

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Universitäres Herz- und Gefäßzentrum Hamburg

Klinik und Poliklinik für Kinderherzmedizin und Erwachsene mit angeborenen Herzfehlern

Prof. Dr. med. Rainer Kozlik-Feldmann

## **Untersuchung der Zellteilung von Herzmuskelzellen bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Franziska Haniel,

aus Düsseldorf

Hamburg 2023

**(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)**

**Angenommen von der**

**Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 10.10.2023**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der**

**Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Thomas Eschenhagen**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Rainer Kozlik-Feldmann**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Inhaltsverzeichnis</b>   |           |
| <b>1. INHALTSVERZEICHNIS.....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>2. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG .....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>3. EINLEITUNG .....</b>   | <b>6</b>  |
| 3.1. ANGEBORENE HERZFEHLER BEI KINDERN.....  | 6         |
| 3.1.1. <i>Ätiologie, Epidemiologie, Klinik und Therapie.....</i>                                     | <i>6</i>  |
| 3.1.2. <i>Pathophysiologie.....</i>  | <i>8</i>  |
| 3.2. KARDIOMYOZYTENPROLIFERATION IN TIER- UND MENSCHENMODELLEN .....                                 | 9         |
| 3.3. KARDIOMYOZYTEN REGENERATIONSFÄHIGKEIT NACH VERLETZUNG IM JUGENDLICHEN UND ERWACHSENEN HERZ..... | 12        |
| 3.4. SAUERSTOFF ALS EINFLUSSFAKTOR AUF KARDIOMYOZYTENPROLIFERATION .....                             | 13        |
| 3.5. KARDIOMYOZYTEN PROLIFERATION BEI KINDERN MIT ANGEBORENEN HERZFEHLERN .....                      | 16        |
| <b>4. MATERIAL UND METHODEN:.....</b>  | <b>18</b> |
| 4.1. MATERIAL .....  | 18        |
| 4.1.1. <i>Materialien.....</i>   | <i>18</i> |
| 4.1.2. <i>Geräte.....</i>  | <i>18</i> |
| 4.1.3. <i>Substanzen und Lösungen.....</i>   | <i>19</i> |
| 4.1.4. <i>Primär Antikörper.....</i>   | <i>19</i> |
| 4.1.5. <i>Sekundär Antikörper und Kernfarbstoffe.....</i>  | <i>19</i> |
| 4.2. METHODEN .....  | 20        |
| 4.2.1. <i>Study Population and Tissue sampling:.....</i>   | <i>20</i> |
| 4.2.2. <i>Herstellung histologischer Präparate .....</i>   | <i>21</i> |
| 4.2.3. <i>Entparaffinieren.....</i>  | <i>21</i> |
| 4.2.4. <i>Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....</i>   | <i>21</i> |
| 4.2.5. <i>Masson-Goldner-Trichrom-Färbung.....</i>   | <i>21</i> |
| 4.2.6. <i>Immunhistochemie.....</i>  | <i>22</i> |
| 4.2.7. <i>Alpha- Aktinin:.....</i>   | <i>23</i> |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 4.2.8.     | <i>PCM1 &amp; Ki-67</i> .....   | 23        |
| 4.3.       | ANALYSE:.....   | 24        |
| 4.4.       | STATISTISCHE AUSWERTUNG .....   | 24        |
| <b>5.</b>  | <b>ERGEBNISSE</b> .....   | <b>25</b> |
| 5.1.       | STUDIENPOPULATION:.....   | 25        |
| 5.2.       | HÖHERE KARDIOMYOZYTEN ZELLZYKLUSAKTIVITÄT IN DER JÜNGEREN ALTERSGRUPPE ..                                   | 34        |
| 5.3.       | GESTEIGERTE KARDIOMYOZYTEN ZELLZYKLUSAKTIVITÄT IN KINDERN MIT ANGEBORENEN<br>ZYANOTISCHEN HERZFEHLERN ..... | 37        |
| 5.4.       | AURORA B NACHWEIS.....  | 39        |
| <b>6.</b>  | <b>DISKUSSION</b> .....   | <b>40</b> |
| 6.1.       | ALTERSABHÄNGIGE ZELLZYKLUSAKTIVITÄT .....   | 40        |
| 6.2.       | DER EINFLUSS DES SAUERSTOFFPARTIALDRUCKS AUF DIE PROLIFERATION VON<br>KARDIOMYOZYTEN .....                  | 42        |
| 6.3.       | KARDIOMYOZYTEN ZELLZYKLUSAKTIVITÄT BEI KINDERN MIT ANGEBORENEN HERZFEHLERN<br>44                            |           |
| 6.4.       | LIMITATIONEN DER ARBEIT.....  | 45        |
| 6.5.       | FAZIT DER DISKUSSION .....  | 46        |
| <b>7.</b>  | <b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....  | <b>47</b> |
| <b>8.</b>  | <b>ABSTRACT</b> .....   | <b>49</b> |
| <b>9.</b>  | <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....  | <b>50</b> |
| <b>10.</b> | <b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....   | <b>51</b> |
| <b>11.</b> | <b>DANKSAGUNG</b> .....   | <b>56</b> |
| <b>12.</b> | <b>LEBENSLAUF</b> .....   | <b>57</b> |
| <b>13.</b> | <b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b> .....  | <b>59</b> |

## 2. Arbeitshypothese und Fragestellung

Knapp ein Prozent aller Neugeborenen kommen mit einem angeborenen Herzfehler zur Welt (Van Der Bom *et al.*, 2011). Die Therapien sind vielfältig und reichen von pharmakologischen Ansätzen bis hin zur operativen Therapie. Häufig ist ein kurativer Ansatz nicht möglich und die Therapie resultiert in einer Palliation. Echte kurative Ansätze für komplexe Herzfehler fehlen weiterhin und regenerative Ansätze könnten eine neue Strategie bei angeborenen Herzfehlern darstellen. Die Regenerationsfähigkeit des Herzens ist nach der Geburt stark limitiert, sodass beschädigte, fehlende oder fehlangelegte Strukturen des Herzens nicht vom Körper selbst regeneriert werden können. Studien haben gezeigt, dass die Fähigkeit zur Zellteilung, bei Herzmuskelzellen kurz nach der Geburt verloren geht, so dass das erwachsene Herz nur noch eine geringe regenerative Fähigkeit besitzt (Li *et al.*, 1996; Laflamme and Murry, 2011; Ye *et al.*, 2016). Das neonatale Herz dagegen besitzt eine stärker ausgeprägte Fähigkeit zur Kardiomyozytenregeneration (Haubner *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2018). Welche Faktoren für die Regenerationsfähigkeit der Kardiomyozyten verantwortlich sind, bleibt bis zum jetzigen Zeitpunkt unklar. Einige Hinweise lassen vermuten, dass der postnatal ansteigende Sauerstoffpartialdruck ein möglicher Faktor ist (Nakada *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2019). Bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern werden zyanotische von nicht-zyanotischen Herzfehlern unterschieden. Wie sich die Regenerationsfähigkeit der Kardiomyozyten bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern verhält, bei denen postnatal niedrigere Sauerstoffpartialdrücke bestehen, ist bisher nur wenig erforscht.

Unsere Hypothese war, dass bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern die Zellzyklusaktivität der Kardiomyozyten postnatal abnimmt, bei Patienten mit zyanotischen Herzfehlern (=niedrigerer Sauerstoffpartialdruck) jedoch eine höhere Kardiomyozytenzellzyklusaktivität vorkommt als bei Patienten mit nicht-zyanotischen Vitien.

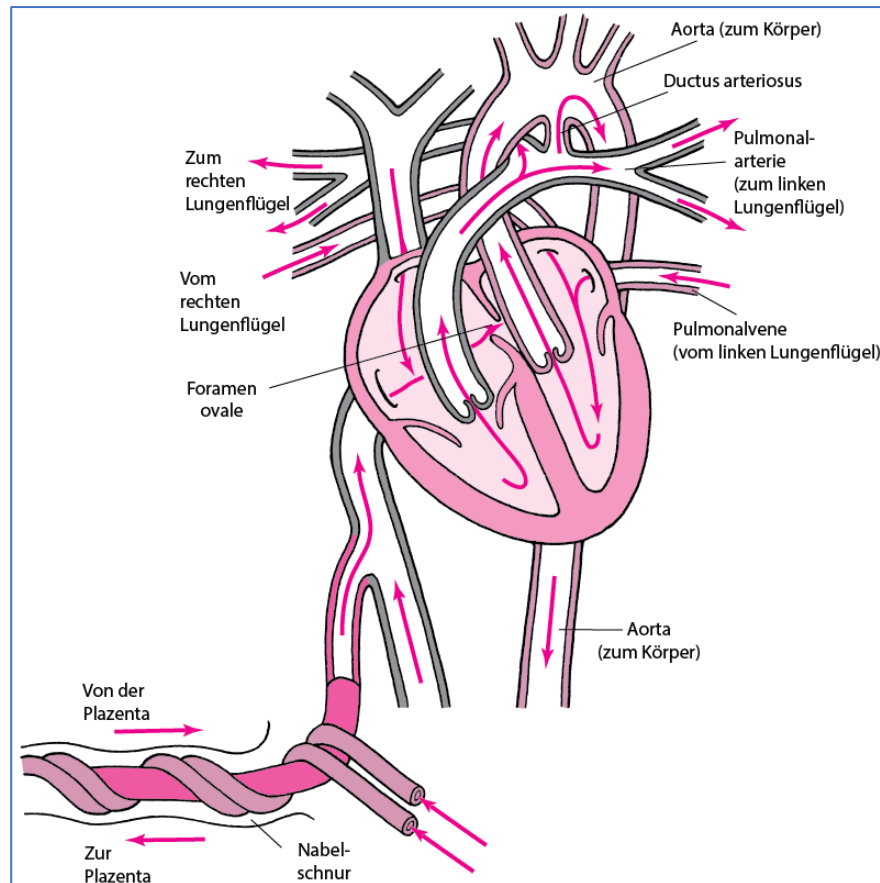
### 3. Einleitung

#### 3.1. Angeborene Herzfehler bei Kindern

##### 3.1.1. Ätiologie, Epidemiologie, Klinik und Therapie

Angeborene Herzfehler betreffen ca. 1 % aller Neugeborenen und zählen damit weltweit zu den häufigsten angeborenen Fehlbildungen (Hoffman and Kaplan, 2002). Die Ätiologie von angeborenen Herzfehlern ist heutzutage noch Großteils unbekannt. Die meisten Fälle sind multifaktoriell und resultieren aus einer Kombination von genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren. Faktoren wie Diabetes mellitus oder Infektionen während der Schwangerschaft, sowie Alkohol-, Tabak- und Drogenkonsum steigern das Risiko von angeborenen Herzfehlern (Hoffman and Kaplan, 2002). Genetische Syndrome und chromosomale Aberrationen haben auch eine Assoziation mit angeborenen Herzfehlern. Der Begriff „angeborener Herzfehler“ gilt als Sammelbegriff, welcher viele verschiedenen Ätiologien der Herzfehler beinhaltet. Aufgrund der Heterogenität der Erkrankung gibt es keine einheitliche Therapieform und jede Therapie muss gesondert auf die Hämodynamik der kardialen Fehlbildung eingehen. Der therapeutische Goldstandard umfasst heutzutage meist eine Kombination aus Pharmakotherapie und Chirurgie. Grundsätzlich werden zyanotische von nicht-zyanotischen Herzfehlern unterschieden. Bei zyanotischen Herzfehlern kommt es aufgrund einer Obstruktion (im Rahmen einer Verlegung oder Fehlanlage des Ausflusstraktes) und/oder eines großen Septumdefektes zu einem Rechts-Links Shunt. Dadurch vermischt sich sauerstoffärmeres Blut aus dem rechten Herzen unter Umgehung des Lungenkreislaufes mit dem Sauerstoff angereichertem Blut aus dem linken Herzen. Folglich kommt es zu einer Mischzirkulation mit einer Zyanose, die in einer Unterversorgung der Organe resultiert. Angeborene Herzfehler betreffen ca. 8-9 aus 1000 Geburten. Bei ca. 25% hiervon handelt es sich um zyanotische Herzfehler (Mahle *et al.*, 2009; Ossa Galvis *et al.*, 2022). Damit sind zyanotische Herzfehler seltener, jedoch stellen sie direkt nach der Geburt rasch einen lebensbedrohlichen Zustand dar. Im Mutterleib unterliegt die Hämodynamik des Fetus einem fetalen Kreislauf. Sauerstoffreiches Blut wird von der Plazenta über die Vena umbilicalis, via den Ductus venosus hepatis in die Vena cava inferior transportiert und weiter in den rechten Vorhof (**Abb. 1**). Hier mischt sich das sauerstoffreiche Blut mit dem sauerstoffarmen Blut aus der Vena cava inferior aus der unteren Körperhälfte sowie dem Blut aus der Vena cava superior der oberen Körperhälfte des Fetus. Das „Mischblut“ gelangt nun unter Umgehung der Lunge über das Foramen ovale vom rechten in den linken Vorhof. Von dort gelangt es von der linken Kammer über

die Aorta in den Systemkreislauf und schließlich über A. umbilicalis zurück zur Plazenta. Direkt postnatal kommt es durch die ersten Atemzüge des Neugeborenen zu einer Beendigung des fetalen Kreislaufes (**Abb. 1**). Mit den ersten Atemzügen kommt es zu einer Entfaltung der Lunge und damit zum Sinken des pulmonalarteriellen Drucks. Durch das Abnabeln und damit dem Wegfall der Plazenta kommt es gleichzeitig zu einer Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes. Dadurch entsteht ein Verschluss des Foramen ovale und damit eine Beendigung des Rechts-Links Shunt auf Vorhofebene. Bei einem Neugeborenen mit einem zyanotischen Herzfehler, stellt die Geburt und die damit einhergehende Zäsur des fetalen Kreislaufes eine kritische Situation dar. So schafft es zum Beispiel bei einem hypoplastischen Linksherz Syndrom der hypotrophe linke Ventrikel meist nicht dem deutlichen Anstieg des Systemkreislaufes Stand zu halten. Es resultiert ein lebensbedrohlicher Zustand innerhalb der ersten Lebensstage. Ohne eine therapeutische Intervention versterben 95% der Patienten mit hypoplastischen Linksherz Syndrom innerhalb der ersten Lebenswochen (Gilboa *et al.*, 2010). Aufgrund der hohen Morbidität und Mortalität der Kinder mit angeboren Herzfehlern ist ein optimales Therapiekonzept ausschlaggebend. Je nach Ausmaß des Herzfehlers schaffen es selbst die modernsten Therapien und innovativsten operativen Techniken nicht den progressiven Verlust der Herzfunktion zu stoppen (Bolger, Coats and Gatzoulis, 2003) und können nur eine Palliation anbieten. Somit bleibt die Herztransplantation oftmals als Ultima Ratio, die einzige kurative Möglichkeit für diese Kinder.



**Abbildung 1: Blutzirkulation bei einem Fötus.** Die Richtung des Blutflusses ist durch rote Pfeile markiert. *MSD Manuals: Angeborene Herzfehler im Überblick, Modifiziert von Lee B. Beermann MD, Children's Hospital of Pittsburgh of the University of Pittsburgh School of Medicine*

### 3.1.2. Pathophysiologie

Angeborene Herzfehler stellen ein sehr komplexes und heterogenes Krankheitsfeld dar. Es ist daher schwierig eine einheitliche Pathophysiologie für sie aufzustellen. Wie oben bereits beschrieben, tragen unter anderem Umweltfaktoren wie: mütterlicher Alkohol-, Drogen- und Rauchabusus, Infektionen sowie die Einnahme von teratogenen Mitteln (z.B. Isotretinoin, Lithium etc.) während der Schwangerschaft zu einer Zunahme der fetalen Fehlbildungen und somit auch angeboren Herzfehlern. Bestimmte chromosomale Aberrationen wie Aneuploidien (Trisomie 13, Trisomie 18, Trisomie 21), sowie Mikrodeletionen wie z.B. das Di-George Syndrome (Mikrodeletion auf 22q11.2) oder das Williams-Beuren Syndrom (Mikrodeletion 7p11.23) sind eng mit angeborenen Herzerkrankungen assoziiert. Häufig treten angeborene Herzfehler auch im Rahmen von Punktmutationen auf. Jedoch bleiben ca. 72% der Ursachen für angeborene Herzfehler ungeklärt (Russell *et al.*, 2018). Molekulare Signalwege, welche substantziell an der Herzentwicklung beteiligt sind, konnten



in den letzten Jahrzehnten besser verstanden werden. Unter anderem wurden hierbei transkriptionelle Regulatoren, Strukturgene, sowie Signalmoleküle identifiziert (Kelly, Buckingham and Moorman, 2014). Die Ursache ist für viele angeborene Herzfehler bislang jedoch nicht bekannt.

### **3.2. Kardiomyozytenproliferation in Tier- und Menschenmodellen**

Die Regenerationsfähigkeit des Herzens, und insbesondere die Proliferationsfähigkeit von Kardiomyozyten, bleibt trotz zahlreicher Studien ein umstrittenes Thema. Über die letzten Jahrzehnte haben sich viele Forschungsgruppen mit diesem Thema beschäftigt. Das Verständnis der Kardiomyozytenproliferation könnte potenziell vielversprechende Therapiemöglichkeit mit sich bringen. Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass Kardiomyozyten ihre Regenerationsfähigkeit kurz nach Geburt verlieren und den Zellzyklus verlassen. Es gibt Hinweise, dass die Proliferationsrate von Kardiomyozyten nach myokardialen Verletzungen ansteigt (Senyo *et al.*, 2013), jedoch bleibt die Fähigkeit gering und das humane Myokard hat nur eine sehr limitierte Fähigkeit sich nach einer Verletzung, zum Beispiel einem Myokardinfarkt, zu regenerieren. Der Verlust an Kardiomyozyten resultiert dadurch meist in einem Verlust der Pumpfunktion (Yester and Kühn, 2017).

Das Herz besteht aus verschiedenen Zelltypen. Die Kardiomyozyten machen den Großteil des Volumens aus, stellen jedoch mit nur ca. 30% einen geringen Anteil der Zellanzahl des Myokards dar. Das menschliche Herz wiegt im Erwachsenenalter 15-fach so viel wie bei der Geburt (20-25g bei Geburt vs. 250-350g im Erwachsenenalter) ('Heart Size Estimations in Infants', 1950). Parallel dazu kommt es zu einer ähnlichen Steigerung des Volumens der einzelnen Kardiomyozyten bei jedoch altersunabhängiger Anzahl der Kardiomyozyten Zellkerne (Bergmann *et al.*, 2015). Dies gibt Hinweise darauf, dass das humane Herz rein durch Hypertrophie und nicht primär durch Hyperplasie wächst. Lange galt das humane Herz als postmitotisches Organ. Jedoch haben verschiedene Studien im letzten Jahrzehnt gezeigt, dass auch nach der Geburt neue Kardiomyozyten in geringem Maß entstehen (ca. 0,5-1% pro Jahr) (Yutzey KE, 2017).

In fetalen und neonatalen Mausmodellen wurde gezeigt, dass die Kardiomyozytenzellzyklusaktivität in zwei Phasen abläuft. Soonpa *et. al.* verabreichten Mäusen zu 21 verschiedenen Zeitpunkten zwischen dem embryonalen Tag 12 und neonatalen Tag 21 radioaktiv markiertes Thymidin ( $^3\text{H-TdR}$ ). Zwei Stunden nach Gabe

wurden die Herzen entnommen und auf den Anteil der  $^3\text{H-TdR}$ -markierten Kardiomyozyten untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass DNA-Synthese in Kardiomyozyten in zwei unterscheidbaren Phasen verläuft. In der ersten Phase, während der Fetalperiode proliferierten die Kardiomyozyten, aber diese Phase endete abrupt mit der Geburt. Die zweite Phase fand in der Neonatalperiode statt. In dieser Phase führte die DNA-Synthese jedoch nicht zur Kardiomyozytenproliferation. Stattdessen zeigte sich eine ausgeprägte Kardiomyozytenbinukleation, d.h. Kardiomyozyten betrieben DNA-Synthese ohne jedoch den Zellzyklus zu vervollständigen. Dies kann entweder, wie in der frühen Neonatalperiode der Maus, eine Karyokinese ohne Zytokinese darstellen und in der Binukleation von Kardiomyozyten resultieren. Andererseits kann die DNA-Synthese in Polyploidie resultieren (Walsh *et al.*, 2010). Aufgrund dessen müssen Studien zwischen Zytokinese und Karyokinese bzw. Polyploidie unterscheiden. Im menschlichen Herz sind bei Geburt die meisten Kardiomyozytenzellkerne diploid. Während der Kindheit wächst das Herz und bis zum Alter von 10 Jahren kommt es in den meisten Zellkernen zu einer Polyploidisierung (Bergmann *et al.*, 2009). Diese Studie an menschlichen Herzen stimmt mit weiteren aktuellen Studien in Tiermodellen überein. Mittels klonaler Analyse wurde in Mausmodellen gezeigt, dass zwar eine lebenslange Kardiomyogenese besteht, dass diese allerdings nur minimal ausgeprägt ist. Die Arbeitsgruppe um Weissmann untersuchte mittels einer Mosaik Analyse mit doppelten Markern die Kardiomyozytenzellzyklusaktivität bei Mäusen. Mit der Markierung von einzelnen Markern (entweder GFP+ oder RFP+ Zellen) erlaubte dies die Unterscheidung zwischen Zytokinese mit Differenzierung von der Karyokinese. Mit diesem System konnten sie die Neubildung von Herzmuskelzellen während der Embryonalphase nachweisen (Positivkontrolle) und zeigen, dass die Neubildung von Kardiomyozyten im Verlauf des Lebens sehr gering ist (Ali *et al.*, 2014). Allerdings kam die Arbeitsgruppe um Porello zu einem bemerkenswerten Ergebnis. Nach Verletzung (Resektion des linksventrikulären Apex) kam es bei neonatalen Mäusen zu einer kompletten und funktionalen Regeneration. Jedoch kam es bereits innerhalb der ersten Woche zu einem Verlust dieser Regenerationsfähigkeit (Porello *et al.*, 2011). Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Studie im Schweinmodell (Ye *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2018) und es gibt Hinweise darauf das ein „regeneratives Fenster“ auch bei neugeborenen Kindern bestehen könnte (Haubner *et al.*, 2016). Dazu passend fanden Ye *et al.* eine gesteigerte Zellteilung in atrialen Kardiomyozyten bei Kindern im Alter von unter drei Monaten, im Vergleich zu der Zellzyklus Aktivität bei älteren Kindern (4-12 Monate) (Ye *et al.*, 2016).

Die Kardiomyozytenproliferation scheint nach der Geburt jedoch nicht komplett zu enden. Mollova *et al.* berichten von einer  $\sim 3.5$  fachen Steigerung der Kardiomyozytenanzahl bei Menschen bis zum 20. Lebensjahr. Kritisch anzumerken bleibt an dieser Arbeit jedoch,

dass diese Steigerung mit großer Wahrscheinlichkeit überschätzt ist, da die restlichen Zelltypen des Myokards nicht differenziert wurden (Mollova *et al.*, 2013). Aber auch andere Studien fanden eine geringe Neubildung von Herzmuskelzellen im Verlauf des Lebens. Sicher scheint, dass es einen Zusammenhang der Kardiomyozytenproliferation mit dem Alter gibt. Bis zum 20. Lebensjahr kommt es zu einer Neubildung von ca. 1% der Kardiomyozyten pro Jahr. Dies nimmt im Laufe des Lebens ab. Im Lebensalter von 75 Jahren kommt es wahrscheinlich zu einer geringeren Neubildung von nur noch ~0,3% der Kardiomyozyten pro Jahr (Bergmann *et al.*, 2009). Somit ist davon auszugehen, dass während eines menschlichen Lebens ca. 45% der Kardiomyozyten im Myokard erneuert werden und 55% seit Geburt persistieren. Von allen postnatal neu generierten Kardiomyozyten, scheint der größte Anteil im jungen Alter, also ca. 36% bis zum 10. Lebensjahr zu entstehen (Mollova *et al.*, 2013).

Zusammenfassend bleibt mit hoher Wahrscheinlichkeit zu behaupten, dass die größte Anzahl an Kardiomyozyten bereits vor der Geburt etabliert ist (Porello *et al.*, 2011) und das neonatale Herz eine gewisse Regenerationsfähigkeit besitzt, die jedoch kurz nach Geburt verloren geht (Walsh *et al.*, 2010; Mollova *et al.*, 2013).

Regenerative Ansätze, die aktuell mittels klinischer Studien für ischämische Herzerkrankung evaluiert werden, könnten in Zukunft neue Therapieoptionen für Kinder mit angeborenen Herzfehlern darstellen. Ein entscheidender Faktor für die Regenerationsfähigkeit des Myokards ist hierbei die Proliferationsfähigkeit von Kardiomyozyten. Je mehr Informationen über die Faktoren, welche zum postnatalen Zellzyklusarrest führen, gesammelt werden, desto individueller könnte auf diese eingegangen und somit ein optimales Therapiekonzept erarbeitet werden. Ein Beispiel hierfür wäre zum Beispiel die Entscheidung des Operationszeitpunktes bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern.

### 3.3. Kardiomyozyten Regenerationsfähigkeit nach Verletzung im jugendlichen und erwachsenen Herz

Die oben genannten Studien beziehen sich primär auf die Kardiomyozytenproliferation im gesunden Herzen. Ob die Proliferationsfähigkeit der Kardiomyozyten sich jedoch nach einer Verletzung ändert, ist ein Kernthema in vielen Forschungsgruppen, da es von großer therapeutischer Relevanz ist.

Um diese Antwort beantworten zu können muss man unterscheiden, ob es zu einer Verletzung des Myokards während der Embryonalentwicklung, der direkten Postnatalperiode oder des Erwachsenenalters gekommen ist. Wie oben beschrieben zeigten Kardiomyozyten eine bemerkenswerte Regenerationsfähigkeit auf Verletzungen im neugeborenen Alter, die jedoch mit zunehmendem Alter abnahm. Die Plastizität des embryonalen Herzens wurde von der Arbeitsgruppe um Sturzu, untersucht. Diese haben in embryonalen Mäusen mittels genetischer Ablation mit einem Diphtherietoxinmodell 50-60% der Kardiomyozyten zerstört. Der Verlust selbst einer großen Zahl von Kardiomyozyten während der Embryonalentwicklung konnte komplett kompensiert werden und es zeigte sich zum Zeitpunkt der Geburt eine normale Herzfunktion (Sturzu *et al.*, 2015). Wie bereits beschrieben, besteht diese Regenerationsfähigkeit auch noch kurz nach der Geburt. Nach Resektion des Apex (ca. 15.% des Myokards) am ersten Lebenstag kam es zu einer funktionalen Regeneration bei neonatalen Mäusen. Diese Regenerationsfähigkeit ging jedoch bis zum 7. Lebenstag verloren (Porello *et al.*, 2011). Da das apikale Resektionsmodell jedoch relativ unphysiologisch ist, wurde eine ischämische Verletzung durch die Arbeitsgruppe um Haubner *et al.* imitiert. Hierzu wurde der Ramus interventriculares anterior (ein Koronarast der linken Koronararterie) in Mausmodellen ligiert. Bei jüngeren Mäusen (Alter zum Verletzungszeitpunkt 1 Tag) konnte eine komplette Regeneration des Myokards beobachtet werden. Bei älteren Mäusen hingegen (Alter zum Verletzungszeitpunkt 7 Tage) kam es zu einer ausgedehnten Narbenbildung (Haubner *et al.*, 2012). Die gleiche Regenerationsfähigkeit wurde im Schweinemodell beschrieben. Eine Regenerationsfähigkeit, mit nur minimaler Narbenbildung, zeigte sich bei einer Verletzung bis zum 2. Lebenstag. Bei einer myokardialen Verletzung nach dem 2. Lebenstag resultierte die myokardiale Verletzung auch bei Schweinen in einer ausgeprägten Narbenbildung mit deutlicher Einschränkung des Pumpvermögens (Ye *et al.*, 2018). Es gibt Hinweise, dass diese neonatale Regenerationsfähigkeit auch bei Menschen besteht. In einem Fallbericht über ein Neugeborenes mit einem großen Myokardinfarkt direkt postnatal mit deutlicher Einschränkung der myokardialen Pumpfunktion und Anstieg der Herzenzyme

pro-BNP und Troponin-T als Zeichen der ausgeprägten myokardialen Verletzung, kam es zu einer kompletten Regeneration der Herzfunktion und Herzenzymen bis zum Entlassungstag am 46. postnatalen Tag (Haubner *et al.*, 2016).

Klar ist, dass diese Regenerationsfähigkeit mit zunehmendem Alter abnimmt. Es gibt keinen Anhalt dafür, dass es zu einer gesteigerten Kardiomyozytenproliferation nach Verletzungen im adulten Herzen kommt (Soonpaa and Field, 1997; Li *et al.*, 2018). Die genauen Ursachen für die Abnahme der Regenerationsfähigkeit sind unklar. In den letzten Jahren sind einige Faktoren und Signalwege beschrieben worden, die für den Austritt der Kardiomyozyten aus dem Zellzyklus (mit)verantwortlich sind. Hierzu gehören der Anstieg der Schilddrüsenhormone postnatal sowie die gesteigerte Sauerstoffsättigung, die als mögliche Faktoren für den Kardiomyozytenzellzyklusarrest genannt worden sind (Webster and Abela, 2007; Tong *et al.*, 2013; Puente *et al.*, 2014; Nakada *et al.*, 2017; Yester and Kühn, 2017).

### **3.4. Sauerstoff als Einflussfaktor auf Kardiomyozytenproliferation**

Die Sauerstoffsättigung ist als entscheidender Faktor für den postnatalen Zellzyklusarrest von Kardiomyozyten beschrieben worden. Der Sauerstoffpartialdruck verändert sich direkt nach der Geburt, mit einem Anstieg des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes (paO<sub>2</sub>) von 30 mmHg zu 100 mmHg (Webster and Abela, 2007). Direkt nach der Geburt kommt es mit Beendigung der fetalen Zirkulation zu einem Absinken des pulmonalarteriellen Drucks durch Eröffnen der Lunge mit den ersten Atemzügen. Parallel kommt es zu einem Anstieg des systemarteriellen Drucks. Dadurch verschließt sich das Foramen ovale und der Ductus arteriosus und die Lungenzirkulation wird etabliert. So kommt es zu einer Transition für die menschlichen Organe von einem hypoxischen Umfeld in utero zu einem normoxischen (bzw. bezogen auf die Fetalsituation hyperoxischen) Umfeld nach der Geburt. Diese Transition resultiert in einer Verschiebung des Metabolismus von einer anaerobischen Glykolyse zum oxidativen Stoffwechsel mittels dem Krebs-Zyklus. Dies führt zu einem Anstieg an Sauerstoffradikalen welche zu oxidativer DNA- Schädigung führt (Puente *et al.*, 2014).

Die Arbeitsgruppe um H. Sadek erforschte in mehreren Studien den Zusammenhang zwischen dem Anstieg des Sauerstoffpartialdruckes und der Zellzyklusaktivität. Sie zeigte, dass es durch die Umstellung in ein sauerstoffreiches Umfeld zu einer Steigerung der

mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung und konsekutiv daraus zu einem gesteigerten DNA-Schaden kommt. Dieser DNA-Schaden (bzw. die Reparaturmechanismen) führte zu einem Zellzyklusarrest der Kardiomyozyten innerhalb der ersten Lebenswoche. Um den Einfluss unterschiedlicher Sauerstoffumgebungen auf die Kardiomyozytenproliferation zu bestimmen haben sie neonatale Mäusen entweder einer hyperoxischen Umgebung (100% Sauerstoff für 4 Tage), einer hypoxischen Umgebung (15% Sauerstoff für 7) Tage bzw. einer normoxischen Umgebung (21% Sauerstoff) als Kontrollgruppe ausgesetzt. Anschließend wurden ihre Herzen zur Untersuchung entnommen. Die Versuchsgruppe, die der hypoxischen Umgebung (15% Sauerstoffanteil) ausgesetzt waren, zeigten ein erhöhtes Herzgewicht-zu-Körpergewicht-Verhältnis im Vergleich zu den anderen Gruppen. Wie bereits zuvor beschrieben wächst das Herz postnatal durch Hypertrophie. Hier zeigte sich jedoch keine Zunahme der Kardiomyozytengröße. Dies indizierte, dass Mäuse, die einer hypoxischen Umgebung ausgesetzt waren, von einem hypertrophen zu einem hyperplastischen Herzwachstum wechselten und letztlich eine Steigerung der Kardiomyozytenanzahl zeigten. Darüber hinaus zeigte sich in der Hyperoxiegruppe (100% Sauerstoff) ein Anstieg von 8-Oxoguanin-positiven Zellkernen, der auf eine DNA-Schädigung durch freie Sauerstoffradikale hinwies. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass durch induzierte postnatale Hypoxie, der Anstieg an freien Sauerstoffradikalen verhindert und damit das postnatale proliferative Fenster prolongiert werden konnte. Um dies zu beweisen, applizierten sie N-Acetylcystein, welches reaktive Sauerstoffradikale bindet. Mäuse, die ab dem Zeitpunkt ihrer Geburt täglich N-Acetylcystein injiziert bekamen, zeigten nach einer myokardialen Verletzung, am postnatalen Tag 21, eine bessere Herzfunktion und weniger Narbenbildung als die Kontrollgruppe, die nur einmalig N-Acetylcystein appliziert bekommen hatte (Puente *et al.*, 2014).

Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit einer anderen Arbeit dieser Forschungsgruppe. Hier wurden adulte Mäuse schrittweise an eine reduzierte Sauerstoffkonzentration gewöhnt (schrittweise Reduktion des Sauerstoffs um 1%/Tag auf eine Endkonzentration von 7% in der Umgebung). Wie zuvor bereits beschrieben, bewirkte die geringere Sauerstoffkonzentration eine Reduktion der freien Sauerstoffradikale und damit einhergehend, geringere DNA-Schädigungen mit konsekutiv gesteigerter Kardiomyozytenzellzyklusaktivität. Um die Bedeutung der Hypoxie auf die Regenerationsfähigkeit eines verletzten Herzens zu untersuchen wurde bei den Mäusen ein Myokardinfarkt durch LAD-Ligatur induziert. Die Mäuse, die der Hypoxie ausgesetzt waren, zeigten eine gebesserte Heilung des Myokardinfarktes mit weniger Narbenfläche und verbesserter linksventrikulären Ejektionsfraktion im Vergleich zur Kontrollgruppe (Nakada *et al.*, 2017).

Die Arbeitsgruppe um Ye et al. hat die oben genannte Hypothese an humanen Proben untersucht. Dafür haben sie Gewebe des rechtsventrikulären Ausflusstrakt von Kindern mit einem angeborenen Herzfehler, der sogenannten Fallot'schen Tetralogie, während der Operation entnommen und untersucht. Dieser Herzfehler besteht per Definition aus vier Komponenten: einer Pulmonalstenose, einem Ventrikelseptumdefekt, einer über der Herzscheidewand reitenden Aorta und einer rechtsventrikulären Hypertrophie und zählt zu der Gruppe der zyanotischen Herzfehler. Die Kinder wurden anhand ihrer Sauerstoffsättigung in 3 Gruppen eingeteilt (schwere Hypoxie: SaO<sub>2</sub> < 75%, moderate Hypoxie: SaO<sub>2</sub> 75-85% und milde Hypoxie: SaO<sub>2</sub> > 85%). Das Gewebe wurde histologisch untersucht und das Myokard der moderaten Hypoxie (75-85%) zeigte eine erhöhte Expression der Zellzyklusmarker Ki-67 und ppH3, sowie Aurora-B-positiver Kardiomyozyten (Zytokinesemarker), die hinweisend für eine gesteigerte Kardiomyozytenproliferation in der Gruppe der moderaten Hypoxie sind. Um einen kausalen Zusammenhang zu untersuchen hat die Arbeitsgruppe kultivierte humane stammzell-abgeleitete Kardiomyozyten drei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt (10% Sauerstoffsättigung, 5% Sauerstoffsättigung und 21% Sauerstoffsättigung als Kontrollgruppe). Hier zeigte sich *in vitro* eine erhöhte Expression der Zellzyklusmarker (Ki-67, ppH3, Aurora B) in der Gruppe mit moderater Hypoxie. Dies ging einher mit erniedrigten Markern für DNA-Schädigung im Vergleich zu den Gruppen mit normalem Sauerstoffgehalt (21%) und starker Hypoxie (5%). Diese Ergebnisse geben Hinweise dafür, dass eine moderate Hypoxie zu einem Anstieg der Zellzyklusaktivität führen kann, eine zu starke Hypoxie jedoch negativ auf die Zellzyklusaktivität der Kardiomyozyten wirken kann (Ye et al., 2020).

Die oben genannten Ergebnisse legen nahe, dass ein niedriger Sauerstoffpartialdruck, der bei Kindern mit zyanotischen Herzfehlern vorkommen kann, förderlich für die Zellzyklusaktivität und damit die Regenerationsfähigkeit des Herzens sein könnte. Nichtsdestotrotz bleibt zu erwähnen, dass Forschungsgruppen auch gegenteilige Resultate fanden. So wurde beschrieben, dass es bei Hypoxie zu einer Inhibierung der Kardiomyozytenproliferation kam (Tong et al., 2013; Paradis et al., 2015). Dementsprechend bleibt das Thema weiterhin umstritten. Möglicherweise handelt es sich beim Sauerstoffpartialdruck am ehesten um ein zweischneidiges Schwert, wobei eine Hypoxie sowohl positive wie auch negative Effekte auf die Kardiomyozytenproliferation ausüben kann. Ein Grund für diese Kontroverse könnte darin bestehen, dass die Rolle der Hypoxie auf die Proliferationsrate der Kardiomyozyten in Zusammenhang mit dem Entwicklungsstadium der Kardiomyozyten steht. Die Arbeitsgruppe um Sun et. al. hat embryonale und fetale Kardiomyozyten in zwei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (21% und 10%) kultiviert und gezeigt, dass die Expression von Zellzyklusmarker Ki-67,

sowie die Konzentration von YAP-1 (yes associated protein 1; ein Regulator der Kardiomyozytenproliferation) in neonatalen Kardiomyozyten unter Hypoxiebedingungen deutlich gesteigert war. Bei embryonalen Kardiomyozyten hingegen reduziert war. Ein Grund für die verschiedenen Auswirkungen der Hypoxie könnten der unterschiedliche Metabolismus der Kardiomyozyten im Rahmen ihrer Entwicklung darstellen (Sun *et al.*, 2019).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Sauerstoffpartialdruck wahrscheinlich nicht allein für den Zellzyklusarrest der Kardiomyozyten ausschlaggebend ist, sondern dass das Thema multifaktoriell zu sein scheint. Jedoch lassen sich anhand der dargestellten Forschungsergebnisse gewisse Schlussfolgerungen ziehen: eine moderate, über einen längeren Zeitraum bestehende Hypoxie scheint förderlich auf die Zellzyklusaktivität von Kardiomyozyten zu sein. Da genau dieser Fall bei Kindern mit zyanotischen Herzfehlern vorliegt, ist das Ziel dieser Forschungsarbeit die Zellzyklusaktivität bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern zu untersuchen.

### **3.5. Kardiomyozyten Proliferation bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern**

Das Feld um Kardiomyozytenproliferation bleibt ein kompetitives und man hat in den letzten Jahrzehnten viel darüber gelernt. Nichtsdestotrotz bleibt ein komplettes Verständnis, warum Kardiomyozyten den Zellzyklus verlassen und welche Umweltfaktoren dies verhindern können, nach wie vor offen. Die meisten der oben genannten Studien basieren auf Tiermodellen. Hieraus lassen sich Rückschlüsse auf die Situation beim Menschen ziehen. Allerdings gibt es entscheidende Unterschiede und die Kardiomyozyten-Zellzyklusaktivität bei Menschen, insbesondere bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern, bleibt von großem Interesse. Aufgrund der schlechten Verfügbarkeit humaner Proben, gibt es bis zum heutigen Tag nur wenig Studien welche humane Kardiomyozyten *in vivo* untersucht haben.

Ye. *et al.* ist nach meinem Kenntnisstand die einzige Arbeitsgruppe, welche die Zellzyklusaktivität von Kardiomyozyten bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern untersucht hat. In einer ihrer ersten Studien untersuchten sie atriales Gewebe von Kindern mit einem nicht-zyanotischen Herzfehler (Ventrikelseptumdefekt) und verglichen den Anteil der Ki-67 positiven Kardiomyozyten mit atrialem Gewebe einer gesunden Kontrollgruppe (ohne kardialer Erkrankung) und fanden keinen signifikanten Unterschied (Ye *et al.*, 2015).



In 2016 publizierten sie eine Studie in der Vorhofgewebe von Kindern mit Ventrikelseptumdefekten untersucht wurde und die Studienpopulation in Altersgruppen eingeteilt wurde. Bei Kindern <3 Monaten wurde histologisch eine höhere Expression von Zellzyklusmarkern, im Vergleich zu älteren Kindern, nachgewiesen. Damit unterstützen sie die oben genannten Ergebnisse das die Zellzyklusaktivität von Kardiomyozyten mit steigendem Alter abnimmt (Ye *et al.*, 2016). In einer weiteren Studie wurde der Sauerstoffpartialdruck als Faktor für Zellzyklusaktivität bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern untersucht. Hierfür wurde Vorhofgewebe von Kindern mit einem zyanotischen Herzfehler (Fallot'schen Tetralogie) im Rahmen einer Routine-Operation entnommen und untersucht. Wie oben bereits beschrieben, wurde hier gezeigt, dass in der milden Hypoxie-Gruppe die Zellzyklusmarker, hinweisend für gesteigerte Kardiomyozytenproliferation, deutlich höher als in den anderen beiden Gruppen waren (Ye *et al.*, 2020).

Die oben beschriebenen Ergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit für weitere Studien zu diesem Thema. Obwohl Kinder mit angeborenen Herzfehlern eine besondere Patientengruppe darstellen, sind sie ein wichtiger Meilenstein der regenerativen Medizin. Je mehr Verständnis wir über die Regenerationsfähigkeit der Kardiomyozyten bei Kindern haben, desto mehr Therapieoptionen und schließlich ein besserer Übergang in die Erwachsenen Medizin mit deutlich gebesserter Lebensqualität, könnte erzielt werden.

Mit dieser Arbeit wollen wir unser Wissen zu den oben genannten Forschungsergebnissen beitragen. Hierfür wurden Proben von Kindern mit angeborenen Herzfehlern, welche im Universitären Herzzentrum Hamburg operiert wurden, untersucht. Ziel dieser Arbeit war ein weiteres Verständnis über die Zellzyklusaktivität der Kardiomyozyten von Kindern mit angeborenen Herzfehlern zu erhalten. Dabei untersuchten wir sowohl das Alter, wie auch die Sauerstoffsättigung als möglichen Einflussfaktor.

## 4. Material und Methoden:

### 4.1. Material

Alle hier aufgeführten Methoden waren im Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie in der Arbeitsgruppe von Dr. Florian Weinberger etabliert. Die Beschreibung der Methoden lehnt sich an die Promotionsarbeit von Deniz Köse an und wurde um die für diese Studie spezifischen Details erweitert.

#### 4.1.1. Materialien

| Bezeichnung               | Hersteller          |
|---------------------------|---------------------|
| Objektträger              | Thermo Scientific   |
| Pinzetten                 | Hammacher, Solingen |
| Pipetten (10/100/1000 µl) | Eppendorf AG        |

#### 4.1.2. Geräte

| Bezeichnung                     | Hersteller        |
|---------------------------------|-------------------|
| Konfokalmikroskop LSM 800       | Zeiss             |
| Mikroskop Axioskop 2 mit Kamera | Zeiss             |
| Paraffinausgießstation,         | Leica             |
| Pipettierhilfe accu-jet® pro    | Brand             |
| Rollschüttler Roller Mixer SRT1 | Stuart            |
| Rotationsmikrotom 2125 RTS      | Leica             |
| Sicherheitswerkbank HERAsafe®   | Thermo Scientific |
| Wasserbad                       | GFL               |
| Kühlkammer 4°C                  | UKE, Hamburg      |

#### 4.1.3. Substanzen und Lösungen

| Bezeichnung       | Hersteller    |
|-------------------|---------------|
| Mowiol®           | AppliChem     |
| PBS               | Biochrom      |
| Polyvinylalkohol  | Sigma-Aldrich |
| PBS Tabletten     | Gibco         |
| PCR Puffer 10x    | Qiagen        |
| Roti®-Histofix 4% | Roth          |

#### 4.1.4. Primär Antikörper

| Antigen                            | Hersteller                 | Verdünnung |
|------------------------------------|----------------------------|------------|
| Anti-PCM1<br>antibody (rabbit)     | Sigma Aldrich              | 1:800      |
| Anti-Ki67<br>antibody (rat)        | Invitrogen                 | 1:10000    |
| Anti- Aurora B<br>antibody (mouse) | Invitrogen                 | 1:50       |
| Alpha-Actinin                      | Sigma-Aldrich, clone EA-53 | 1:600      |

#### 4.1.5. Sekundär Antikörper und Kernfarbstoffe

| Label                                     | Hersteller | Verdünnung |
|---|------------|------------|
| Anti-rabbit-antibody (biotin-<br>labeled) | Invitrogen | 1:500      |

|                                |                           |        |
|--------------------------------|---------------------------|--------|
| Anti-rat antibody (AF 546)     | Invitrogen                | 1:500  |
| Anti-mouse antibody (AF 546)   | Invitrogen                | 1:100  |
| Streptavidin (AF 488)          | Thermo-Fischer Scientific | 1:100  |
| Wheat Germ Agglutinin (AF 633) | Thermo-Fisher Scientific  | 1:100  |
| Alexa Fluor® 488               | Invitrogen                | 1:800  |
| DAPI                           | Biochemica, A1001 0025    | 1:1000 |

## 4.2. Methoden

### 4.2.1. Study Population and Tissue sampling:

27 atriale und ventrikuläre Myokardproben wurden von 25 Kindern mit angeborenen Herzfehlern, die sich aufgrund Ihrer Erkrankung einer Herzoperation unterziehen mussten, gesammelt. Die Proben wurden zwischen November 2017 und September 2020 am Universitären Herzzentrum Hamburg-Eppendorf entnommen. Die Eltern haben einer Probenentnahme zugestimmt und die Studie wurde durch die zuständige Aufsichtsbehörde genehmigt (Ärztekammer Hamburg, PV5402). 21 Vorhofproben wurden während der Kannülierung im Rahmen der Anlage der Herz-Lungen-Maschine entnommen. Sechs Ventrikelproben wurden während der Resektion einer rechtsventrikulären Ausflusstraktobstruktion entnommen. Bei einem Patienten wurde eine Herztransplantation durchgeführt, sodass Proben von beiden Vorhöfen und Kammern entnommen werden konnten. Die Proben wurden zur weiteren histologischen Prozessierung in Paraformaldehyd (4%) fixiert.

#### **4.2.2. Herstellung histologischer Präparate**

Es wurden Histologien der explantierten Herzmuskelpräparate hergestellt. Die atrialen und ventrikulären Myokardproben wurden in 4% Histofix<sup>®</sup> (Roth) bei 4°C fixiert und danach mit PBS (Phosphate buffered saline) gewaschen. Die nachfolgende Entwässerung und Herstellung der 4 µm dünnen Paraffinschnitte erfolgte durch Kristin Hartmann der HEXT Core Facility für Mauspathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

#### **4.2.3. Entparaffinieren**

Vor der Anfertigung der Färbungen wurden die Paraffinschnitte durch die zweimalige Inkubation der Objektträger in Xylol (für jeweils 15 min) entparaffiniert. Anschließend erfolgte die Rehydrierung der Präparate in einer absteigenden Ethanolreihe (jeweils 2 min; 100%, 100%, 96%, 96%, 80%, 70%). Abschließend wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gewaschen.

#### **4.2.4. Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Zur Analyse der Myokardstruktur wurden nach dem Entparaffinieren Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (H.E.) angefertigt. Im ersten Schritt erfolgte die zehnmünütige Färbung mit Hämalaun nach Mayer. Dann wurden die Schnitte für zehn Minuten mit fließendem Leitungswasser gebläut und anschließend wurden die Schnitte kurz in destilliertem Wasser gewaschen und für weitere zehn Minuten mit Eosin gegengefärbt. Nach Abschluss der Färbung erfolgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (je 2 Minuten; 80%, 96%, 96%, 100%, 100%) und Xylol. Die Schnitte wurden mit dem Eindeckmedium Eukitt<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich, 03989) eingedeckelt.

#### **4.2.5. Masson-Goldner-Trichrom-Färbung**

Zur Differenzierung zwischen fibrotischen Anteilen und Myokard wurde eine Masson-Goldner-Trichrom-Färbungen durchgeführt. Die Färbung begann mit einer zehnmütigen Inkubation in Eisenhämatoxylin nach Weigert. Darauf schloss sich eine zehnmütige Inkubation in fließendem Wasser an. Es folgte die Färbung (60 Minuten) mit Ponceaurot, eine Färbung mit Wolframatophosphorsäure-Orange (7 Minuten) und die Färbung mit Anilinblau (20 Minuten). Nach der Inkubation der entparaffinierten Präparate mit den jeweiligen Farbstoffen erfolgte jeweils das Abspülen in 1% Essigsäure und destilliertem Wasser (je 5 Minuten). Abschließend wurden die Schnitte in 100%igen Ethanol und Xylol entwässert. Die Schnitte wurden mit Eukitt® eingedeckelt.

#### **4.2.6. Immunhistochemie**

Die Immunfluoreszenzfärbung ermöglicht die Darstellung von Proteinen durch die spezifische Bindung von Antikörpern. Zur immunhistochemischen Analyse der Gewebe wurden PCM 1- , Ki- 67 und Alpha Actintin- Färbungen durchgeführt.

Es erfolgte die Vorbereitung auf die Behandlung mit Antikörpern, mit dem Versuch, chemische Modifikationen durch die vorherige Fixierung des Gewebes zu reduzieren und das Gewebe für Antikörper zugänglich zu machen (*engl. antigen-retrieval*). Hierfür wurden die Schnitte zunächst mit PBS-Lösung dreimalig gewaschen und dann für 10min mit Natriumcitrat-Puffer hitzebehandelt. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS-Lösung wurde die Schnitte darauffolgend in einer 0,1 % Triton X-100 in PBS Lösung inkubiert. Anschließend folgte die Färbung mit den primären Antikörpern 4°C über Nacht. Anschließend wurden drei Waschschritte mit PBS durchgeführt. Hierauf folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, nach einem weiteren Wachsritt mit PBS, erfolgte die Inkubation mit tertiären Antikörpern und DAPI. Dann nach weiterer PBS - Waschung wurden die Schnitte mit Mowiol eingedeckelt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Eine Liste mit den in dieser Arbeit verwendeten Antikörpern und den jeweiligen Verdünnungen ist unter Materialien zu finden. Primäre Antikörper wurden mit einem Fluorochrom-markierten sekundären Antikörper visualisiert. Die Fluorochrome werden durch die Absorption von Licht zur spontanen Emission von Licht zu einer spezifischen Wellenlänge angeregt, welches durch die Verwendung von Filtern für das menschliche Auge als Signal erkenntlich gemacht werden kann.

#### **4.2.7. Alpha- Aktinin:**

Zur Darstellung der Kardiomyozytenstruktur wurde eine  $\alpha$ -Aktinin Färbung für paraffineingebetteten Präparate durchgeführt. Nach der Entparaffinierung erfolgte eine Epitop-Demaskierung (Antigen-Retrieval). Dafür wurden die Schnitte für 5 Minuten in einer Tris/HCl-Pufferlösung (pH 7,4) mit Proteinase K für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Es folgte das zweimalige Waschen mit PBS (je 5 Minuten) und die Bedeckung der Schnitte mit einer Blocklösung (0,05 M TBS (pH 7,4), 10% fetales Kälberserum, 1% bovines Serum-Albumin (BSA), 0,5% Triton™ X-100) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der primäre monoklonale  $\alpha$ -Aktinin Antikörper (Sigma-Aldrich, clone EA-53, A7811) in einer Verdünnung von 1:800 in einer Antikörperlösung (0,05 M TBS, pH 7,4; 1% BSA, 0,5% Triton™ X-100) hinzugegeben. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C in einer dunklen Feuchtkammer platziert. Am nächsten Tag erfolgte zunächst das dreimalige Waschen mit PBS für jeweils 5 Minuten. Anschließend wurden der sekundäre Antikörper Alexa Fluor® 488 (goat anti-mouse-IgG-Alexa 488, Invitrogen, A-11001) und der Kernfarbstoff DRAQ5™ (Biostatus Limited, DR50050) in einer Verdünnung von 1:800 den Schnitten hinzu pipettiert. Die Inkubation der sekundären Antikörperlösungen erfolgte auf Grund ihrer Lichtsensitivität für eine Stunde in einer dunklen Feuchtkammer. Es folgte das dreimalige Waschen der Schnitte für jeweils 5 Minuten in PBS unter abgedunkelten Bedingungen. Letztlich wurden die Schnitte mit jeweils 100  $\mu$ l Mowiol® eingedeckelt und über Nacht bei Raumtemperatur unter abgedunkelten Bedingungen stehen gelassen. Für die Anfertigung mikroskopischer Aufnahmen wurde das Konfokalmikroskop LSM 800 (Zeiss) benutzt.

#### **4.2.8. PCM1 & Ki-67**

Zur Darstellung der Kardiomyozytenkerne wurden Immunfluoreszenzfärbungen für PCM1 angefertigt. Diese Färbungen wurden analog zum Färbeprotokoll der zuvor beschriebenen  $\alpha$ -Aktinin Färbungen hergestellt. Nach der Entparaffinierung erfolgte eine etwas geänderte Epitop-Demaskierung (Antigen-Retrieval). Es folgte das dreimalige Waschen mit PBS (je 5 Minuten) und die Hitzebehandlung für 20 Minuten mit Natrium-citrat Puffer. Danach Bedeckung der Schnitte mit einer Blocklösung (1,5% Pferdeserum, 0,25% Triton™ X-100) für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Nach erneuter dreimaliger Waschung mit PBS wurden die primären Antikörper Anti-PCM1 Antikörper (rabbit, Sigma-Aldrich) in einer Verdünnung von 1:800 und Anti-Ki67-Antikörper (rat, Invitrogen) in einer Verdünnung von 1:1000 in

einer Antikörperlösung (1,5 % NHS/0,25 % Triton X-100/PBS) hinzugegeben. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C in einer dunklen Feuchtkammer platziert. Am nächsten Tag erfolgte zunächst das dreimalige Waschen mit PBS für jeweils 5 Minuten. Anschließend wurden der sekundäre Antikörper Alexa Fluor® 546 (anti-rat-antibody AF546, Invitrogen) und der biotinylierte Anti-Kannichen Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 in der selbigen Antikörperlösung hinzugegeben. Die Inkubation der sekundären Antikörperlösungen erfolgte auf Grund ihrer Lichtsensitivität für eine Stunde in einer dunklen Feuchtkammer. Es folgte das dreimalige Waschen der Schnitte für jeweils 5 Minuten in PBS unter abgedunkelten Bedingungen. Schließlich erfolgte das Pipettieren der tertiären Antikörper Alexa Fluor 488 (Streptavidin) in einer Verdünnung von 1:100. Danach erneutes dreimaliges Waschen mit PBS und Inkubation mit dem Kernfarbstoff DAPI der Antikörperlösung in einer Verdünnung von 1:1000, nach 10-minütiger Inkubation unter Raumtemperatur, erfolgte das letztmalige waschen mit PBS für 3x5 Minuten und dann wurden die Schnitte mit jeweils 100 µl Mowiol® eingedeckelt und über Nacht bei Raumtemperatur unter abgedunkelten Bedingungen stehen gelassen. Für die Anfertigung mikroskopischer Aufnahmen wurde auch das Konfokalmikroskop LSM 800 (Zeiss) benutzt.

#### **4.3. Analyse:**

Nach Anfertigen der mikroskopischen Aufnahmen der Schnitte im Konfokalmikroskop. Die Quantifizierung der Zellkerne erfolgte manuell in der Fiji-Software. Insgesamt wurden pro Schnitt 5-10 Bilder generiert, die manuell ausgewertet wurden. Insgesamt wurden pro Bild ~ 55-65 Nuklei in einer Fläche von ~280 µm x 280 µm. PCM1<sup>+</sup> und Ki67<sup>+</sup> Zellkerne manuell durch einen verblindeten Untersucher gezählt. Die Bildauswertung erfolgte zweimalig durch verschiedene verblindete Untersucher, um eine Stichprobenverzerrung zu verhindern. Als Kontrolle wurden die gleichen Proben auch mit Alpha- Aktinin gefärbt. Die Anzahl der PCM1<sup>+</sup> und Ki67<sup>+</sup> Zellkerne wurde prozentual auf alle gezählten Zellkerne angegeben.

#### **4.4. Statistische Auswertung**

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten werden als arithmetischer Mittelwert ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichung des Mittelwertes ( $\pm$  standard error of the mean, SEM) präsentiert.



## 5. Ergebnisse

### 5.1. Studienpopulation:

27 Proben von 25 Kindern mit unterschiedlichen angeborenen Herzfehlern wurden in die Arbeit inkludiert. Die Proben wurden in zyanotische und nicht-zyanotische Herzfehler, per Definition des Herzfehlers, sowie abhängig von ihrer Sauerstoffsättigung eingeteilt (**Tab. 3a-b.**). 18 Proben bzw. 72% der Proben waren von Kindern mit nicht-zyanotischen Herzfehlern und 7 Proben bzw. 28% der Proben waren von Kindern mit zyanotischen Herzfehlern. Damit spiegelt die Population die ungefähre Inzidenz der zyanotischen Herzfehler wider (ca. 25% aller angeborenen Herzfehler sind zyanotische Herzfehler). Von den 27 Proben waren 21 (77,8%) atriale- und 6 (22,2%) ventrikuläre Proben, die Diskrepanz zwischen Probenanzahl und Patientenanzahl besteht darin, dass bei einem Patienten eine Herztransplantation durchgeführt wurde und wir daher von dem Patienten Vorhof- sowie Ventrikelgewebe sammeln konnten. Die Altersspanne der Kinder reichte von 14 Tagen bis 18 Jahre, mit den meisten Kindern jedoch in einem Alter von über einem Jahr. Die Proben wurden anhand des Alters der Kinder zum Zeitpunkt der Operation in 3 unterschiedliche Alterskategorien eingeteilt: < 3 Monate, 3-12 Monate und > 12 Monate (**Tab. 1.+2a-c**).

Vorhofgewebe beinhaltete fibrotische Areale zusätzlich zum Myokard. Ventrikelgewebe zeigte im Vergleich hauptsächlich Myokard (**Abbildung 2a und b**). Kardiomyozyten Zellkerne wurden identifiziert durch die Expression von Alpha- Aktinin (markiert die Querstreifung in Kardiomyozyten, die durch die Anordnung von ausgereiften Sarkomer-Strukturen zustande kommt) und PCM 1 (bindet sich an die äußere Zellkernlamina von Kardiomyozyten) (**Abbildung 2**). PCM 1 negative Zellkerne wurden als Nicht-Kardiomyozyten beschrieben.  $34,8 \pm 8,65\%$  von allen Zellkernen waren PCM1<sup>+</sup> und somit als Kardiomyozyten gewertet in den Vorhofgeweben und  $37,1 \pm 8,91\%$  von allen Zellkernen waren PCM 1<sup>+</sup> in den Ventrikelproben (**Abbildung 2C, Tabelle 3**).

| Alter       | Anzahl | Prozent (%) |
|-------------|--------|-------------|
| < 3 Monate  | 3      | 12          |
| 3-12 Monate | 8      | 32          |
| > 12 Monate | 14     | 56          |

**Tabelle 1:** Altersverteilung der Studienpatienten

| Gruppe A (< 3 Monaten; n=3) |                 |                |            |             |             |        |                        |
|-----------------------------|-----------------|----------------|------------|-------------|-------------|--------|------------------------|
| Probennummer                | Herzfehler      | Alter (Wochen) | Geschlecht | SpO2 (%)    | paO2 (mmHg) | Lokal. | Ki67+ KM Zellkerne (%) |
| H7                          | Hypopl. AoBogen | 3              | M          | 96          | 86          | A      | 16,3%                  |
| H12                         | dTGA            | 2              | M          | 85          | 70          | A      | 7,7%                   |
| H26                         | dTGA            | 2              | M          | 88          | 70          | A      | 2,9%                   |
| <b>Durschnitt</b>           |                 | <b>2,33</b>    |            | <b>92,7</b> | <b>75,0</b> |        | <b>8,96%</b>           |
| <b>SD</b>                   |                 | 0,58           |            | 4,6         | 9,2         |        | 6,81%                  |

**Tabelle 2a:** Demographische Daten für die Altersgruppe < 3 Monaten

| Group B (3-12 Monate; n=8) |            |                |            |          |             |        |                        |
|----------------------------|------------|----------------|------------|----------|-------------|--------|------------------------|
| Probennummer               | Herzfehler | Alter (Monate) | Geschlecht | SpO2 (%) | paO2 (mmHg) | Lokal. | Ki67+ KM Zellkerne (%) |

|                     |                           |             |   |             |             |     |             |
|---------------------|---------------------------|-------------|---|-------------|-------------|-----|-------------|
| <b>H2</b>           | DORV                      | 8           | M | 90          | 73          | A   | 7,5         |
| <b>H8</b>           | VSD                       | 7           | M | 100         | 92          | A   | 0,0         |
| <b>H11</b>          | ASD II                    | 7           | M | 97          | 85          | A   | 0,0         |
| <b>H13</b>          | DCM                       | 12          | M | 94          | 78          | A+V | 0,0         |
| <b>H16</b>          | ASD                       | 12          | W | 100         | 90          | A   | 0,5         |
| <b>H18</b>          | Fallot'sche<br>Tetralogie | 5           | M | 88          | 72          | A   | 0,0         |
| <b>H24</b>          | Pulmonalatresie<br>, VSD  | 6           | W | 80          | 65          | A   | 1,3         |
| <b>H27</b>          | Fallot'sche<br>Tetralogie | 6           | M | 90          | 76          | A   | 0,0         |
| <b>Durchschnitt</b> |                           | <b>7,88</b> |   | <b>92,4</b> | <b>78,9</b> |     | <b>1,16</b> |
| <b>SD</b>           |                           | 2,70        |   | 6,8         | 9,4         |     | 2,61        |

**Tabelle 2b:** Demographische Daten für die Altersgruppe 3-12 Monate. Double outlet right ventricle (DORV), Ventrikelseptumdefekt (VSD), Vorhofseptumdefekt (ASD), Dilatative Kardiomyopathie (DCM), Standard Deviation (SD)

| <b>Group C (&gt; 12 Monate; n=14)</b> |                   |                      |                   |                 |                    |               |                               |
|---------------------------------------|-------------------|----------------------|-------------------|-----------------|--------------------|---------------|-------------------------------|
| <b>Probennummer</b>                   | <b>Herzfehler</b> | <b>Alter (Jahre)</b> | <b>Geschlecht</b> | <b>SpO2 (%)</b> | <b>paO2 (mmHg)</b> | <b>Lokal.</b> | <b>Ki67+ KM Zellkerne (%)</b> |

|            |                            |      |   |     |     |    |     |
|------------|----------------------------|------|---|-----|-----|----|-----|
| <b>H1</b>  | part.Sinus venosus defekt  | 2,0  | M | 100 | 85  | A  | 0,7 |
| <b>H3</b>  | VSD                        | 1,7  | M | 98  | 90  | A  | 0,0 |
| <b>H4</b>  | VSD                        | 7,0  | W | 96  | 89  | A  | 0,2 |
| <b>H5</b>  | VSD                        | 3,0  | M | 95  | 88  | A  | 0,0 |
| <b>H6</b>  | ASD II                     | 5,0  | W | 98  | 95  | A  | 0,4 |
| <b>H9</b>  | ASD                        | 3,0  | W | 98  | 105 | A  | 0,0 |
| <b>H10</b> | pAVSD                      | 3,0  | W | 96  | 89  | A  | 0,5 |
| <b>H14</b> | DORV                       | 10,0 | M | 94  | 85  | RV | 0,0 |
| <b>H17</b> | Aortenstenose              | 5,0  | M | 94  | 86  | A  | 0,0 |
| <b>H19</b> | Shone complex              | 12,0 | W | 94  | 90  | A  | 0,0 |
| <b>H21</b> | Pulmonalatresie, VSD       | 5,0  | W | 90  | 80  | RV | 0,6 |
| <b>H22</b> | AVSD, RVOTO                | 14,0 | W | 94  | 85  | RV | 0,0 |
| <b>H23</b> | hypopl. Aortenbogen, LVOTO | 1,0  | M | 97  | 90  | A  | 0,0 |
| <b>H25</b> | DORV, PS                   | 18,0 | W | 95  | 88  | RV | 0,0 |

|                     |  |             |  |             |             |  |             |
|---------------------|--|-------------|--|-------------|-------------|--|-------------|
| <b>Durchschnitt</b> |  | <b>6,40</b> |  | <b>95,6</b> | <b>88,9</b> |  | <b>0,18</b> |
| <b>SD</b>           |  | 5,18        |  | 2,5         | 5,8         |  | 0,27        |

**Tabelle 2c:** Demographische Daten für die Altersgruppe >12 Monaten. Double outlet right ventricle (DORV), Ventrikelseptumdefekt (VSD), Vorhofseptumdefekt (ASD), Dilatative Kardiomyopathie (DCM), partieller Atrioventrikulärer Septumdefekt (paAVSD), rechtsventrikuläre Ausflusstrakt Obstruktion (RVOTO), linksventrikuläre Ausflusstraktobstruktion (LVOTO), Pulmonalstenose (PS).

**Gruppe: Nicht-zyanotischer Herzfehler (n=18)**

| <b>Probennummer</b> | <b>Herzfehler</b>                  | <b>Alter (Jahre)</b> | <b>Geschlecht</b> | <b>SpO2 (%)</b> | <b>paO2 (mmHg)</b> | <b>Lokal.</b> | <b>Ki67 + KM Zellkerne (%)</b> |
|---------------------|------------------------------------|----------------------|-------------------|-----------------|--------------------|---------------|--------------------------------|
| <b>H1</b>           | Sinus venosus defekt               | 2,0                  | M                 | 100             | 85                 | A             | 0,7                            |
| <b>H3</b>           | VSD                                | 1,7                  | W                 | 98              | 90                 | A             | 0,0                            |
| <b>H4</b>           | VSD                                | 7,0                  | W                 | 96              | 89                 | A             | 0,2                            |
| <b>H5</b>           | VSD                                | 3,0                  | M                 | 95              | 88                 | A             | 0,0                            |
| <b>H6</b>           | ASD II                             | 5,0                  | W                 | 98              | 95                 | A             | 0,4                            |
| <b>H7</b>           | Hypopl. Aortenbogen, Aortenstenose | 0,1                  | M                 | 96              | 86                 | A             | 16,3                           |
| <b>H8</b>           | VSD                                | 0,6                  | M                 | 100             | 92                 | A             | 0,0                            |
| <b>H9</b>           | ASD II                             | 3,0                  | W                 | 98              | 105                | A             | 0,0                            |
| <b>H10</b>          | pAVSD                              | 3,0                  | W                 | 96              | 89                 | A             | 0,5                            |

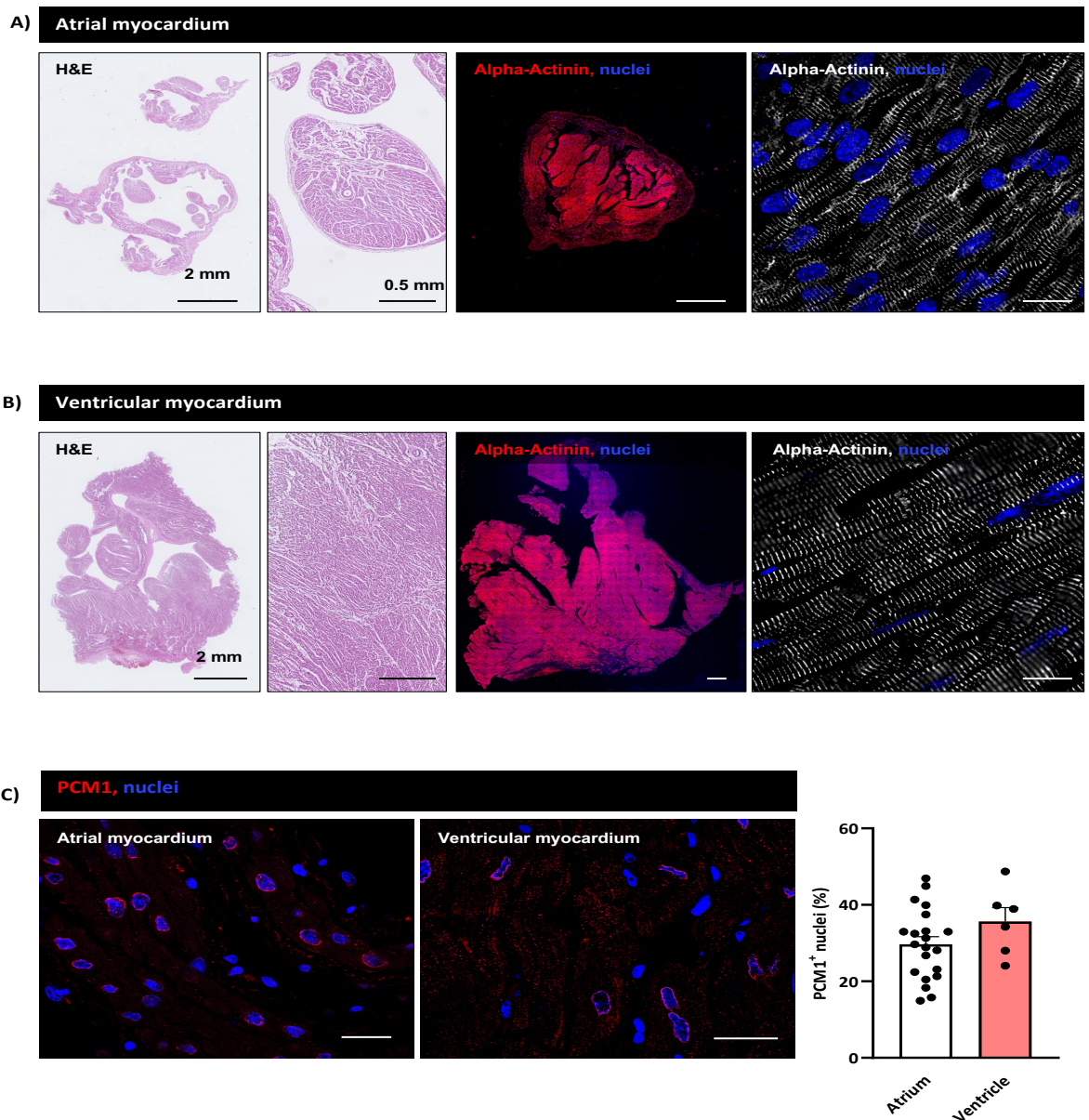
|                     |                                       |             |   |             |             |                   |             |
|---------------------|---------------------------------------|-------------|---|-------------|-------------|-------------------|-------------|
| <b>H11</b>          | ASD II                                | 0,6         | M | 97          | 85          | A                 | 0,0         |
| <b>H13</b>          | DCM                                   | 1,0         | M | 94          | 78          | LA, RA,<br>LV, RV | 0,0         |
| <b>H14</b>          | DORV,<br>Conduitstenose               | 10,0        | M | 94          | 85          | RV                | 0,0         |
| <b>H16</b>          | ASD II                                | 1,0         | M | 100         | 90          | A                 | 0,5         |
| <b>H17</b>          | Aortenstenose                         | 4,2         | M | 94          | 86          | A                 | 0,0         |
| <b>H19</b>          | Shone complex                         | 12,0        | W | 94          | 90          | A                 | 0,0         |
| <b>H22</b>          | AVSD                                  | 14,0        | W | 94          | 85          | RV                | 0,0         |
| <b>H23</b>          | hypopl. Aortenbogen,<br>Aortenstenose | 1,0         | M | 97          | 90          | A                 | 0,0         |
| <b>H25</b>          | DORV, PS,                             | 18,0        | W | 95          | 88          | RV                | 0,0         |
| <b>Durchschnitt</b> |                                       | <b>4,84</b> |   | <b>96,4</b> | <b>88,7</b> |                   | <b>1,04</b> |
| <b>SD</b>           |                                       | 5,27        |   | 2,2         | 5,5         |                   | 3,82        |

**Tabelle 3a:** Demographische Daten von Kindern mit nicht-zyanotischen Herzfehlern. Double outlet right ventricle (DORV), Ventrikelseptumdefekt (VSD), Vorhofseptumdefekt (ASD), partieller Atrioventrikulärer Septumdefekt (paAVSD), Pulmonalstenose (PS).

| Gruppe zyanotische Herzfehler (n=7) |                       |               |            |             |             |        |                        |
|-------------------------------------|-----------------------|---------------|------------|-------------|-------------|--------|------------------------|
| Probennummer                        | Herzfehler            | Alter (Jahre) | Geschlecht | SpO2 (%)    | paO2 (mmHg) | Lokal. | Ki67+ KM Zellkerne (%) |
| H2                                  | Falot'sche Tetralogie | 0,66          | M          | 87          | 65          | A      | 7,5                    |
| H12                                 | dTGA                  | 0,04          | M          | 90          | 70          | A      | 7,7                    |
| H18                                 | Falot'sche Tetralogie | 0,42          | M          | 88          | 75          | A      | 0,0                    |
| H21                                 | Pulmonalatresie       | 5,00          | W          | 94          | 80          | RV     | 0,6                    |
| H24                                 | Pulmonalatresie       | 0,50          | W          | 80          | 65          | A      | 1,3                    |
| H26                                 | dTGA                  | 0,04          | M          | 88          | 70          | A      | 2,9                    |
| H27                                 | Falot'sche Tetralogie | 0,50          | M          | 85          | 66          | A      | 0,0                    |
| <b>Durchschnitt</b>                 |                       | <b>1,0</b>    |            | <b>87,3</b> | <b>72,3</b> |        | <b>2,85</b>            |
| <b>SD</b>                           |                       | <b>1,8</b>    |            | <b>3,8</b>  | <b>4,9</b>  |        | <b>3,39</b>            |

**Tabelle 3b:** Demographische Daten von Kindern mit zyanotischen Herzfehlern. Transposition der großen Gefäße (dTGA).





**Abbildung 2:** Histologische Darstellung des Myokardgewebes und immunohistochemische Färbung. **(A+B)** Kardiomyozyten wurden mit einer Alpha-Aktinin-Färbung (rot) dargestellt. Zellkerne wurden mit DAPI markiert (blau). Von links nach rechts: H&E Färbungen in lila markiert in unterschiedlichen Vergrößerungen. Konfokale Aufnahme von KM Gewebe wobei Kardiomyozyten mit einer Alpha-aktinin Färbung rot markiert wurden. Rechts Konfokale Aufnahme von Kardiomyozten Gewebe, KM werden mit Alpha-aktinin Färbung (weiß) und Zellkerne mit DAPI (blau) dargestellt. **(C)** Kardiomyozyten wurden mit PCM 1 Färbung (rot) dargestellt. Zellkerne wurden mit DAPI markiert (blau). Vergleich atriales und ventrikuläres Gewebe. Prozentsatz der Kardiomyozyten in atrialen und ventrikulärem Gewebe. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standard Deviation (SD).

|                            | Alter<br>(Jahre) | KM Zellkerne<br>(% aller Zellkerne) | Ki67 <sup>+</sup> KM Zellkerne<br>(%) | Ki67 <sup>+</sup> Nicht-KM<br>(%) |
|----------------------------|------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Atriale Proben</b>      | 2,3              | 34,8 ± 8,65                         | 1,8 ± 3,96                            | 0,7 ± 1,24                        |
| <b>Ventrikuläre Proben</b> | 8,2              | 37,1 ± 8,91                         | 0,1 ± 0,26                            | 0,3 ± 0,6                         |

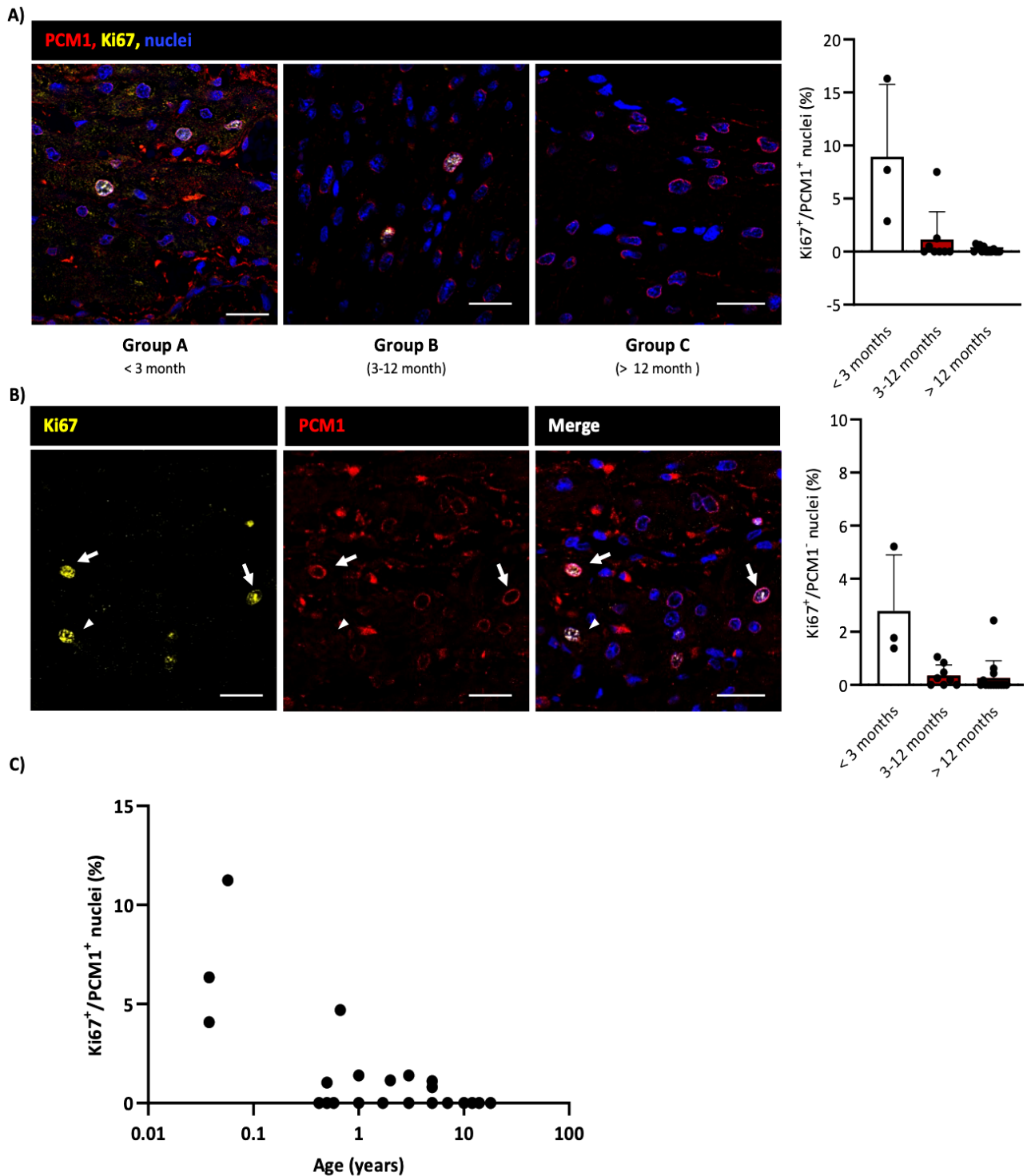
**Tabelle 4:** Ki 67<sup>+</sup> KM und Nicht-KM in atrialen und ventrikulären Proben. Werte werden in Mittelwert (Ø) und Standardabweichung (±) dargestellt.

## 5.2. Höhere Kardiomyozyten Zellzyklusaktivität in der jüngeren Altersgruppe

Kardiomyozyten, die sich im Zellzyklus befinden, wurden identifiziert durch die Ko-Expression von PCM 1 und Ki-67. Ki-67. Dies ist ein Marker, der in allen proliferierenden Zellen in der späten G1, S und G2 als auch in der Mitose-Phase gebildet wird. In Zellen, die sich nicht in der Zellteilung befinden (G0 Phase) ist er dementsprechend nicht nachweisbar. Die Expression von Ki-67 positiven Kardiomyozyten wurde in Prozent von allen gezählten Zellkernen angegeben und zeigte sich höher in der Altersgruppe < 3 Monaten (Ø 8,96 ± 6,81%) im Vergleich zu den anderen Altersgruppen (3-12 Monate Ø 1,16 ± 2,61%, > 12 Monate Ø 0,18 ± 0,27%). Die meisten Myokardproben in den höheren Altersgruppen zwischen 3-12 Monate, sowie in der Altersgruppe > 12 Monate zeigten gar keine Ki67<sup>+</sup> Kardiomyozyten (5/8 in der Altersgruppe 3-12 Monate ohne Ki67<sup>+</sup> KM und 9/14 in der Altersgruppe > 12 Monate). Als Nicht-Kardiomyozyten wurden Zellen mit fehlender PCM1 Expression gewertet. Auch bei den Nicht-Kardiomyozyten zeigten sich eine gesteigerte Proliferationsrate in der jüngeren Altersgruppe < 3 Monaten im Vergleich zu den anderen Altersgruppen (siehe **Tab. 5**). Insgesamt zeigen unsere Daten, dass die Zellzyklusaktivität in Kardiomyozyten sowie Nicht-Kardiomyozyten gesteigert ist in jüngeren Kindern mit einem Alter unter 3 Monaten und diese Zellzyklusaktivität mit zunehmendem Alter abnimmt.

| Alter (Monate) | KM Zellkerne (% aller Zellkerne) | Ki67+ KM Zellkerne (%) | Ki67+ Nicht-KM Zellkerne. (%) |
|----------------|----------------------------------|------------------------|-------------------------------|
| < 3            | 29,19 ± 5,56                     | 8,96 ± 6,81            | 2,79 ± 2,11                   |
| 3-12           | 33,72 ± 7,92                     | 1,16 ± 2,61            | 0,35 ± 0,41                   |
| > 12           | 37,13 ± 8,39                     | 0,18 ± 0,27            | 0,26 ± 0,65                   |

**Tabelle 5:** Ki-67+ KM und Nicht-KM in den Unterschiedlichen Altersgruppen. Werte werden in Mittelwert ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichung ( $\pm$ ) dargestellt



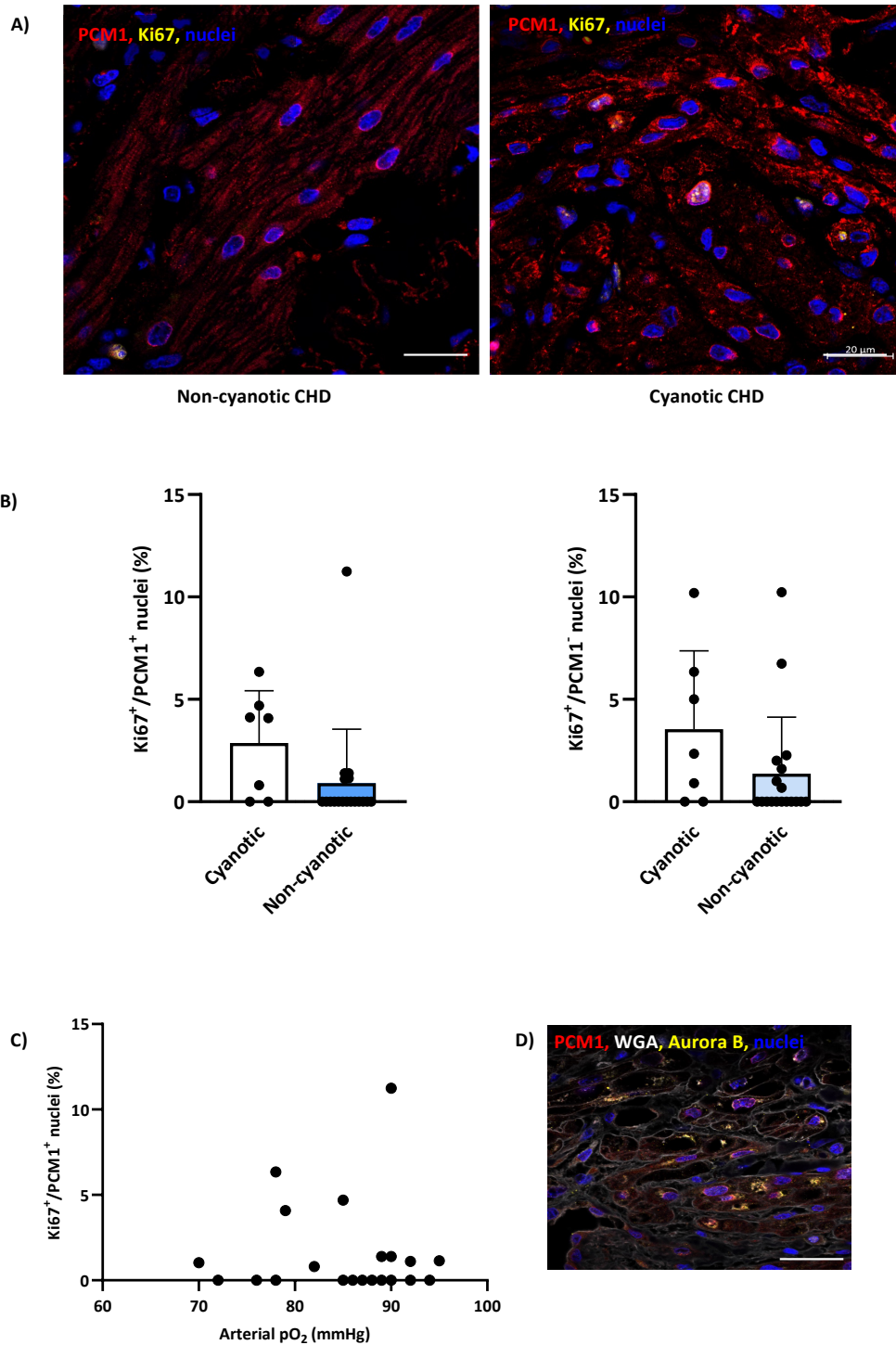
**Abbildung 3:** Konfokale Aufnahme mit immunhistochemischer Färbung. **(A)** KM wurden mittels PCM1 Färbung (rot) dargestellt. Zellen welche sich in der Zellteilung befinden wurde mit Ki67(gelb) markiert. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) markiert. Graphisch dargestellter Prozentsatz der proliferierenden Kardiomyozyten in den unterschiedlichen Altersgruppen. **(B)** Ki67<sup>+</sup> KM und Ki67<sup>+</sup> Nicht-Kardiomyozyten in den unterschiedlichen Altersgruppen. Die Pfeile markieren proliferierende Zellen. Graphisch dargestellter Prozentsatz der proliferierenden Nicht-KM in den unterschiedlichen Altersgruppen **(C)** Quantifizierung von sich teilenden KM mit zunehmendem Alter.

### 5.3. Gesteigerte Kardiomyozyten Zellzyklusaktivität in Kindern mit angeborenen zyanotischen Herzfehlern

Die Proben wurden zudem je nach Herzfehler in zyanotische (n=7) und nicht-zyanotische Herzfehler (n=18) eingeteilt. Der Mittelwert der arteriellen Sauerstoffsättigung in der Gruppe mit den zyanotischen Herzfehlern betrug  $72,3 \pm 4,9$  mmHg und  $88,7 \pm 5,5$  mmHg in der Gruppe mit nicht-zyanotischen Herzfehlern. Der Mittelwert der transkutanen Sauerstoffsättigung war  $87,3\% \pm 3,8$  in den Kindern mit zyanotischem Vitium und  $96,4\% \pm 2,2$  in den Kindern mit nicht-zyanotischem Vitium. Die Kinder mit den angeborenen zyanotischen Herzfehlern neigen zu einem jüngeren Alter zum Zeitpunkt der operativen Versorgung:  $1,0 \pm 1,8$  Jahre vs.  $4,8 \pm 5,2$  Jahre in der nicht zyanotischen Gruppe. Jedoch zeigte dieser Altersunterschied keine statistische Signifikanz ( $p=0.332$ ). In der Gruppe der zyanotischen Herzfehler zeigten  $2,85 \pm 3,39\%$  der KM eine Ki67<sup>+</sup> Expression, wobei sich in der Gruppe der nicht-zyanotischen Herzfehler nur  $1,04 \pm 3,82\%$  der KM im Zellzyklus befanden. Zudem war auch die Expression von Ki-67<sup>+</sup> Nicht-KM in der zyanotischen Gruppe gesteigert ( $4,38 \pm 6,15\%$  vs.  $1,00 \pm 1,94\%$ ).

|                         | Alter (Jahren) | KM Zellkerne (%) | Ki67 <sup>+</sup> KM Zellkerne (%) | Ki67 <sup>+</sup> PCM <sup>-</sup> Zellkerne (%) |
|-------------------------|----------------|------------------|------------------------------------|--|
| <b>Zyanotisch</b>       | 1,0            | $34,56 \pm 8,62$ | $2,85 \pm 3,39$                    | $4,38 \pm 6,15$                                  |
| <b>Nicht-Zyanotisch</b> | 4,8            | $35,37 \pm 7,84$ | $1,04 \pm 3,82$                    | $1,00 \pm 1,94$                                  |

**Tabelle 4:** Ki-67<sup>+</sup> KM und Ki67<sup>+</sup> PCM<sup>-</sup> Zellkerne (Nicht-KM) Expression in der zyanotischen vs. Nicht-zyanotischen Herzfehlern



**Abbildung 4:** Konfokale Aufnahme mit immunohistochemischer Färbung. **(A)** Konfokal Aufnahmen von Proben aus zyanotischen und nicht-zyanotischen Herzfehlern. KM wurden mittels PCM1 Färbung (rot) dargestellt. Zellen, welche sich in der Zellteilung befinden wurde mit Ki67(gelb) markiert. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) markiert. **(B)** Prozent der KM und nicht KM, die sich in der Zellteilung in atrialen und ventrikulären Proben befanden. **(C)** Quantifizierung von sich teilenden KM in unterschiedlicher Sauerstoffumgebung. **(D)** Konfokale Aufnahme, KM wurden mit PCM1 (rot) markiert, Aurora B Färbung (gelb), WGA (weiß), Zellkerne (blau).

#### 5.4. Aurora B Nachweis

Wie oben bereits geschildert, kommt es bei Kardiomyozyten postnatal zur Binukleation und Polyploidisierung. Zellzyklusmarker wie Ki-67 können nicht zwischen Zytokinese und Endoreplikation unterscheiden. Aufgrund dessen, untersuchten wir die Proben auf die Expression von Aurora-B Kinase, der sich als suffizienter Marker für Kardiomyozyten Proliferation zeigte (Hesse *et al.*, 2018). Aurora B Kinase kontrollierte die Bewegung und Teilung von Chromosomen durch Verbindung von speziellen Mikrotubulie namens K-Fasern. Obwohl Aurora-B ein essenzieller Indikator für Zellteilung ist und in vielen Studien als Indikator für Kardiomyoztenproliferation verwendet wird, geschieht die Zytokinese von Kardiomyozyten über einen langsamen Zeitraum. Da die Proben *in vivo* zu einem bestimmten Zeitpunkt entnommen wurden, stellt die Darstellung von Aurora-B eine besondere Herausforderung dar. Mikroskopisch indiziert die Färbung von Aurora B einen Zeitpunkt zwischen zwei symmetrischen Zellen, die sich aktuell in der Zellteilung befinden. Dieser Zeitpunkt ist kurz und das Signal schwierig zu identifizieren und von unspezifischen Färbungen teilweise nur schwer zu unterscheiden. In unseren Proben konnten wir keine Aurora B-Kinase detektieren. Dies bedeutet, dass wir entweder Aurora- B aufgrund des statischen Zeitpunktes unserer immunhistochemischen Untersuchung nicht darstellen konnten oder der Großteil der nachgewiesenen Zellzyklusaktivität Karyokinese bzw. Polyploide entspricht.

## 6. Diskussion

Anhand der aktuellen Studienlage kann davon ausgegangen werden, dass Kardiomyozyten den Zellzyklus kurz nach der Geburt verlassen. Ein viel diskutierter physiologischer Faktor des Zellzyklusarrest, ist der steigende Sauerstoffpartialdruck direkt nach der Geburt. Durch die Umstellung von einem hypoxischen zu einem hyperoxischen Umfeld kommt es durch die Bildung von freier Sauerstoffradikale zu DNA-Schädigungen, die zu einem Verlassen des Zellzyklus der Kardiomyozyten führen (Punkte *et al.*, 2014). Nach der Geburt steigt der Sauerstoffpartialdruck von ungefähr 30 mmHg zu 100 mmHg (Dawes, Mott and Widdicombe, 1954). Jedoch ist der Sauerstoffpartialdruck niedriger in Kindern mit angeborenen zyanotischen Herzfehlern. Wie der Name schon sagt, kommt es bei diesen Kindern zu einer Sauerstoffarmut im Blut, einer Zyanose (bis zu Sauerstoffpartialdrücken von ~40 mmHg) (Jones *et al.*, 1976). Die angeborenen zyanotischen Herzfehler sind charakterisiert durch einen Rechts-Links Shunt, wobei der Lungenkreis mit deoxygeniertem Blut umgangen wird. Als Resultat folgt, eine Mischdurchblutung von sauerstoffreichem- und sauerstoffarmem Blut, welches den Systemkreislauf versorgt, unter anderem auch die Koronararterien. Im Zuge dieser Arbeit haben wir nach einer Antwort für die "Hypoxie-Frage" gesucht. Unsere Arbeitshypothese war, dass ein niedrigerer Sauerstoffpartialdruck bei Kindern mit angeborenen zyanotischen Herzfehlern zu einer prolongierten Phase von Kardiomyozyten Zellzyklusaktivität nach der Geburt führen kann. Das Ziel dieser Arbeit war: i) die Analyse von Zellzyklus Aktivität in Myokardproben von Kindern mit angeborenen Herzfehlern und ii) zu untersuchen ob sich die Zellzyklusaktivität bei Kindern mit angeborenen zyanotischen Herzfehlern und nicht-zyanotischen Herzfehlern unterscheidet. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen ein erster Schritt für das Verständnis von Kardiomyozytenproliferation bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern darstellen.

### 6.1. Altersabhängige Zellzyklusaktivität

Wir unterteilten die Patienten in drei Gruppen in Abhängigkeit ihres Alters, folgend der Studie von Ye *et al.* (Ye *et al.*, 2016). Wir sahen eine deutlich gesteigerte Zellzyklusaktivität in jüngeren Kindern mit einem Lebensalter von unter 3 Monaten zum Zeitpunkt der Operation, im Vergleich zu den älteren Kindern (3-12 Monate und > 12 Monate). Zudem zeigte sich auch die Anzahl der Nicht-Kardiomyozyten, welche sich im Zellzyklus befanden,



gesteigert in der jüngeren Altersgruppe (< 3 Monaten). Dies indiziert eine gesteigerte Zellzyklusaktivität verschiedener Zellreihen, bei jüngeren Patienten. Unsere Ergebnisse sind übereinstimmend mit denen von Ye et al., welche eine gesteigerte Zellzyklusaktivität der Kardiomyozyten in Kindern mit einem Alter von < 3 Monaten zeigten im Vergleich zu den älteren Patienten (Ye et al., 2016). Die Anzahl der proliferativen Kardiomyozyten in Prozent ( $8,96 \pm 6,81\%$  in < 3 Monaten Lebensalter und  $2,85 \pm 3,39\%$  in der zyanotischen Gruppe) zeigten sich höher als in der Studie von Ye et al.. Ein Grund dafür könnte sein, dass wir in unserer Arbeit viele verschiedene Herzfehler inkludiert haben, wobei die zitierte Arbeitsgruppe nur Proben von Kindern mit Ventrikelseptumdefekten gesammelt und ausgewertet hat. Außerdem zeigten unserer Patienten in der Altersgruppe < 3 Monaten ein sehr junges Alter zum Zeitpunkt der Operation, mit einem mittleren Alter von 2,3 Wochen (Alter der Patienten reicht von 14-20 Lebenstagen, also allesamt mit einem Lebensalter unter 1 Monat). Die Studiengruppe um Ye et. al. hatte dagegen nur Kinder mit einem Lebensalter von  $\geq 4$  Wochen inkludiert.

Insgesamt stimmen unsere Ergebnisse sehr mit denen von anderen Studien überein in denen gezeigt wurde, dass der Zellzyklusarrest kurz postnatal zustande kommt (Li et al., 1996; Soonpaa et al., 1996), aber insbesondere mit einer Studie welche eine schrittweise Reduktion der Zellzyklusaktivität innerhalb der ersten 2 Lebensmonaten in Schweinen darstellte (Velayutham et al., 2020). Es bleibt jedoch zu erwähnen, dass Zellzyklusaktivität hinweisend für Regenerationsfähigkeit von Herzmuskelzellen in Nagetieren zu sein scheint (Porrello et al., 2011), es jedoch eine Diskrepanz zwischen Zellzyklusarrest (innerhalb der ersten 2 Lebensmonate) und Verlust des regenerativen Potenzials (innerhalb der ersten 3 Lebenstage) in Schweinen gibt (Ye et al., 2018; Zhu et al., 2018; Velayutham et al., 2020). Auch beim Menschen konnte ähnliches beobachtet werden. Ein Fallbericht gibt Hinweise darauf, dass es ein regeneratives Fenster auch bei Menschen geben könnte (Haubner et al., 2016). Des Weiteren wurde gezeigt, dass das regenerative Fenster verlängert werden kann durch pharmakologische Stimulation; wie zum Beispiel die Administration von rekombinierten Wachstumsfaktor Neuregulin-1, welches die Kardiomyozytenproliferation in sowohl neonatalen Mäusen wie auch menschlichen Säuglingen < 6 Monate stimuliert (Bersell et al., 2009; Polizzotti et al., 2017). Die Auswirkungen von Neuregulin-1-Gabe erscheint in vielen klinischen Studien als vielversprechend, da unter anderem gezeigt wurde, dass die Gabe bei Menschen mit chronischer Herzinsuffizienz eine Verbesserung der kardialen Funktion und ein Rückgang des kardialen Remodelings bewirken könnte (Xu et al., 2010; Jabbour et al., 2011). Zusammenfassend kann man zu der Konklusion kommen, dass es mit zunehmendem Alter in Tier- wie auch Menschenmodellen früher oder später immer zu einem Zellzyklusarrest mit fehlender Regeneration der Kardiomyozyten

kommen wird. Diese Ergebnisse führen zu der Überlegung, die Kardiomyozytenproliferation als Einflussfaktor für den Operationszeitpunkt bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern zu sehen. So wäre es denkbar, dass bei einem Operationszeitpunkt im jungen Lebensalter die Kardiomyozyten noch in der Lage zur Regeneration sein könnten und so potenziell funktionelle Defizite ausgleichen könnten. Um jedoch genaue Schlussfolgerungen dafür zu ziehen, bedarf es noch weiterer Studien zu diesem Thema.

## **6.2. Der Einfluss des Sauerstoffpartialdrucks auf die Proliferation von Kardiomyozyten**

Die Sauerstoffsättigung gilt als möglicher Einflussfaktor für Kardiomyozytenproliferation (Webster and Abela, 2007; Tong *et al.*, 2013; Puente *et al.*, 2014; Paradis *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2019). Die Hypothese ist, dass durch den Wechsel von einem hypoxischem, zu einer hyperoxischen Umgebung, es zu einer Umstellung des Stoffwechsels von anaerober Glykolyse hin zu oxidativer Phosphorylierung mittels des Krebs Zyklus kommt. Der oxidative Stoffwechsel benutzt ATP als Energiequelle und dabei werden Sauerstoffradikale freigesetzt, die zu DNA Schäden und somit zu einem Ausstieg der Kardiomyozyten aus dem Zellzyklus führen (Puente *et al.*, 2014; Nakada *et al.*, 2017).

Wir untersuchten Kinder mit nicht-zyanotischen Herzfehlern vs. Kinder mit zyanotischen Herzfehlern und fanden eine 2,7-fach gesteigerte Prozentzahl der proliferierenden Kardiomyozyten in Kindern mit angeborenen zyanotischen Herzfehlern ( $2,85 \pm 3,39\%$  vs.  $1,04 \pm 3,84\%$ ). Zyanotische Herzfehler resultieren in einer hypoxischen Sauerstoffsättigung (Mittelwert der transkutanen Sauerstoffsättigung in der zyanotischen Herzfehler Gruppe  $87,3 \pm 3,8\%$ ). Unsere Ergebnisse indizieren, dass eine niedrige Sauerstoffsättigung einen relevanten Einflussfaktor auf die Kardiomyozyten Zellzyklusaktivität haben könnte.

Die bisherige Studienlage diesbezüglich erscheint auf den ersten Blick als widersprüchlich, mit sowohl förderlicher Funktion auf die Kardiomyozytenproliferation, wie auch einer Inhibierenden Wirkung. Der Entwicklungszustand der Kardiomyozyten, sowie das Ausmaß der Hypoxie scheint dabei eine große Rolle zu spielen.

Zwei Studien aus dem Jahr 2013 und 2019 beschrieben bei fetalen Kardiomyozyten eine Abnahme der Zellzyklusaktivität unter hypoxischen Bedingungen (Tong *et al.*, 2013; Sun *et*

*al.*, 2019). Wobei die Arbeitsgruppe um L. Ye zeigte, dass die Kardiomyozyten Proliferation bei neonatalen Mäusen im Vergleich zu embryonalen Mäusen, unter Hypoxie Bedingungen deutlich gesteigert war. Als Grund für diese Diskrepanz wird der unterschiedliche Metabolismus im Rahmen des Entwicklungsstadium der Kardiomyozyten diskutiert (Sun *et al.*, 2019). Die Arbeitsgruppe um Zhang hat einen Rückgang der Kardiomyozyten Zellzyklusaktivität unter einer akut auftretenden, sehr schweren Hypoxie, nahezu Anoxie, ohne vorherige Gewöhnung, beschrieben (Paradis *et al.*, 2015). Auch Ye *et al.* fanden bei einer schweren bzw. plötzlich entstehenden Hypoxie eine Abnahme der Zellzyklusaktivität (Ye *et al.* 2020).

Auf der Gegenseite hierzu gibt es zahlreiche Studien, welche eine Zunahme der Kardiomyozyten Proliferation unter hypoxischen Bedingungen beschreiben. Die Gruppe um H. Sadek zeigte dass eine moderate Hypoxie (15% Sauerstoff) *in vivo*, einen positiven Effekt auf die Zellzyklusaktivität von neonatalen Mäusen hat (Puate *et al.*, 2014). Zu ähnlichen Ergebnissen kam Ye *et al.* in 2020 und zeigte gesteigerte Zellzyklus Regeneration in Kindern mit moderater Hypoxie (Sauerstoffsättigung 75-85%) in Vergleich zu Kindern welche eine schweren (<75%) oder milden (>85%) Hypoxie ausgesetzt waren (Ye *et al.*, 2020). Zudem konnte auch gezeigt werden, dass trotz schwerer Hypoxie (7% Sauerstoff) ein positiver Effekt auf die Kardiomyozyten Proliferation bei gesunden Mäusen, sowie nach kardialer Verletzung besteht. In dieser Studie kam es zu einer Schrittweise Reduktion der Sauerstoffumgebung (1% Sauerstoffreduktion pro Tag über 2 Wochen), daher kann man von einer Gewöhnung der Herzmuskelzellen an die Hypoxie ausgehen (Nakada *et al.*, 2017).

Dementsprechend lassen sich die zunächst widersprüchlich erscheinenden Studienergebnisse doch vereinbaren. Zusammenfassend bleibt zu erkennen, dass eine moderate Hypoxie zu einer Steigerung der Regenerationsfähigkeit der Kardiomyozyten führt, dabei muss jedoch der Entwicklungszustand der Kardiomyozyten beachtet werden und es muss eine gewisse Gewöhnung an das hypoxische Umfeld erfolgen. Diese Erkenntnisse über eine moderate Hypoxie können eine besondere Wichtigkeit in der klinischen Therapie von Kindern mit angeborenen Herzfehlern darstellen. Das adäquate Sauerstoffmanagement von Kindern mit zyanotischen angeborenen Herzfehlern stellt eine klinische Herausforderung für behandelnde Ärzte dar. Zum Beispiel kann eine gesteigerte Zufuhr von Sauerstoff bei Kindern mit einem univentrikulären Herzen zu einer gesteigerten Pulmonalperfusion auf Kosten der Systemperfusion kommen und somit rasch zu einem lebensbedrohlichen Zustand führen. Im Gegensatz dazu kann eine ausgeprägte Hypoxie zu einer metabolischen Azidose und Minderversorgung der Organe kommen. Das Gehirn beispielsweise ist ein Organ mit hohem Energieverbrauch und reagiert besonders

empfindlich auf Sauerstoffmangelzustände, sodass bereits eine milde Hypoxie die physiologische Hirnentwicklung und -funktion beeinträchtigen kann (Gibson *et al.*, 1981; Sun *et al.*, 2015; Hansen *et al.*, 2016). Das jedoch ein adäquates, moderates Sauerstoffmanagement auch für die Myokardprotektion notwendig ist, hat bisher aufgrund der wenigen Datenlage, im klinischen Management eine untergeordnete Rolle gespielt.

### **6.3. Kardiomyozyten Zellzyklusaktivität bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern**

In dieser Arbeit stammen alle Proben von Kindern mit angeborenen Herzfehlern. Angeborene Herzfehler stellen eine heterogene Krankheitsgruppe dar. Innerhalb dieser Arbeit wurden allerhand Herzfehler inkludiert, daher variierten die Herzfehler von simplen (nicht-lebensbedrohlich) Herzfehlern wie zum Beispiel ein Vorhofseptumdefekt zu komplexen (potenziell lebensbedrohlichen) zyanotischen Herzfehlern wie zum Beispiel die Transposition der großen Gefäße oder Pulmonalatresie. Die unter anderem zugrunde liegende genetische Alteration, die bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern vorkommt, könnte eine bisher nicht einzuschätzende Rolle in der Fähigkeit der Kardiomyozytenproliferation spielen (Postma, Bezzina and Christoffels, 2016). Daher kann man anhand dieser Daten noch keine voreiligen Schlüsse ziehen, wenn man die Daten i) mit anderen Studienergebnissen vergleicht, welche sich nur auf einen angeborenen Herzfehler konzentrieren und ii) im Vergleich mit gesunden Probanden. Es gibt Hinweise dafür, dass bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern die Kardiomyozyten Zellzyklusaktivität niedriger scheint und es zu einem frühzeitigem Zellzyklusarrest kommt (Polizzotti *et al.*, 2017), daher könnten unsere Daten die tatsächliche Kardiomyozytenproliferation sogar unterschätzen.

Die aktuelle Studienlage zur Kardiomyozytenproliferation von Kindern mit angeborenen Herzfehlern ist limitiert. Nach meinem besten Wissen gibt es bisher nur drei verschiedene Studien aus der Arbeitsgruppe von J. Liu, welche zu dem Thema Kardiomyozytenproliferation bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern publiziert wurden. Die Ergebnisse dieser Forschungsgruppe sind im Einklang mit unseren Ergebnissen. Im Jahr 2016 veröffentlichten sie eine Studie in der sie eine höhere Expression von Ki-67 positiven Kardiomyozyten in Patienten < 3 Monaten nachweisen konnten im Vergleich zu älteren Kindern (Ye *et al.*, 2016), wir konnten das gleiche darstellen. In 2020 publizierte die Arbeitsgruppe, dass bei Kindern mit einem zyanotischen Herzfehler (Fallot'sche Tetralogie)

es bei den Kindern mit einer moderaten Zyanose (75-85%) zu einem gesteigertem Nachweis von Ki-67 positiven Kardiomyozyten und dementsprechend zu einer gesteigerten Kardiomyozyten Zellzyklusaktivität kommt im Vergleich zu den anderen Gruppen (Ye *et al.*, 2020). Wir konnten eine 2,7fach gesteigerte Expression von Ki67<sup>+</sup> positiven Kardiomyozyten in der zyanotischen Gruppe (mittlere SpO<sub>2</sub> 87,3% ± 3,8) im Vergleich zu der Gruppe mit nicht-zyanotischen Herzfehlern (mittlere SpO<sub>2</sub> 96,4% ± 2,2) darstellen.

#### **6.4. Limitationen der Arbeit**

Wir benutzten PCM 1 (pericentriolar material 1 protein) zur Identifizierung von Kardiomyozyten Zellkernen. Obwohl es Aussagen darüber gibt das PCM1 nicht nur Kardiomyozyten Zellkerne sondern auch nicht-Kardiomyozyten Zellkerne markiert (Zacchigna *et al.*, 2018), sind wir der Überzeugung dass es durch die Verwendung von PCM1 als Kardiomyozytenmarker, zu einer zuverlässigeren Identifizierung von Herzmuskelzellen kommt im Vergleich zu anderen Methoden wie z.B. drei dimensionale Rekonstruktion von Z-Stapel Aufnahmen.

Da Kinder mit angeborenen zyanotischen Herzfehlern rasch in einen potenziell lebensbedrohlichen Zustand verfallen, ist eine frühe operative Versorgung notwendig. Von den 7 Patienten mit zyanotischen Herzfehlern, die in dieser Arbeit untersucht wurden, war nur ein Patient älter als 12 Monate, da es sich um eine Re-Operation handelte, ansonsten waren 6 von 7 unter einem Jahr alt mit dem jüngsten Patienten 14 Tage alt zum Zeitpunkt der Operation. Das Alter der Patienten mit zyanotischen Herzfehlern war dementsprechend jünger im Vergleich zu der Gruppe mit nicht-zyanotischen Herzfehlern (1,02 Jahre ± 1.77 vs. 4.84 Jahre ± 5.27) und könnte daher die Ergebnisse verfälschen. Nichtsdestotrotz zeigte der Altersunterschied zwischen den beiden Gruppen keine statistische Relevanz.

Innerhalb dieser Arbeit wurden Kinder mit den unterschiedlichsten angeborenen Herzfehlern inkludiert. Wie ausführlich in dieser Arbeit besprochen, ist die Kardiomyozytenproliferation von verschiedenen intrinsischen und extrinsischen Faktoren abhängig. Daher stellt die Heterogenität der Probanden eine klare Limitation dieser Arbeit dar, da einzelne Faktoren nicht herausdifferenziert werden können. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit humaner Proben gibt es keine gesunde Kontrollgruppe in dieser Arbeit.

Zudem wurden die Proben aufgrund der unterschiedlichen operativen Versorgung der Herzfehler auch nicht an einheitlichen Stellen abgenommen. Somit haben wir 21/27 atriale Proben und 6/27 ventrikuläre Proben. Die Anzahl der gezählten Kardiomyozyten differierte unwesentlich in atrialen vs. ventrikulären Proben ( $34,8 \pm 8,65\%$  in atrialen und  $37,1 \pm 8,9\%$  in ventrikulären Proben). Ventrikuläres Myokard ist einer erhöhten Nachlast ausgesetzt im Vergleich zu atrialem Myokard. Studien haben gezeigt das eine erhöhte ventrikuläre Nachlast sich negativ auf die Kardiomyozytenproliferation aufweist und das Kardiomyozyten Wachstum durch gesteigerte mechanische Arbeit von einem hyperplastischen in ein hypertrophes Wachstum wechselt (Wohlschlaeger *et al.*, 2010; Nsair *et al.*, 2014). Diese Schlüsse können jedoch primär auf Myokardproben aus dem linken Ventrikel getroffen werden. In dieser Studie wurden lediglich rechtsventrikuläres Myokardgewebe entnommen.

## **6.5. Fazit der Diskussion**

Es existieren derzeit nur wenige Studien, die sich mit der Proliferation von Herzmuskelzellen bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern befassen. Bei angeborenen Herzfehlern werden zwischen nicht-zyanotischen und zyanotischen Herzfehlern unterschieden. Bei zyanotischen Herzfehlern kommt es zu einem niedrigen Sauerstoffpartialdruck. Es besteht die Hypothese, dass ein niedriger Sauerstoffpartialdruck eine gesteigerte Proliferation von Herzmuskelzellen bewirken kann. Hinweise dafür geben mehrere Studienergebnisse, sowie die Ergebnisse dieser Arbeit. Zudem nimmt die Proliferationsfähigkeit mit zunehmendem Alter ab und es gibt wenige Hinweise dafür, dass es auch bei Menschen ein kurzes, zeitlich begrenztes Fenster für Kardiomyozyten Regeneration direkt nach der Geburt gibt. In der klinischen Kinderkardiologie und Kinderkardiochirurgie besteht allzeit die Frage nach dem optimalen Zeitpunkt für den operativen Eingriff bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern. Diese Frage wird bei jedem Patienten ausführlich interdisziplinär besprochen. Dabei gehen Faktoren wie: Alter, Gewicht, Größe, klinischer Allgemeinzustand und echokardiographischer Befund in die Entscheidungsfindung mit ein. Jedoch könnte in der Zukunft auch der Faktor der optimalen Herzmuskelproliferation und damit Regeneration in die Entscheidungsfindung mit einher gehen. Diese Arbeit gibt Hinweise dafür das i.) eine moderate Hypoxie förderlich für die Kardiomyozytenproliferation sein könnte und ii.) dass die Fähigkeit der Kardiomyozyten Regeneration innerhalb der ersten Lebensmonate abnimmt. Allerdings sind weitere Studien

notwendig, um eine sicherere Aussage bezüglich der Zellteilung von Kardiomyozyten bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern treffen zu können.

## **7. Zusammenfassung**

Zusammenfassend habe ich in dieser Arbeit Proben von Kindern mit angeborenen Herzfehlern, unterschiedlichsten Alters, Ätiologie des Herzfehlers und Sauerstoffsättigungen untersucht und deren Kardiomyozytenproliferation mittels immunhistochemischer Untersuchung gegeneinander verglichen. Die Grundlagenforschung um die Kardiomyozytenregeneration ist ein viel erforschtes und auch heutzutage noch viel diskutiertes Thema. Jedoch beziehen sich die Ergebnisse meist auf *in vitro* Untersuchungen und Tiermodelle. Die *in vivo* Untersuchung der Aktivität von Herzmuskelzellen bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern ist zum jetzigen Zeitpunkt nach wie vor eine absolute Rarität. Ergebnisse können aufgrund der fehlenden Datenlage und kleinen Probandenanzahl aufgrund der schwierigen Verfügbarkeit von humanen Proben nur spekulativ betrachtet werden. Trotzdem ist die Untersuchung der humanen Kardiomyozyten von elementarer Bedeutung für die zukünftige bestmögliche Therapie dieser Patienten. Innerhalb dieser Arbeit konnte ich die Hypothese, dass die Zellzyklusaktivität in jüngeren Patienten gesteigert ist, im Vergleich zu älteren Kindern, bestätigen. Zudem wurden in diesem Patientenkollektiv, wenn auch nur wenige, jedoch sehr junge Patienten < 4 Wochen eingeschlossen. Nach meinem besten Wissen gibt es bisher keine publizierte Studie, die Herzmuskelgewebe von so jungen Patienten mit angeborenen Herzfehlern untersucht hat. Aufgrund des jungen Alters und der Studienergebnisse in Tiermodellen, die zeigen, dass es kurz postnatal noch eine gesteigerte Proliferationsfähigkeit von Herzmuskelzellen gibt, gehen wir davon aus, dass unsere Daten eine überdurchschnittlich hohe Anzahl von proliferierenden Kardiomyozyten gezeigt haben. Auch die „Hypoxie-Frage“ habe ich mir in dieser Arbeit gestellt und auch hier stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit mit der aktuellen Studienlage überein. Es gibt Hinweise dafür, dass eine moderate Hypoxie auch bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern, förderlich für die Stimulation von Herzmuskelzellen sein könnte. Um gefestigte Aussagen und Empfehlungen für die optimale Therapie von Kindern mit angeborenen Herzfehlern machen zu können, braucht es jedoch noch viele ausführlichere Studien. Nichtsdestotrotz gibt diese Arbeit Mut und Hoffnung darauf, dass das Feld der

regenerativen Medizin, im Hinblick auf die Versorgung von Kindern mit angeborenen Herzfehlern, noch vielversprechende Ergebnisse und Erkenntnisse mit sich ziehen wird.



## 8. Abstract

Congenital heart defects (CHDs) are the most common type of congenital disorders in the newborn (Van Der Bom *et al.*, 2011). State of the art therapy nowadays combines pharmacotherapy and surgery thereby enabling the children to survive the immediate postnatal period. However, even modern therapeutic regimens often cannot preclude the development of progressive, chronic heart failure (Bolger, Coats and Gatzoulis, 2003) and heart transplantation remains the only curative therapy. After birth the vast majority of cardiomyocytes exit the cell cycle and switch from hyperplastic to hypertrophic growth (Li *et al.*, 1996). Cardiomyocyte cell cycle activity is critical for the regenerative capacity of the heart, thus the knowledge of environmental and intrinsic factors acting on the cardiomyocyte cell cycle, might influence timing of congenital heart surgery to provide optimal therapy for children with CHDs. I therefore aimed to analyse cell cycle activity in myocardial samples from children with congenital heart defects and evaluate whether cell cycle activity differs between samples from patients with cyanotic and non-cyanotic heart defects and further between different age groups. My results emphasize that the number of cycling cardiomyocytes is substantially higher in children under 3 months of age, compared to older children (3-12 months and >12 months, respectively). Further, also the number Ki67<sup>+</sup> non-myocytes were greater in children under 3 months of age indicating that the general cell cycle activity of cardiomyocytes and non-myocytes is increased in the young. Further the patients were divided according to their heart defect: cyanotic and non-cyanotic heart defect. As Oxygen is considered a major factor in influencing cardiomyocyte cell cycle activity. I therefore hypothesized that cardiomyocyte cell cycle activity is higher in patients with cyanotic CHDs. The results showed a higher percentage of Ki67<sup>+</sup> cardiomyocytes in samples from patients with cyanotic heart defects, indicating that oxygen saturation does play a significant role as an environmental factor stimulating cardiomyocyte turnover. In clinical paediatric cardiology the question about optimal timing for cardiac repair or palliative surgery for children with CHDs remains controversial. One wishes to allow the child to grow and become bigger for the child to obtain enough energy to overcome cardiac surgery and simultaneously for the surgeon to operate on anatomically larger structures. On the other hand, our study substantiates recent findings that cardiomyocytes cell cycle activity ceases early after birth and an earlier timing of cardiac surgeries may provide a higher regenerative ability of cardiac tissue. However, many more studies are needed to allow a definite conclusion and recommendation about this topic, Nevertheless, this study provides confidence that the field of regenerative medicine regarding children with congenital heart defects has much more to offer.

## 9. Abkürzungsverzeichnis

|                      |   |
|----------------------|---|
| <b>µl</b>            | Mikroliter  |
| <b>µm</b>            | Mikrometer  |
| <b>µM</b>            | Mikromolar  |
| <b>%</b>             | Prozent   |
| <b>3D</b>            | Dreidimensional   |
| <b>AHF</b>           | Angeborene Herzfehler   |
| <b>ASD</b>           | Atriumseptumdefekt  |
| <b>AV</b>            | Atrioventrikular  |
| <b>bzgl</b>          | Bezüglich   |
| <b>CHD</b>           | Congenital Heart Defect   |
| <b>DAPI</b>          | <b><i>4,6-Diamidin-2-Phenylindol</i></b>                              |
| <b>DCM</b>           | <i>Dilatative Kardiomyopathie</i>                                     |
| <b>DNA</b>           | <i>Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure</i>                  |
| <b>DORV</b>          | <i>Double Outlet Right Ventricle</i>                                  |
| <b>Engl.</b>         | Englisch  |
| <b>et al</b>         | et alii, und andere   |
| <b>ggf</b>           | Gegebenenfalls  |
| <b>h</b>             | Stunde(n)   |
| <b>IF</b>            | Immunfluoreszenz  |
| <b>KM</b>            | Kardiomyozyten  |
| <b>LVOTO</b>         | Linksventrikuläre Ausflusstraktobstruktion                            |
| <b>max</b>           | Maximal   |
| <b>min</b>           | Minute(n)   |
| <b>ml</b>            | Milliliter  |
| <b>mm</b>            | Millimeter  |
| <b>mmHg</b>          | Millimeter Quecksilbersäule   |
| <b>n</b>             | Anzahl  |
| <b>NaCl</b>          | Natriumchlorid  |
| <b>O<sub>2</sub></b> | Sauerstoff  |
| <b>paAVSD</b>        | Partieller Atrioventrikulärer Septumdefekt                            |
| <b>PBS</b>           | <i>Phosphate buffered saline, Phosphate-gepufferte Kochsalzlösung</i> |
| <b>PS</b>            | <i>Pulmonalstenose</i>  |
| <b>PFA</b>           | Paraformaldehyd   |
| <b>PTFE</b>          | Polytetrafluorethylen   |
| <b>RT</b>            | Raumtemperatur (22°C)   |
| <b>RVOTO</b>         | Rechtsventrikuläre Ausflusstraktobstruktion                           |
| <b>TBS</b>           | <i>Tris buffered saline, Tris-gepufferte Kochsalzlösung</i>           |
| <b>VSD</b>           | <i>Ventrikelseptumdefekt</i>  |
| <b>WGA</b>           | <i>Wheat germ agglutinin</i>  |

## 10. Literaturverzeichnis

- Ali, S. R. *et al.* (2014) 'Existing cardiomyocytes generate cardiomyocytes at a low rate after birth in mice', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(24), pp. 8850–8855. doi: 10.1073/pnas.1408233111.
- Bergmann, O. *et al.* (2009) 'Evidence for Cardiomyocyte renewal in humans', *Science*, 324(5923), pp. 98–102. doi: 10.1126/science.1164680.Evidence.
- Bergmann, O. *et al.* (2015) 'Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart', *Cell*, 161(7), pp. 1566–1575. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.026.
- Bersell, K. *et al.* (2009) 'Neuregulin1/ErbB4 Signaling Induces Cardiomyocyte Proliferation and Repair of Heart Injury', *Cell*, 138(2), pp. 257–270. doi: 10.1016/j.cell.2009.04.060.
- Bolger, A. P., Coats, A. J. S. and Gatzoulis, M. A. (2003) 'Congenital heart disease: The original heart failure syndrome', *European Heart Journal*, 24(10), pp. 970–976. doi: 10.1016/S0195-668X(03)00005-8.
- Van Der Bom, T. *et al.* (2011) 'The changing epidemiology of congenital heart disease', *Nature Reviews Cardiology*. doi: 10.1038/nrcardio.2010.166.
- Dawes, G. S., Mott, J. C. and Widdicombe, J. G. (1954) 'The foetal circulation in the lamb.', *The Journal of physiology*, 126(3), pp. 563–87. doi: 10.1113/jphysiol.1954.sp005227.
- Eschenhagen, T. *et al.* (2017) 'Cardiomyocyte regeneration: A consensus statement', *Circulation*. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029343.
- Gibson, G. E. *et al.* (1981) 'Brain dysfunction in mild to moderate hypoxia.', *The American journal of medicine*. United States, 70(6), pp. 1247–1254. doi: 10.1016/0002-9343(81)90834-2.
- Gilboa, S. M. *et al.* (2010) 'Children and Adults in the United States , 1999 to 2006', *Circulation*, 122(22), pp. 22-54–2263. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.947002.Mortality.
- Hansen, J. H. *et al.* (2016) 'Neurodevelopmental outcome in hypoplastic left heart syndrome: Impact of perioperative cerebral tissue oxygenation of the Norwood procedure.', *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. United States, 151(5), pp. 1358–1366. doi: 10.1016/j.jtcvs.2016.02.035.

Haubner, B. J. *et al.* (2012) 'Complete cardiac regeneration in a mouse model of myocardial infarction', *Aging*, 4(12), pp. 966–977. doi: 10.18632/aging.100526.

Haubner, B. J. *et al.* (2016) 'Functional Recovery of a Human Neonatal Heart after Severe Myocardial Infarction', *Circulation Research*, 118(2), pp. 216–221. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307017.

'Heart Size Estimations in Infants' (1950) *Acta Radiologica*. SAGE Publications, os-33(82\_suppl), pp. 30–44. doi: 10.1177/0284185150033S8204.

Hesse, M. *et al.* (2018) 'Midbody positioning and distance between daughter nuclei enable unequivocal identification of cardiomyocyte cell division in mice', *Circulation Research*. Lippincott Williams and Wilkins, 123(9), pp. 1039–1052. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.312792.

Hoffman, J. I. E. and Kaplan, S. (2002) *The Incidence of Congenital Heart Disease*.

Jabbour, A. *et al.* (2011) 'Parenteral administration of recombinant human neuregulin-1 to patients with stable chronic heart failure produces favourable acute and chronic haemodynamic responses', *European Journal of Heart Failure*, 13(1), pp. 83–92. doi: 10.1093/eurjhf/hfq152.

Jones, R. W. A. *et al.* (1976) 'Arterial oxygen tension and response to oxygen breathing in differential diagnosis of congenital heart disease in infancy', (January).

Kelly, R. G., Buckingham, M. E. and Moorman, A. F. (2014) 'Heart Fields and Cardiac Morphogenesis', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 4(10). doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A015750.

Laflamme, M. A. and Murry, C. E. (2011) 'Heart regeneration', *Nature*. doi: 10.1038/nature10147.

Li, F. *et al.* (1996) 'Rapid Transition of Cardiac Myocytes from Hyperplasia to Hypertrophy During Postnatal Development', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Elsevier, 28(8), pp. 1737–1746. doi: 10.1006/jmcc.1996.0163.

Li, Yan *et al.* (2018) 'Genetic lineage tracing of nonmyocyte population by dual recombinases', *Circulation*, 138(8), pp. 793–805. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034250.

Mahle, W. T. *et al.* (2009) 'Role of pulse oximetry in examining newborns for congenital

heart disease: a scientific statement from the AHA and AAP', *Pediatrics*. *Pediatrics*, 124(2), pp. 823–836. doi: 10.1542/PEDS.2009-1397.

Mollova, M. *et al.* (2013) 'Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(4), pp. 1446–1451. doi: 10.1073/pnas.1214608110.

Nakada, Y. *et al.* (2017) 'Hypoxia induces heart regeneration in adult mice.', *Nature*. England, 541(7636), pp. 222–227. doi: 10.1038/nature20173.

Nsair, A. *et al.* (2014) 'Molecular basis of recovering on mechanical circulatory support.', *Heart failure clinics*. United States, 10(1 Suppl), pp. S57-62. doi: 10.1016/j.hfc.2013.08.007.

Ossa Galvis, M. M. *et al.* (2022) 'Cyanotic Heart Disease.', in. Treasure Island (FL).

Paradis, A. N. *et al.* (2015) 'Newborn hypoxia/anoxia inhibits cardiomyocyte proliferation and decreases cardiomyocyte endowment in the developing heart: Role of endothelin-1', *PLoS ONE*, 10(2), pp. 1–21. doi: 10.1371/journal.pone.0116600.

Polizzotti, B. D. *et al.* (2017) 'Stimulation of cardiomyocyte regeneration in neonatal mice and in human myocardium with neuregulin reveals a therapeutic window', 7(281), pp. 1–30. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa5171.Stimulation.

Porello, E. R. *et al.* (2011) 'Transient Regenerative Potential of the Neonatal Mouse Heart', *National institutes of Health*, 331(February), pp. 1078–1080. doi: 10.1126/science.1200708.Transient.

Porrello, E. R. *et al.* (2011) 'Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart.', *Science (New York, N. Y.)*, 331(6020), pp. 1078–80. doi: 10.1126/science.1200708.

Postma, A. V, Bezzina, C. R. and Christoffels, V. M. (2016) 'Genetics of congenital heart disease: the contribution of the noncoding regulatory genome.', *Journal of human genetics*. England, 61(1), pp. 13–19. doi: 10.1038/jhg.2015.98.

Puente, B. N. *et al.* (2014) 'The Oxygen Rich Postnatal Environment Induces Cardiomyocyte Cell Cycle Arrest Through DNA Damage Response', *Cell*, 157(3), pp. 565–579. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.032.The.

Russell, M. W. *et al.* (2018) 'Advances in the understanding of the genetic determinants of congenital heart disease and their impact on clinical outcomes', *Journal of the American Heart Association*. American Heart Association Inc. doi: 10.1161/JAHA.117.006906.

Senyo, S. E. *et al.* (2013) 'Mammalian Heart Renewal by Preexisting Cardiomyocytes', *Nature*. doi: 10.1038/nature11682.

Soonpaa, M. H. *et al.* (1996) 'Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development.', *The American journal of physiology*, 271(5 Pt 2), pp. H2183-9. doi: 10.1152/ajpheart.1996.271.5.H2183.

Soonpaa, M. H. and Field, L. J. (1997) 'Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis in normal and injured adult mouse hearts', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 272(1 41-1). doi: 10.1152/ajpheart.1997.272.1.h220.

Sturzu, A. C. *et al.* (2015) 'Fetal Mammalian Heart Generates a Robust Compensatory Response to Cell Loss', *Circulation*, 132(2), pp. 109–121. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.011490.

Sun, L. *et al.* (2015) 'Reduced fetal cerebral oxygen consumption is associated with smaller brain size in fetuses with congenital heart disease.', *Circulation*. United States, 131(15), pp. 1313–1323. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013051.

Sun, Y. *et al.* (2019) 'Effects of hypoxia on cardiomyocyte proliferation and association with stage of development', *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier, 118(July), p. 109391. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109391.

Tong, W. *et al.* (2013) 'Hypoxia inhibits cardiomyocyte proliferation in fetal rat hearts via upregulating TIMP-4', *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 304(8), pp. 613–620. doi: 10.1152/ajpregu.00515.2012.

Velayutham, N. *et al.* (2020) 'Cardiomyocyte cell cycling, maturation, and growth by multinucleation in postnatal swine', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 146, pp. 95–108. doi: 10.1016/j.yjmcc.2020.07.004.

Walsh, S. *et al.* (2010) 'Cardiomyocyte cell cycle control and growth estimation in vivo-An analysis based on cardiomyocyte nuclei', *Cardiovascular Research*, 86(3), pp. 365–373. doi: 10.1093/cvr/cvq005.

Webster, W. S. and Abela, D. (2007) 'The effect of hypoxia in development', *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd, 81(3), pp. 215–228. doi: 10.1002/bdrc.20102.

Wohlschlaeger, J. *et al.* (2010) 'Cardiomyocyte survivin protein expression is associated

with cell size and DNA content in the failing human heart and is reversibly regulated after ventricular unloading', *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. Elsevier, 29(11), pp. 1286–1292. doi: 10.1016/j.healun.2010.06.015.

Xu, Y. *et al.* (2010) 'Neuregulin-1/ErbB signaling and chronic heart failure.', *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*. United States, 59, pp. 31–51. doi: 10.1016/S1054-3589(10)59002-1.

Ye, L. *et al.* (2015) 'Decreased yes-associated protein-1 (YAP1) expression in pediatric hearts with ventricular septal defects', *PLoS ONE*, 10(10), pp. 1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0139712.

Ye, L. *et al.* (2016) 'Cardiomyocytes in Young Infants with Congenital Heart Disease: A Three-Month Window of Proliferation', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(December 2015), pp. 1–9. doi: 10.1038/srep23188.

Ye, L. *et al.* (2018) 'Early regenerative capacity in the porcine heart', *Circulation*, 138(24), pp. 2798–2808. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.031542.

Ye, L. *et al.* (2020) 'Role of Blood Oxygen Saturation During Post-Natal Human Cardiomyocyte Cell Cycle Activities', *JACC: Basic to Translational Science*, 5(5), pp. 447–460. doi: 10.1016/j.jacbts.2020.02.008.

Yester, J. W. and Kühn, B. (2017) 'Mechanisms of Cardiomyocyte Proliferation and Differentiation in Development and Regeneration', *Curr. Cardiol Rep*, 19(2). doi: 10.1007/s11886-017-0826-1.

Yutzey KE (2017) 'Cardiomyocyte Proliferation: Teaching an old dogma new tricks', *Circulation Research*, 120(4), pp. 627–9. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.310058.Cardiomyocyte.

Zacchigna, S. *et al.* (2018) 'Paracrine effect of regulatory T cells promotes cardiomyocyte proliferation during pregnancy and after myocardial infarction', *Nature Communications*, 9(1), p. 2432. doi: 10.1038/s41467-018-04908-z.

Zhu, W. *et al.* (2018) 'Regenerative Potential of Neonatal Porcine Hearts.', *Circulation*. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034886.

## 11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich zuallererst Florian Weinberger und seiner gesamten Arbeitsgruppe danken. Vielen Dank Florian für deine hervorragende Unterstützung und Betreuung dieser Doktorarbeit. Danke, dass du mir immer mit Rat und Tat zur Seite standest. Mit deiner Unterstützung konnte ich dieses Projekt auch trotz der Distanz finalisieren und habe dabei immer große Freude gehabt.

Ich danke meinem ehemaligen Chef und Doktorvater Prof. Kozlik-Feldmann für die Betreuung dieser Doktorarbeit und der Unterstützung und Förderung meiner klinischen Arbeit. Dank ihm konnte ich die Faszination der Kinderkardiologie entdecken und teilen. Danke für die vielen produktiven Gespräche und professionellen Rat, welche die ersten Schritte meiner medizinischen Karriere gebahnt haben.

Außerdem möchte ich mich bei meinem ehemaligen Kollegen aus der Kinderkardiochirurgie, Dr. Daniel Biermann, bedanken. Dank seiner Unterstützung in der Gewinnung der Proben und dem kollegialen Umgang miteinander, war es möglich Proben von Kindern mit angeborenen Herzfehlern zu sammeln.

Außerdem möchte ich mich bei Eva Querdel bedanken, welche mich in die Laborarbeit eingeführt hat und mir geholfen hat bei der Bearbeitung meiner Proben.

Mein aller größter Dank geht an dich lieber Victor, danke fürs Korrekturlesen und dass du immer an meiner Seite stehst. Du gibst mir das Gefühl alles schaffen zu können und ich bin sehr froh dich an meiner Seite zu haben.



## **12. Lebenslauf**

**Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen**

**Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen**


### **13. Eidesstattliche Erklärung**

#### **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:  .....