

Tim Christian Kuhn
Dr. med.

Exploring the communication of cardiomyocytes through a novel secretome analysis

Fach/Einrichtung: Innere Medizin
Doktorvater: Prof. Dr. med. Florian Leuschner

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache weltweit. Gegensätzlich zur Abnahme der Todesrate von Herzinfarkten, steht die Zunahme der Morbidität durch Herzinsuffizienz. Hierdurch zeigt sich die Relevanz der Erforschung von molekularen Mechanismen im Heilungsprozess nach Myokardinfarkt und in der Entstehung der ischämischen Kardiomyopathie.

Die Proteinsekretion im Allgemeinen, sowie insbesondere die Kommunikation basierend auf sezernierten Proteinen zwischen verschiedenen Zelltypen im Herzen, wie Kardiomyozyten und Makrophagen, spielen eine wichtige Rolle in physiologischen und pathologischen kardialen Prozessen. Sekretomanalysen erlauben eine unabhängige Datenerfassung mit hohem Datendurchsatz von sezernierten Proteinen und ermöglichen so die Entdeckung von neuen molekularen Targets, Biomarkern und Stoffwechselwegen.

In dieser Doktorarbeit wurde ein neuer Ansatz einer Sekretomanalyse von primären Ratten-Kardiomyozyten etabliert, welche die Kombination aus impuls- „stable isotope labeling with amino acids“ (SILAC) und azidohomoalanine (AHA)-Markierung nutzt und mit 10%-haltigem Medium während der Stimulierungsphase angewandt werden kann. Trotz des ausgeprägten Hintergrundrauschens bedingt durch die hohe Konzentration von Serumproteinen, konnte im Vergleich zu vorherigen Sekretomanalysen an primären Ratten-Kardiomyozyten die 5fache Anzahl an Proteinen identifiziert werden.

Insgesamt konnten 42 Proteine, welche eine signifikante Änderung ihres Sekretionsgrades zeigten, in verschiedenen Stimulierungs- und Markierungsphasen innerhalb von 30 Stunden Hypoxiebehandlung von Kardiomyozyten, identifiziert werden. Neben vielen, im Kontext des Myokardinfarkts und der Ischämie bekannten Proteinen wie Vegfa oder Igfbp3, konnten einige in diesem Zusammenhang bislang noch unbekannte Proteine, wie Pcsk6, Serpinb2 und Igfbp6 detektiert werden. In weiterführenden Experimenten *in vitro* sowie *in vivo*, zeigte sich eine relevante Beteiligung von Pcsk6 als bisher unbekannter Akteur in der kardialen Fibrose mit Beteiligung im TGF-beta-Stoffwechselweg.

Die Relevanz der Inflammation und von Immunzellen, wie Makrophagen im Heilungsprozess nach Myokardinfarkt sowie septischem Geschehen, konnte bereits in zahlreichen Publikationen gezeigt werden. Vor allem die Erforschung der Zell-Zell-Kommunikation zwischen Kardiomyozyten und inflammatorischen Makrophagen wird als äußerst relevant für die Identifizierung von Proteinen mit hohem positiven modulatorischen Effekt auf den Heilungsprozess eingeschätzt.

Neben der Durchführung einer Sekretomanalyse von Lipopolysaccharid und Isoproterenol-stimulierten Kardiomyozyten, konnte ein experimenteller Aufbau zur Erforschung der Proteinsekretion während der Zell-Zell-Kommunikation zwischen Kardiomyozyten und inflammatorischen Makrophagen etabliert werden. Die Behandlung von Kardiomyozyten mit dem Sekretom von Lipopolysaccharid-stimulierten Makrophagen führte zu einer deutlichen Zunahme in der Anzahl von sezernierten Proteinen verglichen mit einer alleinigen

Behandlung mit Hypoxie, Lipopolysaccharid oder Isoproterenol. Insgesamt konnten in diesem Kommunikations-Experiment bis zu 182 von Kardiomyozyten sezernierte Proteine mit signifikanter Änderung des Sekretionsgrades identifiziert werden. Neben der Detektion von IL6, Ccl2 und Cxcl1 als zentrale „Hubs“ in der Kommunikation zwischen diesen beiden Zelltypen, muss die aktuell unterschätzte Rolle des Kardiomyozyten hinsichtlich immunologischer und inflammatorischer Prozesse überdacht und hinterfragt werden.

Zusammenfassend konnte das hohe Potenzial von Sekretomanalysen aus dem Überstand von Kardiomyozyten gezeigt werden und führte zur Identifizierung von bekannten, aber auch bislang unbekanntem sezernierten Proteinen und somit potentiellen „drug targets“ sowie Biomarkern. Weiterführende Studien werden benötigt, um die Regulierung und Funktion dieser identifizierten Proteine zu prüfen.