschiede. So zeigen Hautfibroblasten eine deutlich höhere Proliferation (Lindner *et al.*, 2012). Angesichts der geringen Regenerationsmerkmale des Myokards ist die auf 7 Passagen begrenzte Passagierbarkeit der murinen adulten Kardiofibroblasten erklärbar. Bei einer darüber hinausgehenden Kultivierung waren phänotypische Veränderungen zu beobachten (Abbildung 4.20). Dem könnte eine Transdifferenzierung zum Myofibroblast zugrunde liegen. Auf eine derartige Veränderung der murinen Fibroblasten wird bei der Diskussion der Resultate der mechanischen Stimulation näher eingegangen.

5.5 Effizienter Gentransfer als Grundlage einer erfolgreichen Gentherapie

In Abhängigkeit vom Zelltyp und verwendetem Vektor wurden *in vitro* sehr unterschiedliche Gentransferraten erzielt. Die Transfektion erfolgte mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation, kationischer Polymere oder Lipofektion unter Verwendung verschiedener kommerzieller oder selbsthergestellter Transfektionsagenzien. Die beiden ersteren Methoden nutzen die phagozytotische Aufnahme von an Calciumphosphatkristallen gebundene oder mit Polyethylenimin komplexierte DNA in eukaryotische Zellen (Boussif *et al.*, 1995), letztere basiert auf der Endozytose von Liposomen und anschließender endosomaler Fusion. Es wurde beschrieben, dass Fibroblasten nur begrenzt in der Lage sind, Partikel endozytotisch aufzunehmen. Die Größe der Partikel schein

dabei genauso relevant zu sein wie deren Beschaffenheit und deren Erkennung durch Oberflächenrezeptoren der Zelle (Flannagan *et al.*, 2012). Bei den primären Zellen wurde mit keinem der getesteten Transfektionmethoden ein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt. Der Anteil der transgenexprimierenden Zellen lag bei maximal 14 % (Abbildung 4.21, Abbildung 4.41 bis Abbildung 4.43). Deshalb wurden im Anschluss virale Vektoren hinsichtlich der Gentransferrate bei den verschiedenen Kardiofibroblasten untersucht. Bei kardiovaskulären Erkrankungen werden meist adenovirale Vektoren, AAV- basierte Vektoren und lentivirale Vektoren eingesetzt (Rosenzweig, 2003; Sakoda *et al.*, 1999; Svensson *et al.*, 1999). Lentivirale Vektoren und AAV- basierte Vektoren wurden außer Acht gelassen, da bei ersteren das Risiko der Insertionsmutagenese besteht und Letztere sehr komplex in der Evaluierung der verschiedenen Serotypen sind, so dass diese eventuell erst zu einem fortgeschrittenen Punkt der Anwendung eine Rolle spielen könnten, falls mit adenoviralen Vektoren kein ausreichender Zelltropismus zu Fibroblasten im Herzen erreicht werden kann. Zusätzlich konnte die Sicherheit des adenoviralen Vektorsystems bei der Behandlung von Herzinsuffizienz bereits in einer klinischen Studie nachgewiesen werden (Hammond *et al.*, 2016). Für einige rekombinante AAV- Vektoren konnte eine hohe Affinität zu Kardiomyozyten gezeigt werden. Die selektive Anwendung von Vektoren auf Fibroblasten im Myokard ist bisher nicht möglich (Cardin *et al.*, 2012; Jiang and Ning, 2014; Jiang *et al.*, 2015; Meyer *et al.*, 2016; Pan *et al.*, 2012; Tank *et al.*, 2014; Thum, 2014). Für eine fibroblastenspezifische Applikation der viralen Vektoren *in vivo* kann möglicherweise eine Oberflächenmodifikation oder Pseudotypisierung der Vektoren erfolgen (Buchholz *et al.*, 2015). Auch die Wahl eines anderen Promotors kann zur Spezifität beitragen. Beim Vergleich des Genexpressionsprofils von adulten kardialen Fibroblasten und Fibroblasten aus der Schwanzspitze von Mäusen stellte sich ein kardiogenes Expressionsmuster heraus. Dies war unter anderem durch die Transkriptionsfaktoren Tcf21 (Epicardin) und Wt1 (Wilms Tumor Protein 1) charakterisiert (Furtado *et al.*, 2014). Um eine kardiofibroblastenspezifische shRNA- Expression der Expressionskassette zu gewährleisten, könnte die Verwendung der Promotorsequenzen dieser Faktoren in Betracht gezogen werden. Für die Untersuchung der RNA- Interferenz- basierten Suppression der CTGF- Expression würde dies hier jedoch zu weit führen.

Vor diesem Hintergrund wurde die Transduktionseffizienz adenovirale Vektoren auf verschiedene primäre kardiale Fibroblastenkulturen evaluiert. Dabei zeigte sich, dass sowohl die adulten Fibroblasten der Maus (Abbildung 4.22) als auch die neonatalen Fibroblasten der Ratte (Abbildung 4.19) erfolgreich transduziert wurden, dies jedoch nicht auf individuelle humane Fibroblastenkulturen übertragbar war. Da adenovirale Vektoren über die Bindung an den Coxsackie-Adenovirus- Rezeptor (CAR) von der Zelle internalisiert werden, wurde die mRNA- Expression von CAR bei humanen Fibroblasten mit der Expression muriner Fibroblasten verglichen. Dabei zeigte sich, dass die CAR- Expression deutlich geringer war (Abbildung 4.47). Daher war die Verwendung eines

Transduktionsenhancers notwendig. Mit dem kommerziell erhältlichen *Enhancer* TransMAX (Sirion) konnten keine konsistente Transduktionsrate erreicht werden, vielmehr traten hier chargenabhängig deutliche Unterschiede auf (Abbildung 4.44). Daher wurden alternativ das Permeabilisationsagenz Natriumcaprate (Gregory *et al.*, 2003) und das kationische Polymer Polybrene (Jacobsen *et al.*, 2006) als weitere Transduktionsenhancer untersucht. Natriumcaprate erwies sich schon während der Präinkubation als äußerst zytotoxisch. Offenbar wird eine Permeabilisation der Zellmembran von humanen Kardiofibroblasten nicht toleriert. Daher wurde Na-Caprate nicht weiter evaluiert. Durch die Zugabe von Polybrene wird die Ladung des adenoviralen Vektors maskiert und eine Aggregation verhindert um so eine rezeptorunabhängige Aufnahme viraler Partikel zu ermöglichen (Davis *et al.*, 2004). Das kationische Polymer führte zu einer effizienten Vektoraufnahme, welche durch die Expression von GFP fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert werden konnte (Abbildung 4.45). Somit wurde Polybrene auch bei der humanfibroblastischen Applikation der shRNA-exprimierenden adenoviralen Vektoren eingesetzt.

5.6 RNA- Interferenz- basierter Ansatz zur Depletion von CTGF

Die Aktivität eines spezifischen Genes bzw. Proteins kann entweder auf posttranskriptionaler Ebene durch RNA- Interferenz oder unter Verwendung spezifischer Antikörper inhibiert werden. Bisher wurde von einem antikörperbasierten Ansatz zur Inhibition von CTGF berichtet. Dabei wurde gezeigt, dass mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers FG- 3019 bei einem durch Injektion von TGF β 1 und CTGF induzierten Multiorganfibrose der Verlauf positiv beeinflusst wurde (Wang *et al.*, 2011). Synthetische Antikörper wirken jedoch primär extrazellulär (Thurber and Weissleder, 2011). Zusätzlich ist zu erwähnen, dass solche Antikörper in der Regel intravenös appliziert werden und so eine kardio- bzw. organspezifische Wirkung nicht gewährleistet werden kann. Auch wenn CTGF primär bei pathologischen Prozessen vermehrt exprimiert wird und eine systemisch applizierte Inhibition primär am Ort der Inflammation und Fibrose wirkt, kann eine Beeinflussung der normalen Zellfunktionen nicht ausgeschlossen werden.

Die Verwendung von RNA- Interferenz bietet den Vorteil, dass die Inhibition lokal und intrazellulär erfolgt, so dass die Funktionen des Targets sowohl intrazellulär als auch extrazellulär nicht mehr zum Tragen kommen. Zusätzlich kann durch eine gezielte Applikation, die Verwendung zell- und organspezifischer Promotoren und die Pseudotypisierung viraler Vektoren eine hohe Spezifität und geringe Immunogenität erreicht werden.

RNAi kann sowohl mittels siRNAs als auch durch miRNAs erfolgen. Beide Ansätze verfolgen die posttranskriptionale Regulation der Genfunktion. Neben dem eigentlichen Ursprung der kleinen nichtkodierenden RNA- Moleküle stellen der Grad der Komplementarität und die Lokalisation der

Zielsequenz innerhalb der mRNA die wichtigsten Unterscheidungsmerkmale stellen dar (Lam *et al.*, 2015). Die miRNA- mRNA- Erkennung erfolgt im 3'UTR- Bereich und benötigt keine vollständige Komplementarität, wohingegen siRNAs vollständig komplementär innerhalb des kodierenden Abschnitts binden müssen, um eine Degradation der mRNA zu bewirken (Elbashir *et al.*, 2001b). Da miRNAs auch bei unvollständiger Bindung die Translation der mRNA inhibieren, können mehrere mRNA- Targets durch eine miRNA reguliert werden (Bartel, 2009; Lim *et al.*, 2005). Im Herz regulieren miRNAs posttranskriptional die Genexpression und regulieren so die kardiovaskuläre Entwicklung, Inflammation, Hypertrophie, Fibrose und Regeneration (Creemers and van Rooij, 2016; Philippen *et al.*, 2015; Thum and Condorelli, 2015). So kontrollieren miRNAs wichtige Prozesse bei der Gewebeschädigung nach einem Myokardinfarkt indem sie beispielsweise den Zelltod von Kardiomyozyten fördern oder hemmen, postischämische Neovaskularisation und kardiale Fibrose steuern (Boon and Dimmeler, 2015).

Im Fall der endogenen Regulation der CTGF- Expression wurden in diesem Zusammenhang zwei Wege beschrieben. Entweder erfolgt sie auf Promotorebene über eine TGF β 1- vermittelte Signalkaskade aus Smads, Proteinkinase C/ ras/ MEK/ extrazellulär regulierter Kinase und einem Ets-1- bindendes Element in der CTGF- Promoter- Region (Shi-Wen *et al.*, 2008) oder auf posttranskriptionaler Ebene durch die beiden kardial exprimierten miRNAs 30c-1 und 133b. Durch die direkte Interaktion mit der 3'-UTR von CTGF resultiert ein verringertes CTGF- Level (Duisters *et al.*, 2009). Daher wurden neben bereits vorhandenen shRNA- Konstrukten auch entsprechende miRNA- exprimierende adenovirale Vektoren entwickelt und ihre Wirksamkeit bei der Regulation von CTGF in adulten murinen Kardiofibroblasten untersucht (Abbildung 4.25 und Abbildung 4.26). Unter Verwendung der gleichen MOI stellte sich heraus, dass die Expression von CTGF sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene durch shCTGF-A und shCTGF-B stärker inhibiert wurde als durch die miRNAs. Da durch eine miRNA verschiedene Gene angesprochen werden können, könnte die geringe Wirksamkeit gegenüber CTGF auf eine breitere Verteilung der gebildeten miRNAs zurückzuführen sein. Beim Vergleich der beiden miRNAs untereinander war miR133 effektiver. Die weiteren Untersuchungen wurden mit den shRNAs durchgeführt, da der Fokus zunächst auf einer Inhibition der CTGF- Expression lag. Die miRNA 133 sollte aber als vielversprechende Option in Verbindung mit der Regulation fibrotischer und inflammatorischer Prozesse im Myokard untersucht werden, da die Möglichkeit besteht, dass durch sie ein Netzwerk von Genen angesprochen werden könnte, was durch eine Inhibition den Verlauf von Kardiomyopathien positiv beeinflussen könnte. Hierfür sollte zukünftig eine breit angelegte Genexpressionsanalyse nach miRNA- Applikation durchgeführt werden.

5.7 Mechanische Stimulation adulter muriner Kardiofibroblasten

An das kardiale Gewebe werden besondere Anforderungen gestellt. So muss es mechanischer Beanspruchung standhalten können und gleichzeitig eine ausreichende Pumpfunktion zulassen. Unter physiologischen Bedingungen müssen kardiale Fibroblasten in der Lage sein, eine zunehmende mechanische Beanspruchung während der üblichen Zug- und Entspannungszyklen zu detektieren, um mit einer kompensatorischen ECM-Produktion reagieren zu können. Im gesunden Herzen spielen Fibroblasten so bei der Aufrechterhaltung der ECM-Architektur und der kardialen Funktion eine wichtige Rolle. Zusätzlich werden ausgeprägte parakrine, mechanoelektrische und direkte elektrotonische Kommunikationsachsen zwischen Kardiomyozyten und Kardiofibroblasten beschrieben. So wird die Aufrechterhaltung der Homöostase gewährleistet und das Herz kann adäquat auf physiologische Umbauprozesse, zum Beispiel als Anpassung auf körperliche Belastung, reagieren (Cartledge *et al.*, 2015; Kohl and Gourdie, 2014; Maillet *et al.*, 2013; Mezzano *et al.*, 2014; Rohr, 2012; Souders *et al.*, 2009). Als Folge einer Gewebeschädigung wie einem Myokardinfarkt oder einer permanenten Druckbelastung durch Hypertrophie transdifferenzieren hauptsächlich residierende kardiale Fibroblasten zu Myofibroblasten, welche unter normalen, physiologischen Bedingungen im Herzen nicht nachweisbar sind (Baum and Duffy, 2011; van den Borne *et al.*, 2010; Creemers and Pinto, 2011; Hinz *et al.*, 2012; Lyon *et al.*, 2015; Schuetze *et al.*, 2014; Turner and Porter, 2013; Weber *et al.*, 2013). Ihre primäre Aufgabe besteht dann in der Sekretion von Kollagen 1 und 3 sowie der Kontraktion der neu gebildeten ECM (Putten *et al.*, 2016).

Bei einer Gewebeschädigung werden elastische ECM und Kardiomyozyten durch steiferes, kollagenöses Narbengewebe ersetzt. Als Antwort auf eine chronische Überbelastung wird eine zugfestere ECM generiert (Klingberg *et al.*, 2014; Wen and Janmey, 2013). In beiden Fällen kommt es letztlich zu einer 2 bis 10-fachen Versteifung der ECM, welche von den kardialen Zellen mechanosensorisch wahrgenommen und intrazellulär weitergeleitet werden kann (Engler *et al.*, 2008; MacKenna *et al.*, 2000; Wells and Discher, 2008; Yong *et al.*, 2015).

Um die Auswirkungen einer mechanischen Stimulation in Form von zyklischem, equibiaxialen Stretch auf adulte Kardiofibroblasten der Maus zu untersuchen, erfolgte die mechanische Beanspruchung von 10% für 3 Stunden, 6 Stunden oder 168 Stunden (Abbildung 4.27 bis Abbildung 4.32 und Abbildung 4.34 bis Abbildung 4.39). Solche Untersuchungen zur mechanischen Aktivierung von Fibroblasten werden meist in zweidimensionalen Zellkultursystemen durchgeführt, auch wenn diese deutliche Einschränkungen hinsichtlich der nichtphysiologischen Bedingungen aufweisen. Die im Vergleich zu gesundem kardialen Gewebe 10 mal höhere Steifheit der verwendeten Zellkulturplatten mit flexibler Kultivierungsfläche und die zusätzliche zyklische, equibiaxiale Beanspruchung simulieren pathologische Bedingungen und fördern die Transdifferenzierung (Balestrini and Hinz, 2015; Brown, 2000; Throm Quinlan *et al.*, 2011). Es kommt zunächst zu einer

vermehrten Expression und Produktion von ECM- Komponenten und sich an diese anlagernden Glykoproteinen (Blaauboer *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2013; Gupta and Grande-Allen, 2006). In Folge der Langzeitstimulation waren im Rahmen dieser Arbeit die ECM- Komponenten Kollagen 1 α 2, Kollagen 3 α 1 und Osteopontin, die Matrixmetalloproteasen MMP2 und MMP9 und Connexin 43 vermehrt exprimiert, wohingegen die ECM- Komponente Elastin eine Suppression der mRNA- Synthese aufwies. Dies spiegelt die Umbauprozesse in der extrazellulären Matrix hin zu einer Versteifung wider. So wird Osteopontin als nicht- strukturelles ECM- Protein im gesunden Herzen eher gering exprimiert, nimmt aber unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen deutlich zu (Singh *et al.*, 2010) und ist mit myozytärer Apoptose und myokardialer Dysfunktion assoziiert (Dalal *et al.*, 2014; Renault *et al.*, 2010; Subramanian *et al.*, 2007). Die Zunahme von Connexin 43 könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Zellen sich umorganisiert und eine netzartige Formation eingenommen haben, wobei sie sich miteinander über Connexin 43 verknüpfen. Es ist anzunehmen, dass die zellfreien Räume ECM enthalten. Die vermehrte Kollagen- Expression bei längerer mechanischer Stimulation kann dabei durch verschiedene Faktoren bedingt sein. So könnte hier die Aktivierung von PKC und die damit verbundene Phosphorylierung von p300 oder eine Induktion von TGF β 1 beteiligt sein (Horstmeyer *et al.*, 2005; Husse *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2002; Watson *et al.*, 2012). Bei der MMP- Expression sind anscheinend anderen Mechanismen bestimmend, da in einer früheren Arbeit bereits gezeigt wurde, dass eine PKC- Inhibition bei gleichzeitiger mechanischer Stimulation keine Auswirkungen auf die MMP- Expression hat (Husse *et al.*, 2007). So wurde in fetalen Zellen der Lunge ebenfalls eine Induktion der MMP- Expression in Folge von mechanischer Stimulierung beobachtet, wobei die Aktivierung durch IL10 reguliert wurde (Hawwa *et al.*, 2011).

Aufgrund der Beschichtung der Platten mit Kollagen 1 konnte ein entsprechender Nachweis mit den gegebenen Möglichkeiten nicht durchgeführt werden. Da aber die mRNA- Expression auf eine vermehrte ECM- Deposition hinweist, wird auch vom Vorhandensein der Proteine ausgegangen. Zumal es sich bei den Zellen um primäre Fibroblasten handelt, welche diesbezüglich nicht manipuliert wurden und anderenfalls keinen festen Zellverband bilden könnten. Neben den ECM- Komponenten und Modulatoren wurden auch die Expression der CCN- Mitglieder, der Chemokine Ccl2, Ccl7 und Ccl8 sowie von α - SMA untersucht.

Im zeitlichen Verlauf der Aktivierung wurde zunächst eine Induktion der CTGF- mRNA- Expression beobachtet, welche bereits nach 6 Stunden rückläufig war und nach 168 Stunden deutlich unter dem Niveau der Kontrolle lag. Auch die mRNA- Expression des myofibroblastischen Markers α - SMA zeigte einen ähnlichen zeitlichen Verlauf. Von Petersen *et al.* wurde bereits beschrieben, dass die Beschaffenheit des Substrates eher einen temporären Effekt auf das Zellverhalten zu haben scheint, wohingegen der Einfluss der zyklischen Beanspruchung während der Anwendung bestehen bleibt (Petersen *et al.*, 2012). Mit der Zeit wenden die Zellen weniger Kraft für die selbe Deformation des

Substrats auf (Fomovsky *et al.*, 2010; Stroud *et al.*, 2002), da dieses über die Dauer der Belastung nachgibt. Durch die Modulation des Transkriptionsfaktors MyoD kann die Transdifferenzierung zu Myofibroblasten wieder umgekehrt werden, was sich in einer verminderten Expression von α -SMA und CTGF zeigt (Hecker *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012). Dies kann sich wiederum auf die Expression anderer Gene auswirken. Auch kann die Aktivierung des Proteinkinase C-*Signaling* als kompensatorische Gegenmaßnahme der Induktion der CTGF-Expression bei kurzzeitigen Stimulation entgegengewirkt, weshalb es im zeitlichen Verlauf zu einer Abnahme der CTGF-Expression kommt (Fan and Karnovsky, 2000; Yosimichi *et al.*, 2006).

Durch α -SMA in den Stressfasern können Myofibroblasten diagnostisch identifiziert werden (Arnoldi *et al.*, 2012). Aktuellere Untersuchungen haben gezeigt, dass es sich bei Myofibroblasten um ein phänotypisches reversibles Aktivierungsstadium und nicht um einen enddifferenzierten Zelltyp handelt, der nur noch der Apoptose unterliegen kann (Driesen *et al.*, 2014; Hecker *et al.*, 2011; Kisseleva *et al.*, 2012; Talele *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014). Es wird postuliert, dass Zytokine und ECM-Komponenten die Aktivierung zu Myofibroblasten steuern (Davis and Molkentin, 2014; Fomovsky *et al.*, 2010; Freedman *et al.*, 2015; Goldsmith *et al.*, 2014; Horn and Trafford, 2016; Howard and Baudino, 2014; Rienks and Papageorgiou, 2016). Die ECM stellt dabei nicht nur das Gerüst für Zellen und Wachstumsfaktoren, sondern leitet auch mittels biomechanischer Signale die Aktivierung und Aktivität der Myofibroblasten. Eine transiente Aktivierung in Folge einer myokardialen Schädigung ist zunächst förderlich und unabdingbar um die strukturelle Integrität des Myokards zu gewährleisten. Erst bei einer persistenten Myofibroblastenaktivierung kommt es zu einer pathologischen ECM-Deposition und *Remodeling* (Davis and Molkentin, 2014). Welche Bedingungen die transiente Aktivierung pathologisch werden lassen, konnten noch nicht geklärt werden. Es wäre denkbar, dass der Grad der Schädigung oder Belastung des Myokards, eine genetische Prädisposition oder exogene Faktoren eine wesentliche Rolle spielen.

Die Expression der Chemokine stellte sich eher heterogen dar. So war Ccl2 durchgehend ansteigend induziert und die Ccl7-Transkriptmenge schien mit Verzögerung diesem Muster zu folgen, wobei der Anstieg stärker ausgeprägt war. Das Chemokin Ccl8 reagierte zunächst mit einem leichten Rückgang der mRNA-Expression um dann nach 168 Stunden gegenüber der nicht mechanisch stimulierten Kontrolle um über 2000% induziert zu sein. Somit scheinen Myofibroblasten an der Entstehung und Aufrechterhaltung inflammatorischer Prozesse wesentlich beteiligt zu sein. Durch die mechanische Aktivierung kommt es zu einer Stimulation der Chemokinexpression. *In vivo* kann es dann als Grundlage einer Inflammation zur transendothelialen Migration inflammatorischer Zellen entlang eines Chemokingradienten in das Myokard kommen. In vielen experimentellen und klinischen Untersuchungen der Herzinsuffizienz wurden inflammatorische Prozesse im Myokard nachgewiesen (Duerschmid *et al.*, 2013; Hazebroek *et al.*, 2012; Heymans *et al.*, 2009). Diese Prozesse führen zu

einer weiteren Steigerung der Fibrose und pathologischen Umbauprozessen (Westermann et al., 2011b). Im Kontext inflammatorischer Prozesse könnten durch die zusätzliche Induktion der MMP-Expression Umbauprozesse der ECM ermöglicht werden, um so die Migration von Immunzellen zu erleichtern.

In Folge der Langzeitstimulation war für die Gene WISP1 und WISP2 eine erhöhte Transkriptmenge feststellbar. Im Gegensatz dazu war neben CTGF auch Cyr61 supprimiert und Nov und WISP3 wurden durch die Transdifferenzierung zum Myofibroblast zu den untersuchten Zeitpunkten scheinbar nicht beeinflusst. Die Genexpression von WISP2 verhielt sich zu jedem untersuchten Zeitpunkt gegenläufig zu CTGF und entspricht hier dem Bild des kompensatorischen Gegenspielers von CTGF (Yoon *et al.*, 2010). Ihre Expression scheint gegenläufig reguliert zu sein. Da diese Regulation *in vivo* bei der Analyse der Endomyokardbiopsien nicht beobachtet werden konnte, sind diese Ergebnisse kritisch zu betrachten. Das *in vitro*-Modell scheint für diesbezügliche Untersuchungen weniger geeignet zu sein. Im Fall von Cyr61 wäre es denkbar, dass durch die Deaktivierung der Myofibroblasten die Akkumulation von Cyr61 zur Initiation der Seneszenz ebenfalls unterbunden wird und sich dies in der verminderten Expression zeigt. Auch die vermehrte Expression von ECM-Komponenten könnte hier eine Rolle spielen.

5.8 Auswirkungen der CTGF- Depletion auf die Expression fibrose- und inflammationsassoziiertes Gene in aktivierten Fibroblasten

Die mechanische Stimulation adulter muriner Kardiofibroblasten wirkte sich auf die Expression der meisten untersuchten Gene auf (Abbildung 4.27 bis Abbildung 4.32 und Abbildung 4.34 bis Abbildung 4.39). Erfolgte initial die CTGF- Depletion mittels vektorbasierter RNAi, wurde die durch die mechanische Aktivierung bedingte Induktion der CTGF- mRNA- Expression nach 3 Stunden aufgehoben und nach 6 Stunden das detektierbare mRNA- Level unter das der nichtstimulierten Kontrolle gesenkt. Ohne mechanische Aktivierung war durch die Suppression der CTGF- Expression die Expression der Chemokine Ccl2, Ccl7 und Ccl8 nach 3 Stunden reduziert. Bei mechanischer Stimulation für 3 Stunden hatte die shRNA- Behandlung auf die Expression von WISP2, Ccl2, Ccl7 und α -SMA keinen zusätzlichen Einfluss. Die Expression von α -SMA wurde auch nach 168 Stunden nicht durch die CTGF- Depletion beeinflusst. Bei Ccl8 konnte nach 3 Stunden eine zusätzliche Reduktion der Genexpression beobachtet werden. Nach 6 Stunden mechanischer Stimulation zeigte sich nur bei Ccl2 und Ccl7 ein Effekt der CTGF- Suppression in Form einer verminderten Expression der Chemokine. Wurde die CTGF- Expression über 168 Stunden bei gleichzeitiger mechanischer Stimulation inhibiert, konnte für Ccl2, Ccl7, Ccl8, Kollagen 1 α 2, MMP2, MMP9 und Connexin 43 eine signifikant reduzierte Induktion der Genexpression nachgewiesen werden. Die Analyse der WISP2-

Expression zeigte hingegen zusätzlich zur stressbedingten Induktion einen weiteren Anstieg (Abbildung 5.1). Infolge der RNAi- vermittelten CTGF- Suppression war aufgrund der Sequenzspezifität der gegen CTGF gerichteten shRNAs gegenüber der übrigen Mitglieder der CCN- Familie keine direkte Expressionsmanipulation zu erwarten. Die vermehrte Expression von WISP2 bei gleichzeitig reduzierter CTGF- Expression bestätigt nochmal die gegenläufige Regulation der Genexpression.

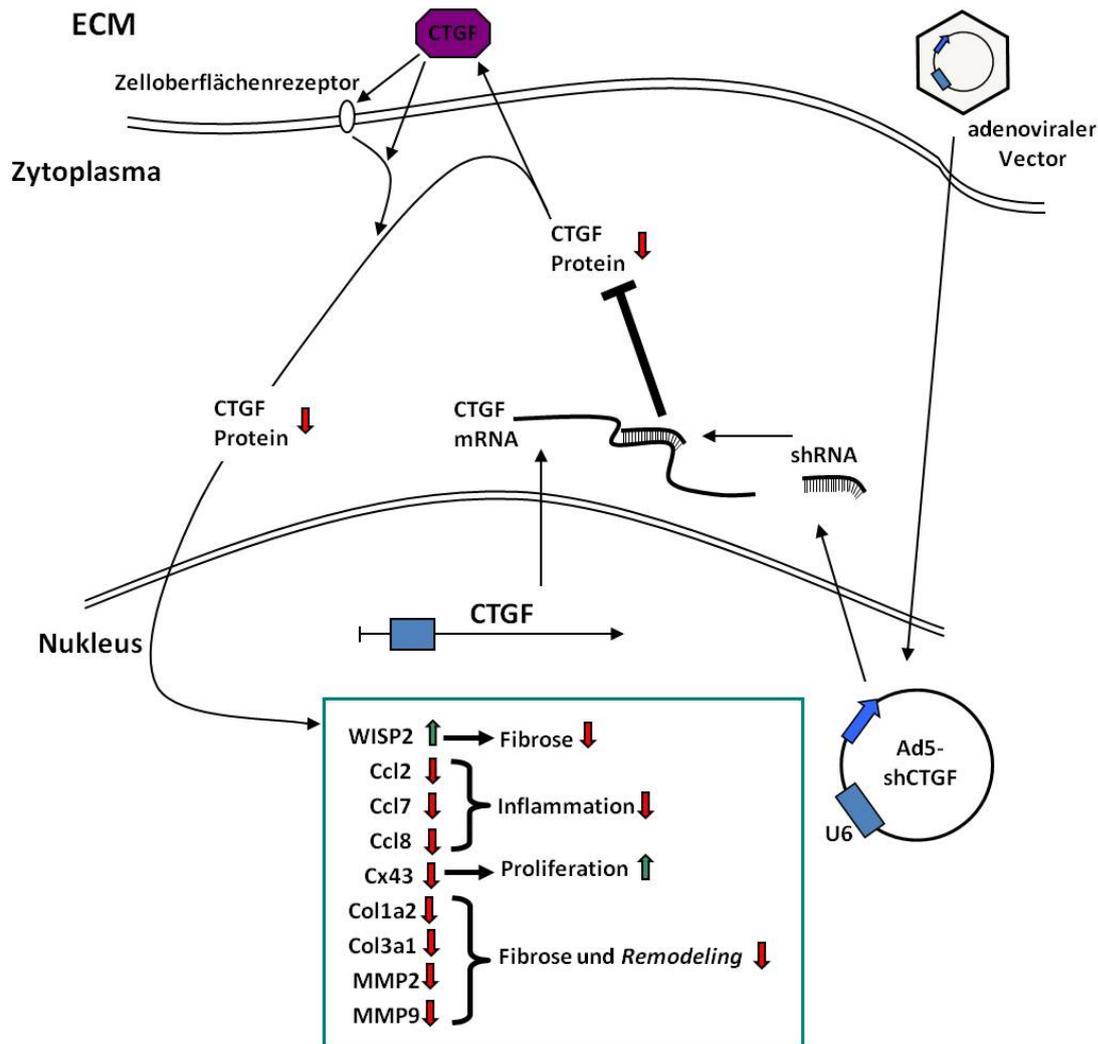


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der antifibrotischen und antiinflammatorischen Effekte in Folge der RNAi- vermittelten CTGF- Depletion. Nach dem Eindringen des adenoviralen Vektors in die Zelle und der nukleären Transkription von shCTGF vermittelt diese das posttranskriptionale *Silencing* von CTGF. Dadurch werden CTGF- abhängige intrazelluläre oder indirekt über Zelloberflächenrezeptoren vermittelte Signalwege beeinflusst und es kommt zu Repression der Expression von Connexin 43, Chemokinen, ECM- Bestandteilen und deren Modulatoren sowie zur Induktion von WISP2. So können fibrotische und inflammatorische Prozesse gehemmt und Proliferation gesteigert werden.

Wie bereits erwähnt, kann die vermehrte Kollagen- Expression bei längerer mechanischer Stimulation durch die Aktivierung von PKC und die damit verbundene Phosphorylierung von p300 oder eine Induktion von TGF β 1 bedingt sein (Horstmeyer *et al.*, 2005; Husse *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2002; Watson *et al.*, 2012). In Folge der CTGF- Suppression ist eine geringere PKC- Aktivierung denkbar, so dass auch weniger Kollagen exprimiert wird. Durch TGF β 1 wäre dann zwar eine gesteigerte CTGF- Expression denkbar, dieser würde jedoch einerseits durch die RNAi- vermittelte Degradation der mRNA und auch durch eine aktivierte PKC entgegengewirkt.

CTGF wird als zentraler Mediator von Fibrose und Remodeling beschrieben. Durch seine Inhibition ist es möglich, diese Prozesse vorzubeugen oder auch umzukehren (Lipson *et al.*, 2012). Wurde initial die CTGF- Expression mit 25 MOI Ad5-shCTGF-A supprimiert, lösten sich deutlich mehr Zellen bei der Vorbereitung zur Fluoreszenzmikroskopie ab. Dies könnte mit der geringeren ECM- Deposition und der verringerten interzellulären Integrität erklärt werden. Durch die Depletion von CTGF kam es auch zu einer deutlich verringerten Migration von Splenozyten.

Vor kurzem wurde von Jun und Lau eine Arbeit veröffentlicht, bei der die Expression von CTGF besonders während der initialen inflammatorischen Phase erhöht ist und während der Proliferation und Differenzierung von Myofibroblasten im Verlauf des Heilungsprozesses schnell wieder auf ein niedriges Level zurück geht (Jun and Lau, 2016). Dies konnte auch über den zeitlichen Verlauf der mechanischen Aktivierung beobachtet werden. Dennoch konnten mit der Suppression der CTGF- Expression verschiedene fibrotische und inflammatorische Faktoren manipuliert werden, was durchaus globale Auswirkungen auf den Verlauf von Inflammation und Fibrose im Myokard haben kann. Denn anders wie bei Verletzungen der Haut, wo Myofibroblasten nach der Bildung neuer Haut in die Apoptose übergehen, können kardiale Myofibroblasten auch noch mehrere Jahre nach der initialen Schädigung aktiv bleiben und Fibrose und auch weitere Entzündungsprozesse fördern (van den Borne *et al.*, 2010; Lindner *et al.*, 2014; Palatinus *et al.*, 2010).

Nimmt man die Beobachtungen zusammen, kann durch die Inhibition von CTGF über shRNA- vermittelter RNA- Interferenz zusätzlich zur erwarteten antifibrotischen Wirkung auch ein antiinflammatorisch geprägtes Expressionsmuster der untersuchten Gene in Folge der Suppression beobachtet werden. In dem die Expression von CTGF inhibiert wird, kann also sowohl die Fibrose als auch die Inflammation gemindert werden. Damit kann mit diesem RNAi- basierten Ansatz ein vielversprechendes Potential bei der therapeutischen Anwendung aufgezeigt werden.

5.9 RNA- Interferenz bei Kulturen individueller humaner Kardiofibroblasten

Die Möglichkeit, anhand individueller humaner Kardiofibroblastenkulturen vektorvermittelte RNA- Interferenz als gentherapeutischen Ansatz *in vitro* zu untersuchen, kann als innovativ bezeichnet

werden. Dabei musste neben der Wahl einer effektiven shRNA- Sequenz die Etablierung eines effizienten Transgentransfers erfolgen. Beim Sequenzabgleich bereits vorhandener shCTGF- Vektoren wies die shRNA B eine vollständige Übereinstimmung mit der standardisierten Sequenz des humanen CTGFs auf, so dass diese bei der RNAi- vermittelten Suppression der CTGF- Expression in adulten humanen Fibroblasten angewendet werden sollte. Das Einbringen eines shCTGF-B- exprimierenden Vektors in die Zelle konnte weder mit verschiedenen Transfektionsagenzien noch mit einer klassischen adenoviralen Transduktion in ausreichendem Maße erreicht werden. Erst unter Zuhilfenahme des Transduktionsenhancers Polybrene war eine konsistente Gentransferrate erzielt worden. Eine Expressionsanalyse der CAR- mRNA zeigte, dass dessen Transkriptionsrate bei kultivierten humanen Kardiofibroblasten um rund 90% geringer war als bei murinen Kardiofibroblasten (Abbildung 4.47). Eine Untersuchung der mRNA- Expression von CAR bei verschiedenen humanen Kardiomyopathien hat gezeigt, dass es in Abhängigkeit der kardialen Erkrankung deutliche Unterschiede zu geben scheint (Tatrai *et al.*, 2011). Beim Vergleich mit nicht-kardiomyopathischen Herzen war bei DCM- Herzen die mRNA- Expression von CAR 34fach (± 5.4) und bei ischämischer Kardiomyopathie um den Faktor 12 (± 4.3) erhöht (Sasse *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Ergebnisse könnte die therapeutische Anwendung adenoviraler Vektoren *in vivo* trotz der Notwendigkeit eines Transduktionsenhancers *in vitro* dennoch erfolgreich sein, zumal in Anbetracht der sehr heterogenen Ätiologien für Kardiomyopathien bei den Spendern auch die CAR- Expression variieren kann (Tabelle 10.3). Des Weiteren ist zu untersuchen, in wie fern die isolierte Kultivierung der Fibroblasten ausschlaggebend für die geringe CAR- Expression ist. Alternativ könnte auch eine höhere Dosierung des shRNA- Vektors *in vitro* evaluiert werden. Allerdings kann dann unter Umständen keine Transduktionskontrolle mit GFP erfolgen, da dies in hohen Mengen toxisch für die Zellen sein kann (Liu *et al.*, 1999). Die Untersuchungen mit murinen Fibroblasten haben dies bereits gezeigt. Adulte humane Fibroblasten konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht in den für eine solche Evaluierung notwendiger Menge generiert werden. Da es bei den erfolgten Untersuchungen jedoch um die Auswirkung der CTGF- Depletion ging, spielt die Entwicklung eines Gentransfers für die *in vivo* Anwendung in humanen Fibroblasten hier eine untergeordnete Rolle. Nichts desto trotz stellt sie eine nicht zu unterschätzende Herausforderung dar. Wie bereits erwähnt, gibt es schon eine erste klinische Studie zur Verwendung adenoviraler Vektoren bei Gentransfer in Kardiomyozyten. Da CTGF auch in diesen Zellen exprimiert wird (Koshman *et al.*, 2013), könnte die Suppression möglicherweise schon für eine erfolgreiche antifibrotische und antiinflammatorische Therapie mit shCTGF ausreichend sein. Dafür spricht auch die Art des Targets, da es sich bei CTGF um ein matrizelluläres Protein handelt, welches über die Interaktion mit Integrinen wirkt (Bedore *et al.*, 2014). Da nicht alle Zellen in der betroffenen Region angesprochen werden, wäre es denkbar, dass die reparative Fibrose

nicht gestört wird, der Übergang zu pathologischen fibrotischen Prozessen aber verhindert werden kann.

Trotz einer vergleichbaren Transduktionseffizienz konnte nur in 7 von 8 Kulturen eine erfolgreiche Suppression der CTGF- Expression erreicht werden (Abbildung 4.48). Eine Kultur zeigte sogar eine Induktion von CTGF. Die Expression der inflammations- und migrationsassoziierten Chemokinen Ccl2, Ccl7 und Ccl8 (Abbildung 4.50) sowie die Expression von Kollagen, MMP2, Osteopontin und Connexin 43 (Abbildung 4.51) zeigte kein homogenes Muster. Hier wird besonders deutlich, dass es sich um individuelle Kulturen handelt, für dessen heterogenes Ansprechen verschiedene Faktoren verantwortlich sein können. Offensichtliche Unterschiede waren die Diagnose, das Geschlecht, die Einnahme von Arzneimitteln und der Fortschritt der Erkrankung in Bezug auf fibrotische Veränderungen. Auch sollte die eigentliche Endomyokardbiopsie kritisch betrachtet werden. Denn auch wenn sich eine myokardiale Inflammation und damit verbundene Fibrose meist eher punktuell und uneinheitlich zeigen und es so aufgrund einer fehlerhaften Probenentnahme zu falschnegativen Ergebnissen kommt, wird die Endomyokardbiopsie nach wie vor als Goldstandard der *ante- mortem* Diagnose einer Kardiomyopathie angesehen (Ardehali *et al.*, 2004; Maisch *et al.*, 2006; Mills and Lauer, 2004; Ruppert and Maisch, 2012). Daher könnte es so auch zu Variationen in den Fibroblastenkulturen humaner Spender kommen, da nicht davon ausgegangen werden kann, dass das Myokard durchgehend homogen pathologischen Veränderungen unterworfen ist, welche auch auf die Fibroblasten Einfluss nehmen. Zusätzlich können genetische oder epigenetische Faktoren für die Variationen verantwortlich sein. Eine erneute Analyse der Targetsequenz von shCTGF-B ergab, dass in diesem Bereich zwei SNPs (*single nucleotide polymorphism*) ohne klinische Signifikanz lokalisiert sind (Abbildung 5.2). Die Häufigkeit dieser Variationen wurde bisher noch nicht beschrieben. Dadurch kann die Funktionalität der shRNA gestört sein und sich das Verhalten Kultur des Patienten 5833 als *Nonresponder* erklären. Für weitere Untersuchungen ist daher anzuraten, eine andere Targetsequenz zu wählen oder im Vorfeld durch eine Sequenzierung des Genomabschnitts die Kultur als *Responder* oder *Nonresponder* zu charakterisieren. Hier muss der Aufwand der Entwicklung und Evaluierung einer neuen Sequenz mit den Kosten einer Sequenzierung abgewogen werden.

6 Zusammenfassung

Herzinsuffizienz stellt mit einer Prävalenz von über 23 Millionen weltweit eines der größten Gesundheitsprobleme dar (Roger, 2013). Bei etwa einem Zehntel der Betroffenen wird eine inflammatorische DCM (DCMi) diagnostiziert (Felker *et al.*, 2000) und stellt eine Hauptursache für Herzinsuffizienz und plötzlichen Herztod bei Kindern und jungen Erwachsenen dar (Kallwellis-Opara *et al.*, 2007). Eine DCMi kann sich aus einer Myokarditis entwickeln und wird neben inflammatorischen Prozessen durch eine abnehmende Kardiokontraktilität, progressive Fibrose und Ventrikeldilatation charakterisiert (Kania *et al.*, 2013). Die Behandlung erfolgt derzeit nur symptomatisch. Im fortgeschrittenen Stadium der DCM ist die Implantation eines Defibrillators indiziert. Durch den unaufhaltsamen Verlauf kann bis zur Herztransplantation die Implantation eines externen ventrikulären Unterstützungssystems erforderlich sein (Chen *et al.*, 1999).

Bei einer umfassenden Mikroarray- Analyse von Kardiomyopathiepatienten ergaben sich für die CCN-Mitglieder Cyr61, CTGF und WISP1 Hinweise auf erhöhte Expressionslevel (Wittchen *et al.*, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser Befund mittels Endomyokardbiopsien (EMB) von DCM- Patienten sowie murinen Modellen des Myokardinfarkts und der CVB3- Myokarditis evaluiert. Dabei zeigte sich besonders für das profibrotisch wirkende CTGF eine auffällige Induktion der Genexpression. Daher wurde der Fokus auf dieses Mitglied der CCN-Familie gelegt. Zusätzliche statistische Korrelationsanalysen stellten für viele, an Inflammation, Fibrose und *Signaling* beteiligte Gene einen Zusammenhang mit der CTGF- Expression dar. Um die Funktion, die CTGF bei den pathologischen Prozessen einer Kardiomyopathie einnimmt, zu untersuchen, sollte dessen Expression mittels vektorvermittelter RNA- Interferenz manipuliert werden. Dafür wurde ein murines, transduzierbares, kardiofibroblastisches Zellkulturmodell etabliert. Die Transdifferenzierung der murinen Fibroblasten zu Myofibroblasten als wesentlicher Faktor bei Fibrose wurde durch mechanische Aktivierung unterstützt. Dadurch wurden eine Vielzahl fibrose- und inflammationsassoziiertes Gene induziert. Durch die Suppression von CTGF konnte dieser Induktion entgegengewirkt werden und eine deutlich verringerte Splenozytenmigration gezeigt werden.

Für den Transfer der vektorvermittelten CTGF- Suppression in humane Kardiofibroblasten aus EMB war aufgrund der geringen Expression von CAR die Verwendung eines Transduktionsenhancers unabdingbar. Hier wurde durch die Verwendung von Polybrene ein effektiver und effizienter Transgentransfer etabliert. Trotz vergleichbarer Transduktionsraten stellten sich die CTGF- Depletion und die damit assoziierte veränderte Expression von profibrotischen und proinflammatorischen Genen eher heterogen dar. Die Gründe dafür können vielfältig sein. Neben der Form der DCM, können auch die medikamentöse Behandlung der Spenderpatienten und SNPs in der Erkennungssequenz der verwendeten shRNA wichtige Faktoren sein, die weiter untersucht werden

sollten. Dennoch konnte ein effektives Vektortransduktionsprotokoll für humane Kardiofibroblasten etabliert werden. Durch die Inhibition der CTGF- Expression kann also sowohl Fibrose als auch Inflammation positiv beeinflusst werden. Damit kann mit diesem RNAi- basierten Ansatz ein vielversprechendes Potential bei der therapeutischen Anwendung aufgezeigt werden.

7 Summary

Heart failure is one of the major public health problems with a prevalence of more than 23 million worldwide (Roger, 2013). One tenth of the affected population (Felker *et al.*, 2000) is diagnosed with inflammatory cardiomyopathy DCM (DCMi) which is a major cause of cardiac insufficiency and sudden cardiac death in children and adolescents. (Felker *et al.*, 2000) DCMi may result from myocarditis and is characterized by an increasing reduction in cardiac contractility, progressive fibrosis and dilatation of the ventricles in addition to the inflammatory processes (Kania *et al.*, 2013). Treatment usually occurs symptomatically. At advanced late-stage disease, implantation of a defibrillator is indicated and continuing progression often requires the implantation of external ventricular support systems until heart transplantation is performed (Chen *et al.*, 1999).

In a comprehensive microarray study of cardiomyopathy patients, evidences for increased expression level were found for the CCN gene family members Cyr61, CTGF and WISP1 (Wittchen *et al.*, 2007). In the context of this dissertation, these findings were confirmed by endomyocardial biopsies of DCM patients as well as murine models of myocardial infarction and CVB3 myocarditis. A remarkable induction of gene expression was found especially for CTGF, which was described as profibrotic. Consequently, this work focuses on CTGF as a member of the CCN family. Additional statistical correlation analyzes showed an association of CTGF expression with several genes involved in inflammation, fibrosis, and signaling. To investigate the function of CTGF in pathologic processes of cardiomyopathy, its expression was manipulated using vector-mediated RNA interference. For this purpose, a murine, transduceable, cardiofibroblastic cell culture model was established. The transdifferentiation of murine fibroblasts to myofibroblasts as an essential factor in fibrosis was supported by mechanical activation. Thus, a variety of fibrosis- and inflammation-associated genes were induced. The RNAi-mediated suppression of CTGF was able to counteract this induction and, moreover significantly reduced the migration of splenocytes.

For the transfer of the vector-mediated CTGF suppression into human cardiofibroblasts from endomyocardial biopsies, the use of a transduction enhancer was indispensable due to the low expression of CAR. An effective and efficient transgene transfer was established by the use of polybrene. Despite comparable transduction rates, CTGF depletion and the associated altered expression of profibrotic and proinflammatory genes were heterogeneous. The reasons for this could be manifold. In addition to the form of DCM, the drug treatment of the donor and SNPs in the recognition sequence of the used shRNA potentially display important factors which should be further investigated. Nevertheless, an effective vector transduction protocol for human cardiofibroblasts was established. By inhibition of the expression of CTGF both fibrosis and

Summary

inflammation can be positively influenced. Hence this RNAi-based approach demonstrates a promising potential for therapeutic application.

8 Literaturverzeichnis

Aaronson, D.S., and Horvath, C.M. (2002). A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 296, 1653–1655.

Abraham, D.J., and Varga, J. (2005). Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models. *Trends Immunol.* 26, 587–595.

Abreu, J.G., Ketpura, N.I., Reversade, B., and De Robertis, E.M. (2002). Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat. Cell Biol.* 4, 599–604.

Abu El-Asrar, A.M., De Hertogh, G., van den Eynde, K., Alam, K., Van Raemdonck, K., Opendakker, G., Van Damme, J., Geboes, K., and Struyf, S. (2015). Myofibroblasts in proliferative diabetic retinopathy can originate from infiltrating fibrocytes and through endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT). *Exp. Eye Res.* 132, 179–189.

Adam, O., Lavall, D., Theobald, K., Hohl, M., Grube, M., Ameling, S., Sussman, M.A., Rosenkranz, S., Kroemer, H.K., Schäfers, H.-J., et al. (2010). Rac1-induced connective tissue growth factor regulates connexin 43 and N-cadherin expression in atrial fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 55, 469–480.

Ahmed, M.S., Øie, E., Vinge, L.E., Yndestad, A., Øystein Andersen, G., Andersson, Y., Attramadal, T., and Attramadal, H. (2004). Connective tissue growth factor--a novel mediator of angiotensin II-stimulated cardiac fibroblast activation in heart failure in rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 36, 393–404.

Ahmed, M.S., Øie, E., Vinge, L.E., von Lueder, T.G., Attramadal, T., and Attramadal, H. (2007). Induction of pulmonary connective tissue growth factor in heart failure is associated with pulmonary parenchymal and vascular remodeling. *Cardiovasc. Res.* 74, 323–333.

Ahmed, M.S., Gravning, J., Martinov, V.N., von Lueder, T.G., Edvardsen, T., Czibik, G., Moe, I.T., Vinge, L.E., Øie, E., Valen, G., et al. (2011). Mechanisms of novel cardioprotective functions of CCN2/CTGF in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 300, H1291-1302.

Aoki, K., Moriguchi, H., Yoshioka, T., Okawa, K., and Tabara, H. (2007). In vitro analyses of the production and activity of secondary small interfering RNAs in *C. elegans*. *EMBO J.* 26, 5007–5019.

Aoudjehane, L., Pissia, A., Scatton, O., Podevin, P., Massault, P.-P., Chouzenoux, S., Soubrane, O., Calmus, Y., and Conti, F. (2008). Interleukin-4 induces the activation and collagen production of cultured human intrahepatic fibroblasts via the STAT-6 pathway. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 88, 973–985.

Arbustini, E., Morbini, P., Pilotto, A., Gavazzi, A., and Tavazzi, L. (2000). Familial dilated cardiomyopathy: from clinical presentation to molecular genetics. *Eur. Heart J.* 21, 1825–1832.

Ardehali, H., Qasim, A., Cappola, T., Howard, D., Hruban, R., Hare, J.M., Baughman, K.L., and Kasper, E.K. (2004). Endomyocardial biopsy plays a role in diagnosing patients with unexplained cardiomyopathy. *Am. Heart J.* 147, 919–923.

Arnoldi, R., Chaponnier, C., Gabbiani, G., and Hinz, B. (2012). Chapter 88 - Heterogeneity of Smooth Muscle A2 - Hill, Joseph A. In *Muscle*, E.N. Olson, ed. (Boston/Waltham: Academic Press), pp. 1183–1195.

Assomull, R.G., Prasad, S.K., Lyne, J., Smith, G., Burman, E.D., Khan, M., Sheppard, M.N., Poole-Wilson, P.A., and Pennell, D.J. (2006). Cardiovascular magnetic resonance, fibrosis, and prognosis in dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* *48*, 1977–1985.

Aukrust, P., Gullestad, L., Lappegård, K.T., Ueland, T., Aass, H., Wikeby, L., Simonsen, S., Frøland, S.S., and Mollnes, T.E. (2001). Complement activation in patients with congestive heart failure: effect of high-dose intravenous immunoglobulin treatment. *Circulation* *104*, 1494–1500.

Babic, A.M., Chen, C.C., and Lau, L.F. (1999). Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin α v β 3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 2958–2966.

Baker, N., Sharpe, P., Culley, K., Otero, M., Bevan, D., Newham, P., Barker, W., Clements, K.M., Langham, C.J., Goldring, M.B., et al. (2012). Dual regulation of metalloproteinase expression in chondrocytes by Wnt-1-inducible signaling pathway protein 3/CCN6. *Arthritis Rheum.* *64*, 2289–2299.

Balestrini, J., and Hinz, B. (2015). Mechanical Regulation of Myofibroblasts: Mechanically Guided Matrix Remodeling and Prevention of Fibrosis in Regenerative Medicine. In *Cells, Forces, and the Microenvironment*, (Pan Stanford), pp. 97–126.

Ball, D.K., Surveyor, G.A., Diehl, J.R., Steffen, C.L., Uzumcu, M., Mirando, M.A., and Brigstock, D.R. (1998a). Characterization of 16- to 20-kilodalton (kDa) connective tissue growth factors (CTGFs) and demonstration of proteolytic activity for 38-kDa CTGF in pig uterine luminal flushings. *Biol. Reprod.* *59*, 828–835.

Ball, D.K., Surveyor, G.A., Diehl, J.R., Steffen, C.L., Uzumcu, M., Mirando, M.A., and Brigstock, D.R. (1998b). Characterization of 16- to 20-kilodalton (kDa) connective tissue growth factors (CTGFs) and demonstration of proteolytic activity for 38-kDa CTGF in pig uterine luminal flushings. *Biol. Reprod.* *59*, 828–835.

Banerjee, I., Yekkala, K., Borg, T.K., and Baudino, T.A. (2006). Dynamic interactions between myocytes, fibroblasts, and extracellular matrix. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1080*, 76–84.

Banerjee, I., Fuseler, J.W., Price, R.L., Borg, T.K., and Baudino, T.A. (2007). Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *293*, H1883–H1891.

Banerjee, I., Fuseler, J.W., Intwala, A.R., and Baudino, T.A. (2009). IL-6 loss causes ventricular dysfunction, fibrosis, reduced capillary density, and dramatically alters the cell populations of the developing and adult heart. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* *296*, H1694–H1704.

Banerjee, S., Dhar, G., Haque, I., Kambhampati, S., Mehta, S., Sengupta, K., Tawfik, O., Phillips, T.A., and Banerjee, S.K. (2008). CCN5/WISP-2 expression in breast adenocarcinoma is associated with less frequent progression of the disease and suppresses the invasive phenotypes of tumor cells. *Cancer Res.* *68*, 7606–7612.

Barraud, P., Emmerth, S., Shimada, Y., Hotz, H.-R., Allain, F.H.-T., and Bühler, M. (2011). An extended dsRBD with a novel zinc-binding motif mediates nuclear retention of fission yeast Dicer. *EMBO J.* *30*, 4223–4235.

Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* *136*, 215–233.

- Bartlett, D.W., and Davis, M.E. (2006). Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Res.* *34*, 322–333.
- Bartlett, D.W., and Davis, M.E. (2007). Effect of siRNA nuclease stability on the in vitro and in vivo kinetics of siRNA-mediated gene silencing. *Biotechnol. Bioeng.* *97*, 909–921.
- Baudino, T.A., Carver, W., Giles, W., and Borg, T.K. (2006). Cardiac fibroblasts: friend or foe? *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *291*, H1015–1026.
- Baum, J., and Duffy, H.S. (2011). Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about? *J. Cardiovasc. Pharmacol.* *57*, 376–379.
- Baxter, S.C., Morales, M.O., and Goldsmith, E.C. (2008). Adaptive changes in cardiac fibroblast morphology and collagen organization as a result of mechanical environment. *Cell Biochem. Biophys.* *51*, 33–44.
- Bedore, J., Leask, A., and Séguin, C.A. (2014). Targeting the extracellular matrix: Matricellular proteins regulate cell-extracellular matrix communication within distinct niches of the intervertebral disc. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.*
- Ben m'rad, M., Leclerc-Mercier, S., Blanche, P., Franck, N., Rozenberg, F., Fulla, Y., Guesmi, M., Rollot, F., Dehoux, M., Guillevin, L., et al. (2009). Drug-induced hypersensitivity syndrome: clinical and biologic disease patterns in 24 patients. *Medicine (Baltimore)* *88*, 131–140.
- Berezikov, E., Chung, W.-J., Willis, J., Cuppen, E., and Lai, E.C. (2007). Mammalian mirtron genes. *Mol. Cell* *28*, 328–336.
- Berk, B.C., Fujiwara, K., and Lehoux, S. (2007). ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J. Clin. Invest.* *117*, 568–575.
- Berschneider, B., and Königshoff, M. (2011). WNT1 inducible signaling pathway protein 1 (WISP1): a novel mediator linking development and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *43*, 306–309.
- Biros, E., Moran, C.S., Rush, C.M., Gäbel, G., Schreurs, C., Lindeman, J.H.N., Walker, P.J., Nataatmadja, M., West, M., Holdt, L.M., et al. (2014). Differential gene expression in the proximal neck of human abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis* *233*, 211–218.
- Blaauboer, M.E., Smit, T.H., Hanemaaijer, R., Stoop, R., and Everts, V. (2011). Cyclic mechanical stretch reduces myofibroblast differentiation of primary lung fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *404*, 23–27.
- Boden, D., Pusch, O., Silbermann, R., Lee, F., Tucker, L., and Ramratnam, B. (2004). Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins. *Nucleic Acids Res.* *32*, 1154–1158.
- Boengler, K., Hilfiker-Kleiner, D., Drexler, H., Heusch, G., and Schulz, R. (2008). The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure. *Pharmacol. Ther.* *120*, 172–185.
- Boon, R.A., and Dimmeler, S. (2015). MicroRNAs in myocardial infarction. *Nat. Rev. Cardiol.* *12*, 135–142.
- Booz, G.W., Day, J.N.E., and Baker, K.M. (2002). Interplay between the cardiac renin angiotensin system and JAK-STAT signaling: role in cardiac hypertrophy, ischemia/reperfusion dysfunction, and heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *34*, 1443–1453.

- Bork, P. (1993). The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett.* *327*, 125–130.
- van den Borne, S.W.M., Diez, J., Blankesteyn, W.M., Verjans, J., Hofstra, L., and Narula, J. (2010). Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nat. Rev. Cardiol.* *7*, 30–37.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J.P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 7297–7301.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* *3*, e85.
- Brigstock, D.R. (1999). The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocr. Rev.* *20*, 189–206.
- Brigstock, D.R. (2002). Regulation of angiogenesis and endothelial cell function by connective tissue growth factor (CTGF) and cysteine-rich 61 (CYR61). *Angiogenesis* *5*, 153–165.
- Brigstock, D.R., Steffen, C.L., Kim, G.Y., Vegunta, R.K., Diehl, J.R., and Harding, P.A. (1997). Purification and characterization of novel heparin-binding growth factors in uterine secretory fluids. Identification as heparin-regulated Mr 10,000 forms of connective tissue growth factor. *J. Biol. Chem.* *272*, 20275–20282.
- Brigstock, D.R., Goldschmeding, R., Katsube, K., Lam, S.C.-T., Lau, L.F., Lyons, K., Naus, C., Perbal, B., Riser, B., Takigawa, M., et al. (2003). Proposal for a unified CCN nomenclature. *Mol. Pathol.* *MP 56*, 127–128.
- Brower, G.L., Chancey, A.L., Thanigaraj, S., Matsubara, B.B., and Janicki, J.S. (2002). Cause and effect relationship between myocardial mast cell number and matrix metalloproteinase activity. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* *283*, H518–H525.
- Brown, T.D. (2000). Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review. *J. Biomech.* *33*, 3–14.
- Brown, E., and Dejana, E. (2003). Cell-to-cell contact and extracellular matrix: Editorial overview: Cell–cell and cell–matrix interactions — running, jumping, standing still. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 505–508.
- Brown, R.D., Ambler, S.K., Mitchell, M.D., and Long, C.S. (2005). The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *45*, 657–687.
- Buchholz, C.J., Friedel, T., and Büning, H. (2015). Surface-Engineered Viral Vectors for Selective and Cell Type-Specific Gene Delivery. *Trends Biotechnol.* *33*, 777–790.
- Burkett, E.L., and Hershberger, R.E. (2005). Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* *45*, 969–981.
- Caforio, A.L.P., Mahon, N.G., Baig, M.K., Tona, F., Murphy, R.T., Elliott, P.M., and McKenna, W.J. (2007). Prospective familial assessment in dilated cardiomyopathy: cardiac autoantibodies predict disease development in asymptomatic relatives. *Circulation* *115*, 76–83.
- Cai, X., Hagedorn, C.H., and Cullen, B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA N. Y. N* *10*, 1957–1966.

- Calderone, A., Bel-Hadj, S., Drapeau, J., El-Helou, V., Gosselin, H., Clement, R., and Villeneuve, L. (2006). Scar myofibroblasts of the infarcted rat heart express natriuretic peptides. *J. Cell. Physiol.* *207*, 165–173.
- Camelliti, P., Green, C.R., LeGrice, I., and Kohl, P. (2004). Fibroblast network in rabbit sinoatrial node: structural and functional identification of homogeneous and heterogeneous cell coupling. *Circ. Res.* *94*, 828–835.
- Camelliti, P., Borg, T.K., and Kohl, P. (2005). Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* *65*, 40–51.
- Cardin, S., Guasch, E., Luo, X., Naud, P., Le Quang, K., Shi, Y., Tardif, J.-C., Comtois, P., and Nattel, S. (2012). Role for MicroRNA-21 in atrial profibrillatory fibrotic remodeling associated with experimental postinfarction heart failure. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* *5*, 1027–1035.
- Cardullo, R.A., Agrawal, S., Flores, C., Zamecnik, P.C., and Wolf, D.E. (1988). Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 8790–8794.
- Carthew, R.W., and Sontheimer, E.J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* *136*, 642–655.
- Cartledge, J.E., Kane, C., Dias, P., Tesfom, M., Clarke, L., Mckee, B., Ayoubi, S.A., Chester, A., Yacoub, M.H., Camelliti, P., et al. (2015). Functional crosstalk between cardiac fibroblasts and adult cardiomyocytes by soluble mediators. *Cardiovasc. Res.* *105*, 260–270.
- Castel, S.E., and Martienssen, R.A. (2013). RNA interference (RNAi) in the Nucleus: roles for small RNA in transcription, epigenetics and beyond. *Nat. Rev. Genet.* *14*, 100–112.
- Cattaneo, R., Miest, T., Shashkova, E.V., and Barry, M.A. (2008). Reprogrammed viruses as cancer therapeutics: targeted, armed and shielded. *Nat. Rev. Microbiol.* *6*, 529–540.
- Cerutti, H., and Casas-Mollano, J.A. (2006). On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr. Genet.* *50*, 81–99.
- Chaanine, A.H., Kalman, J., and Hajjar, R.J. (2010). Cardiac gene therapy. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* *22*, 127–139.
- Chancey, A.L., Brower, G.L., Peterson, J.T., and Janicki, J.S. (2002). Effects of Matrix Metalloproteinase Inhibition on Ventricular Remodeling Due to Volume Overload. *Circulation* *105*, 1983–1988.
- Chang, H.Y., Chi, J.-T., Dudoit, S., Bondre, C., van de Rijn, M., Botstein, D., and Brown, P.O. (2002). Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 12877–12882.
- Chang, Y., Guo, K., Li, Q., Li, C., Guo, Z., and Li, H. (2016). Multiple Directional Differentiation Difference of Neonatal Rat Fibroblasts from Six Organs. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* *39*, 157–171.
- Chaqour, B., and Goppelt-Struebe, M. (2006). Mechanical regulation of the Cyr61/CCN1 and CTGF/CCN2 proteins. *FEBS J.* *273*, 3639–3649.

- Chaour, B., Whitbeck, C., Han, J.-S., Macarak, E., Horan, P., Chichester, P., and Levin, R. (2002). Cyr61 and CTGF are molecular markers of bladder wall remodeling after outlet obstruction. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *283*, E765-774.
- Charron, P., Arad, M., Arbustini, E., Basso, C., Bilinska, Z., Elliott, P., Helio, T., Keren, A., McKenna, W.J., Monserrat, L., et al. (2010). Genetic counselling and testing in cardiomyopathies: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur. Heart J.* *31*, 2715–2726.
- Cheloufi, S., Dos Santos, C.O., Chong, M.M.W., and Hannon, G.J. (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* *465*, 584–589.
- Chen, C.-C., and Lau, L.F. (2009). Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 771–783.
- Chen, Y., and Du, X.-Y. (2007). Functional properties and intracellular signaling of CCN1/Cyr61. *J. Cell. Biochem.* *100*, 1337–1345.
- Chen, J.M., Spanier, T.B., Gonzalez, J.J., Marelli, D., Flannery, M.A., Tector, K.A., Cullinane, S., and Oz, M.C. (1999). Improved survival in patients with acute myocarditis using external pulsatile mechanical ventricular assistance. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *18*, 351–357.
- Chen, N., Leu, S.-J., Todorovic, V., Lam, S.C.-T., and Lau, L.F. (2004a). Identification of a novel integrin α 5 β 3 binding site in CCN1 (CYR61) critical for pro-angiogenic activities in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* *279*, 44166–44176.
- Chen, Y., Abraham, D.J., Shi-Wen, X., Pearson, J.D., Black, C.M., Lyons, K.M., and Leask, A. (2004b). CCN2 (connective tissue growth factor) promotes fibroblast adhesion to fibronectin. *Mol. Biol. Cell* *15*, 5635–5646.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* *436*, 740–744.
- Chilton, L., Giles, W.R., and Smith, G.L. (2007). Evidence of intercellular coupling between co-cultured adult rabbit ventricular myocytes and myofibroblasts. *J. Physiol.* *583*, 225–236.
- Choi, J.S., Kim, K.-H., and Lau, L.F. (2015). The matricellular protein CCN1 promotes mucosal healing in murine colitis through IL-6. *Mucosal Immunol.* *8*, 1285–1296.
- Chuah, M.K.L., Collen, D., and VandenDriessche, T. (2003). Biosafety of adenoviral vectors. *Curr. Gene Ther.* *3*, 527–543.
- Chung, K.-H., Hart, C.C., Al-Bassam, S., Avery, A., Taylor, J., Patel, P.D., Vojtek, A.B., and Turner, D.L. (2006). Polycistronic RNA polymerase II expression vectors for RNA interference based on BIC/miR-155. *Nucleic Acids Res.* *34*, e53.
- Chuva de Sousa Lopes, S.M., Feijen, A., Korving, J., Korchynskiy, O., Larsson, J., Karlsson, S., ten Dijke, P., Lyons, K.M., Goldschmeding, R., Doevendans, P., et al. (2004). Connective tissue growth factor expression and Smad signaling during mouse heart development and myocardial infarction. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *231*, 542–550.

- Cifuentes, D., Xue, H., Taylor, D.W., Patnode, H., Mishima, Y., Cheloufi, S., Ma, E., Mane, S., Hannon, G.J., Lawson, N.D., et al. (2010). A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science* 328, 1694–1698.
- Cleutjens, J.P., Verluyten, M.J., Smiths, J.F., and Daemen, M.J. (1995). Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am. J. Pathol.* 147, 325–338.
- Cohn, J.N., Ferrari, R., and Sharpe, N. (2000). Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.* 35, 569–582.
- Coles, B., Fielding, C.A., Rose-John, S., Scheller, J., Jones, S.A., and O'Donnell, V.B. (2007). Classic interleukin-6 receptor signaling and interleukin-6 trans-signaling differentially control angiotensin II-dependent hypertension, cardiac signal transducer and activator of transcription-3 activation, and vascular hypertrophy in vivo. *Am. J. Pathol.* 171, 315–325.
- Colmenares, S.U., Buker, S.M., Buhler, M., Dlakić, M., and Moazed, D. (2007). Coupling of double-stranded RNA synthesis and siRNA generation in fission yeast RNAi. *Mol. Cell* 27, 449–461.
- Cossu, G., and Bianco, P. (2003). Mesoangioblasts--vascular progenitors for extravascular mesodermal tissues. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 537–542.
- Creemers, E.E., and Pinto, Y.M. (2011). Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart. *Cardiovasc. Res.* 89, 265–272.
- Creemers, E.E., and van Rooij, E. (2016). Function and Therapeutic Potential of Noncoding RNAs in Cardiac Fibrosis. *Circ. Res.* 118, 108–118.
- Dalal, S., Zha, Q., Daniels, C.R., Steagall, R.J., Joyner, W.L., Gadeau, A.-P., Singh, M., and Singh, K. (2014). Osteopontin stimulates apoptosis in adult cardiac myocytes via the involvement of CD44 receptors, mitochondrial death pathway, and endoplasmic reticulum stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 306, H1182-1191.
- Daskalopoulos, E.P., Hermans, K.C.M., and Blankesteyn, W.M. (2014). Cardiac (myo)fibroblast: Novel strategies for its targeting following myocardial infarction. *Curr. Pharm. Des.* 20, 1987–2002.
- Davidson, B.L., and McCray, P.B. (2011). Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nat. Rev. Genet.* 12, 329–340.
- Davis, J., and Molkentin, J.D. (2014). Myofibroblasts: Trust your heart and let fate decide. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 70, 9–18.
- Davis, E., Caiment, F., Tordoir, X., Cavaillé, J., Ferguson-Smith, A., Cockett, N., Georges, M., and Charlier, C. (2005). RNAi-mediated allelic trans-interaction at the imprinted Rtl1/Peg11 locus. *Curr. Biol. CB* 15, 743–749.
- Davis, H.E., Rosinski, M., Morgan, J.R., and Yarmush, M.L. (2004). Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophys. J.* 86, 1234–1242.
- Desmoulière, A., Badid, C., Bochaton-Piallat, M.-L., and Gabbiani, G. (1997). Apoptosis during wound healing, fibrocontractive diseases and vascular wall injury. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 19–30.

- Diegoli, M., Grasso, M., Favalli, V., Serio, A., Gambarin, F.I., Klersy, C., Pasotti, M., Agozzino, E., Scelsi, L., Ferlini, A., et al. (2011). Diagnostic work-up and risk stratification in X-linked dilated cardiomyopathies caused by dystrophin defects. *J. Am. Coll. Cardiol.* *58*, 925–934.
- Diwan, A., Tran, T., Misra, A., and Mann, D.L. (2003). Inflammatory mediators and the failing heart: a translational approach. *Curr. Mol. Med.* *3*, 161–182.
- Dobaczewski, M., Xia, Y., Bujak, M., Gonzalez-Quesada, C., and Frangogiannis, N.G. (2010). CCR5 Signaling Suppresses Inflammation and Reduces Adverse Remodeling of the Infarcted Heart, Mediating Recruitment of Regulatory T Cells. *Am. J. Pathol.* *176*, 2177–2187.
- Dostal, D.E., Hunt, R.A., Kule, C.E., Bhat, G.J., Karoor, V., McWhinney, C.D., and Baker, K.M. (1997). Molecular mechanisms of angiotensin II in modulating cardiac function: intracardiac effects and signal transduction pathways. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *29*, 2893–2902.
- Driesen, R.B., Nagaraju, C.K., Abi-Char, J., Coenen, T., Lijnen, P.J., Fagard, R.H., Sipido, K.R., and Petrov, V.V. (2014). Reversible and irreversible differentiation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* *101*, 411–422.
- Du, L., Dronadula, N., Tanaka, S., and Dichek, D.A. (2011). Helper-dependent adenoviral vector achieves prolonged, stable expression of interleukin-10 in rabbit carotid arteries but does not limit early atherogenesis. *Hum. Gene Ther.* *22*, 959–968.
- Duerrschmid, C., Crawford, J.R., Reineke, E., Taffet, G.E., Trial, J., Entman, M.L., and Haudek, S.B. (2013). TNF receptor 1 signaling is critically involved in mediating angiotensin-II-induced cardiac fibrosis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *57*, 59–67.
- Duisters, R.F., Tijssen, A.J., Schroen, B., Leenders, J.J., Lentink, V., van der Made, I., Herias, V., van Leeuwen, R.E., Schellings, M.W., Barenbrug, P., et al. (2009). miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling. *Circ. Res.* *104*, 170–178, 6p following 178.
- Echeverri, C.J., and Perrimon, N. (2006). High-throughput RNAi screening in cultured cells: a user's guide. *Nat. Rev. Genet.* *7*, 373–384.
- Echeverri, C.J., Beachy, P.A., Baum, B., Boutros, M., Buchholz, F., Chanda, S.K., Downward, J., Ellenberg, J., Fraser, A.G., Hacohen, N., et al. (2006). Minimizing the risk of reporting false positives in large-scale RNAi screens. *Nat. Methods* *3*, 777–779.
- Eghbali, M., Tomek, R., Woods, C., and Bhambi, B. (1991). Cardiac fibroblasts are predisposed to convert into myocyte phenotype: specific effect of transforming growth factor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *88*, 795–799.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* *411*, 494–498.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001b). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* *15*, 188–200.
- Elliott, P., Andersson, B., Arbustini, E., Bilinska, Z., Cecchi, F., Charron, P., Dubourg, O., Kühn, U., Maisch, B., McKenna, W.J., et al. (2008). Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur. Heart J.* *29*, 270–276.

- Elsner, M., Terbish, T., Jörns, A., Naujok, O., Wedekind, D., Hedrich, H.-J., and Lenzen, S. (2012). Reversal of diabetes through gene therapy of diabetic rats by hepatic insulin expression via lentiviral transduction. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 20, 918–926.
- Emmerth, S., Schober, H., Gaidatzis, D., Roloff, T., Jacobeit, K., and Bühler, M. (2010). Nuclear retention of fission yeast dicer is a prerequisite for RNAi-mediated heterochromatin assembly. *Dev. Cell* 18, 102–113.
- Engler, A.J., Carag-Krieger, C., Johnson, C.P., Raab, M., Tang, H.-Y., Speicher, D.W., Sanger, J.W., Sanger, J.M., and Discher, D.E. (2008). Embryonic cardiomyocytes beat best on a matrix with heart-like elasticity: scar-like rigidity inhibits beating. *J. Cell Sci.* 121, 3794–3802.
- Escher, F., Westermann, D., Gaub, R., Pronk, J., Bock, T., Al-Saadi, N., Köhl, U., Schultheiss, H.-P., and Tschöpe, C. (2011). Development of diastolic heart failure in a 6-year follow-up study in patients after acute myocarditis. *Heart Br. Card. Soc.* 97, 709–714.
- Fan, W.H., and Karnovsky, M.J. (2000). Activation of protein kinase C inhibits the expression of connective tissue growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 312–321.
- Fang, F., Zhao, W.-Y., Li, R.-K., Yang, X.-M., Li, J., Ao, J.-P., Jiang, S.-H., Kong, F.-Z., Tu, L., Zhuang, C., et al. (2014). Silencing of WISP3 suppresses gastric cancer cell proliferation and metastasis and inhibits Wnt/ β -catenin signaling. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7, 6447–6461.
- Feghali, C.A., and Wright, T.M. (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 2, d12-26.
- Felgner, P.L. (1997). Nonviral strategies for gene therapy. *Sci. Am.* 276, 102–106.
- Felker, G.M., Thompson, R.E., Hare, J.M., Hruban, R.H., Clemetson, D.E., Howard, D.L., Baughman, K.L., and Kasper, E.K. (2000). Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 342, 1077–1084.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.
- Flannagan, R.S., Jaumouillé, V., and Grinstein, S. (2012). The cell biology of phagocytosis. *Annu. Rev. Pathol.* 7, 61–98.
- Fomovsky, G.M., Thomopoulos, S., and Holmes, J.W. (2010). Contribution of extracellular matrix to the mechanical properties of the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48, 490–496.
- Förstemann, K., Horwich, M.D., Wee, L., Tomari, Y., and Zamore, P.D. (2007). *Drosophila* microRNAs are sorted into functionally distinct argonaute complexes after production by dicer-1. *Cell* 130, 287–297.
- Frangogiannis, N.G., Michael, L.H., and Entman, M.L. (2000). Myofibroblasts in reperfused myocardial infarcts express the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb). *Cardiovasc. Res.* 48, 89–100.
- Frangogiannis, N.G., Dewald, O., Xia, Y., Ren, G., Haudek, S., Leucker, T., Kraemer, D., Taffet, G., Rollins, B.J., and Entman, M.L. (2007). Critical role of monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 in the pathogenesis of ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 115, 584–592.

- Freedman, B.R., Bade, N.D., Riggin, C.N., Zhang, S., Haines, P.G., Ong, K.L., and Janmey, P.A. (2015). The (dys)functional extracellular matrix. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1853*, 3153–3164.
- French, D.M., Kaul, R.J., D'Souza, A.L., Crowley, C.W., Bao, M., Frantz, G.D., Filvaroff, E.H., and Desnoyers, L. (2004). WISP-1 is an osteoblastic regulator expressed during skeletal development and fracture repair. *Am. J. Pathol.* *165*, 855–867.
- Fries, K.M., Blieden, T., Looney, R.J., Sempowski, G.D., Silvera, M.R., Willis, R.A., and Phipps, R.P. (1994). Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* *72*, 283–292.
- Furtado, M.B., Costa, M.W., Pranoto, E.A., Salimova, E., Pinto, A.R., Lam, N.T., Park, A., Snider, P., Chandran, A., Harvey, R.P., et al. (2014). Cardiogenic Genes Expressed in Cardiac Fibroblasts Contribute to Heart Development and Repair Novelty and Significance. *Circ. Res.* *114*, 1422–1434.
- Gabbiani, G. (2003). The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J. Pathol.* *200*, 500–503.
- Gahéry-Ségard, H., Farace, F., Godfrin, D., Gaston, J., Lengagne, R., Tursz, T., Boulanger, P., and Guillet, J.G. (1998). Immune response to recombinant capsid proteins of adenovirus in humans: antifiber and anti-penton base antibodies have a synergistic effect on neutralizing activity. *J. Virol.* *72*, 2388–2397.
- Gao, R., and Brigstock, D.R. (2004). Connective tissue growth factor (CCN2) induces adhesion of rat activated hepatic stellate cells by binding of its C-terminal domain to integrin alpha(v)beta(3) and heparan sulfate proteoglycan. *J. Biol. Chem.* *279*, 8848–8855.
- Gao, R., and Brigstock, D.R. (2006). A novel integrin alpha5beta1 binding domain in module 4 of connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) promotes adhesion and migration of activated pancreatic stellate cells. *Gut* *55*, 856–862.
- Gao, M.H., Lai, N.C., McKirnan, M.D., Roth, D.A., Rubanyi, G.M., Dalton, N., Roth, D.M., and Hammond, H.K. (2004). Increased regional function and perfusion after intracoronary delivery of adenovirus encoding fibroblast growth factor 4: report of preclinical data. *Hum. Gene Ther.* *15*, 574–587.
- Gaudesius, G., Miragoli, M., Thomas, S.P., and Rohr, S. (2003). Coupling of cardiac electrical activity over extended distances by fibroblasts of cardiac origin. *Circ. Res.* *93*, 421–428.
- Gilbane, A.J., Denton, C.P., and Holmes, A.M. (2013). Scleroderma pathogenesis: a pivotal role for fibroblasts as effector cells. *Arthritis Res. Ther.* *15*, 215.
- Goldsmith, E.C., Bradshaw, A.D., Zile, M.R., and Spinale, F.G. (2014). Myocardial fibroblast–matrix interactions and potential therapeutic targets. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *70*, 92–99.
- Gray, M.R., Malmquist, J.A., Sullivan, M., Blea, M., and Castellot, J.J. (2007). CCN5 Expression in mammals. II. Adult rodent tissues. *J. Cell Commun. Signal.* *1*, 145–158.
- Gregory, L.G., Harbottle, R.P., Lawrence, L., Knapton, H.J., Themis, M., and Coutelle, C. (2003). Enhancement of Adenovirus-Mediated Gene Transfer to the Airways by DEAE Dextran and Sodium Caprate in Vivo. *Mol. Ther.* *7*, 19–26.

- Grimson, A., Farh, K.K.-H., Johnston, W.K., Garrett-Engele, P., Lim, L.P., and Bartel, D.P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol. Cell* 27, 91–105.
- Guo, Y., Zeng, Q., Zhang, C., Zhang, X., Li, R., Wu, J., Guan, J., Liu, L., Zhang, X., Li, J., et al. (2013). Extracellular matrix of mechanically stretched cardiac fibroblasts improves viability and metabolic activity of ventricular cells. *Int. J. Med. Sci.* 10, 1837–1845.
- Gupta, V., and Grande-Allen, K.J. (2006). Effects of static and cyclic loading in regulating extracellular matrix synthesis by cardiovascular cells. *Cardiovasc. Res.* 72, 375–383.
- Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., and Longaker, M.T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature* 453, 314–321.
- Haase, A.D., Jaskiewicz, L., Zhang, H., Lainé, S., Sack, R., Gatignol, A., and Filipowicz, W. (2005). TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep.* 6, 961–967.
- Hajjar, R.J. (2013). Potential of gene therapy as a treatment for heart failure. *J. Clin. Invest.* 123, 53–61.
- Halic, M., and Moazed, D. (2010). Dicer-independent primal RNAs trigger RNAi and heterochromatin formation. *Cell* 140, 504–516.
- Hall-Glenn, F., and Lyons, K.M. (2011). Roles for CCN2 in normal physiological processes. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 68, 3209–3217.
- Hammond, H.K., Penny, W.F., Traverse, J.H., Henry, T.D., Watkins, M.W., Yancy, C.W., Sweis, R.N., Adler, E.D., Patel, A.N., Murray, D.R., et al. (2016). Intracoronary Gene Transfer of Adenylyl Cyclase 6 in Patients With Heart Failure: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol.* 1, 163–171.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Kim, Y.-K., Jin, H., and Kim, V.N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 18, 3016–3027.
- Harvey, R.P., and Rosenthal, N. (1999). *Heart Development* (New York: Academic).
- Hashimoto, G., Inoki, I., Fujii, Y., Aoki, T., Ikeda, E., and Okada, Y. (2002). Matrix metalloproteinases cleave connective tissue growth factor and reactivate angiogenic activity of vascular endothelial growth factor 165. *J. Biol. Chem.* 277, 36288–36295.
- Hawwa, R.L., Hokenson, M.A., Wang, Y., Huang, Z., Sharma, S., and Sanchez-Esteban, J. (2011). Differential expression of MMP-2 and -9 and their inhibitors in fetal lung cells exposed to mechanical stretch: regulation by IL-10. *Lung* 189, 341–349.
- Hazebroek, M., Dennert, R., and Heymans, S. (2012). Idiopathic dilated cardiomyopathy: possible triggers and treatment strategies. *Neth. Heart J. Mon. J. Neth. Soc. Cardiol. Neth. Heart Found.* 20, 332–335.
- Heath, E., Tahri, D., Andermarcher, E., Schofield, P., Fleming, S., and Boulter, C.A. (2008). Abnormal skeletal and cardiac development, cardiomyopathy, muscle atrophy and cataracts in mice with a targeted disruption of the *Nov* (*Ccn3*) gene. *BMC Dev. Biol.* 8, 18.
- Hecker, L., Jagirdar, R., Jin, T., and Thannickal, V.J. (2011). Reversible differentiation of myofibroblasts by MyoD. *Exp. Cell Res.* 317, 1914–1921.

- Heimer, R., Bashey, R.I., Kyle, J., and Jimenez, S.A. (1995). TGF-beta modulates the synthesis of proteoglycans by myocardial fibroblasts in culture. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *27*, 2191–2198.
- Heineke, J., and Molkentin, J.D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 589–600.
- Hershberger, R.E., Lindenfeld, J., Mestroni, L., Seidman, C.E., Taylor, M.R.G., and Towbin, J.A. (2009). Genetic Evaluation of Cardiomyopathy—A Heart Failure Society of America Practice Guideline. *J. Card. Fail.* *15*, 83–97.
- Heymans, S., Hirsch, E., Anker, S.D., Aukrust, P., Balligand, J.-L., Cohen-Tervaert, J.W., Drexler, H., Filippatos, G., Felix, S.B., Gullestad, L., et al. (2009). Inflammation as a therapeutic target in heart failure? A scientific statement from the Translational Research Committee of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur. J. Heart Fail.* *11*, 119–129.
- Hilfiker-Kleiner, D., Hilfiker, A., Fuchs, M., Kaminski, K., Schaefer, A., Schieffer, B., Hillmer, A., Schmiedl, A., Ding, Z., Podewski, E., et al. (2004). Signal transducer and activator of transcription 3 is required for myocardial capillary growth, control of interstitial matrix deposition, and heart protection from ischemic injury. *Circ. Res.* *95*, 187–195.
- Hill, J.A., and Olson, E.N. (2008). Cardiac plasticity. *N. Engl. J. Med.* *358*, 1370–1380.
- Hinz, B., Phan, S.H., Thannickal, V.J., Prunotto, M., Desmoulière, A., Varga, J., De Wever, O., Mareel, M., and Gabbiani, G. (2012). Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am. J. Pathol.* *180*, 1340–1355.
- Hirota, H., Yoshida, K., Kishimoto, T., and Taga, T. (1995). Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 4862–4866.
- Hirota, H., Chen, J., Betz, U.A., Rajewsky, K., Gu, Y., Ross, J., Müller, W., and Chien, K.R. (1999). Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell* *97*, 189–198.
- Höck, J., and Meister, G. (2008). The Argonaute protein family. *Genome Biol.* *9*, 210.
- Holbourn, K.P., Acharya, K.R., and Perbal, B. (2008). The CCN family of proteins: structure-function relationships. *Trends Biochem. Sci.* *33*, 461–473.
- Horn, M.A., and Trafford, A.W. (2016). Aging and the cardiac collagen matrix: Novel mediators of fibrotic remodelling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *93*, 175–185.
- Horstmeyer, A., Licht, C., Scherr, G., Eckes, B., and Krieg, T. (2005). Signalling and regulation of collagen I synthesis by ET-1 and TGF-beta1. *FEBS J.* *272*, 6297–6309.
- Hou, C.-H., Tang, C.-H., Hsu, C.-J., Hou, S.-M., and Liu, J.-F. (2013). CCN4 induces IL-6 production through $\alpha v \beta 5$ receptor, PI3K, Akt, and NF- κ B signaling pathway in human synovial fibroblasts. *Arthritis Res. Ther.* *15*, R19.
- Howard, C.M., and Baudino, T.A. (2014). Dynamic cell–cell and cell–ECM interactions in the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *70*, 19–26.
- Hoyles, R.K., Derrett-Smith, E.C., Khan, K., Shiwen, X., Howat, S.L., Wells, A.U., Abraham, D.J., and Denton, C.P. (2011). An essential role for resident fibroblasts in experimental lung fibrosis is defined

by lineage-specific deletion of high-affinity type II transforming growth factor β receptor. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **183**, 249–261.

Hung, C., Linn, G., Chow, Y.-H., Kobayashi, A., Mittelsteadt, K., Altemeier, W.A., Gharib, S.A., Schnapp, L.M., and Duffield, J.S. (2013). Role of lung pericytes and resident fibroblasts in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **188**, 820–830.

Husse, B., Briest, W., Homagk, L., Isenberg, G., and Gekle, M. (2007). Cyclical mechanical stretch modulates expression of collagen I and collagen III by PKC and tyrosine kinase in cardiac fibroblasts. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **293**, R1898–R1907.

Hutvagner, G., and Simard, M.J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 22–32.

Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Bálint, E., Tuschl, T., and Zamore, P.D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* **293**, 834–838.

Igarashi, A., Okochi, H., Bradham, D.M., and Grotendorst, G.R. (1993). Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol. Biol. Cell* **4**, 637–645.

Irvine, D.V., Zaratiegui, M., Tolia, N.H., Goto, D.B., Chitwood, D.H., Vaughn, M.W., Joshua-Tor, L., and Martienssen, R.A. (2006). Argonaute slicing is required for heterochromatic silencing and spreading. *Science* **313**, 1134–1137.

Isner, J.M. (2002). Myocardial gene therapy. *Nature* **415**, 234–239.

Itasaki, N., Jones, C.M., Mercurio, S., Rowe, A., Domingos, P.M., Smith, J.C., and Krumlauf, R. (2003). Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling. *Dev. Camb. Engl.* **130**, 4295–4305.

Ito, T.-K., Ishii, G., Chiba, H., and Ochiai, A. (2007). The VEGF angiogenic switch of fibroblasts is regulated by MMP-7 from cancer cells. *Oncogene* **26**, 7194–7203.

Jacobsen, F., Hirsch, T., Mittler, D., Schulte, M., Lehnhardt, M., Druecke, D., Homann, H.H., Steinau, H.U., and Steinstraesser, L. (2006). Polybrene improves transfection efficacy of recombinant replication-deficient adenovirus in cutaneous cells and burned skin. *J. Gene Med.* **8**, 138–146.

Jaski, B.E., Jessup, M.L., Mancini, D.M., Cappola, T.P., Pauly, D.F., Greenberg, B., Borow, K., Dittrich, H., Zsebo, K.M., Hajjar, R.J., et al. (2009). Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID Trial), a first-in-human phase 1/2 clinical trial. *J. Card. Fail.* **15**, 171–181.

Jessup, M., Greenberg, B., Mancini, D., Cappola, T., Pauly, D.F., Jaski, B., Yaroshinsky, A., Zsebo, K.M., Dittrich, H., Hajjar, R.J., et al. (2011). Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in patients with advanced heart failure. *Circulation* **124**, 304–313.

Jiang, X.-Y., and Ning, Q.-L. (2014). Expression profiling of long noncoding RNAs and the dynamic changes of lncRNA-NR024118 and Cdkn1c in angiotensin II-treated cardiac fibroblasts. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **7**, 1325–1336.

- Jiang, X., Zhang, F., and Ning, Q. (2015). Losartan reverses the down-expression of long noncoding RNA-NR024118 and Cdkn1c induced by angiotensin II in adult rat cardiac fibroblasts. *Pathol. Biol. (Paris)* *63*, 122–125.
- Jinde, K., Nikolic-Paterson, D.J., Huang, X.R., Sakai, H., Kurokawa, K., Atkins, R.C., and Lan, H.Y. (2001). Tubular phenotypic change in progressive tubulointerstitial fibrosis in human glomerulonephritis. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* *38*, 761–769.
- Jun, J.-I., and Lau, L.F. (2010). The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat. Cell Biol.* *12*, 676–685.
- Jun, J.-I., and Lau, L.F. (2011). Taking aim at the extracellular matrix: CCN proteins as emerging therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* *10*, 945–963.
- Jun, J.-I., and Lau, L.F. (2016). CCN2 induces cellular senescence in fibroblasts. *J. Cell Commun. Signal.*
- Kaden, J.J., Kiliç, R., Sarikoç, A., Hagl, S., Lang, S., Hoffmann, U., Brueckmann, M., and Borggrefe, M. (2005). Tumor necrosis factor alpha promotes an osteoblast-like phenotype in human aortic valve myofibroblasts: a potential regulatory mechanism of valvular calcification. *Int. J. Mol. Med.* *16*, 869–872.
- Kakkar, R., and Lee, R.T. (2010). Intramyocardial fibroblast myocyte communication. *Circ. Res.* *106*, 47–57.
- Kallwellis-Opara, A., Dörner, A., Poller, W.-C., Noutsias, M., Kühl, U., Schultheiss, H.-P., and Pauschinger, M. (2007). Autoimmunological features in inflammatory cardiomyopathy. *Clin. Res. Cardiol. Off. J. Ger. Card. Soc.* *96*, 469–480.
- Kamimura, D., Ishihara, K., and Hirano, T. (2003). IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* *149*, 1–38.
- Kanekar, S., Hirozanne, T., Terracio, L., and Borg, T.K. (1998). Cardiac fibroblasts form and function. *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.* *7*, 127–133.
- Kanellakis, P., Ditiatkovski, M., Kostolias, G., and Bobik, A. (2012). A pro-fibrotic role for interleukin-4 in cardiac pressure overload. *Cardiovasc. Res.* *95*, 77–85.
- Kania, G., Blyszczuk, P., Müller-Edenborn, B., and Eriksson, U. (2013). Novel therapeutic options in inflammatory cardiomyopathy. *Swiss Med. Wkly.* *143*, w13841.
- Kaski, J.C., and Consuegra-Sanchez, L. (2013). Evaluation of ASPIRE trial: a Phase III pivotal registration trial, using intracoronary administration of Generx (Ad5FGF4) to treat patients with recurrent angina pectoris. *Expert Opin. Biol. Ther.* *13*, 1749–1753.
- Kato, H., Goto, D.B., Martienssen, R.A., Urano, T., Furukawa, K., and Murakami, Y. (2005). RNA polymerase II is required for RNAi-dependent heterochromatin assembly. *Science* *309*, 467–469.
- Katoh, M., and Katoh, M. (2005). Comparative genomics on Norrie disease gene. *Int. J. Mol. Med.* *15*, 885–889.
- Katsube, K., Sakamoto, K., Tamamura, Y., and Yamaguchi, A. (2009). Role of CCN, a vertebrate specific gene family, in development. *Dev. Growth Differ.* *51*, 55–67.

- Kaufmann, K.B., Büning, H., Galy, A., Schambach, A., and Grez, M. (2013). Gene therapy on the move. *EMBO Mol. Med.* *5*, 1642–1661.
- Kawaguchi, M., Takahashi, M., Hata, T., Kashima, Y., Usui, F., Morimoto, H., Izawa, A., Takahashi, Y., Masumoto, J., Koyama, J., et al. (2011). Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* *123*, 594–604.
- Kay, M.A., Glorioso, J.C., and Naldini, L. (2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat. Med.* *7*, 33–40.
- Kendall, R.T., and Feghali-Bostwick, C.A. (2014). Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front. Pharmacol.* *5*, 123.
- Khan, K., Xu, S., Nihtyanova, S., Derrett-Smith, E., Abraham, D., Denton, C.P., and Ong, V.H. (2012). Clinical and pathological significance of interleukin 6 overexpression in systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* *71*, 1235–1242.
- Kilian, E.G., Sadoni, S., Vicol, C., Kelly, R., van Hulst, K., Schwaiger, M., Kupatt, C., Boekstegers, P., Pillai, R., Channon, K., et al. (2010). Myocardial transfection of hypoxia inducible factor-1alpha via an adenoviral vector during coronary artery bypass grafting. - A multicenter phase I and safety study -. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* *74*, 916–924.
- Kim, D.H., and Rossi, J.J. (2007). Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat. Rev. Genet.* *8*, 173–184.
- Kim, S.-G., Akaike, T., Sasagawa, T., Atomi, Y., and Kurosawa, H. (2002). Gene expression of type I and type III collagen by mechanical stretch in anterior cruciate ligament cells. *Cell Struct. Funct.* *27*, 139–144.
- Kim, V.N., Han, J., and Siomi, M.C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 126–139.
- Kisseleva, T., Cong, M., Paik, Y., Scholten, D., Jiang, C., Benner, C., Iwaisako, K., Moore-Morris, T., Scott, B., Tsukamoto, H., et al. (2012). Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 9448–9453.
- Klenotic, P.A., Zhang, C., and Lin, Z. (2016). Emerging roles of CCN proteins in vascular development and pathology. *J. Cell Commun. Signal.* *10*, 251–257.
- Klingberg, F., Chow, M.L., Koehler, A., Boo, S., Buscemi, L., Quinn, T.M., Costell, M., Alman, B.A., Genot, E., and Hinz, B. (2014). Prestress in the extracellular matrix sensitizes latent TGF- β 1 for activation. *J Cell Biol* *207*, 283–297.
- Knuefermann, P., Vallejo, J., and Mann, D.L. (2004). The role of innate immune responses in the heart in health and disease. *Trends Cardiovasc. Med.* *14*, 1–7.
- Kohl, P. (2003). Heterogeneous cell coupling in the heart: an electrophysiological role for fibroblasts. *Circ. Res.* *93*, 381–383.
- Kohl, P., and Gourdie, R.G. (2014). Fibroblast-myocyte electrotonic coupling: does it occur in native cardiac tissue? *J. Mol. Cell. Cardiol.* *70*, 37–46.
- Köhncke, C., Lisewski, U., Schleußner, L., Gaertner, C., Reichert, S., and Roepke, T.K. (2013). Isolation and Kv channel recordings in murine atrial and ventricular cardiomyocytes. *J. Vis. Exp. JoVE* e50145.

- Koitabashi, N., and Kass, D.A. (2012). Reverse remodeling in heart failure--mechanisms and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cardiol.* *9*, 147–157.
- Komatsu, M., Nakamura, Y., Maruyama, M., Abe, K., Watanapokasin, R., and Kato, H. (2015). Expression profiles of human CCN genes in patients with osteoarthritis or rheumatoid arthritis. *J. Orthop. Sci. Off. J. Jpn. Orthop. Assoc.* *20*, 708–716.
- Königshoff, M., Kramer, M., Balsara, N., Wilhelm, J., Amarie, O.V., Jahn, A., Rose, F., Fink, L., Seeger, W., Schaefer, L., et al. (2009). WNT1-inducible signaling protein-1 mediates pulmonary fibrosis in mice and is upregulated in humans with idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* *119*, 772–787.
- Koshman, Y.E., Patel, N., Chu, M., Iyengar, R., Kim, T., Ersahin, C., Lewis, W., Heroux, A., and Samarel, A.M. (2013). Regulation of connective tissue growth factor gene expression and fibrosis in human heart failure. *J. Card. Fail.* *19*, 283–294.
- Kranias, E.G., and Hajjar, R.J. (2012). Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome. *Circ. Res.* *110*, 1646–1660.
- Krause, A., Joh, J.H., Hackett, N.R., Roelvink, P.W., Bruder, J.T., Wickham, T.J., Kovsdi, I., Crystal, R.G., and Worgall, S. (2006). Epitopes expressed in different adenovirus capsid proteins induce different levels of epitope-specific immunity. *J. Virol.* *80*, 5523–5530.
- Krek, A., Grün, D., Poy, M.N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E.J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K.C., Stoffel, M., et al. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* *37*, 495–500.
- Krishnamurthy, P., Rajasingh, J., Lambers, E., Qin, G., Losordo, D.W., and Kishore, R. (2009). IL-10 inhibits inflammation and attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction via activation of STAT3 and suppression of HuR. *Circ. Res.* *104*, e9-18.
- Kubota, S., and Takigawa, M. (2013). The CCN family acting throughout the body: recent research developments. *Biomol. Concepts* *4*, 477–494.
- Kubota, S., Kawaki, H., Kondo, S., Yosimichi, G., Minato, M., Nishida, T., Hanagata, H., Miyauchi, A., and Takigawa, M. (2006). Multiple activation of mitogen-activated protein kinases by purified independent CCN2 modules in vascular endothelial cells and chondrocytes in culture. *Biochimie* *88*, 1973–1981.
- Kühl, U., Pauschinger, M., Schwimmbeck, P.L., Seeberg, B., Lober, C., Noutsias, M., Poller, W., and Schultheiss, H.-P. (2003). Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation* *107*, 2793–2798.
- Kühl, U., Pauschinger, M., Noutsias, M., Seeberg, B., Bock, T., Lassner, D., Poller, W., Kandolf, R., and Schultheiss, H.-P. (2005). High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with “idiopathic” left ventricular dysfunction. *Circulation* *111*, 887–893.
- Kühl, U., Lassner, D., von Schlippenbach, J., Poller, W., and Schultheiss, H.-P. (2012). Interferon-Beta improves survival in enterovirus-associated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* *60*, 1295–1296.
- Lajiness, J.D., and Conway, S.J. (2014). Origin, development, and differentiation of cardiac fibroblasts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *70*, 2–8.

- Lake, A.C., and Castellot, J.J. (2003). CCN5 modulates the antiproliferative effect of heparin and regulates cell motility in vascular smooth muscle cells. *Cell Commun. Signal. CCS* 1, 5.
- Lam, J.K.W., Chow, M.Y.T., Zhang, Y., and Leung, S.W.S. (2015). siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol. Ther. — Nucleic Acids* 4, e252.
- Lam, P., Khan, G., Stripecke, R., Hui, K.M., Kasahara, N., Peng, K.-W., and Guinn, B.-A. (2013). The innovative evolution of cancer gene and cellular therapies. *Cancer Gene Ther.* 20, 141–149.
- Lamkanfi, M., Declercq, W., Kalai, M., Saelens, X., and Vandenabeele, P. (2002). Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ.* 9, 358–361.
- Lang, R.M., Badano, L.P., Mor-Avi, V., Afilalo, J., Armstrong, A., Ernande, L., Flachskampf, F.A., Foster, E., Goldstein, S.A., Kuznetsova, T., et al. (2015). Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging* 16, 233–270.
- Lau, L.F. (2012). CCN1 and CCN2: blood brothers in angiogenic action. *J. Cell Commun. Signal.* 6, 121–123.
- Lau, N.C. (2010). Small RNAs in the animal gonad: guarding genomes and guiding development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1334–1347.
- Lau, L.F., and Lam, S.C. (1999). The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. *Exp. Cell Res.* 248, 44–57.
- Leask, A. (2010). Yin and Yang Part Deux: CCN5 inhibits the pro-fibrotic effects of CCN2. *J. Cell Commun. Signal.* 4, 155–156.
- Leask, A., and Abraham, D.J. (2006a). All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *J. Cell Sci.* 119, 4803–4810.
- Leask, A., and Abraham, D.J. (2006b). All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *J. Cell Sci.* 119, 4803–4810.
- Leask, A., Parapuram, S.K., Shi-Wen, X., and Abraham, D.J. (2009). Connective tissue growth factor (CTGF, CCN2) gene regulation: a potent clinical bio-marker of fibroproliferative disease? *J. Cell Commun. Signal.* 3, 89–94.
- Lee, H.-C., Li, L., Gu, W., Xue, Z., Crosthwaite, S.K., Pertsemliadis, A., Lewis, Z.A., Freitag, M., Selker, E.U., Mello, C.C., et al. (2010). Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer-independent small interfering RNAs in fungi. *Mol. Cell* 38, 803–814.
- Lee, H.-Y., Chung, J.-W., Youn, S.-W., Kim, J.-Y., Park, K.-W., Koo, B.-K., Oh, B.-H., Park, Y.-B., Chaqour, B., Walsh, K., et al. (2007). Forkhead transcription factor FOXO3a is a negative regulator of angiogenic immediate early gene CYR61, leading to inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *Circ. Res.* 100, 372–380.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.
- Leu, S.-J., Lam, S.C.-T., and Lau, L.F. (2002). Pro-angiogenic activities of CYR61 (CCN1) mediated through integrins α v β 3 and α 6 β 1 in human umbilical vein endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 277, 46248–46255.

- Lévy, B.I. (2006). Microvascular plasticity and experimental heart failure. *Hypertension* 47, 827–829.
- Lewis, B.P., Shih, I. -hun., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Burge, C.B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115, 787–798.
- LeWitt, P.A., Rezai, A.R., Leehey, M.A., Ojemann, S.G., Flaherty, A.W., Eskandar, E.N., Kostyk, S.K., Thomas, K., Sarkar, A., Siddiqui, M.S., et al. (2011). AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet Neurol.* 10, 309–319.
- Li, L., Lin, X., Khvorova, A., Fesik, S.W., and Shen, Y. (2007). Defining the optimal parameters for hairpin-based knockdown constructs. *RNA N. Y. N* 13, 1765–1774.
- Li, Y.Y., Feldman, A.M., Sun, Y., and McTiernan, C.F. (1998). Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in the failing human heart. *Circulation* 98, 1728–1734.
- Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., and Johnson, J.M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433, 769–773.
- Limberis, M.P. (2012). Phoenix rising: gene therapy makes a comeback. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 44, 632–640.
- Lindner, D., Zietsch, C., Becher, P.M., Schulze, K., Schultheiss, H.-P., Tschöpe, C., and Westermann, D. (2012). Differential expression of matrix metalloproteinases in human fibroblasts with different origins. *Biochem. Res. Int.* 2012, 875742.
- Lindner, D., Zietsch, C., Tank, J., Sossalla, S., Fluschnik, N., Hinrichs, S., Maier, L., Poller, W., Blankenberg, S., Schultheiss, H.-P., et al. (2014). Cardiac fibroblasts support cardiac inflammation in heart failure. *Basic Res. Cardiol.* 109, 428.
- Lindsey, M.L., Escobar, G.P., Mukherjee, R., Goshorn, D.K., Sheats, N.J., Bruce, J.A., Mains, I.M., Hendrick, J.K., Hewett, K.W., Gourdie, R.G., et al. (2006). Matrix Metalloproteinase-7 Affects Connexin-43 Levels, Electrical Conduction, and Survival After Myocardial Infarction. *Circulation* 113, 2919–2928.
- Lipson, K.E., Wong, C., Teng, Y., and Spong, S. (2012). CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 5, S24.
- Liu, Y. (2004). Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 15, 1–12.
- Liu, P.P., and Opavsky, M.A. (2000). Viral myocarditis: receptors that bridge the cardiovascular with the immune system? *Circ. Res.* 86, 253–254.
- Liu, H.S., Jan, M.S., Chou, C.K., Chen, P.H., and Ke, N.J. (1999). Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260, 712–717.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., and Parker, R. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol.* 7, 719–723.
- Liu, S., Shi-wen, X., Abraham, D.J., and Leask, A. (2011). CCN2 is required for bleomycin-induced skin fibrosis in mice. *Arthritis Rheum.* 63, 239–246.

- Liu, Y.P., Vink, M.A., Westerink, J.-T., Ramirez de Arellano, E., Konstantinova, P., Ter Brake, O., and Berkhout, B. (2010). Titers of lentiviral vectors encoding shRNAs and miRNAs are reduced by different mechanisms that require distinct repair strategies. *RNA N. Y. N* 16, 1328–1339.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25, 402–408.
- Louault, C., Benamer, N., Faivre, J.-F., Potreau, D., and Bescond, J. (2008). Implication of connexins 40 and 43 in functional coupling between mouse cardiac fibroblasts in primary culture. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 2097–2104.
- Lubini, P., Zürcher, W., and Egli, M. (1994). Stabilizing effects of the RNA 2'-substituent: crystal structure of an oligodeoxynucleotide duplex containing 2'-O-methylated adenosines. *Chem. Biol.* 1, 39–45.
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303, 95–98.
- Lyon, A.R., Sato, M., Hajjar, R.J., Samulski, R.J., and Harding, S.E. (2008). Gene therapy: targeting the myocardium. *Heart Br. Card. Soc.* 94, 89–99.
- Lyon, R.C., Zanella, F., Omens, J.H., and Sheikh, F. (2015). Mechanotransduction in Cardiac Hypertrophy and Failure. *Circ. Res.* 116, 1462–1476.
- MacKenna, D., Summerour, S.R., and Villarreal, F.J. (2000). Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. *Cardiovasc. Res.* 46, 257–263.
- MacRae, I.J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C.V., and Doudna, J.A. (2008). In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 512–517.
- Maillet, M., van Berlo, J.H., and Molkentin, J.D. (2013). Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 38–48.
- Maisch, B., Outzen, H., Roth, D., Hiby, A., Herzum, M., Hengstenberg, C., Hufnagel, G., Schönian, U., and Kochsiek, K. (1991). Prognostic determinants in conventionally treated myocarditis and perimyocarditis--focus on antimyolemmal antibodies. *Eur. Heart J.* 12 *Suppl D*, 81–87.
- Maisch, B., Bültman, B., Factor, S., Gröne, H.J., Hufnagel, K.K., Kühl, U., Olsen, E.J., Pankuweit, S., and Virmani, R. (1999). World Heart Federation consensus conference's definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): report from two expert committees on histology and viral cardiomyopathy. *Heartbeat* 4, 3–4.
- Maisch, B., Portig, I., Ristic, A., Hufnagel, G., and Pankuweit, S. (2000). Definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): on the way to consensus. A status report. *Herz* 25, 200–209.
- Maisch, B., Ristić, A.D., Hufnagel, G., Funck, R., Alter, P., Tontsch, D., and Pankuweit, S. (2002). Dilated cardiomyopathies as a cause of congestive heart failure. *Herz* 27, 113–134.
- Maisch, B., Ristic, A.D., Portig, I., and Pankuweit, S. (2003). Human viral cardiomyopathy. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 8, s39-67.
- Maisch, B., Richter, A., Koelsch, S., Alter, P., Funck, R., and Pankuweit, S. (2006). Management of patients with suspected (peri-)myocarditis and inflammatory dilated cardiomyopathy. *Herz* 31, 881–890.

- Maisch, B., Noutsias, M., Ruppert, V., Richter, A., and Pankuweit, S. (2012). Cardiomyopathies: classification, diagnosis, and treatment. *Heart Fail. Clin.* *8*, 53–78.
- Mäkinen, P.I., Koponen, J.K., Kärkkäinen, A.-M., Malm, T.M., Pulkkinen, K.H., Koistinaho, J., Turunen, M.P., and Ylä-Herttua, S. (2006). Stable RNA interference: comparison of U6 and H1 promoters in endothelial cells and in mouse brain. *J. Gene Med.* *8*, 433–441.
- Malik, A.R., Liszewska, E., and Jaworski, J. (2015). Matricellular proteins of the Cyr61/CTGF/NOV (CCN) family and the nervous system. *Front. Cell. Neurosci.* *9*, 237.
- Manabe, I., Shindo, T., and Nagai, R. (2002). Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* *91*, 1103–1113.
- Maron, B.J., Towbin, J.A., Thiene, G., Antzelevitch, C., Corrado, D., Arnett, D., Moss, A.J., Seidman, C.E., and Young, J.B. (2006). Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies: An American Heart Association Scientific Statement From the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* *113*, 1807–1816.
- Marrero, M.B., Schieffer, B., Paxton, W.G., Heerdt, L., Berk, B.C., Delafontaine, P., and Bernstein, K.E. (1995). Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature* *375*, 247–250.
- Mason, J.W. (2003). Myocarditis and dilated cardiomyopathy: an inflammatory link. *Cardiovasc. Res.* *60*, 5–10.
- Mason, H.R., Lake, A.C., Wubben, J.E., Nowak, R.A., and Castellot, J.J. (2004). The growth arrest-specific gene CCN5 is deficient in human leiomyomas and inhibits the proliferation and motility of cultured human uterine smooth muscle cells. *Mol. Hum. Reprod.* *10*, 181–187.
- Matthijs Blankesteyn, W. (2015). Has the search for a marker of activated fibroblasts finally come to an end? *J. Mol. Cell. Cardiol.* *88*, 120–123.
- McFarland, T.J., Zhang, Y., Appukuttan, B., and Stout, J.T. (2004). Gene therapy for proliferative ocular diseases. *Expert Opin. Biol. Ther.* *4*, 1053–1058.
- McKleroy, W., Lee, T.-H., and Atabai, K. (2013). Always cleave up your mess: targeting collagen degradation to treat tissue fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *304*, L709-721.
- McMurray, J.J.V., Adamopoulos, S., Anker, S.D., Auricchio, A., Böhm, M., Dickstein, K., Falk, V., Filippatos, G., Fonseca, C., Gomez-Sanchez, M.A., et al. (2012). ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur. J. Heart Fail.* *14*, 803–869.
- Mehta, J.L., and Li, D.Y. (1999). Inflammation in ischemic heart disease: response to tissue injury or a pathogenetic villain? *Cardiovasc. Res.* *43*, 291–299.
- Meister, G., and Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* *431*, 343–349.
- Mello, C.C., and Conte, D. (2004). Revealing the world of RNA interference. *Nature* *431*, 338–342.

- Mercurio, S., Latinkic, B., Itasaki, N., Krumlauf, R., and Smith, J.C. (2004). Connective-tissue growth factor modulates WNT signalling and interacts with the WNT receptor complex. *Dev. Camb. Engl.* *131*, 2137–2147.
- Mestroni, L., Maisch, B., McKenna, W.J., Schwartz, K., Charron, P., Rocco, C., Tesson, F., Richter, A., Wilke, A., and Komajda, M. (1999). Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies. Collaborative Research Group of the European Human and Capital Mobility Project on Familial Dilated Cardiomyopathy. *Eur. Heart J.* *20*, 93–102.
- Meyer, K., Hodwin, B., Ramanujam, D., Engelhardt, S., and Sarikas, A. (2016). Essential Role for Premature Senescence of Myofibroblasts in Myocardial Fibrosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* *67*, 2018–2028.
- Mezzano, V., Pellman, J., and Sheikh, F. (2014). Cell Junctions in the Specialized Conduction System of the Heart. *Cell Commun. Adhes.* *21*, 149–159.
- Midwood, K.S., Williams, L.V., and Schwarzbauer, J.E. (2004). Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *36*, 1031–1037.
- Mills, R.M., and Lauer, M.S. (2004). Endomyocardial biopsy: a procedure in search of an indication. *Am. Heart J.* *147*, 759–760.
- Miragoli, M., Gaudesius, G., and Rohr, S. (2006). Electrotonic modulation of cardiac impulse conduction by myofibroblasts. *Circ. Res.* *98*, 801–810.
- Miragoli, M., Salvarani, N., and Rohr, S. (2007). Myofibroblasts induce ectopic activity in cardiac tissue. *Circ. Res.* *101*, 755–758.
- Mitchell, G.F., Pfeffer, J.M., and Pfeffer, M.A. (1997). The transition to failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am. J. Hypertens.* *10*, 120S–126S.
- Mo, F.-E., and Lau, L.F. (2006). The matricellular protein CCN1 is essential for cardiac development. *Circ. Res.* *99*, 961–969.
- Monia, B.P., Lesnik, E.A., Gonzalez, C., Lima, W.F., McGee, D., Guinosso, C.J., Kawasaki, A.M., Cook, P.D., and Freier, S.M. (1993). Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2'-deoxy gaps as antisense inhibitors of gene expression. *J. Biol. Chem.* *268*, 14514–14522.
- Montgomery, M.K., Xu, S., and Fire, A. (1998). RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 15502–15507.
- Moorman, A.F.M., and Christoffels, V.M. (2003). Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. *Physiol. Rev.* *83*, 1223–1267.
- Morgera, T., Di Lenarda, A., Dreas, L., Pinamonti, B., Humar, F., Bussani, R., Silvestri, F., Chersevani, D., and Camerini, F. (1992). Electrocardiography of myocarditis revisited: clinical and prognostic significance of electrocardiographic changes. *Am. Heart J.* *124*, 455–467.
- Mori, T., Kawara, S., Shinozaki, M., Hayashi, N., Kakinuma, T., Igarashi, A., Takigawa, M., Nakanishi, T., and Takehara, K. (1999). Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *J. Cell. Physiol.* *181*, 153–159.
- Mosterd, A., Hoes, A.W., de Bruyne, M.C., Deckers, J.W., Linker, D.T., Hofman, A., and Grobbee, D.E. (1999). Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in the general population; The Rotterdam Study. *Eur. Heart J.* *20*, 447–455.

- Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2002). miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev.* *16*, 720–728.
- Mueller, E.E., Momen, A., Massé, S., Zhou, Y.-Q., Liu, J., Backx, P.H., Henkelman, R.M., Nanthakumar, K., Stewart, D.J., and Husain, M. (2011). Electrical remodelling precedes heart failure in an endothelin-1-induced model of cardiomyopathy. *Cardiovasc. Res.* *89*, 623–633.
- Nag, A.C. (1980). Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios* *28*, 41–61.
- Nagase, H., and Woessner, J.F. (1999). Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* *274*, 21491–21494.
- Ng, Y.Y., Huang, T.P., Yang, W.C., Chen, Z.P., Yang, A.H., Mu, W., Nikolic-Paterson, D.J., Atkins, R.C., and Lan, H.Y. (1998). Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Int.* *54*, 864–876.
- Nian, M., Lee, P., Khaper, N., and Liu, P. (2004). Inflammatory Cytokines and Postmyocardial Infarction Remodeling. *Circ. Res.* *94*, 1543–1553.
- Nishida, T., Kubota, S., Fukunaga, T., Kondo, S., Yosimichi, G., Nakanishi, T., Takano-Yamamoto, T., and Takigawa, M. (2003). CTGF/Hcs24, hypertrophic chondrocyte-specific gene product, interacts with perlecan in regulating the proliferation and differentiation of chondrocytes. *J. Cell. Physiol.* *196*, 265–275.
- Nishikawa, M., and Huang, L. (2001). Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Hum. Gene Ther.* *12*, 861–870.
- Norris, R.A., Borg, T.K., Butcher, J.T., Baudino, T.A., Banerjee, I., and Markwald, R.R. (2008). Neonatal and adult cardiovascular pathophysiological remodeling and repair: developmental role of periostin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1123*, 30–40.
- Noutsias, M., Rohde, M., Block, A., Klippert, K., Lettau, O., Blunert, K., Hummel, M., Köhl, U., Lehmkuhl, H., Hetzer, R., et al. (2008). Preamplification techniques for real-time RT-PCR analyses of endomyocardial biopsies. *BMC Mol. Biol.* *9*, 3.
- Orban, T.I., and Izaurralde, E. (2005). Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA N. Y. N* *11*, 459–469.
- Pak, J., and Fire, A. (2007). Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*. *Science* *315*, 241–244.
- Palatinus, J.A., Rhett, J.M., and Gourdie, R.G. (2010). Translational lessons from scarless healing of cutaneous wounds and regenerative repair of the myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *48*, 550–557.
- Pan, J., Fukuda, K., Kodama, H., Makino, S., Takahashi, T., Sano, M., Hori, S., and Ogawa, S. (1997). Role of angiotensin II in activation of the JAK/STAT pathway induced by acute pressure overload in the rat heart. *Circ. Res.* *81*, 611–617.
- Pan, Z., Sun, X., Shan, H., Wang, N., Wang, J., Ren, J., Feng, S., Xie, L., Lu, C., Yuan, Y., et al. (2012). MicroRNA-101 inhibited postinfarct cardiac fibrosis and improved left ventricular compliance via the FBJ osteosarcoma oncogene/transforming growth factor- β 1 pathway. *Circulation* *126*, 840–850.

- Panek, A.N., Posch, M.G., Alenina, N., Ghadge, S.K., Erdmann, B., Popova, E., Perrot, A., Geier, C., Morano, R.D.I., Bader, M., et al. (2009). Connective Tissue Growth Factor Overexpression in Cardiomyocytes Promotes Cardiac Hypertrophy and Protection against Pressure Overload. *PLoS ONE* 4.
- Pankuweit, S., Portig, I., Eckhardt, H., Crombach, M., Hufnagel, G., and Maisch, B. (2000). Prevalence of viral genome in endomyocardial biopsies from patients with inflammatory heart muscle disease. *Herz* 25, 221–226.
- Pankuweit, S., Moll, R., Baandrup, U., Portig, I., Hufnagel, G., and Maisch, B. (2003). Prevalence of the parvovirus B19 genome in endomyocardial biopsy specimens. *Hum. Pathol.* 34, 497–503.
- Pankuweit, S., Richter, A., Ruppert, V., and Maisch, B. (2009). [Classification of cardiomyopathies and indication for endomyocardial biopsy revisited]. *Herz* 34, 55–62.
- Papageorgiou, A.-P., and Heymans, S. (2012). Interactions between the extracellular matrix and inflammation during viral myocarditis. *Immunobiology* 217, 503–510.
- Parker, A.L., Nicklin, S.A., and Baker, A.H. (2008). Interactions of adenovirus vectors with blood: implications for intravascular gene therapy applications. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 10, 439–448.
- Pennica, D., Swanson, T.A., Welsh, J.W., Roy, M.A., Lawrence, D.A., Lee, J., Brush, J., Taneyhill, L.A., Deuel, B., Lew, M., et al. (1998). WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 14717–14722.
- Perbal, B. (2001). NOV (nephroblastoma overexpressed) and the CCN family of genes: structural and functional issues. *Mol. Pathol. MP* 54, 57–79.
- Perbal, B. (2004). CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet* 363, 62–64.
- Perbal, B. (2015). Knock once for yes, twice for no. *J. Cell Commun. Signal.* 9, 15–18.
- Perbal, B., Martinerie, C., Sainson, R., Werner, M., He, B., and Roizman, B. (1999). The C-terminal domain of the regulatory protein NOVH is sufficient to promote interaction with fibulin 1C: a clue for a role of NOVH in cell-adhesion signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 869–874.
- Petersen, A., Joly, P., Bergmann, C., Korus, G., and Duda, G.N. (2012). The Impact of Substrate Stiffness and Mechanical Loading on Fibroblast-Induced Scaffold Remodeling. *Tissue Eng. Part A* 18, 1804–1817.
- Pfeffer, J.M., Pfeffer, M.A., Fletcher, P.J., and Braunwald, E. (1991). Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am. J. Physiol.* 260, H1406-1414.
- Phanish, M.K., Winn, S.K., and Dockrell, M.E.C. (2010). Connective tissue growth factor-(CTGF, CCN2)-a marker, mediator and therapeutic target for renal fibrosis. *Nephron Exp. Nephrol.* 114, e83-92.
- Philippen, L.E., Dirx, E., Wit, J.B.M., Burggraaf, K., de Windt, L.J., and da Costa Martins, P.A. (2015). Antisense MicroRNA Therapeutics in Cardiovascular Disease: Quo Vadis? *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 23, 1810–1818.
- Piera-Velazquez, S., Li, Z., and Jimenez, S.A. (2011). Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders. *Am. J. Pathol.* 179, 1074–1080.

- Pilling, D., and Gomer, R.H. (2012). Differentiation of circulating monocytes into fibroblast-like cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 904, 191–206.
- Podewski, E.K., Hilfiker-Kleiner, D., Hilfiker, A., Morawietz, H., Lichtenberg, A., Wollert, K.C., and Drexler, H. (2003). Alterations in Janus kinase (JAK)-signal transducers and activators of transcription (STAT) signaling in patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation* 107, 798–802.
- Poller, W., Hajjar, R., Schultheiss, H.-P., and Fechner, H. (2010). Cardiac-targeted delivery of regulatory RNA molecules and genes for the treatment of heart failure. *Cardiovasc. Res.* 86, 353–364.
- Ponticos, M. (2013). Connective tissue growth factor (CCN2) in blood vessels. *Vascul. Pharmacol.* 58, 189–193.
- Porter, K.E., and Turner, N.A. (2009). Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol. Ther.* 123, 255–278.
- Pursnani, A., Yee, H., Slater, W., and Sarswat, N. (2009). Hypersensitivity myocarditis associated with azithromycin exposure. *Ann. Intern. Med.* 150, 225–226.
- Putten, S. van, Shafieyan, Y., and Hinz, B. (2016). Mechanical control of cardiac myofibroblasts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 93, 133–142.
- Quan, T.E., Cowper, S., Wu, S.-P., Bockenstedt, L.K., and Bucala, R. (2004). Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 598–606.
- Raffetto, J.D., and Khalil, R.A. (2008). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem. Pharmacol.* 75, 346–359.
- Raizman, J.E., Komljenovic, J., Chang, R., Deng, C., Bedosky, K.M., Rattan, S.G., Cunnington, R.H., Freed, D.H., and Dixon, I.M.C. (2007). The participation of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger in primary cardiac myofibroblast migration, contraction, and proliferation. *J. Cell. Physiol.* 213, 540–551.
- Ramesh, S., Singh, A., Cibi, D.M., Hausenloy, D.J., and Singh, M.K. (2016). In Vitro Culture of Epicardial Cells From Mouse Embryonic Heart. *J. Vis. Exp. JoVE*.
- Raper, S.E., Yudkoff, M., Chirmule, N., Gao, G.-P., Nunes, F., Haskal, Z.J., Furth, E.E., Propert, K.J., Robinson, M.B., Magosin, S., et al. (2002). A pilot study of in vivo liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency. *Hum. Gene Ther.* 13, 163–175.
- Raper, S.E., Chirmule, N., Lee, F.S., Wivel, N.A., Bagg, A., Gao, G., Wilson, J.M., and Batshaw, M.L. (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol. Genet. Metab.* 80, 148–158.
- Rapti, K., Chaanine, A.H., and Hajjar, R.J. (2011). Targeted gene therapy for the treatment of heart failure. *Can. J. Cardiol.* 27, 265–283.
- Recchia, A.G., Filice, E., Pellegrino, D., Dobrina, A., Cerra, M.C., and Maggiolini, M. (2009). Endothelin-1 induces connective tissue growth factor expression in cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 352–359.
- Redfield, M.M., Jacobsen, S.J., Burnett, J.C., Mahoney, D.W., Bailey, K.R., and Rodeheffer, R.J. (2003). Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic. *JAMA* 289, 194–202.

- Renault, M.-A., Robbesyn, F., Réant, P., Douin, V., Daret, D., Allières, C., Belloc, I., Couffinhal, T., Arnal, J.-F., Klingel, K., et al. (2010). Osteopontin expression in cardiomyocytes induces dilated cardiomyopathy. *Circ. Heart Fail.* *3*, 431–439.
- Richardson, P., McKenna, W., Bristow, M., Maisch, B., Mautner, B., O'Connell, J., Olsen, E., Thiene, G., Goodwin, J., Gyarfás, I., et al. (1996). Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* *93*, 841–842.
- Rienks, M., and Papageorgiou, A.-P. (2016). Novel regulators of cardiac inflammation: Matricellular proteins expand their repertoire. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *91*, 172–178.
- Rincon, M.Y., VandenDriessche, T., and Chuah, M.K. (2015). Gene therapy for cardiovascular disease: advances in vector development, targeting, and delivery for clinical translation. *Cardiovasc. Res.* *108*, 4–20.
- Riser, B.L., Najmabadi, F., Perbal, B., Peterson, D.R., Rambow, J.A., Riser, M.L., Sukowski, E., Yeger, H., and Riser, S.C. (2009). CCN3 (NOV) Is a Negative Regulator of CCN2 (CTGF) and a Novel Endogenous Inhibitor of the Fibrotic Pathway in an in Vitro Model of Renal Disease. *Am. J. Pathol.* *174*, 1725–1734.
- Rivas, F.V., Tolia, N.H., Song, J.-J., Aragon, J.P., Liu, J., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2005). Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 340–349.
- Roger, V.L. (2013). Epidemiology of Heart Failure. *Circ. Res.* *113*, 646–659.
- Rohr, S. (2012). Arrhythmogenic Implications of Fibroblast-Myocyte Interactions. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* *5*, 442–452.
- Roselló-Lletí, E., Rivera, M., Bertomeu, V., Cortés, R., Jordán, A., and González-Molina, A. (2007). [Interleukin-4 and cardiac fibrosis in patients with heart failure]. *Rev. Esp. Cardiol.* *60*, 777–780.
- Rosenzweig, A. (2003). Vectors for cardiovascular gene therapy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *35*, 731–733.
- Rother, M., Krohn, S., Kania, G., Vanhoutte, D., Eisenreich, A., Wang, X., Westermann, D., Savvatis, K., Dannemann, N., Skurk, C., et al. (2010). Matricellular signaling molecule CCN1 attenuates experimental autoimmune myocarditis by acting as a novel immune cell migration modulator. *Circulation* *122*, 2688–2698.
- Ruby, J.G., Jan, C.H., and Bartel, D.P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* *448*, 83–86.
- Ruponen, M., Arkko, S., Urtti, A., Reinisalo, M., and Ranta, V.-P. (2009). Intracellular DNA release and elimination correlate poorly with transgene expression after non-viral transfection. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *136*, 226–231.
- Ruppert, V., and Maisch, B. (2012). Molecular signatures and the study of gene expression profiles in inflammatory heart diseases. *Herz* *37*, 619–626.
- Russell, S.J., Peng, K.-W., and Bell, J.C. (2012). Oncolytic virotherapy. *Nat. Biotechnol.* *30*, 658–670.
- Russo, J.W., and Castellot, J.J. (2010). CCN5: biology and pathophysiology. *J. Cell Commun. Signal.* *4*, 119–130.

- Sakai, M., Imai, T., Ohtake, H., Azuma, H., and Otagiri, M. (1997). Effects of absorption enhancers on the transport of model compounds in Caco-2 cell monolayers: assessment by confocal laser scanning microscopy. *J. Pharm. Sci.* *86*, 779–785.
- Sakoda, T., Kasahara, N., Hamamori, Y., and Kedes, L. (1999). A high-titer lentiviral production system mediates efficient transduction of differentiated cells including beating cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *31*, 2037–2047.
- Sasse, A., Wallich, M., Ding, Z., Goedecke, A., and Schrader, J. (2003). Coxsackie-and-adenovirus receptor mRNA expression in human heart failure. *J. Gene Med.* *5*, 876–882.
- Schiedner, G., Morral, N., Parks, R.J., Wu, Y., Koopmans, S.C., Langston, C., Graham, F.L., Beaudet, A.L., and Kochanek, S. (1998). Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat. Genet.* *18*, 180–183.
- Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* *3*, 1101–1108.
- Schober, J.M., Chen, N., Grzeszkiewicz, T.M., Jovanovic, I., Emeson, E.E., Ugarova, T.P., Ye, R.D., Lau, L.F., and Lam, S.C.-T. (2002). Identification of integrin alpha(M)beta(2) as an adhesion receptor on peripheral blood monocytes for Cyr61 (CCN1) and connective tissue growth factor (CCN2): immediate-early gene products expressed in atherosclerotic lesions. *Blood* *99*, 4457–4465.
- Schuetze, K.B., McKinsey, T.A., and Long, C.S. (2014). Targeting cardiac fibroblasts to treat fibrosis of the heart: Focus on HDACs. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *70*, 100–107.
- Segura, A.M., Frazier, O.H., and Buja, L.M. (2014). Fibrosis and heart failure. *Heart Fail. Rev.* *19*, 173–185.
- Serini, G., Bochaton-Piallat, M.-L., Ropraz, P., Geinoz, A., Borsi, L., Zardi, L., and Gabbiani, G. (1998). The Fibronectin Domain ED-A Is Crucial for Myofibroblastic Phenotype Induction by Transforming Growth Factor- β 1. *J. Cell Biol.* *142*, 873–881.
- Shaw, T., Elliott, P., and McKenna, W.J. (2002). Dilated cardiomyopathy: a genetically heterogeneous disease. *Lancet* *360*, 654–655.
- Shimoyama, T., Hiraoka, S., Takemoto, M., Koshizaka, M., Tokuyama, H., Tokuyama, T., Watanabe, A., Fujimoto, M., Kawamura, H., Sato, S., et al. (2010). CCN3 inhibits neointimal hyperplasia through modulation of smooth muscle cell growth and migration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *30*, 675–682.
- Shinde, A.V., and Frangogiannis, N.G. (2014). Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *70*, 74–82.
- Shi-Wen, X., Leask, A., and Abraham, D. (2008). Regulation and function of connective tissue growth factor/CCN2 in tissue repair, scarring and fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* *19*, 133–144.
- Si, W., Kang, Q., Luu, H.H., Park, J.K., Luo, Q., Song, W.-X., Jiang, W., Luo, X., Li, X., Yin, H., et al. (2006). CCN1/Cyr61 is regulated by the canonical Wnt signal and plays an important role in Wnt3A-induced osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 2955–2964.
- Silva, J.M., Li, M.Z., Chang, K., Ge, W., Golding, M.C., Rickles, R.J., Siolas, D., Hu, G., Paddison, P.J., Schlabach, M.R., et al. (2005). Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nat. Genet.* *37*, 1281–1288.

- Singh, M., Foster, C.R., Dalal, S., and Singh, K. (2010). Osteopontin: role in extracellular matrix deposition and myocardial remodeling post-MI. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *48*, 538–543.
- Slattery, E., Ismail, N., Sheridan, J., Eustace, K., Harewood, G., and Patchett, S. (2011). Myocarditis associated with infliximab: a case report and review of the literature. *Inflamm. Bowel Dis.* *17*, 1633–1634.
- Sliva, K., and Schnierle, B.S. (2010). Selective gene silencing by viral delivery of short hairpin RNA. *Virology* *7*, 248.
- Smith, R.S., Smith, T.J., Blieden, T.M., and Phipps, R.P. (1997). Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am. J. Pathol.* *151*, 317–322.
- Sonnylal, S., Shi-Wen, X., Leoni, P., Naff, K., Van Pelt, C.S., Nakamura, H., Leask, A., Abraham, D., Bou-Gharios, G., and de Crombrughe, B. (2010). Selective expression of connective tissue growth factor in fibroblasts in vivo promotes systemic tissue fibrosis. *Arthritis Rheum.* *62*, 1523–1532.
- Sonnylal, S., Xu, S., Jones, H., Tam, A., Sreeram, V.R., Ponticos, M., Norman, J., Agrawal, P., Abraham, D., and de Crombrughe, B. (2013). Connective tissue growth factor causes EMT-like cell fate changes in vivo and in vitro. *J. Cell Sci.* *126*, 2164–2175.
- Souders, C.A., Bowers, S.L.K., and Baudino, T.A. (2009). Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ. Res.* *105*, 1164–1176.
- Stewart, J.A., Wei, C.-C., Brower, G.L., Rynders, P.E., Hanks, G.H., Dillon, A.R., Lucchesi, P.A., Janicki, J.S., and Dell'Italia, L.J. (2003). Cardiac mast cell- and chymase-mediated matrix metalloproteinase activity and left ventricular remodeling in mitral regurgitation in the dog. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *35*, 311–319.
- Stramer, B.M., Mori, R., and Martin, P. (2007). The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *J. Invest. Dermatol.* *127*, 1009–1017.
- Strehlow, D., and Korn, J.H. (1998). Biology of the scleroderma fibroblast. *Curr. Opin. Rheumatol.* *10*, 572–578.
- Stroud, J.D., Baicu, C.F., Barnes, M.A., Spinale, F.G., and Zile, M.R. (2002). Viscoelastic properties of pressure overload hypertrophied myocardium: effect of serine protease treatment. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* *282*, H2324–H2335.
- Su, B.Y., Cai, W.Q., Zhang, C.G., Martinez, V., Lombet, A., and Perbal, B. (2001). The expression of *ccn3* (nov) RNA and protein in the rat central nervous system is developmentally regulated. *Mol. Pathol.* *MP 54*, 184–191.
- Subramanian, V., Krishnamurthy, P., Singh, K., and Singh, M. (2007). Lack of osteopontin improves cardiac function in streptozotocin-induced diabetic mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *292*, H673–683.
- Sun, Y., and Weber, K.T. (2000). Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc. Res.* *46*, 250–256.
- Sun, Y., and Weber, K.T. (2003). RAS and connective tissue in the heart. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *35*, 919–931.
- Sussman, M.A., McCulloch, A., and Borg, T.K. (2002). Dance band on the Titanic: biomechanical signaling in cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* *91*, 888–898.

- Svensson, E.C., Marshall, D.J., Woodard, K., Lin, H., Jiang, F., Chu, L., and Leiden, J.M. (1999). Efficient and stable transduction of cardiomyocytes after intramyocardial injection or intracoronary perfusion with recombinant adeno-associated virus vectors. *Circulation* *99*, 201–205.
- Takewa, Y., Chemaly, E.R., Takaki, M., Liang, L.F., Jin, H., Karakikes, I., Morel, C., Taenaka, Y., Tatsumi, E., and Hajjar, R.J. (2009). Mechanical work and energetic analysis of eccentric cardiac remodeling in a volume overload heart failure in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *296*, H1117-1124.
- Talele, N.P., Fradette, J., Davies, J.E., Kapus, A., and Hinz, B. (2015). Expression of α -Smooth Muscle Actin Determines the Fate of Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Rep.* *4*, 1016–1030.
- Taliercio, C.P., Olney, B.A., and Lie, J.T. (1985). Myocarditis related to drug hypersensitivity. *Mayo Clin. Proc.* *60*, 463–468.
- Tamaoki, M., Imanaka-Yoshida, K., Yokoyama, K., Nishioka, T., Inada, H., Hiroe, M., Sakakura, T., and Yoshida, T. (2005). Tenascin-C regulates recruitment of myofibroblasts during tissue repair after myocardial injury. *Am. J. Pathol.* *167*, 71–80.
- Tang, T., Gao, M.H., and Hammond, H.K. (2012). Prospects for gene transfer for clinical heart failure. *Gene Ther.* *19*, 606–612.
- Tank, J., Lindner, D., Wang, X., Stroux, A., Gilke, L., Gast, M., Zietsch, C., Skurk, C., Scheibenbogen, C., Klingel, K., et al. (2014). Single-target RNA interference for the blockade of multiple interacting proinflammatory and profibrotic pathways in cardiac fibroblasts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *66*, 141–156.
- Tao, L., Liu, J., Li, Z., Dai, X., and Li, S. (2010). Role of the JAK-STAT pathway in proliferation and differentiation of human hypertrophic scar fibroblasts induced by connective tissue growth factor. *Mol. Med. Rep.* *3*, 941–945.
- Tatrai, E., Bedi, K., Kovalszky, I., Hartyanszky, I., Laszik, A., Acsady, G., Sotonyi, P., and Hubay, M. (2011). No mutation but high mRNA expression of Coxsackie-Adenovirus Receptor was observed in both dilated and ischemic cardiomyopathy. *Forensic Sci. Int.* *212*, 47–50.
- Teekakirikul, P., Eminaga, S., Toka, O., Alcalai, R., Wang, L., Wakimoto, H., Naylor, M., Konno, T., Gorham, J.M., Wolf, C.M., et al. (2010). Cardiac fibrosis in mice with hypertrophic cardiomyopathy is mediated by non-myocyte proliferation and requires Tgf- β . *J. Clin. Invest.* *120*, 3520–3529.
- Throm Quinlan, A.M., Sierad, L.N., Capulli, A.K., Firstenberg, L.E., and Billiar, K.L. (2011). Combining dynamic stretch and tunable stiffness to probe cell mechanobiology in vitro. *PLoS One* *6*, e23272.
- Thum, T. (2014). Noncoding RNAs and myocardial fibrosis. *Nat. Rev. Cardiol.* *11*, 655–663.
- Thum, T., and Condorelli, G. (2015). Long noncoding RNAs and microRNAs in cardiovascular pathophysiology. *Circ. Res.* *116*, 751–762.
- Thurber, G.M., and Weissleder, R. (2011). Quantitating Antibody Uptake In Vivo: Conditional Dependence on Antigen Expression Levels. *Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging* *13*, 623–632.
- Todarò, G.J., and Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol.* *17*, 299–313.
- Tomari, Y., and Zamore, P.D. (2005). Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev.* *19*, 517–529.

- Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R.A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 349–363.
- Tong, Z.-Y., and Brigstock, D.R. (2006). Intrinsic biological activity of the thrombospondin structural homology repeat in connective tissue growth factor. *J. Endocrinol.* 188, R1-8.
- Tong, Z., Chen, R., Alt, D.S., Kemper, S., Perbal, B., and Brigstock, D.R. (2009). Susceptibility to liver fibrosis in mice expressing a connective tissue growth factor transgene in hepatocytes. *Hepatology*. Baltim. Md 50, 939–947.
- Torre-Amione, G., Kapadia, S., Benedict, C., Oral, H., Young, J.B., and Mann, D.L. (1996a). Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J. Am. Coll. Cardiol.* 27, 1201–1206.
- Torre-Amione, G., Kapadia, S., Lee, J., Durand, J.B., Bies, R.D., Young, J.B., and Mann, D.L. (1996b). Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation* 93, 704–711.
- Travers, J.G., Kamal, F.A., Robbins, J., Yutzey, K.E., and Blaxall, B.C. (2016). Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. *Circ. Res.* 118, 1021–1040.
- Trayanova, N.A., Boyle, P.M., Arevalo, H.J., and Zahid, S. (2014). Exploring susceptibility to atrial and ventricular arrhythmias resulting from remodeling of the passive electrical properties in the heart: a simulation approach. *Front. Physiol.* 5, 435.
- Tsuruda, T., Costello-Boerrigter, L.C., and Burnett, J.C. (2004). Matrix metalloproteinases: pathways of induction by bioactive molecules. *Heart Fail. Rev.* 9, 53–61.
- Turner, N.A., and Porter, K.E. (2013). Function and fate of myofibroblasts after myocardial infarction. *Fibrogenesis Tissue Repair* 6, 5.
- Verrecchia, F., Chu, M.L., and Mauviel, A. (2001). Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *J. Biol. Chem.* 276, 17058–17062.
- Vetter, R., Kott, M., Schulze, W., and Rupp, H. (1998). Influence of different culture conditions on sarcoplasmic reticular calcium transport in isolated neonatal rat cardiomyocytes. *Mol. Cell. Biochem.* 188, 177–185.
- Villarreal, F.J., Lee, A.A., Dillmann, W.H., and Giordano, F.J. (1996). Adenovirus-mediated overexpression of human transforming growth factor-beta 1 in rat cardiac fibroblasts, myocytes and smooth muscle cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 28, 735–742.
- Vilmos, P., Gaudenz, K., Hegedus, Z., and Marsh, J.L. (2001). The Twisted gastrulation family of proteins, together with the IGFBP and CCN families, comprise the TIC superfamily of cysteine rich secreted factors. *Mol. Pathol. MP* 54, 317–323.
- Visse, R., and Nagase, H. (2003). Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases Structure, Function, and Biochemistry. *Circ. Res.* 92, 827–839.
- Vorwerk, P., Hohmann, B., Oh, Y., Rosenfeld, R.G., and Shymko, R.M. (2002). Binding properties of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3), IGFBP-3 N- and C-terminal fragments, and structurally related proteins mac25 and connective tissue growth factor measured using a biosensor. *Endocrinology* 143, 1677–1685.

- de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C.G., and de Vries, J.E. (1991). Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* *174*, 1209–1220.
- Walker, G.A., Masters, K.S., Shah, D.N., Anseth, K.S., and Leinwand, L.A. (2004). Valvular Myofibroblast Activation by Transforming Growth Factor- β Implications for Pathological Extracellular Matrix Remodeling in Heart Valve Disease. *Circ. Res.* *95*, 253–260.
- Wang, H., Haeger, S.M., Kloxin, A.M., Leinwand, L.A., and Anseth, K.S. (2012). Redirecting Valvular Myofibroblasts into Dormant Fibroblasts through Light-mediated Reduction in Substrate Modulus. *PLOS ONE* *7*, e39969.
- Wang, Q., Usinger, W., Nichols, B., Gray, J., Xu, L., Seeley, T.W., Brenner, M., Guo, G., Zhang, W., Oliver, N., et al. (2011). Cooperative interaction of CTGF and TGF- β in animal models of fibrotic disease. *Fibrogenesis Tissue Repair* *4*, 4.
- Wang, Y., Fan, P.-S., and Kahaleh, B. (2006). Association between enhanced type I collagen expression and epigenetic repression of the FLI1 gene in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum.* *54*, 2271–2279.
- Wasala, N.B., Shin, J.-H., and Duan, D. (2011). The evolution of heart gene delivery vectors. *J. Gene Med.* *13*, 557–565.
- Watson, C.J., Phelan, D., Xu, M., Collier, P., Neary, R., Smolenski, A., Ledwidge, M., McDonald, K., and Baugh, J. (2012). Mechanical stretch up-regulates the B-type natriuretic peptide system in human cardiac fibroblasts: a possible defense against transforming growth factor- β mediated fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* *5*, 9.
- Weber, K.T. (2004). Fibrosis in hypertensive heart disease: focus on cardiac fibroblasts. *J. Hypertens.* *22*, 47–50.
- Weber, K.T., Sun, Y., Tyagi, S.C., and Cleutjens, J.P. (1994). Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *26*, 279–292.
- Weber, K.T., Sun, Y., Bhattacharya, S.K., Ahokas, R.A., and Gerling, I.C. (2013). Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart. *Nat. Rev. Cardiol.* *10*, 15–26.
- Wells, R.G., and Discher, D.E. (2008). Matrix Elasticity, Cytoskeletal Tension, and TGF- β : The Insoluble and Soluble Meet. *Sci Signal* *1*, pe13-pe13.
- Wells, J.E., Howlett, M., Cheung, L.C., and Kees, U.R. (2015). The role of CCN family genes in haematological malignancies. *J. Cell Commun. Signal.* *9*, 267–278.
- Wen, Q., and Janmey, P.A. (2013). Effects of non-linearity on cell–ECM interactions. *Exp. Cell Res.* *319*, 2481–2489.
- Westermann, D. (2012). Does inflammation trigger fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy: a burning question? *Heart Br. Card. Soc.* *98*, 965–966.
- Westermann, D., Savvatis, K., Lindner, D., Zietsch, C., Becher, P.M., Hammer, E., Heimesaat, M.M., Bereswill, S., Völker, U., Escher, F., et al. (2011a). Reduced degradation of the chemokine MCP-3 by matrix metalloproteinase-2 exacerbates myocardial inflammation in experimental viral cardiomyopathy. *Circulation* *124*, 2082–2093.

- Westermann, D., Lindner, D., Kasner, M., Zietsch, C., Savvatis, K., Escher, F., von Schlippenbach, J., Skurk, C., Steendijk, P., Riad, A., et al. (2011b). Cardiac inflammation contributes to changes in the extracellular matrix in patients with heart failure and normal ejection fraction. *Circ. Heart Fail.* 4, 44–52.
- Wightman, B., Bürglin, T.R., Gatto, J., Arasu, P., and Ruvkun, G. (1991). Negative regulatory sequences in the *lin-14* 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. *Genes Dev.* 5, 1813–1824.
- Wijetunga, M., and Rockson, S. (2002). Myocarditis in systemic lupus erythematosus. *Am. J. Med.* 113, 419–423.
- de Winter, P., Leoni, P., and Abraham, D. (2008). Connective tissue growth factor: structure-function relationships of a mosaic, multifunctional protein. *Growth Factors Chur Switz.* 26, 80–91.
- Wittchen, F., Suckau, L., Witt, H., Skurk, C., Lassner, D., Fechner, H., Sipo, I., Ungethüm, U., Ruiz, P., Pauschinger, M., et al. (2007). Genomic expression profiling of human inflammatory cardiomyopathy (DCMi) suggests novel therapeutic targets. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 85, 257–271.
- Wolf, N., Yang, W., Dunk, C.E., Gashaw, I., Lye, S.J., Ring, T., Schmidt, M., Winterhager, E., and Gellhaus, A. (2010). Regulation of the matricellular proteins CYR61 (CCN1) and NOV (CCN3) by hypoxia-inducible factor-1{alpha} and transforming-growth factor-{beta}3 in the human trophoblast. *Endocrinology* 151, 2835–2845.
- Wong, T., McGrath, J.A., and Navsaria, H. (2007). The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *Br. J. Dermatol.* 156, 1149–1155.
- Wright, M.J., Wightman, L.M., Lilley, C., de Alwis, M., Hart, S.L., Miller, A., Coffin, R.S., Thrasher, A., Latchman, D.S., and Marber, M.S. (2001). In vivo myocardial gene transfer: optimization, evaluation and direct comparison of gene transfer vectors. *Basic Res. Cardiol.* 96, 227–236.
- Wu, K.C., Weiss, R.G., Thiemann, D.R., Kitagawa, K., Schmidt, A., Dalal, D., Lai, S., Bluemke, D.A., Gerstenblith, G., Marbán, E., et al. (2008). Late gadolinium enhancement by cardiovascular magnetic resonance heralds an adverse prognosis in nonischemic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 51, 2414–2421.
- Wynn, T.A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J. Pathol.* 214, 199–210.
- Xu, H., Li, P., Liu, M., Liu, C., Sun, Z., Guo, X., and Zhang, Y. (2015a). CCN2 and CCN5 exerts opposing effect on fibroblast proliferation and transdifferentiation induced by TGF- β . *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 42, 1207–1219.
- Xu, H., Liu, C., Sun, Z., Guo, X., Zhang, Y., Liu, M., and Li, P. (2015b). CCN5 attenuates profibrotic phenotypes of fibroblasts through the Smad6-CCN2 pathway: Potential role in epidural fibrosis. *Int. J. Mol. Med.* 36, 123–129.
- Xu, J., Smock, S.L., Safadi, F.F., Rosenzweig, A.B., Odgren, P.R., Marks, S.C., Owen, T.A., and Popoff, S.N. (2000). Cloning the full-length cDNA for rat connective tissue growth factor: implications for skeletal development. *J. Cell. Biochem.* 77, 103–115.
- Xuan, Y.T., Guo, Y., Han, H., Zhu, Y., and Bolli, R. (2001). An essential role of the JAK-STAT pathway in ischemic preconditioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9050–9055.

- Yan, L., and Chaqour, B. (2013). Cysteine-rich protein 61 (CCN1) and connective tissue growth factor (CCN2) at the crosshairs of ocular neovascular and fibrovascular disease therapy. *J. Cell Commun. Signal.* *7*, 253–263.
- Yan, A.T., Shayne, A.J., Brown, K.A., Gupta, S.N., Chan, C.W., Luu, T.M., Di Carli, M.F., Reynolds, H.G., Stevenson, W.G., and Kwong, R.Y. (2006). Characterization of the peri-infarct zone by contrast-enhanced cardiac magnetic resonance imaging is a powerful predictor of post-myocardial infarction mortality. *Circulation* *114*, 32–39.
- Yang, J.-S., Maurin, T., Robine, N., Rasmussen, K.D., Jeffrey, K.L., Chandwani, R., Papapetrou, E.P., Sadelain, M., O'Carroll, D., and Lai, E.C. (2010). Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 15163–15168.
- Yang, R., Amir, J., Liu, H., and Chaqour, B. (2008). Mechanical strain activates a program of genes functionally involved in paracrine signaling of angiogenesis. *Physiol. Genomics* *36*, 1–14.
- Yang, X., Chen, B., Liu, T., and Chen, X. (2014). Reversal of myofibroblast differentiation: A review. *Eur. J. Pharmacol.* *734*, 83–90.
- Yano, T., Miura, T., Ikeda, Y., Matsuda, E., Saito, K., Miki, T., Kobayashi, H., Nishino, Y., Ohtani, S., and Shimamoto, K. (2005). Intracardiac fibroblasts, but not bone marrow derived cells, are the origin of myofibroblasts in myocardial infarct repair. *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.* *14*, 241–246.
- Yekta, S., Shih, I.-H., and Bartel, D.P. (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* *304*, 594–596.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* *17*, 3011–3016.
- Ylä-Herttuala, S., and Alitalo, K. (2003). Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat. Med.* *9*, 694–701.
- Yong, K.W., Li, Y., Huang, G., Lu, T.J., Safwani, W.K.Z.W., Pinguan-Murphy, B., and Xu, F. (2015). Mechanoregulation of cardiac myofibroblast differentiation: implications for cardiac fibrosis and therapy. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* *309*, H532–H542.
- Yoon, P.O., Lee, M.-A., Cha, H., Jeong, M.H., Kim, J., Jang, S.P., Choi, B.Y., Jeong, D., Yang, D.K., Hajjar, R.J., et al. (2010). The opposing effects of CCN2 and CCN5 on the development of cardiac hypertrophy and fibrosis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *49*, 294–303.
- Yosimichi, G., Kubota, S., Nishida, T., Kondo, S., Yanagita, T., Nakao, K., Takano-Yamamoto, T., and Takigawa, M. (2006). Roles of PKC, PI3K and JNK in multiple transduction of CCN2/CTGF signals in chondrocytes. *Bone* *38*, 853–863.
- Zak, R. (1974). Development and proliferative capacity of cardiac muscle cells. *Circ. Res.* *35*, suppl II:17-26.
- Zeng, Y., Wagner, E.J., and Cullen, B.R. (2002). Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol. Cell* *9*, 1327–1333.

Zhang, L., Li, Y., Liang, C., and Yang, W. (2014). CCN5 overexpression inhibits profibrotic phenotypes via the PI3K/Akt signaling pathway in lung fibroblasts isolated from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and in an in vivo model of lung fibrosis. *Int. J. Mol. Med.* 33, 478–486.

Zhou, D., Herrick, D.J., Rosenbloom, J., and Chaqour, B. (2005). Cyr61 mediates the expression of VEGF, α -v-integrin, and α -actin genes through cytoskeletally based mechanotransduction mechanisms in bladder smooth muscle cells. *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985 98, 2344–2354.

Zhou, Y., Hagood, J.S., and Murphy-Ullrich, J.E. (2004). Thy-1 expression regulates the ability of rat lung fibroblasts to activate transforming growth factor-beta in response to fibrogenic stimuli. *Am. J. Pathol.* 165, 659–669.

Zou, K.H., Tuncali, K., and Silverman, S.G. (2003). Correlation and simple linear regression. *Radiology* 227, 617–622.

9 Publikationsverzeichnis

9.1 Artikel

Cardiac fibroblasts support cardiac inflammation in heart failure.

Lindner D, Zietsch C, Tank J, Sossalla S, Fluschnik N, Hinrichs S, Maier L, Poller W, Blankenberg S, Schultheiss HP, Tschöpe C, Westermann D.
Basic Res Cardiol. 2014;109(5):428

Single-target RNA interference for the blockade of multiple interacting proinflammatory and profibrotic pathways in cardiac fibroblasts.

Tank J, Lindner D, Wang X, Stroux A, Gilke L, Gast M, Zietsch C, Skurk C, Scheibenbogen C, Klingel K, Lassner D, Kühl U, Schultheiss HP, Westermann D, Poller W.
J Mol Cell Cardiol. 2013 Nov 12;66C:141-156.

Cardiovascular RNA interference therapy: the broadening tool and target spectrum.

Poller W, Tank J, Skurk C, Gast M.
Circ Res. 2013 Aug 16;113(5):588-602.

CCN1: a novel inflammation-regulated biphasic immune cell migration modulator.

Löbel M, Bauer S, Meisel C, Eisenreich A, Kudernatsch R, Tank J, Rauch U, Kühl U, Schultheiss HP, Volk HD, Poller W, Scheibenbogen C.
Cell Mol Life Sci. 2012 Sep;69(18):3101-13.

9.2 Poster

RNA Interference targeting the matricellular protein CTGF (CCN2) modulate multiple interrelated pro-inflammatory and pro-fibrotic pathways in cardiofibroblasts

Juliane Tank, MSc, Leona Gilke, MSc, Diana Lindner PhD, Xiaomin Wang, MSc, Henry Fechner, DVM, Carsten Skurk, MD, Carsten Tschöpe MD, Dirk Westermann, MD, Wolfgang Poller, MD
ESC Congress Paris, 2011

10 Anhang

Tabelle 10.1: Korrelationsanalyse verschiedener Parameter zur CTGF- Expression in Myokardgewebe

Parameter	Spearman r	p- value (two- tailed)
WISP3	-0.2308	0.2117
Ccl2	0.2524	0.0869
Ccl8	0.2508	0.0856
CXADR	-0.2702	0.0662
MMP1	0.2995	0.0571
CD3	0.08934	0.5459
Mac1	0.03841	0.8092
CD45RO	0.1374	0.3624
Perforin	-0.02710	0.8614
LFA1	0.2480	0.1133
HLA1AF	-0.005712	0.9706
CD54AF	-0.01788	0.9083
CD106AF	-0.2374	0.1208

Tabelle 10.2: Veränderung der Genexpression im Myokardgewebe bei DCM

Parameter	mittlere Veränderung der Genexpression [%]	p- value (two- tailed)
Ccl2	-59,7	0,8367
Ccl7	-87,1	0,0428
Ccl8	-67,5	0,2506
Ccl20	186,5	0,4261
CCR5	31,2	0,3631
CCR6	-64,6	0,1610
MMP1	-95,9	0,3537
MMP2	-60,9	0,9324
MMP9	-46,4	0,5252
TIMP4	-86,0	0,3067
Col1a1	-77,4	0,4449
Col3a1	-85,4	0,7618
Gja1	-33,5	0,7618
CXADR	58,0	0,1096
CD55	-49,4	0,0338
Spp1	-99,4	0,7618
IL4	-12,6	0,9088
IL6	-31,6	0,5270
IL10	-95,6	0,3980
TGF β 1	-81,2	0,2395
TNF α	-94,5	0,9903
STAT1	-62,7	0,0454
STAT2	-67,5	0,2698
STAT3	-56,2	0,0158
STAT4	-52,0	0,0429
STAT5	-27,2	0,1423
JAK1	-68,5	0,0538
CASP3	-36,3	0,1016

Tabelle 10.3: Klinische Daten der Spender der adulten humanen Kardiofibroblasten

Patient	Geschlecht	Enddiagnose	Fibrose	Betablocker	Diuretika
B5833	m	DCM	nein	Metoprolol	Torasemid
B6026	m	MCNo	ja	∅	∅
B5959	m	Mca	ja	∅	∅
B5817	m	KHK	ja	∅	∅
B6120	w	DCM	ja	Metoprolol	Torasemid
B5867	w	SSCM	nein	∅	∅
B6293	w	MC-BL	ja	Bisoprolol	HCT
B6119	m	HCM	ja	Bisoprolol	∅

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel erstellt wurde.

Berlin, 30.11.2016

Juliane Tank