

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. Kristina Lorenz

**Kardiotoxizität von CTRPs und das Vorkommen der CTRP-Rezeptoren in
Kardiomyozyten**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Daniela Horn

aus Weiding

Würzburg, April 2023

Referentin:

Prof. Dr. Kristina Lorenz

Korreferent:

Prof. Dr. Harald Wajant

Dekan:

Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.2023

Die Promovendin ist Zahnärztin

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Das metabolische Syndrom	1
1.1.1	Prävalenz und Ätiologie.....	1
1.1.2	Manifestationen und Therapie	2
1.2	CTRPs als potenzielle Therapeutika.....	3
1.2.1	Struktur der Ligandenfamilie <i>C1q/tumor necrosis factor-related proteins</i>	3
1.2.2	Rezeptoren der Ligandenfamilie <i>C1q/tumor necrosis factor-related proteins</i>	4
1.2.3	Wirkung der Ligandenfamilie <i>C1q/tumor necrosis factor-related proteins</i>	6
1.3	Kardiotoxizität.....	10
1.4	Ziele.....	11
2	MATERIAL.....	12
2.1	Tiere	12
2.2	Zellen	12
2.3	Reagenzien für die Zellkultur	12
2.4	Substanzen.....	13
2.5	Geräte	14
2.6	Software.....	15
2.7	Antikörper.....	15
2.8	CTRPs	15
2.9	Primer	16
2.10	Plasmidvektoren	17
2.11	Kits	17
2.12	Verbrauchsmaterialien.....	17

3	METHODEN.....	18
3.1	Zellbiologische Methoden	18
3.1.1	Präparation und Kultivierung neonataler Mauskardiomyozyten und Fibroblasten..	18
3.1.2	Zelllinien	19
3.1.3	Beschichtung mit Poly-D-Lysin und Fibronektin.....	20
3.1.4	Bestimmung der Zellzahl.....	21
3.1.5	Behandlung der Zellen mit CTRPs.....	21
3.1.6	Behandlung von H9c2-Zellen mit CTRPs und Ischämiepuffer.....	22
3.1.7	Transfektion mittels Calciumphosphat-Kopräzipitationsmethode	23
3.2	Qualitativer Nachweis von mRNA.....	24
3.2.1	RNA-Isolation und cDNA-Synthese.....	24
3.2.2	Polymerase-Kettenreaktion	25
3.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	26
3.2.4	<i>Real-Time</i> PCR	27
3.3	Assays zur Bestimmung der Kardiotoxizität	28
3.3.1	ATP-Assay.....	28
3.3.2	Laktat-Assay	29
3.4	Statistik.....	30
4	ERGEBNISSE.....	31
4.1	Auswahl der Zelllinien.....	31
4.1.1	H9c2-Zelllinie	31
4.1.2	AC16-Zelllinie	31
4.2	Auswirkungen der CTRPs auf die Viabilität der Zellen	32
4.2.1	Viabilität von H9c2-Zellen nach CTRP-Behandlung	32
4.2.2	Viabilität von AC16-Zellen nach CTRP-Behandlung.....	38
4.3	Einfluss der CTRPs auf die Laktatkonzentration im Zellmedium	45
4.3.1	Laktatkonzentration nach CTRP-Behandlung von H9c2-Zellen	45
4.3.2	Laktatkonzentration nach CTRP-Behandlung von AC16-Zellen.....	51
4.4	Viabilität und Laktatsekretion von H9c2-Zellen bei zusätzlichem Ischämie stimulus unter CTRP2-Behandlung	58

4.5	Nachweis der mRNA-Expression der Rezeptoren AdipoR1, AdipoR2, BAI3 und RXFP1 in H9c2- und AC16-Zellen	61
4.5.1	Auswahl der Rezeptoren	61
4.5.2	mRNA-Nachweis mittels PCR mit Agarosegelelektrophorese und <i>Real-Time</i> PCR	61
5	DISKUSSION	78
5.1	Viabilität und Laktatsekretion von H9c2-Zellen und AC16-Zellen nach CTRP-Behandlung	78
5.2	CTRP2-Behandlung mit zusätzlichem Ischämiestimulus von H9c2-Zellen.....	81
5.3	Evaluation ATP- und Laktat-Assay	82
5.4	Untersuchung der H9c2-/AC16- und Mauszellen auf die Rezeptoren AdipoR1, AdipoR2, BAI3, RXFP1	83
5.5	Evaluation der Methoden zum mRNA-Nachweis.....	85
5.6	Ausblick.....	87
6	ZUSAMMENFASSUNG	89
7	LITERATURVERZEICHNIS	91

APPENDIX

- I. Abbildungsverzeichnis**
- II. Tabellenverzeichnis**
- III. Abkürzungsverzeichnis**
- IV. Danksagung**
- V. Lebenslauf**

1 Einleitung

1.1 Das metabolische Syndrom

1.1.1 Prävalenz und Ätiologie

„Wohlstandskrankheit, Syndrom X oder tödliches Quartett“ – das metabolische Syndrom hat viele Bezeichnungen (Kaplan, 1989; Reaven, 1988; Schumm-Draeger & Riemann, 2017). Generell versteht man unter Syndrom das gleichzeitige Auftreten verschiedener Symptome (Dudenredaktion, o. J.-b).

Unter dem Begriff „Syndrom X“ fasste Reaven im Jahr 1988 die Krankheiten Insulinresistenz, erhöhten Blutdruck, erhöhte Triglyceride und erniedrigtes HDL-Cholesterin zusammen und stellte einen Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen fest (Lemieux & Després, 2020; Reaven, 1988). Ergänzend zu diesen Symptomen, kam später noch Fettleibigkeit hinzu, sodass das Cluster aus viszeraler Adipositas, Bluthochdruck, Dyslipidämie und verringerte Glukosetoleranz als „tödliches Quartett“ bekannt wurde (Kaplan, 1989).

Vor allem abdominale Fettleibigkeit und Insulinresistenz werden als kausale Faktoren für das metabolische Syndrom vermutet (Alberti et al., 2006; Eckel et al., 2005). Insbesondere der moderne Lebensstil mit einer Kombination aus hochkalorischer Ernährung und Bewegungsmangel begünstigt demnach die Entstehung und führte zu dem Namen „Wohlstandskrankheit“ (Schumm-Draeger & Riemann, 2017). Neben diesen Ursachen spielen auch die genetische Prädisposition, das Alter, Entzündungswerte und hormonelle Störungen eine Rolle (Alberti et al., 2006).

Die Prävalenz des metabolischen Syndroms wird durch soziodemografische und geografische Faktoren, sowie durch verwendete Diagnostikkriterien beeinflusst (Eckel et al., 2005; McCracken et al., 2018). In der Literatur finden sich für die europäische Prävalenz unter *International Diabetes Federation* (IDF)-Kriterien Werte um 41,2 % bei Männern und 37,9 % bei Frauen (Gao, 2008; McCracken et al., 2018). Mit den IDF-Kriterien wurde 2005 eine global anwendbare Definition eingeführt, welche die Hauptsymptome des metabolischen Systems aufgreift (Alberti et al., 2005). Werden neben einem erhöhten BMI ($> 30\text{kg/m}^2$) oder Taillenumfang (Männer $\geq 94\text{ cm}$, Frauen $\geq 80\text{ cm}$) zwei weitere Kriterien erfüllt, liegt ein metabolisches Syndrom nach IDF vor. Unter den weiteren Kriterien finden ein erhöhter Blutdruck (systolisch $\geq 130\text{ mmHg}$, diastolisch $\geq 85\text{ mmHg}$), erhöhte Triglyceride ($> 150\text{ mg/dl}$), sowie erniedrigtes

HDL-Cholesterin (Männer < 40 mg/dl, Frauen < 50 mg/dl) und gesteigerte Nüchtern glukose (100 mg/dl) Berücksichtigung (Alberti et al., 2005; International Diabetes Federation, 2006).

1.1.2 Manifestationen und Therapie

Das metabolische Syndrom hat viele verschiedene Manifestationen. Durch die zunehmende Glukoseintoleranz erhöht sich die Wahrscheinlichkeit an einem Diabetes-Typ-2 zu erkranken, zudem wird ein hoher Wert der Nüchtern glukose mit erhöhten Entzündungswerten und Atherosklerose assoziiert (Grundy et al., 2004). Durch Übergewicht und Insulinresistenz wird das Vorkommen von freien Fettsäuren gesteigert und diese wiederum verstärken die Insulinresistenz, sodass sich ein, sich potenzierender Circulus vitiosus einstellt (Grundy et al., 2004; Müller-Wieland et al., 2017).

Die freien Fettsäuren werden von Zellen aufgenommen. In der Leber führt dies zur ektopen Lipidakkumulation und manifestiert sich schließlich in der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (englisch: *non-alkoholic fatty liver disease*) (NAFLD) (Müller-Wieland et al., 2017).

Übergewicht, Diabetes mellitus, Dyslipidämie und arterielle Hypertonie sind die Hauptursachen atherosklerotischer Veränderungen, welche die Grundlage der koronaren Herzkrankheit darstellen (Fischer-Rasokat et al., 2018). Somit kann sich das metabolische Syndrom auch in einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität und in einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einen Myokardinfarkt zu erleiden, manifestieren (Isomaa et al., 2001).

Das metabolische Syndrom kann sowohl kausal als auch symptomatisch therapiert werden. Die kausale Therapie basiert dabei auf einer Veränderung des Lebensstils. Eine kalorien- und fettreduzierte, gesunde Ernährung kombiniert mit ausreichend Bewegung reduziert Übergewicht, senkt den Blutdruck und verbessert Fett- und Nüchtern glukosewerte des Blutes (Alberti et al., 2006; Castro et al., 2015; Spranger, 2009; Weihe & Weihrauch-Blüher, 2019; Winder & Zyriax, 2016).

Die Symptome können auch medikamentös behandelt werden. So erzielen beispielsweise ACE-Hemmer oder AT1-Rezeptor-Antagonisten eine Blutdrucksenkung, indem sie die Bildung des blutdrucksteigernden Hormons Angiotensin II verhindern und so in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System eingreifen. Auf den Fettstoffwechsel

des Körpers kann man mit Statinen einwirken. Diese hemmen die HMG-CoA-Reduktase und somit das Schlüsselenzym bei der Cholesterinsynthese. Außerdem bewirkt auch Metformin eine Reduktion der Triglyceride im Blut, wird jedoch hauptsächlich zur Behandlung von Diabetes-Typ-2 eingesetzt, da es die Glukoseaufnahme in der Peripherie verbessert und die Gewichtsabnahme positiv beeinflusst (Bellis & Trimarco, 2013; Berufsverband Deutscher Internistinnen und Internisten e.V., 2017).

1.2 CTRPs als potenzielle Therapeutika

Bei Untersuchungen des metabolischen Syndroms zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Ausprägung der Symptome und der Konzentration des Peptidhormons Adiponektin (Achari & Jain, 2017; Eckel et al., 2005). Auf der Basis erster positiver Effekte rückte es weiter in den Fokus der Forschung. Und auch bei den strukturell verwandten Liganden der *C1q/tumor necrosis factor-related proteins* (CTRPs) werden aufgrund der Ähnlichkeit in ihrem Aufbau vergleichbare Wirkungen vermutet.

1.2.1 Struktur der Ligandenfamilie *C1q/tumor necrosis factor-related proteins*

Neben Adiponektin umfasst die Ligandenfamilie der *C1q/tumor necrosis factor-related proteins* weitere 15 Liganden, welche sich in ihrer Struktur ähneln (Appari et al., 2017). Ausgenommen CTRP4, welches zwei C1q-Domänen besitzt (Byerly et al., 2014; Wang, 2017), bestehen alle anderen bisher bekannten CTRPs aus einem N-terminalen Signalpeptid und einer kurzen variablen Domäne, an welche sich die Kollagen- und dann die Trimerisierungsdomäne am C-Terminus anschließen (Schäffler & Buechler, 2012). Letztere ist strukturell sowohl mit der Komplementkomponente C1q, welche eine Schnittstelle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem darstellt (Kishore et al., 2004), als auch mit der TNF-Homologiedomäne (THD) der TNF-Familie verwandt (Jones et al., 1989).

Die CTRPs formen Trimere und sind durch Disulfidbrückenbindungen zwischen den variablen Regionen zusätzlich in der Lage Oligomere zu bilden (Kishore et al., 2004; Wong et al., 2008). Adiponektin kommt neben Trimeren auch in Hexameren und HMW (*high-molecular-mass*)-Oligomeren vor (Tsao et al., 2003). Sowohl das in HEK 293 T-Zellen produzierte als auch das *in vivo* vorkommende CTRP2 liegen als

Trimer vor (Wong et al., 2008). Produzierte CTRP3, CTRP5, CTRP6 und CTRP10 formen sowohl Trimere als auch Oligomere (Wong et al., 2008). CTRP5 bildet *in vivo* vornehmlich Trimere, CTRP3 und CTRP6 eher Oligomere (Wong et al., 2008). Bei manchen Liganden kann dabei sowohl Homo-, als auch Hetero-Oligomerisierung beobachtet werden (Wong et al., 2008).

In der Literatur finden sich Hinweise, dass die Oligomerisierung zu einer veränderten Wirkung der sezernierten Plasmaproteine führen kann. So aktiviert beispielsweise trimeres Adiponektin andere Signalwege als oligomeres (Tsao et al., 2003).

1.2.2 Rezeptoren der Ligandenfamilie *C1q/tumor necrosis factor-related proteins*

Die strukturelle Ähnlichkeit innerhalb der Ligandenfamilie lässt vermuten, dass die Liganden die gleichen Rezeptoren binden können. Jedoch sind die Rezeptoren, über welche die CTRPs wirken, größtenteils noch nicht bekannt. Es wurden unter anderem die Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 für Adiponektin (Fang & Judd, 2018) und CTRP9 (Niemann et al., 2020), der Rezeptor RXFP1 für CTRP8 (Glogowska et al., 2013) und der Rezeptor BAI3 für CTRP10, CTRP11, CTRP13 und CTRP14 identifiziert (Bollinger et al., 2011).

1.2.2.1 *AdipoR1 und AdipoR2*

AdipoR1 und AdipoR2 stellen den Rezeptor für Adiponektin dar. Beide werden ubiquitär exprimiert, wobei die Expression von AdipoR1 im Skelettmuskel erhöht ist und die von AdipoR2 in der Leber (Yamauchi et al., 2003). Sie gehören zu der Familie der *progesterone and adiponectine Q* (PAQR) Rezeptoren (Fang & Judd, 2018). Mit ihrer 7-Transmembranhelix erinnern sie an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, weisen im Gegensatz dazu aber einen intrazellulären N-Terminus und einen extrazellulären C-Terminus auf und sind nicht mit G-Proteinen assoziiert (Tanabe et al., 2015; Tang et al., 2005). Statt den G-Proteinen bindet ein Adapterprotein mit Pleckstrin-Homologiedomäne, Phosphotyrosin-bindender Domäne und Leuzinzipper-Motiv (APPL1), welches unterschiedliche Signalkaskaden initiieren kann und damit auch verschiedene nachgeschaltete Effekte ermöglicht (Mao et al., 2006). Für die kardioprotektive Wirkung, welche durch die Rezeptoren vermittelt wird, ist vor allem die Phosphorylierung der AMP- (Adenosinmonophosphat) abhängigen

Proteinkinase (AMPK) verantwortlich (Goldstein et al., 2009; Russell et al., 2004). Diese reduziert sowohl kardiale Hypertrophie (Liao et al., 2005; Shibata et al., 2004), als auch über eine Hochregulierung der COX-2 (Cyclooxygenase 2) die TNF- α -Ausschüttung bei kardialer Ischämie-Reperfusion (Shibata et al., 2005).

1.2.2.2 *BAI3*

Der BAI3-Rezeptor gehört zu der Familie der Adhäsions-G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und wird vor allem im Gehirn exprimiert (Bollinger et al., 2011; Shiratsuchi et al., 1997). Dem Grundaufbau der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren folgend, gliedert sich der Rezeptor in einen extrazellulären N-Terminus, 7-Transmembranhelices und einen intrazellulären C-Terminus. Extrazellulär findet sich dabei eine CUB-Domäne, vier Thrombospondin Wiederholungen, eine Hormon-bindende-Domäne und die G-Protein-gekoppelte Rezeptoren Proteolysestelle (GPS) (Bollinger et al., 2011; Shiratsuchi et al., 1997). Bollinger et al. konnten zeigen, dass CTRP10, CTRP11, CTRP13 und CTRP14 eine Bindung mit diesem Rezeptor eingehen, indem die C1q-Domäne an die Thrombospondin Typ 1 Wiederholungen bindet (Bollinger et al., 2011).

Ob durch die Bindung eine G-Protein-gekoppelte Signalkaskade aktiviert wird oder die Rezeptoren durch CTRP vermittelte Komplexbildung aktiviert werden, ist noch nicht geklärt (Bollinger et al., 2011). Jedoch konnte als Wirkung der CTRPs eine Reduktion der Synapsendichte bei Neuronen festgestellt werden (Bollinger et al., 2011).

1.2.2.3 *RXFP1*

Der Rezeptor *Relaxin Family Peptide 1* (RXFP1) gehört zu der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Summers et al., 2018). Der Aufbau umfasst typischerweise eine 7-Transmembranhelix, ein intrazelluläres C-terminales Ende und extrazellulär ein N-terminales LDLa-Modul (*low density lipoprotein receptor type A*) und eine LRR-Domäne (*leucin-rich repeats*) (Summers et al., 2018). Der Hauptagonist des Rezeptors ist Relaxin. Dieser zeigte sowohl an Ratten (Bani et al., 1998), als auch an Schweinen einen positiven Effekt auf das Herz bei Ischämie-Reperfusion (Perna et al., 2005). In Rattenkardiomyozyten reduzierte Relaxin sowohl hypertrophe als auch apoptotische Reaktionen (Moore et al., 2007). Eine Reduktion der kardiomyozytären

Apoptoserate, eine Steigerung der Angiogenese und eine verminderte Fibrosierung konnte in Mäusen nachgewiesen werden (Samuel et al., 2011).

Als weiterer Ligand bindet CTRP8 über die N-terminale Region an die LRR-Domäne des Rezeptors (Glogowska et al., 2013). Diese Bindung wurde in Glioblastomen nachgewiesen, wo sie den cAMP-PKA-Signalweg und auch den PI3K-PKC-Signalweg aktiviert. Letzterer steigert die Cathepsin B Expression, welche mit einer verringerten Überlebensrate bei Glioblastomen korreliert (Glogowska et al., 2013). Zudem wird in der Literatur eine durch CTRP8 vermittelte Resistenz gegen Temozolomid, das Standardchemotherapeutikum bei Glioblastomen, beschrieben (Thanasupawat et al., 2018).

1.2.3 Wirkung der Ligandenfamilie *C1q/tumor necrosis factor-related proteins*

Bei den *C1q/tumor necrosis factor-related proteins* handelt es sich um sezernierte Plasmaproteine, welche aufgrund ihres gemeinsamen Grundbauplanes zu einer Ligandenfamilie zusammengefasst werden (Schäffler & Buechler, 2012). Positive Effekte von Adiponektin auf Herz-Kreislauf- und Stoffwechselerkrankungen (Ishikawa et al., 2003; Shibata et al., 2004; Yamauchi et al., 2001) führten zu Untersuchungen weiterer Mitglieder der Ligandenfamilie. Wenngleich sie einer gemeinsamen Gruppe zugeordnet werden, zeigen sich neben Gemeinsamkeiten auch Unterschiede hinsichtlich ihres Vorkommens und ihrer Wirkung (Schäffler & Buechler, 2012).

1.2.3.1 *Adiponektin*

Adiponektin wird hauptsächlich von Adipozyten sezerniert und wirkt als Peptidhormon über die Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 (Achari & Jain, 2017). Die Adiponektinkonzentration korreliert dabei mit Erkrankungen wie Diabetes, Atherosklerose, Adipositas und inflammatorischen Manifestationen (Fang & Judd, 2018). Ein reduzierter Adiponektinwert hat zur Folge, dass unter anderem das Risiko steigt, eine koronare Herzkrankheit zu entwickeln (Kumada et al., 2003) oder einen Herzinfarkt zu erleiden (Pischon et al., 2004). Zusätzlich schützt Adiponektin das Herz vor Hypertrophie (Shibata et al., 2004) und Ischämie-Reperfusionsschäden (Ishikawa et al., 2003; Wang et al., 2010). Über die Wirkung an Makrophagen werden inflammatorische Prozesse reguliert, sodass Leberentzündungen bei NAFLD (Fang & Judd, 2018; Xu et al., 2003) und Atherosklerose reduziert werden (Okamoto et al., 2002). Zudem wirken

sich Adiponektin-induzierte Effekte, wie eine erhöhte NO-Synthese (Chen et al., 2003), die Stimulation zur Bildung neuer Blutgefäße (Ouchi et al., 2004) und die Reduktion von Glukose- und Fettsäurewerten im Blut (Berg et al., 2001) positiv auf die Gefäße aus. Die gestiegene Glukosetoleranz basiert dabei nicht auf einem Insulinstieg, sondern der Steigerung der Insulinsensitivität (Berg et al., 2001). Der Triglyceridgehalt in den Muskeln und in der Leber nimmt ab, während die β -Oxidation im Skelettmuskel gesteigert wird (Yamauchi et al., 2001). Diese, durch Adiponektin induzierten Wirkungen, machen es nachvollziehbar, dass das metabolische Syndrom und vor allem Fettleibigkeit mit einer reduzierten Adiponektinkonzentration einhergehen (Arita et al., 1999).

1.2.3.2 CTRP2

Für murines CTRP2 konnte in Mausmyoblasten der Zelllinie C2C12 eine Aktivierung der AMPK mit darauffolgender Phosphorylierung und somit Inaktivierung der Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) dargestellt werden (Wong et al., 2004). AMPK-Aktivität führt zu einer gesteigerten Glykogenanhäufung (Wong et al., 2004), welche vermutlich auf einer vermehrten Glukoseaufnahme, wie sie bereits bei Kardiomyozyten beobachtet wurde, basiert (Li et al., 2021). Durch die verminderte Malanoyl-CoA-Konzentration, welche sich aus der Inaktivierung der ACC ergibt, wird die Carnitin-Acyltransferase 1 weniger inhibiert und ermöglicht so den Transport langkettiger Fettsäuren in die Mitochondrien, sodass die β -Oxidation gesteigert wird (Wong et al., 2004).

Während eine weitere Studie eine verbesserte Insulintoleranz bei CTRP2-Überexpression feststellte (Peterson et al., 2014), konnte dies in einem CTRP2-*Knockout*-Modell nicht bestätigt werden (Lei & Wong, 2019).

1.2.3.3 CTRP3

Seit der Entdeckung 2001 ist CTRP3 Gegenstand diverser Studien (Maeda et al., 2001). Jüngst wurde in H9c2-Zellen eine schützende Wirkung von CTRP3 bei Ischämie-Reperfusion nachgewiesen. Die reduzierte Apoptoserate der Kardiomyozyten ist dabei auf die Aktivierung des LAMP1/JIP2/JNK-Signalweges zurückzuführen (Song et al., 2022). Diese Erkenntnisse decken sich mit Ergebnissen eines früheren Versuches, in dem bereits kardioprotektive und antiapoptotische Wirkungen beschrieben wurden (Yi et al., 2012). Zudem steigert CTRP3 über den AMPK/PGC-1 α -Signalweg in neuronalen Zellen unter ischämischen Bedingungen und in Kardiomyozyten die Expression

bestimmter Gene in Mitochondrien und treibt dadurch die Biogenese voran (Gao et al., 2020; Zhang et al., 2017). Des Weiteren wurde in diabetischen H9c2-Zellen durch *Knockdown* und Überexpression von CTRP3 neben einer anti-inflammatorischen auch eine, den oxidativen Stress reduzierende, Wirkung über den AMPK α /Akt-Signalweg gezeigt (Ma et al., 2017).

1.2.3.4 CTRP4

CTRP4 stellt eine Ausnahme im strukturellen Aufbau der CTRPs dar und weist auch hinsichtlich seiner Wirkung Inhomogenitäten auf (Wang, 2017). Einerseits konnte bei CTRP4-*Knockout* Mäusen während eines induzierten, endotoxischen Schockzustandes eine erhöhte Konzentration proinflammatorischer Zytokine und somit eine anti-inflammatorische Wirkung von CTRP4 dargestellt werden (Cao et al., 2021). Andererseits konnte in Krebszellen eine Aktivierung inflammatorischer Signalwege durch CTRP4 gezeigt werden (Li et al., 2011).

Während Byerly et al. in einem Versuch eine verringerte Futteraufnahme und Gewichtsverlust bei direkter Verabreichung von CTRP4 in das Gehirn bei Mäusen feststellte (Byerly et al., 2014), beobachteten Wang et al. eine gesteigerte Futteraufnahme bei gleichzeitiger Resistenz gegenüber Hyperglykämie und Fettleibigkeit (Wang, 2017). Dem entsprechend kann eine erhöhte CTRP4-Konzentration das Risiko der Entwicklung eines Typ-2-Diabetes senken (Liu et al., 2021).

1.2.3.5 CTRP9

CTRP9 weist mit 51 % Identität der Aminosäuren die höchste Übereinstimmung mit Adiponektin auf (Li et al., 2021). CTRP9 existiert in zwei Formen (CTRP9A und 9B) (Peterson et al., 2009). Diese sind bezüglich der Aminosäuren zu 98 % identisch, unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer Biochemie und werden von unterschiedlichen Genen kodiert (Peterson et al., 2009).

Ähnlich wie Adiponektin zeigt auch CTRP9 eine AMPK-abhängige, kardioprotektive Wirkung (Kambara et al., 2012; Niemann et al., 2020; Zheng et al., 2011). Bei Ischämie-Reperfusion wurde die Infarktgröße verringert und die Apoptose der Kardiomyozyten reduziert (Kambara et al., 2012). Außerdem führt CTRP9 über AMPK zu einer NO vermittelten Gefäßrelaxation (Zheng et al., 2011). In beiden

Untersuchungen wurden die Effekte auf Interaktion mit AdipoR1 zurückgeführt. Niemann et al. haben diesen Zusammenhang mit AdipoR1 allerdings nur bei gleichzeitigem *Knockdown* mit AdipoR2 feststellen können und vermuteten noch weitere Rezeptorinteraktionen (Niemann et al., 2020). Eine andere Untersuchung konnte ebenfalls positive Effekte bei Ischämie-Reperfusion feststellen, führte die Inhibierung der Apoptose allerdings auf den durch Calreticulin aktivierten PKA/CREB-Signalweg zurück (Zhao et al., 2018).

1.2.3.6 CTRP10

In der Literatur kann man bisher wenig über CTRP10 finden. Entgegen der meisten CTRPs, welche vor allem in Fettgewebe exprimiert werden, wird CTRP10 überwiegend im Auge, in der Plazenta und im Gehirn und in geringen Mengen in den Stromazellen des Fettgewebes und weniger in den Adipozyten exprimiert (Wong et al., 2008). Neben der Bildung von Hexameren und Oligomeren (Wong et al., 2008), kann CTRP10 während der Synthese auch Heteromere mit CTRP13 und CTRP11 formen (Wei et al., 2011; Wei et al., 2013). Zur Wirkung von CTRP10 konnte in der Literatur nur gefunden werden, dass CTRP10 im Kohlenhydratstoffwechsel die Hexokinase hochreguliert (Li et al., 2015).

1.2.3.7 CTRP11

CTRP11 wird sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen vermehrt in Fettgewebe durch die Stromazellen und in Hoden exprimiert (Wei et al., 2013). Wie oben erwähnt bildet CTRP11 mit CTRP10 Heteromere. Auch CTRP13 und CTRP14 ermöglichen eine derartige Fusion während der Synthese (Wei et al., 2013).

An embryonalen Mauszellen konnte beobachtet werden, dass CTRP11 durch die Störung der Mitose die frühe Differenzierung der Adipozyten beeinträchtigt (Wei et al., 2013). Eine andere Studie konnte einen Zusammenhang zwischen CTRP11 und angiogenetischen Wirkungen herausarbeiten, welche mit der Phosphorylierung von ERK1/2 einhergingen (F. Liu et al., 2017).

1.2.3.8 CTRP13

Im Hinblick auf das metabolische Syndrom gibt es diverse positive Effekte von CTRP13. Die durch CTRP13 induzierte Aktivierung des AMPK-Signalweges führt in Adipozyten, Hepatozyten und Myotuben zu einer gesteigerten Glukoseaufnahme über GLUT1 und zu einer verminderten Gluconeogenese in Hepatozyten (Wei et al., 2011). Zudem konnte an Mäusen gezeigt werden, dass CTRP13 die Nahrungsaufnahme reduziert und das Körpergewicht senkt (Byerly et al., 2013).

Auch auf Kardiomyozyten wirkt sich CTRP13 positiv aus. In H9c2-Zellen führt es bei ischämischen Bedingungen und anschließender Reperfusion über den AMPK-Signalweg zu einer Senkung des oxidativen Stresses und der Apoptoserate (Jiang et al., 2021).

1.2.3.9 CTRP14

Für CTRP14 konnten bei der Literaturrecherche nur wenige Daten gewonnen werden, welche das Plasmaprotein näher charakterisieren.

Bisher ist bekannt, dass CTRP14 über BAI3 zur Strukturierung und der Funktion des Gehirns beiträgt (Kakegawa et al., 2015; Sigoillot et al., 2015) und dass ein CTRP14-*Knockout* aufgrund der Expression in der Cochlea zu Hörverlust führt (Qi et al., 2021).

Ebenso wie für CTRP11 konnte auch für CTRP14 eine angiogenetische Wirkung in Endothelzellen dargestellt werden, welche durch die Aktivierung des ERK1/2-Signalweges induziert wird (F. Liu et al., 2017).

1.3 Kardiotoxizität

Spricht man von einer kardiotoxischen Wirkung, so wirkt sich eine Substanz schädigend auf das Herz aus (Dudenredaktion, o. J.-a). In der Literatur bezieht sich dieser Terminus vor allem auf die Kardiotoxizität von Tumortherapeutika. Denn bei diesen tritt sie als zweithäufigste Langzeitnebenwirkung auf (Curigliano et al., 2016). Aber auch andere Substanzen können sich als kardiotoxisch erweisen, sodass eine präklinische Selektion diesbezüglich Zeit und Kosten für weitere Studien erspart. Zwischen 1994 und 2006 wurden 38 Medikamente aufgrund von Hepato- und Kardiotoxizität vom Markt

genommen (Dykens & Will, 2007; Shah, 2006), wodurch letztendlich nicht nur ein finanzieller Schaden entstand, sondern auch Patienten, welche diese Medikamente erhielten, einem Gesundheitsrisiko ausgesetzt wurden.

Bei der Kardiotoxizität lässt sich die funktionale, welche akut die mechanische Funktion beeinträchtigt, von der strukturellen, worunter man eine morphologische Schädigung bis hin zum Viabilitätsverlust der Kardiomyozyten versteht, unterscheiden (Lavery et al., 2011; Pointon et al., 2013).

Besonders die Mitochondrien enthalten verschiedene Mechanismen, an denen Substanzen angreifen können. So können neben der Unterbrechung der mitochondrialen Atmungskette, essenzielle Enzyme blockiert werden, wie beispielsweise die ADP/ATP-Translokase oder welche, die die Replikation der mitochondrialen DNA katalysieren (Varga et al., 2015). Zudem kann das mitochondriale Membranpotential zusammenbrechen und ein Anstieg freier Radikale induziert werden (Varga et al., 2015). Diese Störungen können bis zum Zelltod und schließlich zu kardiovaskulären Dysfunktionen führen (Varga et al., 2015).

1.4 Ziele

Wie vorhergehend ausführlich dargestellt, deuten Daten aus der Literatur daraufhin, dass die Ligandenfamilie *C1q/tumor necrosis factor-related proteins* positive Effekte unter anderem auf den Stoffwechsel und das Herz-Kreislaufsystem besitzt. Während für manche CTRPs bereits Rezeptoren identifiziert werden konnten, ist für andere immer noch nicht geklärt, an welche Rezeptoren sie binden oder über welche sie diese Wirkungen erzielen.

Ziel dieser Arbeit ist die Nutzbarkeit der CTRPs zur Behandlung des metabolischen Syndroms und dessen Manifestationen zu untersuchen. Dafür wurde versucht Zelllinien für Folgestudien zu identifizieren, welche die bisher bekannten Rezeptoren exprimieren. Des Weiteren sollte sowohl eine potenziell kardiotoxische als auch potenziell protektive Wirkung auf Kardiomyozytenzellen untersucht werden. Dies wurde auch unter „Stressbedingungen“ untersucht, genauer unter Ischämie-Reperfusion-Bedingungen, um die Bedingungen für therapeutische Anwendungen zu simulieren.

2 Material

2.1 Tiere

Bezeichnung	Hersteller
Mäuse	ZEMM/Janvier
Ratten	Janvier

2.2 Zellen

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
H9c2	Myoblastische Zellen aus Ratten	Sigma
AC16	Humane Kardiomyozyten-Zelllinie (Fusion humaner kardialer Primärzellen mit Fibroblasten)	Merck
HEK 293 T	Humane embryonale Nierenzellen mit SV40 T-Antigen	Pharmakologie, Würzburg
Neonatale Mauskardiomyozyten (NMCM)	Isolierte Kardiomyozyten aus neonatalen Mäusen	diese Arbeit
Adulte Kardiomyozyten	Isolierte Kardiomyozyten aus adulten Mäusen	diese Arbeit
Fibroblasten	Isolierte kardiale Fibroblasten aus neonatalen Mäusen	diese Arbeit

2.3 Reagenzien für die Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller
Bovines Plasma Fibronectin	Sigma
Bromodesoxyuridin	Sigma
<i>Dublecco's Modified Eagle Medium</i> mit 4,5 g/L D-Glukose, L-Glutamin, Pyruvat	Gibco
<i>Dublecco's Modified Eagle Medium</i> mit 4,5 g/l D-Glukose, Pyruvat, ohne L-Glutamin	Gibco

<i>Dublecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham</i>	Sigma
mit 15 mM HEPES, Natriumbicarbonat, ohne L-Glutamin (DME/F-12)	
<i>Dublecco's's Phosphate Buffered Saline (DPBS)</i>	Gibco
Fetales Kälberserum (FCS)	Anprotec
L-Glutamin Lösung (200mM)	Sigma
<i>Minimum Essential Medium Eagle (MEM Eagle) ohne NaHCO₃</i>	Sigma
NaHCO ₃	Sigma
Penicillin (10 000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	Sigma
Poly-D-Lysin Hydrobromid	MP
Trypanblau	Sigma
Trypsin – EDTA Lösung	Sigma
Vitamin B12	AppliChem

2.4 Substanzen

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	VWR
Antimycin A	Sigma
BES	Sigma
Bromphenolblau	Thermo Scientific
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck
Chloroform	Merck
2-Deoxy-D-Glucose	Sigma
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Applichem
Desoxyribonukleotidtriphosphat (dNTPs)	Invitrogen
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
<i>DNA-Ladder</i> (100 Basenpaar/1 Kilobasenpaar)	BioLabs
<i>DreamTaq</i> DNA-Polymerase	Thermo Scientific
10X <i>DreamTaq</i> Puffer	Thermo Scientific
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
EDTA-Dinatriumsalzdihydrat	Roth
Essigsäure	Sigma
Ethanol	Merck
<i>GelRed</i> 10,000X in Wasser	Biotium

Glycerin	Thermo Scientific
HEPES	Sigma
HCl	Roth
Iodonitrotetrazoliumchlorid	Sigma
Isopropanol	Sigma
KCl	Applichem
Laktatdehydrogenase (LDH)	Sigma
L(+)-Milchsäure	Applichem
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Applichem
Magnesiumchlorid	Merck
NaCl	Applichem
Natriumdithionit	Sigma
Natrium-L-Laktat	Sigma
Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD)	Sigma
Phenazinmethosulfat	Sigma
<i>SsoAdvanced Universal SYBR[®] Green Supermix</i>	Bio-Rad
Triethanolamin	Sigma
TRI <i>Reagent</i> [®]	Sigma
Tris HCL	Merck
Triton-X	Applichem
RNasin [®]	Promega

2.5 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
<i>Biometra Compact M</i>	Analytik Jena
<i>E.A.S.Y[®] Doc plus</i>	Herolab
<i>gentleMACS[™] Octo Dissociator</i>	Miltenyi Biotec
<i>GeneAmp[®] PCR System 9700</i>	Thermo Scientific
<i>NanoDrop[™] 2000c</i>	Thermo Scientific
<i>Synergy neo2 multi-mode reader</i>	BioTek
<i>Thermal Cycler C1000 Touch CFX384</i>	Bio-Rad
Thermomixer 5436	Eppendorf

2.6 Software

Bezeichnung	Hersteller
CFX Maestro Software	Bio-Rad
E.A.S.Y [®] Win	Herolab
Gen5 (Version 3.10)	BioTek
Prism8	GraphPad

2.7 Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller	SKU
Monoklonaler anti-FLAG [®]	Maus	Sigma	F3165-5MG

M2 Antikörper

Verdünnung: 1:1000; 1:2000; 1:4000; 1:8000; 1:16000 (Versuch 3.1.5)
1: 50 (Versuch 3.1.6)

2.8 CTRPs

Die verwendeten CTRPs wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Wajant zur Verfügung gestellt. Es handelte sich dabei um humane CTRPs, welche transient in HEK293-Zellen produziert wurden. Die Liganden wurden mit einer Tenascin-C (TNC) -Domäne und einem Flag-tag versehen. Die TNC-Domäne stabilisiert zusätzlich die Trimerisierung der CTRPs, welche sich natürlicherweise bereits zu Trimeren zusammen lagern. Über den Flag-tag können die CTRPs mittels anti-Flag-Agarose-Affinitätschromatographie und Elution mit Flag-Peptid gereinigt werden, um die Proteine vom Medium und den darin enthaltenen Stoffwechselprodukten zu trennen und zusätzlich die Konzentration der Proteine zu steigern. Zudem kann über den Flag-tag eine sekundäre Quervernetzung der CTRPs mittels Anti-Flag M2 Antikörper erreicht werden. Für die durchgeführten Versuche wurden die CTRPs im Zellkulturüberstand verwendet, CTRP2 zusätzlich in aufgereinigter Form.

Bezeichnung	Konzentration
CTRP 2	20 µg/ml
CTRP 2 (in aufgereinigter Form)	200 µg/ml

CTRP 3	7 µg/ml
CTRP 4	11 µg/ml
CTRP 9A	5,8 µg/ml
CTRP 10	5 µg/ml
CTRP 11	8 µg/ml
CTRP 13	10 µg/ml
CTRP 14	11 µg/ml

2.9 Primer

Bezeichnung	Sequenz
21T Oligo dT-Primer	5`-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3`
Human Adipor1 (<i>forward</i>)	5`-GCCTGCCCGGCTTGTC-3`
Human Adipor1 (<i>reverse</i>)	5`-GGGAAAGGTTGGGGTCTCTC-3`
Human Adipor2 (<i>forward</i>)	5`-TCCCCTCTCTTACAAGCCCA-3`
Human Adipor2 (<i>reverse</i>)	5`-CACCGACCTTCCCATACCTTAC-3`
Human BAI3 (<i>forward</i>)	5`-TGGTCGAGGCCAAAGAACAA-3`
Human BAI3 (<i>reverse</i>)	5`-CCACTCTTGCCACTGTCCAT-3`
Human RXFP1 (<i>forward</i>)	5`-CCTGAAGCCGGGTGTTTTTG-3`
Human RXFP1 (<i>reverse</i>)	5`-GGTAAACGGGTGAGGACGTT-3`
Maus/Ratte Adipor1 (<i>forward</i>)	5`-AGGAGTTCGTGTATAAGGTCTGGG-3`
Maus/Ratte Adipor1 (<i>reverse</i>)	5`-CAGCCAGTCAGGAAGCACATC-3`
Maus/Ratte Adipor2 (<i>forward</i>)	5`-GCAGCCATTATCGTCTCTCAGTG-3`
Maus/Ratte Adipor2 (<i>reverse</i>)	5`-AGCCCACGAACACTCCTGC-3`
Maus BAI3 (<i>forward</i>)	5`-ATATTTGAAGCTGAACCGGGGG-3`
Maus BAI3 (<i>reverse</i>)	5`-CAGCAGGTTACGAACAGCCT-3`
Maus RXFP1 (<i>forward</i>)	5`-AAGAACACTCCCTCCCAACG-3`
Maus RXFP1 (<i>reverse</i>)	5`-GAGACGCTCACGGAGTGAAT-3`
Ratte BAI3 (<i>forward</i>)	5`-CGGGACATACCAAACACAAGC-3`
Ratte BAI3 (<i>reverse</i>)	5`-CCAGCGGCAAATTCAGACAC-3`
Ratte RXFP1 (<i>forward</i>)	5`-GGTCCATTCTTCTTCTGCGTCT-3`
Ratte RXFP1 (<i>reverse</i>)	5`-CTTGGTTCACAGTCGTCC-3`

2.10 Plasmidvektoren

Bezeichnung	Spezies	Referenz
1/256 BAI3-GFP	Mensch	OriGene
1/258 RXFP1-GFP-PS100010	Mensch	OriGene
1/294 ADIPOR1-pCMV6-XL5	Mensch	OriGene
1/295 ADIPOR2-pCMV6-XL4	Mensch	OriGene

2.11 Kits

Bezeichnung	Hersteller
<i>CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay</i>	Promega
<i>Neonatal Heart Dissociation Kit mouse</i>	Miltenyi Biotec
<i>SuperScript[®] Reverse Transcriptase</i>	Invitrogen

2.12 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
<i>gentleMACS Tubes</i>	Miltenyi Biotec
Hartschalen PCR Platten 384-well	Bio-Rad
Lumineszenzplatten cellGrade [™] (96-well, weiß)	BRAND
Polypropylene Tube, konisch	Falcon
Polystyrene Tube, Rundboden	Falcon
<i>SafeSeal/ SurPhob</i> Spitzen steril	Biozym
TC-Platte 96 Well, Standard, F	Sarstedt
TC-Schalen, Standard (60 und 100)	Sarstedt
Tube RNase-frei	Sarstedt

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Präparation und Kultivierung neonataler Mauskardiomyozyten und Fibroblasten

Neonatale Kardiomyozyten wurden aus 1-3 Tage alten Mäusen gewonnen. Dem Protokoll von *Milteny Biotec* folgend, wurden die, vom Rest des Herzens abgetrennten, Vorhöfe mittels Schere zerkleinert und in die *gentle MACS Tubes* überführt. Im *gentleMACS™ Octo Dissociator* dissoziierten die Vorhöfe bei 37 °C. Einer Resuspension des so entstandenen Zellpellets in DMEM (10 % FCS) und einer anschließenden Filterung durch 70 µm Maschenweite, folgte ein erneutes Waschen mit DMEM. Die Zellen wurden für 5 min bei 600 g abzentrifugiert, anschließend mit MEM-Medium resuspendiert und in Zellkulturschalen überführt. Dem Medium wurde der Wachstumshemmer Bromodesoxyuridin zugefügt, um die Proliferation nichtmyokardialer Zellen zu reduzieren (Simpson & Savion, 1982). Um die Kardiomyozyten, welche weniger als 20 % der Gesamtzellzahl im Herzen ausmachen (Field, 2004), von den restlichen Zellen zu trennen, wurden die Zellen für eine Stunde bei 37 °C und 1 % CO₂ inkubiert. Fibroblasten und Endothelzellen setzen sich dabei am Boden der Zellkulturschale ab (Ehler et al., 2013). Die im Medium verbleibenden Kardiomyozyten konnten anschließend in einer Neubauerzählkammer gezählt werden. Es wurden ca. 500.000 Zellen auf beschichtete Platten (siehe weiter unten), in einem 5 % FCS-Medium, welches nach ca. 24 h durch 1 % FCS-Medium ausgetauscht wurde, ausplattiert. Zu den am Boden verbliebenen Fibroblasten wurde DMEM-Medium ohne FCS hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre und 5 % CO₂ kultiviert. Die Präparation wurde von Theresa Brand und Julia Fender aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Lorenz durchgeführt.

MEM-Medium:

<i>Modified Eagle Medium</i>	10,5 g/l
NaHCO ₃	350 mg/l
Vitamin B12 (2mg/ml)	1 ml/l
Penicillin	100 U/ml

Streptomycin	100 µg/ml
L-Glutamin (200mM)	10ml/l
Bromodesoxyuridin	29 mg/l
FCS	5 %/ 1 %/ 0 % (V/V)
In H ₂ O (pH 7,3)	

Fibroblasten:

Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
In DMEM mit L-Glutamin (4,5 g/L Glukose)	

3.1.2 Zelllinien

3.1.2.1 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Um Zellen zu konservieren, werden sie eingefroren. Dafür wurden sie mit Trypsin-EDTA-Lösung von der Zellkulturschale abgelöst und in ein, mit Einfriermedium befülltes, Kryoröhrchen gegeben. Beim Einfrieren wurden die Zellen schrittweise heruntergekühlt. Nach ca. 3 h bei -20 °C folgten weitere Stunden bei -80 °C, ehe der Vorgang mit der Lagerung bei -196 °C im Stickstofftank endete.

Einfriermedium:

Zellspezifisches Medium	50 % (V/V)
FCS	40 % (V/V)
DMSO	10 % (V/V)

Aufgetaut wurden die Zellen, indem das Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C erwärmt wurde. Dann folgte die Resuspension der Zellen in frischem Medium. Nach einer Inkubationszeit im Brutschrank, in welcher sich die Zellen absetzen konnten, wurde das Medium gewechselt. Noch vorhandenes DMSO, welches beim Einfriervorgang Zellschäden mindert, indem es die dabei entstehende, erhöhte Elektrolytkonzentration, verhindert (Lovelock & Bishop, 1959), wurde so entfernt.

3.1.2.2 Kultivierung von H9c2-Zellen, AC16-Zellen und HEK 293 T

Für das Ernten der Zellen bei einer Konfluenz von ca. 70 % wurde das Nährmedium abgenommen und die Zellen mit DPBS gewaschen. Durch Inkubation mit Trypsin-EDTA-Lösung für 5 min bei 37 °C wurden die Zellen vom Plattenboden abgelöst, da Trypsin als Serinprotease Proteine, die zur Anheftung der Zelle dienen, spaltet (Schmitz, 2007). Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit, auf 37 °C erwärmtem Medium von der Oberfläche gespült und im Verhältnis 1:3 bis 1:10 passagiert.

Zellkulturmedien:

H9c2

FCS	10 % (V/V)
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
In DMEM mit L-Glutamin (4,5 g/l Glukose)	

AC16 / HEK

FCS	10 % (V/V)
L-Glutamin	2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
In DME/F-12 für AC16 oder DMEM ohne L-Glutamin (4,5 g/l Glukose) für HEK	

3.1.3 Beschichtung mit Poly-D-Lysin und Fibronectin

Um eine Haftung der neonatalen Mauscardiomyozyten an den Zellkulturschalen zu erreichen, wurden diese vor dem Ausplattieren der Zellen entweder mit Poly-D-Lysin oder mit Fibronectin beschichtet. Poly-D-Lysin ist bei neutralem pH ein Polykation, welches eine Verbindung zwischen den anionischen Seitenketten der Zellmatrix und der negativ geladenen Oberfläche der Zellkulturplatte schafft (Mazia et al., 1975).

Für die Beschichtung wurde steril filtriertes Poly-D-Lysin (0,033 mg/ml) in die Zellkulturschalen gegeben und bei 37 °C für mindestens 30 min inkubiert. Danach wurde es wieder abgenommen und gegen DPBS getauscht, welches wiederum vor dem Ausplattieren der Zellen abgesaugt wurde.

Das extrazelluläre Glykoprotein Fibronectin führt zur Anhaftung der Zellen, indem es stark mit extrazellulären Matrixproteinen interagiert (Ruoslahti, 1981). Fibronectin wurde für die Beschichtung mindestens 1,5 h vor Zellzugabe 1:100 in DPBS verdünnt und mit der Endkonzentration 1 mg/ml in die Zellkulturschale gegeben und bei 37 °C aufbewahrt.

3.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl in einer Suspension wurde lichtmikroskopisch unter Zuhilfenahme der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Tote Zellen wurden bei der Zählung nicht berücksichtigt. Dies gelang, indem die Suspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt wurde. Dieser Farbstoff kann nur die beschädigte Membran abgestorbener Zellen durchdringen und so das Zytoplasma anfärben, lebende Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf (Strober, 2015). Die gefärbte Zellsuspension wurde blasenfrei zwischen Deckglas und Neubauerplatte pipettiert. Da die Platte durch ein Gitternetz in vier Quadranten unterteilt ist, welche alle ausgezählt wurden, erhält man die Zellzahl pro Quadranten durch Division durch vier. Die Verdünnung der Suspension mit Trypanblau wurde durch Multiplikation mit dem Faktor zwei berücksichtigt. Dank definiertem Volumen unter der Deckplatte der Zählkammer, erhält man durch Multiplikation mit 10^4 die Zellzahl pro ml.

3.1.5 Behandlung der Zellen mit CTRPs

Für die Behandlung der H9c2- und AC16-Zellen mit verschiedenen CTRPs, wurden von beiden Zelllinien ca. 15.000 Zellen/Well auf eine sterile 96-Well-Platte ausgesät. Die Zellen konnten dann bei 37 °C und 7 % CO₂ für 24 h anwachsen, ehe sie einem Mediumwechsel unterzogen wurden. Hierfür wurde das alte Medium abgesaugt und 100 µl/Well frisches Medium mit einer Mehrkanalpipette zugegeben. Die Platte wurde dann wieder in den Brutschrank gestellt, während auf einer zusätzlichen, sterilen 96-Well-Platte die unterschiedlich konzentrierten CTRPs auf eine Zielkonzentration von 0,8 µg/ml eingestellt wurden. Ein Teil der CTRPs wurde mit Anti-Flag M2 Antikörper vorinkubiert.

Mithilfe der 0,8 µg/ml-Stammlösung der jeweiligen CTRPs wurde anschließend eine Verdünnungsreihe erstellt und die Lösungen so zu den Zellen in der 96-Well-Platte gegeben, dass die CTRPs mit einer Zielkonzentration von 400 ng/ml, 200 ng/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml (Antikörper: 1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,125 µg/ml,

0,0625 µg/ml) auf die Zellen wirken konnten. Hierzu inkubierten die Zellen für 24 h bzw. 72 h bei 37 °C bei 7 % CO₂.

Während bei der Negativkontrolle für den ATP-Assay nur reines Medium auf die Zellen gegeben wurde, wurde für die Positivkontrolle eine halbe Stunde vor Ende der 24- bzw. 72-stündigen Inkubation Triton X-100 (2 %) zugegeben.

Als Positivkontrolle für den Laktat-Assay dienten mit Antimycin-A (25 µM) behandelte Zellen.

3.1.6 Behandlung von H9c2-Zellen mit CTRPs und Ischämiepuffer

Um einen schützenden Effekt der CTRPs auf Kardiomyozyten zu untersuchen, wurden 15.000 H9c2-Zellen/Well auf eine sterile 96-Well-Platte ausgesät. Nach 24 h im Brutschrank bei 37 °C und 7 % CO₂ erfolgte ein Mediumwechsel auf 100 µl Hungermedium und eine Vorbehandlung mit aufgereinigtem CTRP2 (5 µg/ml), welches mit Antikörper (0,02 mg/ml) vorinkubiert worden ist. Es folgte eine 24-stündige Inkubation im selben Brutschrank wie zuvor.

Zu den Zellen wurden 100 µl Ischämiepuffer gegeben und zusätzlich das CTRP-Antikörper-Gemisch. Nach 30-minütiger Inkubationszeit bei 37 °C und 7 % CO₂ erfolgte ein Tausch des Ischämiepuffers gegen H9c2-Nährmedium. CTRP2 und Antikörper wurden erneut hinzugefügt. Im Sinne einer Reperfusion wurde die Platte für 15 min in den Brutschrank gegeben.

Nach der Reperfusion wurde für den Laktat-Assay Überstand abgenommen und bei -20 °C weggefroren und der ATP-Assay durchgeführt.

Hungermedium:

Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
In DMEM mit L-Glutamin (4,5 g/L Glukose)	

Ischämiepuffer:

NaCl	137 mmol/l
KCl	12 mmol/l
MgCl ₂	0,49 mmol/l
HEPES	4 mmol/l
Deoxyglucose	10 mmol/l

Natriumdithionit	0,75 mmol/l
Laktat	20 mmol/l
H ₂ O dest. (pH 6,5)	500 ml

3.1.7 Transfektion mittels Calciumphosphat-Kopräzipitationsmethode

Als Positivkontrolle für die Expression verschiedener Rezeptoren in AC16-Zellen, wurden die Rezeptoren in HEK 293 T-Zellen überexprimiert. Für die Transfektion, also die Aufnahme von DNA durch eukaryotische Zellen, wurde die Calciumphosphat-Kopräzipitationsmethode verwendet. Dafür wurden HEK-Zellen 1:3 gesplittet und in 10 ml Medium gegeben. Am nächsten Tag wurde der Transfektionsansatz hergestellt und für ca. 10-20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis er eintrübte und dann vorsichtig auf die Zellen gegeben.

Beim Mischen von Calciumchloridlösung mit Natriumphosphatlösung fällt das schwerer lösliche Calciumphosphat aus (Netzker, 2016). Dieses ist positiv geladen und bildet mit der in der Lösung vorhandenen, negativen DNA einen positiv geladenen Komplex. Der wiederum wird von der negativ geladenen Zellmembran angezogen und in die Zelle aufgenommen. Die Aufnahme in die Zelle erfolgt vermutlich durch unspezifische Endozytose oder Phagozytose (Kim & Eberwine, 2010).

Die Zellen wurden ca. 24 h im Brutschrank bei 37 °C und 7 % CO₂ inkubiert.

Transfektionsansatz:

H ₂ O (steril)	440 µl
Calciumchlorid-Stammlösung (2,5 M)	50 µl
Plasmid (1 µg/ml)	10 µl
2 x BBS-Puffer	500 µl

2 x BBS-Puffer:

(pH 6,95)

BES	50 mM
NaCl	280 mM
Na ₂ HPO ₄	1,5 mM

3.2 Qualitativer Nachweis von mRNA

3.2.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Ob die untersuchten Zelltypen in der Lage sind verschiedene Rezeptoren zu exprimieren, an welche die CTRPs binden, sollte mittels mRNA-Nachweis erfolgen.

Hierfür wurde die RNA zum einen aus Zellen von Zelllinien und zum anderen aus frisch präpariertem Gewebe isoliert. AC16- und H9c2-Zellen wurden auf unbeschichtete oder mit Fibronectin beschichtete Zellkulturschalen ausgesät. Neonatale Mauskardiomyozyten wurden auf mit Poly-D-Lysin oder Fibronectin beschichteten Schalen kultiviert. Nach 24 h im Brutschrank wurden die Zellen mittels TRI[®] *Reagent* lysiert. Die Lyse der adulten Mauskardiomyozyten erfolgte direkt im Anschluss an die Präparation, welche durch Dr. Katja Merches aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Lorenz durchgeführt wurde. Die Zugabe von Chloroform zum Zelllysat mit anschließender Zentrifugation trennte die RNA von der DNA und den Proteinen. Die RNA wurde abgenommen und präzipitierte nach Zugabe von Isopropanol. Den Angaben des TRI[®] *Reagent* (Merck) Protokolls weiter folgend, wurde die RNA nach wiederholter Ethanolwaschung am Ende in DEPC-H₂O gelöst (Merck, o. J.-b).

Um die RNA aus Gewebe zu isolieren, wurde ein Teil davon in TRI[®] *Reagent* unter Zuhilfenahme eines Gewebehomogenisators lysiert und anschließend, wie oben beschrieben, weiterverfahren. Bei allen beschriebenen Schritten wurde darauf geachtet, RNase frei zu arbeiten. Die RNA-Isolation wurde am Ende durch die Messung der Konzentration am *NanoDrop*[™] 2000c kontrolliert.

DEPC-H₂O:

DEPC (Diethylpyrocarbonat)	1:1000
in H ₂ O	
nach 1h Vorinkubation autoklavieren	

Der erfolgreichen RNA-Isolation schloss sich die cDNA-Synthese an. Dafür wurde zu 1 µg RNA die entsprechende Menge DEPC-H₂O gegeben, um das Zielvolumen von 10 µl zu erreichen. Nachdem die dNTPs (10 mM) und der Oligo dT-Primer (2 µM) zugefügt wurden, inkubierte der Ansatz für 10 min bei 70 °C und wurde danach auf Eis gestellt. In der Zwischenzeit wurde der Mastermix hergestellt und anschließend auf die

Proben verteilt. Einer 60-minütigen Inkubationszeit bei 42 °C, folgten weitere 10-15 min bei 70 °C, ehe dann je 200 µl DEPC-H₂O auf die Ansätze verteilt wurden.

cDNA-Synthese

Mastermix:

(für eine Probe)

5x <i>first strand buffer</i>	4,0 µl
DTT (100 mM)	2,0 µl
<i>SuperScript II Reverse Transcriptase</i> (200 U/µl)	1,0 µl
DEPC-H ₂ O	0,9 µl
RNasin® (40 U/µl)	0,1 µl

3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Mit der Methode der Polymerase-Kettenreaktion ist es möglich definierte DNA-Sequenzen zu vervielfältigen und somit die Nachweisgrenze zu überwinden. Die Amplifizierung umfasst sich wiederholende Zyklen. Ein Zyklus gliedert sich dabei in drei nacheinander ablaufende Schritte. Zuerst denaturiert der DNA-Doppelstrang bei 95 °C und zerfällt in zwei Einzelstränge. Es folgt das *Annealing* bei reduzierter Temperatur. Diese liegt meist zwischen 40-70 °C, hängt aber von der Länge und Sequenz der Primer ab. Ein Primer lagert sich dabei komplementär zum 5'-Ende und einer komplementär zum 3'-Ende an die DNA an. Der Zyklus wird durch die Elongation bei ca. 72 °C beendet. Eine thermostabile DNA-Polymerase ergänzt die Einzelstränge mit komplementären dNTPs zu Doppelsträngen. (Netzker, 2016)

Für die Durchführung wurde der hergestellte Ansatz in das *GeneAmp*® PCR System 9700 (Thermo Scientific) gegeben.

Zur Vervielfältigung wurde die cDNA von AC16 und H9c2-Zellen, welche auf unbeschichteten oder mit Fibronectin beschichteten Platten angewachsen waren, verwendet. Als Positivkontrollen für die AC16-Zellen wurden die Rezeptoren AdipoR1, AdipoR2, BAI3 und RXFP1 in HEK 293 T überexprimiert und die cDNA amplifiziert. Des Weiteren wurde eine PCR mit den NMCM-Proben (Poly-D-Lysin und Fibronectin), sowie mit der cDNA von adulten Mauskardiomyozyten und kardialen Fibroblasten aus Mausherzen durchgeführt. Als Positivkontrolle für H9c2-Zellen und Mauskardiomyozyten wurde die cDNA von Gehirn- und Fettgewebe vervielfältigt. Die Durchführung der PCR

wurde von Annette Hannawacker aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Lorenz übernommen.

PCR-Ansatz:

(für 1 Probe)

cDNA (1 µg/ml)	3 µl
5' Ende-Primer (10 µM)	1,25 µl
3' Ende-Primer (10 µM)	1,25 µl
Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) (10 mM)	2,5µl
10X <i>DreamTaq</i> Puffer	2,5 µl
<i>DreamTaq</i> DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,125 µl
H ₂ O	14,4 µl

PCR-Ablauf:

	Denaturierung: 94 °C	2 min	
40 Zyklen		Denaturierung: 94 °C	20 sek
		Annealing 60 °C	30 sek
		Elongation: 72 °C	30 sek
		Elongation: 72 °C	7 min
	Kühlung: 4 °C	∞	

3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese trennt die DNA-Fragmente gemäß ihrer Größe. Die Konzentration der Agarose ermöglicht das Einstellen der Porengröße des Gels. Bei kleineren DNA-Stücken erhöht man die Agarosekonzentration (Netzker, 2016).

Es wurde ein 2-prozentiges (m/V) Agarosegel verwendet. Zur Herstellung wurde die Agarose in 1xTAE Puffer aufgekocht. Hinzugefügtes *GelRed* 10000x in Wasser (1:33333) färbt die Nukleinsäuren durch Interkalation (Biotium, 2021).

Die Gele wurden in 1xTAE als Laufpuffer gegeben. Bevor die PCR-Proben in die Taschen pipettiert wurden, wurden sie mit PCR-Ladepuffer gemischt. Der Ladepuffer erhöht die Dichte der Proben und sichert die Platzierung am Boden der Taschen.

Bei einer Spannung von 90 V wanderte die negativ geladene DNA für ca. 2 h zur positiv geladenen Anode des Biometra *Compact M* (An Analytik Jena Company). Eine Aufteilung in Banden ergibt sich durch die Ansammlung einer Vielzahl gleich großer

Stücke. Die fluoreszierende DNA wurde im *E.A.S.Y[®] Doc plus* (Herolab) mittels UV-Licht dargestellt und mit *E.A.S.Y[®] Win* dokumentiert. Durch das Auftragen eines Größenstandards (100bp- und 1kb-Leiter, New England Biolabs) konnte man den DNA-Fragmenten eine definierte Größe zuordnen.

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde von Annette Hannawacker aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Lorenz durchgeführt.

50xTAE-Puffer:

EDTA	50 mM
Essigsäure (konz.)	6 % (m/V)
Tris-HCl	2 M

PCR-Ladepuffer:

EDTA	100 mM
Glycerin	50 % (V/V)
Bromphenolblau	0,1 % (m/V)

3.2.4 *Real-Time* PCR

Neben einer normalen PCR wurde mit der zuvor in cDNA umgeschriebenen mRNA der unter 3.2.3 beschriebenen Proben zusätzlich eine *Real-Time* PCR durchgeführt. Hierfür wurde ein Mastermix mit den entsprechenden Primern und SYBR[®] *Green* (Bio-Rad) hergestellt. SYBR[®] *Green* interkaliert in die DNA, wodurch seine fluoreszierende Eigenschaft verstärkt wird (Bio-Rad, o. J.).

Der Mastermix wurde in eine 384-Well-Platte (Bio-Rad) zu den cDNA-Triplikaten (1 µg/µl) gegeben. Die Amplifizierung und Messung wurde in einem C1000 *Touch Thermal Cycler* CFX384TM *Real-Time* System (Bio-Rad) durchgeführt.

Mit zunehmenden Zyklen der DNA-Vervielfältigung steigt das Fluoreszenzsignal, welches gemessen werden kann. Bei Erreichen eines gewissen Schwellenwertes des Signals, wird die Anzahl der, bis dahin erfolgten, Zyklen einer jeden Probe wiedergegeben (ct-Wert, englisch: *threshold cycle*). Die Wiederholung der Zyklen wurde auf 45-mal begrenzt. Am Ende der Zyklen wurde eine Schmelzkurve erstellt. Hierzu wurde die Temperatur von 65 °C auf 95 °C in 0,5 °C Schritten erhöht. Durch die Schmelzkurve lässt sich die Spezifität der amplifizierten DNA analysieren. Die

Denaturierung der DNA erfolgt temperaturabhängig, sodass unspezifische Produkte und Primer-Dimere erkannt werden können.

RT-PCR-Mastermix:

(für 1 Probe)

<i>SsoAdvanced Universal SYBR</i> [®]	6,0 µl
<i>Green Supermix</i> (Bio-Rad)	
5' Ende-Primer (reverse) (10 µM)	0,2 µl
3' Ende-Primer (forward) (10µM)	0,2 µl
H ₂ O	3,6 µl
cDNA (1 µg/ml)	2,5 µl

RT-PCR-Ablauf:

45 Zyklen	}	Denaturierung: 95 °C	3 min
		Denaturierung: 95 °C	10 sek
		<i>Annealing</i> : 60 °C	10 sek
		Elongation: 65 °C	20 sek
		Elongation: 65 °C	10 sek
		Schmelzkurve: 65-95 °C (0,5 °C Schritte)	je 0,05 sek
		Kühlung: 4 °C	∞

3.3 Assays zur Bestimmung der Kardiotoxizität

3.3.1 ATP-Assay

Die Viabilität der Zellen wurde mittels *CellTiter-Glo*[®] *Luminescent Cell Viability Assay* (Promega) erfasst, indem die ATP-Konzentration im Medium gemessen wurde. Das Kit besteht aus *CellTiter-Glo*[®]-Substrat und *CellTiter-Glo*[®]-Buffer, welche man miteinander vermischt. Das entstandene Reagenz führt dabei zur Zelllyse und zur Erzeugung eines Lumineszenzsignals. Das Signal basiert auf der Umwandlung von Luciferin zu Oxyluciferin durch die *Ultra-Glo Recombinant Luciferase* unter ATP-Verbrauch in

Anwesenheit von Mg^{2+} und Sauerstoff (Crouch et al., 1993; Promega, o. J.). Das bei der Reaktion emittierte Licht kann mittels Luminometer gemessen werden. Die ATP-Konzentration limitiert somit das Lumineszenzsignal.

Die Durchführung des Assays begann 30 min nach Entnahme der, für die Behandlung mit CTRP verwendeten, 96-Well-Platte aus dem Inkubator. Bevor das 1:1 Gemisch aus *CellTiter-Glo[®]-Substrat* und *CellTiter-Glo[®]-Buffer* auf die Wells gegeben wurde, wurden 100 μ l Medium je Well für den Laktat-Assay entnommen und in eine Mikrotiterplatte gegeben, sodass 100 μ l Zellmedium bei den Zellen in den Wells verblieben. Das Reagenz wurde dann auf alle Wells gegeben, darunter auch auf diejenigen, welche lediglich 100 μ l reines Zellmedium ohne Zellen enthielten. Diese dienten als „Blanks“. Die Platte wurde geschwenkt und für 5 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Übertragen der Lysate auf eine Lumineszenzplatte, folgten weitere 5 min Inkubation unter den gleichen Konditionen. Im Anschluss daran wurde mittels *BioTek synergy neo2* das Lumineszenzsignal bei 450 nm gemessen.

3.3.2 Laktat-Assay

Der Laktat-Assay ist eine Methode, um die Laktatkonzentration im Medium der Zellen zu messen. Ermöglicht wird dies durch eine Reaktionskette, die mittels Laktat-Dehydrogenase (LDH) im Medium vorhandenes Laktat zu Pyruvat oxidiert, während NAD zu NADH reduziert wird. Nachdem das entstehende NADH Phenazinmethosulfat (PMS) zu PMSH reduziert, reagiert dieses mit Iodnitrotetrazolium (INT) und reduziert es zu (INTH). INTH wird durch die Absorption bei 490 nm messbar. (Babson & Phillips, 1965; Limonciel et al., 2011)

Von den Zellkulturmediumüberständen der zu untersuchenden Proben, wurden je 10 μ l in eine durchsichtige 96-Well-Platte vorgelegt. Dann wurden 90 μ l des Reagenzmixes zugegeben und die Reaktion nach 3-4 min mit 50 μ l 1 N Salzsäure gestoppt. Am Ende wurde die Absorption mittels *Synergy neo2 multimode reader* (Biotek) gemessen.

Reagenzmix:

NAD	3,76724 mM
TRAM-Puffer	83,477 % (V/V)
Farblösung	16,4995 % (V/V)
LDH	0,0275 % (V/V)

TRAM-Puffer:

Triethanolamin	107 mM
EDTA di-Natriumsalz-Dihydrat	10,4 mM
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	41,8 mM
Gelöst in sterilem VE-Wasser	

Farblösung:

Phenazinmethosulfat	1,63 mM
Iodnitrotetrazoliumchlorid	3,35 mM
Ethanol	35 % (V/V)
Triton-X	2 % (V/V)
Gelöst in sterilem VE-Wasser	

3.4 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde GraphPad Prism8 verwendet. Es wurden jeweils die Ergebnisse von mindestens 3 Versuchen herangezogen und als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (*mean* \pm SEM) wiedergegeben. Für die Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) mit nachfolgendem Tukey-Test durchgeführt. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant gekennzeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Auswahl der Zelllinien

Die Wirkungen von Substanzen können, bevor sie in Tierversuchen und später in klinischen Studien getestet werden, bereits in Zelllinien untersucht werden. Dadurch können potenziell schädliche Stoffe frühzeitig erkannt werden, was langfristig sowohl Ressourcen schont, als auch Gesundheitsschäden verhindert. Zudem helfen *in-vitro* Versuche die zugrundeliegenden Mechanismen und Signalkaskaden herauszuarbeiten, um ein genaueres Verständnis über die Wirkungsweise der Substanzen zu generieren. Um jedoch fundierte Aussagen bezüglich der Biochemie treffen zu können, müssen adäquate Zelllinien für die Experimente ausgewählt werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien H9c2 und AC16 wurden aufgrund ihrer Ähnlichkeiten mit Kardiomyozyten ausgewählt (Davidson et al., 2005; Hescheler et al., 1991).

4.1.1 H9c2-Zelllinie

Kimes und Brandt isolierten die myoblastische Zelllinie H9c2 aus Herzgewebe embryonaler BDIX Ratten durch die gering modifizierte Methode *selective serial passaging* nach Yaffe et al. (Kimes & Brandt, 1976; Richler & Yaffe, 1970; Yaffe, 1968). Nachdem zuerst angenommen wurde, dass die Zellen sich zu Skelettmuskelzellen differenzierten (Kimes & Brandt, 1976), konnten 1991 morphologische Ähnlichkeiten zu unausgereiften embryonalen Kardiomyozyten festgestellt werden. Da die Zellen zusätzlich Teile des elektrischen und hormonalen Signalweges adulter Herzzellen konservieren, eignet sich die Zelllinie als Modell für transmembranäre Signaltransduktion in Kardiomyozyten (Hescheler et al., 1991).

4.1.2 AC16-Zelllinie

Durch Fusion von Primärzellen aus adultem menschlichem Herzventrikelgewebe mit SV-40-transformierten, uridin-auxotrophen menschlichen Fibroblasten ohne Mitochondrien-DNA, entstand die proliferierende Zelllinie AC16 (Davidson et al., 2005). Unfusionierte Fibroblasten werden durch uridinfreies Medium entfernt. Die so verbleibenden Zellen werden weiter subkloniert und auf das Vorkommen zellspezifischer Marker für Kardiomyozyten gescreent (Davidson et al., 2005). Diese spezifischen Marker

und das Vorhandensein einer voll funktionsfähigen Atmungskette, deuten darauf hin, dass die nukleäre und mitochondriale DNA der primären Kardiomyozyten in den AC16-Zellen erhalten blieb. Somit eignet sich die Zelllinie, die Entwicklung von Kardiomyozyten in physiologischen und pathologischen Konditionen zu untersuchen (Davidson et al., 2005).

4.2 Auswirkungen der CTRPs auf die Viabilität der Zellen

Um mögliche Auswirkungen von CTRPs auf die Viabilität von Kardiomyozyten beurteilen zu können, wurden verschiedene CTRPs (CTRP2, CTRP3, CTRP4, CTRP9A, CTRP10, CTRP11, CTRP13, CTRP14) sowohl auf H9c2-Zellen als auch auf AC16-Zellen gegeben. Nach 24 h bzw. 72 h Inkubationszeit wurde die ATP-Konzentration mittels ATP-Assay gemessen. ATP dient dabei als Indikator für die noch lebenden, metabolisch aktiven Zellen. Das gemessene Signal ist proportional zu der Menge an vorhandenen ATP und dieses wiederum zu der Anzahl an lebenden Zellen (Kankia et al., 2017).

Als Positivkontrolle wurde Triton X-100 verwendet, da damit in Säugetierzellen ein Rückgang der Viabilität der Zellen festgestellt wurde (Dayeh et al., 2004). Die mit reinem Medium behandelten Zellen, entsprechen der Negativkontrolle im Versuchsaufbau.

Wie eingangs bereits beschrieben, verändern CTRPs durch Oligomerisierung ihre Eigenschaften. Damit kardiotoxische Effekte in oligomerem Zustand ausgeschlossen werden können, wurden die Assays zum Teil mit anti-Flag M2 Antikörper durchgeführt. Dieser induzierte als Mediator bereits in Untersuchungen der TNF-Familie die Oligomerisierung der Liganden (Wyzgol et al., 2009).

4.2.1 Viabilität von H9c2-Zellen nach CTRP-Behandlung

H9c2-Zellen, die aus embryonalen Rattenherzen gewonnen wurden, bieten die Möglichkeit die Toxizität von Substanzen *in-vitro* mit Hilfe einer Zelllinie zu testen, die Eigenschaften von Kardiomyoblasten zeigt. Daraus lassen sich erste Einschätzungen zur Funktion der CTRPs ableiten.

Die Behandlung mit den CTRPs (CTRP2, CTRP3, CTRP4, CTRP9A, CTRP10, CTRP11, CTRP13, CTRP14) in aufsteigender Konzentration (25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml) wurde mit den unbehandelten Zellen verglichen und in den Abbildungen 1-4 dargestellt. Die Positivkontrolle Triton X zeigte in allen Versuchen eine Abnahme der Viabilität und wird sowohl in Abbildung 1: A beispielhaft für alle Diagramme

der 24-stündigen Behandlung dargestellt als auch in Abbildung 3: A für alle Diagramme der 72-stündigen Behandlung. In den Abbildungen 1: B-H, Abbildungen 2: A-H, Abbildung 3: B-H und Abbildung 4: A-H wurde Triton X der Übersichtlichkeit wegen weggelassen, erzielte jedoch auch dort einen signifikanten Rückgang der Zellviabilität.

Die Ergebnisse der 24-stündigen CTRP-Behandlung ohne zusätzlichen anti-Flag M2 Antikörper zeigen keine signifikante Abnahme der Viabilität der Zellen verglichen mit den unbehandelten Zellen (Abbildung 1: A-H). CTRP2 bewirkte eine gering signifikante Steigerung ($p \leq 0,05$) bei einer Konzentration von 200 ng/ml und 400 ng/ml (Abbildung 1: A), ebenso wie CTRP3 bei einer Konzentration von 400 ng/ml (Abbildung 1: B).

Auch die Zugabe von anti-Flag M2 Antikörper bewirkte nach 24 h keine signifikante Reduktion der Viabilität der Zellen (Abbildung 2: A-H). Nur vereinzelte Konzentrationen (25 ng/ml und 200 ng/ml) von CTRP11 führten zu einer sogar leicht gesteigerten Viabilität (Abbildung 2: F).

Ähnliche Ergebnisse konnten auch nach 72 h dokumentiert werden. Ohne anti-Flag M2 Antikörper gab es keine signifikanten Veränderungen in der Viabilität der Zellen nach CTRP-Behandlung (Abbildung 3: A-H), aber auch eine durch anti-Flag M2 Antikörper induzierte Oligomerisierung führte zu keiner signifikanten Reduktion der Viabilität der Zellen. Lediglich CTRP2 wies nach 72 h bei einer Konzentration von 25 ng/ml eine leicht signifikante Steigerung ($p \leq 0,05$) der Viabilität auf (Abbildung 4: A).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse des ATP-Assays also nicht darauf hin, dass eine CTRP-Behandlung die Viabilität der Zellen beeinflusst oder kardiotoxische Wirkungen durch ihre Anwendung zu erwarten sind.

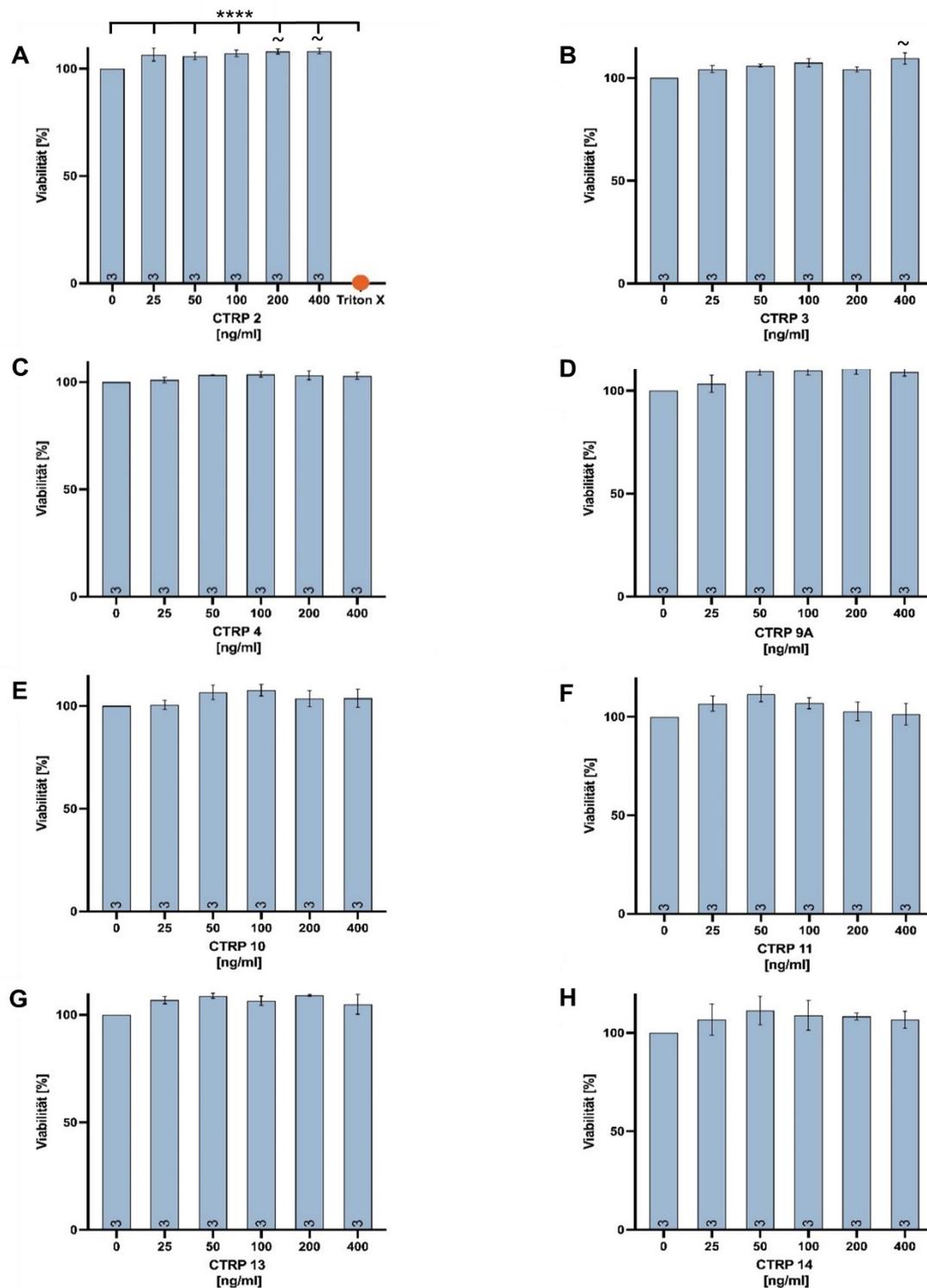


Abbildung 1: Viabilität von H9c2-Zellen nach 24-stündiger CTRP-Behandlung ohne anti-Flag M2 Antikörper. H9c2-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen (25-400 ng/ml) CTRP2, CTRP3, CTRP4, CTRP9A, CTRP10, CTRP11, CTRP13, CTRP14 [A-H] für 24 h behandelt. Anschließend wurde die ATP-Konzentration im Medium ermittelt. Die jeweiligen Ergebnisse wurden gegen die unbehandelten Zellen als Kontrolle normiert. Triton X (2%) als Positivkontrolle wird in A beispielhaft für alle Diagramme dargestellt. n=3. **** p ≤ 0,0001 zu Triton X; ~ p ≤ 0,05 zu 0 ng/ml. Mittelwert ± S.E.M.. Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (one-way ANOVA) und der Tukey-Test als Post-hoc-Test durchgeführt.

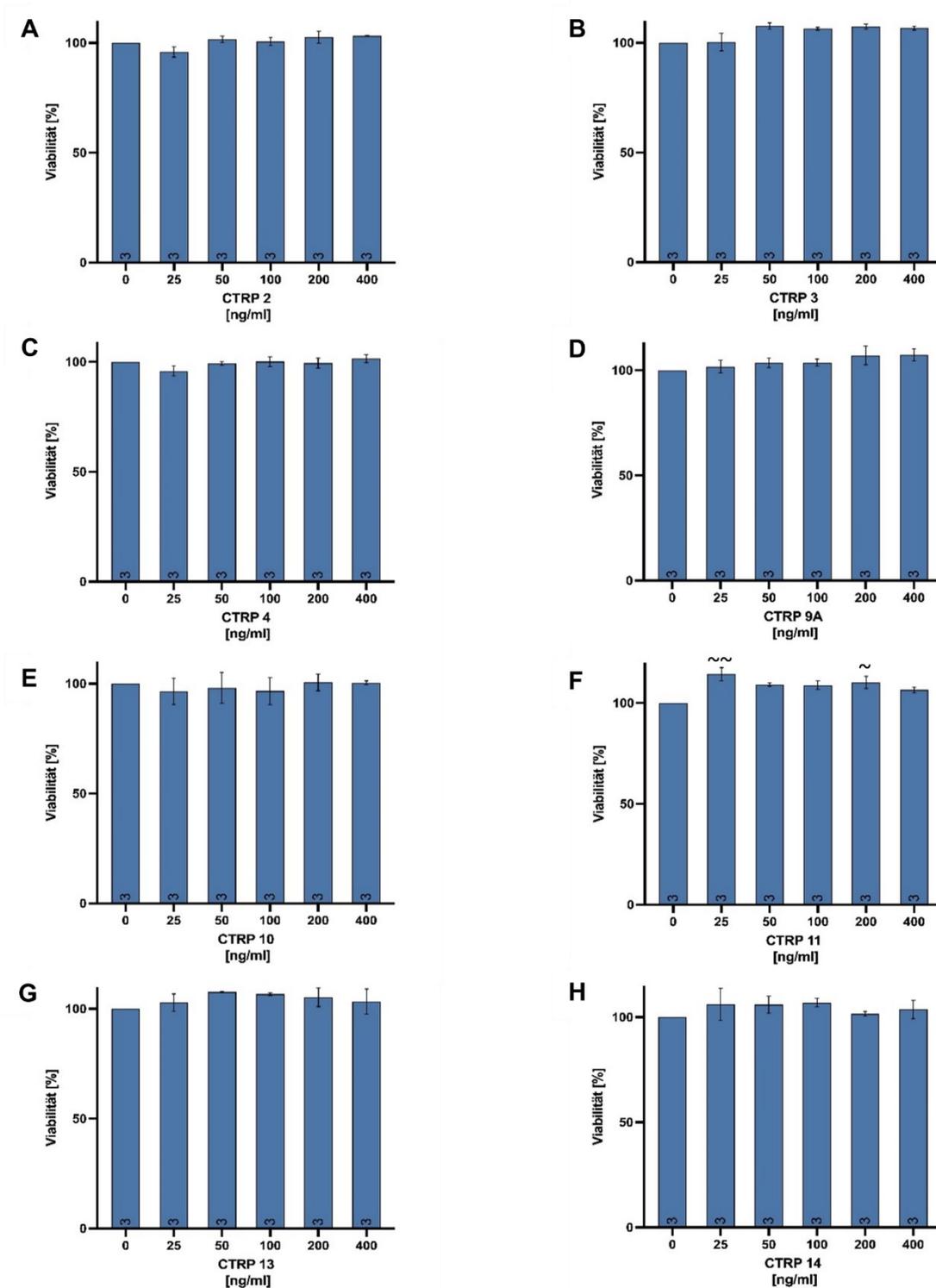


Abbildung 2: Viabilität von H9c2-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit anti-Flag M2 Antikörper vorinkubierten CTRPs. H9c2-Zellen wurden mit anti-Flag M2 Antikörper vorinkubiertem CTRP2, CTRP3, CTRP4, CTRP9A, CTRP10, CTRP11, CTRP13, CTRP14 [A-H] in steigenden Konzentrationen (25-400 ng/ml) für 24 h behandelt. Anschließend wurde die ATP-Konzentration im Medium ermittelt. Die jeweiligen Ergebnisse wurden gegen die unbehandelten Zellen als Kontrolle normiert. n=3. ~ $p \leq 0,05$ zu 0 ng/ml; ~~ $p \leq 0,01$ zu 0 ng/ml. Mittelwert \pm S.E.M.. Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (one-way ANOVA) und der Tukey-Test als Post-hoc-Test durchgeführt.

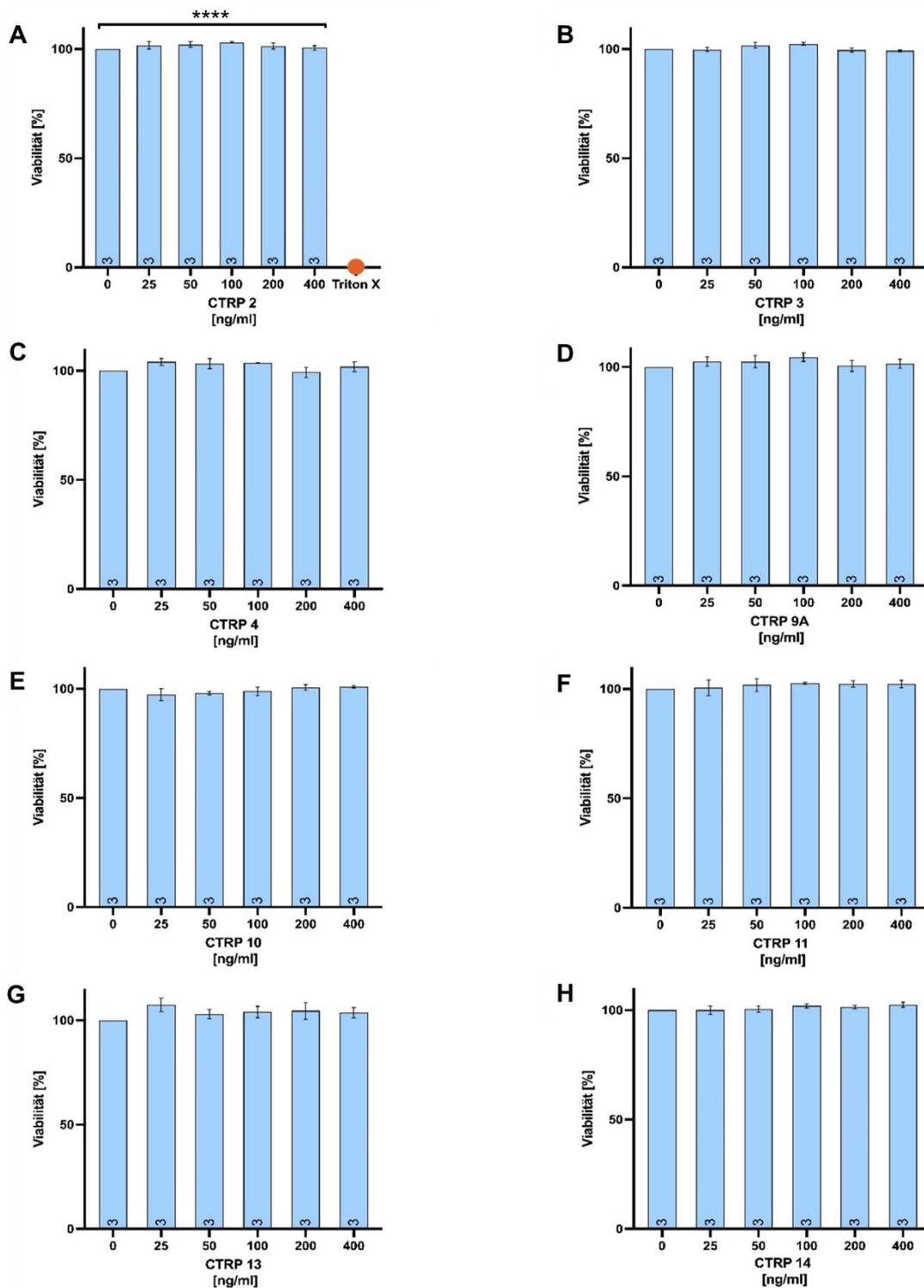


Abbildung 3: Viabilität von H9c2-Zellen nach 72-stündiger CTRP-Behandlung ohne anti-Flag M2 Antikörper. H9c2-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen (25-400 ng/ml) CTRP2, CTRP3, CTRP4, CTRP9A, CTRP10, CTRP11, CTRP13, CTRP14 [A-H] für 72 h behandelt. Anschließend wurde die ATP-Konzentration im Medium ermittelt. Die jeweiligen Ergebnisse wurden gegen die unbehandelten Zellen als Kontrolle normiert. Triton X (2%) als Positivkontrolle wird in A beispielhaft für alle Diagramme dargestellt. n=3. **** p ≤ 0,0001 zu Triton X. Mittelwert ± S.E.M.. Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorielles Varianzanalyse (one-way ANOVA) und der Tukey-Test als Post-hoc-Test durchgeführt.

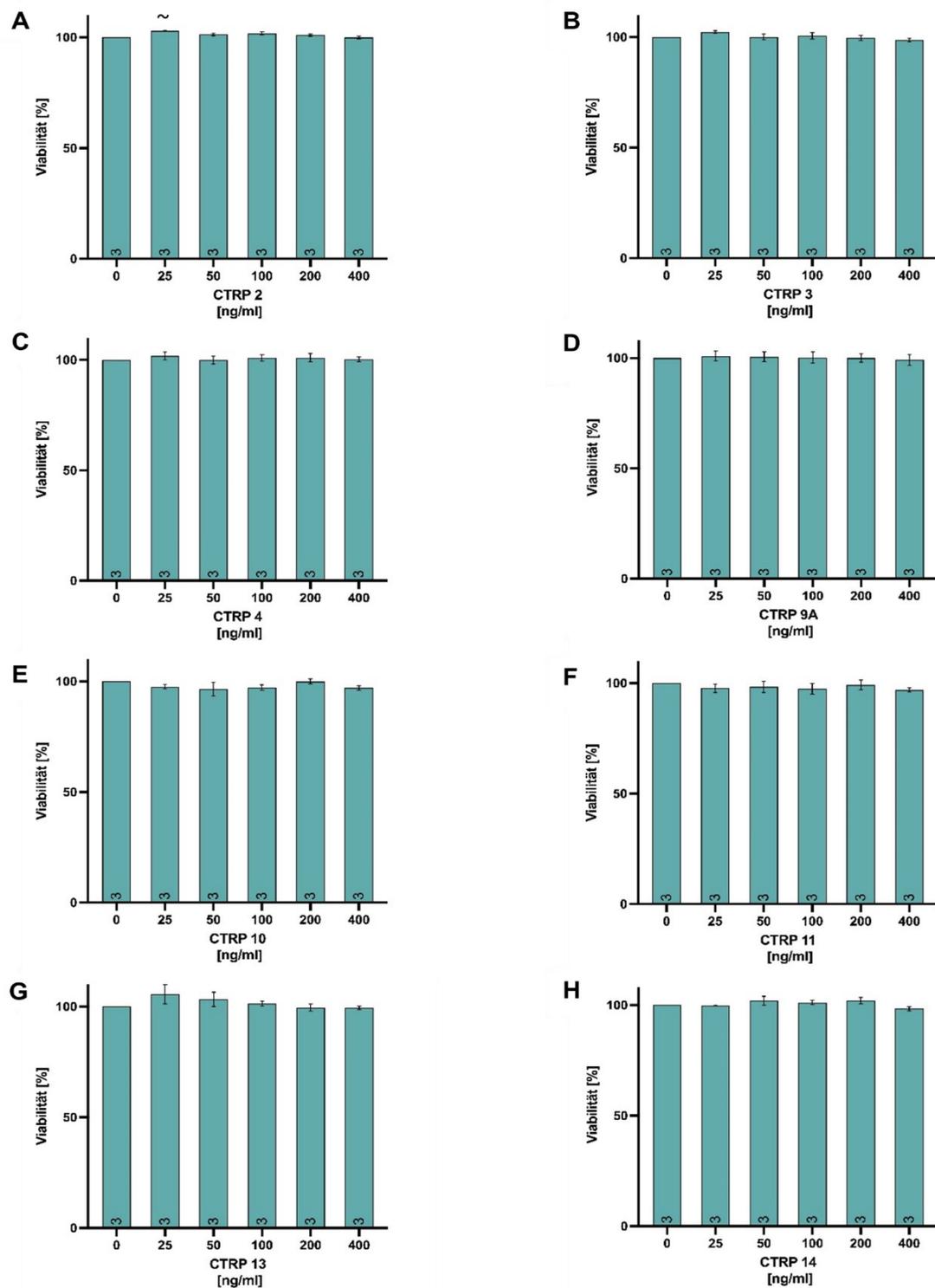


Abbildung 4: Viabilität von H9c2-Zellen nach 72- stündiger Behandlung mit anti-Flag M2 Antikörper vorinkubierten CTRPs. H9c2-Zellen wurden mit anti-Flag M2 Antikörper vorinkubiertem CTRP2, CTRP3, CTRP4, CTRP9A, CTRP10, CTRP11, CTRP13, CTRP14 [A-H] in steigenden Konzentrationen (25-400 ng/ml) für 72 h behandelt. Anschließend wurde die ATP-Konzentration im Medium ermittelt. Die jeweiligen Ergebnisse wurden gegen die unbehandelten Zellen als Negativkontrolle normiert. n=3. * $p \leq 0,05$ zu 0 ng/ml. Mittelwert \pm S.E.M.. Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) und der Tukey-Test als Post-hoc-Test durchgeführt.

4.2.2 Viabilität von AC16-Zellen nach CTRP-Behandlung

Um kardiotoxische Wirkungen der CTRPs auch auf humane Herzzellen ausschließen zu können, wurden die Substanzen zusätzlich in einer humanen Kardiomyozyten-Zelllinie mittels ATP-Assay untersucht.

Als Positivkontrolle der Methode zeigte Triton X einen signifikanten Rückgang der Zellviabilität und wird beispielhaft für alle Diagramme des 24-stündigen Versuchsaufbaus in Abbildung 5: A und für alle Diagramme des 72-stündigen Versuchs in Abbildung 8: A dargestellt.

Bei 24-stündiger Behandlung der Zellen mit steigenden Konzentrationen der CTRPs konnte weder ohne anti-Flag M2 Antikörper (Abbildung 5: A-H), noch nach anti-Flag M2 Antikörper induzierter Oligomerisierung (Abbildung 6: A-H) eine signifikante Veränderung der Zellviabilität beobachtet werden.

Nachdem die Versuche mit Konzentrationen von 25-400 ng/ml in Medium gelösten CTRPs keine kardiotoxischen Wirkungen zeigten, sollte mit CTRP2 in aufgereinigter Form und erhöhter Konzentration exemplarisch bestätigt werden, dass dies zu vergleichbaren Ergebnissen führt und keine potenziell protektiven Mediatoren im Medium zu den entsprechenden Versuchsergebnissen geführt haben.

Hierfür wurde CTRP2 mittels Affinitätschromatographie konzentriert und von Stoffwechselprodukten befreit. Es wurde in aufsteigender Konzentration (312 ng/ml, 625 ng/ml, 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml) für 24 h ohne anti-Flag M2 Antikörper (Abbildung 7: A) und mit Antikörper (Abbildung 7: B) auf die Zellen gegeben. Auch hier wurden keine signifikanten Veränderungen in der Viabilität der Zellen gemessen.

Diese Ergebnisse bestätigten sich auch nach 72 h. Die Zellviabilität veränderte sich nicht signifikant durch die Behandlung mit den CTRPs (Abbildung 8: A-H).

Die Zugabe von anti-Flag M2 Antikörper führte in diesen Versuchen generell nicht zu einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität (Abbildung 9: A-H), wenngleich bei CTRP2, CTRP3, CTRP4 und CTRP9A ein Trend zu einer reduzierten Zellviabilität zu erkennen ist. Da dieser Rückgang jedoch nur bei CTRP4 bei der Konzentration 25 ng/ml signifikant ausgeprägt ist und bei steigenden Konzentrationen der CTRPs wieder abnimmt (Abbildung 9: A-D), deutet es eher auf versuchsbedingte Veränderungen aufgrund der niedrigen Anzahl an Versuchswiederholungen hin, anstatt auf relevante kardiotoxische Effekte der CTRPs.

Somit lässt sich festhalten, dass die CTRPs (CTRP2, CTRP3, CTRP4, CTRP9A, CTRP10, CTRP11, CTRP13, CTRP14) in verschiedenen Konzentrationen, welche entweder für 24h oder 72h auf die Zellen gegeben wurden, die Viabilität der Zellen nicht

signifikant beeinflussten. Auch eine zusätzliche Oligomerisierung der Liganden rief keine eindeutigen kardiotoxischen Wirkungen hervor.

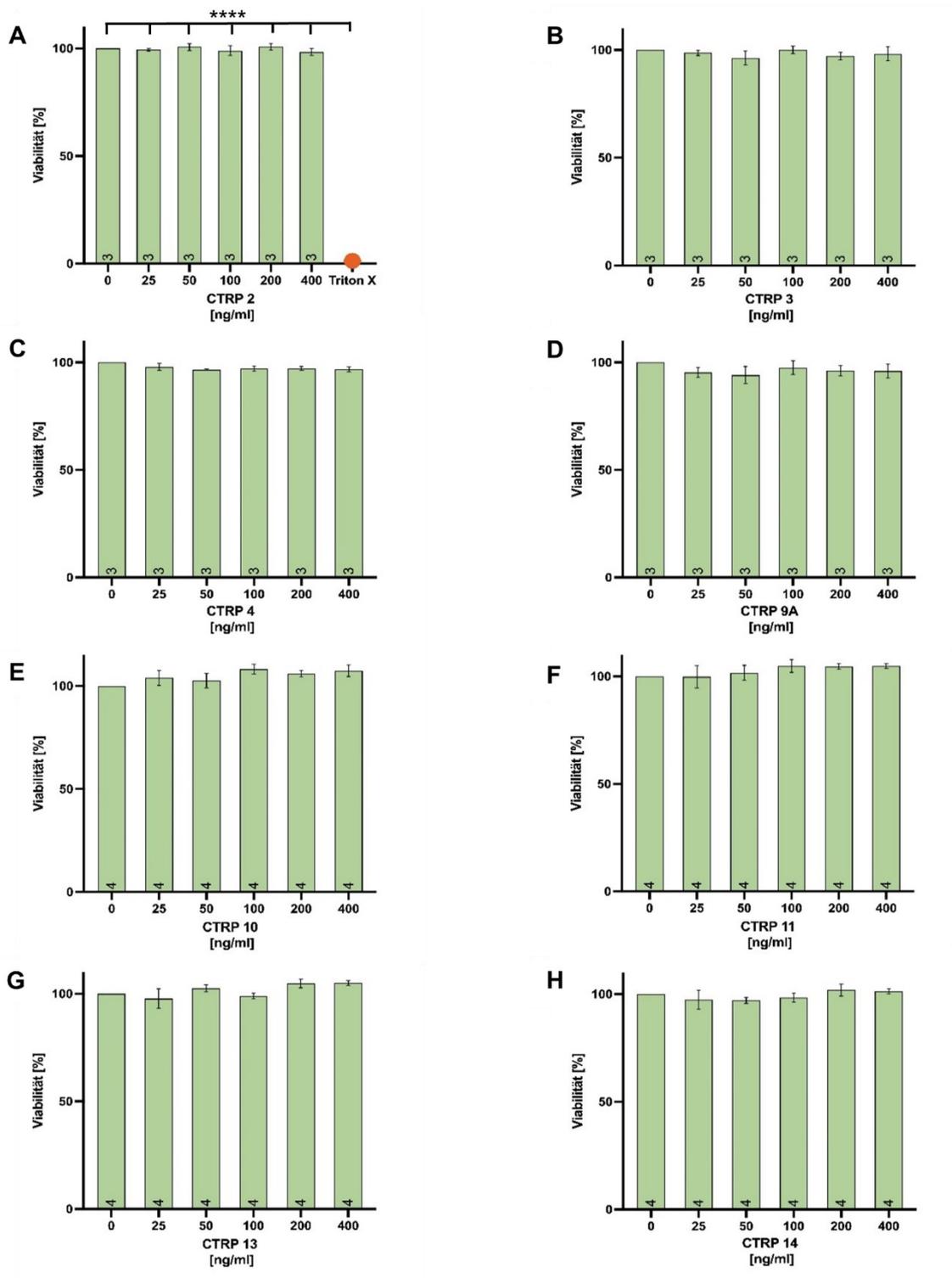


Abbildung 5: Viabilität von AC16-Zellen nach 24-stündiger CTRP-Behandlung ohne anti-Flag M2 Antikörper. AC16-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen (25-400 ng/ml) CTRP2, CTRP3, CTRP4, CTRP9A, CTRP10, CTRP11, CTRP13, CTRP14 [A-H] für 24 h behandelt. Anschließend wurde die ATP-Konzentration im Medium ermittelt. Die jeweiligen Ergebnisse wurden gegen die unbehandelten Zellen als Kontrolle normiert. Triton X (2%) als Positivkontrolle wird in **A** beispielhaft für alle Diagramme dargestellt. n=3-4. **** p < 0,0001 zu Triton X. Mittelwert ± S.E.M.. Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorielte Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) und der Tukey-Test als Post-hoc-Test durchgeführt.

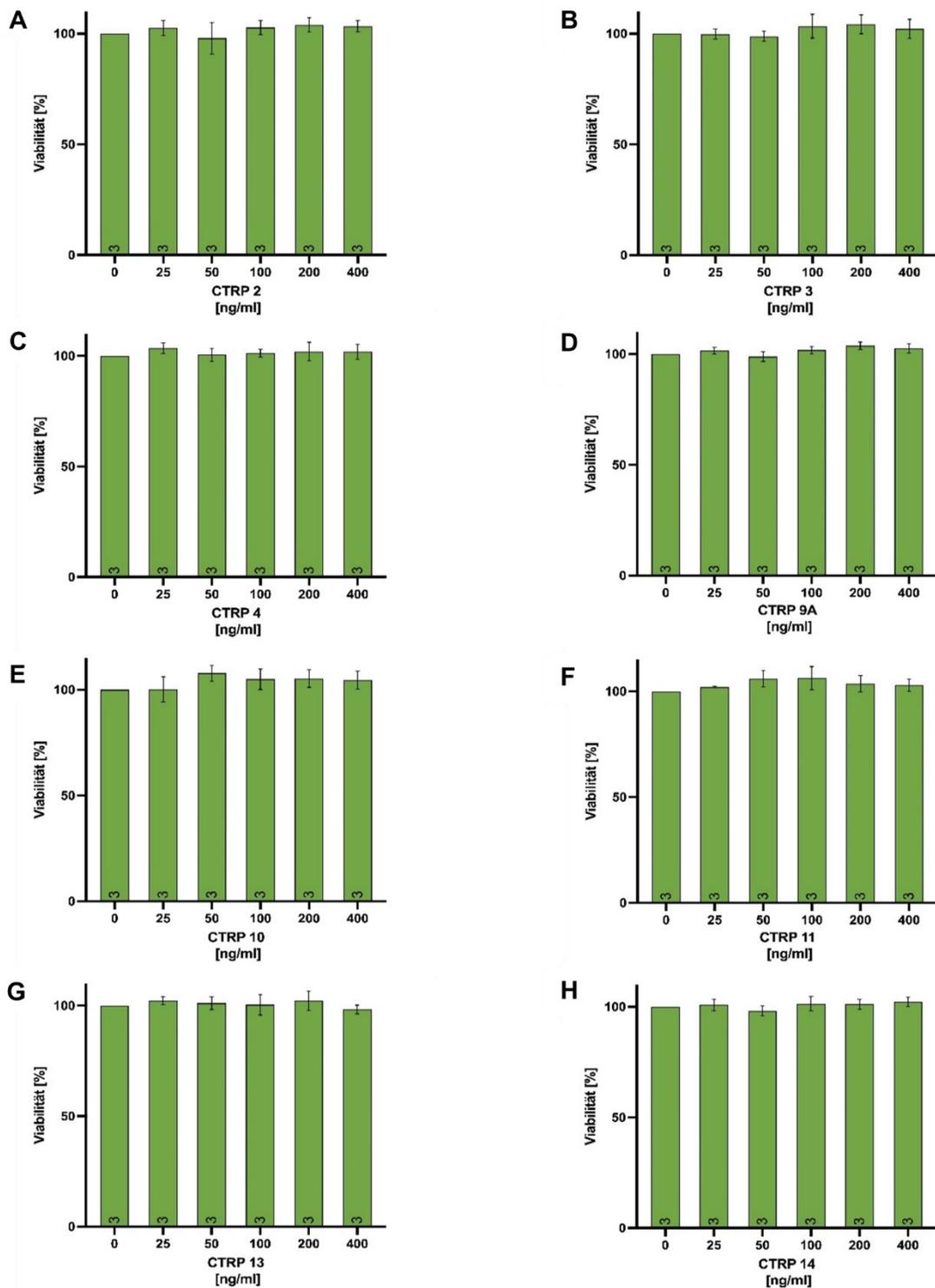


Abbildung 6: Viabilität von AC16-Zellen nach 24- stündiger Behandlung mit anti-Flag M2 Antikörper vorinkubierten CTRPs. AC16-Zellen wurden mit anti-Flag M2 Antikörper vorinkubiertem CTRP2, CTRP3, CTRP4, CTRP9A, CTRP10, CTRP11, CTRP13, CTRP14 [A-H] in steigenden Konzentrationen (25-400 ng/ml) für 24 h behandelt. Anschließend wurde die ATP-Konzentration im Medium ermittelt. Die jeweiligen Ergebnisse wurden gegen die unbehandelten Zellen als Negativkontrolle normiert. n=3. Mittelwert \pm S.E.M.. Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) und der Tukey-Test als Post-hoc-Test durchgeführt.

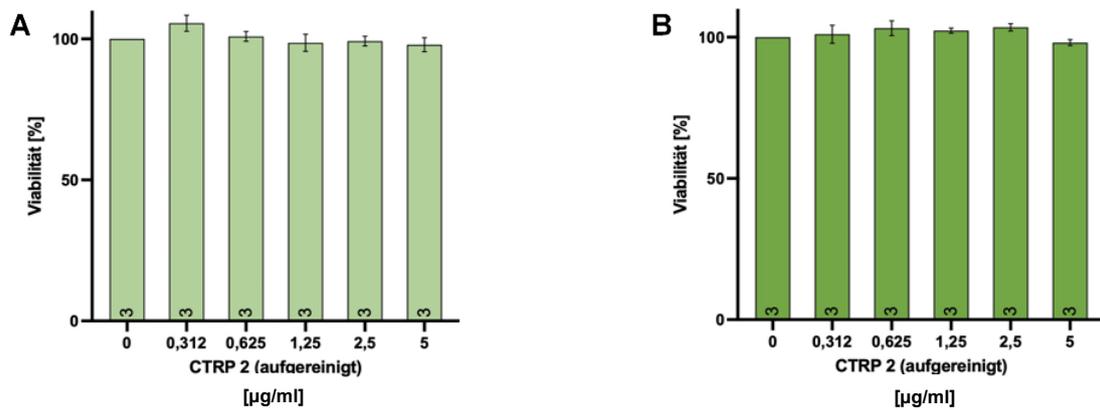


Abbildung 7: Viabilität von AC16-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit aufgereinigtem CTRP2. AC16-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen (0,312-5 µg/ml) CTRP2 **[A, B]** für 24 h behandelt. In **[B]** wurde CTRP2 zuvor mit anti-Flag M2 Antikörper vorinkubiert. Anschließend wurde die ATP-Konzentration im Medium ermittelt. Die jeweiligen Ergebnisse wurden gegen die unbehandelten Zellen als Kontrolle normiert. n=3. Mittelwert ± S.E.M.. Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) und der Tukey-Test als Post-hoc-Test durchgeführt.

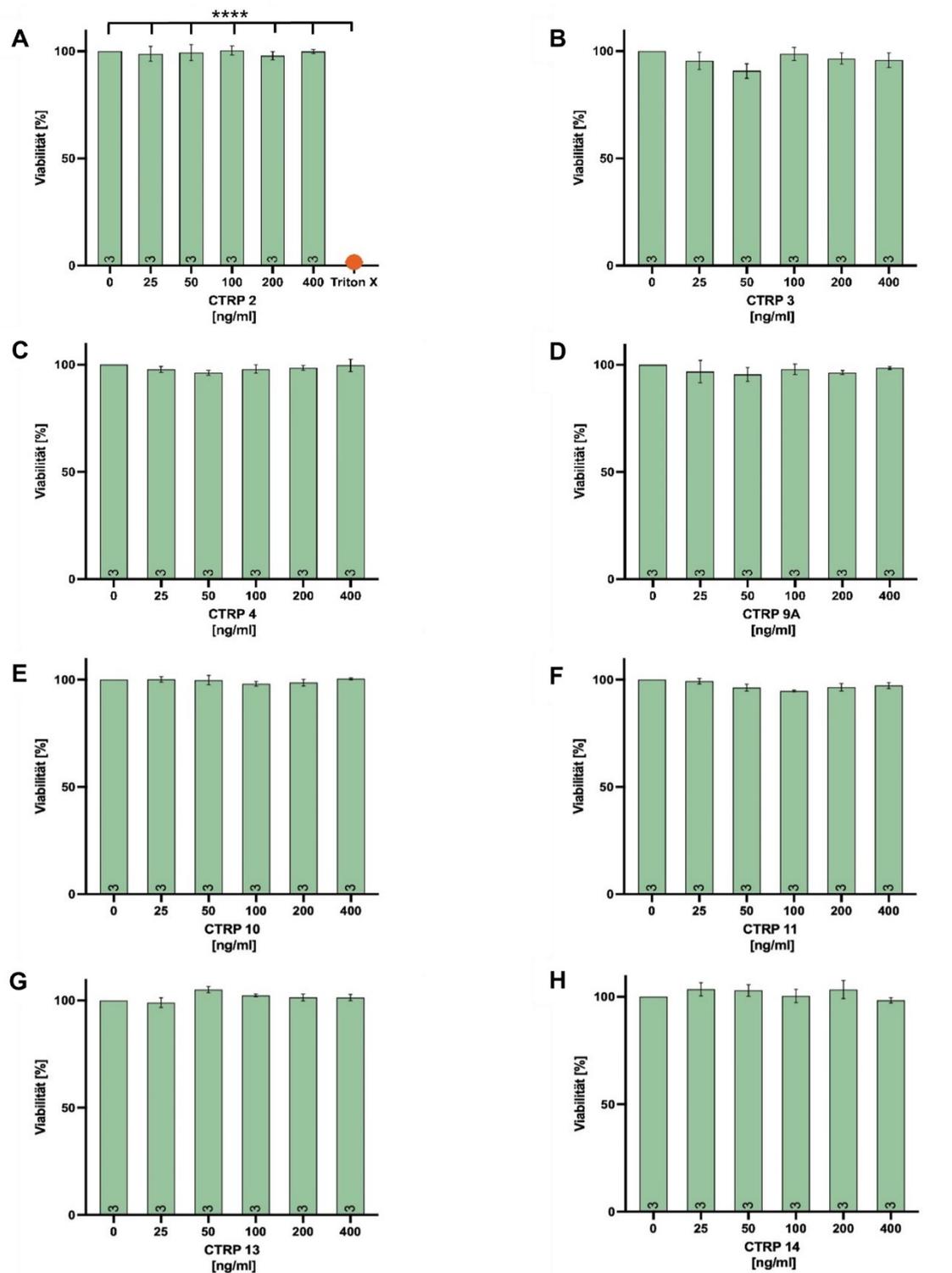


Abbildung 8: Viabilität von AC16-Zellen nach 72-stündiger CTRP-Behandlung ohne anti-Flag M2 Antikörper. AC16-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen (25-400 ng/ml) CTRP2, CTRP3, CTRP4, CTRP9A, CTRP10, CTRP11, CTRP13, CTRP14 [A-H] für 72 h behandelt. Anschließend wurde die ATP-Konzentration im Medium ermittelt. Die jeweiligen Ergebnisse wurden gegen die unbehandelten Zellen als Kontrolle normiert. Triton X (2%) als Positivkontrolle wird in **A** beispielhaft für alle Diagramme dargestellt. n=3. **** p < 0,0001 zu Triton X. Mittelwert ± S.E.M.. Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorielles Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) und der Tukey-Test als Post-hoc-Test durchgeführt.

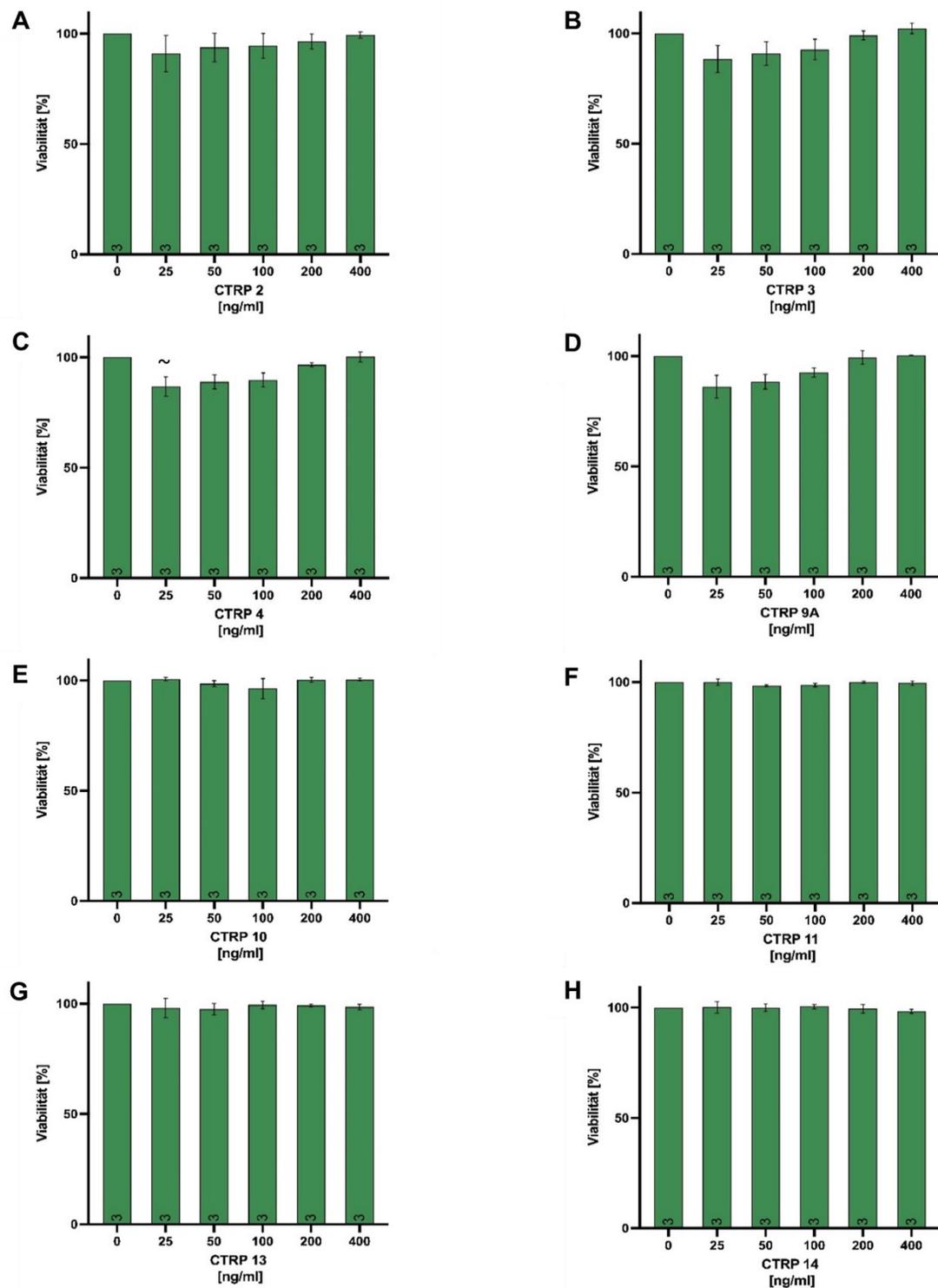


Abbildung 9: Viabilität von AC16-Zellen nach 72- stündiger Behandlung mit anti-Flag M2 Antikörper vorinkubierten CTRPs. AC16-Zellen wurden mit anti-Flag M2 Antikörper vorinkubiertem CTRP2, CTRP3, CTRP4, CTRP9A, CTRP10, CTRP11, CTRP13, CTRP14 [A-H] in steigenden Konzentrationen (25-400 ng/ml) für 72 h behandelt. Anschließend wurde die ATP-Konzentration im Medium ermittelt. Die jeweiligen Ergebnisse wurden gegen die unbehandelten Zellen als Kontrolle normiert. n=3. ~ p ≤ 0,05 zu 0 ng/ml. Mittelwert ± S.E.M.. Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorielles Varianzanalyse (one-way ANOVA) und der Tukey-Test als Post-hoc-Test durchgeführt.

4.3 Einfluss der CTRPs auf die Laktatkonzentration im Zellmedium

Neben dem ATP-Assay lassen sich kardiotoxische Eigenschaften von Substanzen mit dem Laktat-Assay untersuchen. Über die gemessene Laktatkonzentration im Zellmedium können Rückschlüsse über die mitochondriale Funktionalität gezogen werden. In gesunden Zellen wird das im Zytosol über die Glykolyse gewonnene Pyruvat in die Mitochondrien transportiert (Rassow, 2016a). Dort durchläuft es den Citratzyklus, sodass Nikotinamidadenindinukleotid (NADH) gewonnen wird (Rassow, 2016c), welches wiederum in der Atmungskette zur ATP-Gewinnung dient (Rassow, 2016b). Bei funktionellen Störungen der mitochondrialen Energiegewinnung kommt es kompensatorisch zur Laktatbildung aus dem, im Zytosol verbleibenden Pyruvat. Beispielhaft für diesen Kompensationsmechanismus ist das Antibiotikum Antimycin A, welches den Komplex III der Atmungskette blockiert (Rassow, 2016b; Slater, 1973) und folglich die Laktatkonzentration im Medium erhöht. Antimycin A diente somit im Versuch als Positivkontrolle. Für die Messung der Laktatkonzentration wurde der Überstand der mit CTRP behandelten Zellen aus dem ATP-Versuchsaufbau verwendet. Der Assay wurde mit CTRP2, CTRP3, CTRP4, CTRP9A, CTRP10, CTRP11, CTRP13, CTRP14 in aufsteigender Konzentration zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (24 h und 72 h) mit und ohne anti-Flag M2 Antikörper durchgeführt.

4.3.1 Laktatkonzentration nach CTRP-Behandlung von H9c2-Zellen

Der Laktat-Assay zeigte bei der Positivkontrolle Antimycin A einen signifikanten Anstieg der Laktatkonzentration im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Die Positivkontrolle wird in Abbildung 10: A beispielhaft für alle 24 h-Versuche dargestellt.

Nach 24-stündiger CTRP-Behandlung ohne zusätzliche anti-Flag M2 Antikörperzugabe konnten in H9c2-Zellen keine signifikant gesteigerten Laktatkonzentrationen dokumentiert werden (Abbildung 10: A-H).

Durch die Oligomerisierung mit Antikörper wurde bei CTRP3 und CTRP13 bei der höchsten Konzentration von 400 ng/ml eine gering signifikante Steigerung der Laktatkonzentration verglichen mit den unbehandelten Zellen festgestellt (Abbildung 11: B und G). Somit besteht der Verdacht, dass hohe Konzentrationen von CTRP3 und CTRP13 die mitochondriale Energiegewinnung beeinflussen und möglicherweise toxisch auf Kardiomyozyten wirken könnten. Durch

Antikörper-Oligomerisierung mittels anti-Flag M2 Antikörper konnten nach 24 h keine weiteren signifikanten Effekte festgestellt werden (Abbildung 11: A-H).

Auch die Effekte nach einer Inkubationszeit von 72 h wurden analysiert. Auch hier wird Antimycin A exemplarisch nur in einem Diagramm dargestellt (Abbildung 12: A).

Die Laktatkonzentration nach entsprechender CTRP-Behandlung war außer für CTRP11 unverändert (Abbildung 12: A-H). Lediglich CTRP11 führte in hoher Konzentration (400 ng/ml) zu einer gering signifikanten Erniedrigung des Laktats (Abbildung 12: F).

Die Oligomerisierung mit Antikörper führte nach 72 h zu keiner signifikanten Laktatveränderung (Abbildung 13: A-H). Insgesamt zeigen die Versuche, dass die getesteten CTRPs für den mitochondrialen Energiemetabolismus weitestgehend unschädlich sind.

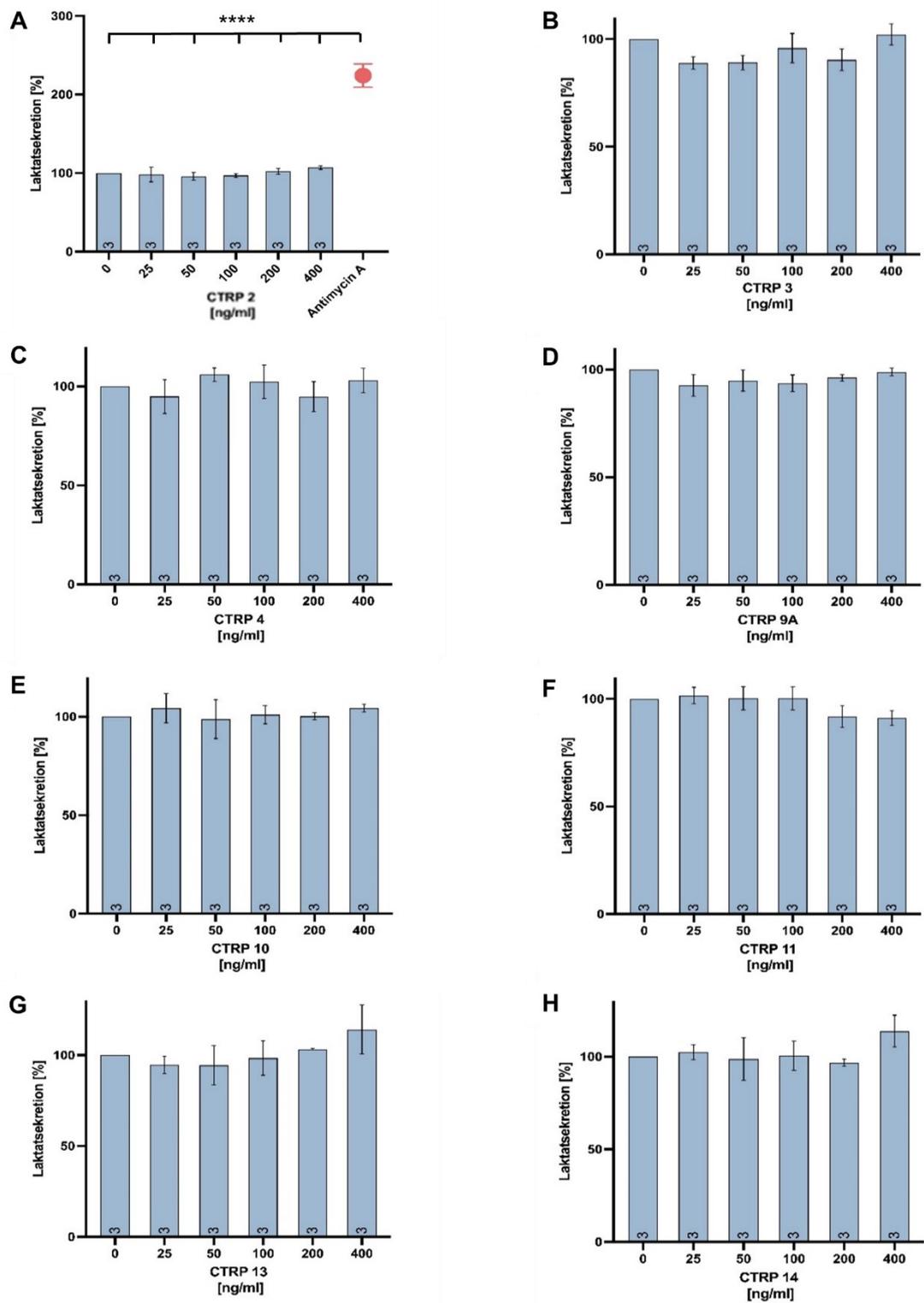


Abbildung 10: Laktatsekretion von H9c2-Zellen nach 24-stündiger CTRP-Behandlung ohne anti-Flag M2 Antikörper. H9c2-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen (25-400 ng/ml) CTRP2, CTRP3, CTRP4, CTRP9A, CTRP10, CTRP11, CTRP13, CTRP14 [A-H] für 24 h behandelt. Anschließend wurde die Laktatkonzentration im Medium ermittelt. Die jeweiligen Ergebnisse wurden gegen die unbehandelten Zellen als Kontrolle normiert. Antimycin A (25 µM) als Positivkontrolle wird in A beispielhaft für alle Diagramme dargestellt. n=3. **** p ≤ 0,0001 zu Antimycin A. Mittelwert ± S.E.M.. Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (one-way ANOVA) und der Tukey-Test als Post-hoc-Test durchgeführt.

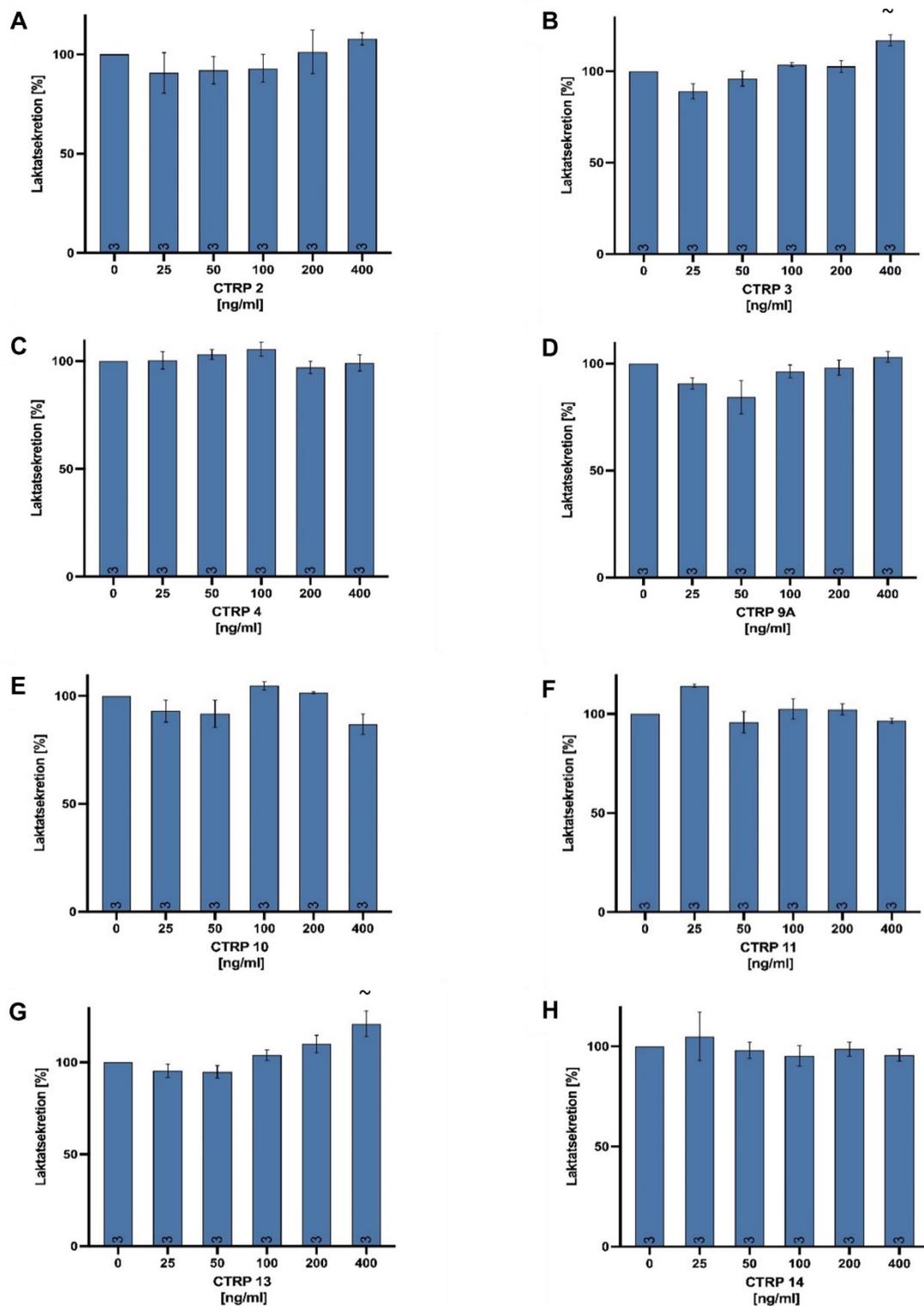


Abbildung 11: Laktatsekretion von H9c2-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit anti-Flag M2 Antikörper vorinkubierten CTRPs. H9c2-Zellen wurden mit anti-Flag M2 Antikörper vorinkubiertem CTRP2, CTRP3, CTRP4, CTRP9A, CTRP10, CTRP11, CTRP13, CTRP14 [A-H] in steigenden Konzentrationen (25-400 ng/ml) für 24 h behandelt. Anschließend wurde die Laktatkonzentration im Medium ermittelt. Die jeweiligen Ergebnisse wurden gegen die unbehandelten Zellen als Kontrolle normiert. n=3. ~ p ≤ 0,05 zu 0 ng/ml. Mittelwert ± S.E.M.. Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) und der Tukey-Test als Post-hoc-Test durchgeführt.

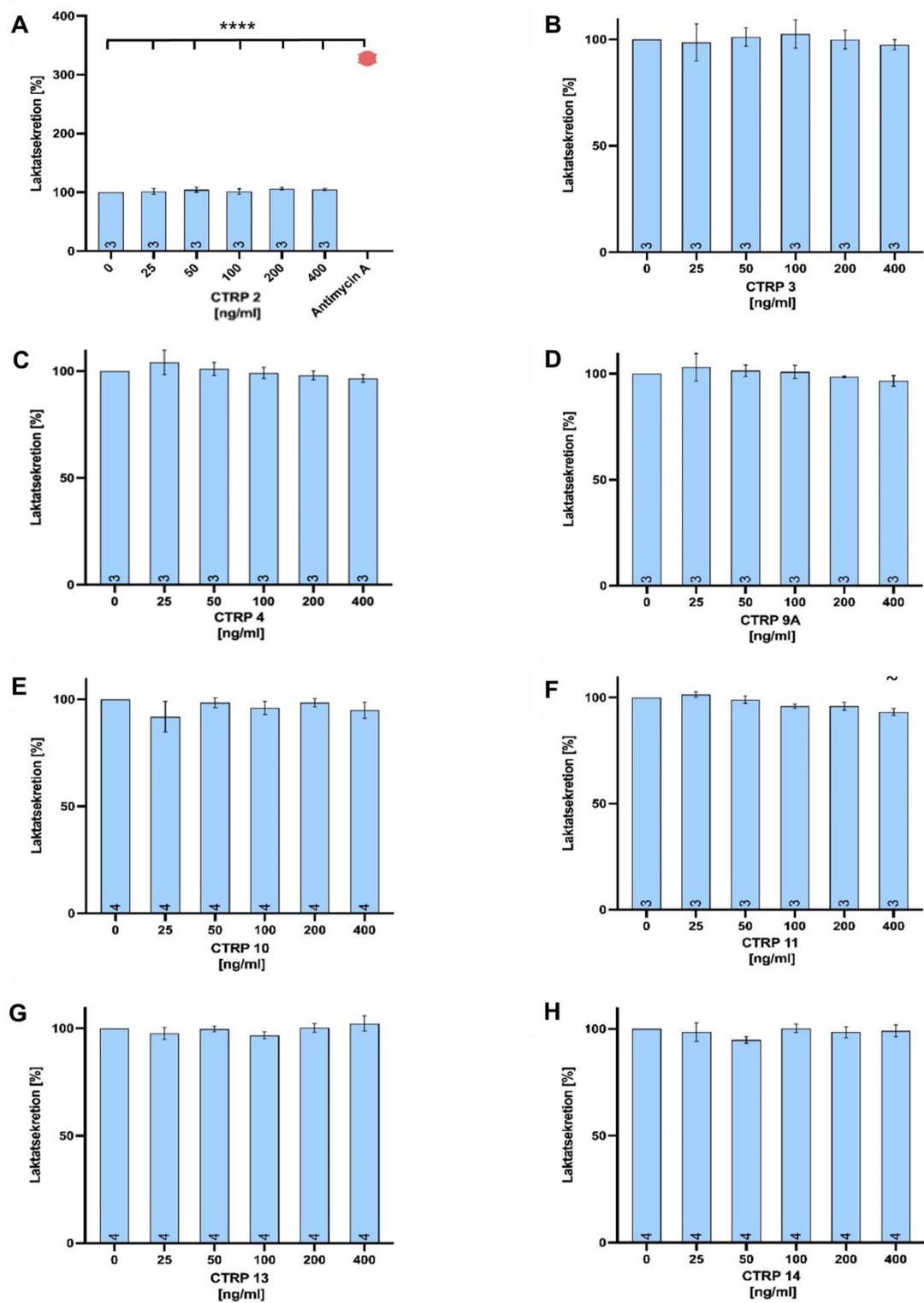


Abbildung 12: Laktatsekretion von H9c2-Zellen nach 72-stündiger CTRP-Behandlung ohne anti-Flag M2 Antikörper. H9c2-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen (25–400 ng/ml) CTRP2, CTRP3, CTRP4, CTRP9A, CTRP10, CTRP11, CTRP13, CTRP14 [A–H] für 72 h behandelt. Anschließend wurde die Laktatkonzentration im Medium ermittelt. Die jeweiligen Ergebnisse wurden gegen die unbehandelten Zellen als Kontrolle normiert. Antimycin A (25 µM) als Positivkontrolle wird in A beispielhaft für alle Diagramme dargestellt. n=3–4. **** p ≤ 0,0001 zu Antimycin A; ~ p ≤ 0,05 zu 0 ng/ml. Mittelwert ± S.E.M.. Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) und der Tukey-Test als Post-hoc-Test durchgeführt.

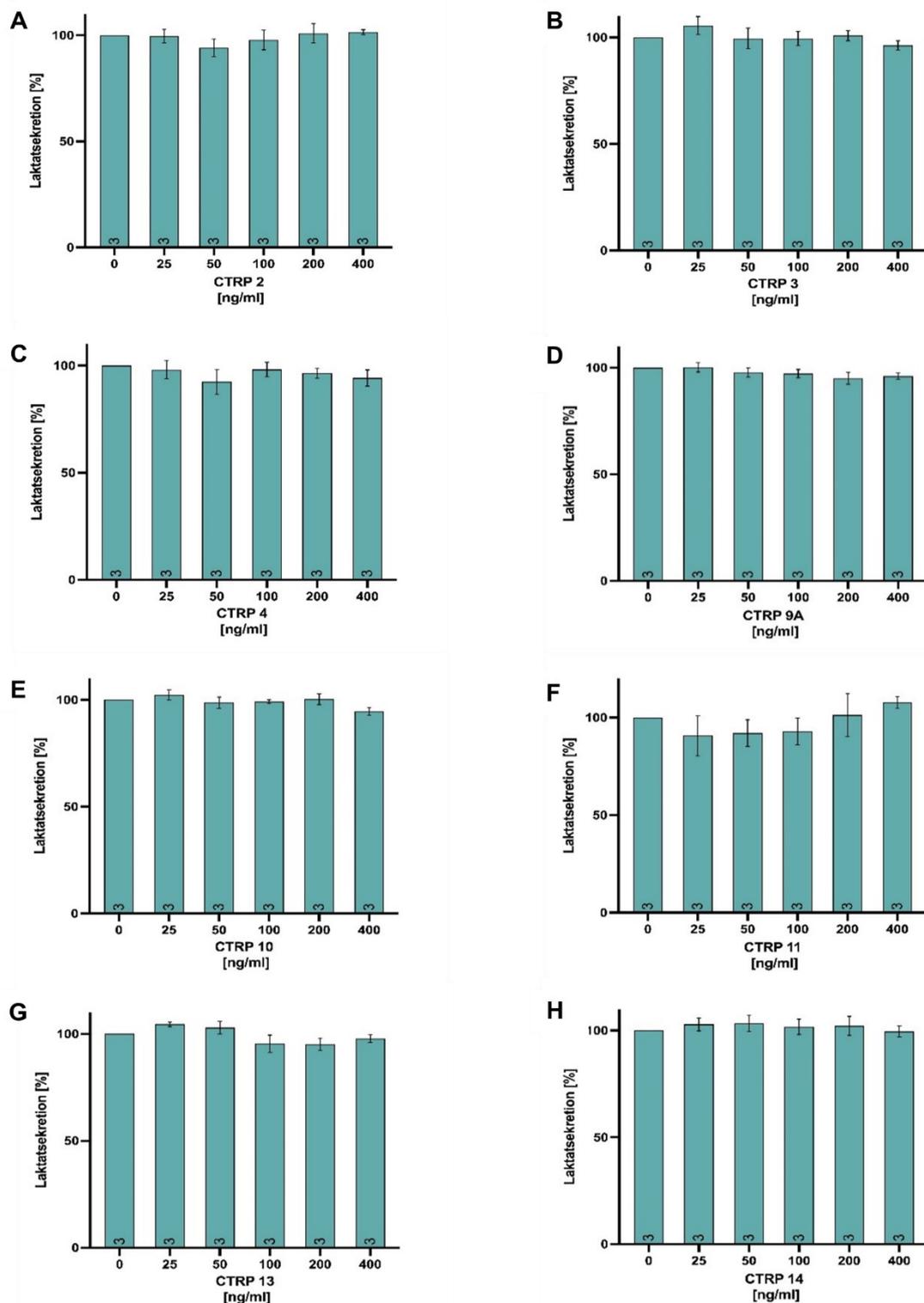


Abbildung 13: Laktatsekretion von H9c2-Zellen nach 72- stündiger Behandlung mit anti-Flag M2 Antikörper vorinkubierten CTRPs. H9c2-Zellen wurden mit anti-Flag M2 Antikörper vorinkubiertem CTRP2, CTRP3, CTRP4, CTRP9A, CTRP10, CTRP11, CTRP13, CTRP14 [A-H] in steigenden Konzentrationen (25-400 ng/ml) für 72 h behandelt. Anschließend wurde die Laktatkonzentration im Medium ermittelt. Die jeweiligen Ergebnisse wurden gegen die unbehandelten Zellen als Kontrolle normiert. n=3. Mittelwert \pm S.E.M.. Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorielles Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) und der Tukey-Test als Post-hoc-Test durchgeführt.

4.3.2 Laktatkonzentration nach CTRP-Behandlung von AC16-Zellen

Mit den Ergebnissen in H9c2-Zellen übereinstimmende Beobachtungen zeigten sich auch in der humanen Kardiomyozyten-Zelllinie AC16. Die Durchführung in AC16-Zellen sollte die Ergebnisse in einer weiteren Zelllinie verifizieren.

Das im Überstand der Zellen gemessene Laktat nach CTRP-Behandlung (CTRP2, CTRP3, CTRP4, CTRP9A, CTRP10, CTRP11, CTRP13, CTRP14) zeigte gegenüber der Positivkontrolle Antimycin A signifikante Veränderungen. Die Positivkontrolle wird aus Übersichtlichkeitsgründen nur in Abbildung 14 und Abbildung 17 dargestellt.

Gegenüber den unbehandelten Zellen konnten nach 24-stündiger CTRP-Inkubation keine signifikanten Veränderungen in der Laktatkonzentration festgestellt werden (Abbildung 14: A-H).

Wenngleich CTRP9A nach 24 h mit zusätzlicher anti-Flag M2 Antikörper-Oligomerisierung bei 25 ng/ml einen leicht signifikanten Anstieg von Laktat aufwies, kann davon ausgegangen werden, dass es keine toxische Wirkung besitzt, da eine weitere Steigerung der CTRP9A-Konzentration zu keinem weiteren Laktatanstieg führte (Abbildung 15: D). Auch die restlichen CTRPs hatten keinen Einfluss auf die Laktatsekretion (Abbildung 15: A-C, E-H).

Wie bereits unter Abschnitt 4.1.2 beschrieben, wurde mit aufgereinigtem CTRP2 eine höhere Konzentration erreicht und damit ein ATP-Assay durchgeführt. Ergänzend wurde die Laktatkonzentration im Überstand der Zellen gemessen, um neben der Viabilität der Zellen auch die mitochondriale Energiegewinnung beurteilen zu können. Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus dem ATP-Assay, welcher keine kardiotoxischen Wirkungen feststellen konnte, wurden auch keine signifikanten Unterschiede in der Laktatkonzentration zwischen Kontrolle und CTRP-Behandlung dokumentiert, sodass kardiotoxische Effekte des CTRP2 mit und ohne Antikörper-Oligomerisierung ausgeschlossen werden können (Abbildung 16: A-B).

Des Weiteren wurden die Laktatwerte für AC16-Zellen nach 72-stündiger CTRP-Behandlung ermittelt. Ohne Antikörper-Oligomerisierung konnten keine signifikanten Veränderungen in der Laktatkonzentration festgestellt werden (Abbildung 17: A-H). In oligomeren Zustand hingegen wurden für CTRP9A gesunkene Laktatkonzentrationen bei den Konzentrationen 25 ng/ml und 50 ng/ml verglichen mit den unbehandelten Zellen dokumentiert (Abbildung 18: D). Dies könnte auf eine gesteigerte mitochondriale Aktivität hindeuten. Da aber auch hier lediglich die geringeren Konzentrationen betroffen sind, wird nicht von einer relevanten Veränderung ausgegangen.

Somit weisen die Untersuchungen mit den verwendeten CTRPs in AC16-Zellen auch auf keine toxischen Effekte hin.

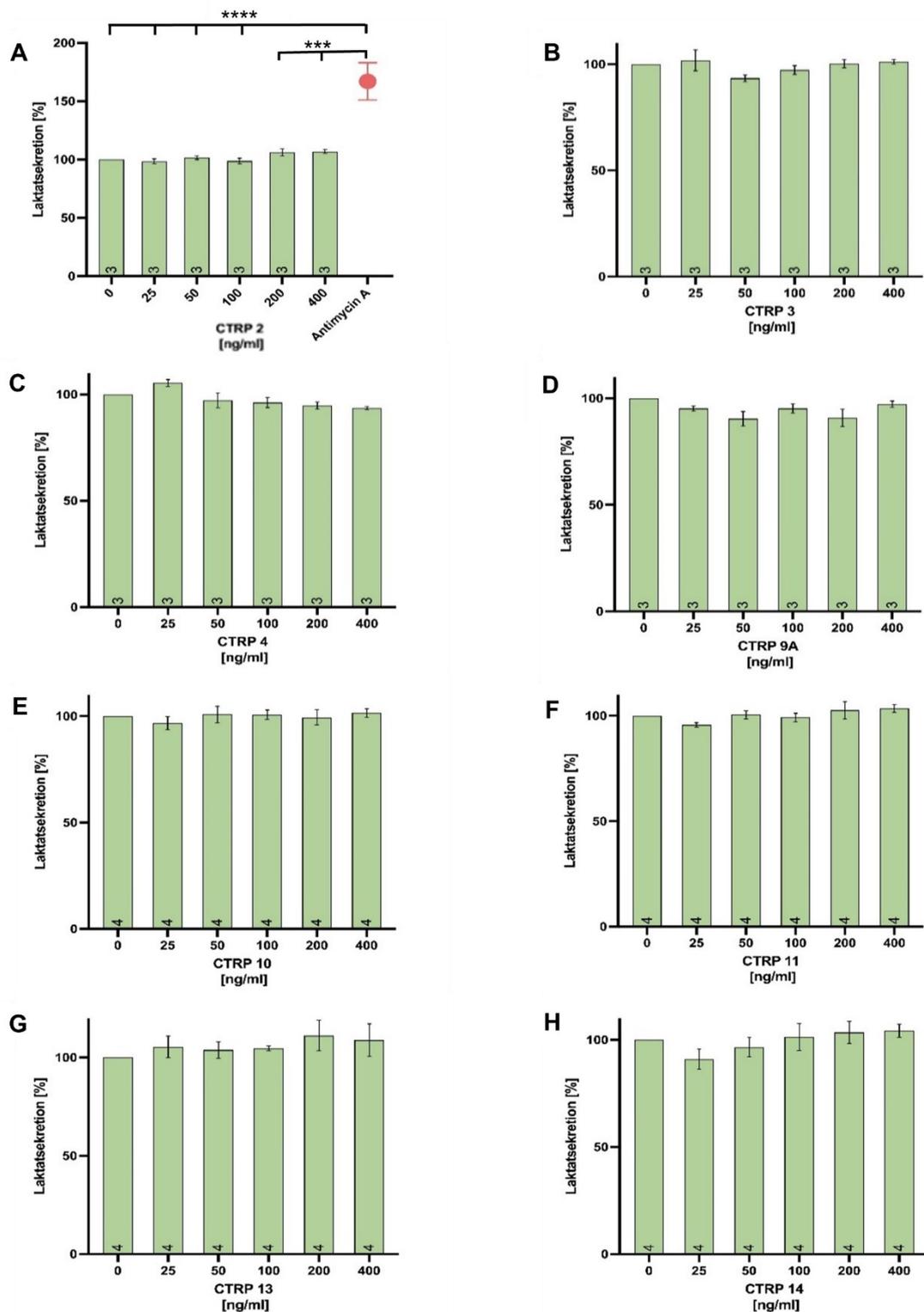


Abbildung 14: Laktatsekretion von AC16-Zellen nach 24-stündiger CTRP-Behandlung ohne anti-Flag M2 Antikörper. AC16-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen (25-400 ng/ml) CTRP2, CTRP3, CTRP4, CTRP9A, CTRP10, CTRP11, CTRP13, CTRP14 [A-H] für 24 h behandelt. Anschließend wurde die Laktatkonzentration im Medium ermittelt. Die jeweiligen Ergebnisse wurden gegen die unbehandelten Zellen als Kontrolle normiert. Antimycin A (25 μ M) als Positivkontrolle wird in A beispielhaft für alle Diagramme dargestellt. n=3-4. **** $p \leq 0,0001$ und *** $p \leq 0,001$ zu Antimycin A. Mittelwert \pm S.E.M.. Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (one-way ANOVA) und der Tukey-Test als Post-hoc-Test durchgeführt.

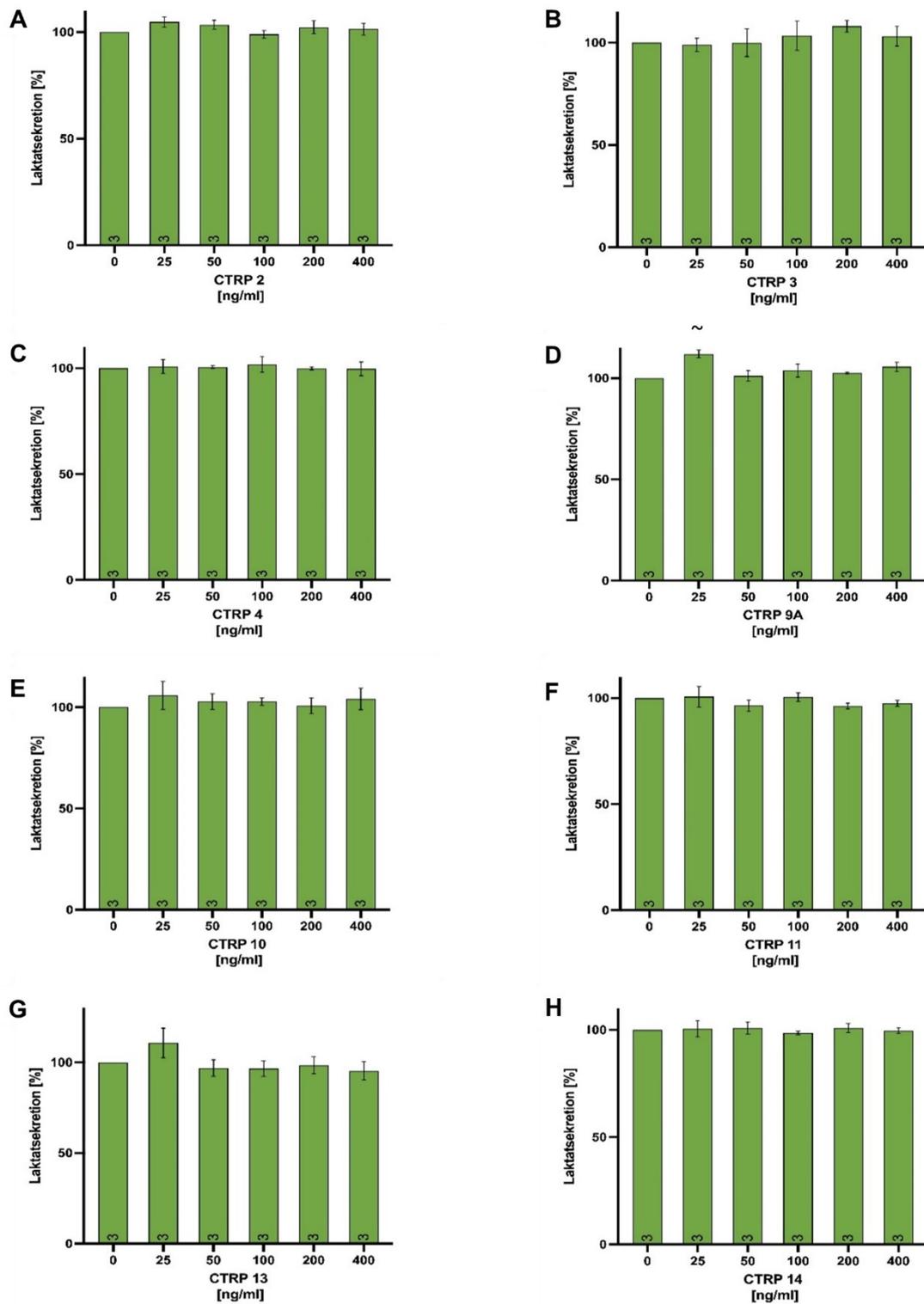


Abbildung 15: Laktatsekretion von AC16-Zellen nach 24- stündiger Behandlung mit anti-Flag M2 Antikörper vorinkubiertem CTRP2, CTRP3, CTRP4, CTRP9A, CTRP10, CTRP11, CTRP13, CTRP14 [A-H] in steigenden Konzentrationen (25-400 ng/ml) für 24 h behandelt. Anschließend wurde die Laktatkonzentration im Medium ermittelt. Die jeweiligen Ergebnisse wurden gegen die unbehandelten Zellen als Kontrolle normiert. n=3. ~ p ≤ 0,05 zu 0 ng/ml. Mittelwert ± S.E.M.. Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) und der Tukey-Test als Post-hoc-Test durchgeführt.

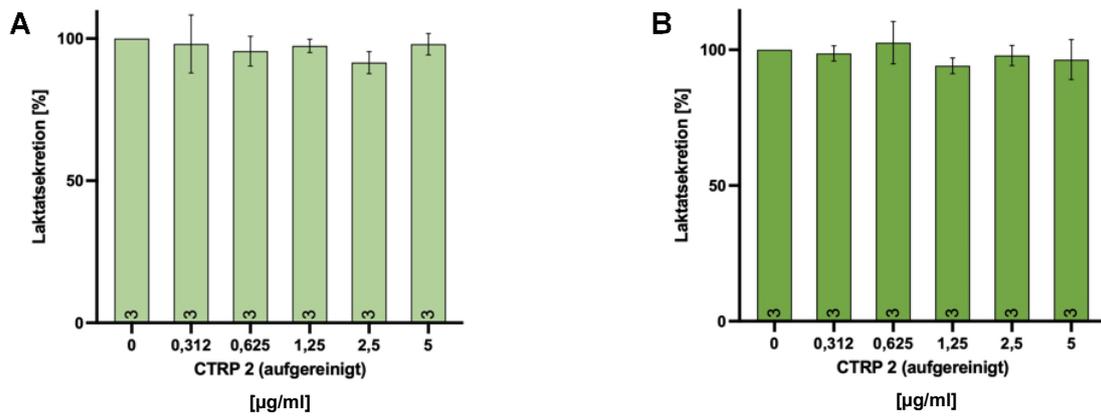


Abbildung 16: Laktatsekretion von AC16-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit aufgereinigtem CTRP2. AC16-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen (0,312-5 µg/ml) CTRP2 **[A, B]** für 24 h behandelt. In **[B]** wurde CTRP2 zuvor mit anti-Flag M2 Antikörper vorinkubiert. Anschließend wurde die Laktatkonzentration im Medium ermittelt. Die jeweiligen Ergebnisse wurden gegen die unbehandelten Zellen als Kontrolle normiert. n=3. Mittelwert ± S.E.M.. Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) und der Tukey-Test als Post-hoc-Test durchgeführt.

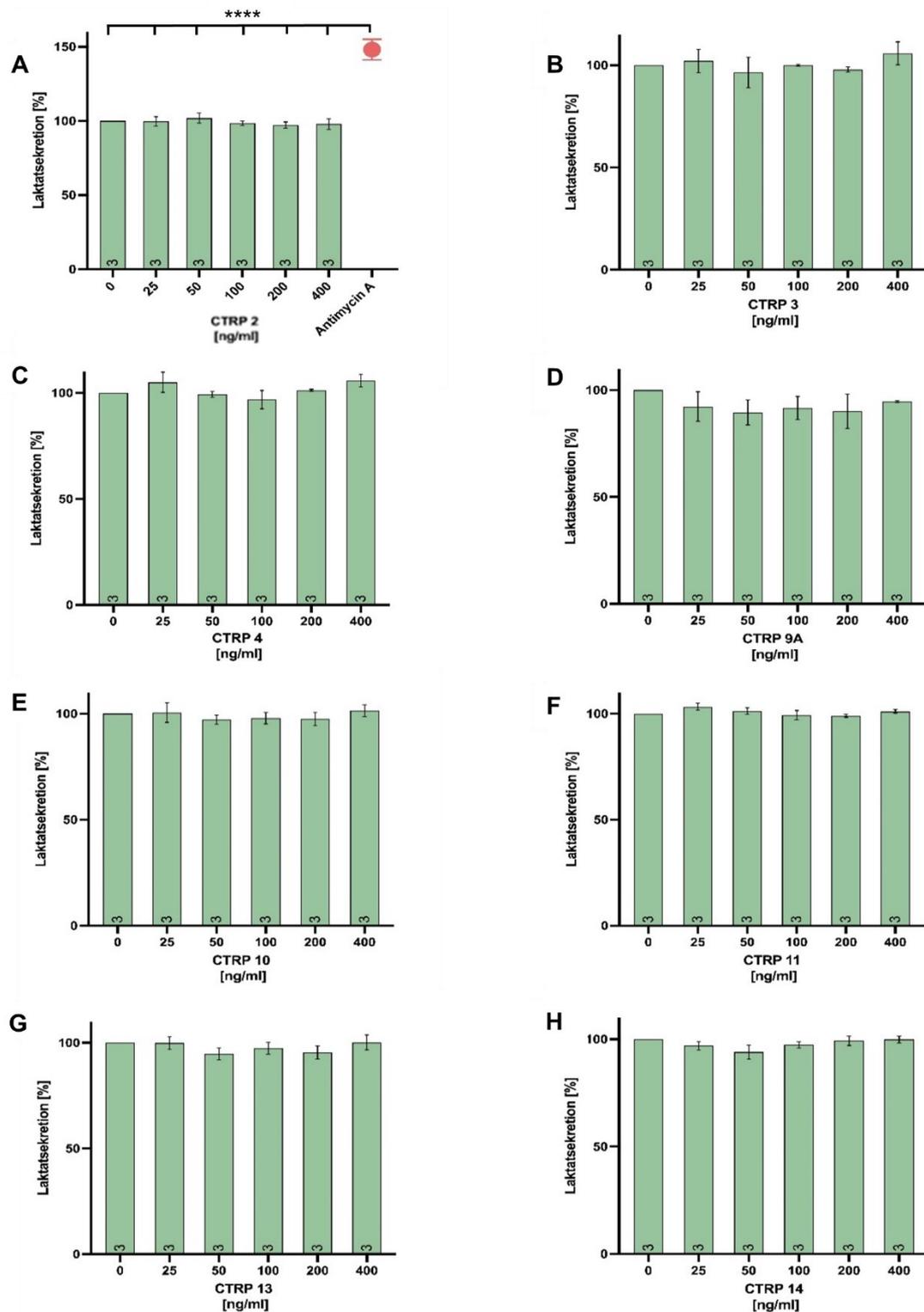


Abbildung 17: Laktatsekretion von AC16-Zellen nach 72-stündiger CTRP-Behandlung ohne anti-Flag M2 Antikörper. AC16-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen (25–400 ng/ml) CTRP2, CTRP3, CTRP4, CTRP9A, CTRP10, CTRP11, CTRP13, CTRP14 [A–H] für 72 h behandelt. Anschließend wurde die Laktatkonzentration im Medium ermittelt. Die jeweiligen Ergebnisse wurden gegen die unbehandelten Zellen als Kontrolle normiert. Antimycin A (25 µM) als Positivkontrolle wird in A beispielhaft für alle Diagramme dargestellt. n=3. **** p < 0,0001 zu Antimycin A. Mittelwert ± S.E.M.. Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (one-way ANOVA) und der Tukey-Test als Post-hoc-Test durchgeführt.

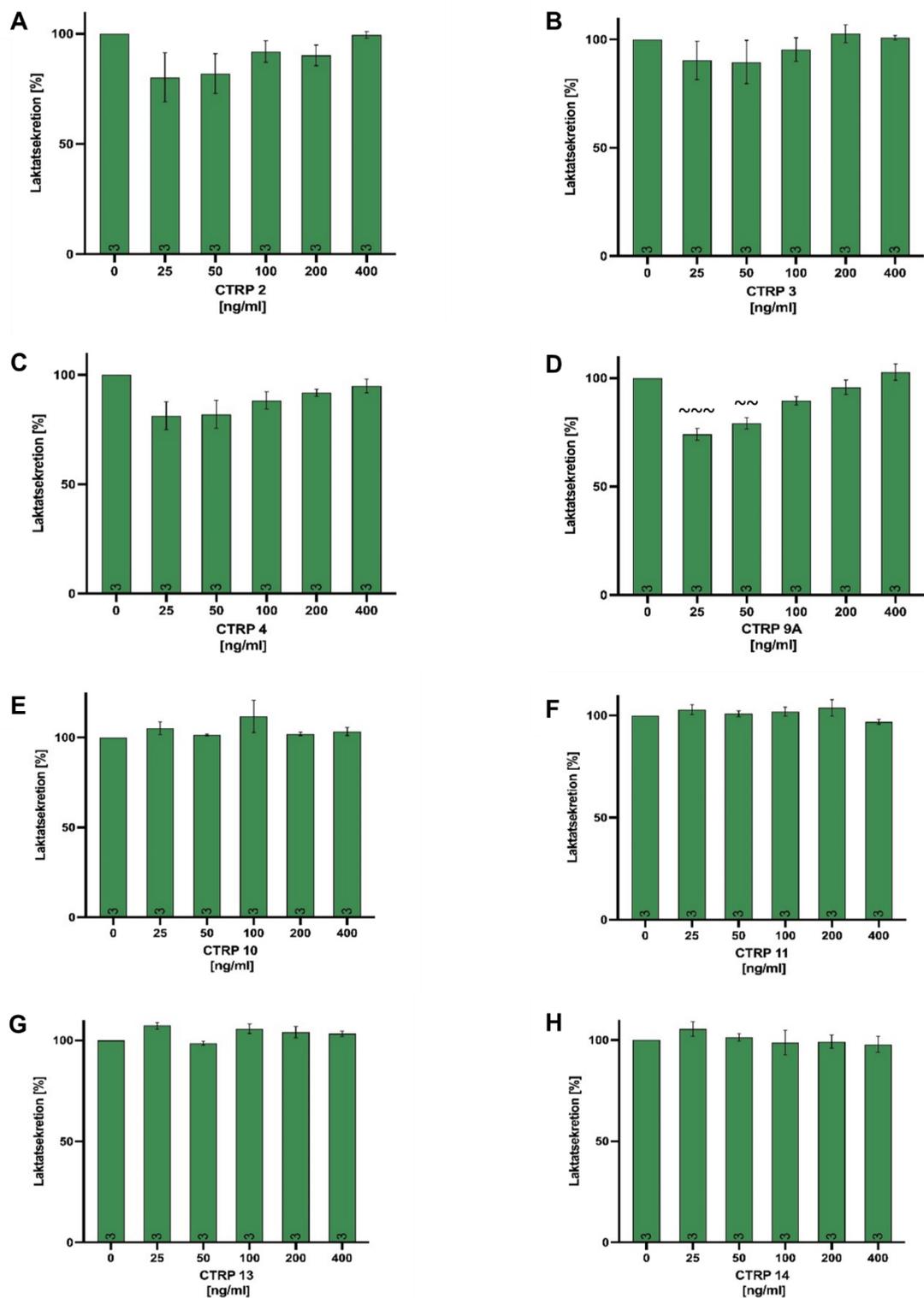


Abbildung 18: Laktatsekretion von AC16-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit anti-Flag M2 Antikörper vorinkubiertem CTRP2, CTRP3, CTRP4, CTRP9A, CTRP10, CTRP11, CTRP13, CTRP14 [A-H] in steigenden Konzentrationen (25-400 ng/ml) für 72 h behandelt. Anschließend wurde die Laktatkonzentration im Medium ermittelt. Die jeweiligen Ergebnisse wurden gegen die unbehandelten Zellen als Kontrolle normiert. n=3. ~ p ≤ 0,001 und ~ ~ p ≤ 0,01 zu 0 ng/ml. Mittelwert ± S.E.M.. Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) und der Tukey-Test als Post-hoc-Test durchgeführt.

4.4 Viabilität und Laktatsekretion von H9c2-Zellen bei zusätzlichem Ischämiestimulus unter CTRP2-Behandlung

Wie Eingangs bereits beschrieben, gehören Adiponektin und die CTRPs derselben Ligandenfamilie an. Adiponektin und auch CTRP9 zeigten in der Literatur unter Ischämie-Reperfusionbedingungen bereits kardioprotektive Wirkung, indem sie die Apoptose AMPK-abhängig reduzierten (Kambara et al., 2012; Shibata et al., 2005).

Da CTRP2 mit 42 % eine ähnlich hohe Aminosäureübereinstimmung mit Adiponektin wie CTRP9 (51 %) aufweist (Li et al., 2021), stellt sich die Frage, ob CTRP2 ebenfalls kardioprotektiv wirken kann. Zusätzlich wurde in der Literatur für murines CTRP2 eine Phosphorylierung der AMPK in C2C12-Myotuben, einer immortalisierten Mauszelllinie detektiert (Wong et al., 2004), sowie eine Aktivierung des AMPK- und Akt-Signalweges, welcher in Rattenkardiomyozyten zu einer gesteigerten Glukoseaufnahme führte (Li et al., 2021). Basierend auf diesen Ähnlichkeiten, sollte ein möglicher Einfluss von CTRP2 auf das Apoptoseverhalten nach ischämischen Bedingungen untersucht werden.

Im durchgeführten Versuch wurden die Zellen für 24 h einer Vorbehandlung mit aufgereinigtem und mittels anti-Flag M2 Antikörper sekundär oligomerisiertem CTRP2 unterzogen. Es folgte die Zugabe von Ischämiebuffer zur Imitation des extrazellulären Milieus, welches sich während einer Ischämiephase im Herzen entwickelt, und daraufhin eine Reperfusionphase mit Nährmedium. Es wurde jeweils frisches CTRP2 zugegeben. Aus der Literatur mit CTRP9 ist bekannt, dass CTRP9 Ischämieschäden am Herzen sowohl durch Zugabe vor der Ischämie-Reperfusion als auch durch Zugabe während der Reperfusion vermindert (Kambara et al., 2012). Die gewählte Konzentration von 5 µg/ml orientierte sich an den, in der Literatur bereits beschrieben Werten zwischen 1-4 µg/ml (Kambara et al., 2012; Li et al., 2021) und wurde etwas höher gewählt, um eindeutige Effekte zu erzielen.

Für den Versuch wurde ein Teil der Zellen mit aufgereinigtem CTRP2, welches sekundär mit anti-Flag M2 Antikörper oligomerisiert wurde, behandelt und ein Teil der Zellen blieb unbehandelt. Beiden Bedingungen wurde Ischämiebuffer hinzugefügt.

Abbildung 19 zeigt die Viabilität der Zellen, welche nach der Reperfusion mittels ATP-Assay gemessen wurde. Den Zellen, die weder mit CTRP2 noch mit Ischämiebuffer inkubierten, wurde eine Viabilität von 100 % zugeordnet. Sie dienten als Kontrolle. Als Positivkontrolle wurde Triton X eingesetzt, welches zu einer deutlichen Abnahme des ATP-Levels führte. Durch reine CTRP2-Behandlung zeigt sich keine Abweichung der Viabilität. Erst der Ischämiebuffer führt zu einer deutlichen Reduktion dieser, wobei kein

Unterschied zwischen mit CTRP2 behandelten oder unbehandelten Zellen zu erkennen ist. Somit konnte mit diesem Versuchsaufbau kein kardioprotektiver Einfluss des CTRP2, in der hier verwendeten Konzentration von 5 µg/ml, festgestellt werden.

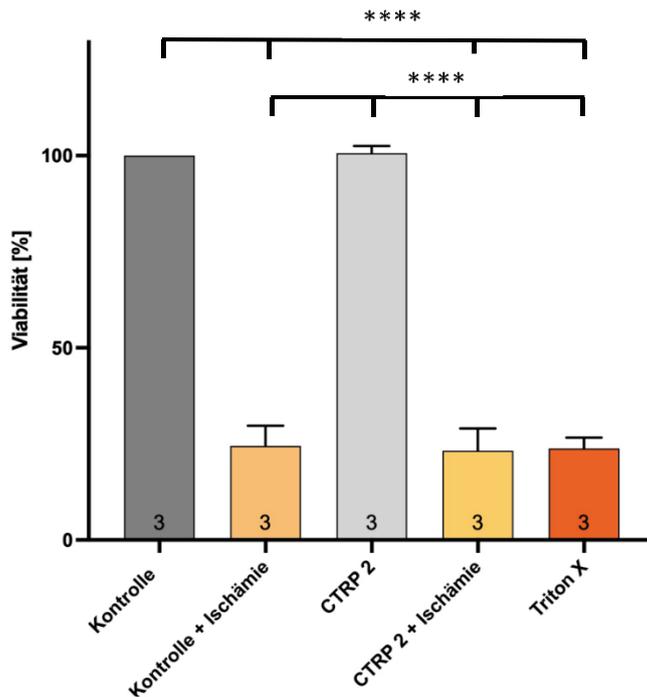


Abbildung 19: Viabilität von H9c2-Zellen nach Ischämie stimulus. H9c2-Zellen wurden für 24 h mit anti-Flag M2 Antikörper vorinkubiert, aufgereinigtem CTRP2 (5 µg/ml) behandelt. Anschließend wurde eine ischämische Phase mittels Ischämiebuffer für 30 min simuliert, welcher eine Reperfusion mit Nährmedium für 15 min folgte. Danach wurde die ATP-Konzentration im Medium ermittelt. Die jeweiligen Ergebnisse wurden gegen die unbehandelten Zellen als Kontrolle normiert. Triton X (4%) dient als Positivkontrolle. n=3. **** p ≤ 0,0001 zur Kontrolle. Mittelwert ± S.E.M. Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) und der Tukey-Test als Post-hoc-Test durchgeführt.

Nach erfolgter Reperfusion wurde mit dem Überstand der Laktat-Assay durchgeführt, um mögliche protektive Wirkungen von CTRP2 auf Mitochondrien zu testen.

Bei einem myokardialen Infarkt kommt es unter anderem zu Schädigungen der Mitochondrien. Durch die ischämische Phase ist die oxidative Phosphorylierung eingeschränkt und somit der ATP-Gewinn reduziert. Die anschließende Reperfusion führt in den Mitochondrien durch die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

und der Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Poren zu Funktionsverlusten (Sun et al., 2021). Diese mitochondrialen Schädigungen wiederum führen laut Warburgs-Hypothese zu einem Anstieg des Laktatspiegels (Vaupel & Multhoff, 2021).

Der Negativkontrolle wurde eine Laktatkonzentration von 100 % zugeteilt. Die Ischämiegruppe zeigte keinen signifikanten Anstieg der Laktatkonzentration. Auch die Behandlung mit CTRP2 zeigte keine signifikante Veränderung der Laktatkonzentration. Somit konnten keine Auswirkungen von CTRP2 auf die Mitochondrien durch diesen Versuchsaufbau gezeigt werden. Da allerdings auch kein ischämieinduzierter Laktatanstieg vorhanden war, ist dieser Versuchsansatz zur Untersuchung protektiver Effekte eher nicht geeignet.

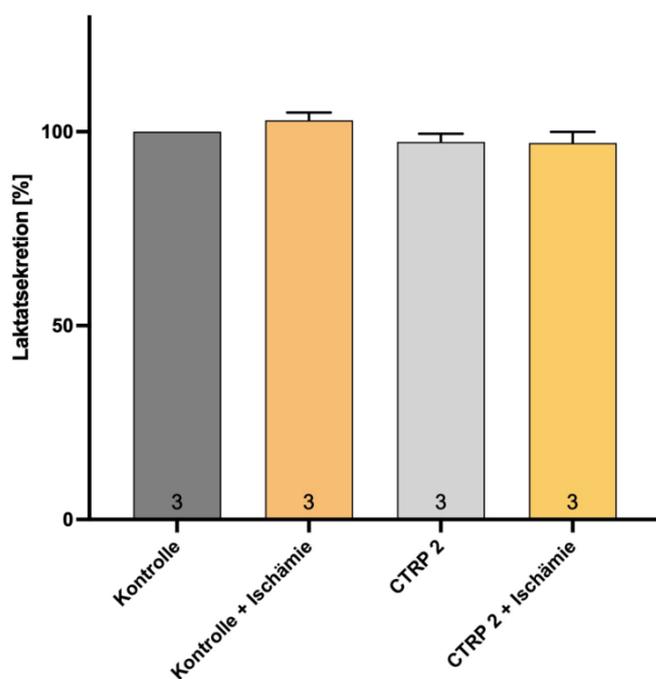


Abbildung 20: Laktatsekretion von H9c2-Zellen nach Ischämiestimulus. H9c2-Zellen wurden für 24 h mit anti-Flag M2 Antikörper vorinkubiertem, aufgereinigtem CTRP2 (5 µg/ml) behandelt. Anschließend wurde eine ischämische Phase mittels Ischämiepuffer für 30 min simuliert, welcher eine Reperfusion mit Nährmedium für 15 min folgte. Danach wurde die Laktatkonzentration im Medium ermittelt. Die jeweiligen Ergebnisse wurden gegen die unbehandelten Zellen als Kontrolle normiert. n=3. Mittelwert ± S.E.M. Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) und der Tukey-Test als Post-hoc-Test durchgeführt.

4.5 Nachweis der mRNA-Expression der Rezeptoren AdipoR1, AdipoR2, BAI3 und RXFP1 in H9c2- und AC16-Zellen

4.5.1 Auswahl der Rezeptoren

Die Identifikation der zellulären Rezeptoren ist für die meisten CTRPs noch nicht erfolgt. Eine Ausnahme bilden dabei Adiponektin und CTRP9, welche an AdipoR1 und AdipoR2 binden (Fang & Judd, 2018; Kambara et al., 2012; Yamauchi et al., 2003; Zheng et al., 2011), sowie CTRP8, welches durch den Rezeptor RXFP1 die Wirksamkeit von Chemotherapeutika in humanen Glioblastomen herabsetzt (Thanasupawat et al., 2018). Für CTRP10, 11, 13, 14 ist der Rezeptor BAI3 bekannt (Bollinger et al., 2011; Fang & Judd, 2018). Ob die Rezeptoren, von denen eine bestätigte Affinität der CTRPs bekannt ist, in den Zelllinien H9c2 und AC16, sowie in neonatalen und adulten Mauskardiomyozyten und kardiomyozytären Mausfibroblasten vorkommen, sollte durch den mRNA-Nachweis erfolgen.

4.5.2 mRNA-Nachweis mittels PCR mit Agarosegelelektrophorese und *Real-Time* PCR

Damit eine Zelle einen Rezeptor exprimieren kann, muss dieser nicht nur in der DNA kodiert sein, sondern diese kodierende Sequenz muss auch aktiv in RNA transkribiert werden. Denn nur mit Hilfe der mRNA ist die Translation, also die Proteinsynthese und somit die Produktion der Rezeptoren, möglich (Netzker, 2016).

Da die Expression von Genen verschiedenen Faktoren unterliegt, wurde ein Teil der Zellen für die mRNA-Gewinnung zusätzlich auf mit Fibronectin beschichteten Platten gegeben, um so die Situation nach Infarkt zu imitieren und eine Expression möglicherweise vorhandener Rezeptoren hervorzurufen. Fibronectin wird nach einem Herzinfarkt sowohl von Menschen als auch Tieren vermehrt exprimiert (Knowlton et al., 1992; Ulrich et al., 1997; Willems et al., 1996). In *in-vitro* Versuchen mit neonatalen Rattenkardiomyozyten konnte zudem beobachtet werden, dass eine Fibronectinbeschichtung neben der Anhaftung der Zellen, auch zu Hypertrophie der Zellen führt (Konstandin et al., 2013; Ogawa et al., 2000). Zudem wurde in neonatalen Rattenkardiomyozyten bereits gezeigt, dass durch eine Fibronectin induzierte Hypertrophie die Expression verschiedener Gene verändert werden kann (Chen et al., 2004).

Für den Rezeptornachweis wurde aus mRNA umgeschriebene cDNA mittels PCR und Agarosegelelektrophorese und des Weiteren mittels *Real-Time* PCR analysiert. Bei der *Real-Time* PCR besteht zusätzlich zur qualitativen Analyse noch die Möglichkeit einer Quantifizierung. Hier wurde sich jedoch auf den qualitativen Nachweis beschränkt. Je höher der ct-Wert, desto mehr Zyklen sind notwendig, um die entsprechende DNA über die Nachweisgrenze hinaus zu vervielfältigen. Als Positivkontrolle wurde mRNA aus Gewebe isoliert, von welchem in der Literatur ein Vorhandensein der Rezeptoren bekannt ist. So wurde für AdipoR1 und AdipoR2 eine Häufung in Fettgewebe (Rasmussen et al., 2006) und für BAI3 und RXFP1 ein Vorkommen im Gehirn (Shiratsuchi et al., 1997; Sutton et al., 2004) dokumentiert. Zudem wurde bei den PCR-Gelen ein 100bp-Marker verwendet, um die angegebenen Laufhöhen der PCR-Produkte zu überprüfen.

4.5.2.1 Rezeptornachweis in H9c2-Zellen

Der Nachweis der Rezeptoren in H9c2-Zellen erfolgte mit den Proben der unbehandelten Zellen und den mit Fibronektin stimulierten Zellen.

Nachdem durch das Programm Primer-BLAST NCBI bestätigt wurde, dass die AdipoR1-Primer sowohl für Maus als auch Ratte geeignet sind, wurde als Positivkontrolle Fettgewebe aus Mäusen verwendet. Die durchgeführte Gelelektrophorese ergab für die Proben der H9c2-Zellen, sowie für die der Fettkontrolle, Banden unterhalb der 100bp-Markierung. Die angegebene Größe des DNA-Stückes beträgt 71bp. Die Wasserkontrolle zeigte keine unspezifischen Bindungen (Abbildung 21). Somit kann man davon ausgehen, dass der AdipoR1-Rezeptor in H9c2-Zellen exprimiert wird.

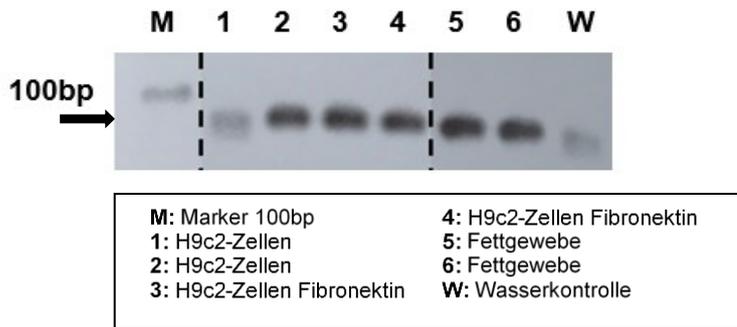


Abbildung 21: mRNA-Expressionskontrolle des Rezeptors AdipoR1 in H9c2-Zellen.

Adiponektin-Rezeptor 1 (AdipoR1) Expression in H9c2-Zellen, die auf Platten ohne (1, 2) oder mit Fibronektinbeschichtung (3, 4) kultiviert wurden. Mausfettgewebe diente als Positivkontrolle (5, 6). Es wurde jeweils die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine PCR durchgeführt. Der Pfeil befindet sich auf Höhe des PCR-Produkts des AdipoR1-Rezeptors. Der Übersichtlichkeit wegen wurde das Gel an den gestrichelten Linien geschnitten.

Bei dem Gel des AdipoR2-Rezeptors ließ sich in den Proben eine Doppelbande erkennen. Beide Banden liefen unterhalb der 100bp-Markierung. Die obere Bande ließ sich der, für das PCR-Produkt errechneten Laufhöhe von 79bp zuordnen. Auch hier wurde, nach entsprechendem Primerblast, Fettgewebe der Maus als Positivkontrolle verwendet. Die Positivkontrolle befand sich auf gleicher Laufhöhe und gibt somit den Nachweis des AdipoR2-Rezeptors in H9c2-Zellen (Abbildung 22). Unspezifische Bindungen wurden mittels Wasserkontrolle ausgeschlossen.

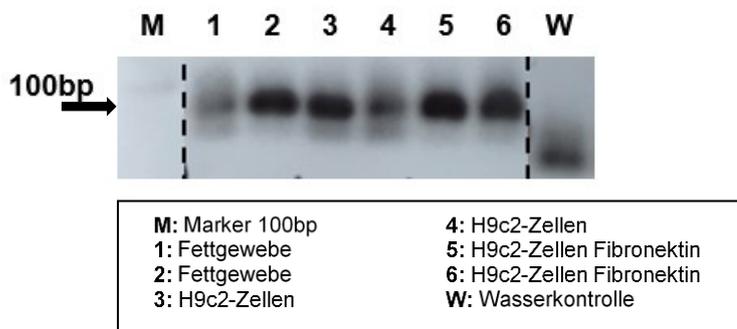


Abbildung 22: mRNA-Expressionskontrolle des Rezeptors AdipoR2 in H9c2-Zellen.

Adiponektin-Rezeptor 2 (AdipoR2) Expression in H9c2-Zellen, die auf Platten ohne (3, 4) oder mit Fibronektinbeschichtung (5, 6) kultiviert wurden. Mausfettgewebe diente als Positivkontrolle (1, 2). Es

wurde jeweils die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine PCR durchgeführt. Der Pfeil befindet sich auf Höhe des PCR-Produkts des AdipoR2-Rezeptors. Der Übersichtlichkeit wegen wurde das Gel an den gestrichelten Linien geschnitten.

Für den BAI3-Rezeptor wurde als Kontrolle die mRNA aus Rattengehirn isoliert und in cDNA umgeschrieben. In diesen Proben zeigte sich auf der Höhe 181pb eine deutliche Bande und bestätigte das Vorkommen des Rezeptors. Die Banden der restlichen H9c2-Proben befanden sich auf Höhe der Wasserprobe, sodass davon ausgegangen werden kann, dass der BAI3-Rezeptor in H9c2-Zellen nicht exprimiert wird (Abbildung 23). Auch in der durchgeführten qPCR konnten keine ct-Werte für die H9c2-Proben ermittelt werden, während für die Gehirnproben ct-Werte um 21 gemessen wurden (Tabelle 1).

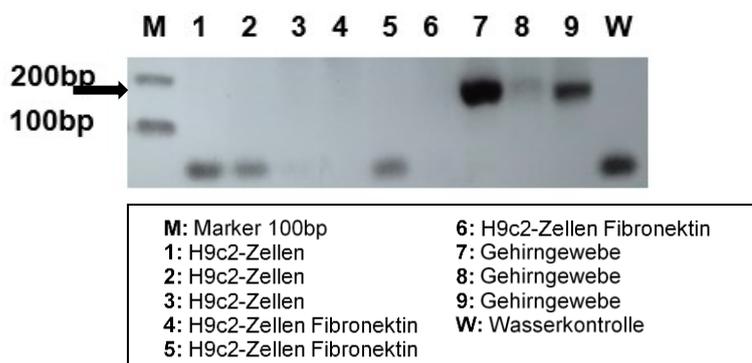


Abbildung 23: mRNA-Expressionskontrolle des Rezeptors BAI3 in H9c2-Zellen.

BAI3-Rezeptorexpression in H9c2-Zellen, die auf Platten ohne (1, 2, 3) oder mit Fibronektinbeschichtung (4, 5, 6) kultiviert wurden. Mausgehirngewebe diente als Positivkontrolle (7, 8, 9). Es wurde jeweils die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine PCR durchgeführt. Der Pfeil befindet sich auf Höhe des PCR-Produkts des BAI3-Rezeptors.

Tabelle 1: ct-Werte des mRNA-Nachweises für den Rezeptor BAI3 in H9c2-Zellen.

BAI3-Rezeptorexpression in H9c2-Zellen, die auf Platten ohne oder mit Fibronektinbeschichtung kultiviert wurden. Mausgehirngewebe diente als Positivkontrolle. Es wurde jeweils die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qPCR durchgeführt. Der ct-Wert (englisch: *threshold-cycle*) gibt die Anzahl der

benötigten Zyklen an, um einen Grenzwert im Fluoreszenzsignal zu erreichen. Je ct-Wert (n) wurden drei Wells gemessen. (n=3).

	ct-Wert 1	ct-Wert 2	ct-Wert 3
cDNA H9c2	-	-	-
cDNA H9c2 Fibronectin	-	-	-
cDNA Gehirngewebe	21,93	21,40	21,91

Die Laufhöhe des PCR-Produktes des RXFP1-Rezeptors ist 160bp. Für die cDNA-Proben des Gehirns konnte auf dieser Höhe auch deutliche Banden erkennen. Die cDNA-Proben der H9c2-Zellen hingegen zeigten nur Primer- oder dNTP-Banden ähnlich wie die H₂O-Probe (Abbildung 24). Dass der Rezeptor RXFP1 somit nicht in H9c2-Zellen exprimiert wird, konnte zusätzlich durch eine qPCR bestätigt werden. Hier konnten abgesehen von der Positivkontrolle keine ct-Werte ermittelt werden (Tabelle 2).

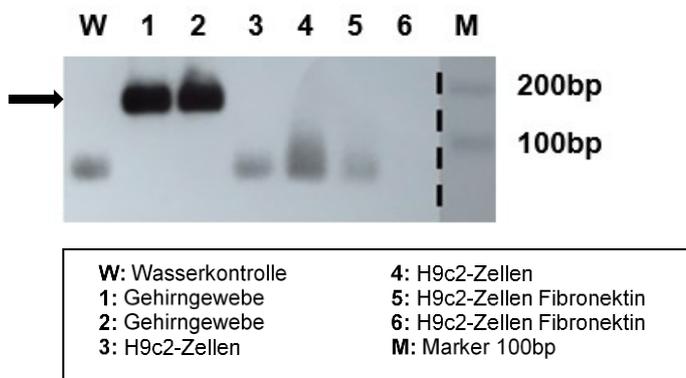


Abbildung 24: mRNA-Expressionskontrolle des Rezeptors RXFP1 in H9c2-Zellen.

RXFP1-Rezeptorexpression in H9c2-Zellen, die auf Platten ohne (3, 4) oder mit Fibronectinbeschichtung (5, 6) kultiviert wurden. Mausgehirngewebe diente als Positivkontrolle (1, 2). Es wurde jeweils die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine PCR durchgeführt. Der Pfeil befindet sich auf Höhe des PCR-Produktes des RXFP1-Rezeptors. Der Übersichtlichkeit wegen wurde das Gel an der gestrichelten Linie geschnitten.

Tabelle 2: ct-Werte des mRNA-Nachweises für den Rezeptor RXFP1 in H9c2-Zellen.

RXFP1-Rezeptorexpression in H9c2-Zellen, die auf Platten ohne oder mit Fibronectinbeschichtung kultiviert wurden. Mausgehirngewebe diente als Positivkontrolle. Es wurde jeweils die mRNA isoliert, in

cDNA umgeschrieben und eine qPCR durchgeführt. Der ct-Wert (englisch: *threshold-cycle*) gibt die Anzahl der benötigten Zyklen an, um einen Grenzwert im Fluoreszenzsignal zu erreichen. Je ct-Wert (n) wurden drei Wells gemessen. (n=2).

	ct-Wert 1	ct-Wert 2
cDNA H9c2	-	-
cDNA H9c2 Fibronectin	-	-
cDNA Gehirngewebe	29,52	29,80

Zusammenfassend kann man von einer Expression der Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 in H9c2-Zellen ausgehen, während die Rezeptoren BAI3 und RXFP1 allem Anschein nach nicht exprimiert werden. Hinsichtlich des zusätzlichen Stimulus Fibronectin konnte keine Hochregulation einer Rezeptorexpression festgestellt werden.

4.5.2.2 Rezeptornachweis in AC16-Zellen

Für den Nachweis der Rezeptoren in AC16-Zellen wurde die cDNA der Zellen, welche einmal mit und einmal ohne Fibronectinstimulus kultiviert wurden, aufgetragen. Als Kontrolle wurde die cDNA der in HEK-Zellen überexprimierten Rezeptoren verwendet. Die Bande des PCR-Produktes des Rezeptors AdipoR1 ist bei 70bp. Auf dieser Höhe zeigte sich auch bei den Proben der Überexpression in HEK-Zellen eine breite Bande. In den Proben mit und ohne Fibronectin war die Bande auf dieser Höhe ebenfalls vorhanden, wenngleich sie deutlich schwächer waren als die Signale aus den transfizierten HEK-Zellen. Die Wasserprobe zeigte keine Verunreinigungen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die PCR funktioniert hat und der Rezeptor AdipoR1 in AC16-Zellen exprimiert wird (Abbildung 25).

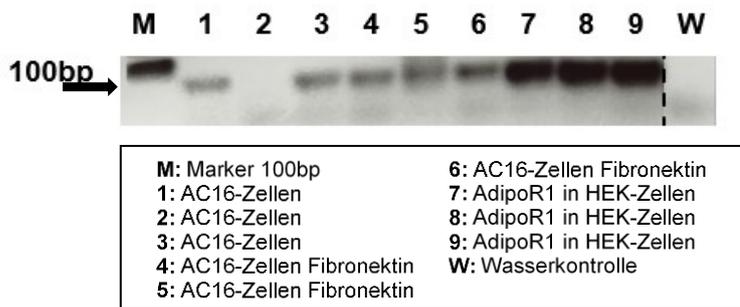


Abbildung 25: mRNA-Expressionskontrolle des Rezeptors AdipoR1 in AC16-Zellen.

Adiponektin-Rezeptor 1 (AdipoR1) Expression in AC16-Zellen, die auf Platten ohne (1, 2, 3) oder mit Fibronectinbeschichtung (4, 5, 6) kultiviert wurden. Die Überexpression des AdipoR1-Rezeptors in HEK-Zellen diente als Positivkontrolle (7, 8, 9). Es wurde jeweils die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine PCR durchgeführt. Der Pfeil befindet sich auf Höhe des PCR-Produkts des AdipoR1-Rezeptors. Der Übersichtlichkeit wegen wurde das Gel an der gestrichelten Linie geschnitten.

Die Laufhöhe des PCR-Produktes des AdipoR2-Rezeptors ist 74bp. Für die cDNA-Proben der AC16-Zellen zeichnete sich eine Doppelbande ab, welche sich ähnlich wie die der Positivkontrollen (transfizierte HEK-Zellen) verhielt, sodass die Bande dem AdipoR2-Rezeptor zugeordnet wurde. Die Wasserprobe zeigte keine Verunreinigungen an. Die mRNA des AdipoR2-Rezeptors konnte somit in AC16-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 26).

Diese Ergebnisse decken sich mit der parallel durchgeführten qPCR, bei der für die cDNA-Proben ct-Werte zwischen 23-24 gemessen wurden (Tabelle 3).

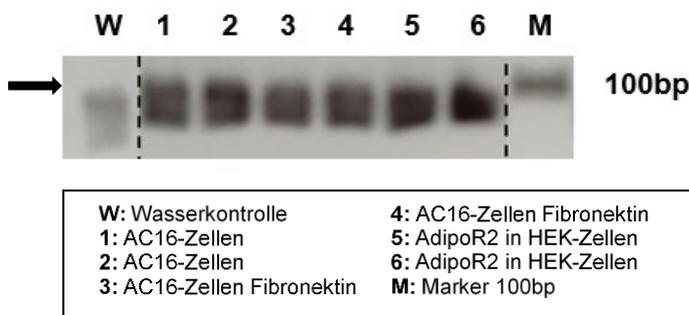


Abbildung 26: mRNA-Expressionskontrolle des Rezeptors AdipoR2 in AC16-Zellen.

Adiponektin-Rezeptor2 (AdipoR2) Expression in AC16-Zellen, die auf Platten ohne (1, 2) oder mit Fibronectinbeschichtung (3, 4) kultiviert wurden. Die Überexpression des AdipoR2-Rezeptors in HEK-Zellen diente als Positivkontrolle (5, 6). Es wurde jeweils die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben

und eine PCR durchgeführt. Der Pfeil befindet sich auf Höhe des PCR-Produkts des AdipoR2-Rezeptors. Der Übersichtlichkeit wegen wurde das Gel an den gestrichelten Linien geschnitten.

Tabelle 3: ct-Werte des mRNA-Nachweises für den Rezeptor AdipoR2 in AC16-Zellen.

Adiponektin-Rezeptor2 (AdipoR2) Expression in AC16-Zellen, die auf Platten ohne oder mit Fibronectinbeschichtung kultiviert wurden. Es wurde jeweils die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qPCR durchgeführt. Der ct-Wert (englisch: *threshold-cycle*) gibt die Anzahl der benötigten Zyklen an, um einen Grenzwert im Fluoreszenzsignal zu erreichen. Je ct-Wert (n) wurden drei Wells gemessen. (n=3).

	ct-Wert 1	ct-Wert 2
cDNA AC16	24,40	24,28
cDNA AC16 Fibronectin	23,70	24,22

Das PCR-Produkt des BAI3-Rezeptors läuft bei 136bp. In der durchgeführten PCR kann man die sich abzeichnenden Banden der verschiedenen Proben dieser Laufhöhe zuordnen. In allen Bedingungen konnte der BAI3-Rezeptor auf diese Weise nachgewiesen werden (Abbildung 27).

In der zusätzlich durchgeführten qPCR wurden für die AC16-Proben ct-Werte zwischen 30-32 registriert, welche die Ergebnisse der PCR stützen. Bei der Positivkontrolle wurden ct-Werte um 16-17 gemessen (Tabelle 4). Es waren weniger Zyklen für die Amplifizierung der cDNA der transfizierten HEK-Proben nötig, um den Grenzwert des Fluoreszenzsignals zu erreichen, als für die Proben der AC16-Zellen.

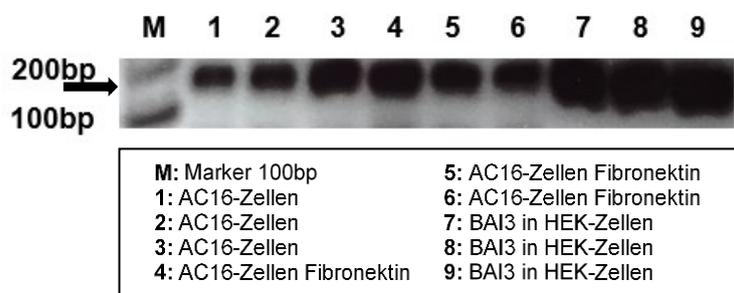


Abbildung 27: mRNA-Expressionskontrolle des Rezeptors BAI3 in AC16-Zellen.

BAI3-Rezeptorexpression in AC16-Zellen, die auf Platten ohne (1, 2, 3) oder mit Fibronectinbeschichtung (4, 5, 6) kultiviert wurden. Die Überexpression des BAI3-Rezeptors in HEK-Zellen diente als

Positivkontrolle (7, 8, 9). Es wurde jeweils die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine PCR durchgeführt. Der Pfeil befindet sich auf Höhe des PCR-Produkts des BAI3-Rezeptors.

Tabelle 4: ct-Werte des mRNA-Nachweises für den Rezeptor BAI3 in AC16-Zellen.

BAI3-Rezeptorexpression in AC16-Zellen, die auf Platten ohne oder mit Fibronectinbeschichtung kultiviert wurden. Die Überexpression des BAI3-Rezeptors in HEK-Zellen diente als Positivkontrolle. Es wurde jeweils die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qPCR durchgeführt. Der ct-Wert (englisch: *threshold-cycle*) gibt die Anzahl der benötigten Zyklen an, um einen Grenzwert im Fluoreszenzsignal zu erreichen. Je ct-Wert (n) wurden drei Wells gemessen. (n=2).

	ct-Wert 1	ct-Wert 2
cDNA AC16	32,58	32,24
cDNA AC16 Fibronectin	30,93	30,70
cDNA BAI3-Überexpression in HEK-Zellen	16,07	17,64

Über die Expression des RXFP1-Rezeptors kann keine Aussage getroffen werden. Es befindet sich keine Bande auf der für das PCR-Produkt errechneten Höhe von 150bp. Selbst durch die cDNA-Proben der HEK-Zellen, in denen der Rezeptor überexprimiert wurde, zeichnete sich keine Bande auf dieser Höhe ab (Abbildung 28).

Ebenso konnten in der qPCR für die Proben der Überexpression keine ct-Werte generiert werden. In den AC16-Proben wurden lediglich für je eine Probe hohe ct-Werte über 34 registriert.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die verwendeten Primer nicht funktionierten, weshalb sich keine finale Aussage über das Vorkommen des RXFP1-Rezeptors in AC16-Zellen treffen lässt (Tabelle 5).

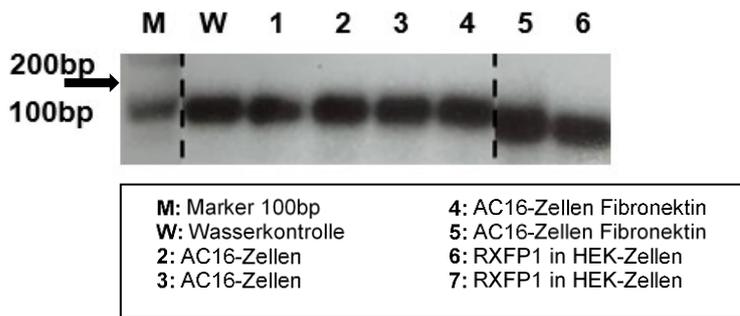


Abbildung 28: mRNA-Expressionskontrolle des Rezeptors RXFP1 in AC16-Zellen.

RXFP1-Rezeptorexpression in AC16-Zellen, die auf Platten ohne (1, 2) oder mit Fibronectinbeschichtung (4, 5) kultiviert wurden. Die Überexpression des RXFP1-Rezeptors in HEK-Zellen diente als Positivkontrolle (6, 7). Es wurde jeweils die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine PCR durchgeführt. Der Pfeil befindet sich auf Höhe des PCR-Produkts des RXFP1-Rezeptors. Der Übersichtlichkeit wegen wurde das Gel an den gestrichelten Linien geschnitten.

Tabelle 5: ct-Werte des mRNA-Nachweises für den RXFP1-Rezeptor in AC16-Zellen.

RXFP1-Rezeptorexpression in AC16-Zellen, die auf Platten ohne oder mit Fibronectinbeschichtung kultiviert wurden. Die Überexpression des RXFP1-Rezeptors in HEK-Zellen diente als Positivkontrolle. Es wurde jeweils die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qPCR durchgeführt. Der ct-Wert (englisch: *threshold-cycle*) gibt die Anzahl der benötigten Zyklen an, um einen Grenzwert im Fluoreszenzsignal zu erreichen. Je ct-Wert (n) wurden drei Wells gemessen. (n=3).

	ct-Wert 1	ct-Wert 2	ct-Wert 3
cDNA AC16	-	-	34,93
cDNA AC16 Fibronectin	-	-	36,54
cDNA RXFP1-Überexpression in HEK-Zellen	-	-	-

Generell wurde in AC16 kein Unterschied in der Expression der Rezeptoren festgestellt, wenn die Zellen mit Fibronectin stimuliert wurden. Die Rezeptoren AdipoR1, AdipoR2, BAI3 kommen unabhängig von weiteren Stimuli in der menschlichen Kardiomyozyten-Zelllinie AC16 vor. Das Vorkommen des Rezeptors RXFP1 kann nicht abschließend beurteilt werden.

4.5.2.3 Rezeptornachweis in Mauszellen

Nachdem der Rezeptornachweis bereits in einer Rattenkardiomyozyten-Zelllinie und einer humanen Zelllinie durchgeführt wurde, sollten auch neonatale und adulte Mauskardiomyozyten sowie kardiozytäre Mausfibroblasten dahingehend untersucht werden. Bei den neonatalen Kardiomyozyten wurden die Platten einmal mit dem Stimulus Fibronectin beschichtet und einmal mit Poly-D-Lysin, welches keine Reaktion der neonatalen Kardiomyozyten induzieren sollte. Als Positivkontrolle diente auch hier Gewebe, für das die Literatur die Expression der Rezeptoren bereits dokumentieren konnte.

Das PCR-Produkt des AdipoR1-Rezeptors läuft bei 71bp. Als Positivkontrolle wurde Fettgewebe der Maus verwendet. Dass die Positivkontrolle die gleiche Bande aufwies, wie die untersuchten Zellen und die Wasserprobe schwächere und tiefer laufende Banden, deutet darauf hin, dass der Rezeptor AdipoR1 in den untersuchten Mauszellen vorhanden ist (Abbildung 29).

Um diese Ergebnisse zu kontrollieren, wurde eine qPCR durchgeführt. Hier wurden ct-Werte zwischen 23-27 gemessen und bestätigen somit das Vorkommen des Rezeptors (Tabelle 6).

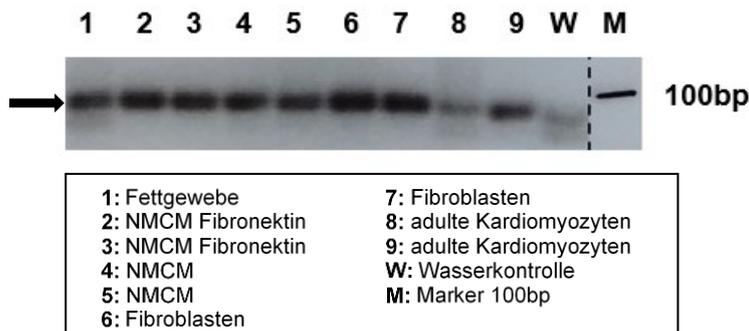


Abbildung 29: mRNA-Expressionskontrolle des Rezeptors AdipoR1 in Mauskardiomyozyten und kardialen Mausfibroblasten. Adiponektin-Rezeptor 1 (AdipoR1) Expression in neonatalen Mauskardiomyozyten (NMCM), die auf Platten mit Fibronectinbeschichtung (1, 2) oder mit Poly-D-Lysin-Beschichtung (4, 5) kultiviert wurden. AdipoR1-Expression in adulten Mauskardiomyozyten (8, 9) und kardialen Mausfibroblasten (6, 7). Mausfettgewebe diente als Positivkontrolle (1). Es wurde jeweils die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine PCR durchgeführt. Der Pfeil befindet sich auf Höhe des PCR-Produkts des AdipoR1-Rezeptors. Der Übersichtlichkeit wegen wurde das Gel an der gestrichelten Linie geschnitten.

Tabelle 6: ct-Werte des mRNA-Nachweises für den AdipoR1-Rezeptor in Mauszellen.

Adiponektin-Rezeptor 1 (AdipoR1) Expression in neonatalen Mauskardiomyozyten (NMCM), die auf Platten mit Fibronectinbeschichtung oder mit Poly-D-Lysin-Beschichtung kultiviert wurden.

AdipoR1-Expression in adulten Mauskardiomyozyten und kardialen Mausfibroblasten. Mausfettgewebe diente als Positivkontrolle. Es wurde jeweils die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qPCR durchgeführt. Der ct-Wert (englisch: *threshold-cycle*) gibt die Anzahl der benötigten Zyklen an, um einen Grenzwert im Fluoreszenzsignal zu erreichen. Je ct-Wert (n) wurden drei Wells gemessen. (n=2).

	ct-Wert 1	ct-Wert 2
cDNA neonatale Muskardiomyozyten Poly-D-Lysin	24,93	24,94
cDNA neonatale Muskardiomyozyten Fibronectin	24,94	24,76
cDNA adulte Muskardiomyozyten	26,48	25,16
cDNA kardiomyozytäre Mausfibroblasten	24,84	23,90
cDNA Fettgewebe	23,87	23,80

Um den AdipoR2-Rezeptor nachzuweisen, wurde wie bei AdipoR1 Mausfettgewebe als Positivkontrolle verwendet. Im Gel stellte sich in allen Proben eine Bande bei ungefähr 79bp dar, was der errechneten Höhe des PCR-Produkts des AdipoR2-Rezeptors entspricht. Die Kontrolle mit Wasser hatte eine geringere Intensität und lief tiefer als die übrigen Proben (Abbildung 30). Zusammen mit den Ergebnissen der qPCR kann von einer Expression des AdipoR2-Rezeptors in den untersuchten Zellproben ausgegangen werden (Tabelle 7).

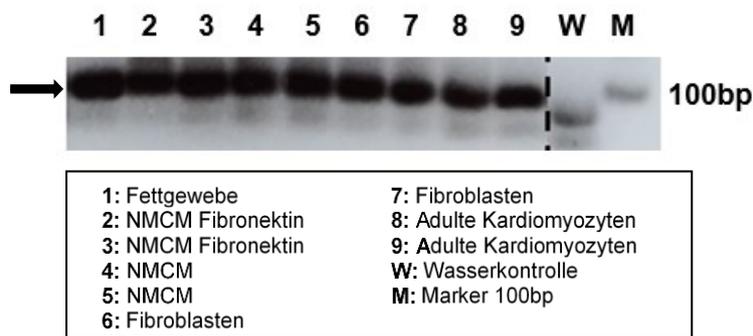


Abbildung 30: mRNA-Expressionskontrolle des Rezeptors AdipoR2 in Mauskardiomyozyten und kardialen Mausfibroblasten. Adiponektin-Rezeptor 2 (AdipoR2) Expression in neonatalen Mauskardiomyozyten (NMCM), die auf Platten mit Fibronectinbeschichtung (1, 2) oder mit Poly-D-Lysin-Beschichtung (4, 5) kultiviert wurden. AdipoR2-Expression in adulten Mauskardiomyozyten (8, 9) und kardialen Mausfibroblasten (6, 7). Mausfettgewebe diente als Positivkontrolle (1). Es wurde jeweils die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine PCR durchgeführt. Der Pfeil befindet sich auf Höhe des PCR-Produkts des AdipoR2-Rezeptors. Der Übersichtlichkeit wegen wurde das Gel an der gestrichelten Linie geschnitten.

Tabelle 7: ct-Werte des mRNA-Nachweises für den AdipoR2-Rezeptor in Mauszellen. Adiponektin-Rezeptor 2 (AdipoR2) Expression in neonatalen Mauskardiomyozyten (NMCM), die auf Platten mit Fibronectinbeschichtung oder mit Poly-D-Lysin-Beschichtung kultiviert wurden. AdipoR2-Expression in adulten Mauskardiomyozyten und kardialen Mausfibroblasten. Mausfettgewebe diente als Positivkontrolle. Es wurde jeweils die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qPCR durchgeführt. Der ct-Wert (englisch: *threshold-cycle*) gibt die Anzahl der benötigten Zyklen an, um einen Grenzwert im Fluoreszenzsignal zu erreichen. Je ct-Wert (n) wurden drei Wells gemessen. (n=2).

	ct-Wert 1	ct-Wert 2
cDNA neonatale Muskardiomyozyten Poly-D-Lysin	27,55	26,96
cDNA neonatale Muskardiomyozyten Fibronectin	25,75	26,81
cDNA adulte Muskardiomyozyten	27,87	26,67
cDNA kardiomyozytäre Mausfibroblasten	26,82	26,54
cDNA Fettgewebe	22,71	21,95

Die Untersuchung der Mauszellen ergab in PCR und qPCR, dass der Rezeptor BAI3 nicht exprimiert wird. In der PCR zeigte nur die cDNA des Gehirngewebes der Maus, welche als Positivkontrolle diente, bei der für das PCR-Produkt des BAI3-Rezeptors errechneten Höhe von 177bp eine deutliche Bande (Abbildung 31).

In der qPCR konnten keine oder nur sehr hohe Werte über 35 gemessen werden, während in der Positivkontrolle die ct-Werte zwischen 21-24 auf eine hohe Expression des Rezeptors hinweisen (Tabelle 8). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass der Rezeptor in den untersuchten Zellen nicht in relevanten Mengen exprimiert wird.

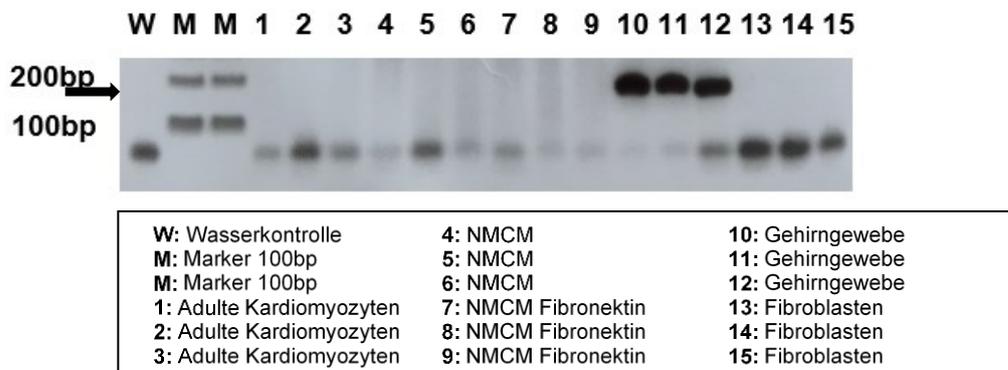


Abbildung 31: mRNA-Expressionskontrolle des Rezeptors BAI3 in Mauskardiomyozyten und kardialen Mausfibroblasten. BAI3-Rezeptorexpression in neonatalen Mauskardiomyozyten (NMCM), die auf Platten mit Poly-D-Lysin-Beschichtung (4, 5, 6) oder mit Fibronectinbeschichtung (7, 8, 9) kultiviert wurden. BAI3-Expression in adulten Mauskardiomyozyten (1, 2, 3) und kardialen Mausfibroblasten (13, 14, 15). Mausgehirngewebe diente als Positivkontrolle (10, 11, 12). Es wurde jeweils die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine PCR durchgeführt. Der Pfeil befindet sich auf Höhe des PCR-Produkts des BAI3-Rezeptors.

Tabelle 8: ct-Werte des mRNA-Nachweises für den BAI3-Rezeptor in Mauszellen.

BAI3-Rezeptorexpression in neonatalen Mausekardiomyozyten (NMCM), die auf Platten mit Fibronectinbeschichtung oder mit Poly-D-Lysin-Beschichtung kultiviert wurden. BAI3-Expression in adulten Mausekardiomyozyten und kardialen Mausekardiomyozyten. Mausekardiomyozyten diente als Positivkontrolle. Es wurde jeweils die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qPCR durchgeführt. Der ct-Wert (englisch: *threshold-cycle*) gibt die Anzahl der benötigten Zyklen an, um einen Grenzwert im Fluoreszenzsignal zu erreichen. Je ct-Wert (n) wurden drei Wells gemessen. (n=3).

	ct-Wert 1	ct-Wert 2	ct-Wert 3
cDNA neonatale Mausekardiomyozyten Poly-D-Lysin	-	-	-
cDNA neonatale Mausekardiomyozyten Fibronectin	-	35,95	-
cDNA adulte Mausekardiomyozyten	-	-	36,28
cDNA kardiomyozytäre Mausekardiomyozyten	-	-	36,97
cDNA Gehirngewebe	21,96	23,20	22,27

Für den Rezeptor RXFP1 konnte das Vorkommen in Mauszellen dokumentiert werden. Die Laufhöhe des PCR-Produktes ist 90bp. Die entstandenen Banden der Proben lassen sich dieser Höhe zuordnen. Auch die cDNA von Gehirngewebe der Maus, welche als Positivkontrolle fungierte, lief auf gleicher Höhe (Abbildung 32).

In der zusätzlich durchgeführten qPCR konnten in den Proben ct-Werte zwischen 26-36 gemessen werden (Tabelle 9).

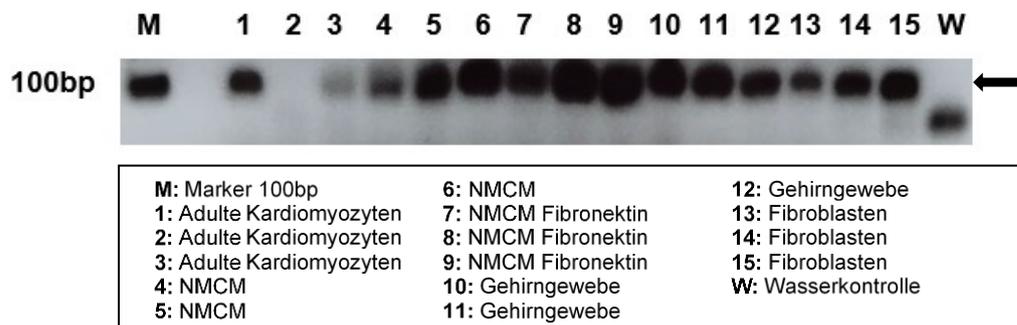


Abbildung 32: mRNA-Expressionskontrolle des Rezeptors RXFP1 in Mauskardiomyozyten und kardialen Mausfibroblasten. RXFP1-Rezeptorexpression in neonatalen Mauskardiomyozyten (NMCM), die auf Platten mit Poly-D-Lysin-Beschichtung (4, 5, 6) oder mit Fibronektinbeschichtung (7, 8, 9) kultiviert wurden. RXFP1-Expression in adulten Mauskardiomyozyten (1, 2, 3) und kardialen Mausfibroblasten (13, 14, 15). Mausgehirngewebe diente als Positivkontrolle (10, 11, 12). Es wurde jeweils die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine PCR durchgeführt. Der Pfeil befindet sich auf Höhe des PCR-Produkts des RXFP1-Rezeptors.

Tabelle 9: ct-Werte des mRNA-Nachweises für den RXFP1-Rezeptor in Mauszellen.

RXFP1-Rezeptorexpression in neonatalen Mauskardiomyozyten (NMCM), die auf Platten mit Fibronektinbeschichtung oder mit Poly-D-Lysin-Beschichtung kultiviert wurden. RXFP1-Expression in adulten Mauskardiomyozyten und kardialen Mausfibroblasten. Mausgehirngewebe diente als Positivkontrolle. Es wurde jeweils die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qPCR durchgeführt. Der ct-Wert (englisch: threshold-cycle) gibt die Anzahl der benötigten Zyklen an, um einen Grenzwert im Fluoreszenzsignal zu erreichen. Je ct-Wert (n) wurden drei Wells gemessen. (n=2).

	ct-Wert 1	ct-Wert 2
cDNA neonatale Mauskardiomyozyten Poly-D-Lysin	30,60	29,30
cDNA neonatale Mauskardiomyozyten Fibronektin	30,39	29,06
cDNA adulte Mauskardiomyozyten	32,47	36,23
cDNA kardiomyozytäre Mausfibroblasten	31,27	31,30
cDNA Gehirngewebe	26,51	27,53

In neonatalen als auch adulten Mauskardiomyozyten, sowie in kardiomyozytären Mausfibroblasten werden die Rezeptoren AdipoR1, AdipoR2 und RXFP1 exprimiert. Sowohl die Beschichtung der Platten mit Poly-D-Lysin als auch mit Fibronectin zeigen eine Expression der Rezeptoren. Der BAI3-Rezeptor wird dagegen nicht in den untersuchten Mauszellen exprimiert. Auch ein zusätzlicher Fibronectinstimulus hatte keine Auswirkungen auf dessen Expression.

5 Diskussion

5.1 Viabilität und Laktatsekretion von H9c2-Zellen und AC16-Zellen nach CTRP-Behandlung

Das metabolische Syndrom als Volkskrankheit hat verschiedene Manifestationen. Und so vielfältig die Ausprägungen des metabolischen Syndroms sind, ist auch die strukturell verwandte Ligandenfamilie der *C1q/tumor necrosis factor-related proteins* sehr umfangreich und zum Teil different in ihren Effekten. Es wurden in der Literatur bereits positive Wirkungen dieser Liganden auf Stoffwechsel und Herz beschrieben, sodass man sich erhofft, die CTRPs zukünftig als Therapeutika für das metabolische Syndrom einsetzen zu können. Um diesem Ziel näher zu kommen, müssen die CTRPs umfangreich getestet werden. In dieser Arbeit wurde unter anderem die kardiotoxische Wirkung auf H9c2- und AC16-Zellen mittels ATP- und Laktat-Assay untersucht.

Dabei führte keines der verwendeten CTRPs zu kardiotoxischen Effekten.

In H9c2-Zellen zeigte CTRP2 in einigen Konzentrationen eine leichte Steigerung der ATP-Konzentration im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Dies würde bedeuten, dass die Anzahl an metabolisch aktiven Zellen, beziehungsweise die ATP-Produktion der Zellen durch CTRP2-Zugabe gesteigert wird. Ein vergleichbarer Anstieg der ATP-Konzentration konnte in der Literatur bereits bei CTRP3 beobachtet werden. Feng et al. konnten diese Veränderungen auf eine gesteigerte Expression von Komplex I, II, III, V in der Mitochondrienmembran zurückführen, welche bei der oxidativen Phosphorylierung und somit in der ATP-Produktion beteiligt sind (Feng et al., 2016). Es wäre denkbar, dass die in dieser Arbeit hervorgerufenen Veränderungen durch CTRP2 auf ähnlichen Expressionseffekten beruhen. Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob CTRP2 weitere Ähnlichkeiten zu CTRP3 aufweist und somit auch die, für CTRP3 nachgewiesenen, positive Effekte auf Kardiomyozyten bei Ischämie-Reperfusion (Song et al., 2022) durch CTRP2 hervorgerufen werden können.

Feng et al. dokumentierten in ihren Versuchen mit CTRP3 einen Anstieg in der ATP-Konzentration nach 24 h und 48 h mit Konzentrationen zwischen 1-4 µg/ml CTRP3. Eine Konzentration von 0,5 µg/ml führte dabei jedoch noch zu keiner signifikanten Erhöhung (Feng et al., 2016). In dieser Arbeit hingegen zeigte CTRP3 schon bei einer geringeren Konzentration von 400 ng/ml eine Erhöhung der Viabilität der H9c2-Zellen nach 24 h. Im Gegensatz zu dieser positiven Wirkung zeichnete sich bei der gleichen Konzentration von CTRP3, wenn es durch den Antikörper oligomerisiert wurde,

allerdings eine Steigerung der Laktatsekretion ab. Dies deutet darauf hin, dass CTRP3 die mitochondriale Energiegewinnung der H9c2-Zellen beeinflusst.

Da in der Literatur für globuläres CTRP3 förderliche Wirkungen auf die mitochondriale Biogenese beschrieben wurden (Zhang et al., 2017) und ohne Antikörperzugabe in dieser Arbeit keine signifikanten Laktaterhöhungen dokumentiert wurden, stellt sich die Frage, ob die Oligomerisierung durch den Antikörper die Wirkung des CTRPs verändert. Dass trimere globuläre CTRPs (gCTRPs), also lösliche CTRP-Varianten, welche lediglich die CTRP-Domäne enthalten, andere Effekte hervorrufen als oligomerisierte komplette CTRPs, wurde bereits anhand von Adiponektin und CTRP12 demonstriert (Tsao et al., 2003; Wei et al., 2012). Oligomerisierte Adiponektin-Trimere stimulieren den NFκB-Signalweg, wohingegen Adiponektin-Trimere den AMPK-Signalweg aktivieren (Tsao et al., 2003). Weiterhin wurde für CTRP12 festgestellt, dass lediglich *full-length* CTRP12, nicht jedoch globuläres CTRP12 die Glukoseaufnahme in Adipozyten steigert. Dies beruht auf einer stärkeren Stimulation der Akt-Phosphorylierung durch *full-length* CTRP12 (Wei et al., 2012). Somit kann eine durch Oligomerisierung veränderte Signalwegaktivierung also durchaus zu abweichenden Ergebnissen im Vergleich zu trimeren CTRPs führen, wie es in dieser Arbeit bei CTRP3 beobachtet wurde.

Für oligomerisiertes CTRP11 wurden im ATP-Assay in H9c2-Zellen signifikant erhöhte Werte nach 24 h für die Konzentrationen 25 ng/ml und 200 ng/ml dokumentiert. Generell zeigte sich aber für alle Konzentrationen eine leichte Erhöhung der ATP-Konzentration, sodass man davon ausgehen kann, dass CTRP11 eine positive Wirkung auf die Kardiomyozyten ausübt.

Im Laktat-Assay konnte für CTRP11 ohne Antikörper nach 72 h eine verringerte Laktatkonzentration beobachtet werden, was ein Zeichen für eine gesteigerte mitochondriale Aktivität darstellen kann. Leider konnten bei der Recherche keine Untersuchungen gefunden werden, die die Auswirkungen von CTRP11 auf Kardiomyozyten dokumentieren. Positive Wirkungen von CTRP11 zeigen sich jedoch in Endothelzellen, in denen CTRP11 über den ERK1/2-Signalweg zur Angiogenese beizutragen scheint (F. Liu et al., 2017), weshalb auch im Herzen positive Effekte durchaus möglich sind.

400 ng/ml oligomerisiertes CTRP13 steigerte in H9c2-Zellen die Laktatsekretion nach 24 h signifikant und deutet somit auf eine Störung der mitochondrialen Aktivität hin. Wenngleich in der Literatur keine Ergebnisse zu finden sind, die den Laktatgehalt nach CTRP13-Behandlung dokumentieren, gibt es Versuche, bei denen die Überexpression von CTRP13 positive Wirkungen auf die Viabilität von Kardiomyozyten zeigte (Jiang et

al., 2021). Eine kardiotoxische Wirkung für CTRP13 ist somit bisher nicht bekannt. Die Erhöhung der hier beobachteten Laktatsekretion scheint nicht relevant zu sein, ließe sich aber durch eine Erhöhung der Anzahl der Versuchsdurchführungen weiter überprüfen. In AC16-Zellen zeigten in dieser Arbeit nur CTRP4 und CTRP9A signifikante Ergebnisse. Oligomerisiertes CTRP4 reduzierte nach 72-stündiger Behandlung mit einer Konzentration von 25 ng/ml die Zellviabilität signifikant. Eine Erhöhung der Konzentration führte jedoch zu einer Abnahme des toxischen Effektes, sodass eine tatsächliche toxische Wirkung auf Kardiomyozyten unwahrscheinlich erscheint. Auch in der Literatur finden sich bisher keine Hinweise auf derartige Effekte.

Bei CTRP9A war in der oligomerisierten Form in einer Konzentration von 25 ng/ml eine Steigerung der Laktatkonzentration nach 24 h zu beobachten. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 72 h kehrte diesen Effekt jedoch ins Gegenteil um, sodass die Konzentrationen 25 ng/ml und 50 ng/ml eine Reduktion der Laktatsekretion bewirkten. Dies würde bedeuten, dass sich einer kurzfristigen Schädigung der kardiomyozytären Mitochondrien eine Erholungsphase anschließt, welche sich dann in eine positive Wirkung umkehrt. Zudem zeigten nur die niedrigen Konzentrationen einen Effekt, sodass die Relevanz dieser Beobachtungen in Frage gestellt werden sollte.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass sich bei den Versuchen und signifikanten Ergebnissen eher keine Konzentrationsabhängigkeiten abzeichneten, sodass die Veränderungen als nicht relevant betrachtet werden können.

Um nicht nur die Sicherheit der CTRPs zu bestätigen, sondern auch protektive Effekte untersuchen zu können, sollten die Konzentrationen der CTRPs erhöht werden, da in der Literatur ähnliche Versuche mit höheren Konzentrationen zu positiven Viabilitätsveränderungen geführt haben. Für CTRP9 in H9c2 wurde nach 24 h eine Steigerung der Zellviabilität und des ATP-Levels bei einer Konzentration von 4 µg/ml dokumentiert (Li et al., 2021) und auch CTRP3 wirkt in der Literatur erst ab einer Konzentration von 1 µg/ml viabilitätssteigernd (Feng et al., 2016).

Therapeutische Erfolge konnten in *in-vitro* Untersuchungen unter hypoxischen Bedingungen mit Konzentrationen von 10 µg/ml erreicht werden und im Mausmodell mit 1 µg/g Maus (Kambara et al., 2012).

5.2 CTRP2-Behandlung mit zusätzlichem Ischämiestimulus von H9c2-Zellen

Aus der Literatur ist bekannt, dass CTRP9 Ischämieschäden am Herzen minimiert (Kambara et al., 2012).

Aufgrund der Ähnlichkeit von CTRP2 zu CTRP9 (vgl. Kapitel 4.3) sollte auch für CTRP2 überprüft werden, ob es bei Ischämie-Reperfusion protektiv wirkt.

Die hierfür gewählte CTRP2-Konzentration von 5 µg/ml orientierte sich an der Konzentration, bei der für CTRP9 bereits ATP-Veränderungen festgestellt werden konnten. Diese lag bei 4 µg/ml (Li et al., 2021). Für die Inkubationszeit des CTRPs diente der Versuch von Kambara et al. als Orientierung. Dort wurde im Mausmodell sowohl durch Zugabe vor der Ischämie-Reperfusion als auch durch Zugabe während der Reperfusion ein Effekt dokumentiert (Kambara et al., 2012).

Neben den Wirkungen im Mausmodell konnten Kambara et al. auch *in-vitro* bei neonatalen Rattenkardiomyozyten eine verringerte Apoptoserate nach Hypoxie/Reoxygenierung feststellen. Dazu wurde eine Konzentration von 10 µg/ml CTRP9 genutzt und hypoxische Verhältnisse mittels *Anaero Pack system (Mitsubishi GAS Chemical Co., Inc.)* für 12 h hergestellt, gefolgt von einer 24-stündigen Reoxygenierungsphase (Kambara et al., 2012).

Auch für CTRP3 und CTRP13 konnten *in-vitro* in H9c2-Zellen kardioprotektive Eigenschaften festgestellt werden (Jiang et al., 2021; Song et al., 2022). Hierzu wurden die CTRPs überexprimiert, statt extern zugefügt. Ischämie-Reperfluationsverhältnisse wurden in beiden Versuchen mittels glukosefreiem Medium und Hypoxiekammer imitiert. Den Zellen, die mit CTRP3 behandelt wurden, wurde für 24 h Sauerstoff und Glukose entzogen und anschließend für 6 h wieder zugefügt (Song et al., 2022). Bei dem Versuch mit CTRP13 erfolgte der Entzug für 8 h und die darauffolgende Reperfusion für 24 h (Jiang et al., 2021).

Im Gegensatz zu den Experimenten in der Literatur wurde in der vorliegenden Arbeit CTRP2 in einer Konzentration von 5 µg/ml eingesetzt und die hypoxischen Verhältnisse mittels Ischämiepufter für 30 min hergestellt. Die Reperfusion erfolgte für 15 min.

Durch den Ischämiepufter wurde der oxidative Stoffwechsel reversibel unterdrückt und das extrazelluläre Milieu während eines Herzinfarktes nachgeahmt (Esumi et al., 1991; Li et al., 2017). Die in dieser Arbeit verwendete Rezeptur des Ischämiepufters wich geringfügig von der, in der Literatur beschriebenen, ab, erzielte jedoch die gleiche

Wirkung. Zudem wurde die Ischämie-Reperfusionsdauer in der vorliegenden Arbeit verkürzt.

Letzten Endes konnten in dieser Arbeit keine kardioprotektiven Eigenschaften von CTRP2 nach Ischämie-Reperfusion *in-vitro* in Kardiomyozyten beobachtet werden. Inwieweit die Abweichungen, zu den, in der Literatur beschriebenen Versuchen dazu geführt haben, dass CTRP2 nicht die erhoffte positive Wirkung zeigte, oder ob CTRP2 keine kardioprotektive Wirkung besitzt, lässt sich abschließend nicht sicher beurteilen.

5.3 Evaluation ATP- und Laktat-Assay

ATP- und Laktat-Assay stellen Methoden zur Untersuchung verschiedener Substanzen auf deren Toxizität auf Kardiomyozyten dar.

ATP dient Zellen als Hauptlieferant für Energie, sodass die ATP-Produktion als Indikator für die Funktionalität der Zellen angesehen werden kann. Eine Reduktion der ATP-Konzentration kann auf zytostatische und zytozide Effekte hindeuten (Garewal et al., 1986). In der vorliegenden Arbeit kann nicht abschließend beurteilt werden, ob ein Rückgang des ATP-Spiegels durch eine Abnahme der Zellzahl oder der ATP-Produktion hervorgerufen wurde.

Neben dem ATP-Assay gibt es weitere Methoden die Viabilität der Zellen zu messen. Dafür wird unter anderem die Stoffwechsel- oder Enzymaktivität herangezogen. So basiert der MTT-Assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid) darauf, dass Zellen mit einem aktiven Metabolismus MTT in Formazan umwandeln. Beim Resazurin-Assay wird Resazurin zu Resorufin reduziert. Beide Reaktionen gehen dabei mit einem Farbwechsel einher, welcher dann gemessen werden kann (Riss et al., 2004). Wenngleich für CTRP13 in einem Überexpressionsversuch mittels MTT-Assay (Jiang et al., 2021) und für CTRP7 und CTRP9 im Resazurin-Assay (Li et al., 2021) Viabilitätsänderungen registriert werden konnten, gilt der ATP-Assay im Vergleich als sensitiver, schneller und besser reproduzierbar (Petty et al., 1995; Riss et al., 2004). Dass in dieser Arbeit für CTRP9 keine Viabilitätssteigerung, wie sie Li et al in ihren Versuchen beobachteten, dokumentiert werden konnte, ist eher auf eine geringere CTRP-Konzentration zurückzuführen. Li et al verwendeten eine Konzentration von 4 µg/ml (Li et al., 2021), wohingegen in dieser Arbeit eine Konzentration von 400 ng/ml CTRP9 eingesetzt wurde.

Der Laktat-Assay beruht auf Warburgs Beobachtungen, dass eine Schädigung der Mitochondrien eine Anhäufung von Laktat zur Folge hat, welches dann im Medium gemessen werden kann. Unter normalen Bedingungen in gesunden Zellen wird das aus Glukose gewonnene Pyruvat zur maximalen Energiegewinnung in den Citratzyklus eingespeist. Liegt jedoch eine Beeinträchtigung der Mitochondrienfunktion vor, wird selbst bei aeroben Verhältnissen Pyruvat zu Laktat metabolisiert (Vaupel & Multhoff, 2021). Somit lässt sich mittels Laktat-Assay zwar eine Schädigung der Mitochondrien nachweisen, jedoch kann diese nicht genau lokalisiert werden. Neben Veränderungen im Calciumhaushalt können auch reaktive Sauerstoffspezies, Fehler in der Elektronentransportkette oder Veränderungen der Struktur zu einem Funktionsverlust führen (Merches et al., 2022; Sun et al., 2021; Zhou & Tian, 2018).

Dass generell wenig Effekte im Laktat-Assay beobachtet werden konnten, ist bei den H9c2-Zellen eventuell auch darauf zurückzuführen, dass es sich um eine eher unreife Zelllinie handelt, bei der die Mitochondrienanzahl nicht stark ausgeprägt ist (Merches et al., 2022).

Es lässt sich festhalten, dass es sich bei den durchgeführten Assays um gängige Methoden für die Bewertung der Toxizität von Substanzen auf Zellen handelt. Vereinzelte Schwankungen in den Ergebnissen sind dabei eher durch Abweichungen in der Zellzahl aufgrund un stetigen Pipettierens zu erklären.

5.4 Untersuchung der H9c2-/AC16- und Mauszellen auf die Rezeptoren AdipoR1, AdipoR2, BAI3, RXFP1

Wie bereits erörtert, sind die zellulären Rezeptoren für die meisten CTRPs noch nicht bekannt (vgl. Kapitel 4.4.1). Für AdipoR1, AdipoR2, BAI3 und RXFP1 konnte jedoch eine Bindefähigkeit mit CTRPs bestätigt werden. Ob diese Bindung auch an den hier untersuchten Zellen möglich ist, sollte durch den Nachweis der Rezeptoren geklärt werden.

Für die Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 erfolgte dieser Nachweis in allen untersuchten Zellen. Übereinstimmungen zu diesen Ergebnissen finden sich auch in der Literatur. Versuche in H9c2-Zellen dokumentieren die Expression der Rezeptoren (J. Liu et al., 2017; Park et al., 2011). In neonatalen Mauskardiomyozyten bestätigen Veränderungen der Signalkaskade durch den *Knockdown* von AdipoR1 und AdipoR2 deren Vorhandensein (Amin et al., 2010). Eine weitere Untersuchung zeigte das

Vorkommen des Adpior1-Rezeptors in adulten Mauskardiomyozyten (Zhu et al., 2022). Über die Expression der beiden Rezeptoren in humanen Kardiomyozyten oder der humanen AC16-Zelllinie konnte in der Literatur nichts herausgefunden werden.

Der BAI3-Rezeptor konnte in der vorliegenden Arbeit lediglich in der AC16-Zelllinie nachgewiesen werden. Generell ist bisher wenig über diesen Rezeptor und sein Vorkommen in Kardiomyozyten bekannt. In Herzgewebe von Mäusen konnte der Rezeptor mittels Northern- und Western-Blot nicht bestätigt werden (Kee et al., 2004). Die Dokumentation seiner Expression beschränkt sich bisweilen auf humane Endothelzellen der Nabelschnur (F. Liu et al., 2017) und das Gehirn. Dort vor allem auf Neurone des Cortex und des Hippocampus. Die höchste Expressionsrate wird direkt nach der Geburt beobachtet und nimmt dann mit zunehmendem Alter wieder ab (Kee et al., 2004).

Die mRNA des RXFP1-Rezeptors konnte in der vorliegenden Arbeit sowohl in neonatalen und adulten Mauskardiomyozyten sowie in kardialen Mausfibroblasten nachgewiesen werden. Das Vorkommen in neonatalen Mauskardiomyozyten wurde auch in der Literatur bereits dokumentiert (Formigli et al., 2009). Zudem konnte in der Literatur die Expression des RXFP1-Rezeptors in H9c2-Zellen beobachtet werden (Boccalini et al., 2015). Dies konnte durch die, in dieser Arbeit durchgeführten, Untersuchungen nicht bestätigt werden. Ob die Zelllinie AC16 den Rezeptor exprimiert, wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Da die hier gewonnenen Daten aus PCR und qPCR darauf hindeuten, dass die Bindefähigkeit der verwendeten Primer nicht gegeben war, kann damit keine definitive Aussage über das Vorhandensein des RXFP1-Rezeptors in AC16-Zellen getroffen werden.

Nachdem der RXFP1-Rezeptor bisher aber sowohl in humanen kardialen Fibroblasten (Sarwar et al., 2015) als auch in humanem Myokardgewebe (Dschietzig et al., 2011) nachgewiesen werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass auch die AC16-Zelllinie, welche eine Fusion aus Fibroblasten und Herzgewebezellen darstellt, den Rezeptor exprimieren. Um diese Vermutung zu verifizieren, bedarf es jedoch erneuten Untersuchungen der AC16-Zellen.

5.5 Evaluation der Methoden zum mRNA-Nachweis

Die Expression der Rezeptoren in den Zellen sollte mittels mRNA-Nachweis untersucht werden. Wenngleich hierzu etablierte Methoden verwendet wurden, bauen diese auf verschiedenen Teilschritten auf, was wiederum zu Ungenauigkeiten führen kann.

Bereits bei der Extraktion kann es zum mRNA-Zerfall oder Verunreinigungen kommen. Einmal extrahiert hat die mRNA eine sehr kurze Halbwertszeit. Die ubiquitär vorkommenden RNasen, welche auch unter Hitzeeinwirkung noch stabil sind, bauen die mRNA ab (Tan & Yiap, 2009; Thermo Fisher Scientific, o. J.-c).

Um die Reinheit des Isolats zu überprüfen, wurde der 260/280-Quotient bestimmt, der die Verunreinigungen durch Proteine und Phenole anzeigt. Werte zwischen 1,8-2,0 gelten als sauber extrahiert (Arnemann, 2019a) und wurden in der vorliegenden Arbeit angestrebt.

Eine weitere Fehlerquelle stellt die cDNA-Synthese dar. Es wurde eine RNA-Konzentration von 1 µg/ml eingestellt. Die Konzentration an entstandener cDNA wurde nicht nochmals überprüft, da davon ausgegangen wird, dass durch die reverse Transkriptase eine quantitative Umsetzung erfolgt.

Zur Amplifikation der Fragmente bediente man sich einer seit 1983 etablierten Technik - der Polymerase-Kettenreaktion (Mullis & Faloona, 1987). Doch trotz dieser langen Optimierungszeitspanne kann es in den drei aufeinanderfolgenden Schritten Denaturierung, *Annealing* und Elongation zu Beeinträchtigungen kommen.

Bei der Denaturierung ist die Dauer der Hitzeeinwirkung entscheidend. Während eine zu lange Temperatureinwirkung zu einer Zerstörung der DNA führt, verhindert eine zu kurze die Auftrennung des DNA-Doppelstrangs in Einzelstränge (Douglas & Atchison, 1993; Merck, o. J.-a).

Nach der Spaltung der Doppelstränge erfolgt beim *Annealing* die Bindung der Primer an die Einzelstränge. Hier ist neben der Justierung der Temperatur an die Schmelzpunkte der Primer auch das Design der Primer für den Anheftungserfolg entscheidend. Die Primer wurden mit Primer-BLAST entworfen. Es wurde darauf geachtet, dass die Schmelztemperaturdifferenz möglichst gering (max 1 °C) ist und die Schmelzpunkte im Bereich zwischen 59 °C-61 °C liegen. Zudem wurde versucht einen GC-Gehalt zwischen 50-60 % zu wählen, wobei ähnliche GC-Werte der Primer anzustreben sind, was in der vorliegenden Arbeit jedoch schwer umzusetzen war. Die Produktgröße wurde auf min. 70bp bis max. 200bp festgesetzt und die Selbstkomplementarität versucht niedrig zu halten. Es wurden keine Primerlängen über 24bp ausgewählt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer erzielten das gewünschte PCR-Produkt. Lediglich die humanen RXFP1-Primer konnten nicht binden. Ansonsten konnten in der qPCR adäquate Schmelzkurven gemessen werden und in beiden mRNA-Nachweismethoden sinnvolle Ergebnisse gewonnen werden. Ob der Fehler beim Nachweisversuch des humanen RXFP1-Rezeptors am Design der Primer oder einer anderen Variablen in der Methode lag, lässt sich retrospektiv nicht sicher feststellen. Da aber sowohl PCR als auch qPCR unzureichende Ergebnisse lieferten, stehen vor allem die Primer im Verdacht.

Aber nicht nur das *Annealing* stellt eine Fehlerquelle dar. Es können auch bei der Vervollständigung der Doppelstränge durch die Polymerase in der Elongationsphase Beeinträchtigungen auftreten. In der vorliegenden Arbeit wurde in der PCR statt einer konventionellen *taq*-Polymerase die *DreamTaq*-Polymerase verwendet, welche sich durch eine höhere Sensitivität, höhere Erträge und längere PCR-Produkte auszeichnet (Thermo Fisher Scientific, o. J.-b) und so Fehlern vorbeugt.

Um die Ergebnisse der PCR zu validieren, wurde zusätzlich noch eine qPCR mit den vorhandenen Proben und Primern durchgeführt. Anders als beim Vorgehen bei der PCR erfolgt die Detektion bei der qPCR nicht durch Auftrennung und Anfärben der amplifizierten DNA mittels Gelelektrophorese, sondern durch die Messung eines Fluoreszenzsignals. Dafür verantwortlich ist das, im Reaktionsgemisch enthaltene *SYBR[®] Green*, welches nach der Bindung der entstandenen DNA-Doppelstränge fluoresziert (Bio-Rad, o. J.). Bei einer qPCR besteht die Möglichkeit einer quantitativen Analyse, das Ziel dieser Arbeit war aber lediglich eine qualitative. Ähnlich wie bei der PCR kann es auch bei der qPCR durch suboptimale Temperatureinstellungen und Primergestaltungen zu unzureichenden Ergebnissen kommen.

Alternativ zu den hier verwendeten Methoden gibt es zahlreiche Modifikationen und andere Möglichkeiten, mit denen man noch versuchen könnte, die mRNA der Rezeptoren nachzuweisen. So kann man beim Northern Blot statt einer vorgeschalteten reversen Transkriptase direkt RNA mittels Gelelektrophorese auftrennen und zur Visualisierung auf eine Trägerfolie übertragen (Gressner & Gressner, 2019a). Nachteilig ist hier, dass auf einen absolut RNase-freien Versuchsaufbau geachtet werden muss. Eine weitere Möglichkeit sowohl RNA als auch DNA nachzuweisen ist die Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung. Mithilfe sequenzspezifischer Sonden können die Zielsequenzen unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. In Gewebe lässt

sich durch RNA-Hybridisierung sogar die Verteilung dieser darstellen (Arnemann, 2019b).

Dem Prinzip der Hybridisierung wird sich auch beim *Nuklease Protection Assay* bedient. Durch die Bildung eines Doppelstranges wird die Zielsequenz vor dem enzymatischen Abbau durch RNasen geschützt. Verglichen mit dem Northern Blot, zeichnet sich der Assay durch eine hohe Sensitivität und die Fähigkeit, verschiedene Transkriptvarianten zu unterscheiden, aus. Zudem hat er, gegenüber der reversen Transkriptase-PCR, den Vorteil, dass er mehrere Zielsequenzen gleichzeitig detektieren kann. Allerdings geht bei dem Assay die Information über die Transkriptionsgröße verloren, da sich die Hybridisierung auf das zu schützende Segment beschränkt (Thermo Fisher Scientific, o. J.-a).

Letztendlich sollte mit dem Nachweis der mRNA das Vorkommen der Rezeptoren in den Zellen bestätigt werden. Ein positiver mRNA-Nachweis ist jedoch noch keine Bestätigung der Translation, also der Proteinsynthese und somit tatsächlichen Rezeptorexpression. Um also eine sichere Aussage über das Vorkommen der Rezeptoren treffen zu können, müssen die Proteine nachgewiesen werden. Hierzu kann ein Western Blot durchgeführt werden, bei dem die, in den Zelllysaten enthaltenen, Proteine mittels Elektrophorese aufgetrennt werden. Spezifische Antikörper binden die Zielproteine und können so über Fluoreszenzsignale detektiert werden (Gressner & Gressner, 2019b).

Es lässt sich also abschließend festhalten, dass die Wissenschaft viele Möglichkeiten des Rezeptornachweises bietet. Aber auch mit den, in dieser Arbeit verwendeten Methoden, konnten zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden.

5.6 Ausblick

Die oben beschriebenen Versuche in Kardiomyozyten-Zelllinien haben bestätigt, dass die CTRPs keine negativen Auswirkungen auf die Viabilität und die Laktatsekretion der Zellen haben. Nachdem die CTRPs auf Kardiomyozyten folglich als sicher anzusehen sind, ist es nun, vor dem Hintergrund die CTRPs zukünftig therapeutisch nutzen zu wollen, wichtig, weitere Untersuchungen durchzuführen, um vor allem unter pathologischen Bedingungen eine schützende Wirkung nachzuweisen.

Um protektive Effekte in diesem Kontext abzubilden, können beispielsweise zunächst *in-vitro* Untersuchungen an Zellen mit H₂O₂-induzierter Apoptose oder

Phenylephrin-induzierter Hypertrophie durchgeführt werden. Zusätzlich können mittels tierexperimenteller Studien weitere Erkenntnisse über die Wirkung der CTRPs gewonnen werden. Hierzu können unterschiedliche Myokardinfarktmodelle herangezogen werden, um pathologische Bedingungen zu simulieren.

Ziel wird es in Zukunft also sein, den therapeutischen Nutzen der CTRPs darzustellen. Wie eingangs beschrieben, zeigten Adiponektin und einige CTRPs in der Literatur bereits positive Wirkungen auf Manifestationen des metabolischen Syndroms. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind jedoch noch nicht hinreichend verstanden. Zudem fehlt eine solide Datenbasis über Zelllinien und Zelltypen, welche die bisher bekannten CTRP-Rezeptoren exprimieren und an welche Rezeptoren die jeweiligen CTRPs binden können. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse durch den mRNA-Nachweisversuch der CTRP-Rezeptoren in den untersuchten Kardiomyozyten-Zelllinien ließen sich durch weitere Bindungsstudien ergänzen. Die Identifikation von Zelllinien oder primären Zellen, welche die Rezeptoren exprimieren, verbessert die Interpretation von Daten, die in diesen Zellen gewonnenen werden. Zusätzlich können dadurch *in-vitro* Untersuchungen konkretisiert und optimiert werden, um so letztendlich *in-vivo*-Aktivitäten und Signalkaskaden der CTRPs besser zu verstehen.

6 Zusammenfassung

Die *C1q/tumor necrosis factor-related proteins* (CTRPs) sind eine Ligandenfamilie aus sezernierten Plasmaproteinen, welche sich in ihrem Grundbauplan ähneln. Für Adiponektin, als bekanntesten Vertreter dieser strukturell verwandten Liganden, wurden in der Literatur bereits protektive Effekte für das metabolische Syndrom beschrieben. Bisherige *in-vitro* Untersuchungen der CTRPs und CTRP-*knockout* Versuche legen nahe, dass die CTRPs ähnliche Wirkungen wie Adiponektin haben könnten. Um die CTRPs zukünftig therapeutisch nutzen zu können, sind umfassende Analysen ihrer Wirkungen auf verschiedene Zellen unerlässlich. Da sich das metabolische Syndrom unter anderem in Herz-Kreislaufkrankungen manifestiert, wurden die CTRPs hinsichtlich ihrer Effekte auf Kardiomyozyten untersucht.

Dafür wurden Zellviabilitäts-Assays in Kardiomyozyten-Zelllinien mit den CTRPs durchgeführt. Diese bieten die Möglichkeit potenziell kardiotoxische Wirkung frühzeitig zu erkennen. Veränderungen der ATP- oder Laktatkonzentration verweisen dabei auf Störungen der Zellviabilität und der mitochondrialen Funktionalität. Mit den untersuchten CTRP2, CTRP3, CTRP4, CTRP9A, CTRP10, CTRP11, CTRP13 und CTRP14 konnten in den durchgeführten Versuchen keine derartigen, relevanten Veränderungen hervorgerufen werden, sodass die CTRPs für Kardiomyozyten als sicher zu bewerten sind.

Neben dem Ausschluss kardiotoxischer Effekte wurden in dieser Arbeit zudem potenziell protektive Wirkungen bei Ischämie-Reperfusion durch CTRP2 untersucht. Diese konnten in dem dafür gewählten Versuchsaufbau aber nicht dokumentiert werden.

Bisher ist bekannt, dass die CTRPs an die Rezeptoren AdipoR1, AdipoR2, BAI3 und RXFP1 binden und so ihre Effekte vermitteln. Um die Relevanz dieser Rezeptorbindungen für die Wirkung in Kardiomyozyten untersuchen zu können, müssen Zelllinien identifiziert werden, die diese Rezeptoren exprimieren. Der mRNA-Nachweis der Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 gelang in den Zelllinien H9c2 und AC16 und in neonatalen und adulten Maus-kardiomyozyten. Die mRNA des BAI3-Rezeptors konnte lediglich in AC16-Zellen und die mRNA des RXFP1-Rezeptors nur in neonatalen und adulten Maus-kardiomyozyten nachgewiesen werden. Inwieweit die CTRPs in den untersuchten Zellen an diese Rezeptoren binden, ist bisher nicht klar.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die CTRPs sicher für Kardiomyozyten zu sein scheinen, was eine wichtige Grundlage für die therapeutische Nutzbarkeit

darstellt. Folglich bieten die CTRPs bislang vielversprechende Möglichkeiten zukünftig als Therapeutikum gegen das metabolische Syndrom Einsatz zu finden.

7 Literaturverzeichnis

- Achari, A. E., & Jain, S. K. (2017). Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. *Int J Mol Sci*, 18(6). <https://doi.org/10.3390/ijms18061321>
- Alberti, K. G., Zimmet, P., & Shaw, J. (2005). The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet*, 366(9491), 1059-1062. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)67402-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(05)67402-8)
- Alberti, K. G., Zimmet, P., & Shaw, J. (2006). Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med*, 23(5), 469-480. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2006.01858.x>
- Amin, R. H., Mathews, S. T., Alli, A., & Leff, T. (2010). Endogenously produced adiponectin protects cardiomyocytes from hypertrophy by a PPARgamma-dependent autocrine mechanism. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 299(3), H690-698. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01032.2009>
- Appari, M., Breitbart, A., Brandes, F., Szaroszyk, M., Froese, N., Korf-Klingebiel, M., Mohammadi, M. M., Grund, A., Scharf, G. M., Wang, H., Zwadlo, C., Fraccarollo, D., Schrameck, U., Nemer, M., Wong, G. W., Katus, H. A., Wollert, K. C., Müller, O. J., Bauersachs, J., & Heineke, J. (2017). C1q-TNF-Related Protein-9 Promotes Cardiac Hypertrophy and Failure. *Circ Res*, 120(1), 66-77. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309398>
- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., Hotta, K., Shimomura, I., Nakamura, T., Miyaoaka, K., Kuriyama, H., Nishida, M., Yamashita, S., Okubo, K., Matsubara, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Funahashi, T., & Matsuzawa, Y. (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, 257(1), 79-83. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0255>
- Arnemann, J. (2019a). DNA-/RNA-Konzentrationsbestimmung. In A. M. Gressner & T. Arndt (Eds.), *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (pp. 719-719). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_3464
- Arnemann, J. (2019b). Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FiSH). In A. M. Gressner & T. Arndt (Eds.), *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (pp. 884-884). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_3481
- Babson, A. L., & Phillips, G. E. (1965). A rapid colorimetric assay for serum lactic dehydrogenase. *Clin Chim Acta*, 12(2), 210-215. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0009-8981\(65\)90032-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0009-8981(65)90032-X)
- Bani, D., Masini, E., Bello, M. G., Bigazzi, M., & Bani Sacchi, T. (1998). Relaxin protects against myocardial injury caused by ischemia and reperfusion in rat heart. *Am J Pathol*, 152(5), 1367-1376.
- Bellis, A., & Trimarco, B. (2013). Pharmacological approach to cardiovascular risk in metabolic syndrome. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 14(6), 403-409. <https://doi.org/10.2459/JCM.0b013e32835dbd0d>
- Berg, A. H., Combs, T. P., Du, X., Brownlee, M., & Scherer, P. E. (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nature medicine*, 7(8), 947-953. <https://doi.org/10.1038/90992>
- Berufsverband Deutscher Internistinnen und Internisten e.V. (2017). *Metabolisches Syndrom: Diagnose & Behandlung*. Retrieved 14.03.2022 from <https://www.internisten-im-netz.de/krankheiten/metabolisches-syndrom/untersuchungen-behandlung/>

- Bio-Rad. (o. J.). *SYBR® Green for qPCR*. Retrieved 07.03.2022 from <https://www.bio-rad.com/featured/en/sybr-green-for-qpcr.html>
- Biotium. (2021). *Produkt Information*. Retrieved 07.03.2022 from <https://biotium.com/wp-content/uploads/2015/02/PI-41002-41003.pdf>
- Boccalini, G., Sassoli, C., Formigli, L., Bani, D., & Nistri, S. (2015). Relaxin protects cardiac muscle cells from hypoxia/reoxygenation injury: involvement of the Notch-1 pathway. *FASEB J*, 29(1), 239-249. <https://doi.org/10.1096/fj.14-254854>
- Bollinger, M. F., Martinelli, D. C., & Südhof, T. C. (2011). The cell-adhesion G protein-coupled receptor BAI3 is a high-affinity receptor for C1q-like proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(6), 2534-2539. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.1019577108>
- Byerly, M. S., Petersen, P. S., Ramamurthy, S., Seldin, M. M., Lei, X., Provost, E., Wei, Z., Ronnett, G. V., & Wong, G. W. (2014). C1q/TNF-related protein 4 (CTRP4) is a unique secreted protein with two tandem C1q domains that functions in the hypothalamus to modulate food intake and body weight. *J Biol Chem*, 289(7), 4055-4069. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.506956>
- Byerly, M. S., Swanson, R., Wei, Z., Seldin, M. M., McCulloh, P. S., & Wong, G. W. (2013). A central role for C1q/TNF-related protein 13 (CTRP13) in modulating food intake and body weight. *PLoS One*, 8(4), e62862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062862>
- Cao, L., Tan, W., Chen, W., Huang, H., He, M., Li, Q., Zhu, X., & Wang, L. (2021). CTRP4 acts as an anti-inflammatory factor in macrophages and protects against endotoxic shock [<https://doi.org/10.1002/eji.202048617>]. *Eur J Immunol*, 51(2), 380-392. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/eji.202048617>
- Castro, I., Waclawovsky, G., & Marcadenti, A. (2015). Nutrition and physical activity on hypertension: implication of current evidence and guidelines. *Curr Hypertens Rev*, 11(2), 91-99. <https://doi.org/10.2174/1573402111666150429170302>
- Chen, H., Huang, X. N., Stewart, A. F., & Sepulveda, J. L. (2004). Gene expression changes associated with fibronectin-induced cardiac myocyte hypertrophy. *Physiol Genomics*, 18(3), 273-283. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00104.2004>
- Chen, H., Montagnani, M., Funahashi, T., Shimomura, I., & Quon, M. J. (2003). Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 278(45), 45021-45026. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307878200>
- Crouch, S. P., Kozlowski, R., Slater, K. J., & Fletcher, J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods*, 160(1), 81-88. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(93\)90011-u](https://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90011-u)
- Curigliano, G., Cardinale, D., Dent, S., Criscitiello, C., Aseyev, O., Lenihan, D., & Cipolla, C. M. (2016). Cardiotoxicity of anticancer treatments: Epidemiology, detection, and management. *CA Cancer J Clin*, 66(4), 309-325. <https://doi.org/10.3322/caac.21341>
- Davidson, M. M., Nesti, C., Palenzuela, L., Walker, W. F., Hernandez, E., Protas, L., Hirano, M., & Isaac, N. D. (2005). Novel cell lines derived from adult human ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 39(1), 133-147. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2005.03.003>
- Dayeh, V. R., Chow, S. L., Schirmer, K., Lynn, D. H., & Bols, N. C. (2004). Evaluating the toxicity of Triton X-100 to protozoan, fish, and mammalian cells using fluorescent dyes as indicators of cell viability. *Ecotoxicol Environ Saf*, 57(3), 375-382. [https://doi.org/10.1016/s0147-6513\(03\)00083-6](https://doi.org/10.1016/s0147-6513(03)00083-6)
- Douglas, A., & Atchison, B. (1993). Degradation of DNA during the denaturation step of PCR. *Genome Res*, 3(2), 133-134. <https://doi.org/10.1101/gr.3.2.133>
- Dschietzig, T., Alexiou, K., Kinkel, H. T., Baumann, G., Matschke, K., & Stangl, K. (2011). The positive inotropic effect of relaxin-2 in human atrial myocardium is preserved

- in end-stage heart failure: role of G(i)-phosphoinositide-3 kinase signaling. *J Card Fail*, 17(2), 158-166. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2010.08.011>
- Dudenredaktion. (o. J.-a). *kardiotoxisch*. Retrieved 15.03.2022 from <https://www.duden.de/rechtschreibung/kardiotoxisch>
- Dudenredaktion. (o. J.-b). *Syndrom*. Retrieved 13.03.2022 from <https://www.duden.de/rechtschreibung/Syndrom>
- Dykens, J. A., & Will, Y. (2007). The significance of mitochondrial toxicity testing in drug development. *Drug Discov Today*, 12(17-18), 777-785. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.07.013>
- Eckel, R. H., Grundy, S. M., & Zimmet, P. Z. (2005). The metabolic syndrome. *Lancet*, 365(9468), 1415-1428. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)66378-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(05)66378-7)
- Ehler, E., Moore-Morris, T., & Lange, S. (2013). Isolation and culture of neonatal mouse cardiomyocytes. *J Vis Exp*(79). <https://doi.org/10.3791/50154>
- Esumi, K., Nishida, M., Shaw, D., Smith, T. W., & Marsh, J. D. (1991). NADH measurements in adult rat myocytes during simulated ischemia. *Am J Physiol*, 260(6 Pt 2), H1743-1752. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1991.260.6.H1743>
- Fang, H., & Judd, R. L. (2018). Adiponectin Regulation and Function. *Compr Physiol*, 8(3), 1031-1063. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170046>
- Feng, H., Wang, J. Y., Zheng, M., Zhang, C. L., An, Y. M., Li, L., & Wu, L. L. (2016). CTRP3 promotes energy production by inducing mitochondrial ROS and up-expression of PGC-1 α in vascular smooth muscle cells. *Exp Cell Res*, 341(2), 177-186. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.02.001>
- Field, L. J. (2004). Modulation of the cardiomyocyte cell cycle in genetically altered animals. *Ann N Y Acad Sci*, 1015, 160-170. <https://doi.org/10.1196/annals.1302.013>
- Fischer-Rasokat, U., Dill, T., & Hamm, C. W. (2018). Koronare Herzkrankheit. In *Duale Reihe: Innere Medizin* (4. ed., pp. 61-81). Thieme.
- Formigli, L., Francini, F., Nistri, S., Margheri, M., Luciani, G., Naro, F., Silvertown, J. D., Orlandini, S. Z., Meacci, E., & Bani, D. (2009). Skeletal myoblasts overexpressing relaxin improve differentiation and communication of primary murine cardiomyocyte cell cultures. *J Mol Cell Cardiol* 47(2), 335-345. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.05.008>
- Gao, J., Qian, T., & Wang, W. (2020). CTRP3 Activates the AMPK/SIRT1-PGC-1 α Pathway to Protect Mitochondrial Biogenesis and Functions in Cerebral Ischemic Stroke. *Neurochem Res*, 45(12), 3045-3058. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03152-6>
- Gao, W. (2008). Does the constellation of risk factors with and without abdominal adiposity associate with different cardiovascular mortality risk? *Int J Obes (Lond)*, 32(5), 757-762. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803797>
- Garewal, H. S., Ahmann, F. R., Schiffman, R. B., & Celniker, A. (1986). ATP assay: ability to distinguish cytostatic from cytotoxic anticancer drug effects. *J Natl Cancer Inst*, 77(5), 1039-1045.
- Glogowska, A., Kunanuvat, U., Stetefeld, J., Patel, T. R., Thanasupawat, T., Krcek, J., Weber, E., Wong, G. W., Del Bigio, M. R., Hoang-Vu, C., Hombach-Klonisch, S., & Klonisch, T. (2013). C1q-tumour necrosis factor-related protein 8 (CTRP8) is a novel interaction partner of relaxin receptor RXFP1 in human brain cancer cells [<https://doi.org/10.1002/path.4257>]. *J Pathol*, 231(4), 466-479. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/path.4257>
- Goldstein, B. J., Scalia, R. G., & Ma, X. L. (2009). Protective vascular and myocardial effects of adiponectin. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 6(1), 27-35. <https://doi.org/10.1038/ncpcardio1398>

- Gressner, A. M., & Gressner, O. A. (2019a). Northern blot. In A. M. Gressner & T. Arndt (Eds.), *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (pp. 1764-1765). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_3675
- Gressner, A. M., & Gressner, O. A. (2019b). Western blot. In A. M. Gressner & T. Arndt (Eds.), *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (pp. 2505-2506). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_3674
- Grundy, S. M., Hansen, B., Smith, S. C., Jr., Cleeman, J. I., & Kahn, R. A. (2004). Clinical management of metabolic syndrome: report of the American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute/American Diabetes Association conference on scientific issues related to management. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(2), e19-24. <https://doi.org/10.1161/01.Atv.0000112379.88385.67>
- Hescheler, J., Meyer, R., Plant, S., Krautwurst, D., Rosenthal, W., & Schultz, G. (1991). Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circ Res*, 69(6), 1476-1486. <https://doi.org/doi:10.1161/01.RES.69.6.1476>
- International Diabetes Federation. (2006). *The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome*. Retrieved 16.04.2023 from <https://www.idf.org/component/attachments/attachments.html?id=705&task=download>
- Ishikawa, Y., Akasaka, Y., Ishii, T., Yoda-Murakami, M., Choi-Miura, N. H., Tomita, M., Ito, K., Zhang, L., Akishima, Y., Ishihara, M., Muramatsu, M., & Taniyama, M. (2003). Changes in the distribution pattern of gelatin-binding protein of 28 kDa (adiponectin) in myocardial remodelling after ischaemic injury. *Histopathology*, 42(1), 43-52. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2003.01518.x>
- Isomaa, B., Almgren, P., Tuomi, T., Forsén, B., Lahti, K., Nissén, M., Taskinen, M.-R., & Groop, L. e. (2001). Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*, 24(4), 683-689. <https://doi.org/10.2337/diacare.24.4.683>
- Jiang, W., Song, J., Zhang, S., Ye, Y., Wang, J., & Zhang, Y. (2021). CTRP13 Protects H9c2 Cells Against Hypoxia/Reoxygenation (H/R)-Induced Injury Via Regulating the AMPK/Nrf2/ARE Signaling Pathway. *Cell transplantation*, 30. <https://doi.org/10.1177/09636897211033275>
- Jones, E. Y., Stuart, D. I., & Walker, N. P. (1989). Structure of tumour necrosis factor. *Nature*, 338(6212), 225-228. <https://doi.org/10.1038/338225a0>
- Kakegawa, W., Mitakidis, N., Miura, E., Abe, M., Matsuda, K., Takeo, Yukari H., Kohda, K., Motohashi, J., Takahashi, A., Nagao, S., Muramatsu, S.-i., Watanabe, M., Sakimura, K., Aricescu, A. R., & Yuzaki, M. (2015). Anterograde C1q1 Signaling Is Required in Order to Determine and Maintain a Single-Winner Climbing Fiber in the Mouse Cerebellum. *Neuron*, 85(2), 316-329. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.020>
- Kambara, T., Ohashi, K., Shibata, R., Ogura, Y., Maruyama, S., Enomoto, T., Uemura, Y., Shimizu, Y., Yuasa, D., Matsuo, K., Miyabe, M., Kataoka, Y., Murohara, T., & Ouchi, N. (2012). CTRP9 protein protects against myocardial injury following ischemia-reperfusion through AMP-activated protein kinase (AMPK)-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 287(23), 18965-18973. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.357939>
- Kankia, I. H., Khalil, H. S., Langdon, S. P., Moul, P. R., Bown, J. L., & Deeni, Y. Y. (2017). NRF2 Regulates HER1 Signaling Pathway to Modulate the Sensitivity of Ovarian Cancer Cells to Lapatinib and Erlotinib. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 1864578. <https://doi.org/10.1155/2017/1864578>

- Kaplan, N. M. (1989). The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med*, *149*(7), 1514-1520. <https://doi.org/10.1001/archinte.1989.00390070054005>
- Kee, H. J., Ahn, K. Y., Choi, K. C., Won Song, J., Heo, T., Jung, S., Kim, J.-K., Bae, C. S., & Kim, K. K. (2004). Expression of brain-specific angiogenesis inhibitor 3 (BAI3) in normal brain and implications for BAI3 in ischemia-induced brain angiogenesis and malignant glioma. *FEBS Lett*, *569*(1-3), 307-316. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.06.011>
- Kim, T. K., & Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem*, *397*(8), 3173 - 3178. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2911531/pdf/216_2010_Article_3821.pdf
- Kimes, B. W., & Brandt, B. L. (1976). Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp Cell Res*, *98*(2), 367-381.
- Kishore, U., Gaboriaud, C., Waters, P., Shrive, A. K., Greenhough, T. J., Reid, K. B., Sim, R. B., & Arlaud, G. J. (2004). C1q and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility. *Trends Immunol*, *25*(10), 551-561. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.08.006>
- Knowlton, A. A., Connelly, C. M., Romo, G. M., Mamuya, W., Apstein, C. S., & Brecher, P. (1992). Rapid expression of fibronectin in the rabbit heart after myocardial infarction with and without reperfusion. *J Clin Invest*, *89*(4), 1060-1068. <https://doi.org/10.1172/jci115685>
- Konstandin, M. H., Völkens, M., Collins, B., Quijada, P., Quintana, M., De La Torre, A., Ormachea, L., Din, S., Gude, N., Toko, H., & Sussman, M. A. (2013). Fibronectin contributes to pathological cardiac hypertrophy but not physiological growth. *Basic Res Cardiol*, *108*(5), 375. <https://doi.org/10.1007/s00395-013-0375-8>
- Kumada, M., Kihara, S., Sumitsuji, S., Kawamoto, T., Matsumoto, S., Ouchi, N., Arita, Y., Okamoto, Y., Shimomura, I., Hiraoka, H., Nakamura, T., Funahashi, T., & Matsuzawa, Y. (2003). Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *23*(1), 85-89. <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000048856.22331.50>
- Laverty, H., Benson, C., Cartwright, E., Cross, M., Garland, C., Hammond, T., Holloway, C., McMahon, N., Milligan, J., Park, B., Pirmohamed, M., Pollard, C., Radford, J., Roome, N., Sager, P., Singh, S., Suter, T., Suter, W., Trafford, A., . . . Valentin, J. (2011). How can we improve our understanding of cardiovascular safety liabilities to develop safer medicines? *Br J Pharmacol*, *163*(4), 675-693. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01255.x>
- Lei, X., & Wong, G. W. (2019). C1q/TNF-related protein 2 (CTRP2) deletion promotes adipose tissue lipolysis and hepatic triglyceride secretion. *J Biol Chem*, *294*(43), 15638-15649. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009230>
- Lemieux, I., & Després, J.-P. (2020). Metabolic Syndrome: Past, Present and Future. *Nutrients*, *12*(11), 3501. <https://doi.org/10.3390/nu12113501>
- Li, L., Aslam, M., Siegler, B. H., Niemann, B., & Rohrbach, S. (2021). Comparative Analysis of CTRP-Mediated Effects on Cardiomyocyte Glucose Metabolism: Cross Talk between AMPK and Akt Signaling Pathway. *Cells*, *10*(4), 905. <https://doi.org/10.3390/cells10040905>
- Li, L., Stumpp, D., Siegler, B., Niemann, B., & Rohrbach, S. (2015). Differential effects of C1q/tumor necrosis factor-related proteins on cardiomyocyte glucose metabolism. *Diabetologie und Stoffwechsel*, *10*(S 01), P92.
- Li, Q., Wang, L., Tan, W., Peng, Z., Luo, Y., Zhang, Y., Zhang, G., Na, D., Jin, P., Shi, T., Ma, D., & Wang, L. (2011). Identification of C1qTNF-related protein 4 as a potential cytokine that stimulates the STAT3 and NF-κB pathways and promotes

- cell survival in human cancer cells. *Cancer Lett*, 308(2), 203-214. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.05.005>
- Li, X., Yang, R., Yang, X., & Zheng, X. (2017). Paeonol protects H9C2 cardiomyocytes from ischemia/reperfusion injury by activating Notch1 signaling pathway in vitro. *Int J Clin Exp Med*, 10(2), 2866-2873.
- Liao, Y., Takashima, S., Maeda, N., Ouchi, N., Komamura, K., Shimomura, I., Hori, M., Matsuzawa, Y., Funahashi, T., & Kitakaze, M. (2005). Exacerbation of heart failure in adiponectin-deficient mice due to impaired regulation of AMPK and glucose metabolism. *Cardiovasc Res*, 67(4), 705-713. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.04.018>
- Limonciel, A., Aschauer, L., Wilmes, A., Prajczek, S., Leonard, M. O., Pfaller, W., & Jennings, P. (2011). Lactate is an ideal non-invasive marker for evaluating temporal alterations in cell stress and toxicity in repeat dose testing regimes. *Toxicol In Vitro*, 25(8), 1855-1862. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.05.018>
- Liu, F., Tan, A., Yang, R., Xue, Y., Zhang, M., Chen, L., Xiao, L., Yang, X., & Yu, Y. (2017). C1ql1/Ctrp14 and C1ql4/Ctrp11 promote angiogenesis of endothelial cells through activation of ERK1/2 signal pathway. *Mol Cell Biochem*, 424(1-2), 57-67. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2842-7>
- Liu, J., Sui, H., Zhao, J., & Wang, Y. (2017). Osmotin Protects H9c2 Cells from Simulated Ischemia-Reperfusion Injury through AdipoR1/PI3K/AKT Signaling Pathway. *Front Physiol*, 8, 611. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00611>
- Liu, Z., Lu, J., Zhang, D., Niu, L., & Shi, B. (2021). Decreased serum C1Q/TNF-related protein 4 concentrations are associated with type 2 diabetes mellitus. *Ther Adv Endocrinol Metab*, 12, 20420188211059884. <https://doi.org/10.1177/20420188211059884>
- Lovelock, J. E., & Bishop, M. W. (1959). Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature*, 183(4672), 1394-1395. <https://doi.org/10.1038/1831394a0>
- Ma, Z.-G., Yuan, Y.-P., Xu, S.-C., Wei, W.-Y., Xu, C.-R., Zhang, X., Wu, Q.-Q., Liao, H.-H., Ni, J., & Tang, Q.-Z. (2017). CTRP3 attenuates cardiac dysfunction, inflammation, oxidative stress and cell death in diabetic cardiomyopathy in rats. *Diabetologia*, 60(6), 1126-1137. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4232-4>
- Maeda, T., Abe, M., Kurisu, K., Jikko, A., & Furukawa, S. (2001). Molecular cloning and characterization of a novel gene, CORS26, encoding a putative secretory protein and its possible involvement in skeletal development. *J Biol Chem*, 276(5), 3628-3634. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007898200>
- Mao, X., Kikani, C. K., Riojas, R. A., Langlais, P., Wang, L., Ramos, F. J., Fang, Q., Christ-Roberts, C. Y., Hong, J. Y., Kim, R.-y., Liu, F., & Dong, L. Q. (2006). APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. *Nat Cell Biol*, 8(5), 516-523. <https://doi.org/10.1038/ncb1404>
- Mazia, D., Schatten, G., & Sale, W. (1975). Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. *J Cell Biol*, 66(1), 198-200. <https://doi.org/10.1083/jcb.66.1.198>
- McCracken, E., Monaghan, M., & Sreenivasan, S. (2018). Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clin Dermatol*, 36(1), 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2017.09.004>
- Merches, K., Breunig, L., Fender, J., Brand, T., Bätz, V., Idel, S., Kollipara, L., Reinders, Y., Sickmann, A., Mally, A., & Lorenz, K. (2022). The potential of remdesivir to affect function, metabolism and proliferation of cardiac and kidney cells in vitro. *Arch Toxicol*, 96(8), 2341-2360. <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03306-1>
- Merck. (o. J.-a). *Polymerase-Kettenreaktion*. Retrieved 16.07.2022 from <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/technical-documents/technical-article/genomics/pcr/polymerase-chain-reaction>

- Merck. (o. J.-b). *TRI Reagent® Protokoll*. Retrieved 3.3.2020 from <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/technical-documents/protocol/protein-biology/protein-lysis-and-extraction/tri-reagent>
- Moore, X.-I., Tan, S.-I., Lo, C.-y., Fang, L., Su, Y.-D., Gao, X.-M., Woodcock, E. A., Summers, R. J., Tregear, G. W., Bathgate, R. A., & Du, X.-J. (2007). Relaxin antagonizes hypertrophy and apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes. *Endocrinology*, *148*(4), 1582-1589. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1324>
- Müller-Wieland, D., Schütt, K., Knebel, B., Kotzka, J., Lehrke, M., & Marx, N. (2017). Metabolisches Syndrom. *Gastroenterologe*, *12*(4), 286-293. <https://doi.org/10.1007/s11377-017-0174-0>
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In *Methods Enzymol* (Vol. 155, pp. 335-350). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)
- Netzker, R. (2016). Zellzyklus und molekulare Genetik. In *Biochemie* (4 ed., pp. 419-549). Thieme.
- Niemann, B., Li, L., Siegler, D., Siegler, B. H., Knapp, F., Hanna, J., Aslam, M., Kracht, M., Schulz, R., & Rohrbach, S. (2020). CTRP9 Mediates Protective Effects in Cardiomyocytes via AMPK- and Adiponectin Receptor-Mediated Induction of Anti-Oxidant Response. *Cells*, *9*(5), 1229. <https://doi.org/10.3390/cells9051229>
- Ogawa, E., Saito, Y., Harada, M., Kamitani, S., Kuwahara, K., Miyamoto, Y., Ishikawa, M., Hamanaka, I., Kajiyama, N., Takahashi, N., Nakagawa, O., Masuda, I., Kishimoto, I., & Nakao, K. (2000). Outside-in signalling of fibronectin stimulates cardiomyocyte hypertrophy in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, *32*(5), 765-776. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2000.1119>
- Okamoto, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Nishida, M., Arita, Y., Kumada, M., Ohashi, K., Sakai, N., Shimomura, I., Kobayashi, H., Terasaka, N., Inaba, T., Funahashi, T., & Matsuzawa, Y. (2002). Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, *106*(22), 2767-2770. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000042707.50032.19>
- Ouchi, N., Kobayashi, H., Kihara, S., Kumada, M., Sato, K., Inoue, T., Funahashi, T., & Walsh, K. (2004). Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *J Biol Chem*, *279*(2), 1304-1309. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310389200>
- Park, M., Youn, B., Zheng, X. L., Wu, D., Xu, A., & Sweeney, G. (2011). Globular adiponectin, acting via AdipoR1/APPL1, protects H9c2 cells from hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis. *PLoS One*, *6*(4), e19143. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019143>
- Perna, A.-M., Masini, E., Nistri, S., Briganti, V., Chiappini, L., Stefano, P., Bigazzi, M., Pieroni, C., Bani Sacchi, T., & Bani, D. (2005). Novel drug development opportunity for relaxin in acute myocardial infarction: evidences from a swine model. *Faseb j*, *19*(11), 1525-1527. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3664fje>
- Peterson, J. M., Seldin, M. M., Tan, S. Y., & Wong, G. W. (2014). CTRP2 overexpression improves insulin and lipid tolerance in diet-induced obese mice. *PLoS One*, *9*(2), e88535. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088535>
- Peterson, J. M., Wei, Z., & Wong, G. W. (2009). CTRP8 and CTRP9B are novel proteins that hetero-oligomerize with C1q/TNF family members. *Biochem Biophys Res Commun*, *388*(2), 360-365. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.08.014>
- Petty, R. D., Sutherland, L. A., Hunter, E. M., & Cree, I. A. (1995). Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number [<https://doi.org/10.1002/bio.1170100105>]. *J Biolumin Chemilumin*, *10*(1), 29-34. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bio.1170100105>

- Pischon, T., Girman, C. J., Hotamisligil, G. S., Rifai, N., Hu, F. B., & Rimm, E. B. (2004). Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *Jama*, *291*(14), 1730-1737. <https://doi.org/10.1001/jama.291.14.1730>
- Pointon, A., Abi-Gerges, N., Cross, M. J., & Sidaway, J. E. (2013). Phenotypic profiling of structural cardiotoxins in vitro reveals dependency on multiple mechanisms of toxicity. *Toxicol Sci*, *132*(2), 317-326. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft005>
- Promega. (o. J.). *Technical Bulletin. CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay*. Retrieved 03.03.2022 from file:///C:/Users/hornd/AppData/Local/Temp/CellTiterGlo%20Luminescent%20Cell%20Viability%20Assay%20TB288.pdf
- Qi, Y., Xiong, W., Yu, S., Du, Z., Qu, T., He, L., Wei, W., Zhang, L., Liu, K., Li, Y., He, D. Z., & Gong, S. (2021). Deletion of C1ql1 Causes Hearing Loss and Abnormal Auditory Nerve Fibers in the Mouse Cochlea. *Front Cell Neurosci*, *15*, 713651. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.713651>
- Rasmussen, M. S., Lihn, A. S., Pedersen, S. B., Bruun, J. M., Rasmussen, M., & Richelsen, B. (2006). Adiponectin receptors in human adipose tissue: effects of obesity, weight loss, and fat depots [<https://doi.org/10.1038/oby.2006.5>]. *Obesity (Silver Spring)*, *14*(1), 28-35. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/oby.2006.5>
- Rassow, J. (2016a). Abbau der Kohlenhydrate zu Pyruvat bzw. Lactat. In *Biochemie* (4 ed.). Thieme.
- Rassow, J. (2016b). ATP-Synthese durch oxidative Phosphorylierung. In *Biochemie* (4 ed.). Thieme.
- Rassow, J. (2016c). Oxidativer Abbau von Pyruvat: Die Reaktionen der Pyruvat-Dehydrogenase und des Citratzyklus. In *Biochemie* (4 ed.). Thieme.
- Reaven, G. M. (1988). Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, *37*(12), 1595-1607. <https://doi.org/10.2337/diab.37.12.1595>
- Richler, C., & Yaffe, D. (1970). The in vitro cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines. *Dev Biol*, *23*(1), 1-22. [https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(70\)80004-5](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(70)80004-5)
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2004). Cell Viability Assays. In S. Markossian, A. Grossman, K. Brimacombe, M. Arkin, D. Auld, C. P. Austin, J. Baell, T. D. Y. Chung, N. P. Coussens, J. L. Dahlin, V. Devanarayan, T. L. Foley, M. Glicksman, M. D. Hall, J. V. Haas, S. R. J. Hoare, J. Inglese, P. W. Iversen, S. C. Kales, M. Lal-Nag, Z. Li, J. McGee, O. McManus, T. Riss, P. Saradjian, G. S. Sittampalam, M. Tarselli, O. J. Trask, Jr., Y. Wang, J. R. Weidner, M. J. Wildey, K. Wilson, M. Xia, & X. Xu (Eds.), *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Ruoslahti, E. (1981). Fibronectin. *J Oral Pathol*, *10*(1), 3-13. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1981.tb01242.x>
- Russell, R. R., 3rd, Li, J., Coven, D. L., Pypaert, M., Zechner, C., Palmeri, M., Giordano, F. J., Mu, J., Birnbaum, M. J., & Young, L. H. (2004). AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *J Clin Invest*, *114*(4), 495-503. <https://doi.org/10.1172/jci19297>
- Samuel, C. S., Cendrawan, S., Gao, X.-M., Ming, Z., Zhao, C., Kiriazis, H., Xu, Q., Tregear, G. W., Bathgate, R. A., & Du, X.-J. (2011). Relaxin remodels fibrotic healing following myocardial infarction. *Lab Invest*, *91*(5), 675-690. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.198>
- Sarwar, M., Samuel, C. S., Bathgate, R. A., Stewart, D. R., & Summers, R. J. (2015). Serelaxin-mediated signal transduction in human vascular cells: bell-shaped concentration-response curves reflect differential coupling to G proteins. *Br J Pharmacol*, *172*(4), 1005-1019. <https://doi.org/10.1111/bph.12964>

- Schäffler, A., & Buechler, C. (2012). CTRP family: linking immunity to metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, 23(4), 194-204. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.12.003>
- Schmitz, S. (2007). *Der Experimentator: Zellkultur* (4 ed.). Springer.
- Schumm-Draeger, P.-M., & Riemann, J. F. (2017). Das metabolische Syndrom. *Gastroenterologe*, 12(4), 284-285. <https://doi.org/10.1007/s11377-017-0182-0>
- Shah, R. R. (2006). Can pharmacogenetics help rescue drugs withdrawn from the market? *Pharmacogenomics*, 7(6), 889-908. <https://doi.org/10.2217/14622416.7.6.889>
- Shibata, R., Ouchi, N., Ito, M., Kihara, S., Shiojima, I., Pimentel, D. R., Kumada, M., Sato, K., Schiekofer, S., Ohashi, K., Funahashi, T., Colucci, W. S., & Walsh, K. (2004). Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart. *Nature medicine*, 10(12), 1384-1389. <https://doi.org/10.1038/nm1137>
- Shibata, R., Sato, K., Pimentel, D. R., Takemura, Y., Kihara, S., Ohashi, K., Funahashi, T., Ouchi, N., & Walsh, K. (2005). Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms. *Nature medicine*, 11(10), 1096-1103. <https://doi.org/10.1038/nm1295>
- Shiratsuchi, T., Nishimori, H., Ichise, H., Nakamura, Y., & Tokino, T. (1997). Cloning and characterization of BAI2 and BAI3, novel genes homologous to brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (BAI1). *Cytogenet Cell Genet*, 79(1-2), 103-108. <https://doi.org/10.1159/000134693>
- Sigoillot, Séverine M., Iyer, K., Binda, F., González-Calvo, I., Talleur, M., Vodjdani, G., Isope, P., & Selimi, F. (2015). The Secreted Protein C1QL1 and Its Receptor BAI3 Control the Synaptic Connectivity of Excitatory Inputs Converging on Cerebellar Purkinje Cells. *Cell Rep*, 10(5), 820-832. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.034>
- Simpson, P., & Savion, S. (1982). Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells. Cross-striations, ultrastructure, and chronotropic response to isoproterenol. *Circ Res*, 50(1), 101-116. <https://doi.org/doi:10.1161/01.RES.50.1.101>
- Slater, E. C. (1973). The mechanism of action of the respiratory inhibitor, antimycin. *Biochim Biophys Acta*, 301(2), 129-154. [https://doi.org/10.1016/0304-4173\(73\)90002-5](https://doi.org/10.1016/0304-4173(73)90002-5)
- Song, Y., Zhang, Y., Wan, Z., Pan, J., Gao, F., Li, F., Zhou, J., & Chen, J. (2022). CTRP3 alleviates cardiac ischemia/reperfusion injury via LAMP1/JIP2/JNK signaling pathway. *Aging*, 14(3), 1321-1335. <https://doi.org/10.18632/aging.203876>
- Spranger, J. (2009). Bedeutung von Ernährung und genetischen Faktoren bei der Entstehung von Insulinresistenz und Typ-2-Diabetes mellitus [Nutrition and Genetics in the Development of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes mellitus]. *Diabetologie und Stoffwechsel*, 4(04), 223-225.
- Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*, 111, A3.B.1-A3.B.3. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>
- Summers, R. J., Halls, M. L., & Bathgate, R. A. D. (2018). Relaxin Family Peptide Receptors RXFP1 and RXFP2. In *Encyclopedia of Signaling Molecules* (2. ed., pp. 4583-4615). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4_362
- Sun, X., Alford, J., & Qiu, H. (2021). Structural and Functional Remodeling of Mitochondria in Cardiac Diseases. *Int J Mol Sci*, 22(8). <https://doi.org/10.3390/ijms22084167>
- Sutton, S. W., Bonaventure, P., Kuei, C., Roland, B., Chen, J., Nepomuceno, D., Lovenberg, T. W., & Liu, C. (2004). Distribution of G-Protein-Coupled Receptor (GPCR)135 Binding Sites and Receptor mRNA in the Rat Brain Suggests a Role for Relaxin-3 in Neuroendocrine and Sensory Processing. *Neuroendocrinology*, 80(5), 298-307. <https://doi.org/10.1159/000083656>

- Tan, S. C., & Yiap, B. C. (2009). DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *J Biomed Biotechnol*, 2009, 574398. <https://doi.org/10.1155/2009/574398>
- Tanabe, H., Fujii, Y., Okada-Iwabu, M., Iwabu, M., Nakamura, Y., Hosaka, T., Motoyama, K., Ikeda, M., Wakiyama, M., Terada, T., Ohsawa, N., Hato, M., Ogasawara, S., Hino, T., Murata, T., Iwata, S., Hirata, K., Kawano, Y., Yamamoto, M., . . . Yokoyama, S. (2015). Crystal structures of the human adiponectin receptors. *Nature*, 520(7547), 312-316. <https://doi.org/10.1038/nature14301>
- Tang, Y. T., Hu, T., Arterburn, M., Boyle, B., Bright, J. M., Emtage, P. C., & Funk, W. D. (2005). PAQR proteins: a novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif. *J Mol Evol*, 61(3), 372-380. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0375-2>
- Thanasupawat, T., Glogowska, A., Burg, M., Krcek, J., Beiko, J., Pitz, M., Zhang, G.-J. J., Hombach-Klonisch, S., & Klonisch, T. (2018). C1q/TNF-related peptide 8 (CTRP8) promotes temozolomide resistance in human glioblastoma. *Mol Oncol*, 12(9), 1464-1479. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12349>
- Thermo Fisher Scientific. (o. J.-a). *The Basics: Nuclease Protection Assays*. Retrieved 18.07.2022 from <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/ambion-tech-support/ribonuclease-protection-assays/general-articles/the-basics-what-is-a-nuclease-protection-assay.html#top>
- Thermo Fisher Scientific. (o. J.-b). *Better PCR. All day, every day*. Retrieved 16.07.2022 from https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/BID/Flyers/dreamtaq-polymerase-flyer.pdf?_ga=2.211693649.519050981.1657980357-918433195.1657980357
- Thermo Fisher Scientific. (o. J.-c). *RNA isolation is both a skill and an art*. Retrieved 15.07.2022 from <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/general-articles/the-do-s-and-don-ts-of-total-rna-isolation.html>
- Tsao, T.-S., Tomas, E., Murrey, H. E., Hug, C., Lee, D. H., Ruderman, N. B., Heuser, J. E., & Lodish, H. F. (2003). Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways. *J Biol Chem*, 278(50), 50810-50817. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309469200>
- Ulrich, M. M., Janssen, A. M., Daemen, M. J., Rappaport, L., Samuel, J.-L. L., Contard, F., Smits, J. F., & Cleutjens, J. P. (1997). Increased expression of fibronectin isoforms after myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol*, 29(9), 2533-2543. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1997.0486>
- Varga, Z. V., Ferdinandy, P., Liaudet, L., & Pacher, P. (2015). Drug-induced mitochondrial dysfunction and cardiotoxicity. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 309(9), H1453-H1467. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00554.2015>
- Vaupel, P., & Multhoff, G. (2021). Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. *J Physiol*, 599(6), 1745-1757. <https://doi.org/10.1113/jp278810>
- Wang, L. (2017). CTRP4: a new member of the adipocytokine family. *Cell Mol Immunol*, 14(10), 868-870. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.83>
- Wang, Y., Lau, W. B., Gao, E., Tao, L., Yuan, Y., Li, R., Wang, X., Koch, W. J., & Ma, X.-L. (2010). Cardiomyocyte-derived adiponectin is biologically active in protecting against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298(3), E663-670. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00663.2009>
- Wei, Z., Lei, X., Seldin, M. M., & Wong, G. W. (2012). Endopeptidase cleavage generates a functionally distinct isoform of C1q/tumor necrosis factor-related protein-12

- (CTRP12) with an altered oligomeric state and signaling specificity. *J Biol Chem*, 287(43), 35804-35814. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.365965>
- Wei, Z., Peterson, J. M., & Wong, G. W. (2011). Metabolic regulation by C1q/TNF-related protein-13 (CTRP13): activation OF AMP-activated protein kinase and suppression of fatty acid-induced JNK signaling. *J Biol Chem*, 286(18), 15652-15665. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.201087>
- Wei, Z., Seldin, M. M., Natarajan, N., Djemal, D. C., Peterson, J. M., & Wong, G. W. (2013). C1q/tumor necrosis factor-related protein 11 (CTRP11), a novel adipose stroma-derived regulator of adipogenesis. *J Biol Chem*, 288(15), 10214-10229. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.458711>
- Weihe, P., & Weihrauch-Blüher, S. (2019). Metabolic Syndrome in Children and Adolescents: Diagnostic Criteria, Therapeutic Options and Perspectives. *Curr Obes Rep*, 8(4), 472-479. <https://doi.org/10.1007/s13679-019-00357-x>
- Willems, I. E., Arends, J. W., & Daemen, M. J. (1996). Tenascin and fibronectin expression in healing human myocardial scars. *J Pathol*, 179(3), 321-325. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9896\(199607\)179:3<321::Aid-path555>3.0.Co;2-8](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9896(199607)179:3<321::Aid-path555>3.0.Co;2-8)
- Windler, E., & Zyriax, B.-C. (2016). Cholesterinsenkung zur kardiovaskulären Prävention. *Gynakologe*, 49(4), 243-251. <https://doi.org/10.1007/s00129-016-3853-x>
- Wong, G. W., Krawczyk, S. A., Kitidis-Mitrokostas, C., Revett, T., Gimeno, R., & Lodish, H. F. (2008). Molecular, biochemical and functional characterizations of C1q/TNF family members: adipose-tissue-selective expression patterns, regulation by PPAR-gamma agonist, cysteine-mediated oligomerizations, combinatorial associations and metabolic functions. *The Biochemical journal*, 416(2), 161-177. <https://doi.org/10.1042/bj20081240>
- Wong, G. W., Wang, J., Hug, C., Tsao, T.-S., & Lodish, H. F. (2004). A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(28), 10302-10307. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403760101>
- Wyzgol, A., Müller, N., Fick, A., Munkel, S., Grigoleit, G. U., Pfizenmaier, K., & Wajant, H. (2009). Trimer Stabilization, Oligomerization, and Antibody-Mediated Cell Surface Immobilization Improve the Activity of Soluble Trimers of CD27L, CD40L, 41BBL, and Glucocorticoid-Induced TNF Receptor Ligand. *J Immunol*, 183(3), 1851-1861. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802597>
- Xu, A., Wang, Y., Keshaw, H., Xu, L. Y., Lam, K. S., & Cooper, G. J. (2003). The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest*, 112(1), 91-100. <https://doi.org/10.1172/jci17797>
- Yaffe, D. (1968). Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 61(2), 477-483.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohteki, T., Uchida, S., Takekawa, S., Waki, H., Tsuno, N. H., Shibata, Y., Terauchi, Y., Froguel, P., . . . Kadowaki, T. (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*, 423(6941), 762-769. <https://doi.org/10.1038/nature01705>
- Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O., Akanuma, Y., Gavrilova, O., Vinson, C., Reitman, M. L., Kagechika, H., Shudo, K., Yoda, M., Nakano, Y., . . . Kadowaki, T. (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nature medicine*, 7(8), 941-946. <https://doi.org/10.1038/90984>

- Yi, W., Sun, Y., Yuan, Y., Lau, W. B., Zheng, Q., Wang, X., Wang, Y., Shang, X., Gao, E., Koch, W. J., & Ma, X.-L. (2012). C1q/tumor necrosis factor-related protein-3, a newly identified adipokine, is a novel antiapoptotic, proangiogenic, and cardioprotective molecule in the ischemic mouse heart. *Circulation*, *125*(25), 3159-3169. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.099937>
- Zhang, C.-L., Feng, H., Li, L., Wang, J.-Y., Wu, D., Hao, Y.-T., Wang, Z., Zhang, Y., & Wu, L.-L. (2017). Globular CTRP3 promotes mitochondrial biogenesis in cardiomyocytes through AMPK/PGC-1 α pathway. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, *1861*(1 Pt A), 3085-3094. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.10.022>
- Zhao, D., Feng, P., Sun, Y., Qin, Z., Zhang, Z., Tan, Y., Gao, E., Lau, W. B., Ma, X., Yang, J., Yu, S., Xu, X., Yi, D., & Yi, W. (2018). Cardiac-derived CTRP9 protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via calreticulin-dependent inhibition of apoptosis. *Cell death & disease*, *9*(7), 723. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0726-3>
- Zheng, Q., Yuan, Y., Yi, W., Lau, W. B., Wang, Y., Wang, X., Sun, Y., Lopez, B. L., Christopher, T. A., Peterson, J. M., Wong, G. W., Yu, S., Yi, D., & Ma, X.-L. (2011). C1q/TNF-Related Proteins, A Family of Novel Adipokines, Induce Vascular Relaxation Through the Adiponectin Receptor-1/AMPK/eNOS/Nitric Oxide Signaling Pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *31*(11), 2616-2623. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.231050>
- Zhou, B., & Tian, R. (2018). Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure. *J Clin Invest*, *128*(9), 3716-3726. <https://doi.org/10.1172/jci120849>
- Zhu, D., Zhang, Z., Zhao, J., Liu, D., Gan, L., Lau, W. B., Xie, D., Meng, Z., Yao, P., Tsukuda, J., Christopher, T. A., Lopez, B. L., Gao, E., Koch, W. J., Wang, Y., & Ma, X. L. (2022). Targeting Adiponectin Receptor 1 Phosphorylation Against Ischemic Heart Failure. *Circ Res*, *131*(2), e34-e50. <https://doi.org/10.1161/circresaha.121.319976>

Appendix

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Viabilität von H9c2-Zellen nach 24-stündiger CTRP-Behandlung ohne anti-Flag M2 Antikörper.	34
Abbildung 2: Viabilität von H9c2-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit anti-Flag M2 Antikörper vorinkubierten CTRPs.	35
Abbildung 3: Viabilität von H9c2-Zellen nach 72-stündiger CTRP-Behandlung ohne anti-Flag M2 Antikörper.	36
Abbildung 4: Viabilität von H9c2-Zellen nach 72- stündiger Behandlung mit anti-Flag M2 Antikörper vorinkubierten CTRPs.	37
Abbildung 5: Viabilität von AC16-Zellen nach 24-stündiger CTRP-Behandlung ohne anti-Flag M2 Antikörper.	40
Abbildung 6: Viabilität von AC16-Zellen nach 24- stündiger Behandlung mit anti-Flag M2 Antikörper vorinkubierten CTRPs.	41
Abbildung 7: Viabilität von AC16-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit aufgereinigtem CTRP2.	42
Abbildung 8: Viabilität von AC16-Zellen nach 72-stündiger CTRP-Behandlung ohne anti-Flag M2 Antikörper.	43
Abbildung 9: Viabilität von AC16-Zellen nach 72- stündiger Behandlung mit anti-Flag M2 Antikörper vorinkubierten CTRPs.	44
Abbildung 10: Laktatsekretion von H9c2-Zellen nach 24-stündiger CTRP-Behandlung ohne anti-Flag M2 Antikörper.	47
Abbildung 11: Laktatsekretion von H9c2-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit anti-Flag M2 Antikörper vorinkubierten CTRPs.	48
Abbildung 12: Laktatsekretion von H9c2-Zellen nach 72-stündiger CTRP-Behandlung ohne anti-Flag M2 Antikörper.	49

Abbildung 13: Laktatsekretion von H9c2-Zellen nach 72- stündiger Behandlung mit anti-Flag M2 Antikörper vorinkubierten CTRPs.....	50
Abbildung 14: Laktatsekretion von AC16-Zellen nach 24-stündiger CTRP-Behandlung ohne anti-Flag M2 Antikörper.	53
Abbildung 15: Laktatsekretion von AC16-Zellen nach 24- stündiger Behandlung mit anti-Flag M2 Antikörper vorinkubierten CTRPs.....	54
Abbildung 16: Laktatsekretion von AC16-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit aufgereinigtem CTRP2.	55
Abbildung 17: Laktatsekretion von AC16-Zellen nach 72-stündiger CTRP-Behandlung ohne anti-Flag M2 Antikörper.	56
Abbildung 18: Laktatsekretion von AC16-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit anti-Flag M2 Antikörper vorinkubierten CTRPs.....	57
Abbildung 19: Viabilität von H9c2-Zellen nach Ischämiestimulus.	59
Abbildung 20: Laktatsekretion von H9c2-Zellen nach Ischämiestimulus.....	60
Abbildung 21: mRNA-Expressionskontrolle des Rezeptors AdipoR1 in H9c2-Zellen...	63
Abbildung 22: mRNA-Expressionskontrolle des Rezeptors AdipoR2 in H9c2-Zellen...	63
Abbildung 23: mRNA-Expressionskontrolle des Rezeptors BAI3 in H9c2-Zellen.....	64
Abbildung 24: mRNA-Expressionskontrolle des Rezeptors RXFP1 in H9c2-Zellen.....	65
Abbildung 25: mRNA-Expressionskontrolle des Rezeptors AdipoR1 in AC16-Zellen. .	67
Abbildung 26: mRNA-Expressionskontrolle des Rezeptors AdipoR2 in AC16-Zellen. .	67
Abbildung 27: mRNA-Expressionskontrolle des Rezeptors BAI3 in AC16-Zellen.	68
Abbildung 28: mRNA-Expressionskontrolle des Rezeptors RXFP1 in AC16-Zellen. ...	70
Abbildung 29: mRNA-Expressionskontrolle des Rezeptors AdipoR1 in Mauskardiomyozyten und kardialen Mausfibroblasten.	71

Abbildung 30: mRNA-Expressionskontrolle des Rezeptors AdipoR2 in Muskardiomyozyten und kardialen Mausfibroblasten.	73
Abbildung 31: mRNA-Expressionskontrolle des Rezeptors BAI3 in Muskardiomyozyten und kardialen Mausfibroblasten.	74
Abbildung 32: mRNA-Expressionskontrolle des Rezeptors RXFP1 in Muskardiomyozyten und kardialen Mausfibroblasten.	76

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ct-Werte des mRNA-Nachweises für den Rezeptor BAI3 in H9c2-Zellen....	64
Tabelle 2: ct-Werte des mRNA-Nachweises für den Rezeptor RXFP1 in H9c2-Zellen.	65
Tabelle 3: ct-Werte des mRNA-Nachweises für den Rezeptor AdipoR2 in AC16-Zellen.	68
Tabelle 4: ct-Werte des mRNA-Nachweises für den Rezeptor BAI3 in AC16-Zellen. ...	69
Tabelle 5: ct-Werte des mRNA-Nachweises für den RXFP1-Rezeptor in AC16-Zellen.	70
Tabelle 6: ct-Werte des mRNA-Nachweises für den AdipoR1-Rezeptor in Mauszellen.	72
Tabelle 7: ct-Werte des mRNA-Nachweises für den AdipoR2-Rezeptor in Mauszellen.	73
Tabelle 8: ct-Werte des mRNA-Nachweises für den BAI3-Rezeptor in Mauszellen.....	75
Tabelle 9: ct-Werte des mRNA-Nachweises für den RXFP1-Rezeptor in Mauszellen.	76

III. Abkürzungsverzeichnis

ACC	Acetyl-CoA Carboxylase
ACE	<i>Angiotensin converting enzyme</i>
AdipoR1	Adiponektin-Rezeptor 1
AdipoR2	Adiponektin-Rezeptor 2
ADP	Adenosindiphosphat
Akt	Proteinkinase B
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
AT	Angiotensin
ATP	Adenosintriphosphat
BAI3	<i>Brain-specific angiogenesis inhibitor 3</i>
BBS	Boratgepufferte Kochsalzlösung
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CoA	Coenzym A
COX-2	Cyclooxygenase 2
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
ct	<i>threshold cycle</i>
CTRP	<i>C1q/tumor necrosis factor-related proteins</i>
CUB	Strukturmotiv
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DME/F-12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
ERK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
FCS	Fetales Kälberserum
gCTRP	Globuläres CTRP
GLUT	Glukosetransporter
GPS	G-Protein gekoppelte Rezeptoren Proteolyseseite

HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HMG	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl
HMW	<i>High-molecular-mass</i>
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
INT	Iodnitrotetrazolium
INTH	Reduziertes INT
JIP2	<i>JNK-interacting protein</i>
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
LAMP	Lysosomal-assoziiertes Membranprotein
LDH	Laktatdehydrogenase
LDLa	<i>Low density lipoprotein receptor type A</i>
LPR	<i>Leucin-rich repeats</i>
MEM	<i>Modified Eagle Medium</i>
mTOR	<i>Mechanistic target of Rapamycin</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	Reduziertes NAD
NAFLD	<i>Non-alcoholic fatty liver disease</i>
NMCM	Neonatale Mauskardiomyozyten
PAQR	Progesteron und Adiponektin Q Rezeptor
PGC-1 α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1α</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMS	Phenazinmethosulfat
PMSH	Reduziertes PMS
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RXFP1	<i>Relaxin family peptide receptor 1</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
THD	TNF-Homologiedomäne
TNC-Domäne	Tenascin-C-Domäne
TNF	Tumornekrosefaktor

IV. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Kristina Lorenz für die Möglichkeit der Promotion am Institut für Pharmakologie und Toxikologie. Ihre Unterstützung und Betreuung schätze ich sehr.

Herrn Prof. Dr. Wajant danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Ich möchte mich herzlich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Lorenz für die Hilfsbereitschaft und kollegiale Atmosphäre bedanken.

Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Constanze Scharnbacher bedanken. Die Zeit, die du meiner Dissertation gewidmet hast, weiß ich sehr zu schätzen.

Ein weiterer Dank gilt Annette Hannawacker für ihre Hilfe im Labor.

Vielen Dank auch an Dr. Katja Merches, Dr. Theresa Brand, Julia Fender und Dr. Isabell Lang.