

Aus der Klinik für Innere Medizin III
Mit den Schwerpunkten Kardiologie, Angiologie und Internistische Intensivmedizin
(Direktor: Prof. Dr. Norbert Frey)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Klinikdirektor: Prof. Dr. med. Norbert Frey

**Stimulation pro-fibrotischer und pro-inflammatorischer Signalwege im
kardialen Remodeling durch den orphan Rezeptor GPRC5B**

Inauguraldissertation

Zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von

Friedrich Alexander von Samson-Himmelstjerna

aus Hannover

Kiel, 2019

Erster Berichterstatter: PD Dr. med. Dipl.-Phys. Hans-Jörg-Hippe

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. med. Monika Brüggemann

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2020

Zum Druck genehmigt: 23.06.2020

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

1) Einleitung und Literaturübersicht	1
1.1 Kardiales Remodeling und Fibrose	1
1.1.1 Allgemeines.....	1
1.1.2 Kardiomyozytärer Zellverlust und myokardiale Hypertrophie	4
1.1.3 Interstitielle Fibrose und der kardiale Fibroblast.....	6
1.1.4 Inflammation als eine Ursache des kardialen Remodelings	9
1.1.5 Der NF- κ B-Signalweg im kardialen Remodeling	13
1.2 G-Protein gekoppelter Rezeptor 5B der Familie C	15
1.2.1 Allgemeines.....	15
1.2.2 Aufbau und Funktion des Rezeptors	16
1.3 Zielsetzung	18
2) Material:	19
2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	19
2.2 Chemikalien	20
2.3 Enzyme.....	22
2.4 Antikörper	22
2.5 Kits	23
2.6 Primer	23
2.7 Puffer und Lösungen	24
2.8 Medien für Zellkulturversuche	25
2.9 Versuchstiere	26
2.10 Zellen.....	27
3) Methoden	28
3.1 Planung der Experimente	28
3.1 Kultur von Säugetierzellen.....	28
3.1.1 Primärkultur von NRCF	29
3.1.2 Stimulation der Fibroblasten	31
3.1.3 Mechanische Dehnung der Zellen.....	31
3.1.4 Adenovirale Überexpression in NRCF.....	31
3.1.5 Transfektion der NRCF mit siRNA.....	31
3.1.6 Kultur der HEK293-A-Zellen.....	32
3.2 GPRC5B-transgene Mauslinie	32
3.3 Molekularbiologische Methoden.....	32
3.3.1 Immunfluoreszenz	32
3.3.2 RNA-Extraktion <i>in vitro</i>	33
3.3.3 Messung der RNA-Konzentration mit Nanodrop.....	33

3.3.4 cDNA Schreiben.....	33
3.3.5 Quantitative Real-Time PCR.....	34
3.3.6 Protein-Extraktion aus Zellkulturen	35
3.3.7 Protein-Extraktion aus Herzgewebe	35
3.3.8 Bestimmung der Protein-Konzentration mittels BCA-Assay.....	36
3.3.9 Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	36
3.3.10 Western Blotting.....	37
3.3.11 Detektion spezifischer Proteine auf einer Nitrozellulose-Membran	38
3.3.12 Vervielfachung eines Adenovirus und Titerbestimmung der Viruspartikel.....	39
3.4 Statistische Auswertung	40
4) Ergebnisse	41
4.1 Isolierung von kardialen Fibroblasten	41
4.2 Expression von GPRC5B in NRCF.....	42
4.2.1 Kardiale Myozyten und kardiale Fibroblasten exprimieren GPRC5B	43
4.2.2 LPS stimuliert die GPRC5B-Expression in NRCF	43
4.2.3 TNF α stimuliert die GPRC5B-Expression in NRCF.....	45
4.2.4 Mechanische Dehnung stimuliert die GPRC5B-Expression	47
4.3 Modulierung der GPRC5B-Expression in kardialen Fibroblasten	48
4.3.1 Adenoviral-vermittelte Überexpression	49
4.3.2 siRNA-induzierter Knockdown.....	50
4.4 GPRC5B moduliert inflammatorische Signalwege in kardialen Fibroblasten	51
4.4.1 GPRC5B-Überexpression erhöht die Expression von inflammatorischen Zytokinen	51
4.4.2 GPRC5B-Knockdown hemmt die Expression von inflammatorischen Zytokinen	53
4.5 GPRC5B beeinflusst die EZM <i>in vitro</i>	55
4.5.1 GPRC5B-Überexpression fördert die Expression von Matrix-Metalloproteinase-9.....	55
4.5.2 GPRC5B-Knockdown hemmt die Expression von Matrix-Metalloproteinase-9	57
4.6 GPRC5B stimuliert die Degradation der Extrazellulärmatrix <i>in vivo</i>	58
5) Diskussion.....	61
5.1 Isolierung von kardialen Fibroblasten	61
5.2 Expression von GPRC5B in kardialen Fibroblasten	61
5.3 GPRC5B moduliert inflammatorische Signalwege in kardialen Fibroblasten	62
5.4 GPRC5B reguliert Matrix-Metalloproteinase -9 <i>in vitro</i>	64
5.5 GPRC5B stimuliert die Degradation der Extrazellulärmatrix <i>in vivo</i>	65
5.6 Wirkmechanismus von GPRC5B in kardialen Fibroblasten	67
5.7 Schlussfolgerung: Einfluss auf das kardiale Remodeling	68
5.8 Ausblick	69

6) Zusammenfassung.....	71
7) Summary	73
8) Literaturverzeichnis	75
9) Abkürzungen.....	88
10) Danksagung.....	91
11) Akademischer Lebenslauf.....	92

1) Einleitung und Literaturübersicht

1.1 Kardiales Remodeling und Fibrose

1.1.1 Allgemeines

Unterschiedlichste Herzerkrankungen münden in einer chronischen Herzinsuffizienz [1-3]. Diese bezeichnet die Unfähigkeit des Herzens, den für die Versorgung der Stoffwechselfvorgänge im Körper benötigten Blutfluss zu unterhalten [4]. Herzinsuffizienz stellt aktuell eines der größten Gesundheitsprobleme unserer Gesellschaft dar: In Deutschland gibt es jedes Jahr etwa 375.000 Neuerkrankungen [5]. Die Prognose der Erkrankung ist schlecht: Das 5-Jahresüberleben liegt bei lediglich etwa 50% [6, 7]. Muss ein Patient wegen seiner Erkrankung im Krankenhaus behandelt werden, liegt die 1-Jahresmortalität bei 40% [7]. Dies führt bei Betroffenen zu einem immensen Verlust an Lebensjahren und -qualität und verursacht dem Gesundheitssystem darüber hinaus große Kosten.

Herzinsuffizienz ist charakterisiert durch das sogenannte kardiale Remodeling. Dieser Begriff beschreibt im Wesentlichen die Veränderung der Form und Funktion sowie der zellulären und extrazellulären Bestandteile des Herzens und seine klinischen Folgen [1]. Die mit kardialen Remodeling einhergehende Herzinsuffizienz ist die klinische Endstrecke multipler kardialer und vaskulärer Krankheitsbilder. Zu diesen zählen unter anderem Ischämie- und Reperfusionsschäden, Myokardinfarkt, Druck- und Volumenbelastung, arterielle Hypertonie, Infektionen und idiopathische Kardiomyopathien, aber auch neuroendokrine und metabolische Krankheiten wie die diabetische Kardiomyopathie [1, 3]. Klinisch erkennen lässt sich das Remodeling auch an makroskopischen Veränderungen des Herzens, beispielsweise mittels einer transthorakalen Echountersuchung oder einer Magnetresonanztomographie: Das Herz kann dilatiert sein, die Herzwände können verdickt sein und auch Zeichen von abgelaufenen Infarkten oder Entzündungen sowie fibrotische Veränderungen sind häufig zu finden [1, 8]. Unterschieden wird in die systolische Herzinsuffizienz, welche sich vor allem durch eine eingeschränkte kardiale Pumpfunktion auszeichnet [geringe Ejektionsfraktion (EF)], und die diastolische Herzinsuffizienz mit erhaltener kardialer Pumpfunktion, die durch eine diastolische Füllungsstörung charakterisiert wird (Tabelle 1). Häufig kommen beide Formen überlappend vor [9]. Obgleich 25-50% aller Herzinsuffizienzpatienten an der diastolischen Herzinsuffizienz leiden, haben sich bisherige therapeutische, medikamentöse Strategien primär auf die systolische Herzinsuffizienz konzentriert [10-12].

Tabelle 1: Systolische und diastolische Herzinsuffizienz. Adaptiert von Aziz, Tk [10]

↑ = increased / common; ↓ = decreased; ↔ = normal

	Systolische Insuffizienz	Diastolische Insuffizienz
Ejektionsfraktion	↓↓	↔ / ↑
Kontraktilität	↓↓	↓
Enddiastolischer Druck	↑ / ↑↑	↑↑ / ↑
Ventrikelsteifigkeit	↓	↑↑
Mortalität	↑↑	↑
Risikofaktoren, u.a.		
Arterielle Hypertonie	↑	↑↑
Koronare Herzkrankheit	↑↑	↑
Diabetes mellitus [13, 14]	↑	↑↑
Fibrose und Fibrosecharakter [9, 15]	↑ (Degradation und Entknüpfung der Kollagenfibrillen)	↑↑ (vermehrtes und verbreitertes Kollagen, stark verknüpfte Fibrillen)

Die grundlegenden zellulären Mechanismen sind dabei, wie in Abbildung 1 dargestellt, der Verlust und die Hypertrophie von Kardiomyozyten, eine Proliferation von Fibroblasten mit einer Fibrose des Extrazellulärraumes, sowie eine eingeschränkte Funktion von Mitochondrien durch einen beeinträchtigten kardialen Metabolismus [16].

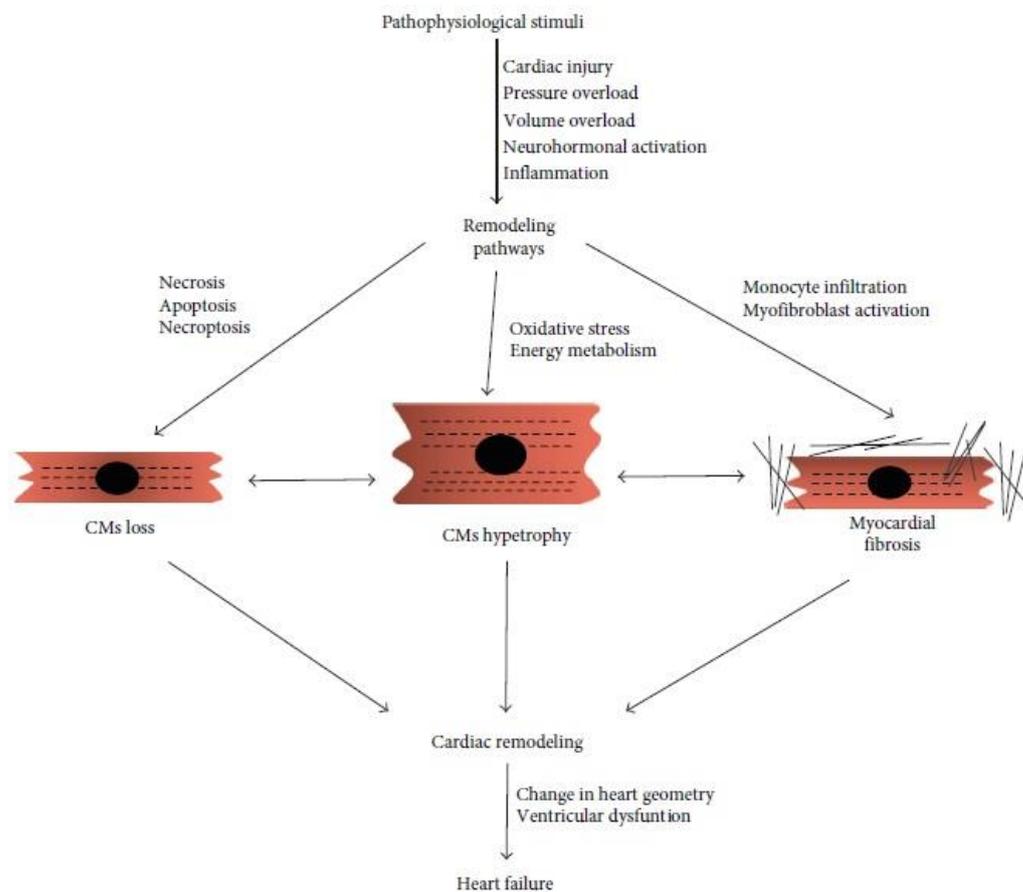


Abbildung 1: Remodeling des Herzens findet über den Verlust und die Hypertrophie von Kardiomyozyten sowie über myokardiale Fibrose statt. Abbildung aus: Schirone et al. [17]

Nach einer Erkrankung des Myokards können diese Aspekte zwar zunächst dazu führen, die kardiale Pumpleistung zu stabilisieren und stellen anfangs somit wichtige kompensatorische Prozesse dar [18, 19]. Werden die zum Remodeling führenden Stimuli (wie unten beschrieben) jedoch lange Zeit aufrechterhalten, kann aus der adaptiven Kompensation eine maladaptive Kompensation werden, wodurch die kardiovaskuläre Dynamik, die Erregungsausbreitung und die Blutversorgung im Herzen zunehmend behindert werden [17, 20]. Die hypertrophen, apoptotischen, profibrotischen und inflammatorischen Signalwege, welche auf molekularbiologischer Ebene das Remodeling vorantreiben, werden im Folgenden erläutert.

1.1.2 Kardiomyozytärer Zellverlust und myokardiale Hypertrophie

Verlust von Kardiomyozyten

Zelltod ist für viele Krankheitsprozesse im menschlichen Körper verantwortlich. Es gibt verschiedene biochemische Programme, welche eine Zelle mehr oder weniger gezielt und kontrolliert in den Tod führen können. Dazu zählen neben der Apoptose und der Nekrose auch die Autophagie und die Nekroptose [17, 21, 22]. Bei kardialen Erkrankungen spielt der Verlust von Kardiomyozyten eine wichtige Rolle in der Entstehung kardialen Remodelings. Ätiologisch geht dem oft ein Herzinfarkt voraus, aber auch andere Ursachen wie zum Beispiel Entzündungen oder chronische Belastungen durch arterielle Hypertonie oder strukturelle Defekte kommen in Frage [23]. In chronisch kranken Herzen findet vermehrt Apoptose statt, wie bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie im Endstadium gezeigt werden konnte [24]. Auch im Mausmodell war zu beobachten, dass konstitutiv aktivierte Apoptose von Kardiomyozyten nach einigen Wochen in die Herzinsuffizienz führte und dass die Hemmung apoptotischer Signalwege die Entwicklung von kardialem Remodeling drosselte [25, 26]. Zudem kommt es vor allem auch durch Nekrose zum Verlust von Kardiomyozyten. Hier fehlen allerdings noch Nachweise, dass sich der krankhafte Prozess durch eine Inhibition von Nekrose potentiell verbessern lässt [21, 27]. Die autophagischen und nekroptotischen Mechanismen sind im Rahmen der Herzinsuffizienz weniger gut untersucht, sodass ihr Effekt auf die Entstehung kardialen Remodelings noch nicht geklärt ist [21, 22].

Myokardiale Hypertrophie

Eine mögliche Antwort auf kardialen Stress stellt zudem die myokardiale Hypertrophie dar. Diese wird durch komplexe biologische Signalwege initiiert und äußert sich im Wachstum der Kardiomyozyten. Dabei ist ein fein austariertes Gleichgewicht aus Muskelwachstum, Inflammation und nachwachsender Gefäßversorgung essentiell. Problematisch wird es dann, wenn die Hypertrophie in den Kardiomyozyten durch zu viele end-zu-end Verknüpfungen von Sarkomeren geschieht, die Zellen also vor allem in der Länge wachsen. Dies kann die kontraktile Kraft der Myozyten verringern und ventrikuläre Auswurfchwäche, ventrikuläre Dilatation und Arrhythmien zur Folge haben [28]. Ein in diesem Zusammenhang beispielhafter, bedeutender Signalweg ist der Akt-Signalweg, welcher unter anderem aktiviert wird, wenn mechanosensitive Ionenkanäle eine übermäßige Ventrikelbelastung detektieren oder die bei mechanischem Stress ausgeschütteten Faktoren Angiotensin-II (ATII) und Endothelin-1 über

die $G\alpha_q$ -Untereinheit eines G-Protein gekoppelten Rezeptors (GPCR) die Phospholipase C (PLC) aktivieren [29]. Im Rahmen des Akt-Signalweges kommt es über eine Aktivierung von Calcineurin zu einer Translokation des Transkriptionsfaktors NFAT, wodurch hypertrophe Gene abgelesen werden. Dies führt kurzfristig zu linksventrikulärer Hypertrophie, langfristig jedoch zu Herzinsuffizienz [30]. Auch epigenetische Faktoren spielen eine Rolle, wenn beispielsweise durch oxidativen Stress Klasse II Histondeacetylasen ihre inhibierende Funktion auf prohypertrophische Transkriptionsfaktoren wie NFAT, MEF und GATA-4 verlieren [31, 32].

Interaktionen zwischen Kardiomyozyten und Kardiofibroblasten

Interessanterweise haben Fibroblasten einen entscheidenden Einfluss auf die Hypertrophie von Kardiomyozyten, da diese beiden Zelltypen biochemisch über parakrine Signale, biomechanisch über die Extrazellulärmatrix (EZM) oder mechanische Junctionen und elektrisch über Gap Junctions und membranständige Nanokanäle kommunizieren [33]. Im Umkehrschluss beeinflussen auch Kardiomyozyten das Verhalten von kardialen Fibroblasten. Parakrin sind vor allem die auf beiden Zelltypen exprimierten Rezeptoren für TGF- β , ATII und für Interleukine von Relevanz, weil über diese inflammatorische, hypertrophe und fibrotische Signalwege induziert werden können [34-37]. Die größtenteils von Fibroblasten sezernierten Hauptbestandteile der Extrazellulärmatrix sind die Kollagene I und III, Fibronectin und die für das Gleichgewicht der Extrazellulärmatrix verantwortlichen Enzyme, die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und deren Inhibitoren, Tissue-Inhibitors-of-Metalloproteinasen (TIMPs). Bei einer Akkumulation von Kollagenen kommt es zu einer eingeschränkten mechanischen Funktion der Kardiomyozyten und zu einer Störung der Erregungsweiterleitung zwischen ihnen, da die Zell-Zell-Verbindungen beeinträchtigt werden [38]. Ebenfalls wird die Bedeutung von Fibronectin diskutiert, welches von Kardiomyozyten mittels membranständigen Integrinen detektiert wird und unter pathologischen Umständen einen möglichen Einfluss auf die mechanische und rhythmogene Funktionalität der Herzmuskelzellen hat [39, 40]. In Co-Kultur-Versuchen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass MMPs elementar für die Organisationsfähigkeit der Kardiomyozyten sind, was die Bedeutung der Interaktionen zwischen Myozyten und Fibroblasten beziehungsweise der EZM weiter unterstreicht [41, 42]. Eine noch direktere Verknüpfung zwischen den beiden Zelltypen stellen die, aus Connexinen bestehenden, Gap Junctions und membranständige Nanokanäle dar [43-45]. Auch wenn die pathophysiologische Bedeutung, abgesehen von der elektrischen Reizweiterleitung, dieser

Verbindungen noch nicht gut untersucht ist, ist eine Relevanz für multiple darüberhinausgehende Zellfunktionen wahrscheinlich.

1.1.3 Interstitielle Fibrose und der kardiale Fibroblast

Begleitet wird die myokardiale Hypertrophie meist durch eine interstitielle und perivaskuläre Fibrose, welche durch inflammatorische und apoptotische Vorgänge entsteht [17]. Eine unbestrittene Schlüsselrolle nimmt dabei stets der kardiale Fibroblast ein.

Der kardiale Fibroblast – eine Wächterzelle

Fibroblasten wachsen gut in 2D-Zellkulturen an [46] und präsentieren sich mit einer flachen, spindelförmigen Morphologie und vielen Ausläufern [47]. Ein Alleinstellungsmerkmal im Vergleich zu den anderen Zellen des Herzens ist, dass Fibroblasten keine Basalmembran besitzen [48]. Kardiale Fibroblasten sind meist mesenchymalen Ursprungs und stellen einen gewichtigen Teil der kardialen Zellpopulation dar [49]. Ihr Anteil wurde bereits in diversen Studien untersucht, welche in ihrer jeweiligen Definition von Fibroblasten und somit auch den verwendeten Methoden variieren. Mäuse- (< 20% - 26%) und Menschherzen (< 20%) scheinen weniger Fibroblasten zu enthalten als Rattenherzen (~ 63%) [50, 51].

Ihre physiologische Hauptfunktion besteht in der Verwaltung der EZM und der Strukturierung des Interstitiums, doch haben sie weitere wichtige, häufig übersehene, Eigenschaften. So nehmen sie an der Erregungsweiterleitung teil, beeinflussen die Angiogenese und sind in der Lage, sowohl mechanische als auch chemische Zeichen der Belastung zu registrieren. Sie werden daher auch als Wächterzellen bezeichnet, welche auto-/ und parakrin (Abbildung 2) über die Sekretion von Zytokinen unterschiedlichste Zelltypen im Myokard und seiner Umgebung mobilisieren können und somit die entzündliche und fibrotische Antwort des Herzens dirigieren [49].

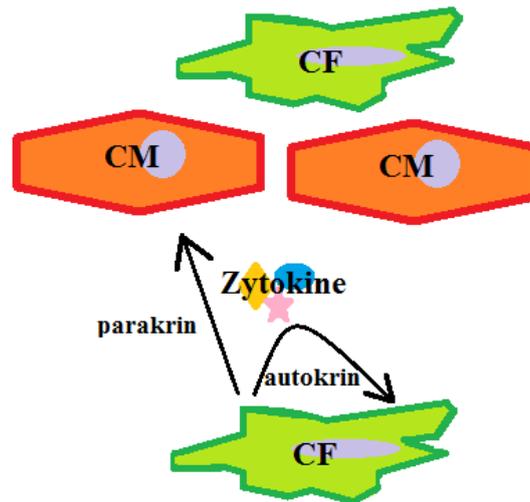


Abbildung 2: Kardiale Fibroblasten (CF) wirken über Zytokine wie z.B. IL-1 β , TNF α oder TGF β autokrin auf sich selbst oder parakrin auf umliegende Zellen wie Kardiomyozyten (CM) [49]

Unter inflammatorischen Umständen transdifferenzieren Fibroblasten zu ihrer aktivierten Form, den Myofibroblasten. Beispielhaft wird in Abbildung 3 ein möglicher Ablauf dargestellt. Es gibt jedoch auch viele weitere mögliche Wege, auf denen Fibroblasten aktiviert werden. So führt z.B. auch ein stimuliertes Renin-Angiotensin-Aldosteron-System-System über Angiotensin-II zu einem erhöhten Level an TGF- β im Herzgewebe und auch andere Wachstumsfaktoren und Zytokine können die Transdifferenzierung einleiten [52-55]. Ob Myofibroblasten auch aus anderen Zellen als Fibroblasten, wie z.B. Fibrozyten, Endothelzellen und Stammzellen, hervorgehen können, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen [48]. Myofibroblasten unterscheiden sich zu normalen Fibroblasten, weil sie verstärkt EZM-wirksame Proteine wie MMPs und die Prokollagene I, III, IV sezernieren und eine fibrotische Zytokin-vermittelte parakrine Wirkung haben. Des Weiteren exprimieren sie kontraktile Proteine, mehr α -Smooth-Muscle-Actin und sind mobiler als normale Fibroblasten [56]. In gesundem Gewebe sind sie eher selten zu entdecken, umso mehr jedoch in verletztem oder entzündetem Gewebe, wo sie unter anderem zum Schließen von Wunden und zur Narbenentstehung wesentlich beitragen. Eine übermäßige Myofibroblasten-Aktivierung kann dann jedoch in einem maladaptiven Remodeling des Gewebes enden [57, 58].

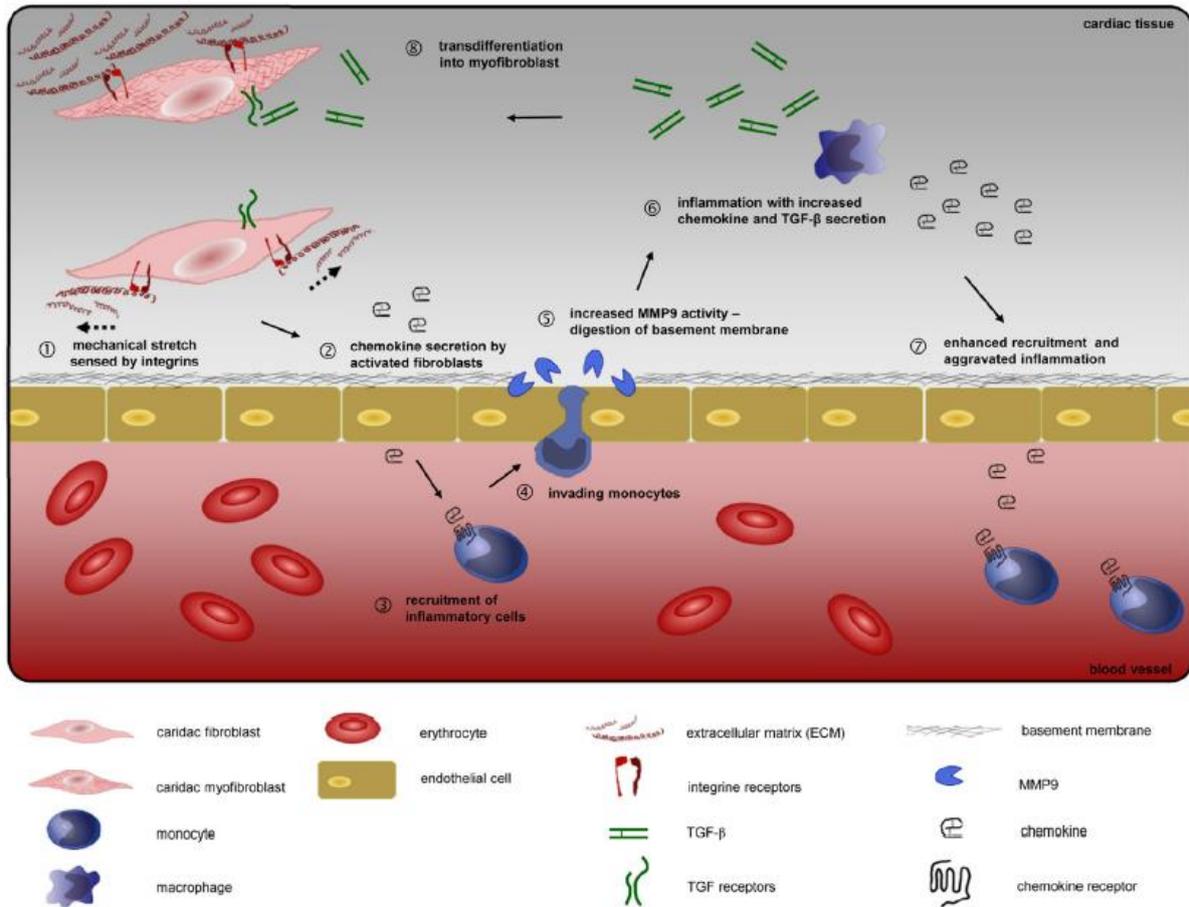


Abbildung 3: Ein Stresssignal wird vom Fibroblasten registriert (1), welcher mittels Ausschütten von Chemokinen (2) Entzündungszellen wie Monozyten rekrutiert (3), die in das Gewebe einwandern (4,5) und dort TGF-β sowie inflammatorische Zytokine sezernieren (6). TGF-β führt schlussendlich zu einer Translokation von Smad-Proteinen in den Nukleus, wo sie eine Vielzahl an profibrotischen Genen induzieren [59, 60]. Das wiederum veranlasst dann die Transdifferenzierung der Fibroblasten in Myofibroblasten (8). Abbildung aus: Lindner, Zietsch [61]

Pathophysiologie der kardialen Fibrose

Charakteristisch für die Fibrose ist eine Störung des empfindlichen Gleichgewichts zwischen ständigem Auf- und Abbau der Extrazellulärmatrix [17]. In der diastolischen Herzinsuffizienz kommt es vor allem zu einer Anreicherung der Kollagene I und III in der Extrazellulärmatrix, zunehmender Verknüpfung der Kollagenfibrillen sowie einer vermehrten Aktivität von EZM-modulierenden Proteinen wie den MMPs [1, 62]. Die dadurch verursachte Steifigkeit verringert die Elastizität und diastolische Funktion des Herzens. Es verschlechtert sich sowohl die Mechanosensorik als auch die elektrochemische Überleitung zwischen den kardialen Zellen [63, 64]. Pathophysiologische Ursache dafür sind neben einem Abbau von MMP-Inhibitoren

[65] und der Stimulation von pro-fibrotischen Faktoren wie dem Tissue-Derived-Growth-Factor β (TGF- β), Platelet-derived Growth Factor (PDGF) und inflammatorischen Zytokinen [66] auch die Transdifferenzierung von kardialen Fibroblasten zu Myofibroblasten [67] und die Rekrutierung von weiteren Zellen mit Fibroblasten-ähnlichen Eigenschaften [68]. Zudem können Kardiomyozyten eine aktive Rolle in den Entzündungsprozessen spielen, indem sie pro-inflammatorische und pro-fibrotische Sezernierungsmuster zeigen [69].

1.1.4 Inflammation als eine Ursache des kardialen Remodelings

Inflammation ist eine treibende Kraft in der Entstehung und Aufrechterhaltung von kardialem Remodeling [70-72]. Dabei können, je nach Stimulus, ganz unterschiedliche Signalwege involviert sein. Zu den Stimuli gehören unter anderem pro-inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren, mechanische Belastung, Damage-associated molecular patterns (DAMPs), Hypoxie und elektrische Signale. Auslöser dafür können Infektionen, ischämische Infarkte, Volumen- und Druckbelastung oder Arrhythmien sein. Der jeweilige Stimulus hat dann auch einen Einfluss darauf, welche spezifischen Zytokine die kardialen Fibroblasten reaktiv sezernieren [2]. Hauptaugenmerk liegt dabei auf den Interleukinen-1 β (IL-1 β) und -6 (IL-6), sowie auf dem Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α) und dem Tissue-Growth-Faktor- β . Diese stehen über komplexe Interaktionen miteinander in Zusammenhang und haben sowohl gemeinsame, als auch entgegengesetzte Wirkungen, die auch vom jeweiligen Zelltypen – und Zustand abhängen [49]. Es ist daher nicht immer möglich, den jeweiligen Faktoren eine einzelne Funktion oder gar Langzeitfolge zuzuteilen. So kann beispielsweise der Umbau von EZM in einem Infarktareal in der Frühphase eine lebensnotwendige Adaption bedeuten, wohingegen die Aufrechterhaltung solcher biochemischen Prozesse langfristig zu einer pathologischen Fibrose führt [73].

Interleukin-1 β

Interleukin-1 β ist eines der sieben Interleukine der IL-1-Gruppe und ein prototypisch inflammatorisches Zytokin mit Beteiligung an vielen Autoimmunkrankheiten [74-77]. Im Herzen dienen kardiale Fibroblasten als eine der Hauptquellen von IL-1 β , aber auch andere Zelltypen wie Makrophagen und Monozyten können es bilden. Die Produktion von IL-1 β kann beispielsweise durch TNF α oder Hypoxie induziert werden, während Östrogene einen hemmenden Einfluss haben [78, 79]. NF κ B induziert einerseits die Transkription von pro-IL-1 β , sein Mangel kann andererseits aber IL-1 β - Sekretion verstärken [80, 81]. Besonders in der Akutphase nach Myokardinfarkten wurden erhöhte IL-1 β -Spiegel beobachtet [82]. IL-1 β wirkt

über seinen Rezeptor IL-1R und aktiviert über das Myeloid-Differentiation-Protein-88 (MyD88) die IRAK-1- und -4-Signalkaskade [74]. Dadurch drosselt es die Proliferation und Transdifferenzierung von kardialen Fibroblasten zu Myofibroblasten, verstärkt jedoch auch ihre zelluläre Migration [82-86]. Es führt außerdem zu einem erhöhten Einwandern von inflammatorischen Leukozyten und nimmt gleichzeitig Einfluss auf die EZM durch eine verminderte Kollagen-I- und -III-Synthese und eine erhöhte Sekretion von MMP-2 und -9 [87-89]. Über die frühe post-Infarktphase hinaus bestehende hohe IL-1-Spiegel im Myokard fördern die Entstehung von dilatativem kardialem Remodeling [90, 91].

Interleukin-6

Interleukin-6 wird unter anderem durch IL-1 β , TNF α und Angiotensin II induziert und wird im Herzen vor allem von kardialen Fibroblasten und kardialen Myozyten gebildet [92, 93]. Es spielt sowohl eine Rolle im Zellwachstum und in der Zelldifferenzierung, als auch in der Apoptose, hat insgesamt jedoch pleiotrope Wirkungen. Dabei agiert es vor allem über die JAK/STAT-Signalkaskade und induziert NF κ B [94, 95]. Im Herzen hat es Auswirkungen auf die Interaktionen zwischen Kardiomyozyten und Kardiofibroblasten und kann dort zum Beispiel das Infarktareal durch anti-apoptotische Wirkungen reduzieren [94]. Dennoch ist es ein wesentlicher Faktor in der Entstehung von Fibrose [96]. Chou und Kollegen konnten kürzlich *in vitro* und *in vivo* nachweisen, dass IL-6-Signalwege wesentlich an der Entstehung Aldosteron-induzierter myokardialer Fibrose beteiligt sind [97]. In anderen Untersuchungen korrelierte IL-6-Aktivität zwar mit der Entstehung von kardialem Remodeling nach einem Myokardinfarkt, allerdings wirkte IL-6-Hemmung nicht protektiv auf die Entstehung von Fibrose [98, 99].

Tumor-Nekrose-Faktor- α

TNF α -Signalwege haben eine außerordentliche Relevanz in der modernen Medizin: Viele Therapien gegen Autoimmunerkrankungen funktionieren über eine Blockade von TNF α [100-102]. TNF α induziert die Expression von diversen Zytokinen und Enzymen wie z.B. IL-1 β , IL-6 und MMPs [79]. Seine Bildung wird überwiegend über Toll-Like-Rezeptoren (TLR), den MAP-Kinase- und den NF κ B-Signalweg induziert [103]. Die TNF α -Rezeptoren 1 und 2 haben, wie in Abbildung 4 demonstriert, voneinander abweichende Downstream-Mechanismen, was vermutlich zur pleiotropen Funktion im kardialen Remodeling beiträgt [104]. Es konnte eine Assoziation zwischen erhöhten TNF α -Spiegeln, Herzinsuffizienz und Linksherzversagen gezeigt werden [105] und auch ein schützender Effekt durch einen TNF α -Knockouts in Mäusen

mit induzierter Linksherzbelastung wurde im Hinblick auf kardiales Remodeling beschrieben [106]. Auf der anderen Seite wurden allerdings auch schon anti-apoptotische Effekte auf kardiale Myozyten diskutiert [107].

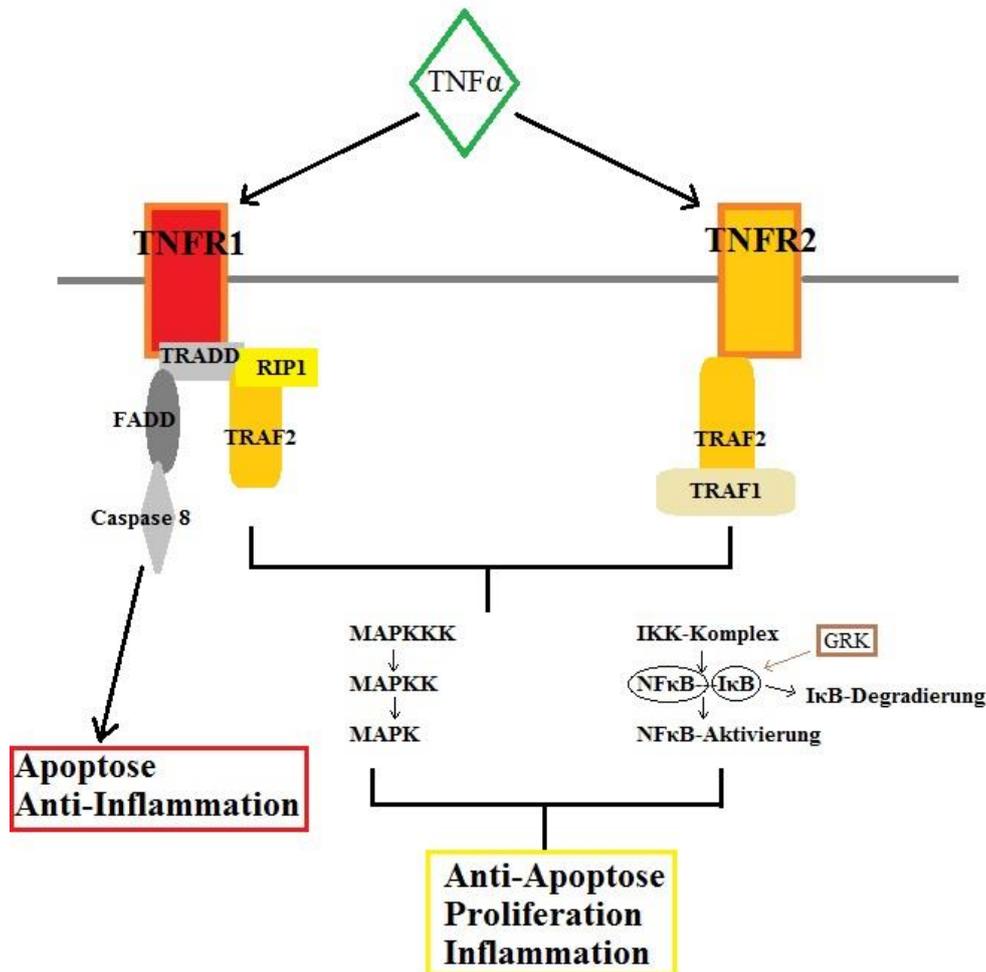


Abbildung 4: Binden von TNF α an einen seiner Rezeptoren (TNFR1 oder TNFR2) kann unterschiedliche Folgen haben: Sowohl TNFR1 (mittels TRADD, RIP1 und TRAF2) als auch TNFR2 (mittels TRAF2 und TRAF1) können TNFR2 über TRAF2 und TRAF1) über den MAP-Kinase- oder den NF κ B-Signalweg anti-apoptotisch und pro-inflammatorisch wirken. NF κ B-Aktivierung kann auch unabhängig vom IKK-Komplex über G-Protein-gekoppelte-Rezeptor-Kinasen (GRK) erfolgen. TNFR1 kann über TRADD und den Death-Rezeptor FADD allerdings auch die Caspase 8 aktivieren und somit Apoptose einleiten. Abbildung adaptiert aus: Parameswaran and Patial [103].

Monocyte Chemoattractant Protein-1

Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), auch CC-Chemokinligand 2 (CCL-2) genannt, ist ein Protein, welches zur großen Familie der Chemokine gehört [108]. Viele Zelltypen können MCP-1 und seinen Rezeptor CCR-2 exprimieren, darunter Endothelzellen,

Muskelzellen und auch Fibroblasten [109-111]. Seine Hauptfunktion liegt darin, die Migration von Monozyten zu induzieren [108]. Es ist zudem ein wichtiger Faktor in der TH₂-vermittelten Immunantwort [112-114]. Vor allem in der Pathogenese von HIV, aber auch bei einer großen Zahl weiterer Erkrankungen konnte die Rolle von MCP-1 bereits demonstriert werden [115]. MCP-1-Aktivität ist darüber hinaus auch mit kardialem Remodeling assoziiert: MCP-1-Hemmung konnte im Mausmodell die Sterblichkeit und die Herzinsuffizienz 4 Wochen nach einem Herzinfarkt senken [116, 117]. Induziert wird MCP-1 vermutlich NFκB-abhängig durch Interleukine wie IL-1β und IL-6, wobei ein negativer Feedback-Loop auf NFκB beobachtet wurde [118-120].

Lipopolysaccharide

Lipopolysaccharide (LPS) sind Verbindungen aus Fetten und Kohlenhydraten und zählen zu den Damage-Associated-Molecular-Patterns (DAMP). Sie stimulieren den Toll-like-Rezeptor-4 (TLR-4) und führen zu einer Aktivierung des Inflammasoms [121]. LPS sind unter anderem in gram-negativen Bakterien oder verschiedenen Viren enthalten, können aber auch mit endogenen Molekülen wie Hitze-Schock-Proteinen interagieren [122-125]. Die TLR-4-Downstream-Signalwege führen entweder MyDD-88-abhängig oder MyDD-88 unabhängig zu einer Induktion von NFκB. MyDD-88-Aktivität ist auch ein wesentlicher Faktor des IL-1-Signalweges. Beim MyDD-88-unabhängigen Signalweg kommt es eher zu einer Stimulation verschiedener Interferone [126-128]. TLR-4 Signalwegen wird in der myokardialen Entzündung eine wesentliche Rolle zugeschrieben [129]. Sie stimulieren außerdem die Progression des maladaptiven kardialen Remodelings und verschlechtern die Heilung nach Myokardinfarkten [130, 131].

Transforming Growth Factor-β

TGF-β wird überwiegend von kardialen Fibroblasten und Leukozyten produziert [132] und wirkt entweder über seinen zellmembranständigen Rezeptor durch die Aktivierung des Smad-Signalweges oder gleich durch intrazelluläre Effektoren [60, 133]. Latentes myokardiales TGF-β kann nach Verletzungen des Herzens beispielsweise durch Entstehung von ROS sehr schnell freigesetzt werden [134, 135]. Es ist an Zellproliferation, -differenzierung und -apoptose beteiligt, vor allem jedoch stimuliert es kardiale Fibroblasten zur verstärkten Produktion von EZM-Proteinen wie Kollagenen, Fibronectin, Proteoglykanen und zur Expression von kontraktilen Genen, wodurch die kardialen Fibroblasten in Myofibroblasten transdifferenzieren

[136-140]. Da TGF- β sowohl pro- als auch antiproliferative Prozesse induziert, ist seine genaue Rolle in der Pathogenese der Herzinsuffizienz nicht vereinfachend festzulegen [141-144].

Matrix-Metalloproteinasen

Matrix-Metalloproteinasen werden von kardialen Fibroblasten produziert und wirken vor allem auf die Zusammensetzung der Proteine der EZM, indem sie Kollagene und andere Proteine degradieren. Physiologischerweise sind Expression und Funktion von MMPs streng reguliert. Im kranken Herzgewebe sind sie durch die Präsenz inflammatorischer Zytokine oder mechanische Belastung allerdings verstärkt exprimiert, wodurch ein exzessiver Umbau der EZM stattfindet [145-149]. Matrix-Metalloproteinasen werden durch Tissue-Inhibitors-of-Metalloproteinasen antagonisiert. Beide Enzymgruppen können zusätzlich sowohl anti- als auch pro-fibrotische und -angiogenetische Effekte haben, jeweils abhängig von weiteren Umständen [58, 150-155]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Effekte von MMPs außerdem über die bloße Degradierung von EZM-Proteinen hinausgehen. So spielen sie auch eine Rolle in der Aktivierung von Leukozyten, in der antimikrobiellen Immunantwort und in Chemokin-Interaktionen [156-158].

MMP-2 und MMP-9

In der Betrachtung des kardialen Remodelings sind unter anderem die Gelatinase A (MMP-2) und die Gelatinase B (MMP-9) interessant. Beide Enzyme degradieren gelöste Kollagen-I- und -III-Monomere [159-163]. Untersuchungen an Mäusen konnten zeigen, dass MMP-2 und MMP-9 einen Tag nach einem Herzinfarkt im Infarktareal von Mäusen stark vermehrt vorlagen [164]. Auch beim Menschen wurde bereits belegt, dass MMP-9 in der Frühphase nach einem Infarkt verstärkt gebildet wird [165]. Außerdem treibt MMP-2-Erhöhung bei Mäusen die Entwicklung von linksventrikulärer Dysfunktion und Dilatation voran, während eine MMP-2-Blockierung die Entstehung von Ventrikelrupturen hemmt [166, 167]. Ein weiteres Indiz für die Relevanz der beiden Gelatinasen in der Pathophysiologie der ischämischen Kardiomyopathie ist, dass das Fehlen ihres Inhibitors (TIMP-3) zu einer frühen Entwicklung von dilatativer Kardiomyopathie und myokardiale Fibrose führt [168, 169].

1.1.5 Der NF- κ B-Signalweg im kardialen Remodeling

Einer der bedeutsamsten und am umfassendsten untersuchten inflammatorischen Signalwege ist der NF κ B-Signalweg. Die Bezeichnung NF κ B umfasst eine Familie aus NF κ B-Proteinen, welche in zwei Klassen eingeteilt werden kann: Klasse I (p50 und p52) und Klasse II

(RelA[p65], RelB, c-Rel). Dimere aus Kombinationen aus den beiden Klassen, zumeist p50:p65, können an Variationen einer fast palindromischen DNA-Sequenz ihre Wirkung entfalten, die in den Promotorregionen hunderter Zielgenen enthalten ist. Homodimere der Klasse I wirken repressiv, während heterodimere oder homodimere mit Beteiligung der Klasse II transkriptionsaktivierend wirken [170, 171]. Diese Zielgene können sowohl anti- als auch pro-inflammatorisch und sowohl pro-apoptotisch als auch anti-apoptotisch agieren. Somit lassen sich die Folgen von NFκB-Aktivierung immer nur in Rücksicht auf die Gesamtsituation abschätzen [73]. NFκB-Aktivierung kann über klassische „canonical“ Signalwege oder über die alternativen „non-canonical“ Signalwege erfolgen. Beispielsweise ist ein bereits gut erforschter klassischer Weg die Aktivierung über den TNFα-Rezeptor 1 (TNFR1). Dabei führt letztendlich die Phosphorylierung von Inhibitoren von κB (IκB) durch IκB-Kinasen (IκBK) zur Freisetzung eines p50/p65-NFκB-Dimers, welcher dann im Zellkern zur transkriptionalen Stimulation bestimmter Zielgene führt [172]. Es gibt jedoch eine große Menge weiterer endogener und exogener Stimuli, welche NFκB induzieren können: Lipopolysaccharide von gram-negativen Bakterien aktivieren den Signalweg über die Toll-Like-Rezeptoren [173], inflammatorische Zytokine wie IL-1β führen zu RelA-Induktion [174] und auch mechanische Belastung von Zellen wird als Aktivator von IκBK diskutiert [175, 176].

NFκB – pro- oder anti-inflammatorisch?

Da die Auswirkungen von NFκB-Aktivierung pleiotrop sind, ist eine vereinfachende Aussage des Einflusses dieser auf das kardiale Remodeling nicht möglich. Zunächst wurden vor allem die pro-inflammatorischen zum Beispiel durch den Anstieg von inflammatorischen Zytokinen und TNFα als schädlich für das Herz angesehen. Nach aktuellem Erkenntnisstand wirkt vor allem die NFκB-Aktivierung im frühen Zeitraum nach Herzmuskelschädigung bei einem Herzinfarkt jedoch kardioprotektiv. Joseph Gordon et al. argumentieren daher also, dass der Zeitpunkt der NFκB-Aktivierung und der Zustand der kardialen Zellen entscheidend seien. Ist die Aktivierung beispielsweise in der Frühphase nach einem Herzinfarkt noch wichtiger Bestandteil der kardialen Adaption auf den Herzmuskelschaden, so nähmen NFκB-Signalwege bei längerfristigem Bestehen einen maladaptiven Charakter an und führten zu kardialem Remodeling [73].

Auswirkungen auf die EZM

Auch auf die Zusammensetzung der EZM nimmt NFκB direkten Einfluss. In kardialen Fibroblasten führt die Hemmung von NFκB microRNA-vermittelt zu einer reduzierten

Kollagen-I-Produktion und einer gehemmten Wirkung von Cell-Tissue-Growth-Factor (CTGF) [177]. Über die TGF- β -assoziierte Kinase 1 (TAK1) werden außerdem vermutlich klassische NF κ B-Signalwege aktiviert [178, 179], welche wiederum durch die gesteigerte Expression von inflammatorischen Zytokinen TAK1-Signalwege stimulieren. Diese TAK1-Signalwege regulieren TGF- β 1-Signalwege und können somit ebenfalls pro-fibrotisch wirken [179-183]. Des Weiteren konnte bereits unter anderem von Bond et al. gezeigt werden, dass NF κ B regulierend in die Expression von MMPs eingreift: Eine Hemmung von NF κ B hatte in Gefäßwandzellen die Herabregulierung von MMP-1, -3 und -9 zur Folge [184]. Auch Li et al. berichteten über eine NF κ B-abhängige Induktion von MMP-9 [185].

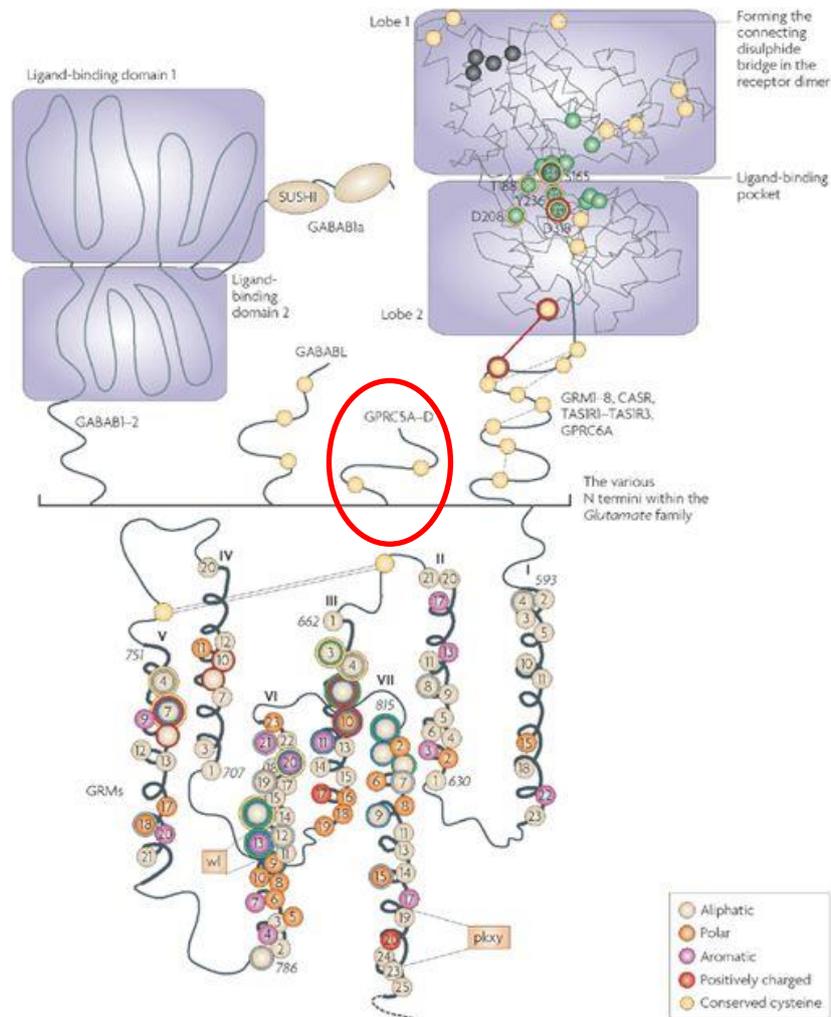
1.2 G-Protein gekoppelter Rezeptor 5B der Familie C

1.2.1 Allgemeines

Die große Gruppe der etwa 800 bekannten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) spielt in der Signaltransduktion unzähliger Prozesse eine essentielle Rolle [186]. Diese immense Bedeutung spiegelt sich auch darin wider, dass GPCRs die größte Zielgruppe von neuentwickelten Pharmaka darstellen: Im Jahre 2017 waren über 34% der von der *US Food and Drug Administration* zugelassenen Medikamente solche, die GPCR-Signalwege beeinflussten. Zu diesen bereits 475 in den USA zugelassenen Medikamenten werden sich in den nächsten Jahren vermutlich noch weitere gesellen, denn über 60 weitere befanden sich 2017 bereits in klinischen Studien [187].

Die Superfamilie der GPCRs lässt sich anhand phylogenetischer Kriterien in fünf Rezeptor-Familien einteilen: Glutamat-, Rhodopsin-, Adhesion-, Frizzled/Taste-2- und Secretin-Rezeptoren, kurz: *GRAFS* [188]. GPRC5B ist ein Teil der Glutamat-Familie, der Familie C. Diese enthält neben GPRC5B 21 weitere Proteine, darunter metabotrope Glutamat-Rezeptoren, GABA-Rezeptoren, Geschmackssensoren und einschließlich GPRC5B insgesamt sieben sogenannte orphan Rezeptoren, deren Ligand und zugehöriges G-Protein nach aktuellem Wissensstand noch nicht bekannt ist [189]. Der Rezeptor wird nahezu ubiquitär exprimiert, vor allem jedoch im Gehirn, im Pankreas, im Hoden, in der Niere und im Herzen [190, 191]. In kardialen Fibroblasten ist er der am 8. häufigsten exprimierte GPCR [192].

1.2.2 Aufbau und Funktion des Rezeptors



Nature Reviews | Drug Discovery

Abbildung 5: GPRC5B hat, wie alle GPCRs, eine sieben-transmembrandomänen (7TM) Konfiguration und gehört zur Subfamilie der Retinoic Acid-Inducible orphan G-protein-coupled receptors (RAIG), deren Expression durch Retinsäuren induziert werden kann [190, 193, 194]. Der extrazelluläre N-Terminus, welcher eigentlich die extrazelluläre Bindestelle für Agonisten darstellt, ist bei GPRC5B im Vergleich zu anderen GPCRs der Familie C äußerst kurz, weshalb in Erwägung gezogen werden muss, dass GPRC5B seine Ligandenbindefunktion im Verlauf der Evolution verloren haben könnte [195].
Abbildung aus: Lagerstrom and Schioth [189]

Signalwege und pathophysiologische Bedeutung

Ein als Bride of sevenless (BOSS) bezeichneter GPCR in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ist zu 28% identisch mit GPRC5B. Der BOSS-Rezeptor ist bei *D. melanogaster* unter anderem in weißen Fettzellen exprimiert und beeinflusst dort Glukose-responsiv den

Fettmetabolismus [196]. Sein Ortholog GPRC5B greift auch beim Menschen in den Stoffwechsel der Fettzellen ein: Eine genomweite Assoziationsstudie konnte zeigen, dass eine stark signifikante Assoziation zwischen dem GPRC5B-Genort und Adipositas besteht, welche vermutlich mit einer erhöhten Genkopienzahl zusammenhängt [197]. Ein GPRC5B-Knockout bei Mäusen verhinderte unter fettreicher Diät eine Gewichtszunahme. Im weißen Fettgewebe von GPRC5B-Knockout-Mäusen waren zudem eine niedrigere Aktivität von inflammatorischen Zytokinen und Makrophagen festgestellt worden [195]. Es konnte in derselben Studie gezeigt werden, dass GPRC5B hauptsächlich mit Caveolin-1, Flotillinen und der Thyrosinkinase Fyn interagiert, welche überwiegend in Lipid Rafts in Plasmamembranen vorkommen. Diese Kopplung zwischen der SH2 Domäne von Fyn und dem phosphorylierten C-Terminus von GPRC5B führt vermutlich zu einer Stimulierung der Kinaseaktivität von Fyn, welche wiederum den I κ BK-NF κ B-Signalweg aktiviert [195]. Diese Autorengruppe konnte ebenfalls zeigen, dass Caveolin-1 die Aktivität von GPRC5B hemmt und dass es bei Fehlen von Caveolin-1 zu einer verstärkten GPRC5B-abhängigen Stimulation des NF κ B-Signalweges kommt [198]. In einer andere Studie mit β -Zellen aus dem Pankreas wurde dargestellt, dass GPRC5B nicht zwangsläufig nur über NF κ B wirkt: Dort waren der JAK-STAT und der Smad-3 Signalweg bedeutsam für die Signaltransduktion [199]. Daher ist weiterhin vieles unklar, denn die bisherigen Ergebnisse wurden stets mit extrakardialen Zellen gewonnen. Über die Rolle und Funktion des Rezeptors speziell im Herzen ist nichts bekannt. Anschließende Untersuchungen hinsichtlich der Induktion und der Funktion von GPRC5B sind also nötig, um seine klinische Bedeutung im kardialen Remodeling aufzuklären.

1.3 Zielsetzung

Das Krankheitsbild der, mit kardialen Remodeling einhergehenden, Herzinsuffizienz ist von großer gesellschaftlicher und klinischer Relevanz. In den letzten Jahrzehnten hat es große Fortschritte in der Aufschlüsselung der beteiligten Mechanismen gegeben: neben der kardiomyozytären Hypertrophie, dem Untergang von Kardiomyozyten und mitochondrialer Dysfunktion wurde auch die von aktivierten kardialen Fibroblasten angetriebene myokardiale Fibrose als wesentlicher Aspekt der Krankheitsentstehung herausgearbeitet. Inflammatorische Signalwege spielen in der Pathophysiologie des kardialen Remodelings eine herausragende Rolle. Trotz immenser Anstrengungen konnte bis heute allerdings noch keine durchschlagende Therapieform entwickelt werden, um maladaptives Remodeling zu verhindern.

GPRC5B ist ein im Herzgewebe exprimierter orphan Rezeptor, welcher über u.a. über NFκB- und JAK-STAT-Signalwege inflammatorische Prozesse moduliert. Hinsichtlich seiner Funktion im Herzen wurde er bisher noch nicht untersucht. Er stellt somit ein reizvolles Ziel dar, um die Pathophysiologie des kardialen Remodelings weiter aufzudecken und mögliche pharmakologische Therapieansätze zu finden.

Hypothesen

1. GPRC5B-Expression wird durch Inflammation und Zellstress reguliert
2. GPRC5B nimmt pro-inflammatorisch Einfluss auf kardiale Fibroblasten und die Extrazellulärmatrix
3. GPRC5B moduliert kardiales Remodeling

2) Material:

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Amersham Hybond-P PVDF Membran	GE Healthcare
Axiovert 40 C Mikroskop	Zeiss
Cell Scraper 16cm 2-position blade	Sarstedt
Cellstar Zellkulturplatten 6-,12-,24-well, 6cm-, 10cm Durchmesser	Greiner Bio One
Centrifuge 5810	Eppendorf
Chromatographie-Papier	Whatman
CFX96 Real-Time PCR Detection Sys	BioRad
CO ₂ -Inkubator	Shel Lab
Deckgläschen 18mm Durchmesser	Karl Hecht KG
Duomax 1030 Plattformschüttler	Heidolph
ECX-F26.M UV-Transilluminator	Peqlab
Faltenfilter 110mm Durchmesser	Schleicher & Schuell
Flexcell® FX-5000™ Tension System	Flexcell International Cooperation
FluorChem Q Kamera	Alpha Innotech
Galaxy Ministar Mikrozentrifuge	VWR
Heraeus Fresco 21 Zentrifuge	Thermo Scientific
Heraeus Pico 21 Zentrifuge	Thermo Scientific
Herasafe KS 15 Klasse II Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific
Horizon 11-14 Gelelektrophorese	Life Technologies
Infinite M200Pro Mikroplattenleser	Tecan
Mini PROTEAN Tetra System	Bio Rad
Membran Nitrozellulose	Protran
Mr. Frosty™ Freezing Container	Thermo Scientific
MyCycler Thermal Cycler	Bio Rad
NanoDrop 2000 Spektrophometer	Thermo Scientific
Neubauer- Zählkammer	Assistent
Newborn Calf Serum (NCS)	PAA Laboratories
Objekträger 76x26x1 mm	Marienfeld
Olympus BX53 Mikroskop	Olympus
Olympus DP72 Kamera	Olympus

Parafilm	BEMIS
Pasteurpipetten, Glas	ROTH
T-Personal Thermocycler	Biometra
Pipetten Eppendorf-Reference	Eppendorf Research
Pipettenspitzen Biosphere Filter Tip	Sarstedt
Pipettenspitzen, mit Filter	Sarstedt
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Power Pac HC	Bio Rad
Power Pack P25	Biometra
PP-Mikroplatte 96-well	Greiner Bio One
Precellys 24 homogenizer	Peqlab
RCT Basic Magnetrührer	IKA
Reagiergefäße 0,5ml, 1,5ml, 2ml	Sarstedt
Röhrchen 15ml, 50ml	Sarstedt
Serologische Pipetten	Sarstedt
Seven Easy pH-Messgerät	Mettler-Toledo
Stemi 2000-C Mikroskop	Zeiss
Steril-Cult 200 Inkubator	Labotec
Sterilfilter 0,2 µm Porengröße	Nalgene Labware
SterilGARD Hood	The Baker Company
Subcell® Model 192 Cell	Bio Rad
TE1502S Präzisionswaage	Sartorius
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Titan PCR-Arbeitsstation	Scanlaf
qRT-PCR Platten, 96-well, semi skirted	Bio Rad
Titramax 100 Plattformschüttler	Heidolph
Vacunsafe Absaugsystem	Integra Biosciences
Variomag Poly Magnetrührer	Thermo Scientific
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Zellkulturflaschen 75cm ² , 175cm ²	Sarstedt

2.2 Chemikalien

Agarose	Biozym Scientific GmbH
Albumin Fraktion V aus Rinderserum	Merck KGaA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth

DAPI	Sigma-Aldrich
DEPC	Sigma-Aldrich
DMEM	PAA Laboratories
DMSO	Sigma-Aldrich
DNA Loading Dye 6x	Fermentas
DreamTaq 10x Puffer grün	Thermo Scientific
EDTA	Serva Electrophoresis
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Invitrogen
FCS Gold	PAA Laboratories
Fluor Preserve Reagent	Caliochem
Formamide	Sigma-Aldrich
GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder	Fermentas
HEPES	Carl Roth
iQ PowerMix Reagent, multiplex qRT	Bio Rad
Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen
Laser Scanning Microscope 800	Zeiss
Methanol	Carl Roth
Natriumchlorid	AppliChem
Natriumhydroxid	AppliChem
Opti-MEM	Gibco
PageRuler Plus prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen/GIBCO
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Protein-Assay Farbstoff-Konzentrat	Bio Rad
Roti®-Block 10x	Roth
SDS	Serva Electrophoresis
TEMED 99% p.a. Electrophoresis	Carl Roth
Tris-Base	Carl Roth
Tris-HCL	Carl Roth
Triton X 100	Serva Electrophoresis
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich
Vectashield HardSet Mounting Medium	Vecta-Labs

2.3 Enzyme

Collagenase Typ 2	Worthington/Cellsystems
Complete-Proteinase Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics
DreamTaq DNA-Polymerase	Thermo Scientific
Phosphatase-Inhibitor 2 und 3	Sigma-Aldrich
0,25% (w/v) Trypsin-EDTA-Lösung	Invitrogen/GIBCO

2.4 Antikörper

Primäre Antikörper

Tabelle 2: Liste der primären Antikörper

AF = Alexa Fluor®, IF = Immunfluoreszenz, WB = Western Blot

Antikörper anti-	#	Spezies	Klona -lität	Hersteller	Beschreibung	Verdünnung
α -Tubulin	T5168	Mouse	Mono	Sigma	IF, WB	1:4000 (IF), 1:8000(WB)
GAPDH	G8795	Mouse	Mono	Sigma	WB	1:20000
GPRC5B		Rabbit	Poly	Hirabayashi (Japan)	WB	1:8000
GPRC5B	Sc-135260	Rabbit	Poly	Santa Cruz	IF	1:100
MMP-9	Ab38898	Rabbit	Poly	Abcam	WB	1:1000
Collagen-1A1	Sc-293182	Mouse	Mono	Santa Cruz	WB	1:1000
α SMA AF-594	Ab202368	Mouse	Mono	Abcam	IF	1:200
DDR2 AF-488	Sc-81707	Mouse	Mono	Santa Cruz	IF	1:100

Sekundäre Antikörper

Tabelle 3: Liste der sekundären Antikörper

AF = Alexa Fluor®, IF = Immunfluoreszenz, WB = Western Blot

Antikörper anti-	#	Spezies	Konjugat	Hersteller	Beschreibung	Verdünnung
------------------	---	---------	----------	------------	--------------	------------

Mouse	Sc-2302	Goat	HRP	Santa Cruz	WB	1:10000
Mouse	1829584	Goat	AF 546	Invitrogen	IF, WB	1:1000
Mouse	1696214	Chicken	AF 488	Life Technologies	IF	1:1000
Rabbit	Sc-2357	Mouse	HRP	Santa Cruz	WB	1:10000
Rabbit	1697089	Chicken	AF 488	Life Technologies	IF	1:1000
Rabbit	1640319	Donkey	AF 546	Life Technologies	IF	1:1000

2.5 Kits

Platinum SYBR Green qPCR SuperMix	Invitrogen
Superscript III First Strand Kit	Invitrogen
RNase-Free DNase Set	Qiagen
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
QIAshredder	Qiagen
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific

2.6 Primer

Tabelle 4: Primer für quantitative Real-Time PCR

Ziel	5'-3'
Col1A1 Fw	GAAGAATATGTATCACCAGACGC
Col1A1 Rv	CATAGCCATAGGACATCTGGG
CTGF Fw	CCGGGTTACCAATGACAATA
CTGF Rv	CACACCCACAGAACTTAGC
TNF α Fw	GACCCTCACACTCAGATCATCTTCT
TNF α Rv	CCACTTGGTGGTTTGCTACGA
Interleukin1 β Fw	CACCTCTCAAGCAGAGCACAG
Interleukin1 β Rv	GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC
Interleukin6 Fw	TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC
Interleukin6 Rv	TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC
MCP1 Fw	CTGTTGTTACAGTTGCTGC
MCP1 Rv	AGCTTGGTGACAAATACTACAGC
MMP2 Fw	GTTTACCCCTGATGTCCAG
MMP2 Rv	GAAGAAATAGCTGTGACCACC

MMP9 Fw	GGAACGTATCTGGAAATTCGAC
MMP9 Rv	GGAGGTCATAGGTCACGTAG
ProCol1A1 Fw	TTCACCTACAGCACGCTTGT
ProCol1A1 Rv	TTGGGATGGAGGGAGTTTAC
GPRC5B Fw	CTCTTCGCACTCTGCTTTTC
GPRC5B Rv	TTCGTGTCACGTAGCACAGT
18S Fw	GCACGGCCGGTACAGTGAAA
18S Rv	GCGCCCGTCGGCATGTATTA
Rpl32 Fw	GGTGGCTGCCATCTGTTTTACG
Rpl32 Rv	CCGCACCCTGTTGTCAATGC
TIMP1 Fw	CACGCTAGAGCAGATAACCAC
TIMP1 Rv	TCGATGATTTCTGGGGAACC

2.7 Puffer und Lösungen

- ADS-Puffer (zehnfach konzentriert)

- 1,16M NaCl
- 197 mM HEPES
- 94 mM NaH₂PO₄
- 55,5mM Glukose
- 53,6 mM KCl
- 8,3 mM MgSO₄, pH 7,4, steril filtriert

- RIPA Kernlysepuffer für Proteinextraktion

- 50 mM Tris-HCl
- pH 7,5 mit 1M NaOH titriert
- 150 mM NaCl
- 0,5% (w/v) Natrium Deoxycholat
- 1% (v/v) NP-40
- 0,2% SDS

Zum Ernten wurden dem Puffer noch folgende Proteine beigefügt

- 40µl 25x Proteinase-Inhibitor Cocktail
- 10µl Phosphatase-Inhibitor 2
- 10µl Phosphatase-Inhibitor 3

- Laufpuffer für SDS-Page (zehnfach konzentriert)

- 250 mM Tris

- 1,9 M Glycin
- 1% (w/v) SDS
- PBS-Puffer (einfach konzentriert)
 - 137 mM NaCl
 - 2,7 mM KCl
 - 4,3 mM Na₂HPO₄
 - 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,4, autoklaviert
- Laemmli-Puffer (vierfach konzentriert)
 - 250 mM Tris pH 6,8
 - 5% (w/v) SDS
 - 40% (v/v) Glyzerin
 - 0,005% (w/v) Bromphenolblau
 - 10% (v/v) 2-Mercaptoethanol
- Sammelgelpuffer für SDS-Page
 - 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
- TBST-Puffer
 - 100 mM Tris-Cl, pH 7,5
 - 0,9% (w/v) NaCl
 - 0,4% (v/v) Tween 20
- Transferpuffer für Western Blot
 - 20% (v/v) Methanol
 - 25 mM Tris
 - 192 mM Glycin
 - 0,037% (w/v) SDS
- Trenngelpuffer für SDS-Page
 - 1,5 M Tris, pH 8,8
- Trypsin-EDTA-Lösung
 - 0,25% (w/v) Trypsin
 - 0,53mM EDTA

In PBS

2.8 Medien für Zellkulturversuche

Medien wurden stets bei +4° C gelagert und lediglich kurz vor der Verwendung für Versuche in einem Wasserbad bei +37°C inkubiert.

- Vollmedium zum Kultivieren von Kardiofibroblasten aus neonatalen Ratten (NRCF) in den ersten 48 h

- DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 110 mg/l Natriumpyruvat (Fertigmedium)
- 10% (v/v) FCS Gold
- 100 U/l Penicillin G
- 100 µg/ml Streptomycin
- 2mM L-Glutamin

- FCS-freies Medium zum Kultivieren von NRCF nach 48 h für die Stimulations- und adenoviralen Überexpressionsversuche

- DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 110 mg/l Natriumpyruvat (Fertigmedium)
- 100 U/l Penicillin G
- 100 µg/ml Streptomycin
- 2mM L-Glutamin

- FCS-reduziertes, Antibiotika freies Medium zum Kultivieren von NRCF nach 48 h für die siRNA-vermittelten

- DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 110 mg/l Natriumpyruvat (Fertigmedium)
- 2% (v/v) FCS Gold
- 2mM L-Glutamin

- Wachstumsmedium für die HEK293-A-Zellen DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 110 mg/l Natriumpyruvat (Fertigmedium)

- DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 110 mg/l Natriumpyruvat (Fertigmedium)
- 10% (v/v) FCS Gold
- 100 U/l Penicillin G
- 100 µg/ml Streptomycin
- 2mM L-Glutamin

2.9 Versuchstiere

- Neonatale Ratten vom Wistar-Stamm

Männliche und weibliche Wistar-Ratten wurden von Charles-River Laboratories bezogen. Diese wurden in der Zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel verpaart. Die daraus hervorgehenden neonatalen Ratten wurden nach 1-3 Tagen Lebenszeit für die Gewinnung der NRCF verwendet. Die Genehmigung für diesen Tierversuch wurde vom Ministerium für Energiewende,

Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein erteilt
(Aktenzeichen: V312-7224.121-4).

2.10 Zellen

- NRCF

Primäre Fibroblasten aus Ventrikeln von neonatalen Ratten. Die Kultivierung wird im
Methodenteil detailliert beschrieben (3.1 Kultur von Säugetierzellen).

- HEK293-A

In dieser humanen, embryonalen Nierenzelllinie kann Adenovirus vervielfältigt werden
[200].

3) Methoden

3.1 Planung der Experimente

Wie in der Einleitung beschrieben, legt der aktuelle Forschungsstand eine pro-inflammatorische Rolle von GPRC5B in intrazellulären Signalwegen nahe. Dies sollte zunächst *in vitro* in NRCF und später *in vivo* an Herzgewebeproben von GPRC5B-transgenen Mäusen untersucht werden. Die kardialen Fibroblasten wurden durch Präparation der Herzen neonataler (1-2 Tage alten) Ratten gewonnen. Die Reinheit der Fibroblastenkulturen sowie die subzelluläre Verteilung des GPRC5B-Rezeptors in den NRCF wurde zu Beginn der Arbeit immunfluoroskopisch im konfokalen Laserscanmikroskop analysiert und die endogene Expression des Rezeptors in den NRCF mithilfe eines spezifischen Antikörpers im Western Blot verifiziert. Um die Regulation von GPRC5B in NRCF zu untersuchen, wurde die Expression von GPRC5B mittels quantitativer real-time-PCR (qRT-PCR) und Western Blot nach Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ und LPS auf mRNA- und Protein-Ebene analysiert. Dabei wurden zeit- und dosisabhängige Effekte getestet. Außerdem wurden flexible, kollagenisierte Membranen genutzt, mit denen eine mechanische Zelldehnung („Stretch-Assay“) von bis zu 18% induziert werden konnte, um Expressionsunterschiede nach mechanischer Belastung zu zeigen.

Zur Analyse der funktionalen Relevanz von GPRC5B in kardialen Fibroblasten wurden eine adenovirale GPRC5B-Überexpression sowie ein siRNA-vermittelter Knockdown des endogenen GPRC5B in NRCF durchgeführt. Über die Bestimmung der Expression von $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6 und MCP-1 wurde ein inflammatorisches Profil ausgelesen. Auch der Einfluss von GPRC5B auf die EZM wurde durch das Eruiere der Matrix-Metalloproteinasen-2 und -9 sowie der fibrotischen Marker Kollagen1A1 und Kollagen3A1 im Zelllysate untersucht.

Es wurden Herzgewebeproben von GPRC5B-überexprimierenden Mäusen genutzt, um mögliche Veränderungen der Markerproteine für Fibrose, insbesondere o.g. Extrazellulärproteine (MMPs, Kollagene) im Herzgewebe dieser Mauslinien im Vergleich zu Mäuseherzen von Wildtypen festzustellen.

3.1 Kultur von Säugetierzellen

Sämtliche verwendete Zellen wurden zur Kultivierung bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Die Bearbeitung der NRCF und HEK293-A geschah stets bei Bedingungen unter einer Sterilbank und, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, an separaten Arbeitsplätzen. Als Kulturgefäße wurden nicht-kollagenisierte Flaschen mit 75 cm² und 175 cm² Grundfläche, Zellschalen mit 6 cm Durchmesser oder Multiwell-Platten mit 6, 12 oder 24 Wells genutzt.

3.1.1 Primärkultur von NRCF

Um eine Primärkultur von NRCF herzustellen, wurden pro Präparation etwa 40 Herzen von neugeborenen Ratten vom Wistar-Stamm im Alter von ein bis drei Tagen gewonnen. Diese wurden zunächst in 75% Ethanol-Lösung getaucht und dann mit einem zügigen Schnitt mit der Schere dekapitiert. Hernach wurde durch einen 2 cm langen Längsschnitt links des Brustbeins der Brustkorb eröffnet und durch sanften Druck auf Abdomen und Thorax mithilfe einer Pinzette die Herzen entnommen. In eiskaltem, einfach konzentriertem ADS-Puffer wurden die Vorhöfe mit den Hohlvenen sowie Aortenbogen und Pulmonalarterien entfernt. Die Ventrikel wurden dann nach Absaugen des ADS-Puffers in kleinste Gewebestücke zerschnitten und in Verdauungslösung (1 ml/Herz) überführt. Diese Lösung enthielt 0,5 mg/μl Collagenase Typ 2 sowie 0,6 mg/ml Pancreatin in einfach konzentriertem ADS-Puffer und wurde zuvor steril gefiltert und auf 37° C erwärmt. Der Vorverdau geschah in einem 37° C warmen Wasserbad bei horizontalem Schütteln mit 40 rpm. Die Verdauungslösung wurde nach 20 Minuten abgenommen und verworfen. Erneut wurden die Gewebestücke in Verdauungslösung aufgenommen und für 20 Minuten im 37° C warmen Wasserbad bei 40 rpm geschüttelt. Die dabei in die Lösung übergehenden Zellen wurden durch ein Netz (Cell Strainer) in ein 50 ml-Röhrchen gegeben, welchem 8 ml Newborn Calf Serum (NCS) hinzugefügt wurden, um die Collagenase Typ 2 und das Pancreatin zu inaktivieren. Dem folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 Minuten bei 1000g. Das Zellpellet wurde in 5 ml NCS resuspendiert und dann im Inkubator (37° C, 5% CO₂) zwischengelagert. Auf die zurückbleibenden Gewebestücke wurde erneut Verdauungslösung gegeben. Dieser Schritt wurde insgesamt vier bis fünfmal durchgeführt, bis die Gewebestücke vollständig aufgelöst waren. Dann folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (1000 g, 5 min), nach welchem das Zellpellet in 50 ml einfach konzentriertem ADS-Puffer resuspendiert wurde.

In dieser Lösung befanden sich nun kardiale Fibroblasten, Myozyten, Blutzellen und weitere kardiale Zellen. Um die Fibroblasten zu isolieren, wurden die verschiedenen Zelltypen mithilfe einer Percollstammlösung in Gradienten aufgetrennt [201]. Diese Stammlösung wurde aus 27 ml Percoll und 3 ml zehnfach konzentriertem ADS-Puffer hergestellt. Eine Lösung mit niedriger Dichte wurde aus 9 ml Stammlösung, 11 ml ADS-Puffer und Phenolrot und eine Lösung mit hoher Dichte aus 13 ml Stammlösung und 7 ml ADS-Puffer angefertigt. Das Phenolrot diente der besseren Sichtbarkeit der verschiedenen Gradienten. Von der Lösung mit der niedrigen Dichte wurden 4 ml in ein 15 ml Reaktionsgefäß gegeben. Dann wurde die Lösung mit der hohen Dichte vorsichtig auf den Boden des Gefäßes pipettiert. Dabei war es sehr wichtig darauf zu achten, langsam zu pipettieren und zu vermeiden, dass Luftblasen in die

Mischung gelangten. Anschließend wurde die ADS-Zellsuspension gleichmäßig als oberste der drei Phasen auf die befüllten 15 ml Reaktionsgefäße verteilt. Es wurde bei 3000 rpm und 4° C für 30 Minuten zentrifugiert. Die Zellen waren nun nach ihrer Dichte aufgetrennt und es waren drei Phasen zu sehen: Ein Erythrozyten-Pellet am Boden des Gefäßes, die Kardiomyozyten am Übergang der unteren zur mittleren Phase und schließlich die Fibroblasten am Übergang der mittleren zur höchsten Phase.

Die Fibroblasten wurden abgenommen und für 10 Minuten bei 2500 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden in 20 ml 37° C warmem DMEM-Vollmedium gewaschen und erneut für 10 Minuten bei 2500 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde erneut in 20 ml DMEM-Vollmedium resuspendiert und die Zellkonzentration mithilfe einer Trypanblaufärbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden mit angemessener Dichte (siehe [Tabelle 5](#)) in den nicht-beschichteten Kulturgefäßen ausgesät. Nach 60 Minuten wurden die Kulturgefäße mit den darin befindlichen Zellüberständen dreifach abgespült und der Überstand anschließend verworfen. Die bereits am Boden haftenden Fibroblasten blieben zurück und wurden so von dem geringen Anteil anderer, durch den Percollgradienten nicht ausreichend von den Fibroblasten getrennten, Zelltypen wie Kardiomyozyten, glatten Muskelzellen der Gefäßwand und vaskulären Endothelzellen gereinigt.

Die Konfluenz betrug nun etwa 10%. Frisches DMEM-Vollmedium wurde hinzugegeben und die Fibroblasten wurden für 48 h bei 37° C kultiviert. In dieser Zeit wuchsen die Fibroblasten zu einer höheren Konfluenz heran. Die beobachtete Verdopplungszeit betrug etwa 18 h. Ein erneuter Mediumwechsel fand statt: Nach diesem Zeitpunkt wurden die Zellen komplett ohne FCS behandelt. Einzige Ausnahme stellten Versuche mit siRNA-vermitteltem Knockdown dar, in welchen zunächst mit reduziertem FCS-Gehalt (2%) weitergearbeitet wurde. Nach 18 h wurden die Zellen für die unterschiedlichen Versuche verwendet.

Tabelle 5: Aussaatdichte in unterschiedlichen Gefäßen

Gefäßtyp	Aussaatmenge pro Well/Schale	Menge Medium in ml pro Einheit
12-Well (mit Deckgläschen)	$3,75 \times 10^5$	1
6-Well	$7,5 \times 10^5$	2
6 cm Schale	$1,5 \times 10^6$	6

3.1.2 Stimulation der Fibroblasten

Medium wurde mit 100 ng/ml Lipopolysacchariden oder 50 ng/ml TNF α versetzt. Mit diesem Medium wurden anschließend die Fibroblasten für 6 h/ 12 h/ 24 h/ 48 h stimuliert. Kontrollzellen wurden ansonsten identisch behandelt, jedoch nicht mit LPS oder TNF α stimuliert.

3.1.3 Mechanische Dehnung der Zellen

Die rhythmische, mechanische Dehnung von kardialen Zellen im Kontraktionszyklus des Herzens wurde simuliert, indem die NRCF auf flexiblen, kollagenisierten Membranen einer 18%-Dehnung ausgesetzt wurden. Dafür wurden sie in einer 6-Well-Platte mit flexiblen, bereits vom Hersteller beschichteten, Membranen ausgesät und, wie oben beschrieben, kultiviert. Nach 48 h wurde die Platte nach Protokoll des Herstellers im Flexcell® FX-5000™ Tension System eingespannt. Für 6 h/ 24h wurde bei 37° C und 5% CO₂ rhythmisch über einen Unterdruck 18% Dehnung auf die Membranen und die darauf wachsenden Zellen ausgeübt.

3.1.4 Adenovirale Überexpression in NRCF

Das Medium wurde gewechselt und enthielt nun 20 MOI LacZ-Adenovirus oder 20 MOI GPRC5B-Adenovirus. Die Infektion mit LacZ-Adenovirus diente dazu, eine Kontrollpopulation an Zellen zu erstellen, welche ebenfalls mit einem Adenovirus infiziert wurde. Die Multiplizität der Infektion (MOI) sagt aus, wie viele Viruspartikel pro Zielzelle vorliegen. Die geeignete MOI von 20 wurde durch eine Dosiskurve ermittelt (4.3.1 Adenoviral-vermittelte Überexpression). 24 h später wurden die Zellen mit warmem PBS gewaschen und mit frischem Medium behandelt. Nach weiteren 48 h fand ein erneuter Mediumwechsel statt, sofern im Versuch eine Stimulation vorgesehen war.

3.1.5 Transfektion der NRCF mit siRNA

Das Medium wurde gewechselt und enthielt nun 2% FCS, 2 mM L-Glutamin, aber keine Antibiotika. Ein Mastermix aus 100 μ l OptiMEM, 10 μ l Lipofectamine 2000 und 125 pmol siRNA pro 6-Well wurde auf die Zellen geträufelt. Eine geeignete Menge an siRNA wurde durch eine Dosiskurve ermittelt (4.3.2 siRNA-induzierter Knockdown). Nach 24 h wurden die Zellen dann mit warmem PBS gewaschen und für weitere 48 h mit nun FCS- und Antibiotika freiem Medium behandelt. Dann fand ein erneuter Mediumwechsel statt, sofern im Versuch eine Stimulation vorgesehen war.

3.1.6 Kultur der HEK293-A-Zellen

Die Hek293-A-Zellen wurden in nicht-beschichteten T75-Zellkulturflaschen mit 10 ml warmem Wachstumsmedium kultiviert. Sie wachsen einschichtig und verdoppeln sich unter optimalen Bedingungen alle 36 h. Die Zellen wurden bei 70-80% Konfluenz passagiert. Dafür wurden sie zunächst mit warmem PBS gewaschen und dann durch 2 ml warme Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst. Es wurden 10 ml Medium hinzugegeben und die Aktivität des Trypsins wurde durch das enthaltene Serum abgestoppt. Die Zellsuspension wurde bei RT und 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in warmem Medium aufgenommen und im Verhältnis 1:10 (Zellsuspension : Zellmedium) in einer neuen T75-Flasche ausgesät um die Zelllinie zu erhalten. Alternativ wurde die Zellkonzentration in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen dann in 6- oder 12-Well-Platten für weitere Versuche ausgesät.

3.2 GPRC5B-transgene Mauslinie

Die Erstellung dieser GPRC5B-transgenen Mauslinie vom Stamm FVB (von der Firma *Janvier Labs* vertrieben) erfolgte in der Arbeitsgruppe von Yoshio Hirabayashi (RIKEN Brain Science Institute, Saitama, Japan). Die Kreuzung und Zucht wurden dankenswerterweise von Greta Freundt (Kiel) im Tierstall der Universitätsklinik Heidelberg vorgenommen. Für dieses Projekt wurden Tiere beider Geschlechter verwendet. Die Tierversuche sind vom Regierungspräsidium Karlsruhe unter 35-9185.81/G-112/11 („Die Bedeutung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors GPRC5B für die Atherosklerose und Restenose in vivo“) genehmigt worden.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen in 12-Wells auf gläsernen, runden Deckgläschen ausgesät und wie beschrieben kultiviert. Nach 48 h wurden sie einmal mit PBS gewaschen und mit 1 ml 4% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur (RT) für 10 Minuten fixiert. Sie wurden wieder dreimal mit PBS gewaschen und dann in 1 ml PBS mit 2,5% BSA und 0,1% TritonX für eine Stunde bei RT geblockt. Die Deckgläschen wurden aus den Wells herausgenommen und dann in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4° C mit dem bereits fluoreszenzmarkierten primären Antikörper und DAPI (zum Anfärben der Zellkerne) inkubiert. Der Antikörper wurde zunächst in PBS mit 2,5% BSA und 0,1% TritonX verdünnt. Sofern mit einem primären Antikörper gearbeitet wurde, welcher noch nicht fluoreszenzmarkiert war, wurden die Deckgläschen nach der Inkubation mit dem primären Antikörper zunächst dreimal

mit PBS gewaschen und dann mit dem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper, welcher sich gegen den primären Antikörper richtete, inkubiert.

Danach wurden die Deckgläschen noch dreimal mit PBS und zweimal mit deionisiertem Wasser bei RT gewaschen und dann mit 9 µl Klebstoff (englisch *mounting medium*) auf Objektträgergläsern fixiert. Die Lagerung und Trocknung erfolgten über Nacht bei 4° C. Die Fluoreszenzbilder wurden mit dem Programm ZEN an einem konfokalen Lasermikroskop (LSM 800) der Firma Zeiss bei RT gemacht.

3.3.2 RNA-Extraktion *in vitro*

Nach beendetem Versuch wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die RNA-Extraktion wurde mit dem Qiagen-RNeasy Kit (Venlo, NL) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die gewonnene, DNA-freie RNA wurde in 30µl RNase-freiem H₂O gelöst und bei -80° C gelagert.

3.3.3 Messung der RNA-Konzentration mit Nanodrop

Die RNA-Konzentration wurde mit dem NanoDrop™ Photometer bestimmt. Dieses misst die optische Dichte bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge. Lag das Verhältnis zwischen den beiden Wellenlängen nicht zwischen 1,9 und 2,1, war von einer Verunreinigung auszugehen.

3.3.4 cDNA Schreiben

Um die RNA in cDNA umzuschreiben wurde das Superscript III first strand cDNA Synthesekit (Invitrogen, Carlsbad, USA) benutzt. Dafür wurden 1 µg RNA eingesetzt und in einem Gesamtvolumen von 13,5 µl RNase und DNase freiem H₂O verdünnt. Die Lösung enthielt außerdem 250 ng Random Hexamer Primer und 0,5 µl von 10 mM dNTPs (Desoxyadenosin, Desoxythymidin, Desoxyguanin und Desoxycytosin jeweils 2,5 mM) und wurde zunächst in einem Thermocycler 5 Minuten lang bei 65° C denaturiert. Ein Mastermix mit einem Gesamtvolumen von 6,5 µl wurde angesetzt und enthielt 4 µl 5x First strand Puffer, 1 µl 0,1 mM DTT, 1 µl RNaseOut RNase Inhibitor und 0,5 µl Superscript III DNA Polymerase. Der Mastermix wurde der denaturierten RNA hinzupipettiert und die daraus resultierende Lösung von 20 µl im Thermocycler platziert. Es wurde für 10 Minuten bei 25° C, für 1 h bei 50° C und dann für 15 Minuten bei 70° C gecycled und schließlich bei 4° C gekühlt. Etwa 1 µg cDNA war entstanden und wurde dann 5-fach verdünnt zu einer finalen Konzentration von 2 ng/µl. Diese wurde dann mittels qRT-PCR weiter untersucht.

3.3.5 Quantitative Real-Time PCR

Pro Well wurden 18 µl Mastermix (Tabelle 6) und 2 µl cDNA (2 ng/µl) eingesetzt. Als interner Standard zur relative Quantifizierung wurden Primer für 18S rRNA und rpl32 genutzt [202, 203]. Jede Probe wurde in Triplikaten pipettiert, dann wurde die Platte mit Klebefolie abgedichtet und herunterzentrifugiert. Für die Genquantifizierung war im Mastermix Platinum® SYBR® Green qPCR Supermix-UDG enthalten. SYBR® Green lagert sich an amplifizierte DNA an und gibt ein Signal ab, dessen Stärke proportional zur Menge an cDNA in der Lösung ist. Dieses Signal wurde mittels eines Lichtstrahls erregt und dessen Emission vom CFX96 Real Time PCR Detection System gemessen. Da es stets ein Hintergrundrauschen der Fluoreszenz gibt, musste die Signalstärke über eine gewisse Schwelle steigen, bevor sie als signifikant erkannt wurde. Die Zyklusanzahl, nach der das in einem Well erstmals geschah, stellte seinen Threshold Cycle dar.

Tabelle 6: Inhalt des Mastermix für die qRT-PCR

Ingredienz	Volumen
Platinum® SYBR® Green qPCR Supermix	10 µl
Primer Forward	0,4 µl
Primer Reverse	0,4 µl
DNase-freies H ₂ O	7,2 µl
cDNA (2 ng/µl)	2 µl

Die Vervielfältigung der cDNA und Messung fanden unter folgenden Bedingungen statt:

Tabelle 7: Standardprogramm für die qRT-PCR mit rGPRC5B-Primern

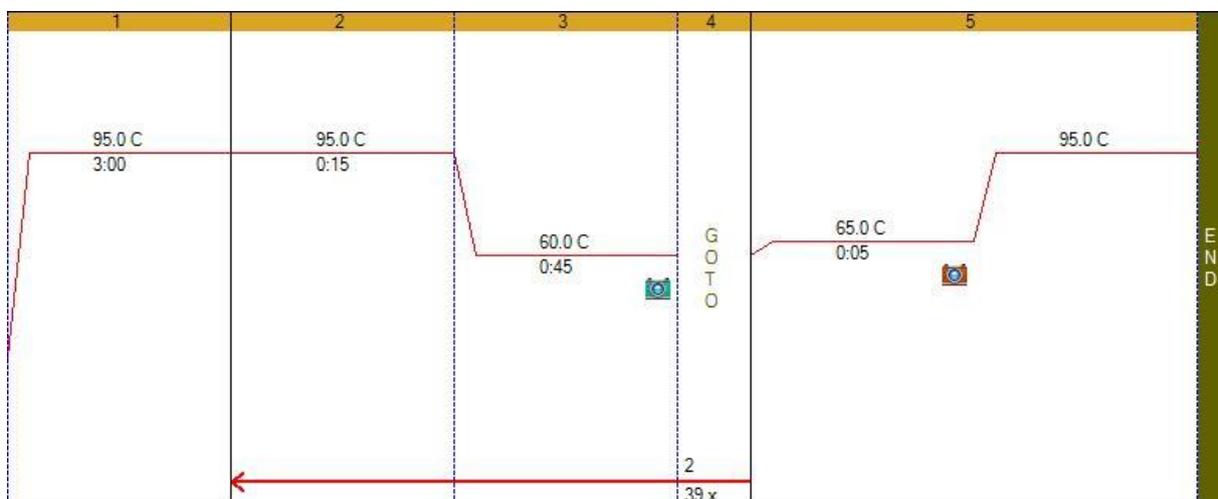
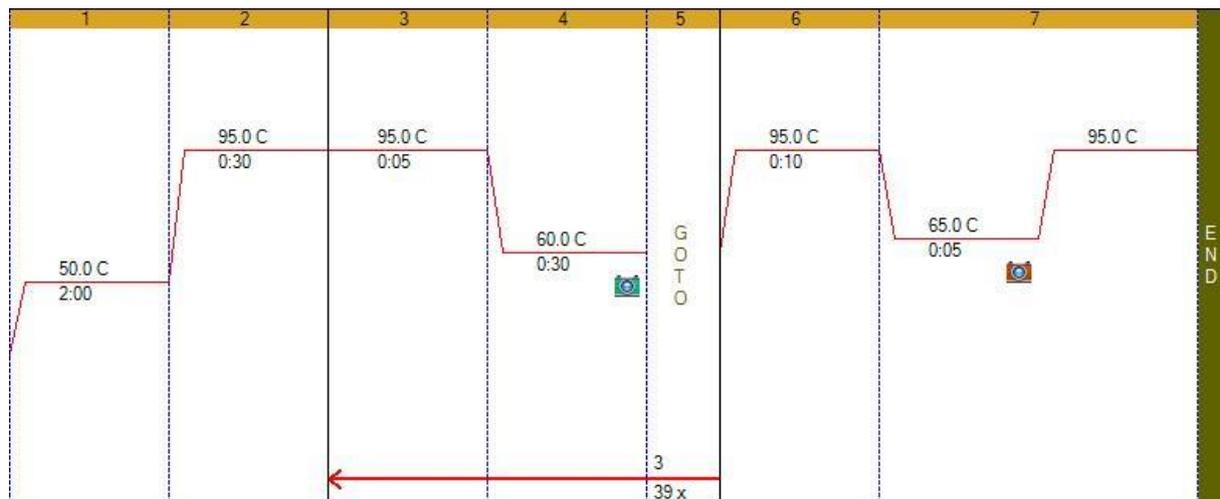


Tabelle 8: Standardprogramm für die qRT-PCR mit allen anderen Primern



3.3.6 Protein-Extraktion aus Zellkulturen

Um das Protein der Zellen zu ernten, wurde zunächst das Zellkulturmedium abgesaugt. Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und fortan wurden die Platten bzw. das geerntete Protein auf Eis oder bei 4° C behandelt. Je nach Wellgröße und Zelldichte wurden zwischen 60 – 150 µl RIPA Lysepuffer hinzugegeben, welcher Proteinase- und Phosphataseinhibitoren enthielt. Nach 5 Minuten Einwirkzeit wurden die Zellen gründlich mithilfe von Zellschabern abgekratzt und in Reaktionsgefäße überführt. Um die Lyse zu komplettieren wurden die Zellen in Abständen von 10 Minuten viermal für jeweils 20 Sekunden auf einem Vortexer auf maximaler Stufe geschüttelt. Dann wurde die Lösung bei 10.000 g für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die aus Zelltrümmern bestehenden Pellets wurden verworfen. Die Proteinkonzentration des Überstands wurde mit dem BCA-Assay-Kit bestimmt.

3.3.7 Protein-Extraktion aus Herzgewebe

Ganze Herzen von Mäusen wurden zunächst lysiert und stets auf Eis oder bei 4° C behandelt. Die Proben wurden mit großen und kleinen Kügelchen in Reaktionsgefäße gegeben und diese mit 1000 µl RIPA Lysepuffer aufgefüllt, welcher Proteinase- und Phosphataseinhibitoren enthielt. Die Gefäße wurden im Precellys® 24 Homogenisierer platziert und zweimal für 20 Sekunden bei 6500 rpm geschüttelt. War danach noch zusammenhängendes Herzgewebe zu sehen, wurde der Vorgang wiederholt. Dann wurde die Suspension für 15 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert und der Überstand in neue Gefäße überführt. Die Proteinkonzentration des Überstands wurde mit dem BCA-Assay-Kit bestimmt.

3.3.8 Bestimmung der Protein-Konzentration mittels BCA-Assay

Die Bestimmung der Protein-Konzentration erfolgte mittels BCA-Assay der Firma Thermo Scientific. Eine Standardkurve wurde mit bekannten Konzentrationen von BSA-Lösung erstellt:

Tabelle 9: Verdünnungsreihe von BSA-Standard

	BSA-Konzentration (mg/ml)
A	2
B	1
C	0,5
D	0,25
E	0,125
F	0,0625
G	0

Von den Standards und Proben wurden je 5 µl pro Well in technischen Triplikaten in eine 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurden nach Protokoll des Herstellers Lösung A und B im Verhältnis 50:1 gemischt und mit einer Multipipette jedem Well 200 µl der Mischung hinzugegeben. Die Platte wurde für 30 Sekunden auf niedriger Stufe auf einem Schüttler geschüttelt und dann für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Dann wurden durch Absorptionsmessung bei 562 nm im Spectrophometer der Firma Tecan vollzogen. Mittels linearer Regression der Standards konnte nun die Konzentration der Proben berechnet werden, sofern sie zwischen 2 mg/ml und 0,0625 mg/ml lag. Bei sehr hohen Konzentrationen der Proben mussten diese vor dem BCA-Assay entsprechend verdünnt werden.

3.3.9 Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-PAGE wurden die Proben zunächst mit vierfach konzentriertem Laemmli-Puffer versetzt, welcher Bromphenolblau und Natriumdodecyl-Sulfat (SDS) enthielt. Der Einsatz von SDS ermöglicht eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe, indem sich das SDS an die Proteine anlagert und ihnen eine einheitlich negative Ladung verleiht, wodurch vorherige Ladungsunterschiede für die Auftrennung irrelevant werden und ein gerichteter Fluss im elektrischen Feld im Polyacrylamid-Gel möglich ist. Je kleiner die Proteine und je niedriger der Polyacrylamid-Anteil des Gels sind, desto schneller bewegen sich die Proteine fort. Die Proben

wurden nach der Vorbereitung 5 Minuten lang bei 95° C denaturiert, dann für 5 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend kurz mit einer Tischzentrifuge zentrifugiert.

Für die Herstellung des Gels wurden 4/5 einer Glaskassette mit Trenngel (Zusammensetzung siehe Tabelle 10) aufgefüllt und dann sofort mit einer Lage Isopropanol überzogen, um die Bildung von Luftblasen zu vermeiden. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol abgossen und die Kassette mit Sammelgel aufgefüllt, in welches ein Kamm mit 10 oder 15 Taschen (60 µl bzw. 40 µl Volumen) inseriert wurde. Der Kamm wurde nach Polymerisation des Sammelgels entfernt, das Gel in das Mini PROTEAN Tetra System eingesetzt und die Taschen sowie die Elektrophorese-Kammer mit Laufpuffer gefüllt. Die Proben wurden vorsichtig auf den Grund der Geltaschen pipettiert, bevor die Elektrophorese mit 80 V gestartet wurde. Neben den Proben wurde auch eine Farbmarkerleiter in eine der Taschen pipettiert, durch welche die Auftrennung der verschiedenen Proteingrößen abgeschätzt werden konnte. Nachdem die Bromphenolblau-Bande im Sammelgel konzentriert war, wurde die Spannung auf 110 V erhöht. Abhängig vom Polyacrylamid-Gehalt und der Größe der zu untersuchenden Proteinbanden wurde die Elektrophorese nach 90 – 150 Minuten beendet.

Tabelle 10: Zusammensetzung Sammelgel, Trenngel

Geltyp	Größe aufzutrennender Proteine (kDa)	30% Acrylamide/bis-acrylamide (ml)	Trenn-/Sammelgel-puffer (ml)	dH ₂ O (ml)	TEMED (µl)	10% APS (µl)
7,5% Trenngel	35 - 130	2,5	2,6	4,7	30	60
10% Trenngel	15 - 70	3,3	2,6	3,9	30	60
Sammelgel	---	0,8	1,4	2,9	15	30

3.3.10 Western Blotting

Das, die aufgetrennten Proteine enthaltende, Gel wurde aus der Glaskassette entnommen und das Sammelgel entfernt. Im weiteren Verlauf wurde mit einem Tank-Transfer-System gearbeitet. Das Gel wurde in eine Kassette mit folgender Schichtung gelegt: Schwamm – 2 Whatman-Papiere – Gel – Nitrozellulosemembran – 2 Whatman-Papiere – Schwamm. Alle Schichten wurden vorher mit Transferpuffer befeuchtet und es wurde großer Wert darauf gelegt, keine Luftblasen zwischen Gel und Nitrozellulosemembran zuzulassen. Der Tank wurde

mit Transferpuffer gefüllt, welcher während des Transfers eisgekühlt wurde. Die Kassette wurde dann so in das Tank-Transfer-System gelegt, dass die Proteine bei angelegtem elektrischen Feld (400 mA) innerhalb von 90 Minuten vom Gel auf die Nitrozellulosemembran wanderten. Um eine fehlerhafte Übertragung auszuschließen, wurde die Nitrozellulosemembran vorübergehend mit Ponceau S angefärbt, wodurch die Proteinbanden auf der Membran sichtbar wurden. Die Entfärbung erfolgte problemlos durch Spülen mit TBST-Puffer.

Weil verhindert werden sollte, dass sich die später verwendeten Antikörper in proteinfreien Stellen auf der Membran einlagern, statt lediglich spezifisch an ihre Zielproteine zu binden, wurde die Membran auf einem Schwenker für 90 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4° C in TBST-Blocklösung mit 5% (w/v) Milchpulver inkubiert. Sofern mit dem Antikörper GPRC5B nachgewiesen wurde, wurde zum Blocken 1x Roti®Block/dH₂O-Lösung verwendet.

3.3.11 Detektion spezifischer Proteine auf einer Nitrozellulose-Membran

Die Membran wurde leicht gerollt und - die Seite mit den Proteinen nach innen weisend - in ein 50 ml Röhrchen gesteckt. Der primäre Antikörper, welcher das Epitop des Zielproteins bindet, wurde entsprechend [Tabelle 2](#) verdünnt, bevor die Nitrozellulosemembran in 4 ml davon über Nacht bei 4° C auf einem Rollenmischer inkubiert wurde. Die Membran wurde zweimal kurz und dann dreimal für 10 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen und dann für 90 Minuten bei RT in 4 ml sekundärem Antikörper entsprechend [Tabelle 3](#) inkubiert. Erneut wurde zweimal kurz und dreimal für 10 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen. Dann wurde die Membran in der FluorChem Q-Detektionskammer platziert und mithilfe des Programms AlphaView Q wurden Bilder erstellt. War der sekundäre Antikörper an einen Fluoreszenzfarbstoff konjugiert, konnte das Bild ohne weitere Vorbereitung direkt nach dem Waschvorgang gemacht werden. War er jedoch an Horseradish-Peroxidase (HRP) konjugiert, musste die Entwicklung mit dem Enhanced-Chemiluminescence- (ECL-)System durchgeführt werden. Dabei wurden Diacylhydrazinluminol und Peroxid 1:1 gemischt und auf die Membran gegeben. Diese wurde im Dunkeln für 1 – 10 Minuten, abhängig von der zu erwartenden Stärke des Signals, inkubiert. Währenddessen wirkte HRP als Katalysator, sodass dort, wo der sekundäre Antikörper auf der Membran gebunden war, Luminol oxidiert wurde. Nach der Einwirkzeit wurde die Lösung wieder von der Membran entfernt. Die entstandene Chemilumineszenz konnte im FluorChem Q bei einer Wellenlänge von 425 nm detektiert werden. Die entstandenen Bilder wurden mittels des Programms ImageJ densitometrisch ausgewertet.

3.3.12 Vervielfachung eines Adenovirus und Titerbestimmung der Viruspartikel
HEK293-A-Zellen wurden in T175-Flaschen ausgesät und inkubiert, bis sie 100 % Konfluenz erreichten. Ein (humanes) GPRC5B-cDNA rekombinantes Adenovirus wurde von der Firma ABM bezogen, LacZ-cDNA rekombinantes Adenovirus wurde aus dem Laborbestand entnommen. Das Medium wurde abgesaugt, frisches Zellmedium mit ca. $50\mu\text{l} \times 10^7/\mu\text{l}$ Viruspartikeln versetzt und dann auf die Zellen gegeben. Diese wurden wieder inkubiert und regelmäßig lichtmikroskopisch kontrolliert, bis Löcher in der Zelldecke entstanden und die Zellen begannen, kugelförmig zu werden. Dies wurde als erstes Zeichen dafür gewertet, dass die Zellen durch hohe Viruslasten kurz vor der Lyse standen. Durch kräftiges Klopfen auf die T175-Flasche und Spülen mit der Pipette wurden die Zellen vom Flaschenboden abgelöst und die Suspension anschließend für 5 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml PBS-Puffer aufgenommen. Dieses wurde dreimal bei -80°C für 20 Minuten inkubiert und dann bei Raumtemperatur aufgetaut. Dadurch wurden die Zellen lysiert. Durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 12 000 g und 4°C wurden die Zellbruchstücke im Pellet gesammelt. Der Überstand wurde entnommen und mit $30\mu\text{l}$ pro Reaktionsgefäß gleichmäßig aliquotiert.

Für die Titerbestimmung wurden HEK293-A-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Virus infiziert und dann mittels eines FITC-markierten anti-Hexon Antikörpers sichtbar gemacht. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 300 000 Zellen pro Well ausgesät. Es wurden $50\mu\text{l}$ Virus in einer Serie von $10^{-2} - 10^{-7}$ verdünnt, sodass 6 verschiedene Verdünnungen vorlagen. Diese wurden in je zwei 12-Well pro Verdünnungsschritt pipettiert, wobei die Verdünnung 10^{-2} eine Ausnahme darstellte und als Positivkontrolle lediglich in einen Well gegeben wurde. Der letzte freie Well wurde nicht infiziert und diente als Negativkontrolle. Die Zellen wurden für exakt 48 h inkubiert, bevor das Medium von ihnen abgesaugt und sie bei -20°C in 1 ml Methanol 10 Minuten lang fixiert wurden. Es wurde dreimal mit 1% BSA-PBS-Puffer gewaschen. Im Dunkeln wurden $100\mu\text{l}$ FITC-markierter anti-Hexon Antikörper in jeden Well pipettiert und die 12-Well-Platte für 1 h bei 37°C inkubiert. Wiederum wurde dreimal mit 1% BSA-PBS-Puffer gewaschen. Die Zählung der infizierten Zellen wurde mithilfe von UV-Licht unterm Lichtmikroskop durchgeführt. Dabei wurde das FITC angeregt, wodurch es ein grünes Signal abgab und infizierte Zellen erkannt wurden. Folglich konnten diese in 10 verschiedenen Sichtfeldern unter dem 20x Objektiv gezählt werden. Die durchschnittliche Zellanzahl pro Sichtfeld wurde berechnet und dann mit 313 multipliziert, da bei einem 20x Objektiv 313 abgegrenzte Sichtfelder pro Well einstellbar sind. Diese Zahl wurde anschließend

durch den Verdünnungsfaktor des ausgezählten Wells dividiert. Somit wurden die infektiösen Units pro ml (ifu/ml) bestimmt.

3.4 Statistische Auswertung

Die in den Versuchen gewonnenen Daten wurden mithilfe des Statistikprogrammes SigmaPlot 13.0 ausgewertet und mit dem Programm GraphPad Prism 6.0 graphisch dargestellt. Waren die Daten normalverteilt und wurden zwei Gruppen miteinander verglichen, wurde ein 2-Seiten-t-Test angewandt. Wurden mehr als zwei Gruppen verglichen, wurde der ANOVA-Test mit anschließendem Bonferroni-Test eingesetzt. Bei nicht-normalverteilten Daten wurden der Mann-Whitney-Test für zwei Gruppen beziehungsweise der Kruskal-Wallis-Test für drei oder mehr Gruppen genutzt. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant, von $\leq 0,01$ als hoch signifikant und von $\leq 0,001$ als höchst signifikant betrachtet. In den Grafiken wurde eine Signifikanz mit *, eine hohe Signifikanz mit ** und höchste Signifikanz mit *** angezeigt. Es wurde der Standardfehler angegeben.

4) Ergebnisse

4.1 Isolierung von kardialen Fibroblasten

Die in diesem Projekt eingesetzte Methode der Kultivierung von NRCF wurde zunächst validiert, um sicherzustellen, dass mit einer möglichst reinen Fibroblastenkultur ohne Kontamination durch andere Zelltypen gearbeitet wurde. Das Herzgewebe setzt sich aus vielen verschiedenen Zelltypen zusammen. Zu diesen zählen vor allem kardiale Myozyten und kardiale Fibroblasten [204, 205], welche den Hauptanteil bilden. Hinzu kommen unter anderem auch Endothelzellen, Leukozyten und weiche Muskelzellen der Gefäßwand.

Die überwiegende Mehrheit der in der Kultur vorliegenden Zellen lag 24 h nach Aussaat in einer schlanken, gestreckten Form vor (Abbildung 6 A). Teilweise sind spindelförmige Zellkerne zu erkennen. Später, zum Zeitpunkt des Versuchsstarts, hatten sich diese Zellen geändert: Sie waren nun deutlich breiter und hatten viele kurze Ausläufer (Abbildung 6 B). Um mit Sicherheit davon ausgehen zu können, dass die, in den folgenden Versuchen verwendeten, Zellen Fibroblasten waren, wurden die Zellkulturen mit den Methoden der Immunfluoreszenz auf fibroblastentypische Marker untersucht.

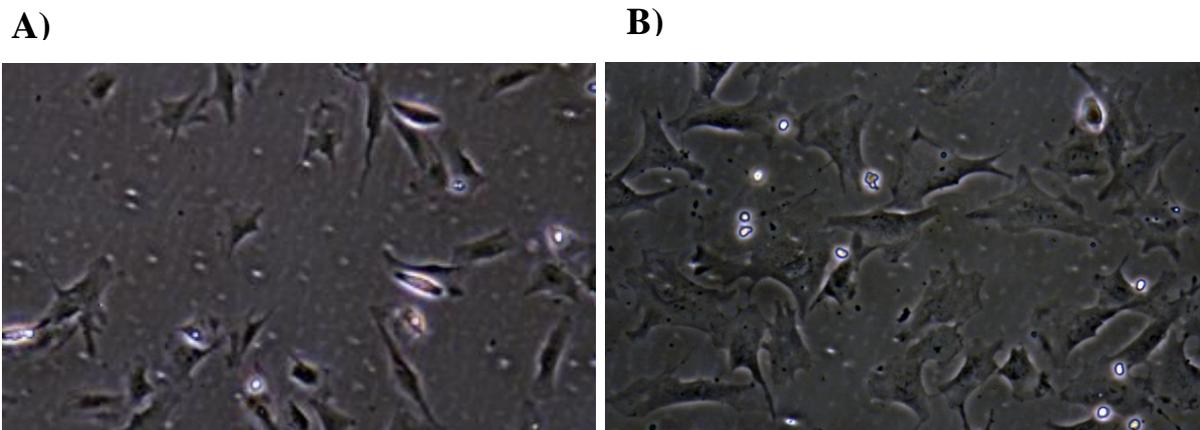


Abbildung 6: **A)** NRCF nach 24h in Kultur. **B)** NRCF nach 48h in Kultur.

Der Discoidin domain-containing receptor 2 (DDR2) ist ein Kollagenrezeptor, welcher auf der Zelloberfläche von kardialen Fibroblasten exprimiert wird [206]. Seine Funktion liegt unter anderem im Zellwachstum sowie in der Zelldifferenzierung und -migration. Er gilt als spezifischer Marker von kardialen Fibroblasten und wird von anderen kardialen Zellpopulationen wie Myozyten, Endothelzellen oder weichen Gefäßmuskelzellen nicht in größerem Maße ausgeprägt [204]. Im Rahmen der Transdifferentiation zum Myofibroblasten, auch als Aktivierung bezeichnet, bilden kardiale Fibroblasten vermehrt α -Smooth Muscle Actin (α SMA), wodurch sie von nicht-aktivierten Fibroblasten abgegrenzt werden können [207].

NRCF wurden auf Deckgläschen ausgesät, welche nach 48 h für die Immunocytochemie bearbeitet wurden (3.3.1 Immunfluoreszenz). Spezifische, fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen DDR2 und α SMA wurden eingesetzt, um diese Proteine unter dem konfokalen Lasermikroskop sichtbar zu machen. Wie repräsentativ in Abbildung 7 zu sehen, wurde jeder mit DAPI angefärbte Zellkern von DDR2 umgeben, außerdem wurde α SMA von der überwiegenden Mehrheit der NRCF stark exprimiert. Die Kultur bestand also nahezu ausschließlich aus Myofibroblasten und enthielt keine Verunreinigung von Nicht-Fibroblasten.

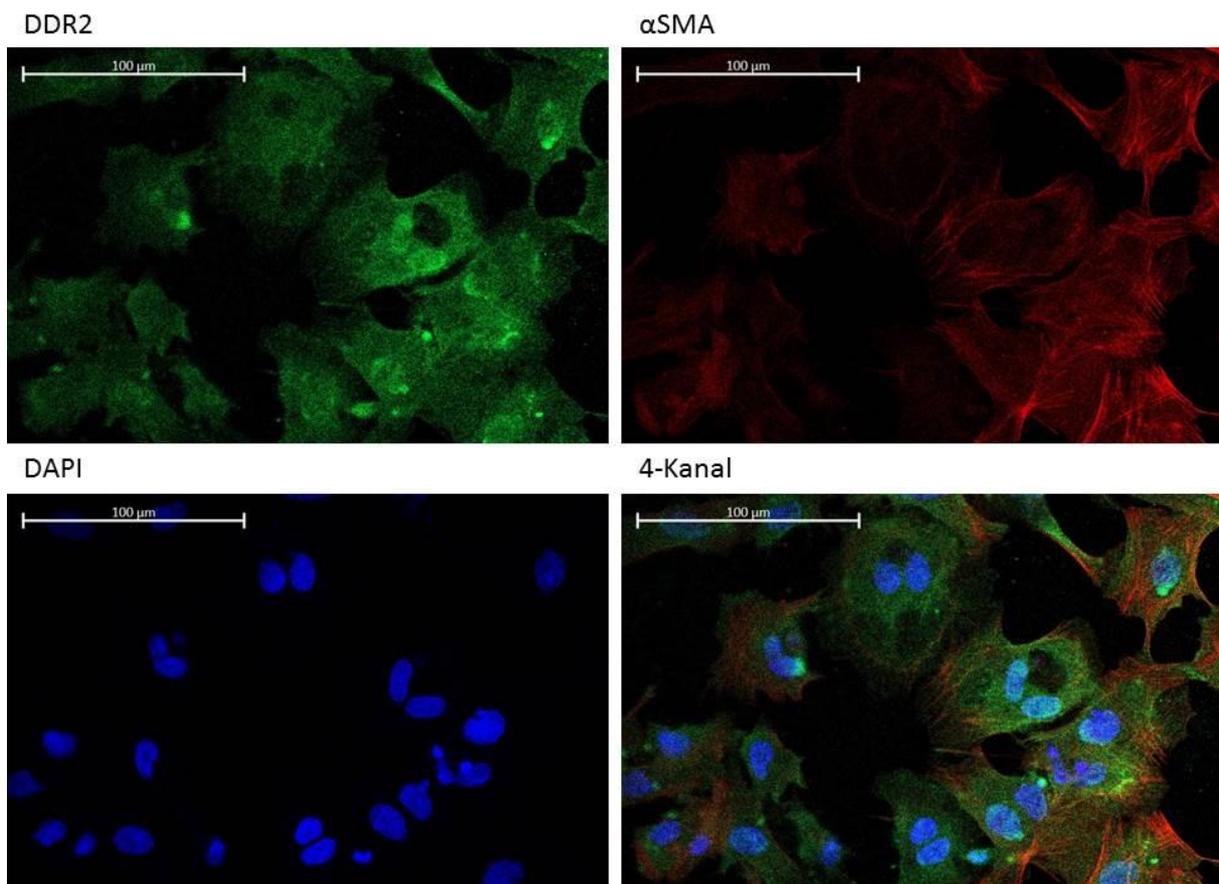


Abbildung 7: Ubiquitäre Expressierung des Fibroblastenmarkers DDR2 (grün) zeigt eine reine Fibroblastenkultur mit hohem Anteil an α SMA-exprimierenden Myofibroblasten (in rot) an. Kerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt.

4.2 Expression von GPRC5B in NRCF

Die endogene GPRC5B-Expression in NRCF wurde zunächst untersucht. Dann wurden Einflüsse auf die Expression durch inflammatorische Stimuli wie LPS, $\text{TNF}\alpha$ und mechanische Dehnung erarbeitet.

4.2.1 Kardiale Myozyten und kardiale Fibroblasten exprimieren GPRC5B

GPRC5B wird nahezu ubiquitär in allen Organen des Körpers exprimiert, vor allem jedoch in der Milz und im Gehirn. Im Herzen findet ebenfalls eine moderate Expression statt. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl in kardialen Myozyten, als auch in kardialen Fibroblasten endogen GPRC5B exprimiert wird (Abbildung 8). Dafür wurden neonatale Rattenventrikel-Kardiomyozyten (NRVCM) und NRCF in separaten Gefäßen ausgesät, kultiviert und nach 48 h lysiert. Dann wurden die Proteine mittels Western Blot auf die Ausprägung von GPRC5B hin untersucht. Als Ladekontrolle diente Tubulin.

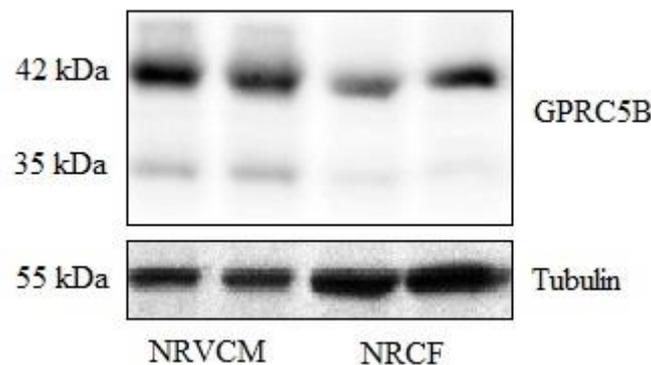


Abbildung 8: Western Blot des endogenen Proteingehaltes von GPRC5B aus Ganzzelllysate von NRVCM und NRCF

4.2.2 LPS stimuliert die GPRC5B-Expression in NRCF

Inflammatorische Prozesse initiieren nach Ischämie oder Druckbelastung fibrotische Veränderungen im Herzgewebe. Eine Hochregulation der Expression von GPRC5B durch Stimulation mit dem Toll-Like-Receptor-4-Agonisten LPS wurde auf mRNA- und Proteinebene gezeigt.

Die kultivierten NRCF wurden für 6 h/ 12 h/ 24 h mit 100 ng/ml LPS stimuliert und dann lysiert. Ihre mRNA wurde in cDNA umgeschrieben und dann das Expressionslevel von GPRC5B-mRNA mittels spezifischer Primer in einer qPCR in Relation zu den Kontrollzellen evaluiert. Als *housekeeping*-Gen wurde ribosomales 18S RNA-Gen verwendet. Nach 6 h zeigte sich in den stimulierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen kein signifikanter Unterschied. Nach 12 h allerdings war die GPRC5B-mRNA in den stimulierten NRCF hoch signifikant auf

das 1,5-fache erhöht, nach 24 h sogar auf das 2-fache (Abbildung 9).

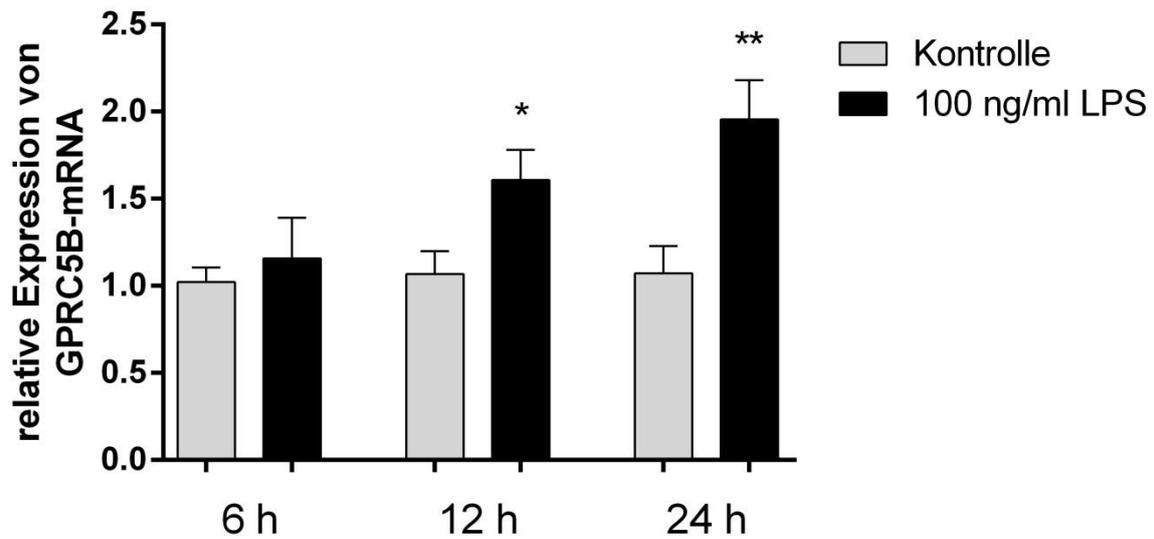
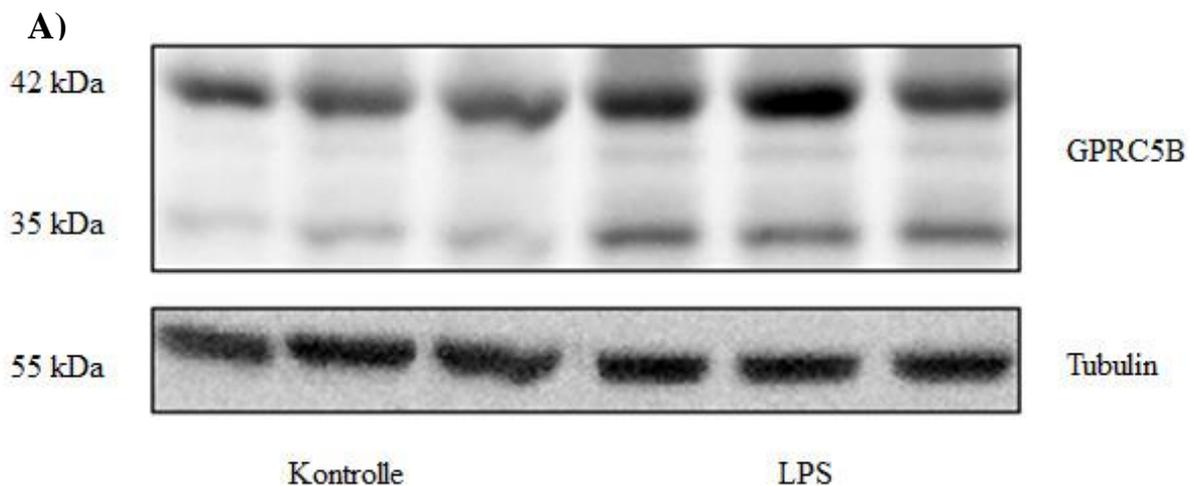


Abbildung 9: Anstieg der GPRC5B-mRNA-Expression in NRCF durch Stimulation mit 100 ng/ml LPS für 6 h, 12 h, 24 h (qPCR). Kontroll-Gen: 18S RNA; n = 9 aus 3 Wiederholungen; $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$

Dieser Effekt bestätigte sich in der Untersuchung des Proteinlysates nach einer LPS-Stimulation mit 100 ng/ml für 48 h. Die Expression von Tubulin wurde für die Expressionsnormierung hinzugezogen. Dabei konnte ein höchst signifikanter Anstieg der GPRC5B-Expression auf das ungefähr 2-fache festgestellt werden (Abbildung 10).



B)

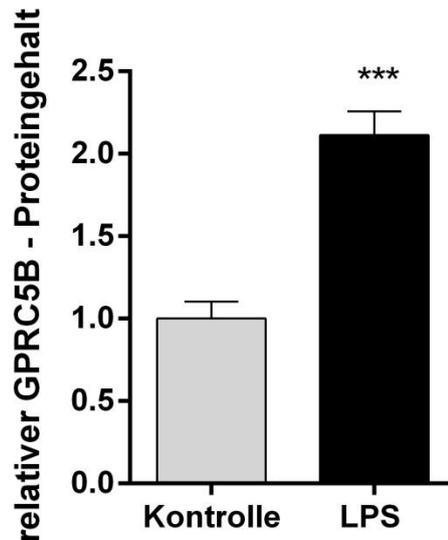


Abbildung 10: A) GPRC5B-Proteingehalt im Ganzzelllysate von NRCF nach Stimulation mit 100 ng/ml LPS für 48 h (Western Blot). B) Densitometrische Auswertung mit Normierung des GPRC5B-Gehaltes auf den Tubulin-Gehalt; n = 8 aus 3 Wiederholungen; p < 0,001 = ***

4.2.3 TNF α stimuliert die GPRC5B-Expression in NRCF

Neben LPS wurde auch der Einfluss inflammatorischer Aktivierung durch das Zytokin TNF α auf die GPRC5B-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene hin untersucht. Dafür wurden NRCF für 6 h/ 12 h/ 24 h diesmal mit 50 ng/ml TNF α stimuliert und dann lysiert. Ihre mRNA wurde wieder in cDNA umgeschrieben, dann wurde das Expressionslevel von GPRC5B-mRNA mittels spezifischer Primer in einer qPCR in Relation zu den Kontrollzellen evaluiert. Für die Normierung wurde als Kontroll-Gen ribosomales 18S verwendet.

Dabei konnte auch für die Stimulation mit TNF α eine Hochregulierung der GPRC5B-mRNA gezeigt werden. Zwar war nach 6 h und 24 h kein signifikanter Unterschied zu sehen, nach 12 h allerdings war die Expression hoch signifikant um den Faktor 1,7 erhöht (Abbildung 11).

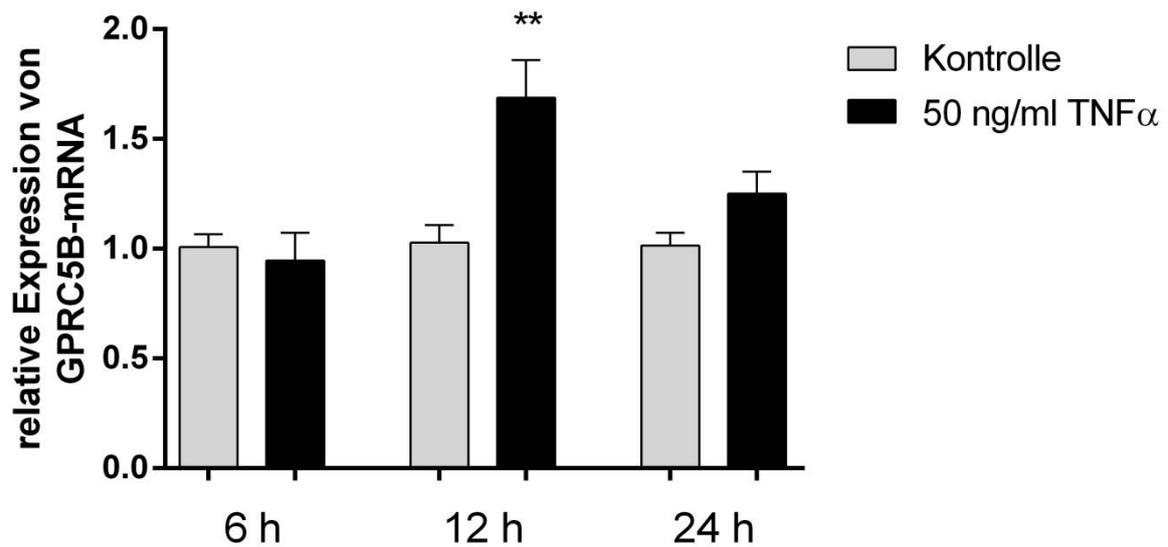
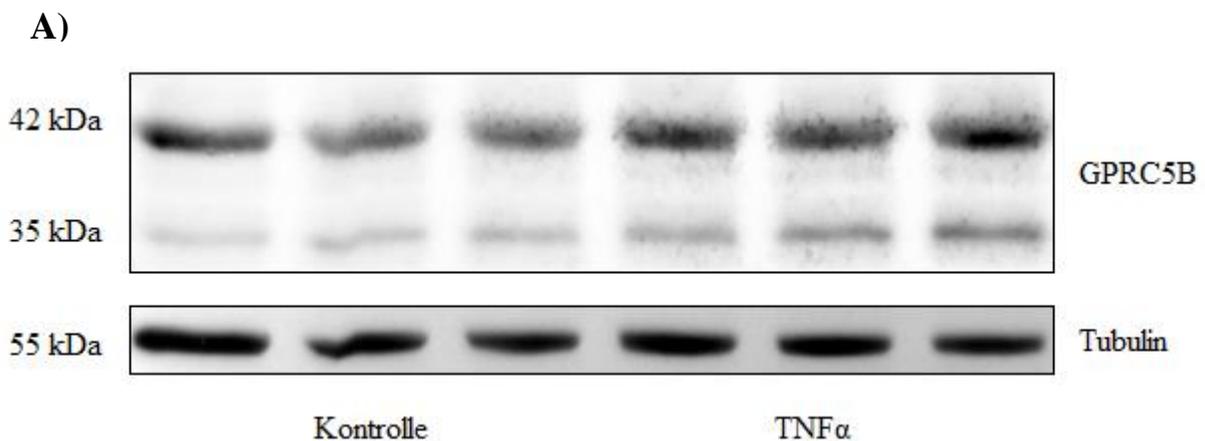


Abbildung 11: Anstieg der GPRC5B-mRNA-Expression in NRCF durch Stimulation mit 50 ng/ml TNF α für 6h, 12h, 24h (qPCR). Kontroll-Gen: 18S; n = 9 aus 3 Wiederholungen; p < 0,01 = **

Bekräftigt wurde dies nach Auswertung des Zelllysates mittels Western Blots nach 48 h Stimulation mit 50 ng/ml TNF α . Dort wurde ein Anstieg der GPRC5B-Expression auf das 1,5-fache deutlich (Abbildung 12). Somit konnte gezeigt werden, dass die GPRC5B-Expression durch inflammatorische Signalwege gesteigert wird.



B)

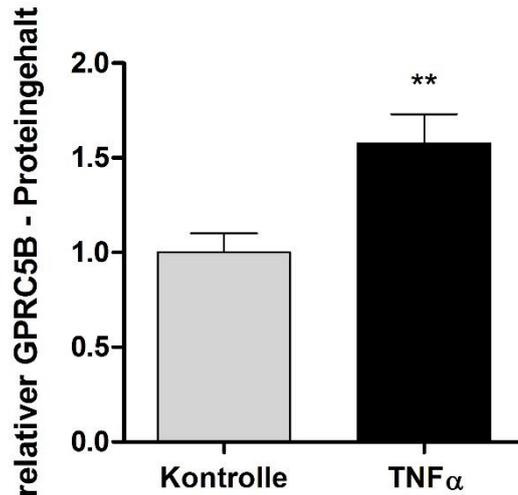


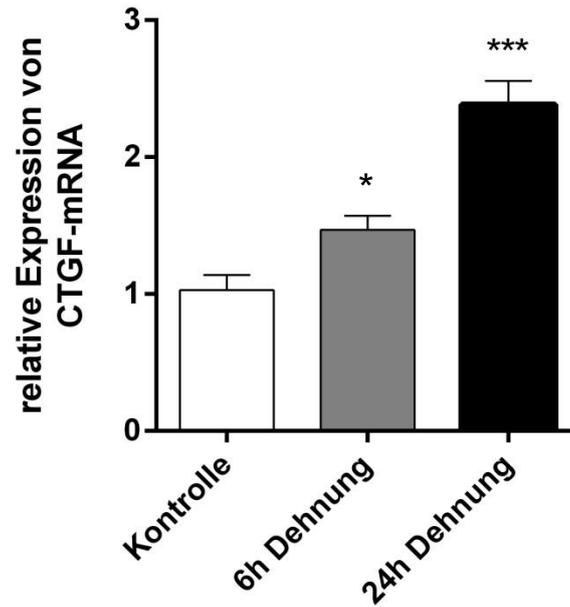
Abbildung 12: A) GPRC5B-Proteingehalt im Ganzzelllysate von NRCF nach Stimulation mit 50 ng/ml TNF α für 48 h (Western Blot). B) Densitometrische Auswertung mit Normierung des GPRC5B-Gehaltes auf den Tubulin-Gehalt; n = 8 aus 3 Wiederholungen; p < 0,01 = **

4.2.4 Mechanische Dehnung stimuliert die GPRC5B-Expression

Auch mechanische Beanspruchung kann zu Zellstress führen und spielt eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie vieler kardialer Erkrankungen. Hier wurde dies maschinell simuliert, um den Einfluss der Dehnung auf die GPRC5B-Expression in NRCF zu eruieren.

NRCF wurden auf flexiblen, kollagenisierten Membranen ausgesät. Auf diese wurde dann für 6 h oder 24 h mit einer Frequenz von 1 Hz 18%-ige Dehnung ausgeübt. Eine Kontrollzellpopulation wurde ebenfalls auf den Membranen ausgesät, allerdings nicht gedehnt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die mRNA mittels qPCR evaluiert. Das Kontrollgen war auch hier 18S. Um herauszufinden, ob die Dehnung funktioniert hatte, wurde als Positivkontrolle ein möglicher Anstieg des CTGF überprüft [61]. Das Experiment wurde insgesamt viermal durchgeführt. Es zeigte sich eine signifikante bzw. höchst signifikante Induktion von CTGF nach 6 h bzw. 24 h um den Faktor 1,5 bzw. 2,5 und ein hoch signifikanter Anstieg der GPRC5B-mRNA um etwa 1,9 nach 24 h Dehnung, während nach 6 h Dehnung lediglich ein nicht-signifikanter Anstieg zu sehen war (Abbildung 13).

A)



B)

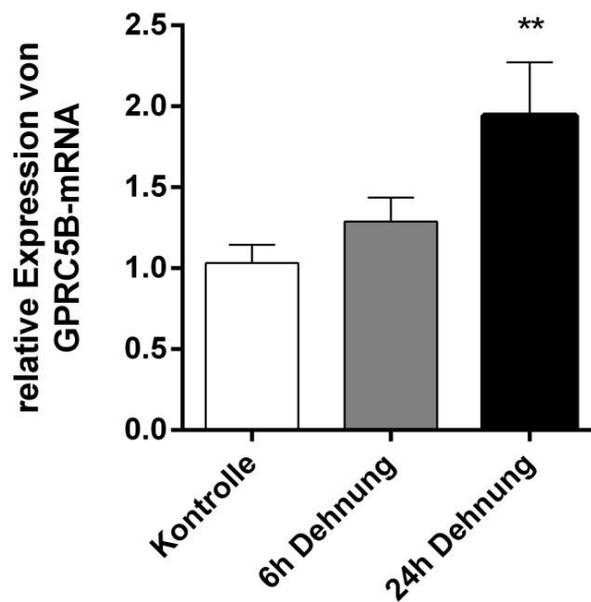


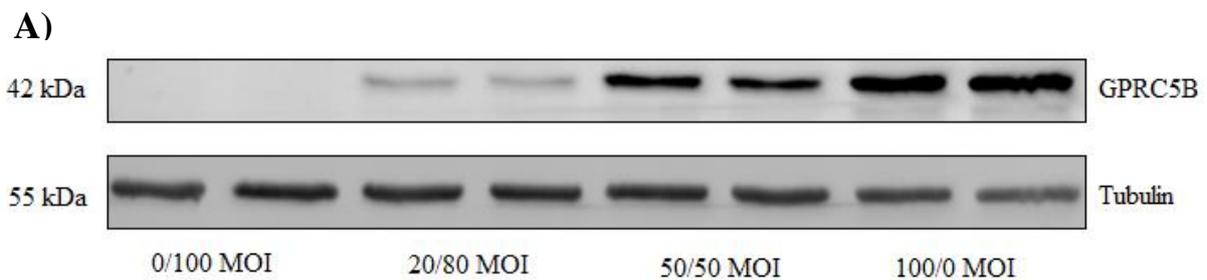
Abbildung 13: **A)** Positivkontrolle: CTGF-mRNA-Expression nach 18%-iger mechanischer Dehnung der NRCF für 6 h/ 24 h (qPCR). **B)** GPRC5B-mRNA-Expression nach mechanischer Dehnung für 6 h/ 24 h (qPCR). **A) B)** Kontroll-Gen: 18S; n = 6; $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$

4.3 Modulierung der GPRC5B-Expression in kardialen Fibroblasten

Um die Funktion von GPRC5B in kardialen Fibroblasten zu untersuchen, wurden *in vitro* zunächst ein adenoviral-vermitteltes Überexpressions- und ein siRNA-induziertes Knockdownmodell etabliert.

4.3.1 Adenoviral-vermittelte Überexpression

Eine Dosiskurve mit verschiedenen hohen MOI wurde erstellt, damit eine signifikante Überexpression erzielt werden konnte, ohne die Zellen zu sehr mit GPRC5B zu überladen. Jede Versuchseinheit erhielt dabei die gleiche Gesamtmenge an Virus, unterschied sich allerdings in der Gewichtung AdGPRC5B:AdLacZ. Nach 72 h Infektion (3.1.4 Adenovirale Überexpression in NRCF) wurden die Zellen lysiert und im Western Blot die GPRC5B-Expression ermittelt. Diese war bei 20 MOI höchst signifikant um den Faktor 5, bei 50 MOI um den Faktor 30 und bei 100 MOI um den Faktor 50 erhöht (Abbildung 14).



B)

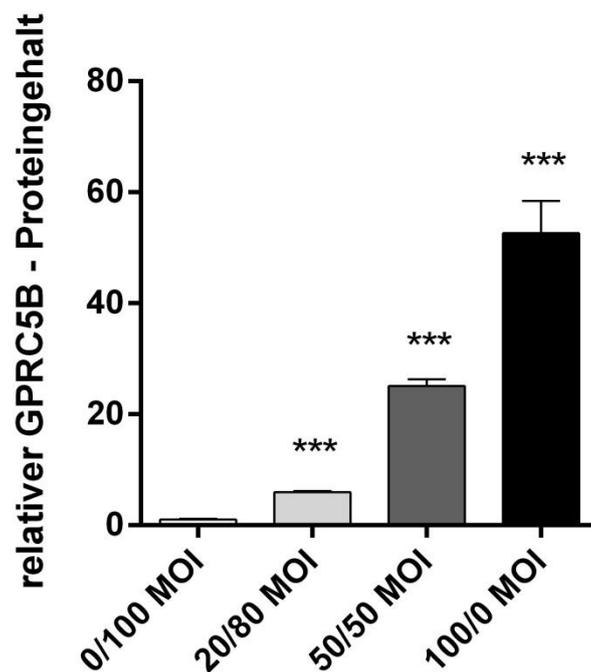


Abbildung 14: **A)** GPRC5B-Proteingehalt im Ganzzelllysat von NRCF nach Infektion mit AdGPRC5B:AdLacZ (Western Blot) **B)** Densitometrische Auswertung mit Normierung des GPRC5B-Gehaltes auf den Tubulin-Gehalt zeigt eine AdGPRC5B-dosisabhängige Überexpression von GPRC5B; n = 6 aus 2 Wiederholungen; p < 0,001 = ***

4.3.2 siRNA-induzierter Knockdown

Um die Translation von GPRC5B-mRNA zu minimieren, wurde siRNA in die NRCF eingebracht. Es wurde eine Dosiskurve mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen erstellt. Jede Einheit wurde mit der gleichen Gesamtmenge an siRNA behandelt, es unterschied sich lediglich das Verhältnis siGPRC5B:siCtrl. Eine Transfektion (3.1.5 Transfektion der NRCF mit siRNA) von 62,5 ng/ml siGPRC5B führte zu einer höchst signifikanten Verringerung des GPRC5B-Protein-Expressionsniveaus auf etwa 25% (Abbildung 15).

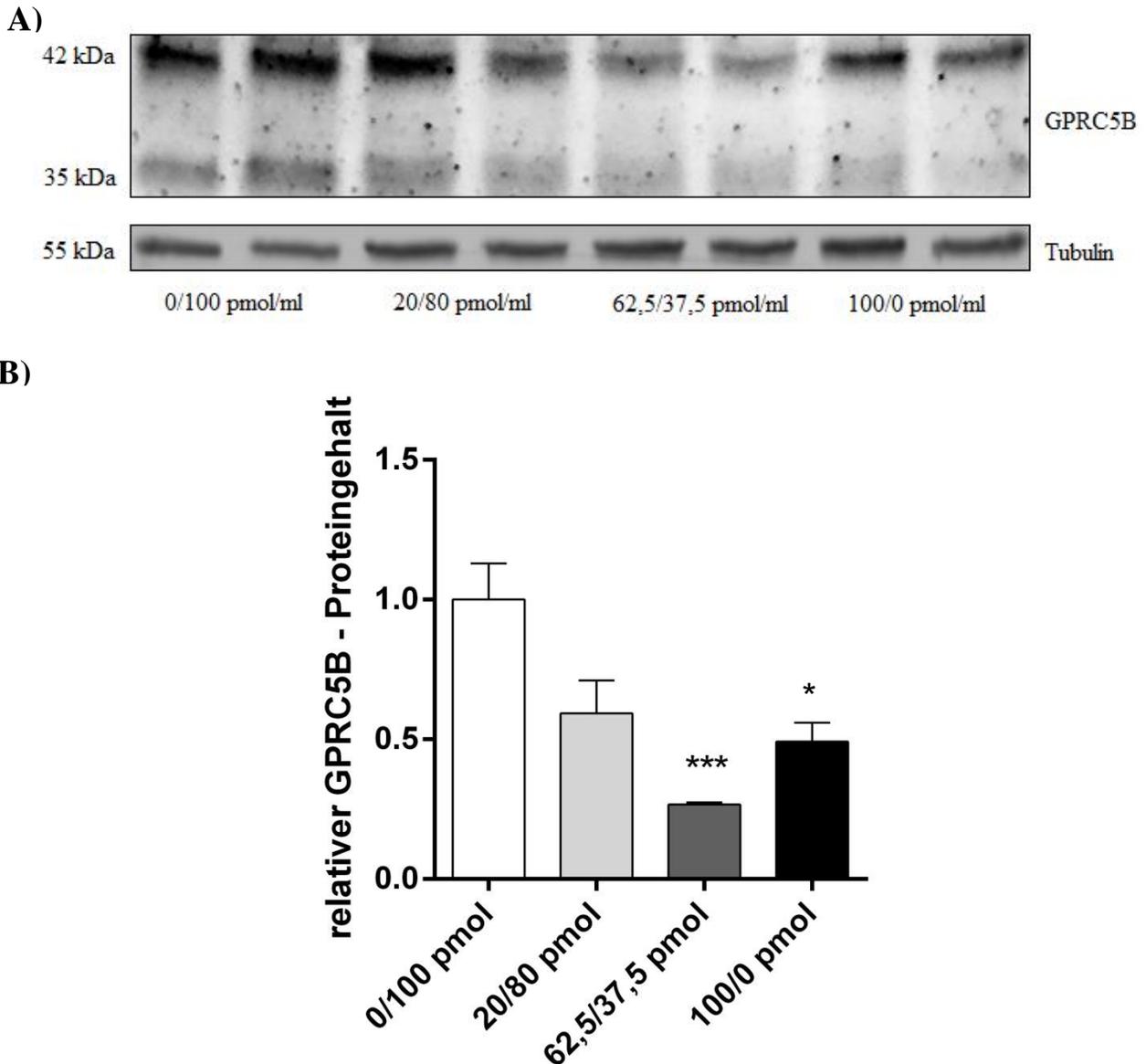


Abbildung 15: **A)** GPRC5B-Proteingehalt im Ganzzelllysate von NRCF nach Transfektion mit siGPRC5B:siCtrl (Western Blot) **B)** Densitometrische Auswertung mit Normierung auf den Tubulin-Gehalt zeigt einen höchst signifikanten Knockdown des GPRC5B-Proteins auf etwa 25% bzw. 50% des

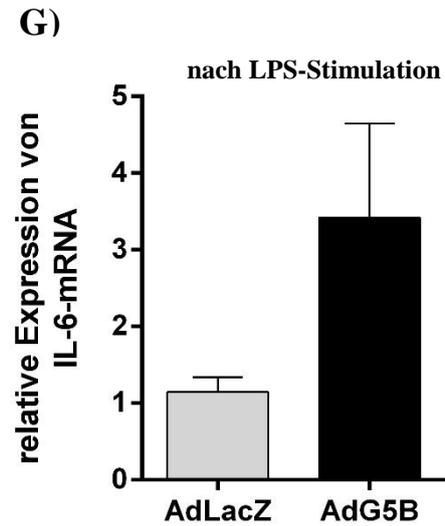
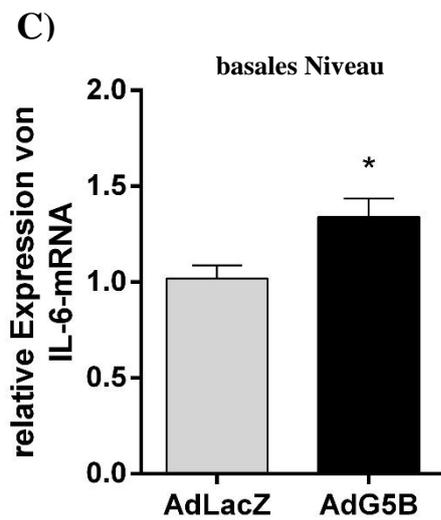
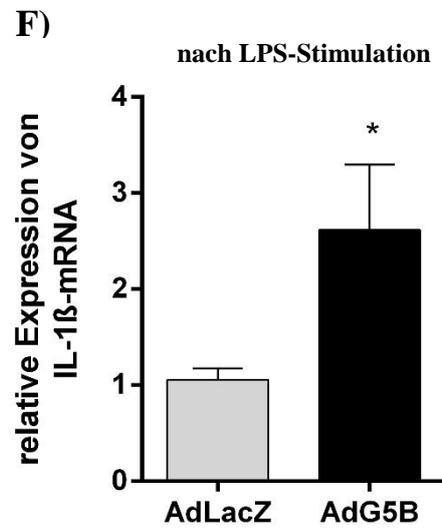
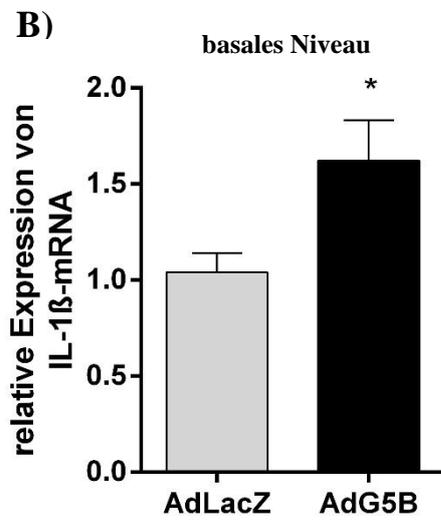
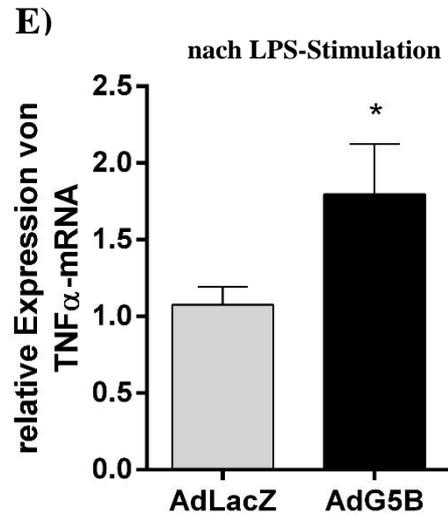
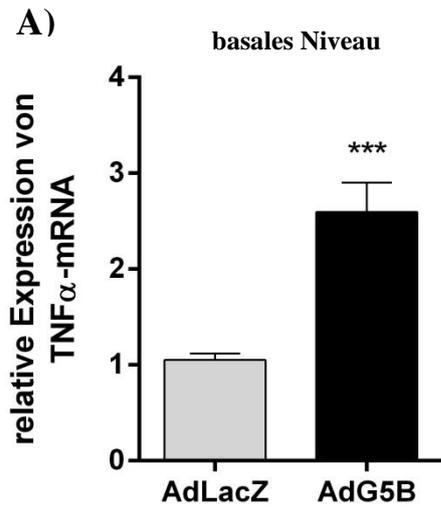
endogenen Niveaus nach Transfektion von 62,5 bzw. 100 pmol/ml siGPCR5B; n = 6; p < 0,05 = *, p < 0,001 = ***

4.4 GPCR5B moduliert inflammatorische Signalwege in kardialen Fibroblasten

Zu der physiologischen Reaktion des Herzwebes auf Entzündung, Ischämie oder Überlastung gehört eine verstärkte Synthese von inflammatorischen Zytokinen, welche wiederum diverse Signalwege, zum Beispiel des kardialen Remodelings, anstoßen oder inhibieren (1.1.4 Inflammation als eine Ursache des kardialen Remodelings). Um den funktionalen Einfluss von GPCR5B auf inflammatorische Prozesse zu untersuchen, wurde das mRNA-Expressionsniveau verschiedener inflammatorischer Zytokine (TNF α , IL-1 β , IL-6, MCP-1) nach Herauf- bzw. Herunterregulierung von GPCR5B bestimmt. Zusätzlich wurden die Zellen 72 h nach Infektion/Transfektion für 24 h mit 10 ng/ml LPS stimuliert, um die zelluläre Antwort unter inflammatorischer Aktivierung zu untersuchen.

4.4.1 GPCR5B-Überexpression erhöht die Expression von inflammatorischen Zytokinen

Die Überexpression von GPCR5B erhöhte die basale Transkription der inflammatorischen Zytokine in einem signifikanten Ausmaß: TNF α auf 260%, IL-1 β auf 160%, IL-6 und MCP-1 auf je 135% im Vergleich zu den LacZ-infizierten Zellen. Auch nach Stimulation mittels 10 ng/ml LPS zeigte sich zudem: Die GPCR5B-überexprimierenden NRCF reagierten im Vergleich zu den Kontrollzellen mit einer signifikanten Erhöhung von TNF α -mRNA auf 180% und IL-1 β - mRNA auf 260%. Die Erhöhung der Expression von IL-6- und MCP-1-mRNA war nach LPS-Stimulation nicht signifikant (Abbildung 16).



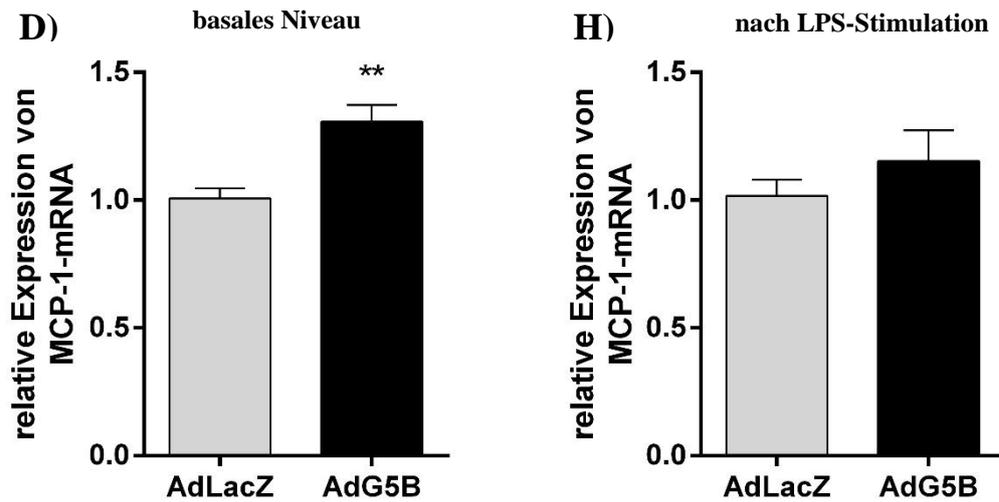
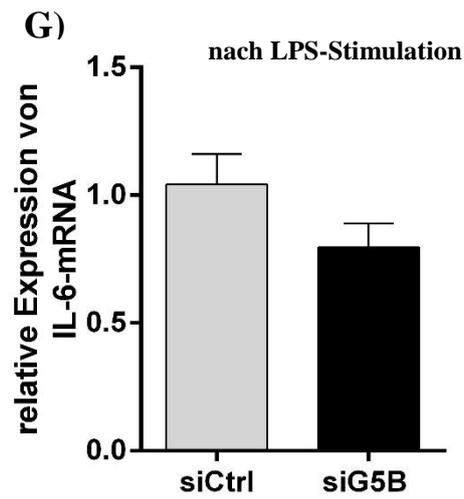
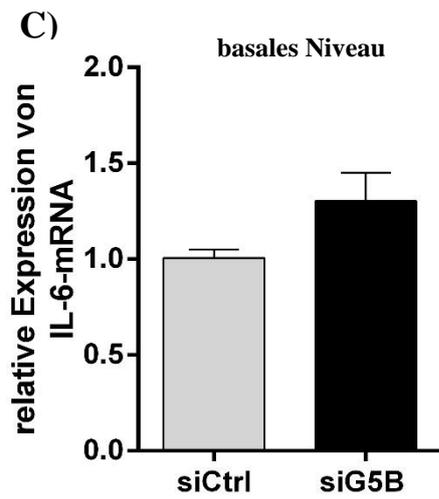
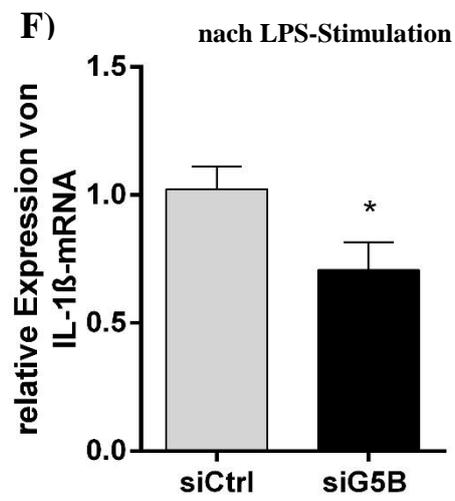
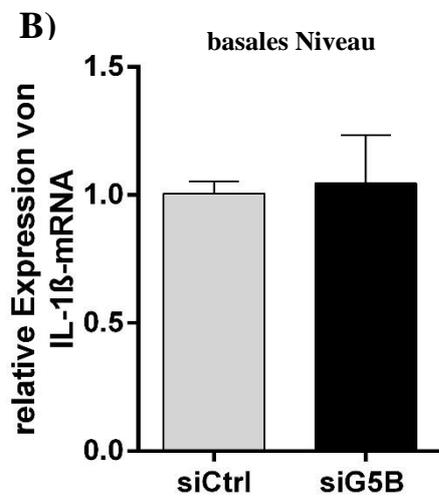
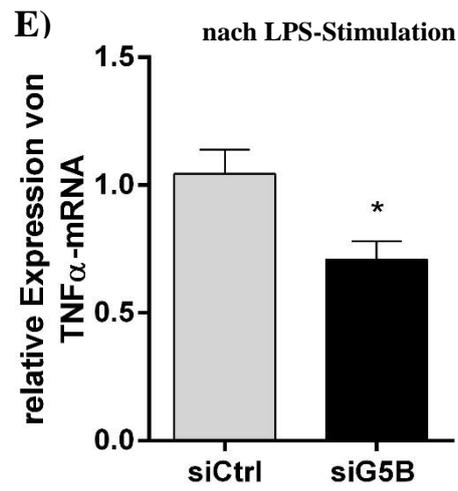
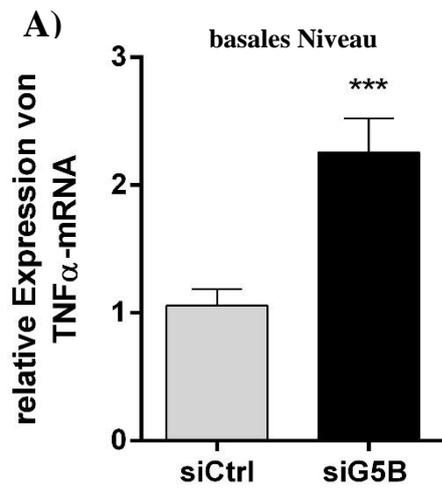


Abbildung 16: A) TNF α -, B) IL-1 β -, C) IL-6-, D) MCP-1-mRNA-Expression 96 h nach Virusinfektion (qPCR). E) TNF α -, F) IL-1 β -, G) IL-6-, H) MCP-1-mRNA-Expression nach 72 h Virusinfektion + 24 h LPS-Stimulation (10 ng/ml) (qPCR). GPRC5B-überexprimierende NRCF (AdG5B) wurden mit LacZ-überexprimierenden NRCF (AdLacZ) verglichen. Kontroll-Gen: rpl32; n = 9; p < 0,05 = *, p < 0,01 = **, p < 0,001 = ***

4.4.2 GPRC5B-Knockdown hemmt die Expression von inflammatorischen Zytokinen

Der Knockdown von GPRC5B hatte keinen signifikanten Einfluss auf die basale Expression von IL-1 β -, IL-6- oder MCP-1-mRNA, während die TNF α -Expression höchst signifikant auf 210% im Vergleich zu den Kontrollzellen erhöht war. Es zeigte sich allerdings, dass eine Erhöhung der inflammatorischen Aktivität durch eine LPS-Stimulation mit 10 ng/ml in GPRC5B-knockdown-Zellen schwächer ausfiel: Die Expression von TNF α - und IL-1 β war signifikant um etwa 35% schwächer, während bei IL-6- und MCP-1-mRNA kein signifikanter Effekt zu sehen war (Abbildung 17).



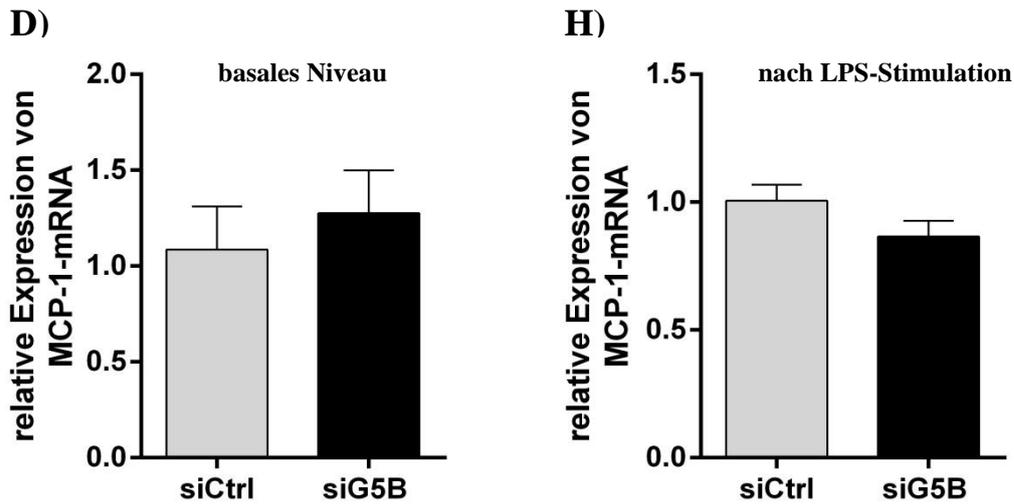


Abbildung 17: **A)** TNF α -, **B)** IL-1 β -, **C)** IL-6-, **D)** MCP-1-mRNA-Expression 96 h nach siRNA-Transfektion (qPCR). **E)** TNF α -, **F)** IL-1 β -, **G)** IL-6-, **H)** MCP-1-mRNA-Expression nach 72 h siRNA-Transfektion + 24 h LPS-Stimulation (10 ng/ml) (qPCR). GPRC5B-Knockdown NRCF (siG5B) wurden mit NRCF ohne Knockdown (siCtrl) verglichen. Kontroll-Gen: rpl32; n = 8 aus 3 Wiederholungen; p < 0,05 = *, p < 0,01 = **, p < 0,001 = ***

4.5 GPRC5B beeinflusst die EZM *in vitro*

Während des kardialen Remodelings kommt es zu einer veränderten Zusammensetzung von Proteinen der Extrazellulärmatrix, wodurch unter anderem fibrotische Prozesse eingeleitet werden können. Neben den Kollagenen, welche Hauptbestandteile der EZM darstellen, sind auch MMPs maßgeblich am Umbau der EZM beteiligt. Der funktionale Einfluss von GPRC5B auf die die EZM wurde geprüft, indem das Transkriptionsniveau von den Matrix-Metalloproteinasen-2 und -9 und von Kollagen-1A1 nach Überexpression und Knockdown von GPRC5B bestimmt wurde. Zusätzlich wurden die Zellen 72 h nach Infektion/Transfektion für 24 h mit 10 ng/ml LPS stimuliert, um das basale Expressionsniveau der MMPs anzuheben.

4.5.1 GPRC5B-Überexpression fördert die Expression von Matrix-Metalloproteinase-9

Die Überexpression von GPRC5B erhöhte die basale Transkription von Kollagen-1A1 und MMP-2 statistisch nicht signifikant, die basale Transkription von MMP-9 hingegen war höchst signifikant um den Faktor 2,3 erhöht. Nach LPS-Stimulation zeigte sich zwischen überexprimierenden Zellen und Kontrollzellen kein Unterschied in der Expression von MMP-2-mRNA, während die Expression von MMP-9-mRNA signifikant um den Faktor 4 gesteigert war (Abbildung 18).

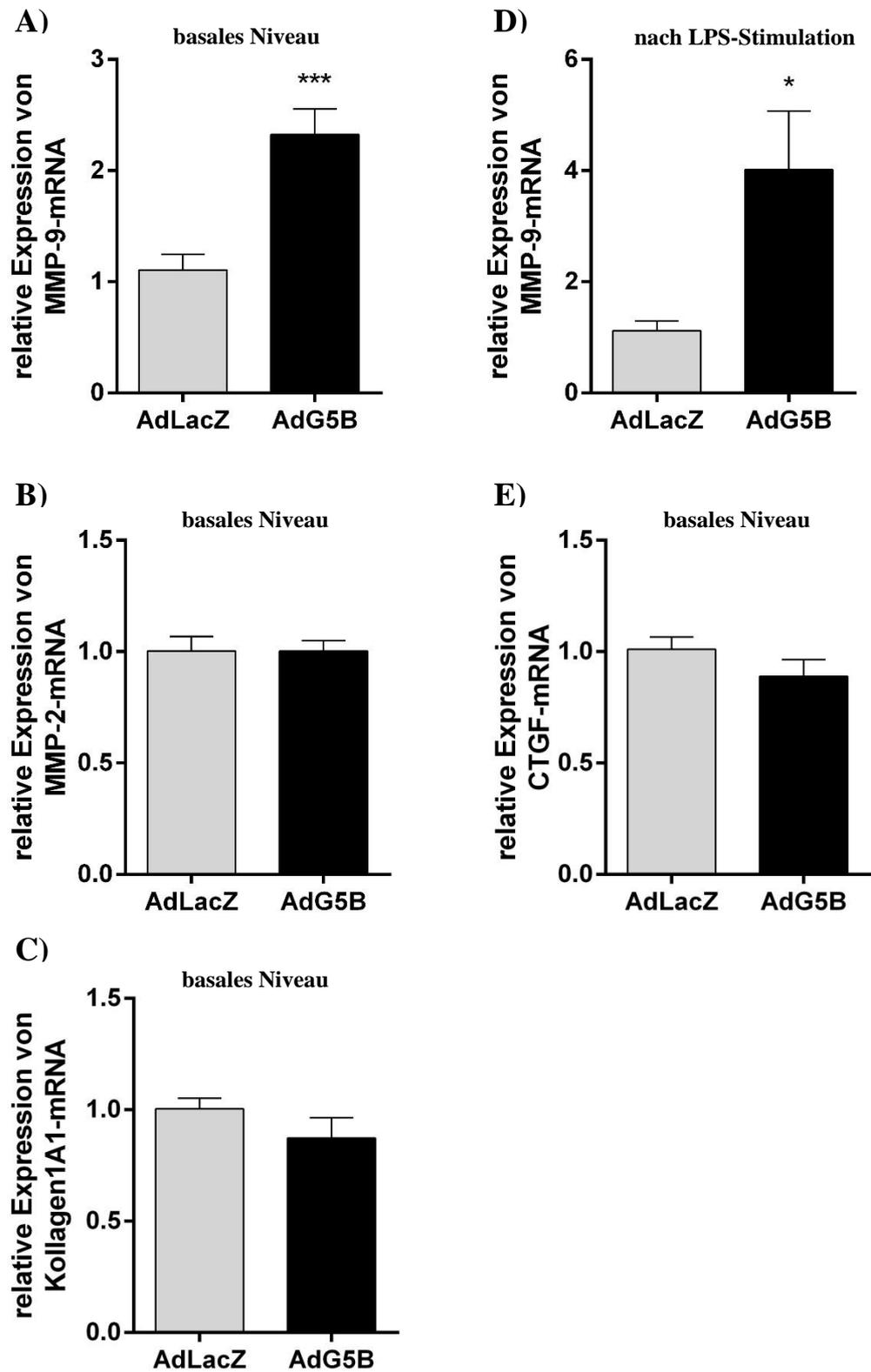


Abbildung 18: **A)** MMP-9-, **B)** MMP-2-, **C)** Kollagen1A1-, **E)** CTGF-mRNA-Expression 96 h nach Virusinfektion (qPCR). **D)** MMP-9-mRNA-Expression nach 72 h Virusinfektion + 24 h LPS-Stimulation (10 ng/ml) (qPCR). GPRC5B-überexprimierende NRCF (AdG5B) wurden mit LacZ-überexprimierenden NRCF (AdLacZ) verglichen. Kontroll-Gen: rpl32; **A), D)** n = 9 aus 3

Wiederholungen; **B), C), E)** n = 6 aus 2 Wiederholungen; p < 0,05 = *, p < 0,01 = **, p < 0,001 = ***

4.5.2 GPRC5B-Knockdown hemmt die Expression von Matrix-Metalloproteinase-9

Der Knockdown von GPRC5B hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von MMP-2- oder MMP-9-mRNA in NRCF im nicht-stimulierten Zustand. Es konnte allerdings beobachtet werden, dass NRCF, in denen GPRC5B herunterreguliert war, nach Stimulation mit LPS einen signifikant um 30% abgeschwächten MMP-9-Anstieg verzeichneten (Abbildung 19).

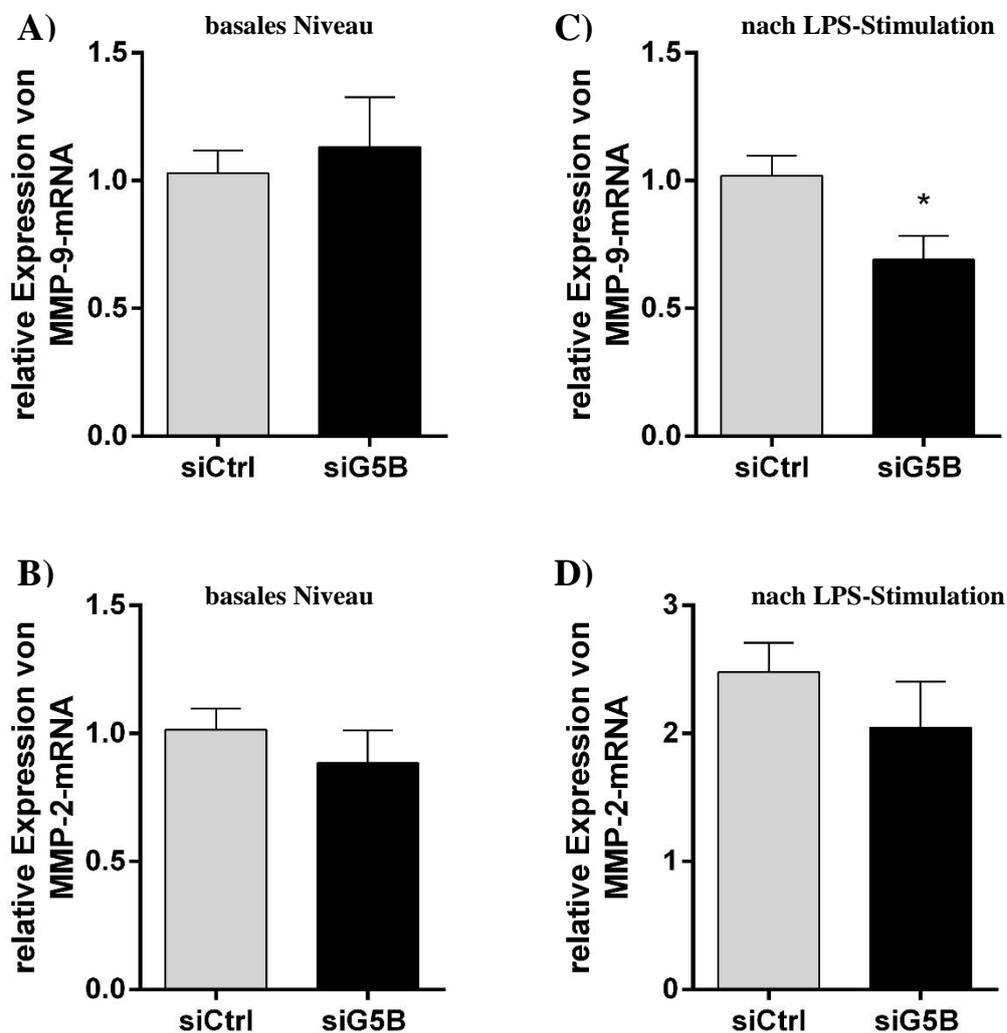
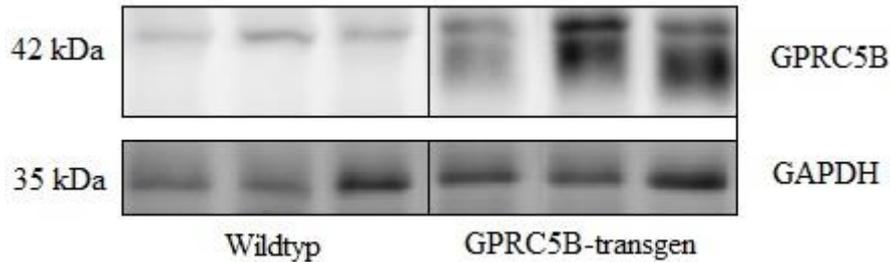


Abbildung 19: **A)** MMP-9-, **B)** MMP-2-mRNA-Expression 96 h nach siRNA-Transfektion (qPCR). **C)** MMP-9-, **D)** MMP-2-mRNA-Expression nach 72 h siRNA-Transfektion + 24 h LPS-Stimulation (10 ng/ml) (qPCR). GPRC5B-Knockdown NRCF (siG5B) wurden mit NRCF ohne Knockdown (siCtrl) verglichen. Kontroll-Gen: rpl32; n = 8 aus 3 Wiederholungen; p < 0,05 = *

4.6 GPRC5B stimuliert die Degradation der Extrazellulärmatrix *in vivo*

Die Mäuse (3.2 GPRC5B-transgene Mauslinie) wurden nach einem Jahr Lebenszeit getötet und ein Proteinlysats ihrer kompletten Herzen erstellt. Dass die GPRC5B-heterologen Mäuse den Rezeptor höchstens etwa dreifach vermehrt exprimieren, konnte zunächst in einem Western Blot gezeigt werden (Abbildung 21). Als Referenzprotein im Western Blot diente GAPDH.

A)



B)

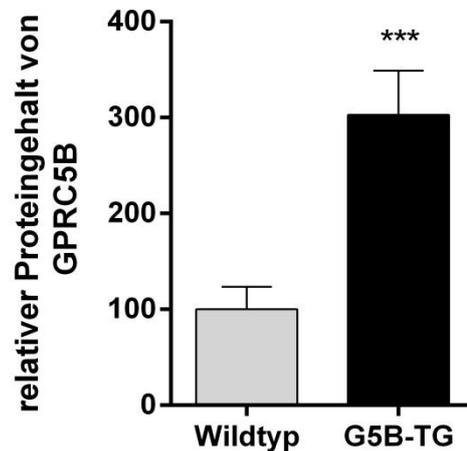


Abbildung 20: **A)** GPRC5B-Proteingehalt in ganzen Herzen von Wildtypen und GPRC5B-transgenen Mäusen (Western Blot). **B)** Densitometrische Auswertung mit Normierung des Proteingehaltes auf den Gehalt von GAPDH; n = 10 Wildtypen und 10 GPRC5B-transgene Tiere; p < 0,001 = ***

Über einen spezifischen Antikörper konnte dann belegt werden, dass die GPRC5B-Überexpression zu einer gesteigerten Proteinanreicherung von MMP-9 in den Mäuseherzen führte. MMP-9 wird posttranslational moduliert und kann daher in mehreren (pro-)aktiven Formen vorliegen. Hier konnte gezeigt werden, dass sowohl pro-MMP-9 bei 112 kDa als auch aktives MMP-9 bei 92 kDa hoch beziehungsweise höchst signifikant um den Faktor 1,6 bzw. 1,7 heraufreguliert wurde (Abbildung 21).

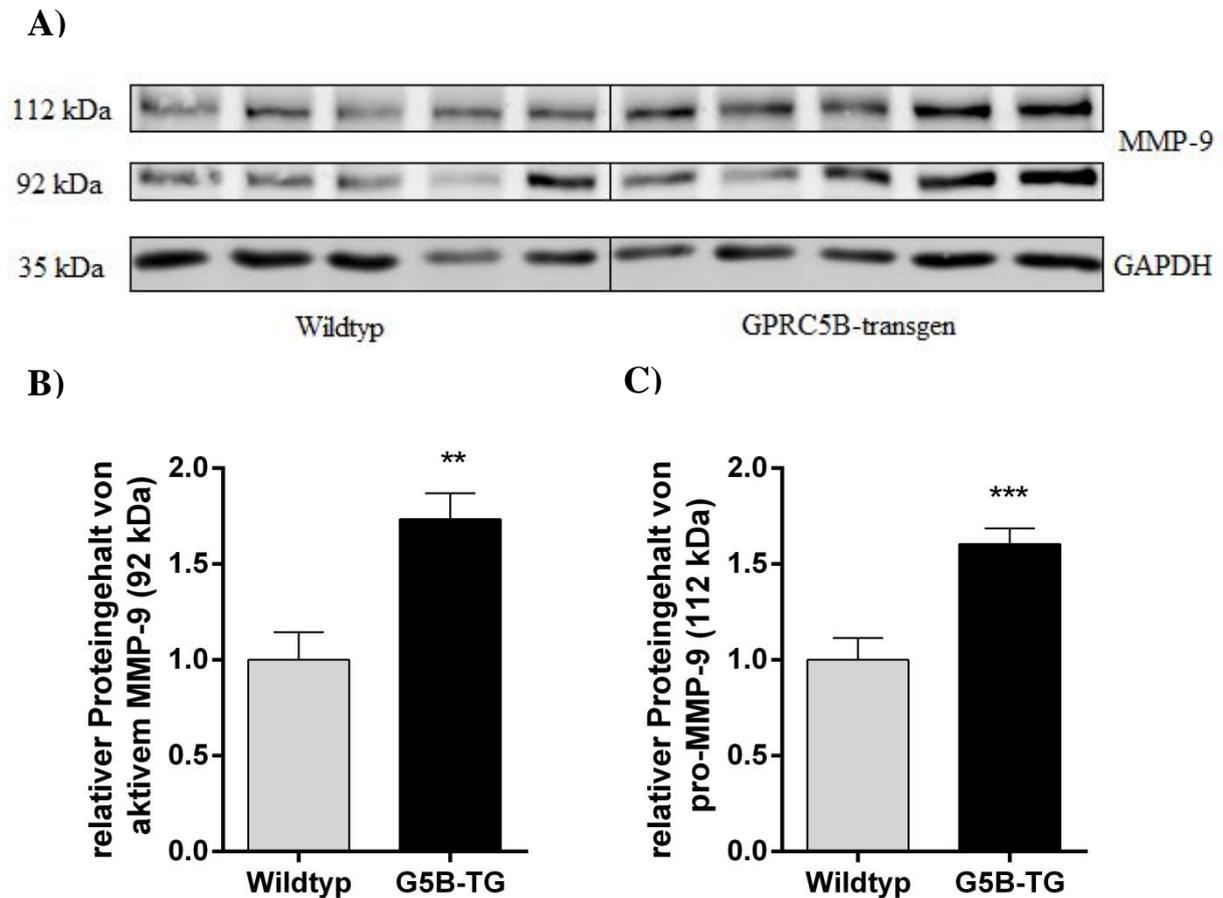
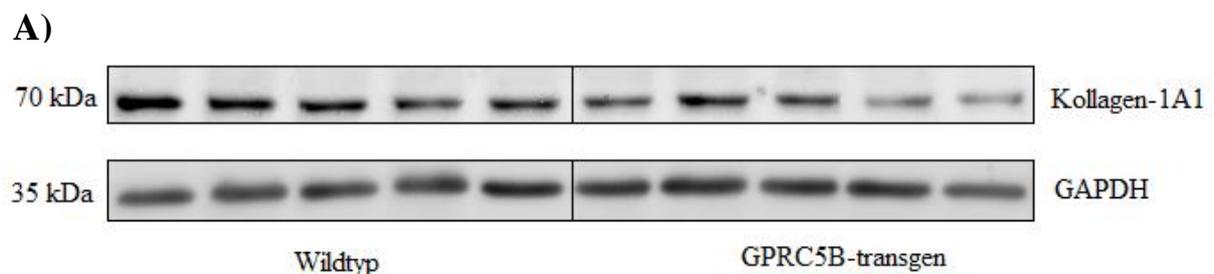


Abbildung 21: A) MMP-9-Proteingehalt von aktivem MMP-9 (92 kDa) und pro-MMP-9 (112 kDa) in ganzen Herzen von Wildtypen und GPRC5B-transgenen Mäusen (Western Blot) B), C) Densitometrische Auswertung von A) mit Normierung auf den GAPDH-Proteingehalt; n = 10 Wildtypen vs. 9 GPRC5B-transgene Mäuse; $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$

Kollagen-1A1 ist ein Hauptbestandteil der EZM. Es konnte hier gezeigt werden, dass die Überexpression von GPRC5B zu einem um 30% verringerten Gehalt von Kollagen-1A1-Protein im Herzgewebe der GPRC5B-transgenen Mäuse führt (Abbildung 22).



B)

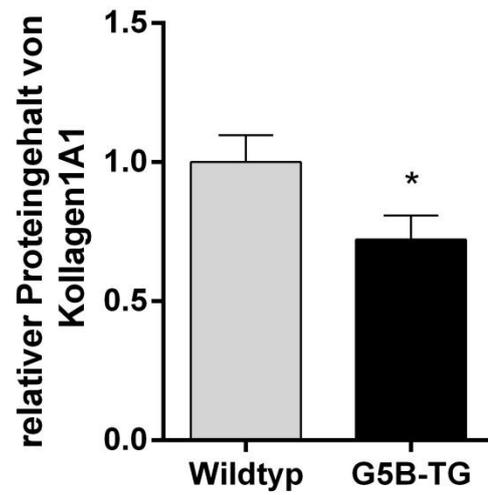


Abbildung 22: A) Kollagen-1A1-Proteingehalt in Wildtypen und in GPRC5B-transgenen Mäusen (Western Blot). B) Densitometrische Auswertung mit Normierung auf den Gehalt von GAPDH; n = 10 Wildtypen vs. 10 GPRC5B-transgene Mäuse; $p < 0,05 = *$

5) Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde mittels in vitro- und in vivo-Versuchen untersucht, wie die GPRC5B-Expression reguliert wird, ob es einen pro-inflammatorischen Einfluss von GPRC5B auf kardiale Fibroblasten und die EZM gibt und ob kardiales Remodeling durch GPRC5B moduliert wird. Die Ergebnisse (siehe Kapitel 4) werden im Folgenden diskutiert.

5.1 Isolierung von kardialen Fibroblasten

Die frisch aus den neonatalen Rattenventrikeln isolierten Zellen (Abbildung 6) entsprachen dem Phänotypen von Fibroblasten, wie er in der Literatur beschrieben wird [47]. Dass die Zellen sich im weiteren Verlauf morphologisch änderten, ist ein in der Literatur bereits gut beschriebenes Phänomen: Schon nach wenigen Zellteilungen in 2D-Zellkulturen findet die Transdifferenzierung in Myofibroblasten statt, welche sich unter anderem durch einen breiteren Körper auszeichnen [141, 208]. Auch die Immunocytochemie bestätigte durch Anfärbung des fibroblastenspezifischen Markers DDR-2 und des vor allem auf Myofibroblasten exprimierten Markers α SMA diesen Eindruck [141, 206, 207]. Alle Zellen exprimierten diese beiden Marker, woraus sich schließen lässt, dass die nachfolgenden Versuche mit kardialen Myofibroblasten durchgeführt wurden.

5.2 Expression von GPRC5B in kardialen Fibroblasten

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass GPRC5B sowohl in kardialen Myozyten als auch in kardialen Fibroblasten exprimiert wird (4.2 Expression von GPRC5B in NRCF). Dies ist kongruent mit bisherigen Erkenntnissen, dass im Herzen eine moderate Expression des Rezeptors stattfindet [190, 191].

Die Ergebnisse zeigten deutlich eine Heraufregulierung der GPRC5B-Expression durch TNF α - und LPS-Stimulation auf mRNA- und Proteinebene sowie durch zyklische, mechanische Belastung auf mRNA-Ebene. Es wurden somit diverse Modelle der Stressinduktion simuliert. Einschränkend ist zu erwähnen, dass der Dehnungs-Versuch lediglich einmalig mit n=6 erfolgreich durchgeführt wurde. Wiederholungen des Versuchs gelangen nicht, dabei war die CTGF-Positivkontrolle stets negativ ausgefallen. Es gibt bereits eine Studie von Hohenhaus et al., welche ein erhöhtes GPRC5B-mRNA-Expressionsniveau in Makrophagen nach Stimulation mit LPS zeigen konnte [209]. Hier wurde nun jedoch dieser Effekt erstmals auf Protein-Ebene und im kardialen Fibroblasten gezeigt. Im Rahmen dieses Projektes konnten nun ebenfalls erstmalig die Regulation des GPRC5B-Expressionsniveaus durch TNF α und mechanische Dehnung belegt werden. TNF α kann, wie in **Kapitel 1.1.4 Inflammation als eine**

Ursache des kardialen Remodelings beschrieben, NFκB induzieren. Auch LPS führt über den Toll-Like-Rezeptor 4 zu einer Aktivierung der NFκB-Signalkaskade [210, 211]. Für zyklische, mechanische Dehnung gibt es bisher keine Untersuchungen in kardialen Fibroblasten, aber aus Studien mit anderen Zelltypen wie Kardiomyozyten aus adulten Ratten ist bekannt, dass 24-stündige mechanische Belastung eine Translokation des NFκB-Proteins p65 in den Nukleus zur Folge hat [212]. Auch in humanen Lungenfibroblasten wurde eine NFκB-Induktion nach mechanischer Belastung festgestellt [213]. Insgesamt ist es wahrscheinlich, dass auch in der hier durchgeführten Untersuchung in kardialen Fibroblasten die NFκB-Aktivität durch zyklische, mechanische Dehnung erhöht war.

Es ist möglich, dass die drei hier verwendeten Modelle der Stimulation (TNFα, LPS, zyklische Dehnung) über unterschiedliche Signalwege zu einer GPRC5B-Induktion führten. Da die NFκB-Induktion aber eine gemeinsame Endstrecke aller drei Modelle darstellt (1.1.4 Inflammation als eine Ursache des kardialen Remodelings), kann auf Grundlage der Ergebnisse die Hypothese aufgestellt werden, dass GPRC5B über die NFκB-Signalkaskade, also über Translokation von NFκB-Proteinen in den Zellkern, induziert wird.

5.3 GPRC5B moduliert inflammatorische Signalwege in kardialen Fibroblasten

Die in **Kapitel 4.4 GPRC5B moduliert inflammatorische Signalwege in kardialen Fibroblasten** beschriebenen Versuche untersuchten den Einfluss von GPRC5B auf die Expression von TNFα, IL-1β, IL-6 und MCP-1. Diese Zytokine repräsentieren zelluläre inflammatorische Signalwege vieler Krankheitsbilder [108, 118, 214-217]. Hier konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von GPRC5B zu einer verstärkten inflammatorischen Aktivität kardialer Fibroblasten führte, während ein Knockdown die inflammatorische Aktivität reduzierte.

Die Überexpression von GPRC5B hatte eine Hochregulierung der basalen Expression aller oben genannter Zytokine zur Folge. Nach LPS-Stimulation waren lediglich IL-6- und MCP-1-mRNA in den GPRC5B-überexprimierenden Zellen nicht signifikant erhöht, TNFα- und IL-1β-mRNA stiegen signifikant an. Keines der inflammatorischen Zytokine wurde in seiner basalen Expression durch einen Knockdown von GPRC5B signifikant herunterreguliert. Hinsichtlich der Expression der TNFα-mRNA ergaben sich überraschende Beobachtungen: sie stieg höchst signifikant. Möglicherweise führte der Knockdown von GPRC5B hier zu einer Induktion von Prozessen, an denen die anderen Zytokine im Gegensatz zu TNFα nicht beteiligt

waren. Die pleiotropen Wirkungen von TNF α erschweren hier eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse. Nachdem das Zytokin-Expressionsniveau mittels LPS-Stimulation angehoben worden war, wurden die TNF α - und IL-1 β -Expression durch einen GPRC5B-Knockdown signifikant herunterreguliert. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Herunterregulation der basalen Expression nach GPRC5B-Knockdown ist, dass das basale Expressionsniveau der Zytokine so niedrig war, dass es nicht weiter sinken konnte. Durch die LPS-Stimulation wurde das Expressionsniveau dann in solch einem Maße gesteigert, dass der Einfluss von GPRC5B zumindest auf die TNF α - und die IL-1 β -Expression deutlich wurde. Dieser schien unter Berücksichtigung der Gesamtbefunde stärker ausgeprägt zu sein, als auf IL-6 und MCP-1.

Insgesamt zeichneten die Expressionsmuster ein relativ eindeutiges Bild: Der GPRC5B-Rezeptor regulierte inflammatorische Signalwege differentiell. Eine pro-inflammatorische Funktion von GPRC5B in kardialen Fibroblasten ist daher auf Grundlage dieser Ergebnisse anzunehmen. Dabei muss berücksichtigt werden, dass in dieser Studie die konstitutive Aktivität, welche bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gut bekannt ist, durch Veränderungen des Expressionsniveaus, reguliert wurde, um funktionale Daten zu erheben. Diese könnten sich unter anderem in ihrem Ausmaß und in ihrer Wirkung von einer Liganden-induzierten Aktivität unterscheiden [218-220].

In bisherigen Studien zu GPRC5B gab es zwar bereits Indizien, die auf eine NF κ B-abhängige, inflammatorische Rolle von GPRC5B hindeuteten (1.2.2 Aufbau und Funktion des Rezeptors). Der funktionale Einfluss von GPRC5B auf die Transkription verschiedener Downstream-Ziele von NF κ B wurde in der hiesigen Studie allerdings erstmalig demonstriert.

Dennoch gibt es Limitationen, welche bei der Interpretation dieser Ergebnisse berücksichtigt werden müssen: Die Regulation der inflammatorischen Zytokine wurde nicht auf Protein-Ebene, sondern nur auf mRNA-Ebene untersucht. Da es zwischen einem effektiv wirkenden Protein und seiner zugrunde liegenden mRNA jedoch viele translationale und post-translationale Prozesse gibt, wäre es hilfreich, in weiteren Untersuchungen diesbezüglich noch mehr Daten zu sammeln. Wie Shebl et al. in peripheren mononukleären Zellen des Blutes zeigen konnten, korrelierte die Protein-Expression vieler Zytokine mit der mRNA-Expression häufig nur zu 40-80% [221]. Anbieten würden sich hier ELISA-Untersuchungen von konzentriertem *in vitro* Überstand der Fibroblastenkulturen oder auch die Evaluation von Proteinlysaten mittels spezifischer Antikörper im Western Blot.

Letzteres wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Greta Freundt an Endothelzellen und Vascular Smooth Muscle Cells durchgeführt. Dies ergab eine gute Korrelation zwischen mRNA-Expression und sezernierter Zytokin-Menge im Zell-Überstand (Kiel 2018, persönliche Mitteilung).

5.4 GPRC5B reguliert Matrix-Metalloproteinase -9 *in vitro*

Inflammation und Fibrose sind durch die Auf- und Abbauprozesse der EZM verknüpft. Somit kommt nicht nur den inflammatorischen Signalwegen in der Pathogenese des kardialen Remodelings erhebliche Bedeutung zu, sondern auch Signalwegen, welche Proteine der EZM beeinflussen (1.1.3 Interstitielle Fibrose und der kardiale Fibroblast). Die MMP-2 und -9 wurden in **Kapitel 4.5 GPRC5B beeinflusst die EZM *in vitro*** stellvertretend für die große Gruppe der MMPs untersucht, da ihre pathophysiologische Relevanz im Remodeling gut bekannt ist [222, 223]. Dabei zeigten die GPRC5B-überexprimierenden Zellen, auch nach LPS-Stimulation, ein erhöhtes Expressionsniveau von MMP-9, während das Expressionsniveau von MMP-2 von GPRC5B unbeeinflusst blieb. Die basale Transkriptionsrate von MMP-2 und -9 wurde durch einen Knockdown nicht beeinflusst. Nach Anheben des MMP-Expressionsniveaus durch LPS-Stimulation demaskierte sich jedoch der hemmende Effekt eines GPRC5B-Knockdowns auf die Expression von MMP-9. Die Expression von MMP-2 blieb im Verhältnis zu den Kontrollzellen unverändert. Geht man von einer NFκB-abhängigen Wirkweise von GPRC5B aus, stimmt diese Beobachtung mit einer Studie von Bond et al. übereinander, welche demonstrierten, dass MMP-9 durch IL-1 und IκB reguliert wird, während sie keinen Effekt auf MMP-2 erkennen konnten [184]. Dies steht in Diskrepanz zu anderen Studien, welche im Gegensatz dazu eine NFκB-beeinflusste MMP-2-Regulation zeigten [224, 225]. Denkbar ist, dass die Expression von MMP-2 und MMP-9 durch unterschiedliche NFκB-abhängige Signalwege induziert wird und dass GPRC5B einen Schenkel der NFκB-Signalkaskade aktiviert, welcher MMP-2 nicht beeinflusst. Diese Hypothese unterstützend sind die Ergebnisse von Reinhardt et al., welche Differenzen zwischen der Aktivitätssteigerung von MMP-2 und MMP-9 je nach zugrunde liegender Krankheit aufzeigen konnten: während die Aktivität von MMP-2 nur bei Patienten mit idiopathisch dilatierter Kardiomyopathie gesteigert war, war die Aktivität von MMP-9 zudem auch in myokardialen Proben von Patienten mit koronarer Herzkrankheit erhöht, was unterschiedliche Induktionswege von MMP-2 und MMP-9 suggeriert [222]. Allerdings kann der fehlenden Stimulation von MMP-2 durch GPRC5B-Überexpression in dieser Studie sicherlich auch zugrunde liegen, dass nicht genügend

unterschiedliche Versuchsbedingungen (Zeitpunkte, Dosierung der Viruslast, LPS-Stimulation) getestet wurden und ein potentieller Effekt dadurch nicht erkannt wurde.

Die hier durchgeführten *in vitro*-Versuche wurden ausschließlich mit neonatalen Zellen durchgeführt. Es gibt Studien, welche auf Unterschiede zwischen neonatalen und adulten kardialen Zellen hinsichtlich ihrer Funktion und Physiologie hinweisen, zum Beispiel bei parakrin vermittelten Signalen durch Fibroblasten [226] oder in der β -adrenergen Erregung der Kardiomyozyten [227]. Vor allem aber gehen Herzen von Säugetieren speziell in den ersten postnatalen Tagen erhebliche Entwicklungen durch, welche auch die Zellverteilung und zum Teil die Zellfunktionen miteinschließen. Insbesondere die Anzahl und Lokalisation von Fibroblasten ist in den ersten Lebensstagen von enormer Dynamik geprägt, welche an den Veränderungen der Herzstruktur einen großen Anteil tragen [228-230]. Dies muss bei der Bewertung der Ergebnisse dieser Studie berücksichtigt werden. Aus ethischen Gründen und vor dem Hintergrund der erheblich höheren Haltungskosten und -umstände in der Arbeit mit adulten Ratten wurde sich in diesem Projekt jedoch bewusst dafür entschieden, mit neonatalen Tieren zu arbeiten.

5.5 GPRC5B stimuliert die Degradation der Extrazellulärmatrix *in vivo*
Daten aus *in vitro*-Versuchen liefern wertvolle Hinweise auf die Regulation und Funktion von Zielproteinen, da sich viele Störfaktoren beseitigen lassen und somit ein direkterer Blick möglich ist. Allerdings haben sie häufig nur eine begrenzte Aussagekraft im Hinblick auf die tatsächlichen Prozesse im menschlichen Körper, der weitaus komplexere Mechanismen beinhaltet, als sich durch 2D-Zellkulturen simulieren lassen. Daher ist es äußerst hilfreich, aus *in vitro*-Versuchen gewonnene Erkenntnisse auch an Tiermodellen zu prüfen.

Die in **Kapitel 4.6 GPRC5B stimuliert die Degradation der Extrazellulärmatrix *in vivo*** verwendeten GPRC5B-transgenen Mäuse exprimierten etwa 5-fach mehr humanes als endogenes GPRC5B im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. Nach Ende des ersten Lebensjahrs die Proteinzusammensetzung ihrer Herzen mittels Western Blot evaluiert. Dabei zeigte sich ein erhöhtes Vorkommen an MMP-9 und eine verringerte Menge an Kollagen-1A1 in den Mäuseherzen. Auch wenn beim Vergleich mit Ergebnissen aus den *in vitro*-Versuchen zu berücksichtigen ist, dass in den *in vivo*-Versuchen die Proteinlysate ganzer Herzen und somit auch viele Nicht-Fibroblasten untersucht wurden, passt dies zu den Resultaten der *in vitro*-Versuche (4.5 GPRC5B beeinflusst die EZM *in vitro*), in welchen eine Steigerung der MMP-9-mRNA-Expression nach GPRC5B-Überexpression beobachtet wurde. Dass Kollagen-1A1 in

den *in vitro*-Versuchen nicht durch GPRC5B reguliert wurde, kann beispielsweise an den unterschiedlichen Nachweismethoden (*in vitro*: qPCR vs. *in vivo*: Western Blot) gelegen haben, auch hätten hier gegebenenfalls für eine höhere Aussagekraft der *in vitro*-Versuche das Ändern der Versuchsparameter (Versuchsdauer, Stimulation, Ausmaß der GPRC5B-Überexpression etc.) geholfen.

Die Anreicherung von MMP-9 und die Degradation von Kollagen-1A1 *in vivo* kann mit einem NFκB-abhängigen Effekt von GPRC5B gut in Einklang gebracht werden [184, 185, 231-233]. Dieser Einfluss von GPRC5B auf die EZM wurde in dieser Studie erstmalig beschrieben und ist in der Literatur nicht vorbekannt. Interessant wären im Hinblick auf die Auswirkungen im kardialen Remodeling noch die Untersuchung weiterer Parameter gewesen. So hätten zum Beispiel immunhistochemische Untersuchungen der Herzen und eine Bemessung des Verhältnisses zwischen Kollagen-1A1 und Kollagen-3A1 erlaubt, konkretere Schlüsse auf die pathophysiologische Relevanz der hier beobachteten Effekte von GPRC5B-Aktivität zu ziehen [234].

5.6 Wirkmechanismus von GPRC5B in kardialen Fibroblasten

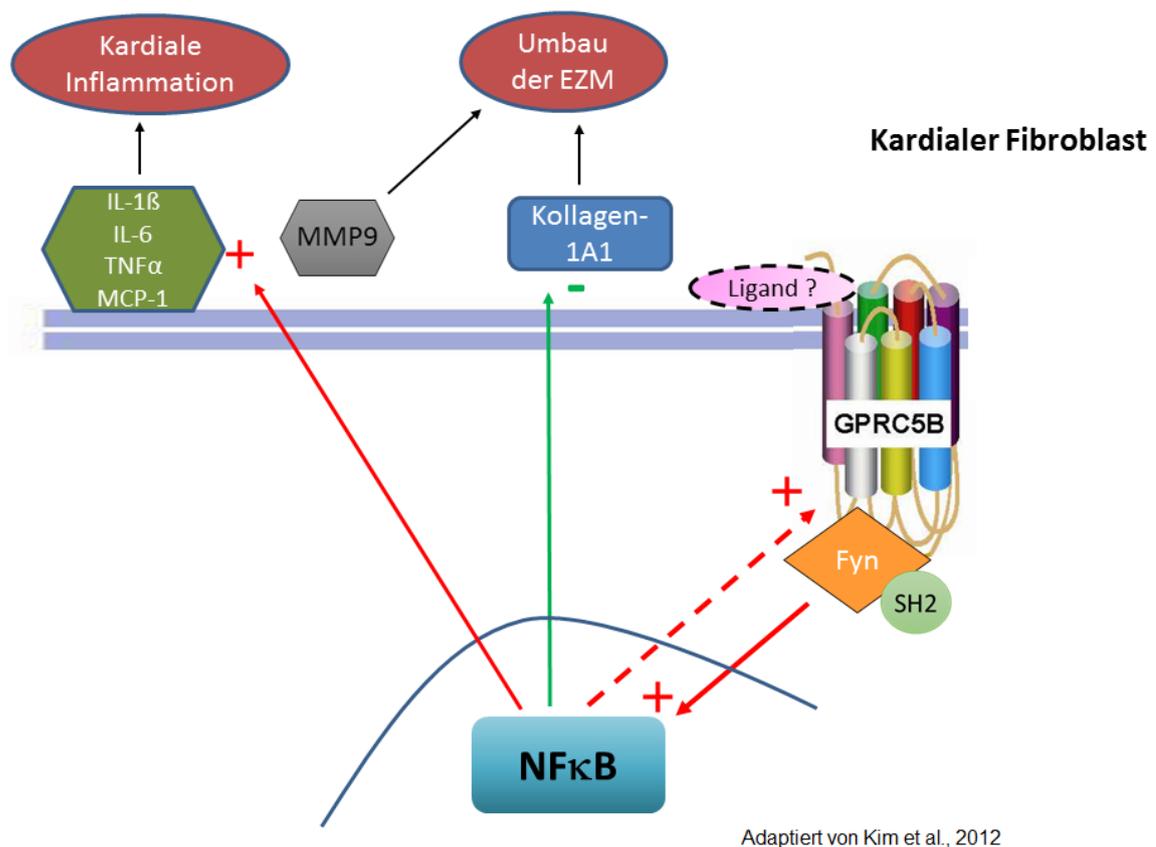


Abbildung 23: Hypothetisches Modell der Wirkweise von GPRC5B: Es besteht ein positiver Feedback-loop zwischen GPRC5B und NF κ B. NF κ B-Stimulation (beispielsweise durch inflammatorische Zytokine oder mechanische Belastung) führt zu einer erhöhten Expression von GPRC5B. Zugleich mündet eine erhöhte Aktivität von GPRC5B über die SH2-Domäne der Tyrosin-Proteinkinase Fyn in einer verstärkten NF κ B-Aktivierung [195, 198]. Somit führt GPRC5B-Aktivität NF κ B-abhängig zu kardialer Inflammation und zum Umbau der kardialen Extrazellulärmatrix.

Abbildung 23 beschreibt auf Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit und der mechanistischen Daten in Adipozyten [195, 198] einen möglichen Signalweg von GPRC5B. Dass die Expression von GPRC5B wirklich NF κ B-abhängig reguliert ist, wird in dieser Arbeit nicht abschließend durch Experimente belegt, lässt sich auf Grundlage dieses Ergebnisse aber annehmen (siehe: 5.2 Expression von GPRC5B in kardialen Fibroblasten). Solch eine Schlussfolgerung ist zwar in Anbetracht der GPRC5B-stimulierenden Faktoren naheliegend, allerdings fehlt es an weiteren molekularbiologischen Untersuchungen, um in diesem Punkt Gewissheit zu erlangen. Ein weiterer starker Hinweis wäre es, wenn nachgewiesen werden könnte, dass der Transkriptionsfaktor NF κ B an die Promotorregion von GPRC5B bindet.

Für die Hypothesen 1 (GPRC5B-Expression wird durch Inflammation und Zellstress reguliert) und 2 (GPRC5B nimmt pro-inflammatorisch Einfluss auf kardiale Fibroblasten und moduliert die Extrazellulärmatrix) aus Kapitel 1.3 lassen sich somit einige Belege finden.

5.7 Schlussfolgerung: Einfluss auf das kardiale Remodeling

Wie in 5.6 dargestellt, hat eine größere Menge von GPRC5B in der Zellmembran eine erhöhte inflammatorische Aktivität und einen Umbau der EZM zur Folge. Es führt zu einer Abnahme der Kollagen-I-Expression in Mäuseherzen. Da kardiales Remodeling mit myokardialer Fibrose einhergeht, welche durch eine Anreicherung von Kollagenen charakterisiert ist [1, 62], stellt sich also folgende Frage: Wirkt GPRC5B durch eine Kollagen-Degradation insgesamt anti-fibrotisch, möglicherweise gar hemmend auf das kardiale Remodeling?

Um diese Frage zu beantworten, lohnt es sich, noch einmal die in **Kapitel 1.1 Kardiales Remodeling und Fibrose** aufgezählten zentralen Bestandteile des kardialen Remodelings zu rekapitulieren: Kardiomyozytärer Zelltod, kardiomyozytäre Hypertrophie, myokardiale Fibrose und Inflammation.

Kardiomyozytärer Zelltod

Die Apoptose von Kardiomyozyten ist ein Aspekt der Entstehung von Herzinsuffizienz [21, 235]. In der vorliegenden Studie konnte in Bezug auf den kardiomyozytären Zelltod gezeigt werden, dass die TNF α -Expression in kardialen Fibroblasten durch GPRC5B hochreguliert wird. Da TNF α als Induktor von Apoptose in kardialen Myozyten identifiziert worden ist, ist dies ein Hinweis auf eine Remodeling-verstärkende Funktion von GPRC5B [236, 237]. Es könnte weiterführend nützlich sein, zu evaluieren, ob eine GPRC5B-Überexpression eine Aktivierung von Caspasen zur Folge hat, weil Caspasen wichtige Elemente in den apoptotischen Signalwegen darstellen [238].

Kardiomyozytäre Hypertrophie

Zur kardiomyozytären Hypertrophie wurden im Rahmen dieses Projektes keine direkten Untersuchungen angestellt. Dennoch ist ein Einfluss von GPRC5B auf die Hypertrophie von kardialen Myozyten denkbar. Wie Liu et al. in kardialen Myozyten und Fibroblasten demonstrieren konnten, besteht über p65 eine direkte Interaktion zwischen NF κ B und dem nukleären Faktor aktivierter T-Zellen (NFAT) [239]. NFAT induziert über den Calcineurin-NFAT-Signalweg das fetale hypertrophe Genprogramm in Kardiomyozyten [240, 241]. Der

Zusammenhang zwischen GPRC5B-Aktivität und kardiomyozytärer Hypertrophie wurde in der Doktorarbeit von Frederik Stelter (Kiel 2018, persönliche Mitteilung) genauer untersucht.

Myokardiale Fibrose

Dass GPRC5B-transgene Mäuse weniger Kollagen-1A1 exprimierten, als die Wildtypen, könnte gegen eine Remodeling- bzw. Fibrose-verstärkende Wirkung von GPRC5B sprechen. Hier ist jedoch die vielschichtige Dynamik des Kollagen-Ab- und Umbaus zu beachten. Nicht nur die Menge, sondern vor allem das Gleichgewicht und die Vernetzung zwischen den diversen Kollagen-Subtypen spielen eine Rolle in der Funktionalität und Steifheit des myokardialen Interstitiums [242]. Auch der zeitliche Verlauf von MMP-Aktivität ist von Relevanz für die Expression von Kollagenen: In MMP-1-überexprimierenden Mäusen konnten Kim et al. beobachten, dass zwar nach 6 Monaten die Kollagen-3-Expression in den Mäuser Herzen gestiegen war. Nach insgesamt einem Jahr war dann allerdings eine Adaption hin zu erniedrigten Kollagen-3-Spiegeln zu messen [243]. Diese Umstände und auch klinische Parameter wie die diastolische und systolische Funktion der Mäuser Herzen wurden im Rahmen dieses Projektes nicht untersucht, weshalb die Schlussfolgerung zunächst sein sollte: GPRC5B verändert den Stoffwechsel der kardialen EZM. Ein erhöhter Metabolismus von Kollagenen sowie erhöhte MMP-9-Spiegel wiederum sind als Biomarker von kardialem Remodeling beschrieben [244-246].

Inflammation

Längerfristig bestehende Inflammation geht mit Aspekten kardialen Remodelings wie Fibrose und Apoptose einher [70-72, 237, 247]. In dieser Studie war GPRC5B mit dem Anstieg multipler inflammatorischer Zytokine assoziiert (5.3 GPRC5B moduliert inflammatorische Signalwege in kardialen Fibroblasten).

5.8 Ausblick

Es gibt bereits profunde Erkenntnisse zu den pathophysiologischen Vorgängen im kardialen Remodeling und auch die Rolle des kardialen Fibroblasten wurde im letzten Jahrzehnt verstärkt untersucht. Dennoch bleibt die Prognose von Herzinsuffizienten beim Auftreten kardialen Remodelings sehr schlecht (1.1.1 Allgemeines), nicht zuletzt wegen fehlenden Therapiemöglichkeiten [248].

Tiermodell

Die im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Ergebnisse lassen ein mögliches therapeutisches Potenzial einer GPRC5B-Inhibition erkennen. Der GPRC5B-Rezeptor sollte als GPCR in seiner konstitutiven Aktivität durch einen passenden inversen Agonisten hemmbar sein. In entsprechender Weise werden Betablocker bereits beim therapeutischen Einsatz zum Hemmen von beta-adrenergen GPCRs genutzt [249]. Um diesen Ansatz zu verfolgen müsste zunächst jedoch die pathophysiologische Relevanz von GPRC5B in kardialen Krankheitsprozessen genauer beleuchtet werden. Von großem Interesse wäre, humane Biopsieproben von Patienten mit kardialem Remodeling als Folge unterschiedlicher Krankheitsentitäten auf ihre GPRC5B-Expression zu untersuchen. Da die Probengewinnung vom Menschen offensichtlich mit einigen Hürden verbunden ist, könnte auch das Ausweichen auf Herzproben von Tieren eine Alternative darstellen. Hier wären Stress-Modelle wie die transverse aortale Konstriktion (TAC) oder die LAD-Ligatur zur Induktion eines Myokardinfarktes in größeren Tieren wie Schweinen und Kaninchen oder in Mäusen denkbar [250-252]. Wegen der vielfältigen Entstehungsmöglichkeiten kardialen Remodelings wären allerdings auch Modelle diverser anderer kardialer Pathologien interessant [253]. In diesen Tiermodellen könnte dann mittels GPRC5B-transgener Tiere auch die vermutete pathologische Funktion des Rezeptors weiter getestet werden. Außerdem könnte erprobt werden, ob GPRC5B-Knockdown-Tiere im Vergleich zu Wildtypen besser auf induzierte Belastungen wie zum Beispiel TAC reagieren.

Zellkultur

Auch in der Zellkultur können noch viele weitere Erkenntnisse gewonnen werden, um das Verständnis der Rolle GPRC5Bs weiter zu festigen. Gewinnbringend wäre unter anderem, die Interaktion zwischen Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten genauer zu untersuchen und festzustellen, ob GPRC5B diese beeinflusst. Ein mögliches Versuchsmodell wäre, Kardiomyozyten mit dem Überstand von GPRC5B-überexprimierenden kardialen Fibroblasten zu stimulieren und dann zu schauen, ob es zu zellulärer Größenzunahme kommt und ob das fetale hypertrophe Genprogramm induziert wird. Im Hinblick auf eine mögliche Rolle in der zellulären Apoptose bestünde eine Möglichkeit darin, das Proteinlysate von GPRC5B-überexprimierenden kardialen Fibroblasten mittels Western Blot auf die Aktivierung verschiedener Caspasen zu untersuchen [238]. Darüber hinaus ist die Aufklärung der intrazellulären Signalwege *downstream* des Rezeptors bedeutsam. Zudem ist insbesondere von Interesse, ob die Tyrosinkinase Fyn im GPRC5B-Signalweg auch in kardialen Fibroblasten eine zentrale Rolle spielt und welche G-Proteine an der Signaltransduktion beteiligt sind.

6) Zusammenfassung

Die Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz stellt eine der größten Herausforderungen der modernen Medizin dar. An Ihrer Entstehung sind Inflammation, kardiale Fibrose und myokardialer Zellverlust sowie kardiomyozytäre Hypertrophie beteiligt. Diese Prozesse münden letztendlich in kardialem Remodeling, welches mit einer stark eingeschränkten Funktion des Herzens einhergeht, sodass dieses den Körper nicht mehr suffizient mit Blut versorgt. Eine Schlüsselrolle in der Pathogenese spielen dabei kardiale Fibroblasten, welche einen Großteil der kardialen Zellpopulation darstellen. GPRC5B, ein G-Protein-gekoppelter orphan Rezeptor, der pro-inflammatorische Eigenschaften in Adipozyten hat und in den Glukose- und Lipidstoffwechsel involviert ist, wird endogen in kardialen Fibroblasten exprimiert. Er wirkt vermutlich über die Aktivierung der NF κ B-Signalkaskade. Hier wurde die Regulation und Funktion dieses Rezeptors in primären Rattenkardiofibroblasten und seine potentielle Bedeutung in der Pathogenese kardialen Remodelings untersucht.

Die Expression des GPRC5B-Rezeptors wird durch TNF α , LPS und mechanischen Stress reguliert. In, frisch aus neonatalen Ratten isolierten, kardialen Fibroblasten zeigte sich im Western Blot nach 48h Stimulation mit TNF α (50 ng/ml) oder LPS (100 ng/ml) eine signifikante Hochregulierung von GPRC5B gegenüber unstimulierten Zellen. Diese Regulation von GPRC5B bestätigte sich auch auf mRNA-Ebene (qPCR). Des Weiteren zeigten Auswertungen der mRNA nach 24 stündiger mechanischer Belastung durch 18%ige Dehnung eine deutliche Hochregulierung von GPRC5B gegenüber nicht-gedehnten Zellen.

Bei adenoviral vermittelter Überexpression von GPRC5B in kardialen Fibroblasten (20 MOI) wurde ein Anstieg der basalen Transkriptionsrate von TNF α , IL-1 β , IL-6, MCP-1 und von MMP-9 beobachtet. Nach anschließender 24 stündiger Stimulation mit LPS (10 ng/ml) zeigte sich kein signifikanter Unterschied der IL-6 und MCP-1-mRNA-Niveaus im Vergleich zu den mit AdLacZ infizierten Kontrollzellen, die TNF α -, IL-1 β - und MMP-9-Transkriptionen stiegen hingegen signifikant an. Die Überexpression von GPRC5B hatte keinen Einfluss auf die Transkription von Kollagen-1A1 *in vitro*.

Mittels spezifischer siRNA ließ sich in kardialen Fibroblasten ein Knockdown von GPRC5B auf Proteinebene auf 25% des endogenen Expressionsniveaus erreichen. In den Knockdown-Zellen war nach Transfektion mit anschließender 24 stündiger Stimulation mit LPS (10 ng/ml) eine Abnahme von IL-1 β - und von MMP-9-mRNA gegenüber den Kontrollzellen nachweisbar,

während IL-6 und MCP-1 unbeeinflusst blieben. Der Knockdown von GPRC5B hatte einen signifikanten Anstieg von TNF α -mRNA zur Folge.

Des Weiteren wurden im Western Blot die Proteinlysate von ganzen Herzen GPRC5B-überexprimierender Mäuse mit denen von Wildtypen verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass erhöhte GPRC5B-Expression zu signifikanter Anreicherung von MMP-9 und signifikant erniedrigtem Gehalt von Kollagen-1A1 führte.

Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Expression von GPRC5B in kardialen Fibroblasten durch inflammatorische und Stress-induzierte Signalwege erhöht wird. Außerdem konnte demonstriert werden, dass GPRC5B die Transkription von inflammatorischen Zytokinen moduliert (TNF α , IL-1 β , IL-6, MCP-1) und in den Stoffwechsel der kardialen Extrazellulärmatrix eingreift (MMP-9, Kollagen-1A1). Insgesamt weisen diese Untersuchungsergebnisse auf eine funktionale Beteiligung des orphan Rezeptor GPRC5B an myokardialen Entzündungsprozessen und dem kardialen Remodeling hin.

7) Summary

The treatment of chronic heart failure remains one of the biggest challenges of modern medicine. Inflammation, cardiac fibrosis and myocardial cell loss as well as hypertrophy of cardiomyocytes are pathophysiologically responsible. These processes lead to cardiac remodeling which strongly impedes with the normal functioning of the heart, preventing the body from receiving adequate oxygenation. Cardiac fibroblasts which represent a large proportion of the cardiac cell population play a major role in the pathogenesis. GPRC5B, a g-protein-coupled orphan receptor, is expressed endogenously in cardiac fibroblasts. It acts pro-inflammatorily in adipocytes and has been shown to be involved in the metabolism of glucose and fats. It has been indicated to use NF κ B-signaling-pathways. The aim of this study was to examine the regulation and function of this receptor in primary rat cardiac fibroblasts and its potential meaning in the pathogenesis of cardiac remodeling.

The expression of the GPRC5B-receptor is regulated through TNF α , LPS and mechanical stress. In freshly isolated neonatal rat cardiac fibroblasts a significant upregulation of GPRC5B was demonstrated through Western Blot after 48 h of stimulation with TNF α (50 ng/ml) or LPS (100 ng/ml). These results were confirmed on mRNA-level (qPCR). Additionally, a significant upregulation of GPRC5B-mRNA was shown in the fibroblasts after 24 h of cyclic 18% stretch.

After GPRC5B-overexpression was established using adenovirus (20 MOI), an increase of the transcription of TNF α , IL-1 β , IL-6, MCP-1 and MMP-9 was observed. Following another 24 h of stimulation with LPS (10 ng/ml), no significant difference in transcription of IL-6 and MCP-1 could be shown, but transcription of TNF α , IL-1 β and MMP-9 increased significantly. Overexpression of GPRC5B did not influence the transcription of Collagen-1A1 *in vitro*. Using specific siRNA, a knockdown of GPRC5B-protein to 25% of endogenous levels was induced. GPRC5B-knockdown led to a significant increase of TNF α - and decrease of IL-1 β - and MMP-9-transcription after 24h of LPS-stimulation (10 ng/ml), while IL-6- and MCP-1-mRNA-levels remained unaffected. Furthermore, whole heart-lysates of GPRC5B-overexpressing mice were compared to wildtypes. This showed that increased GPRC5B-expression leads to increased MMP-9- and decreased Collagen-1A1-protein-levels.

This study showed for the first time that GPRC5B-expression in cardiac fibroblasts is increased by inflammatory and stress-induced signaling. Besides, it demonstrated that GPRC5B modulates the transcription of inflammatory cytokines (TNF α , IL-1 β , IL-6, MCP-1) and proteins of the cardiac extracellular matrix (MMP-9, Collagen-1A1). All in all, the results

support a functional involvement of GPRC5B in fibroblast-driven myocardial inflammation and cardiac remodeling.

8) Literaturverzeichnis

1. Cohn, J.N., R. Ferrari, and N. Sharpe, *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, 2000. **35**(3): p. 569-82.
2. Nian, M., et al., *Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling*. Circ Res, 2004. **94**(12): p. 1543-53.
3. Swynghedauw, B., *Molecular mechanisms of myocardial remodeling*. Physiol Rev, 1999. **79**(1): p. 215-62.
4. Goldberg, L.R., *In the clinic. Heart failure*. Ann Intern Med, 2010. **152**(11): p. ITC61-15; quiz ITC616.
5. Atlas Writing, G., et al., *European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2017*. Eur Heart J, 2018. **39**(7): p. 508-579.
6. Benjamin, E.J., et al., *Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association*. Circulation, 2017. **135**(10): p. e146-e603.
7. Liu, L. and H.J. Eisen, *Epidemiology of heart failure and scope of the problem*. Cardiol Clin, 2014. **32**(1): p. 1-8, vii.
8. Azevedo, P.S., et al., *Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment*. Arq Bras Cardiol, 2016. **106**(1): p. 62-9.
9. Chatterjee, K. and B. Massie, *Systolic and diastolic heart failure: differences and similarities*. J Card Fail, 2007. **13**(7): p. 569-76.
10. Aziz, F., et al., *Diastolic heart failure: a concise review*. J Clin Med Res, 2013. **5**(5): p. 327-34.
11. Cregler, L.L., D. Georgiou, and I. Sosa, *Left ventricular diastolic dysfunction in patients with congestive heart failure*. J Natl Med Assoc, 1991. **83**(1): p. 49-52.
12. Bonow, R.O. and J.E. Udelson, *Left ventricular diastolic dysfunction as a cause of congestive heart failure. Mechanisms and management*. Ann Intern Med, 1992. **117**(6): p. 502-10.
13. Liu, J.E., et al., *The impact of diabetes on left ventricular filling pattern in normotensive and hypertensive adults: the Strong Heart Study*. J Am Coll Cardiol, 2001. **37**(7): p. 1943-9.
14. Kasznicki, J. and J. Drzewoski, *Heart failure in the diabetic population – pathophysiology, diagnosis and management*. Archives of Medical Science : AMS, 2014. **10**(3): p. 546-556.
15. Aurigemma, G.P., M.R. Zile, and W.H. Gaasch, *Contractile behavior of the left ventricle in diastolic heart failure: with emphasis on regional systolic function*. Circulation, 2006. **113**(2): p. 296-304.
16. Burchfield, J.S., M. Xie, and J.A. Hill, *Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2*. Circulation, 2013. **128**(4): p. 388-400.
17. Schirone, L., et al., *A Review of the Molecular Mechanisms Underlying the Development and Progression of Cardiac Remodeling*. Oxid Med Cell Longev, 2017. **2017**: p. 3920195.
18. Dorn, G.W., 2nd, *The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy*. Hypertension, 2007. **49**(5): p. 962-70.
19. Opie, L.H., et al., *Controversies in ventricular remodelling*. Lancet, 2006. **367**(9507): p. 356-67.
20. Hill, J.A. and E.N. Olson, *Cardiac plasticity*. N Engl J Med, 2008. **358**(13): p. 1370-80.

21. Whelan, R.S., V. Kaplinskiy, and R.N. Kitsis, *Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance*. *Annu Rev Physiol*, 2010. **72**: p. 19-44.
22. Zhe-Wei, S., G. Li-Sha, and L. Yue-Chun, *The Role of Necroptosis in Cardiovascular Disease*. *Frontiers in Pharmacology*, 2018. **9**: p. 721.
23. Mudd, J.O. and D.A. Kass, *Tackling heart failure in the twenty-first century*. *Nature*, 2008. **451**(7181): p. 919-28.
24. Olivetti, G., et al., *Apoptosis in the failing human heart*. *N Engl J Med*, 1997. **336**(16): p. 1131-41.
25. Wencker, D., et al., *A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure*. *Journal of Clinical Investigation*, 2003. **111**(10): p. 1497-1504.
26. Diwan, A., et al., *Inhibition of ischemic cardiomyocyte apoptosis through targeted ablation of Bnip3 restrains postinfarction remodeling in mice*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(10): p. 2825-33.
27. Guerra, S., et al., *Myocyte death in the failing human heart is gender dependent*. *Circ Res*, 1999. **85**(9): p. 856-66.
28. Harvey, P.A. and L.A. Leinwand, *The cell biology of disease: cellular mechanisms of cardiomyopathy*. *J Cell Biol*, 2011. **194**(3): p. 355-65.
29. Sadoshima, J. and S. Izumo, *Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism*. *EMBO J*, 1993. **12**(4): p. 1681-92.
30. Matsui, T., et al., *Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(25): p. 22896-901.
31. Backs, J. and E.N. Olson, *Control of cardiac growth by histone acetylation/deacetylation*. *Circ Res*, 2006. **98**(1): p. 15-24.
32. Dassanayaka, S. and S.P. Jones, *Recent Developments in Heart Failure*. *Circ Res*, 2015. **117**(7): p. e58-63.
33. Pellman, J., J. Zhang, and F. Sheikh, *Myocyte-fibroblast communication in cardiac fibrosis and arrhythmias: Mechanisms and model systems*. *J Mol Cell Cardiol*, 2016. **94**: p. 22-31.
34. Kuwahara, F., et al., *Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats*. *Circulation*, 2002. **106**(1): p. 130-5.
35. Sarkar, S., et al., *Influence of cytokines and growth factors in ANG II-mediated collagen upregulation by fibroblasts in rats: role of myocytes*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. **287**(1): p. H107-17.
36. Matsui, H., et al., *Leukemia inhibitory factor induces a hypertrophic response mediated by gp130 in murine cardiac myocytes*. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 1996. **93**(2): p. 149-62.
37. Sanada, S., et al., *IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(6): p. 1538-49.
38. Rohr, S., *Arrhythmogenic implications of fibroblast-myocyte interactions*. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2012. **5**(2): p. 442-52.
39. Chen, C., et al., *Integrins and integrin-related proteins in cardiac fibrosis*. *J Mol Cell Cardiol*, 2016. **93**: p. 162-74.
40. Israeli-Rosenberg, S., et al., *Integrins and integrin-associated proteins in the cardiac myocyte*. *Circ Res*, 2014. **114**(3): p. 572-586.
41. Nichol, J.W., et al., *Co-culture induces alignment in engineered cardiac constructs via MMP-2 expression*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **373**(3): p. 360-5.

42. Spinale, F.G., et al., *Matrix metalloproteinase inhibition during the development of congestive heart failure : effects on left ventricular dimensions and function*. *Circ Res*, 1999. **85**(4): p. 364-76.
43. He, K., et al., *Long-distance intercellular connectivity between cardiomyocytes and cardiofibroblasts mediated by membrane nanotubes*. *Cardiovasc Res*, 2011. **92**(1): p. 39-47.
44. Rook, M.B., H.J. Jongsma, and B. de Jonge, *Single channel currents of homo- and heterologous gap junctions between cardiac fibroblasts and myocytes*. *Pflugers Arch*, 1989. **414**(1): p. 95-8.
45. Kamkin, A., et al., *Electrical interaction of mechanosensitive fibroblasts and myocytes in the heart*. *Basic Res Cardiol*, 2005. **100**(4): p. 337-45.
46. Chang, H.Y., et al., *Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(20): p. 12877-82.
47. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. Thieme, 2012, 4. Auflage: p. 122.
48. Travers, J.G., et al., *Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens*. *Circ Res*, 2016. **118**(6): p. 1021-40.
49. Souders, C.A., S.L. Bowers, and T.A. Baudino, *Cardiac fibroblast: the renaissance cell*. *Circ Res*, 2009. **105**(12): p. 1164-76.
50. Banerjee, I., et al., *Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. **293**(3): p. H1883-91.
51. Pinto, A.R., et al., *Revisiting Cardiac Cellular Composition*. *Circulation research*, 2016. **118**(3): p. 400-409.
52. Walker, G.A., et al., *Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor-beta: implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease*. *Circ Res*, 2004. **95**(3): p. 253-60.
53. Kaden, J.J., et al., *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*, 2005. **16**(5): p. 869-72.
54. Tamaoki, M., et al., *Tenascin-C regulates recruitment of myofibroblasts during tissue repair after myocardial injury*. *Am J Pathol*, 2005. **167**(1): p. 71-80.
55. Serini, G., et al., *The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1*. *J Cell Biol*, 1998. **142**(3): p. 873-81.
56. Sutton, M.G. and N. Sharpe, *Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy*. *Circulation*, 2000. **101**(25): p. 2981-8.
57. Adler, K.B., et al., *Contractile cells in normal and fibrotic lung*. *Lab Invest*, 1989. **60**(4): p. 473-85.
58. Powell, D.W., et al., *Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(1 Pt 1): p. C1-9.
59. Bujak, M. and N.G. Frangogiannis, *The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling*. *Cardiovasc Res*, 2007. **74**(2): p. 184-95.
60. Bujak, M., et al., *Essential role of Smad3 in infarct healing and in the pathogenesis of cardiac remodeling*. *Circulation*, 2007. **116**(19): p. 2127-38.
61. Lindner, D., et al., *Cardiac fibroblasts support cardiac inflammation in heart failure*. *Basic Res Cardiol*, 2014. **109**(5): p. 428.
62. Weber, K.T. and C.G. Brilla, *Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system*. *Circulation*, 1991. **83**(6): p. 1849-65.
63. Segura, A.M., O.H. Frazier, and L.M. Buja, *Fibrosis and heart failure*. *Heart Fail Rev*, 2014. **19**(2): p. 173-85.

64. Prabhu, S.D. and N.G. Frangogiannis, *The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis*. *Circ Res*, 2016. **119**(1): p. 91-112.
65. Kandalam, V., et al., *Lack of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 leads to exacerbated left ventricular dysfunction and adverse extracellular matrix remodeling in response to biomechanical stress*. *Circulation*, 2011. **124**(19): p. 2094-105.
66. Kong, P., P. Christia, and N.G. Frangogiannis, *The pathogenesis of cardiac fibrosis*. *Cell Mol Life Sci*, 2014. **71**(4): p. 549-74.
67. Wang, J., et al., *Mechanical force regulation of myofibroblast differentiation in cardiac fibroblasts*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. **285**(5): p. H1871-81.
68. Zeisberg, E.M., et al., *Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis*. *Nat Med*, 2007. **13**(8): p. 952-61.
69. Barouch, L.A., et al., *Cardiac myocyte apoptosis is associated with increased DNA damage and decreased survival in murine models of obesity*. *Circ Res*, 2006. **98**(1): p. 119-24.
70. Serhan, C.N., et al., *Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms*. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2007. **21**(2): p. 325-32.
71. Lee, S.B. and R. Kalluri, *Mechanistic connection between inflammation and fibrosis*. *Kidney Int Suppl*, 2010(119): p. S22-6.
72. Suthahar, N., et al., *From Inflammation to Fibrosis—Molecular and Cellular Mechanisms of Myocardial Tissue Remodelling and Perspectives on Differential Treatment Opportunities*. *Current Heart Failure Reports*, 2017. **14**(4): p. 235-250.
73. Gordon, J.W., J.A. Shaw, and L.A. Kirshenbaum, *Multiple facets of NF-kappaB in the heart: to be or not to NF-kappaB*. *Circ Res*, 2011. **108**(9): p. 1122-32.
74. Frangogiannis, N.G., *Interleukin-1 in cardiac injury, repair, and remodeling: pathophysiologic and translational concepts*. *Discoveries*, 2015. **3**(1): p. e41.
75. Garlanda, C., C.A. Dinarello, and A. Mantovani, *The interleukin-1 family: back to the future*. *Immunity*, 2013. **39**(6): p. 1003-18.
76. Dinarello, C.A., *A clinical perspective of IL-1beta as the gatekeeper of inflammation*. *European journal of immunology*, 2011. **41**(5): p. 1203-17.
77. Dinarello, C.A., *Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases*. *Blood*, 2011. **117**(14): p. 3720-32.
78. Long, C.S., *The role of interleukin-1 in the failing heart*. *Heart Fail Rev*, 2001. **6**(2): p. 81-94.
79. Turner, N.A., et al., *Mechanism of TNFalpha-induced IL-1alpha, IL-1beta and IL-6 expression in human cardiac fibroblasts: effects of statins and thiazolidinediones*. *Cardiovasc Res*, 2007. **76**(1): p. 81-90.
80. Cogswell, J.P., et al., *NF-kappa B regulates IL-1 beta transcription through a consensus NF-kappa B binding site and a nonconsensus CRE-like site*. *J Immunol*, 1994. **153**(2): p. 712-23.
81. Greten, F.R., et al., *NF-kappaB is a negative regulator of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta*. *Cell*, 2007. **130**(5): p. 918-31.
82. Saxena, A., et al., *IL-1 induces proinflammatory leukocyte infiltration and regulates fibroblast phenotype in the infarcted myocardium*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2013. **191**(9): p. 4838-48.
83. Palmer, J.N., et al., *Interleukin-1 beta induces cardiac myocyte growth but inhibits cardiac fibroblast proliferation in culture*. *J Clin Invest*, 1995. **95**(6): p. 2555-64.

84. Koudssi, F., et al., *Cardiac fibroblasts arrest at the G1/S restriction point in response to interleukin (IL)-1beta. Evidence for IL-1beta-induced hypophosphorylation of the retinoblastoma protein.* J Biol Chem, 1998. **273**(40): p. 25796-803.
85. Piacentini, L., et al., *Endothelin-1 stimulates cardiac fibroblast proliferation through activation of protein kinase C.* J Mol Cell Cardiol, 2000. **32**(4): p. 565-76.
86. Mitchell, M.D., et al., *IL-1beta stimulates rat cardiac fibroblast migration via MAP kinase pathways.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(2): p. H1139-47.
87. Frangogiannis, N.G., *The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling.* Nat Rev Cardiol, 2014. **11**(5): p. 255-65.
88. Siwik, D.A., D.L. Chang, and W.S. Colucci, *Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro.* Circ Res, 2000. **86**(12): p. 1259-65.
89. Xie, Z., M. Singh, and K. Singh, *Differential regulation of matrix metalloproteinase-2 and -9 expression and activity in adult rat cardiac fibroblasts in response to interleukin-1beta.* J Biol Chem, 2004. **279**(38): p. 39513-9.
90. Bujak, M., et al., *Interleukin-1 receptor type 1 signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling.* The American journal of pathology, 2008. **173**(1): p. 57-67.
91. Murtuza, B., et al., *Transplantation of skeletal myoblasts secreting an IL-1 inhibitor modulates adverse remodeling in infarcted murine myocardium.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(12): p. 4216-21.
92. Turner, N.A., et al., *Simvastatin inhibits TNFalpha-induced invasion of human cardiac myofibroblasts via both MMP-9-dependent and -independent mechanisms.* J Mol Cell Cardiol, 2007. **43**(2): p. 168-76.
93. Sano, M., et al., *ERK and p38 MAPK, but not NF-kappaB, are critically involved in reactive oxygen species-mediated induction of IL-6 by angiotensin II in cardiac fibroblasts.* Circ Res, 2001. **89**(8): p. 661-9.
94. Heineke, J. and J.D. Molkentin, *Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(8): p. 589-600.
95. Fischer, P. and D. Hilfiker-Kleiner, *Role of gp130-mediated signalling pathways in the heart and its impact on potential therapeutic aspects.* Br J Pharmacol, 2008. **153 Suppl 1**: p. S414-27.
96. Fielding, C.A., et al., *Interleukin-6 signaling drives fibrosis in unresolved inflammation.* Immunity, 2014. **40**(1): p. 40-50.
97. Chou, C.H., et al., *IL-6 trans-signalling contributes to aldosterone-induced cardiac fibrosis.* Cardiovasc Res, 2018. **114**(5): p. 690-702.
98. Fuchs, M., et al., *Role of interleukin-6 for LV remodeling and survival after experimental myocardial infarction.* FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2003. **17**(14): p. 2118-20.
99. Ohtsuka, T., et al., *Relation of circulating interleukin-6 to left ventricular remodeling in patients with reperfused anterior myocardial infarction.* Clinical cardiology, 2004. **27**(7): p. 417-20.
100. Feldmann, M., et al., *TNF alpha is an effective therapeutic target for rheumatoid arthritis.* Ann N Y Acad Sci, 1995. **766**: p. 272-8.
101. Kollias, G., et al., *On the role of tumor necrosis factor and receptors in models of multiorgan failure, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease.* Immunol Rev, 1999. **169**: p. 175-94.

102. Kleemann, R., S. Zadelaar, and T. Kooistra, *Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice*. Cardiovascular research, 2008. **79**(3): p. 360-76.
103. Parameswaran, N. and S. Patial, *Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages*. Critical reviews in eukaryotic gene expression, 2010. **20**(2): p. 87-103.
104. Hamid, T., et al., *Divergent tumor necrosis factor receptor-related remodeling responses in heart failure: role of nuclear factor- κ B and inflammatory activation*. Circulation, 2009. **119**(10): p. 1386-97.
105. Bozkurt, B., et al., *Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor- α promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats*. Circulation, 1998. **97**(14): p. 1382-91.
106. Sun, M., et al., *Tumor necrosis factor- α mediates cardiac remodeling and ventricular dysfunction after pressure overload state*. Circulation, 2007. **115**(11): p. 1398-407.
107. Kurrelmeyer, K.M., et al., *Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5456-61.
108. Deshmane, S.L., et al., *Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview*. Journal of Interferon & Cytokine Research, 2009. **29**(6): p. 313-326.
109. Brown, Z., et al., *IL-1 receptor antagonist inhibits monocyte chemotactic peptide 1 generation by human mesangial cells*. Kidney Int, 1992. **42**(1): p. 95-101.
110. Standiford, T.J., et al., *Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells*. J Biol Chem, 1991. **266**(15): p. 9912-8.
111. Cushing, S.D., et al., *Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(13): p. 5134-8.
112. Chensue, S.W., et al., *Monocyte chemotactic protein expression during schistosome egg granuloma formation. Sequence of production, localization, contribution, and regulation*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 130-8.
113. Karpus, W.J., et al., *Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production*. J Immunol, 1997. **158**(9): p. 4129-36.
114. Handel, T.M. and P.J. Dommelle, *Heteronuclear (1H , ^{13}C , ^{15}N) NMR assignments and solution structure of the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) dimer*. Biochemistry, 1996. **35**(21): p. 6569-84.
115. Matsushima, K., et al., *Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line*. J Exp Med, 1989. **169**(4): p. 1485-90.
116. Hayashidani, S., et al., *Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction*. Circulation, 2003. **108**(17): p. 2134-40.
117. Szalai, C., et al., *Involvement of polymorphisms in the chemokine system in the susceptibility for coronary artery disease (CAD). Coincidence of elevated Lp(a) and MCP-1 -2518 G/G genotype in CAD patients*. Atherosclerosis, 2001. **158**(1): p. 233-9.
118. Arendt, B.K., et al., *Interleukin 6 induces monocyte chemoattractant protein-1 expression in myeloma cells*. Leukemia, 2002. **16**(10): p. 2142-7.
119. Skalniak, L., et al., *Regulatory feedback loop between NF- κ B and MCP-1-induced protein 1 RNase*. Febs j, 2009. **276**(20): p. 5892-905.
120. Rovin, B.H., et al., *Activation of nuclear factor- κ B correlates with MCP-1 expression by human mesangial cells*. Kidney Int, 1995. **48**(4): p. 1263-71.

121. Mezzaroma, E., et al., *The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(49): p. 19725-19730.
122. Lu, Y.C., W.C. Yeh, and P.S. Ohashi, *LPS/TLR4 signal transduction pathway*. Cytokine, 2008. **42**(2): p. 145-151.
123. Kurt-Jones, E.A., et al., *Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus*. Nat Immunol, 2000. **1**(5): p. 398-401.
124. Rassa, J.C., et al., *Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(4): p. 2281-6.
125. Ohashi, K., et al., *Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex*. J Immunol, 2000. **164**(2): p. 558-61.
126. Kawai, T., et al., *Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin*. Immunity, 1999. **11**(1): p. 115-22.
127. Adachi, O., et al., *Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function*. Immunity, 1998. **9**(1): p. 143-50.
128. Kawai, T., et al., *Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes*. J Immunol, 2001. **167**(10): p. 5887-94.
129. Yang, Y., et al., *The emerging role of Toll-like receptor 4 in myocardial inflammation*. Cell Death & Disease, 2016. **7**(5): p. e2234.
130. Riad, A., et al., *Toll-like receptor-4 modulates survival by induction of left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice*. J Immunol, 2008. **180**(10): p. 6954-61.
131. Timmers, L., et al., *Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction*. Circ Res, 2008. **102**(2): p. 257-64.
132. Christia, P., et al., *Systematic characterization of myocardial inflammation, repair, and remodeling in a mouse model of reperfused myocardial infarction*. J Histochem Cytochem, 2013. **61**(8): p. 555-70.
133. Dobaczewski, M., et al., *Smad3 signaling critically regulates fibroblast phenotype and function in healing myocardial infarction*. Circ Res, 2010. **107**(3): p. 418-28.
134. Frangogiannis, N.G., *Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease*. Physiol Rev, 2012. **92**(2): p. 635-88.
135. Frangogiannis, N.G., et al., *Critical role of endogenous thrombospondin-1 in preventing expansion of healing myocardial infarcts*. Circulation, 2005. **111**(22): p. 2935-42.
136. Eghbali, M., et al., *Cardiac fibroblasts are predisposed to convert into myocyte phenotype: specific effect of transforming growth factor beta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(3): p. 795-9.
137. Heimer, R., et al., *TGF-beta modulates the synthesis of proteoglycans by myocardial fibroblasts in culture*. J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(10): p. 2191-8.
138. Villarreal, F.J., et al., *Adenovirus-mediated overexpression of human transforming growth factor-beta 1 in rat cardiac fibroblasts, myocytes and smooth muscle cells*. J Mol Cell Cardiol, 1996. **28**(4): p. 735-42.
139. Dobaczewski, M., C. Gonzalez-Quesada, and N.G. Frangogiannis, *The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **48**(3): p. 504-11.
140. Leask, A., *TGFbeta, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response*. Cardiovasc Res, 2007. **74**(2): p. 207-12.
141. Masur, S.K., et al., *Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(9): p. 4219-23.

142. Drobic, V., et al., *Differential and combined effects of cardiotrophin-1 and TGF-beta1 on cardiac myofibroblast proliferation and contraction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(2): p. H1053-64.
143. Sigel, A.V., M. Centrella, and M. Eghbali-Webb, *Regulation of proliferative response of cardiac fibroblasts by transforming growth factor-beta 1*. J Mol Cell Cardiol, 1996. **28**(9): p. 1921-9.
144. Squires, C.E., et al., *Altered fibroblast function following myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol, 2005. **39**(4): p. 699-707.
145. Brown, R.D., et al., *The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005. **45**: p. 657-87.
146. Weber, K.T., *Fibrosis in hypertensive heart disease: focus on cardiac fibroblasts*. J Hypertens, 2004. **22**(1): p. 47-50.
147. Raffetto, J.D. and R.A. Khalil, *Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease*. Biochem Pharmacol, 2008. **75**(2): p. 346-59.
148. Visse, R. and H. Nagase, *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry*. Circ Res, 2003. **92**(8): p. 827-39.
149. Frangogiannis, N.G., L.H. Michael, and M.L. Entman, *Myofibroblasts in reperfused myocardial infarcts express the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb)*. Cardiovasc Res, 2000. **48**(1): p. 89-100.
150. Bix, G. and R.V. Iozzo, *Matrix revolutions: "tails" of basement-membrane components with angiostatic functions*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(1): p. 52-60.
151. Hamano, Y., et al., *Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin*. Cancer Cell, 2003. **3**(6): p. 589-601.
152. Chirco, R., et al., *Novel functions of TIMPs in cell signaling*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(1): p. 99-113.
153. Lambert, E., et al., *TIMPs as multifacial proteins*. Crit Rev Oncol Hematol, 2004. **49**(3): p. 187-98.
154. Yamada, E., et al., *TIMP-1 promotes VEGF-induced neovascularization in the retina*. Histol Histopathol, 2001. **16**(1): p. 87-97.
155. Saunders, W.B., et al., *Coregulation of vascular tube stabilization by endothelial cell TIMP-2 and pericyte TIMP-3*. J Cell Biol, 2006. **175**(1): p. 179-91.
156. Gill, S.E. and W.C. Parks, *Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(6-7): p. 1334-47.
157. Manicone, A.M. and J.K. McGuire, *Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation*. Semin Cell Dev Biol, 2008. **19**(1): p. 34-41.
158. Parks, W.C., C.L. Wilson, and Y.S. Lopez-Boado, *Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(8): p. 617-29.
159. Bigg, H.F., et al., *Activity of matrix metalloproteinase-9 against native collagen types I and III*. Febs j, 2007. **274**(5): p. 1246-55.
160. Aimes, R.T. and J.P. Quigley, *Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments*. J Biol Chem, 1995. **270**(11): p. 5872-6.
161. Veidal, S.S., et al., *Matrix metalloproteinase-9-mediated type III collagen degradation as a novel serological biochemical marker for liver fibrogenesis*. Liver Int, 2010. **30**(9): p. 1293-304.

162. Konttinen, Y.T., et al., *New collagenolytic enzymes/cascade identified at the pannus-hard tissue junction in rheumatoid arthritis: destruction from above*. Matrix Biol, 1998. **17**(8-9): p. 585-601.
163. Van Doren, S.R., *Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin*. Matrix Biol, 2015. **0**: p. 224-231.
164. Kandalam, V., et al., *Early activation of matrix metalloproteinases underlies the exacerbated systolic and diastolic dysfunction in mice lacking TIMP3 following myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **299**(4): p. H1012-23.
165. Kaden, J.J., et al., *Time-dependent changes in the plasma concentration of matrix metalloproteinase 9 after acute myocardial infarction*. Cardiology, 2003. **99**(3): p. 140-4.
166. Bergman, M.R., et al., *Cardiac matrix metalloproteinase-2 expression independently induces marked ventricular remodeling and systolic dysfunction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(4): p. H1847-60.
167. Hayashidani, S., et al., *Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(3): p. H1229-35.
168. Kassiri, Z., et al., *Combination of tumor necrosis factor-alpha ablation and matrix metalloproteinase inhibition prevents heart failure after pressure overload in tissue inhibitor of metalloproteinase-3 knock-out mice*. Circulation research, 2005. **97**(4): p. 380-90.
169. Kassiri, Z., et al., *Simultaneous transforming growth factor beta-tumor necrosis factor activation and cross-talk cause aberrant remodeling response and myocardial fibrosis in Timp3-deficient heart*. The Journal of biological chemistry, 2009. **284**(43): p. 29893-904.
170. Smale, S.T., *Dimer-specific regulatory mechanisms within the NF-kappaB family of transcription factors*. Immunol Rev, 2012. **246**(1): p. 193-204.
171. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Shared principles in NF-kappaB signaling*. Cell, 2008. **132**(3): p. 344-62.
172. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Signaling to NF-kappaB*. Genes Dev, 2004. **18**(18): p. 2195-224.
173. Doyle, S.L. and L.A. O'Neill, *Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(9): p. 1102-13.
174. Lawrence, T., *The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2009. **1**(6): p. a001651.
175. Kumar, A. and A.M. Boriek, *Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2003. **17**(3): p. 386-96.
176. Kumar, A., et al., *Mechanical stretch activates nuclear factor-kappaB, activator protein-1, and mitogen-activated protein kinases in lung parenchyma: implications in asthma*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2003. **17**(13): p. 1800-11.
177. Wei, C., et al., *NF-kappaB mediated miR-26a regulation in cardiac fibrosis*. Journal of cellular physiology, 2013. **228**(7): p. 1433-42.
178. Jackson-Bernitsas, D.G., et al., *Evidence that TNF-TNFR1-TRADD-TRAF2-RIP-TAK1-*IKK* pathway mediates constitutive NF-kappaB activation and proliferation in human head and neck squamous cell carcinoma*. Oncogene, 2007. **26**(10): p. 1385-97.

179. Sakurai, H., et al., *Tumor necrosis factor-alpha-induced IKK phosphorylation of NF-kappaB p65 on serine 536 is mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 signaling pathway*. J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 36916-23.
180. Choi, M.E., Y. Ding, and S.I. Kim, *TGF-beta signaling via TAK1 pathway: Role in kidney fibrosis*. Seminars in nephrology, 2012. **32**(3): p. 244-252.
181. Shirakabe, K., et al., *TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase*. J Biol Chem, 1997. **272**(13): p. 8141-4.
182. Ninomiya-Tsuji, J., et al., *The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway*. Nature, 1999. **398**(6724): p. 252-6.
183. Irie, T., T. Muta, and K. Takeshige, *TAK1 mediates an activation signal from toll-like receptor(s) to nuclear factor-kappaB in lipopolysaccharide-stimulated macrophages*. FEBS Lett, 2000. **467**(2-3): p. 160-4.
184. Bond, M., et al., *Inhibition of transcription factor NF-kappaB reduces matrix metalloproteinase-1, -3 and -9 production by vascular smooth muscle cells*. Cardiovascular research, 2001. **50**(3): p. 556-65.
185. Li, Y.F., et al., *The nuclear factor-kappaB pathway is involved in matrix metalloproteinase-9 expression in RU486-induced endometrium breakdown in mice*. Hum Reprod, 2012. **27**(7): p. 2096-106.
186. Gloriam, D.E., R. Fredriksson, and H.B. Schiöth, *The G protein-coupled receptor subset of the rat genome*. BMC Genomics, 2007. **8**: p. 338.
187. Hauser, A.S., et al., *Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications*. Nat Rev Drug Discov, 2017. **16**(12): p. 829-842.
188. Fredriksson, R., et al., *The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints*. Mol Pharmacol, 2003. **63**(6): p. 1256-72.
189. Lagerstrom, M.C. and H.B. Schiöth, *Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(4): p. 339-57.
190. Brauner-Osborne, H. and P. Krogsgaard-Larsen, *Sequence and expression pattern of a novel human orphan G-protein-coupled receptor, GPRC5B, a family C receptor with a short amino-terminal domain*. Genomics, 2000. **65**(2): p. 121-8.
191. Bjarnadottir, T.K., R. Fredriksson, and H.B. Schiöth, *The gene repertoire and the common evolutionary history of glutamate, pheromone (V2R), taste(1) and other related G protein-coupled receptors*. Gene, 2005. **362**: p. 70-84.
192. Snead, A.N. and P.A. Insel, *Defining the cellular repertoire of GPCRs identifies a profibrotic role for the most highly expressed receptor, protease-activated receptor 1, in cardiac fibroblasts*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2012. **26**(11): p. 4540-4547.
193. Cheng, Y. and R. Lotan, *Molecular cloning and characterization of a novel retinoic acid-inducible gene that encodes a putative G protein-coupled receptor*. J Biol Chem, 1998. **273**(52): p. 35008-15.
194. Robbins, M.J., et al., *Molecular cloning and characterization of two novel retinoic acid-inducible orphan G-protein-coupled receptors (GPRC5B and GPRC5C)*. Genomics, 2000. **67**(1): p. 8-18.
195. Kim, Y.J., et al., *GPRC5B activates obesity-associated inflammatory signaling in adipocytes*. Sci Signal, 2012. **5**(251): p. ra85.
196. Kohyama-Koganeya, A., et al., *A Drosophila orphan G protein-coupled receptor BOSS functions as a glucose-responding receptor: loss of boss causes abnormal energy metabolism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(40): p. 15328-33.

197. Speliotes, E.K., et al., *Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index*. Nat Genet, 2010. **42**(11): p. 937-48.
198. Kim, Y.J. and Y. Hirabayashi, *Caveolin-1 prevents palmitate-induced NF-kappaB signaling by inhibiting GPRC5B-phosphorylation*. Biochem Biophys Res Commun, 2018.
199. Atanes, P., et al., *Identifying Signalling Pathways Regulated by GPRC5B in beta-Cells by CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing*. Cell Physiol Biochem, 2018. **45**(2): p. 656-666.
200. Kovesdi, I. and S.J. Hedley, *Adenoviral producer cells*. Viruses, 2010. **2**(8): p. 1681-1703.
201. Iwaki, K., et al., *Alpha- and beta-adrenergic stimulation induces distinct patterns of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells. fos/jun expression is associated with sarcomere assembly; Egr-1 induction is primarily an alpha 1-mediated response*. J Biol Chem, 1990. **265**(23): p. 13809-17.
202. Suzuki, M.T., L.T. Taylor, and E.F. DeLong, *Quantitative Analysis of Small-Subunit rRNA Genes in Mixed Microbial Populations via 5'-Nuclease Assays*. Applied and Environmental Microbiology, 2000. **66**(11): p. 4605-4614.
203. Frank, J.A., et al., *Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes*. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(8): p. 2461-70.
204. Camelliti, P., T.K. Borg, and P. Kohl, *Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts*. Cardiovasc Res, 2005. **65**(1): p. 40-51.
205. Swaney, J.S., et al., *Inhibition of cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis by activation and overexpression of adenylyl cyclase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(2): p. 437-42.
206. Goldsmith, E.C., et al., *Organization of fibroblasts in the heart*. Dev Dyn, 2004. **230**(4): p. 787-94.
207. Tomasek, J.J., et al., *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(5): p. 349-63.
208. Rohr, S., *Cardiac fibroblasts in cell culture systems: myofibroblasts all along?* J Cardiovasc Pharmacol, 2011. **57**(4): p. 389-99.
209. Hohenhaus, D.M., et al., *An mRNA atlas of G protein-coupled receptor expression during primary human monocyte/macrophage differentiation and lipopolysaccharide-mediated activation identifies targetable candidate regulators of inflammation*. Immunobiology, 2013. **218**(11): p. 1345-53.
210. Palsson-McDermott, E.M. and L.A. O'Neill, *Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4*. Immunology, 2004. **113**(2): p. 153-62.
211. Chow, J.C., et al., *Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction*. J Biol Chem, 1999. **274**(16): p. 10689-92.
212. Leychenko, A., et al., *Stretch-induced hypertrophy activates NFkB-mediated VEGF secretion in adult cardiomyocytes*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e29055.
213. Amma, H., et al., *Involvement of reactive oxygen species in cyclic stretch-induced NF-kappaB activation in human fibroblast cells*. Br J Pharmacol, 2005. **145**(3): p. 364-73.
214. Watkin, R.W., et al., *Pro-inflammatory cytokines IL6, TNF-alpha, IL1beta, procalcitonin, lipopolysaccharide binding protein and C-reactive protein in infective endocarditis*. J Infect, 2007. **55**(3): p. 220-5.
215. Guimbaud, R., et al., *Network of inflammatory cytokines and correlation with disease activity in ulcerative colitis*. Am J Gastroenterol, 1998. **93**(12): p. 2397-404.
216. Chevrel, G., C. Granet, and P. Miossec, *Contribution of tumour necrosis factor alpha and interleukin (IL) 1beta to IL6 production, NF-kB nuclear translocation, and class I MHC*

- expression in muscle cells: in vitro regulation with specific cytokine inhibitors. Annals of the Rheumatic Diseases, 2005. 64(9): p. 1257-1262.*
217. Panzer, S., M. Madden, and K. Matsuki, *Interaction of IL-1 beta, IL-6 and tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in human T cells activated by murine antigens. Clinical and Experimental Immunology, 1993. 93(3): p. 471-478.*
 218. Seifert, R. and K. Wenzel-Seifert, *Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2002. 366(5): p. 381-416.*
 219. Bond, R.A. and A.P. Ijzerman, *Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery. Trends Pharmacol Sci, 2006. 27(2): p. 92-6.*
 220. Costa, T. and A. Herz, *Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. 86(19): p. 7321-5.*
 221. Shebl, F.M., et al., *Comparison of mRNA and protein measures of cytokines following vaccination with HPV-16 L1 virus like particles. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 2010. 19(4): p. 978-981.*
 222. Reinhardt, D., et al., *Cardiac remodelling in end stage heart failure: upregulation of matrix metalloproteinase (MMP) irrespective of the underlying disease, and evidence for a direct inhibitory effect of ACE inhibitors on MMP. Heart, 2002. 88(5): p. 525-30.*
 223. Radosinska, J., M. Barancik, and N. Vrbjar, *Heart failure and role of circulating MMP-2 and MMP-9. Panminerva Med, 2017. 59(3): p. 241-253.*
 224. Vellaichamy, E., et al., *Involvement of the NF-kappa B/matrix metalloproteinase pathway in cardiac fibrosis of mice lacking guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor A. J Biol Chem, 2005. 280(19): p. 19230-42.*
 225. Lin, M.L., et al., *Down-regulation of MMP-2 through the p38 MAPK-NF-kappaB-dependent pathway by aloe-emodin leads to inhibition of nasopharyngeal carcinoma cell invasion. Mol Carcinog, 2010. 49(9): p. 783-97.*
 226. Ieda, M., et al., *Cardiac fibroblasts regulate myocardial proliferation through beta1 integrin signaling. Dev Cell, 2009. 16(2): p. 233-44.*
 227. Kuznetsov, V., et al., *Beta 2-adrenergic receptor actions in neonatal and adult rat ventricular myocytes. Circ Res, 1995. 76(1): p. 40-52.*
 228. Borg, T.K., *Development of the connective tissue network in the neonatal hamster heart. Am J Anat, 1982. 165(4): p. 435-43.*
 229. Borg, T.K., et al., *Structural basis of ventricular stiffness. Lab Invest, 1981. 44(1): p. 49-54.*
 230. Banerjee, I., et al., *Dynamic interactions between myocytes, fibroblasts, and extracellular matrix. Ann N Y Acad Sci, 2006. 1080: p. 76-84.*
 231. Rippe, R.A., et al., *NF-kappaB inhibits expression of the alpha1(I) collagen gene. DNA Cell Biol, 1999. 18(10): p. 751-61.*
 232. Hozhabri, N.S.T., H. Kim, and V. Varanasi, *NF-kB inhibitor MG132 enhances differentiation and collagen expression of dental pulp stem cells (732.1). The FASEB Journal, 2014. 28(1_supplement): p. 732.1.*
 233. Grande, R., et al., *NF-kB mediated down-regulation of collagen synthesis upon HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate) treatment of primary human gingival fibroblast/Streptococcus mutans co-cultured cells. Clinical Oral Investigations, 2015. 19(4): p. 841-849.*
 234. Wei, S., et al., *Left and right ventricular collagen type I/III ratios and remodeling post-myocardial infarction. J Card Fail, 1999. 5(2): p. 117-26.*

235. Engel, D., et al., *Cardiac myocyte apoptosis provokes adverse cardiac remodeling in transgenic mice with targeted TNF overexpression*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(3): p. H1303-11.
236. van Empel, V.P., et al., *Myocyte apoptosis in heart failure*. Cardiovasc Res, 2005. **67**(1): p. 21-9.
237. Haudek, S.B., et al., *TNF provokes cardiomyocyte apoptosis and cardiac remodeling through activation of multiple cell death pathways*. J Clin Invest, 2007. **117**(9): p. 2692-701.
238. Li, J. and J. Yuan, *Caspases in apoptosis and beyond*. Oncogene, 2008. **27**: p. 6194.
239. Liu, Q., et al., *Interaction between NFkappaB and NFAT coordinates cardiac hypertrophy and pathological remodeling*. Circ Res, 2012. **110**(8): p. 1077-86.
240. Molkenin, J.D., *Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs*. Cardiovasc Res, 2004. **63**(3): p. 467-75.
241. Dirkx, E., P.A. da Costa Martins, and L.J. De Windt, *Regulation of fetal gene expression in heart failure*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2013. **1832**(12): p. 2414-2424.
242. Collier, P., et al., *Getting to the heart of cardiac remodeling; how collagen subtypes may contribute to phenotype*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2012. **52**(1): p. 148-53.
243. Kim, H.E., et al., *Disruption of the myocardial extracellular matrix leads to cardiac dysfunction*. Journal of Clinical Investigation, 2000. **106**(7): p. 857-866.
244. Spinale, F.G., et al., *Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target*. Cardiovascular research, 2000. **46**(2): p. 225-38.
245. Radovan, J., et al., *Changes of collagen metabolism predict the left ventricular remodeling after myocardial infarction*. Mol Cell Biochem, 2006. **293**(1-2): p. 71-8.
246. Janicki, J.S., et al., *Ventricular remodeling in heart failure: the role of myocardial collagen*. Adv Exp Med Biol, 1995. **382**: p. 239-45.
247. Sabbah, H.N., *Apoptotic cell death in heart failure*. Cardiovasc Res, 2000. **45**(3): p. 704-12.
248. Braunwald, E., *Heart failure*. JACC Heart Fail, 2013. **1**(1): p. 1-20.
249. Khilnani, G. and A.K. Khilnani, *Inverse agonism and its therapeutic significance*. Indian journal of pharmacology, 2011. **43**(5): p. 492-501.
250. deAlmeida, A.C., R.J. van Oort, and X.H. Wehrens, *Transverse aortic constriction in mice*. J Vis Exp, 2010(38).
251. Tagawa, H., et al., *Cytoskeletal role in the transition from compensated to decompensated hypertrophy during adult canine left ventricular pressure overloading*. Circ Res, 1998. **82**(7): p. 751-61.
252. Ye, Y., et al., *High-energy phosphate metabolism and creatine kinase in failing hearts: a new porcine model*. Circulation, 2001. **103**(11): p. 1570-6.
253. Houser, S.R., et al., *Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association*. Circ Res, 2012. **111**(1): p. 131-50.

9) Abkürzungen

α SMA	-	<i>alpha smooth muscle actin</i>
ADS	-	Puffer für Isolierung von neonatalen ventrikulären Rattenzellen
AF	-	Alexa Fluor Fluoreszenzmarker
BSA	-	Bovines Serum-Albumin
°C	-	Grad Celsius
cDNA	-	<i>copyDNA</i>
Ctrl	-	Kontrolle
Cav-1	-	Caveolin-1
CF	-	Kardialer Fibroblast
CM	-	Kardiomyozyt
DAMP	-	<i>Damage associated molecular pattern</i>
DEPC	-	Diethylpyrocarbonat
DDR-2	-	<i>Discoidin domain-containing receptor 2</i>
dH ₂ O	-	destilliertes Wasser
DMEM	-	Dulbecco's modifiziertes <i>Eagle</i> Medium
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	-	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	-	Extrazellulärmatrix
FBS	-	Fetales bovines Serum
FCS	-	Fetales Kälberserum
Fyn	-	Tyrosinkinase Fyn
g	-	Gramm
GPCR	-	<i>G-protein-coupled receptor</i>
GPRC5B	-	<i>G-protein-coupled receptor 5B of the family C</i>
h	-	Stunde
HRP	-	<i>horseradish</i> Peroxidase
IF	-	Immunfluoreszenz
ifu	-	Infektiöse Einheiten
I κ B	-	<i>Inhibitor of $\kappa \beta$</i>
IL-1 β	-	Interleukin-1 β
IL-6	-	Interleukin-6

kDa	-	Kilodalton
LacZ	-	β -Galaktosidase kodierendes Gen
L	-	Liter
LPS	-	Lipopolysaccharid
μ	-	mikro
M	-	Molar
MCP-1	-	<i>Monocyte-chemoattractant-protein-1</i>
m	-	milli
min	-	Minute
miRNA	-	micro-Ribonukleinsäure
MMP	-	Matrix-Metalloproteinase
n	-	nano
NaCl	-	Natriumchlorid
NCS	-	Serum neugeborener Kälber
NFAT	-	Nuklearer Faktor aktivierter T-Zellen
NF κ B	-	Nuklearer Faktor ' κ -leicht-Ketten- <i>enhancer</i> ' aktivierter B-Zellen
NRCF	-	Kardiale Fibroblasten neonataler Ratten
NRVCM	-	Kardiale Myozyten neonataler Rattenherzventrikel
PBS	-	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pH	-	negativ dekadischer Logarithmus der Protonen-Konzentration
qRT-PCR	-	quantitative Realtime-Polymerasekettenreaktion
RNA	-	Ribonukleinsäure
rpm	-	Runden per Minute
RT	-	Raumtemperatur
s	-	Sekunde
SDS	-	Natriumdodecylsulfat
SEM	-	Standardfehler
SH2	-	Sarkoma-Homologie 2-Domäne
TAC	-	Transverse aortic Konstriktion
TEMED	-	Tetramethyldiamin
tg	-	Transgen
TGF β	-	<i>Tissue-growth-factor β</i>
TIMP	-	<i>Tissue inhibitor of matrix-metalloproteases</i>
TNF α	-	Tumornekrosefaktor α

TNFR	-	Rezeptor des Tumornekrosefaktor α
TLR	-	Toll-like Rezeptor
UV	-	Ultraviolett
WB	-	Western Blot
wt	-	Wildtyp

10) Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die mich über die Jahre, in denen dieses Werk verfasst wurde, begleitet haben.

An erster Stelle zu nennen ist mein Doktorvater und Mentor Hans-Jörg Hippe, welcher mich stets engagiert bei allen Fragen zur Promotion, zum Studium und zur Welt der Medizin unterstützt hat und auch weiterhin unterstützt. Auch meiner Betreuerin Greta Freundt möchte ich für ihre kontinuierliche Hilfe danken, und dafür, dass sie mir das Arbeiten im Labor beibrachte und dieses Werk Korrektur las. Wertvolle Unterstützung leisteten auch Thorge Nitz und Frederik Stelter aus der AG Hippe, durch welche sogar die mühsamsten Tage im Labor Spaß machen konnten.

Danken möchte ich außerdem Klinikdirektor Professor Norbert Frey dafür, dass diese Arbeit in seinem Labor erstellt werden durfte. Dieser Dank gilt im Besonderen auch den vielen Kollegen und Kolleginnen aus dem Labor, welche mir über die nahezu vier Jahre bei unzähligen Fragen und Problemen weitergeholfen haben. Dazu zählen alle wissenschaftlichen Mitarbeiter*innen, technische Assistent*innen, Kommiliton*innen und Arbeitsgruppenleiter. Eure Geduld und freundschaftliche Kollegialität haben diese Arbeit erst möglich gemacht.

Außerdem möchte ich dem Deutschen Zentrum für Herz-Kreislaufforschung für die finanzielle und sachliche Unterstützung meines Promotionsvorhabens danken.

Ohne die Inspiration und Unterstützung meiner Freunde und Familie wäre dieses Projekt nie gelungen. Wann auch immer es Rückschläge gab, konnte ich mich auf sie verlassen und gleich wieder optimistisch nach vorne schauen. Allen voran gehören dazu natürlich meine Mutter Jani, stets fürsorgenvoll interessiert, mein Vater Georg, immer guten Rat gebend und am Ende Korrektur lesend, und meine Brüder Tilman und Sebastian, sowie meine Lebensgefährtin Ashley. Ebenso empfinde ich gegenüber all meinen Mitbewohnern sowie meinen Sportsfreunden von den Canes II Dankbarkeit. Durch Euch alle gelang es mir immer wieder, abzuschalten und mich zu erholen.

11) Akademischer Lebenslauf

Schule und Studium

- Zensiert für elektronische Veröffentlichung -

Veröffentlichungen und Vorträge

2017 – Vortrag bei der 83. Jahrestagung der DGK in Mannheim; *Der orphan Rezeptor GPRC5B beeinflusst inflammatorische Signalwege in kardialen Fibroblasten.* von Samson-Himmelstjerna F.A., et al., DOI 10.1007/s00392-017-1105-2, <https://www.abstractserver.com/dgk2017/ft/abstracts/V877.htm>

2017 – Poster-Vortrag bei BCVS Scientific Sessions in Portland, OR, USA; *The Orphan Receptor GPRC5B Increases Pro-Inflammatory Signaling in Neonatal Rat Cardiac Fibroblasts and Cardiac MMP-9-expression in vivo.* von Samson-Himmelstjerna F.A., et al., https://professional.heart.org/idc/groups/ahamah-public/@wcm/@sop/@scon/documents/downloadable/ucm_494953.pdf

2019 – von Samson-Himmelstjerna, F.A., et al., *The orphan receptor GPRC5B modulates inflammatory and fibrotic pathways in cardiac fibroblasts and mice hearts.* Biochem Biophysical Res Commun. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.05.038>

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass diese Abhandlung – abgesehen von der Beratung durch den Betreuer – nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist, soweit dies nicht explizit vermerkt ist. Ich erkläre weiterhin, dass Teile dieser Arbeit zur Publikation eingereicht wurden* und dass die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist.

Friedrich Alexander von Samson-Himmelstjerna

Kiel, den 20.05.2019

* von Samson-Himmelstjerna, F.A., et al., *The orphan receptor GPRC5B modulates inflammatory and fibrotic pathways in cardiac fibroblasts and mice hearts*. Biochem Biophysical Res Commun. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.05.038>