

Aus dem Bereich Innere Medizin – Klinisch-Experimentelle Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Prof. Dr. med. U. Laufs

**Bedeutung des Mineralocorticoid-Rezeptors
für die Entstehung
atrialer Fibrose bei Vorhofflimmern**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

vorgelegt von: **Christian Selzer**
geb. am: 17.09.1978 in Heidelberg

Als Naturwesen bleibt der Mensch an den Körper gebunden,
als Geisteswesen aber hat er Flügel.

Platon (427 - 348 od. 347 v. Chr.)

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	7
1. Summary	9
2. Einleitung und eigene Fragestellung	10
2.1. Klinische Bedeutung von Vorhofflimmern	10
2.1.1. Definition, Inzidenz und Prävalenz	10
2.1.2. Symptome und Folgen von Vorhofflimmern	11
2.2. Pathophysiologie von Vorhofflimmern	13
2.2.1. Physiologie und Pathophysiologie der Erregungsausbreitung im Vorhof	13
2.2.2. Strukturelles Remodeling	13
2.2.3. Molekularbiologische Veränderungen bei strukturellem Remodeling	14
2.2.4. Die Rolle des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	15
2.3. Fragestellung	17
3. Material und Methodik	18
3.1. Zellkultur	18
3.1.1. Isolierung neonataler Rattenfibroblasten	18
3.1.2. Kultivierung und Stimulation neonataler Rattenfibroblasten	19
3.2. Humane Proben des linken Vorhofes	20
3.3. Proteinbestimmung und Western Blot	22
3.3.1. Proteinbestimmung nach Lowry	22
3.3.2. Proteinexpression und Western Blot	22
3.3.3. Gelelektrophorese	23
3.3.4. Protein-Transfer	23
3.3.5. Antikörperinkubation	23
3.4. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	24
3.5. Hydroxyprolin Assay	25
3.6. Immunhistochemische Färbungen	25
3.7. Statistische Analysen	26
3.8. Material	26
3.8.1. Medien, Lösungen, Puffer	26
3.8.2. Antikörper	27
3.8.3. Primer	28
3.8.4. Verbrauchsmaterial	29

3.8.5. Chemikalien, sonstige Reagenzien.....	29
3.8.6. Geräte.....	31
3.8.7. Software.....	32
4. Ergebnisse	33
4.1. Humane Proben des linken Vorhofes	33
4.1.1 Hydroxyprolinegehalt in humanen Proben des linken Vorhofes bei Vorhofflimmern	33
4.1.2. Expression des Mineralocorticoid-Rezeptors in menschlichen Vorhöfen.....	35
4.1.3. Proteinexpression von SPARC in humanen Proben des linken Vorhofes bei Vorhofflimmern	36
4.2. Profibrotische Signaltransduktion in kultivierten kardialen Fibroblasten.....	39
4.2.1. Hydroxyprolin Expression in kardialen Fibroblasten	39
4.2.2. Expression des Mineralocorticoid-Rezeptors in kardialen Fibroblasten	41
4.2.3. Proteinexpression von CTGF in Abhängigkeit von Aldosteron und BR-4628	43
4.2.4. Proteinexpression von CTGF in Abhängigkeit von Aldosteron und Spironolacton	45
4.2.5. Proteinexpression von CTGF in Abhängigkeit von TGF- β und BR-4628.....	47
4.2.6. Proteinexpression von LOX in Abhängigkeit von Aldosteron und BR-4628	49
4.2.7. Proteinexpression von LOX in Abhängigkeit von Aldosteron und Spironolacton	51
5. Diskussion	54
6. Literaturverzeichnis.....	58
7. Publikationen/Dank	69
7.1. Publikationen	69
7.2. Abstracts	69
7.3. Dank.....	70
8. Lebenslauf	71

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AT ₁ -Rezeptor	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
Aqua. dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
°C	Grad Celsius
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
CV	Erregungsweiterleitung
et al	et alii, et aliae, et alia (und andere)
FS	Verkürzungsfraction
g, mg, µg, ng, pg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm, Pikogramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
IVSD	diastolische Septumdicke
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LA	Linkes Atrium
LAd	Durchmesser des linken Vorhofes
LOX	Lysyl Oxidase
LVEDd	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraction
LVESd	linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser
LVPWd	diastolische Hinterwanddicke
M, mM, µM	Molar, Millimolar, Mikromolar
MW	Mittelwert
MR	Mineralocorticoid-Rezeptor
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
(m)RNA	(messenger) ribonucleic acid
RP	Refraktärzeit

RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard Error of the Mean (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes)
SPARC	Secreted protein acidic and rich in cysteine
SPIRO	Spirolacton
SR	Sinusrhythmus
TGF- β	Transforming Growth Factor β
U/min	Umdrehungen pro Minute
VHF	Vorhofflimmern
WL	Wellenlänge

1. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Bedeutung des Mineralocorticoid-Rezeptors (MR) für die Entstehung atrialer Fibrose bei Vorhofflimmern zu untersuchen.

Patienten mit Vorhofflimmern (VHF) wiesen im linken Vorhof (LA) im Vergleich zu Patienten mit Sinusrhythmus (SR) einen erhöhten Gehalt an Hydroxyprolin auf ($425 \% \pm 103 \%$). Die Expression des MR im LA zeigte keinen Unterschied von Patienten mit VHF im Vergleich zu Patienten mit SR. Die Proteinexpression von Hydroxyprolin im LA korrelierte mit dem erhöhten Gehalt an Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) (Hydroxyprolin: $425 \% \pm 103 \%$ und SPARC: $165 \% \pm 23 \%$). SPARC gehört zu den matrizellulären Proteinen und reguliert den Einbau von Kollagen in die extrazelluläre Matrix.

In kultivierten kardialen Fibroblasten, die mit Aldosteron behandelt wurden, zeigte sich eine Hydroxyprolin-Überexpression ($244 \% \pm 46 \%$) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Dieser Aldosteron-Effekt wurde durch eine vorausgehende Behandlung mit Spironolacton oder BR-4628 vollständig verhindert (Spirono: $125 \% \pm 12 \%$ und BR-4628: $123 \% \pm 16\%$). BR-4628 ist ein neuartiger MR-Antagonist aus der Gruppe der Dihydropyridine mit vergleichbarer Affinität zum MR wie Spironolacton. Eine Behandlung mit Aldosteron führte zu einer erhöhten Expression von Connective Tissue Growth Factor (CTGF $207 \% \pm 34 \%$). Sowohl BR-4628 als auch Spironolacton waren in der Lage, diese durch Aldosteron induzierten Effekte zu verhindern (BR-4628: $59 \% \pm 17 \%$ und Spironolacton: $51 \% \pm 15 \%$). Eine Behandlung kardialer Fibroblasten mit transforming growth factor β (TGF- β) führte zu einer erhöhten CTGF Expression ($180 \% \pm 13 \%$). Durch Vorbehandlung mit BR-4628 war eine effektive Hemmung möglich ($86 \% \pm 9 \%$).

Die durch Aldosteron erhöhte Proteinexpression der profibrotischen Lysyl Oxidase (LOX: $271 \% \pm 38 \%$) war durch eine Vorbehandlung mit BR-4628 ($171 \% \pm 25 \%$) reduzierbar. Eine vergleichbare Wirkung war auch für Spironolacton nachweisbar ($141 \% \pm 17 \%$).

Zusammenfassend zeigte sich, eine MR-vermittelte Signaltransduktion, die über Hydroxyprolin, CTGF und LOX zu einem profibrotischen Remodeling führte. Eine Blockade des MR

ist somit ein potentieller Ansatzpunkt zur Prävention der atrialen Fibrose, welche zur Entstehung des Vorhofflimmerns beiträgt.

1. Summary

The aim of the study is to characterize the role of the mineralocorticoid receptor (MR) for atrial fibrosis in patients with atrial fibrillation.

Left atrial myocardium (LA) of patients with atrial fibrillation (AF) showed increased hydroxyproline content compared to patients in sinus rhythm (SR) ($425 \% \pm 103 \%$). LA of AF patients showed similar expression of MR compared to patients in SR. Hydroxyproline in LA correlated with upregulated secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) (Hydroxyproline: $425 \% \pm 103 \%$ and SPARC: $165 \% \pm 23 \%$). SPARC is a collagen binding matricellular protein which mediates assembly of the extracellular matrix.

In cultured cardiac fibroblasts, aldosterone increased hydroxyproline expression ($244 \% \pm 46 \%$) This aldosterone effect was completely prevented by spironolactone as well as BR-4628 (spironolactone: $125 \% \pm 12 \%$ und BR-4628: $123 \% \pm 16\%$), BR-4628 is a novel dihydropyridine-derived non-steroidal and selective MR antagonist. A pretreatment with aldosterone enhanced the expression of Connective Tissue Growth Factor (CTGF: $207 \% \pm 34 \%$). BR-4628 as well as spironolactone prevented this effect and decreased CTGF expression compared to control (BR-4628: $59 \% \pm 17 \%$ and Spironolactone: $51 \% \pm 15 \%$). Exposure of cardiac fibroblasts to transforming growth factor β (TGF- β), increased CTGF protein expression ($180 \% \pm 13 \%$). Preincubation with BR-4628 completely prevented these changes ($86 \% \pm 9 \%$). A pretreatment with aldosterone increased lysyl oxidase (LOX) expression (LOX $271 \% \pm 38 \%$). BR-4628 or spironolactone was able to reduce the increased LOX expression (BR-4628: $171 \% \pm 25 \%$ and spironolactone: $141 \% \pm 17 \%$).

In summary mineralocorticoid receptor signalling through hydroxyproline, CTGF and LOX contributes to atrial structural remodeling. Inhibition of the MR pathways may therefore represent a target for the prevention of fibrosis which is a substrate for atrial fibrillation.

2. Einleitung und eigene Fragestellung

2.1. Klinische Bedeutung von Vorhofflimmern

2.1.1. Definition, Inzidenz und Prävalenz

Kardiale Tachyarrhythmien haben ihre Ursache entweder in einer gestörten Erregungsinitiation oder in einer fehlerhaften Reizweiterleitung, sowie in einer möglichen Kombination beider Störungen (Blomstrom-Lundqvist et al., 2003). Vorhofflimmern ist die häufigste Herzrhythmusstörung. Bei Vorhoffrequenzen über 400 Schlägen pro Minute spricht man von Vorhofflimmern (Nattel, 2002).

Im EKG finden sich bei Patienten mit Vorhofflimmern unregelmäßige, amplitudenmodulierte, schnell oszillierende oder fibrillierende Wellen, anstelle der gleichmäßigen P-Wellen. Durch das Fehlen einer koordinierten Vorhoferregung, sind im EKG keine P-Wellen erkennbar. Die Filterfunktion des AV-Knotens in Bezug auf die frequenzabhängige Weiterleitung der Vorhoffimpulse führt zu unregelmäßigen RR-Abständen im EKG (Fuster et al., 2006).

Vorhofflimmern wird unterteilt in paroxysmales, persistierendes und permanentes Vorhofflimmern.

Als paroxysmal wird Vorhofflimmern bezeichnet, wenn es spontan innerhalb weniger Minuten bis maximal sieben Tage nach seinem vermuteten Beginn endet. Wenn es länger als sieben Tage anhält oder nur durch eine medikamentöse oder elektrische Kardioversion beendet werden kann, wird es als persistierend bezeichnet. Von permanentem Vorhofflimmern spricht man, wenn sich nach einer erfolgten Kardioversion kein (dauerhafter) Sinusrhythmus einstellt oder eine Kardioversion nicht eingeleitet wird, da sie nicht erfolversprechend erscheint.

Die Angabe von genauen Zahlen zur Prävalenz und Inzidenz gestaltet sich sehr schwierig, da es sich bei einem Teil der Patienten um paroxysmales Vorhofflimmern handelt oder das Auftreten asymptomatisch verläuft. Des Weiteren kann ein kontinuierlicher Anstieg der Prävalenz von Vorhofflimmerns, sowie damit verbundener Hospitalisationen beobachtet werden (Tsang et al., 2003). Die Prävalenz und Inzidenz dieser Rhythmusstörung korreliert in

starkem Maße mit dem Alter der Patienten (Feinberg et al., 1995; Fuster et al., 2006; Lip et al., 2012). So ist die Inzidenz von Vorhofflimmern bei Patienten unter 40 Jahren weniger als 0,1 % pro Jahr und steigt bei Patienten, die älter als 80 Jahre sind, auf 1,5 % bei Frauen und auf 2% bei Männern pro Jahr an (Fuster et al., 2006; Wolf et al., 1987). Die Prävalenz des Vorhofflimmerns liegt bei Patienten unter 55 Jahren bei 0,1 % und erhöht sich deutlich bei Patienten ab dem 80. Lebensjahr auf 9 % (Go et al., 2001).

2.1.2. Symptome und Folgen von Vorhofflimmern

Vorhofflimmern bedeutet für viele Menschen subjektiv ein Verlust an Lebensqualität, verursacht durch Herzrasen, Palpitationen, Angstgefühle, Müdigkeit und Schwindel. Daneben gibt es zahlreiche Krankheiten, die gehäuft im Zusammenhang mit Vorhofflimmern auftreten oder dadurch verursacht werden (Fuster et al., 2006; Nattel, 2002; Wolf et al., 1991).

Tabelle 1 zeigt mit Vorhofflimmern assoziierte Komorbiditäten.

Vorhofflimmern erhöht die Mortalität und Morbidität von Patienten. In erster Linie zeigt sich ein erhöhtes Risiko für zerebrovaskuläre Ereignisse bei Vorhofflimmern, besonders bei fehlender oder unzureichender Antikoagulation (Upshaw, 1997). Durch den Verlust der kontraktilen Funktion des linken Atriums kommt es zu einem Stagnieren des Blutflusses, was zu Bildung von Thromben prädisponiert, die wiederum Quelle für mögliche Emboli sein können (Freeman and Aguilar, 2011). Insgesamt werden 17 % - 27 % aller Schlaganfälle von Emboli verursacht, die durch Vorhofflimmern entstanden sind und führen dadurch zu 17 % aller durch Schlaganfall bedingten Todesfälle (Feigin et al., 2003). Das Risiko einen Schlaganfall zu erleiden ist bei Vorhofflimmern 5-fach erhöht, im Vergleich zu Patienten ohne diese Rhythmusstörung (Go et al., 2001). Patienten mit einem Schlaganfall und gleichzeitigem Vorhofflimmern haben häufiger neurologische Komplikationen, sowie eine erhöhte Mortalitätsrate als die übrigen Schlaganfallpatienten (Steger et al., 2004). In ca. 30 % aller Fälle handelt es sich jedoch um „lone atrial fibrillation“, dem alleinigen Vorhofflimmern, d.h. ohne die im Zusammenhang stehenden Begleiterkrankungen (Levy, 1997). Bei länger bestehendem Vorhofflimmern kommt es aufgrund der hämodynamisch unwirksamen Vorhofkontraktionen zu einer Minderung des Herzzeitvolumens um ca. 20 %. (Clark et al., 1997; Dries et al., 1998; Falk, 2001).

Dries et al. zeigten, dass eine Reduktion der linksventrikulären Ejektionsfraktion unmittelbar mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko assoziiert ist (Dries et al., 1998). Alleiniges Vorhofflimmern führt zu einem bei Männern 1,5-fach und bei Frauen 1,9-fach erhöhten Mortalitätsrisiko (Benjamin et al., 1998). Zahlreiche Studien belegen eine enge pathophysiologische Verbindung zwischen Vorhofflimmern und Herzinsuffizienz. So ist Vorhofflimmern ein prädisponierender Faktor für Herzinsuffizienz und umgekehrt haben Patienten mit einer Herzinsuffizienz ein deutlich erhöhtes Risiko an Vorhofflimmern zu erkranken (Benjamin et al., 1994; Dries et al., 1998).

Vorhofflimmern	
Kardiovaskuläre Erkrankungen	Extrakardiale Erkrankungen/ sonstige Ursachen
arterielle Hypertonie	Thyreotoxikose
Kardiomyopathie	Infektionen
Herzklappenvitien	Lungenerkrankungen
KHK	Störungen des Elektrolythaushaltes
Herzchirurgische Eingriffe	Diabetes mellitus
kongenitale Herzerkrankungen	Alkohol
Perikarditis	medikamentöse Nebenwirkungen
rheumatische Herzerkrankungen	nichtkardiale operative Eingriffe

Tabelle 1: Mit Vorhofflimmern assoziierte kardiale und extrakardiale Erkrankungen und sonstige Ursachen

(Ettinger et al., 1978; Frost et al., 2004; Gallagher and Camm, 1997; Gronefeld et al., 2003; Nattel, 2002)

2.2. Pathophysiologie von Vorhofflimmern

2.2.1. Physiologie und Pathophysiologie der Erregungsausbreitung im Vorhof

Bei einem normalen und regelmäßigen Herzschlag geht die Erregungsinitiation vom Sinusknoten aus, der in der unmittelbaren Nähe der Einmündung der Vena cava superior im rechten Atrium liegt. Die Erregung breitet sich von hier über die gesamten Vorhöfe bis zum AV-Knoten aus, von wo die Überleitung zu den Ventrikeln erfolgt.

Beim Vorhofflimmern entstehen eine oder mehrere kreisende Erregungen ("Reentry"). Durch diese ungerichteten elektrischen Erregungen kommt zu einer hämodynamisch unwirksamen Kontraktion der Vorhöfe (Li et al., 1999; Nattel, 2002).

Ein wichtiger Faktor für die Entstehung von Vorhofflimmern und der damit verbundenen kreisenden Erregungen ist das elektrische Remodeling hierbei spielt die Verkürzung der Refraktärzeit eine fundamentale Rolle. Die Wellenlänge (WL) einer kreisenden Erregung ist das Produkt aus der Geschwindigkeit der Erregungsweiterleitung (CV) und der Dauer der Refraktärzeit (RP): **WL=CV x RP**.

Durch die Verkürzung der Refraktärzeit bzw. einer geringeren Erregungsweiterleitungsgeschwindigkeit, wie sie beim Vorhofflimmern progredient entsteht, resultiert eine kürzere Wellenlänge, welche wiederum zur Entstehung neuer Reentries beiträgt (Allessie et al., 2002; Goette et al., 1996; Wijffels et al., 1995). Dies führt dazu, dass Vorhofflimmern sich selbst unterhält bzw. erzeugt ("Atrial Fibrillation Begets Atrial Fibrillation") (Wijffels et al., 1995).

2.2.2. Strukturelles Remodeling

Vorhofflimmern geht mit strukturellen Veränderungen im Vorhof einher. Hierbei lassen sich sowohl makroskopische Veränderungen, wie die atriale Dilatation, als auch mikroskopische Umbauprozesse, im Sinne einer Fibrose, erkennen. Diese Veränderungen werden in ihrer Summe als strukturelles Remodeling bezeichnet (Lin et al., 2007). Strukturelle Veränder-

ungen sind Antworten des Myokards im Sinne eines adaptiven oder maladaptiven Remodelings (Levy, 1997; Saffitz et al., 1999). Die atriale Fibrosierung ist ein Phänomen, welches bei vielen myokardialen Erkrankungen auftritt. Neben Vorhofflimmern sind chronische Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt und Kardiomyopathien typische auslösende Erkrankungen, die die strukturelle Integrität des Myokards beeinflussen und zu profibrotischen Umbauprozessen in den Vorhöfen führen (Burstein and Nattel, 2008a; Levy, 1997; Li et al., 2001). Die chronische Herzinsuffizienz prädisponiert zu Vorhofflimmern. Vorhofflimmern seinerseits verschlechtert die Prognose und die Hämodynamik der chronischen Herzinsuffizienz (Ehrlich et al., 2002). Des Weiteren kommt es bei der chronischen Herzinsuffizienz aufgrund maladaptiver Anpassungsprozesse zu einer ventrikulären und atrialen Fibrosierung (Burstein and Nattel, 2008a). Die Fibrosierung führt wiederum zu einer Inhomogenität der Erregungsausbreitung mit Entstehung von Reentry-Erregungskreisläufen, die die Grundlage für eine Arrhythmiepersistenz darstellen. (Allessie et al., 2002; Li et al., 1999).

Durch diese Korrelation zwischen chronischer Herzinsuffizienz, Fibrose und Vorhofflimmern besteht ein großes klinisches Interesse profibrotische Umbauprozesse besser zu verstehen, um gezielte antifibrotische Interventionsstrategien entwickeln zu können (Burstein and Nattel, 2008b; Wang et al., 2003).

2.2.3. Molekularbiologische Veränderungen bei strukturellem Remodeling

Nur ca. 45 % des Vorhofmyokards besteht aus Kardiomyozyten, der restlichen 55 % werden von kardialen Fibroblasten, Endothelzellen und extrazellulärer Matrix gebildet (Hinescu et al., 2006). Kollagen Typ I (80 %) und III (11 %) sind die am häufigsten am Herz vorkommenden Kollagen Subtypen (de Jong et al., 2011; Pelouch et al., 1993). Mit zunehmendem Alter steigt die Kollagenkonzentration im Herzen an (de Souza, 2002). Diese Veränderungen erhöhen die myokardiale Steifigkeit und separieren teilweise die myokardialen Bündel (Weber et al., 1988). Hieran sind insbesondere Typ I Kollagen-Fasern beteiligt, die in Anzahl und Stärke zunehmen (de Jong et al., 2011).

Die extrazelluläre Matrixbildung und die resultierende Fibrose hängen vom Gleichgewicht zwischen der Synthese und dem Abbau von Matrixmolekülen wie Kollagen und Proteoglykanen ab. Kollagen ist eines der wenigen Proteinen, die die α -Aminosäure Hydroxyprolin enthält, wobei Hydroxyprolin für die Ausbildung der Tertiärstruktur des Kollagens verantwortlich ist (Edwards and O'Brien, 1980).

Zahlreiche kardiale Erkrankungen, wie beispielsweise der Myokardinfarkt, die Myokarditis, die diabetische Kardiomyopathie, sowie die systolische und diastolische Herzinsuffizienz führen zu fibrotischen Umbauprozessen im Myokard. Hierbei wird CTGF überexprimiert und der Grad der Überexpression korreliert mit der Schwere der Erkrankung (Ahmed et al., 2004; Blom et al., 2002; Candido et al., 2003; Dean et al., 2005; Koitabashi et al., 2007; Lang et al., 2008; Way et al., 2002). Kardiomyozyten wie auch kardiale Fibroblasten sind in der Lage CTGF zu exprimieren. Eine vermehrte CTGF Expression in Kardiomyozyten kann durch den Transforming Growth Factor β (TGF- β) induziert werden (Leask, 2007). TGF- β gehört zur Klasse der Zytokine und beeinflusst maßgeblich die Zellproliferation und Zelldifferenzierung (Matsui and Sadoshima, 2004). CTGF ist bei pathologischen ventrikulären und atrialen Umbauprozessen, insbesondere der Entwicklung von Hypertrophie und Fibrose beteiligt (Cardin et al., 2007; Kato et al., 2008). Des Weiteren kann CTGF eine Zunahme von Fibronectin, Kollagen Typ I und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) in Kardiomyozyten wie auch in Fibroblasten induzieren (Chen et al., 2000). Eine mechanische Vorhofdehnung mit beginnender Dilatation führt, ebenso wie eine Exposition mit CTGF und TGF- β , zu einer gesteigerten Kollagensynthese und -sekretion in kardialen Fibroblasten mit einer daraus resultierenden Fibrose (Burstein and Nattel, 2008a; Lijnen et al., 2000; Villarreal and Dillmann, 1992).

2.2.4. Die Rolle des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ist ein wichtiger Parameter bei der Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes sowie des Blutdruckes. Daneben ist das RAAS an fibrotischen Prozessen beteiligt, wie sie im Rahmen der chronischen Herzinsuffizienz, der hypertensiven Herzkrankheit, des myokardialen Infarktes und der Kardiomyopathie vorkommen (Li

et al., 2001). Angiotensin II führt zur Freisetzung von Aldosteron welches in der Zona glomerulosa, der äußersten Schicht der Nebennierenrinde, produziert wird. Aldosteron ist ein Steroidhormon und zählt zur Wirkstoffklasse der Mineralocorticoide. Für Aldosteron wurde eine Beteiligung an der Entstehung von Vorhofflimmern und fibrotischen Umbauprozessen gezeigt (Reil et al., 2012).

Physiologischerweise wird das RAAS durch eine erniedrigte Gewebepfusion stimuliert, was letztendlich zu einem erhöhten intravaskulären Volumen und Druck führt. Bei der Herzinsuffizienz jedoch liegt die Ursache der Minderperfusion nicht in einem verringerten intravasalen Volumen, sondern an einem reduzierten Herzzeitvolumen. Der Ausgleichsmechanismus der Nieren erhöht das Volumen und führt zu einer erhöhten Arbeitsbelastung für das bereits insuffiziente Herz (Nappi and Sieg, 2011). In der Niere bewirkt Aldosteron über die Aktivierung von Mineralocorticoidrezeptoren eine Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes und nimmt somit Einfluss auf das Extrazellulärvolumen und den Blutdruck. Ferner kann Aldosteron zu einer linksventrikulären Hypertrophie und profibrotischen Umbauprozessen beitragen (Brilla et al., 1993; Robert et al., 1995; Young et al., 1994).

Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz weisen eine höhere Aldosteronsekretion gegenüber gesunden Probanden auf (Nappi and Sieg, 2011; Sun et al., 1997). Aldosteron ist an der Ausbildung von Vorhoffarrhythmien beteiligt (Reil et al., 2012; Tsai et al., 2010). Eine gesteigerte Aldosteronkonzentration führt zu einer Fibrose in den Vorhöfen und den Kammern. Diese Fibrose entsteht durch eine Stimulation des Wachstums von Fibroblasten und durch die Synthese von Typ I und III Kollagen (Weber, 2001).

Zwei klinische Studien, die Randomized Aldactone Evaluation Study (RALES) und die Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) zeigten eine Senkung der Mortalität bei Patienten mit Herzinsuffizienz und linksventrikulärer systolischer Dysfunktion nach Gabe eines MR-Antagonisten in Kombination mit einem ACE-Hemmer. Diese Erkenntnisse haben dazu geführt, dass MR-Antagonisten als Standardtherapie in die Leitlinien der Herzinsuffizienz ab Stadium NYHA III aufgenommen worden sind (McMurray et al., 2012; Pitt et al., 2001; Pitt et al., 1999; Swedberg et al., 2012; Zannad et al., 2011).

2.3. Fragestellung

Die zur Entstehung und Unterhaltung beitragenden molekularbiologischen Mechanismen bei Vorhofflimmern sind noch unvollständig bekannt. Eine Identifikation der beteiligten profibrotischen Signaltransduktionswege könnte Grundlage für neue präventive, wie auch therapeutische Ansätze bei Vorhofflimmern liefern. Insbesondere ist die Rolle des Mineralocorticoid-Rezeptors (MR) bei der Entstehung des strukturellen Remodelings bisher unzureichend charakterisiert.

In dieser Arbeit wird die Beteiligung des MR an der Signaltransduktion untersucht. Die Effekte einer durch Aldosteron verursachten Aktivierung des MR werden anhand der resultierenden Proteinexpression von Hydroxyprolin, CTGF, SPARC und LOX überprüft und quantifiziert. Weiterhin wird ein potentieller Effekt und somit ein möglicher therapeutischer Ansatz durch die Hemmung des MR mit pharmakologischen MR-Antagonisten untersucht.

3. Material und Methodik

3.1. Zellkultur

3.1.1. Isolierung neonataler Rattenfibroblasten

Fünf Tage alte Wistar Ratten wurden enthauptet und der Körper kurz mit einer 70%igen Ethanol Lösung gespült. Danach wurde der Thorax der Tiere vorsichtig links parasternal eröffnet und dabei streng darauf geachtet, dass es dabei zu keiner Verletzung des Gastrointestinaltraktes kam, da sonst hieraus ein hohes Risiko einer bakteriellen Kontamination resultiert hätte. Das Herz wurde durch sanften Druck in die obere Thoraxapertur geschoben, die Gefäßverbindungen des Herzens wurden durchtrennt und das Organ in eine mit ADS-Puffer gefüllte Zellkulturschale gelegt. Das reine Ventrikelpräparat, das durch Präparation des entnommen Herzens mittels Entfernung des perikardialen Gewebes, der Gefäßstümpfe und der Vorhöfe gewonnen wurde, wurde in eine neue, mit ADS-Puffer gefüllte Schale gelegt und in 15 etwa gleichgroße Stücke zerteilt. Danach wurde der ADS-Puffer abpipettiert. Die Gewebesuspension wurde in 10 ml Enzym-Mix in eine sterile Flasche gefüllt unter mehrmaliger Resuspendierung. Anschließend erfolgte eine Inkubation des Gewebelysates in dieser Flasche bei 37°C in einem Schüttelwasserbad bei 80-100 U/min für 5 Minuten. Während dieser Inkubation bildete sich ein Überstand (Verdau). Dieser Verdau wurde nun abpipettiert und verworfen, dabei wurde streng darauf geachtet, dass keine Gewebstücke mit in die Pipette aufgenommen wurden. Erneut wurden 10 ml Enzym-Mix hinzugegeben und die Suspension für 20 Minuten im Schüttelwasserbad inkubiert. Danach wurde der Überstand in ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß abpipettiert, die Enzymaktivität durch Zugabe von 2 ml Neonatal Calf Serum (NCS) gestoppt und anschließend für fünf Minuten zentrifugiert bei einer Umdrehung von 700 U/min. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet durch vorsichtiges Schütteln in 4 ml NCS gelöst. Dieser Vorgang wurde noch weitere fünfmal wiederholt, wobei der Unterschied nur in der Länge der Verdau-Zeiten lag, die bei 25 Min, 25 Min, 15 Min, 10 Min und 10 Min lagen. Nach der letzten Zentrifugation wurde wieder der Überstand entfernt und verworfen und die Zellsuspension mit 4 ml F 10-Medium durch vorsichtiges Schütteln resuspendiert und danach in ein Flacon Cell Strainer (70 µm) filtriert. Vor und nach dieser Filtration wurde der Filter mit jeweils 1 ml F10-Medium gespült. Die entstandenen 6 ml Zellsuspensionen wurden nun auf Zellkulturschalen ausgesät und in feuchter

Atmosphäre mit 5 % CO₂ bei 37°C für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Medium und die darin enthaltenen Kardiomyozyten in ein steriles 50 ml Gefäß überführt. Die Adhäsion der Fibroblasten am Schalenboden wurde anschließend mikroskopisch kontrolliert.

3.1.2. Kultivierung und Stimulation neonataler Rattenfibroblasten

Die neonatalen Fibroblasten wurden wie unter 3.1.1. beschrieben aus Wistar Ratten gewonnen und durch Adhäsion von den Kardiomyozyten getrennt. Die durch die beschriebene Prozedur gewonnene P0 Generation der Fibroblasten wurde in F 10-Medium bei 37°C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre inkubiert. Die Zellen sind nach 2 Tagen zu etwa 90 % konfluent. Dadurch konnten sie auf mehrere Zellkulturschalen aufgesplittet werden. Ab dieser Passage, der G1 Generation, wurde das DMEM-Nährmedium verwandt. Das Nährmedium wurde jeden zweiten Tag unter sterilen Bedingungen gewechselt. Die Zelllinien wuchsen bis zur Ausbildung eines konfluenten Zellrasens und wurden dann alle 4 bis 5 Tage durch Trypsinierung (0,25 % Trypsin in PBS-Puffer) subkultiviert. Hatten die Zellen einen etwa 80%igen Zellrasen gebildet, so wurde das Nährmedium abgesaugt. Die Zellen wurden nun in einem DMEM- Hungermedium für 12-24 Std inkubiert und danach in DMEM-Hungermedium stimuliert. Die Angaben zu Dosis und Zeit der nachfolgenden Stimulation sind in Tabelle 2 dargestellt. Durch Hinzufügen eines hypotonen Lysepuffers wurden die Zellen von den Kulturschalen abgeschabt um die Proteinexpression zu bestimmen. Das Lysat wurde zur Denaturierung der Proteine für 4 Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend mittels Western Blot eine quantitative Proteinanalyse durchgeführt.

	Konzentration	Stimulationsdauer vor der Zelllysierung
Aldosteron	[10 nM]	24 h
TGF-β	[5 ng/ml]	24 h
BR-4628	[500 nM]	25 h
Spironoloacton	[500 nM]	25 h

Tabelle 2: Konzentrationen und Stimulationsdauer

3.2. Humane Proben des linken Vorhofes

Im Vergleich zu dem rechtsatrialen Appendix sind Gewebeproben aus dem linken Vorhof schwieriger zu gewinnen. Allerdings ist der linke Vorhof die entscheidende Struktur für die Pathogenese von Vorhofflimmern und atrialem Remodeling mittels atrialer Fibrosierung. Die in Kooperation mit Prof. H.-J. Schäfers (Direktor der Klinik für Thorax- und Herz-Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes) gesammelten humanen Gewebeproben stammten von linken Vorhöfen von Patienten, die sich einer Mitralklappenoperation unterziehen mussten.

Präoperativ erfolgte eine Einteilung der Patienten in zwei Gruppen: die erste Gruppe der Patienten hatte einen Sinusrhythmus (SR); die zweite Patientengruppe ein permanentes Vorhofflimmern (VHF), wobei permanentes VHF als dokumentierte Rhythmusstörung über mehr als sechs Monate definiert wurde. Präoperativ erhielten alle Patienten mindestens zwölf Stunden keine Medikamente. Die beiden Gruppen wurden präoperativ standardisiert echokardiographisch untersucht, um linksventrikuläre Funktion und die Größe bzw. Wandstärken der Herzhöhlen zu messen (atrialer Durchmesser, IVSd, LVPWD, LVEDd). Anschließend wurden beide Gruppen nach Patientencharakteristika, Vorhofgröße und Medikation gepaart (Tabelle 3). Ein positives Ethikvotum lag vor (Ärztchamber des Saarlandes (No.131/00)). Das entnommene Gewebe wurde schockgefroren und bei minus 80 °C aufbewahrt. Zur quantitativen Analyse wurde ein kleines Gewebestück in hypotonem Lysepuffer vollständig homogenisiert. Diese Probe wurde anschließend eine Minute bei 2000 U/min zentrifugiert und der Überstand zur weiteren Verwendung abgenommen.

	SR	SEM	VHF	SEM	p-Wert
n	9		21		
weiblich (männlich)	4 (5)		7 (14)		
Alter [Jahren]	63,0	4,7	70,0	2,0	ns
Größe [cm]	166,9	3,1	176,1	1,45	<0.05
Gewicht [kg]	79,4	3,7	84,6	2,74	ns
LAd, [mm]	51,8	1,8	52,9	1,98	ns
LVEF [%]	58,7	5,1	63,7	2,82	ns
LVEDd [mm]	55,0	1,8	54,6	1,76	ns
LVESd [mm]	39,0	1,9	38,6	1,41	ns
FS [%]	30,7	1,5	29,8	1,07	ns
IVSd [mm]	11,7	0,4	12,6	0,28	ns
LVPWd [mm]	11,4	0,5	11,7	0,39	ns

Tabelle 3: Patienten-Charakteristika

Verwendete Abkürzungen:

LAd = Durchmesser des linken Vorhofes

LVEF = linksventrikuläre Ejektionsfraktion

LVEDd = linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser

LVESd = linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser

FS = Verkürzungsfraktion

IVSD = diastolische Septumdicke

LVPWd = diastolische Hinterwanddicke

SEM = (engl. standard error of mean) = Standardfehler des Mittelwertes

3.3. Proteinbestimmung und Western Blot

3.3.1. Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung des Gesamtlysates bestehend aus Kardiomyozyten und Fibroblasten wurden nach der kolorimetrischen Methode nach Lowry (Lowry et al. 1951) durchgeführt. Bei der Methode nach Lowry wird im ersten Schritt ein Kupfer-Protein-Komplex in alkalischer Lösung hergestellt (Bio-Rad. Dc Protein Assay Reagent A). Ein zugegebenes Phosphomolybdat-Phosphowolfram-Reagens (Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagens; Bio-Rad. Dc Protein Assay Reagent B) wird durch diesen Komplex reduziert, dabei färbt sich die Lösung blau, wobei die Intensität der Blaufärbung von der Proteinkonzentration abhängig ist. Photometrisch wird bei 540 nm die Konzentration der Lösung gemessen.

3.3.2. Proteinexpression und Western Blot

Die Western Blot-Methode wurde ursprünglich 1979 von George R. Stark entwickelt. Bei dem Western Blot Verfahren wird aus Zelllysaten gewonnenes Gesamtprotein elektrophoretisch aufgetrennt, um hierdurch Proteine nach ihrer Molekulargröße zu separieren. Es handelt sich hierbei um eine molekularbiologische Methode zur quantitativen Proteinbestimmung. Von dem Gel werden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Blot) übertragen und dann mit einem gegen das gesuchte Protein gerichteten Antikörper inkubiert. Die ungebundenen Antikörperfragmente werden abgewaschen. Die Membran wird erneut mit einem zweiten Peroxidase-konjugierten Antikörper inkubiert. Die ungebundenen Antikörperfragmente werden abgewaschen. Es wird anschließend ein Fluoreszenzfarbstoff hinzugegeben. Dieser Fluoreszenzfarbstoff wird durch die Peroxidase katalysiert und beginnt dadurch zu fluoreszieren. Mittels eines Röntgenfilmes kann nun die Fluoreszenz sichtbar gemacht werden und durch Densiometrie das Signal quantifiziert werden.

3.3.3. Gelelektrophorese

Es wurden jeweils 50 µg Gesamtlisat je nach Größe des zu bestimmenden Proteins auf ein 8 % SDS-Polyacrylamidgel bzw. ein 10 % SDS-Polyacrylamidgel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt, um die Konzentration des interessierenden Proteins bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen vergleichen zu können. Die Elektrophorese wurde in Anwesenheit einer äquivalenten Menge Ladepuffer durchgeführt.

3.3.4. Protein-Transfer

Die Proteine aus dem Gel wurden mit Hilfe eines Transportpuffers und Filtern sowie der Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell von Biorad auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Diese Membran wurde dann in einer 1%igen Blocking Solution bei 4°C für 20 Stunden belassen, um so freie Bindungsstellen der Oberfläche zu blockieren.

3.3.5. Antikörperinkubation

Die auf diese Weise hergestellten Nylonmembranen wurden mit einem spezifischen Antikörper (Primärantikörper) in einem für den jeweiligen Primärantikörper geeigneten Verdünnungsverhältnis (siehe Tabelle 4) bei 37°C inkubiert, um die Konzentrationen der unterschiedlichen Proteine zu bestimmen. Mit PBS-Tween-Puffer wurden alle nichtgebundenen Antikörperfragmente ausgewaschen. Darauf erfolgte eine erneute Inkubation der Membranen mit einem zweiten Peroxidase-konjugiertem Antikörper (Verdünnungsverhältnis der Sekundärantikörper siehe Tabelle 4). Die Inkubation wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Die ungebundenen Fragmente wurden wieder mit einem PBS-Tween-Puffer ausgewaschen und eliminiert. Die verbliebenen, an die Proteinbanden gebundenen Fragmente wurden mit Fluoreszenzfarbstoff, dem ECL-Kit (enhanced chemiluminescence) versetzt und die Fluoreszenz auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht und anschließend densitometrisch quantifiziert.

Antikörper	Verdünnung Primärantikörper	Verdünnung Sekundärantikörper
CTGF	1:500	rabbit 1:4000
LOX	1:250	rabbit 1:400
SPARC	1:500	rabbit 1:4000

Tabelle 4: Konzentrationen der Primär- und Sekundärantikörper.

3.4. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht. Die Isolierung der Gesamt-RNA, die Reverse Transkription und die kompetitive PCR wurden gemäß den Standardverfahren durchgeführt.

Folgende Primer wurden benutzt um ein 908 Basenpaar großes cDNA Fragment des menschlichen MR zu vervielfältigen:

mMR forward Primer Sequenz: AGAACCCTCGGTCAACACAG

mMR reverse Primer Sequenz: CAGCTCAAGGCAAATGATGA

Die nachfolgenden Primer wurden benutzt, um ein 335 Basenpaar großes cDNA Fragment des Ratten MR zu amplifizieren:

mMR forward Primer Sequenz: GGATTGGTGCTCAAGGTACAA

mMR reverse Primer Sequenz: GATAGTTGTGTTGCCCTTCCA

Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als externer Standard vervielfältigt. Jeder PCR-Zyklus bestand aus einer Denaturierung bei 95 °C für 45s für den menschlichen MR, den MR der Ratte bzw. GAPDH. Die Annealing Sequenz erfolgte für den menschlichen MR und den MR der Ratte bei einer Temperatur von 53 °C für 30s; für

GAPDH bei einer Temperatur von 63 °C ebenfalls für 30s. Jede Elongationssequenz fand bei 72 °C für 60s statt. Die linearen exponentiellen Phasen für menschliche MR bestanden aus 28 Zyklen, für den MR der Ratte 35 Zyklen und 30 Zyklen für GAPDH. Gleiche Mengen des entsprechenden Ziel-Gens und der GAPDH RT-PCR-Produkte wurden auf 1,5%iges Agarosegel geladen und im Anschluss die Ethidiumbromid-gefärbten DNA-Banden mittels der optischen Dichten quantitativ bestimmt.

3.5. Hydroxyprolin Assay

Der Hydroxyprolin-Gehalt in den Gewebeproben des LA und die Überstände von kultivierten kardiale Fibroblasten wurden durch einen Enzym-Immunoassay, dem Hydroxyprolin Assay-kit von Quickzyme gemäß den Anweisungen des Herstellers bestimmt.

3.6. Immunhistochemische Färbungen

10 µm dicke Kryoschnitten wurden mit 0,1 % Sirius Rot F3BA gefärbt. Die Paraffinschnitte des menschlichen LA wurden nun mit monoklonalen Antikörpern gegen α -sarcomeric, SPARC, Aktin und Vimentin inkubiert. Mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) oder Tetramethyl Rhodamin Isothiocyanat (TRITC) konjugierte Anti-Mouse-IgM, Anti-Mouse-IgG oder Anti-Goat-IgG wurden jeweils als sekundäre Antikörper verwendet. Die Schnitte wurden anschließend mit Dapi (Vectashield) gegengefärbt. Zur negativen Kontrolle für unspezifische Färbungen wurden die Schnitte mit FITC oder TRITC-konjugiertem Anti-Mouse-IgM-, Anti-Mouse-IgG oder Anti-Goat-IgG in parallelen Schritten inkubiert.

3.7. Statistische Analysen

Die Auswertung der Intensität der Banden erfolgte mittels Densitometrie. Die angegebenen Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Für die statistischen Analysen wurden Unpaired Student's t-tests, Mann-Whitney U test und ANOVA angewendet. Dazu wurde die SigmaStat-Software, Version 2.0, verwendet. Die Statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen. Die Prozentangaben in den folgenden Abschnitten bezogen sich jeweils auf diese Kontrollgruppe.

3.8. Material

3.8.1. Medien, Lösungen, Puffer

ADS-Puffer	Aqua dest., 6,78 g/l NaCl, 4,76 g/l HEPES, 8 ml/l Na ₂ HPO ₄ , 1 g/l Glucose, 0,4 g/l KCl, 8 ml/l, MgSO ₄ x7H ₂ O
1 % Blocking Solution	1 ml Blocking Solution in 100 ml PBS-Puffer
DMEM-Nährmedium	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (+ Glukose 4,5 g/l; + L-Glutamin; – Pyruvat), FKS (10 % [v/v]), Penicillin-Streptomycin (20 U/ml Penicillin G; 20 µg/ml), Gentamycinsulfat (0,08 mg/ml)
DMEM-Hungermedium	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (+ Glukose 4,5 g/l; + L-Glutamin; – Pyruvat), FKS (10 % [v/v]), Penicillin-Streptomycin (20 U/ml Penicillin G; 20 µg/ml), Gentamycinsulfat (0,08 mg/ml)
Elektrophoresepuffer	Aqua dest., 144 mg/ml Glycin, 30,3 mg/ml Tris, 10 mg/ml SDS

Enzym-Mix	ADS-Puffer, 0,6 mg/l Pankreatin, 0,5 mg/l Kollagenase
F 10 Medium	F 10 Medium (Ham + Glutamin), Horse Serum (10 % [v/v]), FKS (5 % [v/v]), Penicillin/Streptomycin (1 % [v/v])
Ladepuffer	Aqua dest., 5 ml 50 % Glycerol, 1,25 g 10 % SDS, 2,5 ml 0,625 M Tris, 125 µl/ml 1 M DTT
Lysepuffer	100 mM Tris pH 6,8, 4 % SDS, 20 % Glycerol, 1 µg/ml 100 mM PMSF, 1 µg/ml Leupeptin, 0,72 µg/ml Aprotinin
5 % (1 %) Trockenmilch	5 g Trockenmilchpulver (1 g) in 100 ml PBS-Tween-Puffer
PBS-Puffer	Aqua dest., 80 g/l NaCl, 2 g/l KCl, 14,4 g/l Na ₂ HPO ₄ , 2,4 g/l KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
PBS-Tween-Puffer	Aqua dest., 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 0,24 g/l KH ₂ PO ₄ , 1,44 g/l Na ₂ HPO ₄ , 1 ml/l Tween 20
SSC-Puffer	Aqua dest., 35,06 g/l NaCl, 17,95 g/l Natriumcitrat
Transferpuffer	Aqua dest., 200 ml/l Methanol, 14,5 mg/ml Glycin, 2,9 mg/ml Tris; pH 8,3

3.8.2. Antikörper

Primärantikörper:

α-sarcomeric Actin, Mouse IgM	Sigma-Aldrich Chemie, München
CTGF, Goat IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
GAPDH, Mouse IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
LOX, Rabbit IgG	abcam plc 330 Cambridge Science Park Cambridge CB4 0FL UK
SPARC, Rabbit IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

Tubulin, Rabbit IgG

Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz,
CA, USA

Vimentin, Mouse IgG

Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA

Sekundärantikörper:

Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Konjugat

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Goat Anti-Rabbit IgG-Peroxidase

Sigma-Aldrich Chemie, München

Rabbit Anti-Goat IgG-Peroxidase

Sigma-Aldrich Chemie, München

Rhodamine (FITC)-conjugated Anti-Mouse IgG

Dianova, Hamburg

Rhodamine (FITC)-conjugated Anti-Mouse IgM

Dianova, Hamburg

Rhodamine (TRITC)-conjugated Anti-Goat IgG

Dianova, Hamburg

3.8.3. Primer

mMR forward Primer

Eurofins MWG GmbH, Ebersberg

Sequenz : AGAACCTCGGTCAACACAG

mMR reverse Primer

Eurofins MWG GmbH, Ebersberg

Sequenz : CAGCTCAAGGCAAATGATGA

mMR forward Primer

Eurofins MWG GmbH, Ebersberg

Sequenz : GGATTGGTGCTCAAGGTACAA

mMR reverse Primer

Eurofins MWG GmbH, Ebersberg

Sequenz : GATAGTTGTGTTGCCCTTCCA

3.8.4. Verbrauchsmaterial

Falcon Cell Strainer (70 µm)	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
High Performance autoradiography film	GE Healthcare, München
Extra Thick Blot paper	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
PP-Test-tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner-bio.one, Frickenhausen
Zellkulturschale 100 mm	TPP, Trasadingen, Schweiz

3.8.5. Chemikalien, sonstige Reagenzien

Acrylamid Electrophoresis Purity Reagent 30%	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Albumin bovin Fraction V (BSA) pH 7,0	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Angiotensin II	Sigma-Aldrich Chemie, München
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Blocking Solution	Roche, Mannheim
BR-4628	Bayer Schering Pharma AG, Wuppertal
Connective Tissue Growth Factor (CTGF)	Biozol, Eching
Fluorescent Mounting Medium	Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA
Dublecco's modifiziertes Eagle Medium	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)	VWR International, Darmstadt
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie, München
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, München
Ethanol	Merck, Darmstadt
F 10-Medium	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FKS)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Gentamycinsulfat	Merck, Darmstadt
Glukose	Sigma-Aldrich Chemie, München
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie, München

Horse Serum	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Hydroxyprolin Assay Kit	QuickZyme Biosciences, Leiden, NL
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenkarbonat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt
Trockenmilchpulver	Scufin, Zeven
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Neonatal Calf Serum (NCS)	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie, München
2-Propanol	VWR International, Darmstadt
Futtermittel	ssniff, Soest, Germany
N,N,N`N`-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Sirius Red F3BA	Polysciences Europe GmbH Eppelheim
Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris)	VWR International, Darmstadt
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie, München
Trypsin-EDTA	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Tyramide Reagent Pack	PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, USA
Vectashield Mounting Medium with Dapi	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Wasser, vollentsalzt und destilliert (Aqua. dest.)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Xylol	Merck, Darmstadt

3.8.6. Geräte

Autoklaviergerät Tuttbauer 3850 EL	Tuttbauer Europe B.V., Breda, Niederlande
Eismaschine Scotsman Frimont MF 22	Scotsman Frimont, Milano, Italien
ELISA Reader Model 550	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Entwicklungsautomat Curix 60	Agfa, Mortsel, Belgien
Magnetrührer Typ RCT	IKA Labortechnik, Staufen i. Br.
Metallblockthermostat HTMR-133	HLC Biotech, Bovenden, Deutschland
<u>Mikroskope:</u>	
Nikon Eclipse E600	Nikon GmbH, Düsseldorf
Olympus CK 2 Inverted phase contrast	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Mini-Protean 3 Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mini-Protean Gelgießstand	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
pH-Meter 526	WTW GmbH, Weilheim
Spectrophotometer DU 730	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Pipetterhilfe Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Power Pac 200 Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Px2 Thermal Cycler	Thermo Electron Corporation Karlsruhe
Röntgenkassette 24 x 30 cm	Dr. Goos-Suprema, Heidelberg
Scanner CanoScan 5000F	Canon Deutschland, Krefeld
Schüttel- und Mischgerät Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach
Schüttelwasserbad Typ 1086	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwendel
Stickstoffbehälter GT 140	Air Liquide, Düsseldorf
Stickstofftank Apollo 50	Messer Griesheim, Krefeld
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Vortexer VV3	VWR International, Darmstadt

Waagen:

VIC-Series 0.01g Precision Balances	Acculab UK, Edgewood, NY
ALC-Series 0.0001g Analytical Balances	Acculab UK, Edgewood, NY
Überkopfschüttler REAX 2	Heidolph Instruments, Schwabach
Zählkammer BLAUBRAND, nach Neubauer	Blaubrand, Wertheim

Zellkulturgeräte:

Heracell 150 Cell Culture Incubator	Heraeus Holding, Hanau
Sicherheitswerkbank Heraeus HS 12	Heraeus Holding, Hanau
Sicherheitswerkbank Heraeus KS 12	Heraeus Holding, Hanau

Zentrifugen:

Biofuge pico	Heraeus Holding, Hanau
Megafuge 1,0	Heraeus Holding, Hanau

3.8.7. Software

LabWorks 4.6	UVP, Upland, CA, USA
Lucia G, Version 4.81	Laboratory Imaging, Praha, CZ
Sigma Stat-Software, Version 2.0	Systat Software GmbH, Erkrath
XnView	Pierre-Emmanuel Gougelet, Reims, Frankreich

4. Ergebnisse

4.1. Humane Proben des linken Vorhofes

Die humanen Gewebeproben des linken Vorhofes wurden hinsichtlich ihrer Expression von Hydroxyprolin-, SPARC-, sowie des Mineralocorticoid-Rezeptors (MR) untersucht.

4.1.1 Hydroxyprolingehalt in humanen Proben des linken Vorhofes bei Vorhofflimmern

Hydroxyprolin ist eine α -Aminosäure, die unter anderem für die Ausbildung der Tertiärstruktur des Kollagens verantwortlich ist. Die quantitative Analyse des Hydroxyprolingehaltes dient als Surrogat zur Bestimmung der Gesamtfibrose. Hierbei zeigte sich ein 4-fach erhöhter Gewebegehalt von Hydroxyprolin bei Patienten mit Vorhofflimmern gegenüber Patienten mit Sinusrhythmus ($425 \% \pm 103 \%$; ABB. 1.)

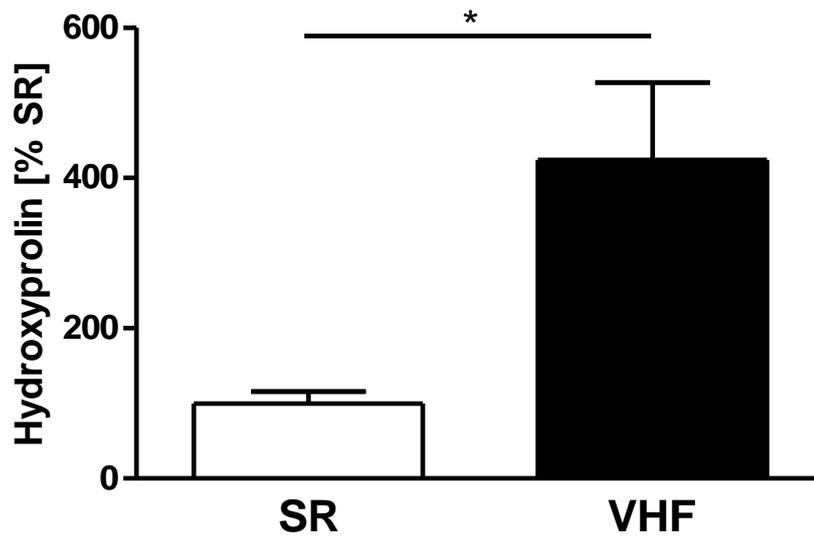


Abbildung 1: Linke Vorhöfe von Patienten mit Vorhofflimmern (VHF) wiesen im Vergleich zu Patienten im Sinusrhythmus (SR) eine erhöhte Konzentration von Hydroxyprolin auf.

n = 4 (SR); n = 6 (VHF); *p < 0,05

4.1.2. Expression des Mineralocorticoid-Rezeptors in menschlichen Vorhöfen

Gewebeproben des linken Vorhofes wurden hinsichtlich der Expression des MR-Rezeptors mittels Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) untersucht.

Die MR-mRNA Konzentration bei Patienten mit Vorhofflimmern entsprach der Konzentration bei Patienten mit Sinusrhythmus ($107 \% \pm 13 \%$; ABB. 2).

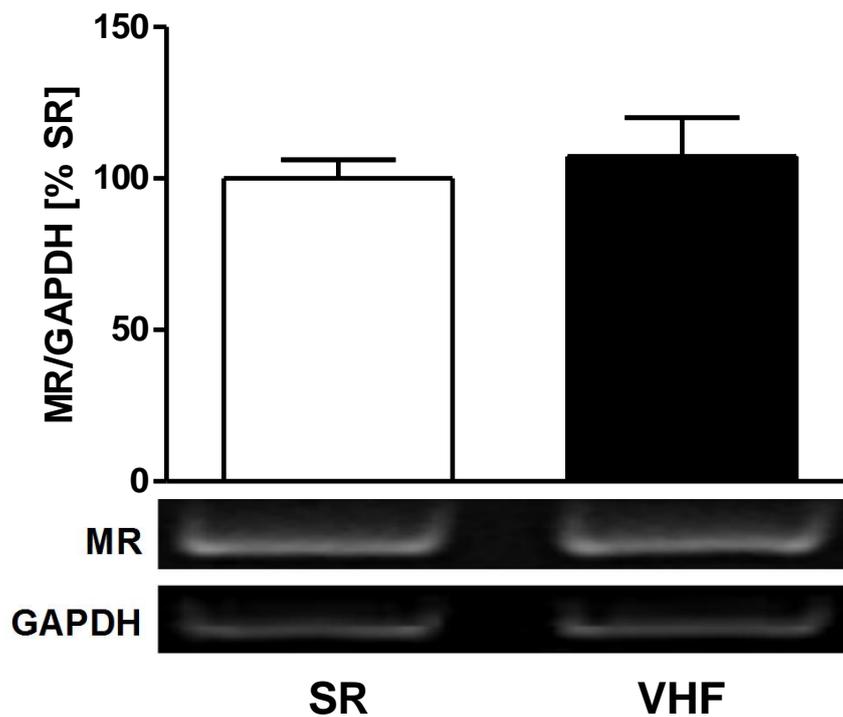


Abbildung 2: Linke Vorhöfe von Patienten mit SR oder VHF zeigten keinen Unterschied in der Expression der MR-mRNA.

Humanen Proben des linken Vorhofes wurden hinsichtlich der Expression der MR-mRNA mittels RT-PCR untersucht. Die MR-mRNA Expression zwischen der Gruppe mit SR und mit VHF war gleich.

n = 8; *p < 0,05

4.1.3. Proteinexpression von SPARC in humanen Proben des linken Vorhofes bei Vorhofflimmern

Humane Proben des linken Vorhofes wurden hinsichtlich der Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC)-Konzentration untersucht. SPARC ist ein aus 286 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 35-45 kDa. SPARC gehört zu den matrizellulären Proteinen, einer Gruppe von Proteinen ohne direkte strukturelle Funktion, die jedoch durch die Bindung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix beeinflussen. Western Blot Analysen zeigten in den humanen Proben des linken Vorhofes bei Patienten mit Vorhofflimmern eine erhöhte SPARC Expression ($165 \% \pm 23 \%$; ABB. 2). Da es sich bei den Gewebeproben um Lysate aus allen im menschlichen Herzen vorkommenden Zelltypen handelte, wurde mittels immunhistochemischer Färbungen untersucht, in welchen Zellen des Vorhofgewebes SPARC exprimiert wird. Dazu wurden immunhistochemische Färbungen der Gewebeschnitte durchgeführt. Es erfolgte eine Doppelfärbung sowohl gegen SPARC, als auch gegen den α -skeletalen und α -kardialen Muskelaktin charakteristischen Indikator α -sarcomeric Actin durchgeführt. Eine weitere Doppelfärbung wurde auch gegen SPARC und Vimentin, einem Intermediärfilamentprotein im Zytoplasma von Zellen mesenchymalen Ursprungs angefertigt. Vimentin diente hierbei als ein Marker für Bindegewebszellen. In immunhistochemischen Färbungen zeigte sich in den Gewebeschnitten der Patienten mit SR und VHF qualitativ eine SPARC-Expression sowohl in den Kardiomyozyten, den Fibroblasten, als auch in der extrazellulären Matrix (ABB. 4).

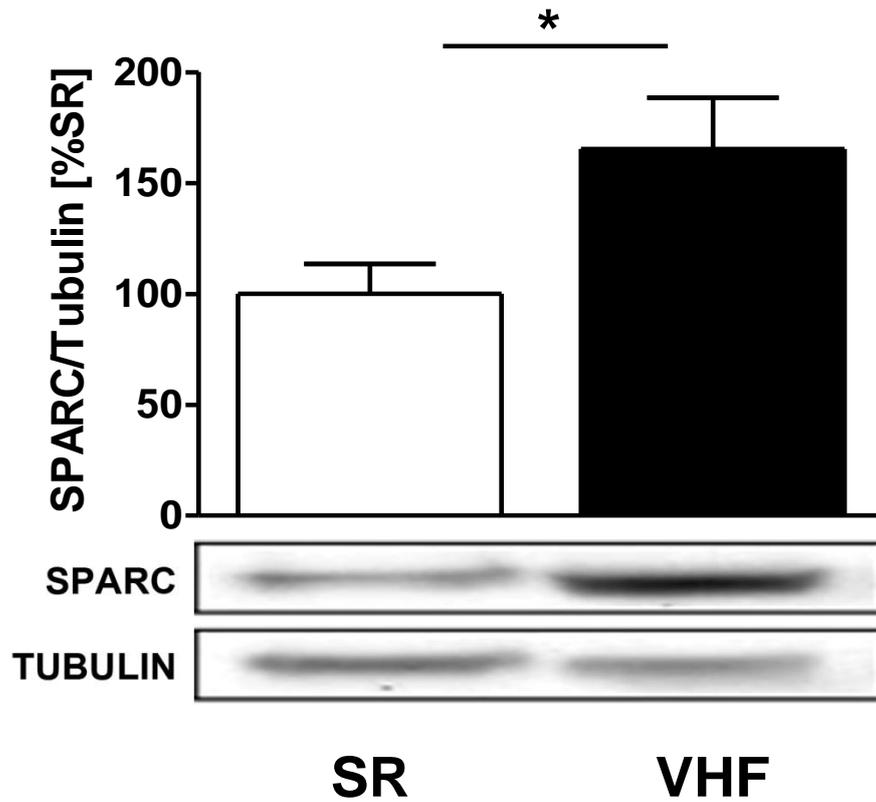


Abbildung 3: Patienten mit VHF exprimierten mehr secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) im linken Vorhof.

Die Western-Blot Analyse zeigt eine erhöhte Proteinexpression von SPARC in der Gruppe der Patienten mit VHF gegenüber der Gruppe mit SR.

n = 5 (SR); n = 7 (VHF); *p < 0,05

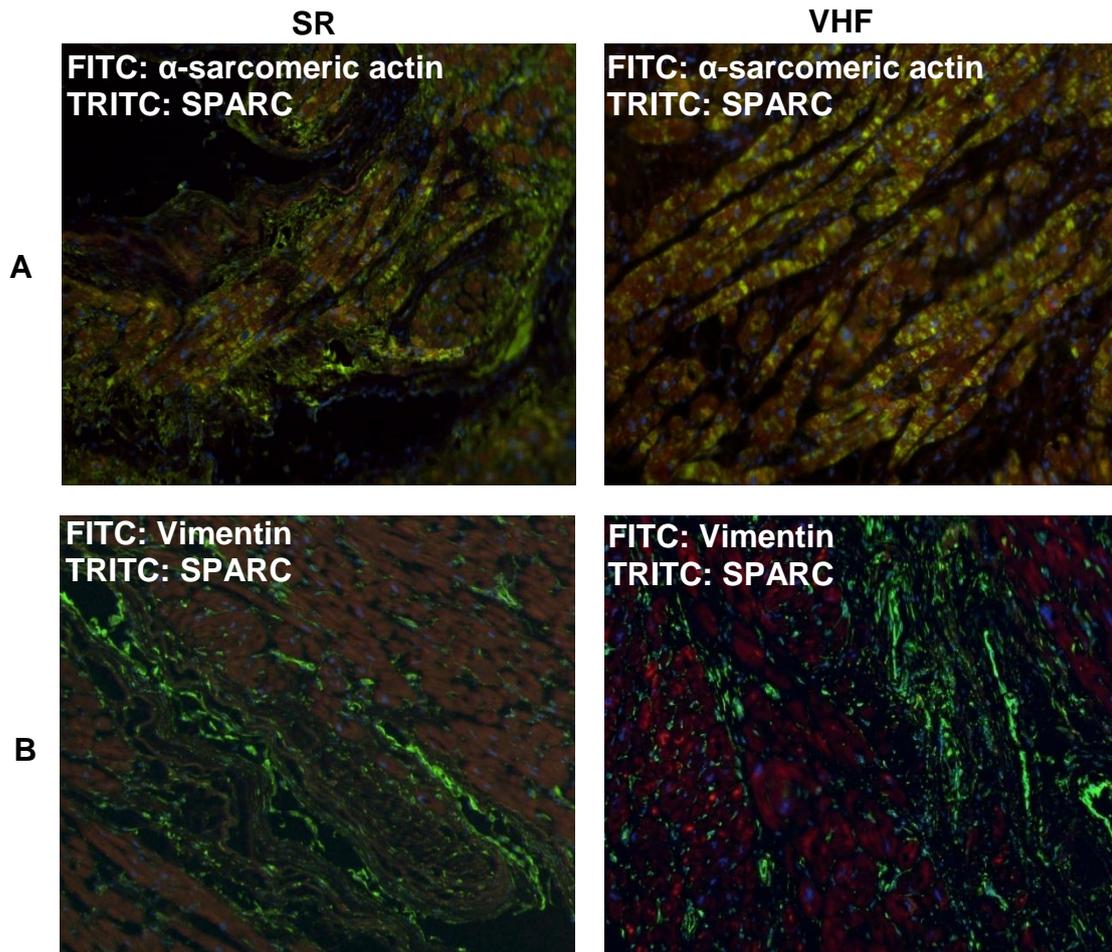


Abbildung 4: SPARC wird in Kardiomyozyten, sowie im Bindegewebe von Menschen mit SR und VHF exprimiert.

Immunfluoreszenz-Bilder von SPARC (TRITC; rot), α -sarcomeric Actin (FITC; in Reihe A grün) und Vimentin (FITC; in Reihe B grün) aus humanen linksatrialen Appendices (10-fache Vergrößerung). SPARC ist in Kardiomyozyten, wie auch in Bindegewebszellen nachweisbar.

4.2. Profibrotische Signaltransduktion in kultivierten kardialen Fibroblasten

Kultivierte kardiale Fibroblasten wurden mit Aldosteron bzw. TGF- β und einem Mineralocorticoid-Rezeptor Antagonisten Spironolacton oder BR-4628 behandelt. BR-4628 ist ein Mineralocorticoid-Rezeptor-Antagonist, welcher von seiner chemischen Struktur den Kalziumantagonisten der Dihydropyridinklasse ähnelt.

BR-4628 und Spironolacton zeigen ähnliche Affinität am MR, jedoch besitzt BR-4628 eine höhere Spezifität zum MR verglichen mit anderen Steroidhormonrezeptoren im Vergleich zu Spironolacton (Fagart et al., 2010).

4.2.1. Hydroxyprolin Expression in kardialen Fibroblasten

Kardiale Fibroblasten wurden mit Aldosteron behandelt. Die Hydroxyprolin-Expression war im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe ($244 \% \pm 46 \%$, ABB. 5) erhöht. Eine vorausgehende Inkubation mit BR-4628 oder mit Spironolacton verhinderte die durch Aldosteron induzierte Hydroxyprolin-Überexpression komplett (BR-4628: $123 \% \pm 16\%$, bzw. Spirono: $125 \% \pm 12 \%$; ABB. 5).

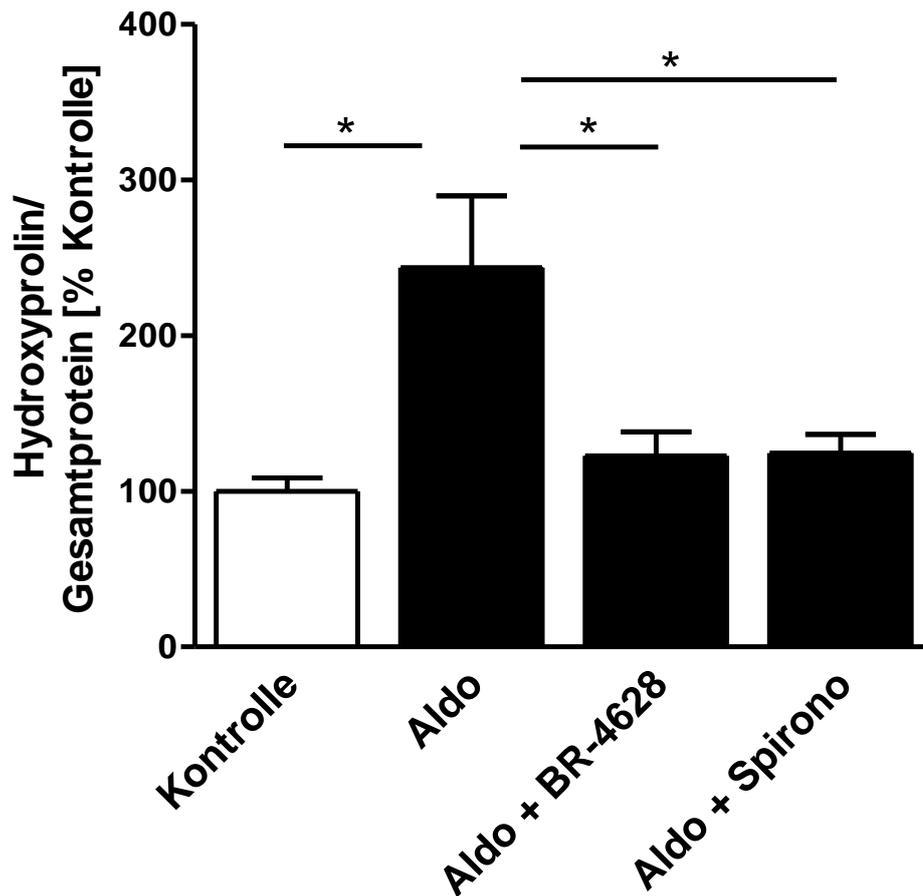


Abbildung 5: Mit Aldosteron behandelte kardiale Fibroblasten wiesen eine erhöhte Hydroxyprolin Expression auf. Eine Präinkubation mit BR-4628 bzw. Spironolacton reduzierte die Hydroxyprolin Expression.

Kardiale Fibroblasten wurden ausschließlich mit Aldosteron [10 nM], mit Aldosteron [10 nM] in Kombination mit BR-4628 [500 nM] oder Aldosteron [10 nM] in Kombination mit Spironolacton [500 nM] behandelt. Aldosteron behandelte Zellen zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine erhöhte Hydroxyprolin Expression. Bei zusätzlicher BR-4628 oder Spironolacton Behandlung kam es im Vergleich zur Aldosteron Gruppe zu einer Reduktion der Hydroxyprolin Protein Expression.

n = 16 (Kontrolle); n = 9 (Aldo); n = 7 (Aldo + BR-4628); n = 5 (Aldo+ Spirono); *p < 0,05

4.2.2. Expression des Mineralocorticoid-Rezeptors in kardialen Fibroblasten

Kardiale Fibroblasten wurden mit TGF- β oder mit Aldosteron inkubiert und anschließend die Expression der Mineralocorticoid-Rezeptor messenger-RNA (MR-mRNA) bestimmt. Sowohl die Behandlung von kardialen Fibroblasten mit Aldosteron als auch mit TGF- β zeigte keine Änderung der MR-mRNA-Expression ($125 \% \pm 7 \%$, p=ns und $135 \% \pm 15 \%$, p=ns ABB. 6).

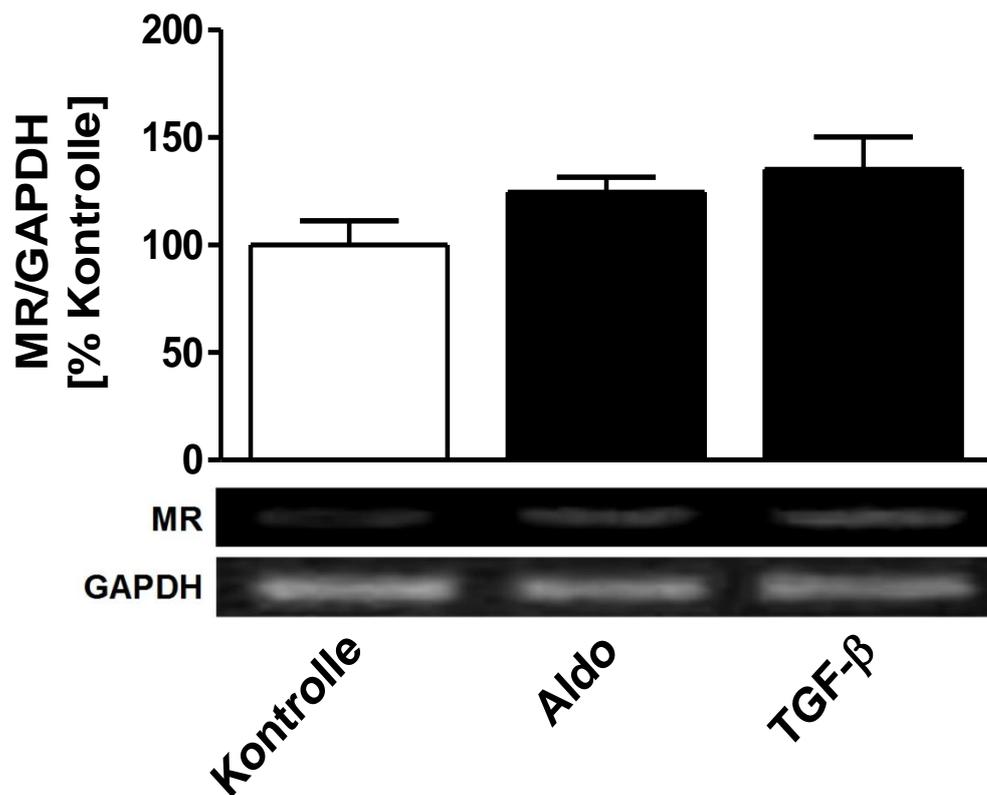


Abbildung 6: Aldosteron und TGF-β führten zu keiner Änderung der Expression der MR-mRNA in kardialen Fibroblasten.

Kardiale Rattenfibroblasten wurden mit Aldosteron [10 nM] oder mit TGF-β [5 ng/ml] behandelt. In der Expression der MR-mRNA (RT-PCR) zeigten sich sowohl in der Aldosteron- als auch TGF-β Gruppe keine Unterschiede zur unbehandelten Kontrollgruppe.

n = 7 (Kontrolle); n = 4 (Aldo); n = 4 (TGF-β); *p < 0,05

4.2.3. Proteinexpression von CTGF in Abhängigkeit von Aldosteron und BR-4628

Die ausschließlich mit Aldosteron behandelten Zellen zeigten eine um das zweifach erhöhte Expression von CTGF ($207 \% \pm 34 \%$; ABB. 7) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Eine vorausgehende Inkubation mit BR-4628 verhinderte vollständig die Erhöhung der durch das Aldosteron induzierten CTGF-Überexpression ($95 \% \pm 12 \%$, ABB. 7).

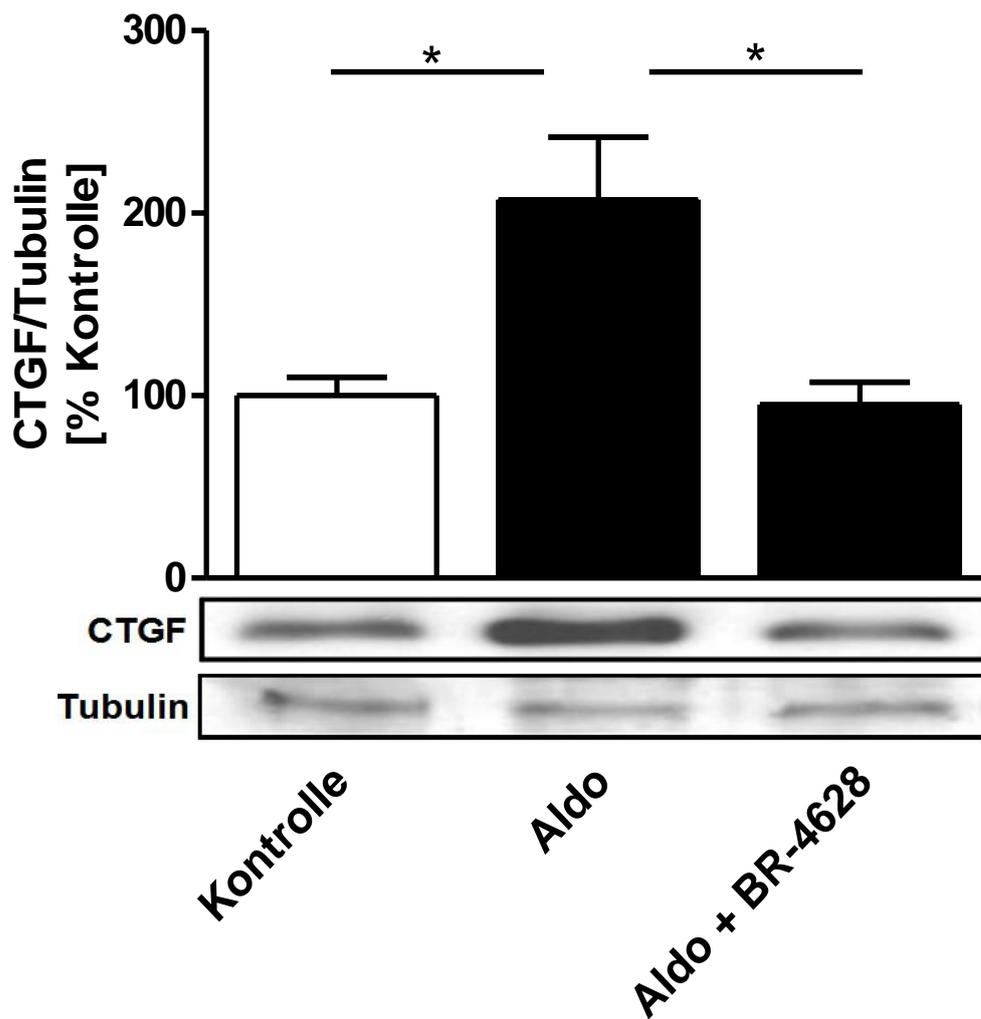


Abbildung 7: Mit Aldosteron behandelten kardialen Fibroblasten wiesen eine erhöhte CTGF-Expression auf. Die Präinkubation mit BR-4628 reduzierte die CTGF-Expression.

Kardiale Fibroblasten wurden mit Aldosteron [10 nM] oder mit Aldosteron [10 nM] in Kombination mit BR-4628 [500 nM] behandelt. Nach Behandlung der Zellen mit Aldosteron war eine Erhöhung der CTGF Protein Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisbar. Eine zusätzliche BR-4628 Behandlung führte zu einer Reduktion der CTGF Protein Expression im Vergleich zu den Zellen, die ausschließlich mit Aldosteron behandelt wurden.

n = 7 (Kontrolle); n = 4 (Aldo); n = 4 (Aldo + BR-4628); *p < 0,05

4.2.4. Proteinexpression von CTGF in Abhängigkeit von Aldosteron und Spironolacton

Kardiale Fibroblasten wurden mit Aldosteron oder mit Aldosteron in Kombination mit Spironolacton inkubiert. Daraufhin wurde eine quantitative Proteinanalyse des Fibrose induzierenden Wachstumsfaktors Connective Tissue Growth Factor (CTGF) mittels Western Blot durchgeführt.

Die ausschließlich mit Aldosteron behandelten Zellen zeigten hierbei eine fast um das zweifach erhöhte Expression von CTGF ($184 \% \pm 31 \%$; ABB. 8). Die Gruppe, die mit Aldosteron und gleichzeitig Spironolacton behandelt wurde, zeigte hingegen eine im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen eine unveränderte CTGF Expression ($99 \% \pm 17 \%$; ABB. 8).

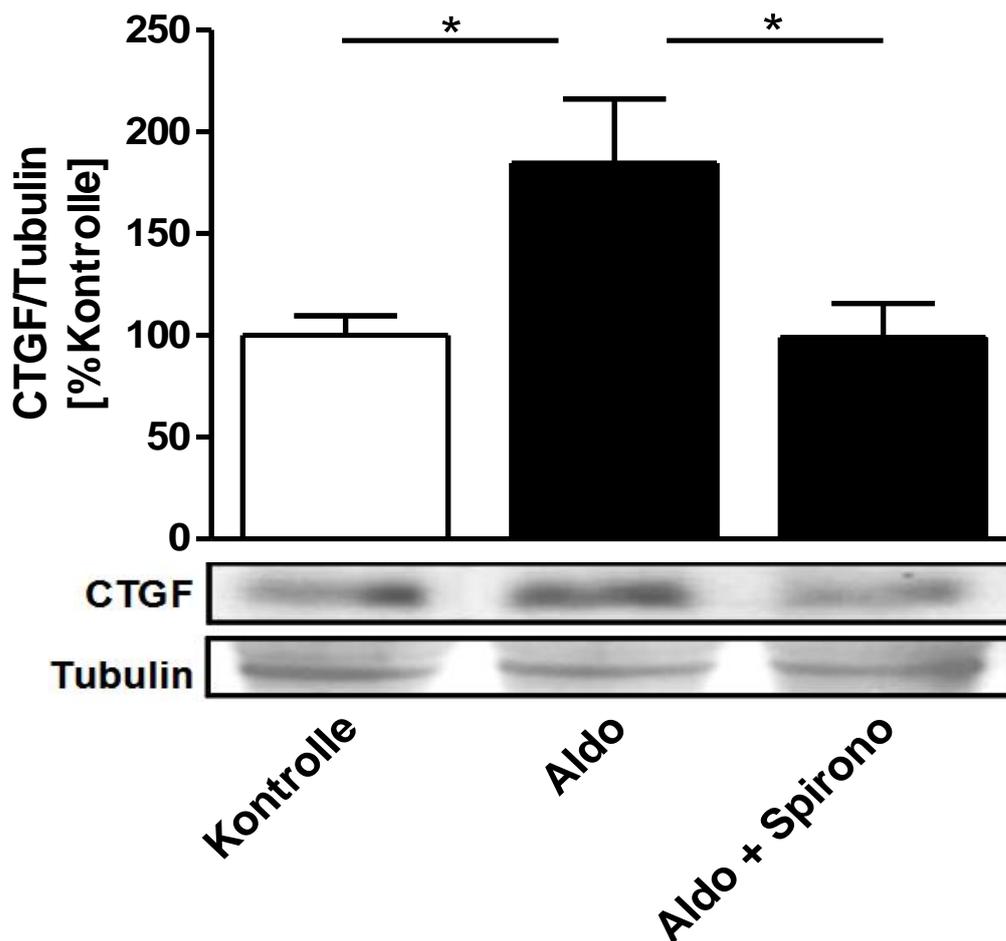


Abbildung 8: Aldosteron führte in kardialen Fibroblasten zu einer CTGF-Überexpression, welche durch Vorbehandlung mit Spironolacton vollständig verhindert wurde.

Kardiale Fibroblasten wurden mit Aldosteron [10 nM] oder mit Aldosteron [10 nM] in Kombination mit Spironolacton [500 nM] behandelt. Es zeigte sich eine Erhöhung der CTGF Protein Expression bei den durch Aldosteron behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei den mit Aldosteron und zusätzlicher Spironolacton behandelten Zellen war eine geringere CTGF Proteinexpression nachweisbar als in der Gruppe, die ausschließlich mit Aldosteron behandelt worden war; sie lag auf dem Niveau der Kontrolle.

n = 8 (Kontrolle); n = 4 (Aldo); n = 4 (Aldo+ Spirono); *p< 0,05

4.2.5. Proteinexpression von CTGF in Abhängigkeit von TGF- β und BR-4628

In dieser Versuchsreihe wurden kardiale Fibroblasten mit dem Fibrose induzierenden Wachstumsfaktor Transforming Growth Factor- β (TGF- β) oder mit TGF- β in Kombination mit BR-4628 behandelt. Die Behandlung von kardialen Fibroblasten mit TGF- β führte zu einer Erhöhung der CTGF-Proteinexpression gegenüber der Kontrolle (180 % \pm 13 %; ABB. 9). Durch eine zusätzliche Präinkubation mit BR-4628 war eine effektive Hemmung der CTGF Expression möglich (86 % \pm 9 %; ABB. 9).

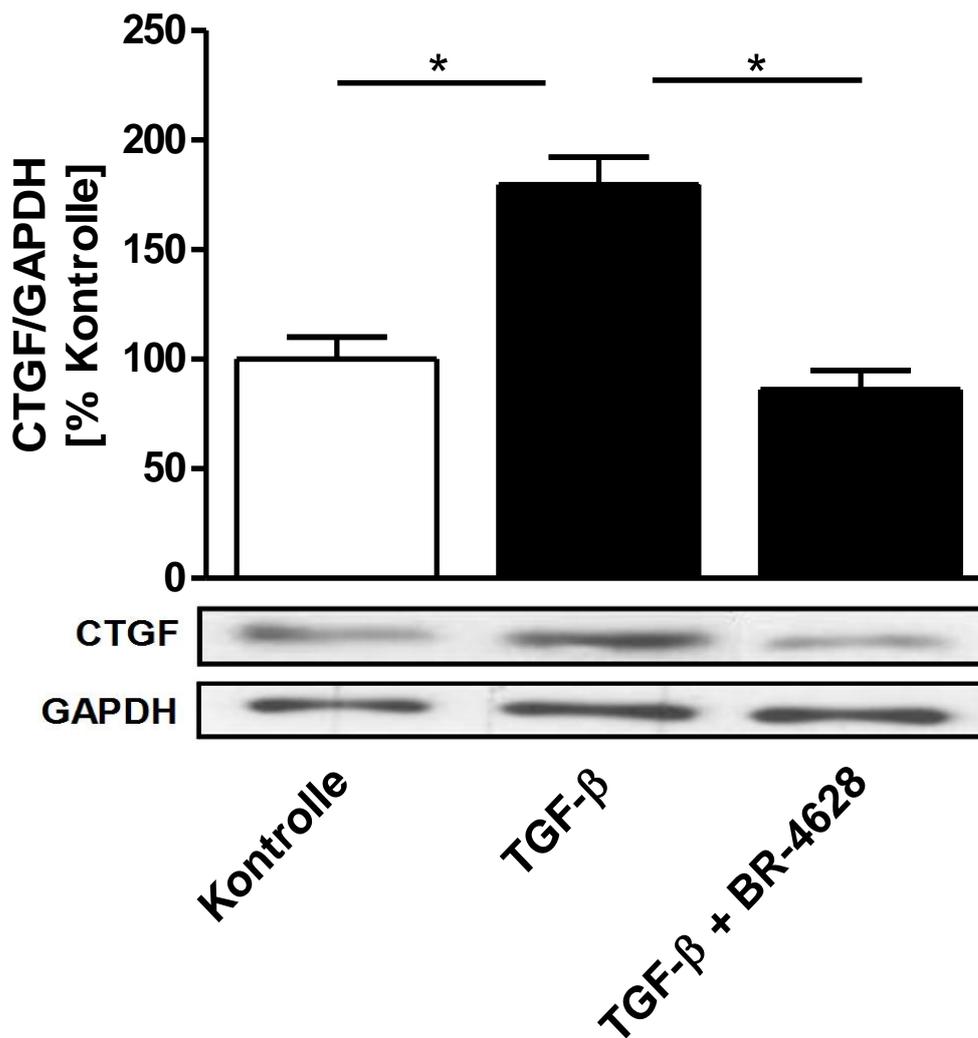


Abbildung 9: Mit TGF-β behandelte kardiale Fibroblasten wiesen eine erhöhte CTGF-Expression auf. Die Vorbehandlung mit BR-4628 reduzierte die CTGF-Expression.

Kardiale Fibroblasten wurden mit TGF-β [5 ng/ml] und mit TGF-β [5 ng/ml] in Kombination mit BR-4628 [500 nM] behandelt. Die durch TGF-β behandelten Zellen zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine erhöhte CTGF Protein Expression. Durch eine zusätzliche Vorbehandlung mit BR-4628 konnte eine CTGF-Überexpression vollständig verhindert.

n = 7 (Kontrolle); n = 4 (TGF-β); n = 4 (Aldo + TGF-β); *p < 0,05

4.2.6. Proteinexpression von LOX in Abhängigkeit von Aldosteron und BR-4628

In dieser Versuchsreihe wurden die kardialen Fibroblasten mit Aldosteron oder mit Aldosteron in Kombination mit BR-4628 inkubiert. Danach erfolgte eine Bestimmung der profibrotischen Lysyl Oxidase (LOX) Expression. Die mit Aldosteron behandelten Zellen zeigten hierbei eine fast dreifach erhöhte Proteinexpression von LOX ($271 \% \pm 38 \%$; ABB. 10). BR-4628 reduzierte die durch Aldosteron induzierte LOX-Überexpression ($171 \% \pm 25 \%$; ABB. 10).

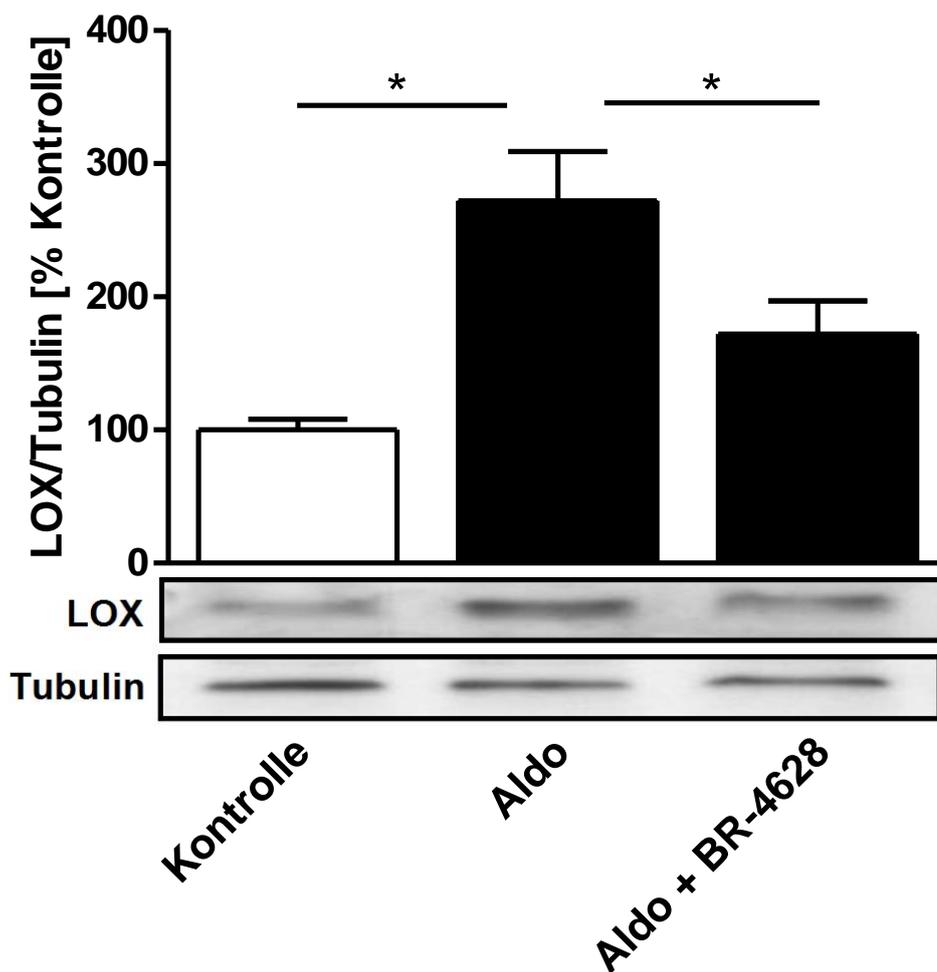


Abbildung 10: Mit Aldosteron behandelte kardiale Fibroblasten wiesen eine erhöhte Lysyl Oxidase (LOX) Expression auf, die Präinkubation mit BR-4628 reduzierte diese durch Aldosteron verursachte Steigerung der LOX-Expression.

Kardiale Fibroblasten wurden mit Aldosteron [10 nM] oder mit Aldosteron [10 nM] in Kombination mit BR-4628 [500 nM] behandelt. Durch Aldosteron stimulierte Zellen zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine gesteigerte LOX-Proteinexpression. Eine zusätzliche Präinkubation mit BR-4628 führte zu einer Reduktion der gesteigerten LOX-Proteinexpression der Aldosteron behandelten Zellen.

n = 9 (Kontrolle); n = 5 (Aldo); n = 5 (Aldo + BR-4628); *p < 0,05

4.2.7. Proteinexpression von LOX in Abhängigkeit von Aldosteron und Spironolacton

In dieser Versuchsreihe wurden die kardialen Fibroblasten mit Aldosteron oder Aldosteron in Kombination mit Spironolacton inkubiert. Die durch alleinige Inkubation mit Aldosteron behandelten Zellen zeigten hierbei eine 2,5-fache erhöhte Proteinexpression von LOX (256 % \pm 44 %; ABB. 11).

Die Gruppe, die mit Aldosteron und gleichzeitig Spironolacton vorbehandelt wurde, zeigte eine Reduzierung der LOX Expression im Vergleich zur alleinigen Aldosteronbehandlung (141 % \pm 17 %; ABB. 11).

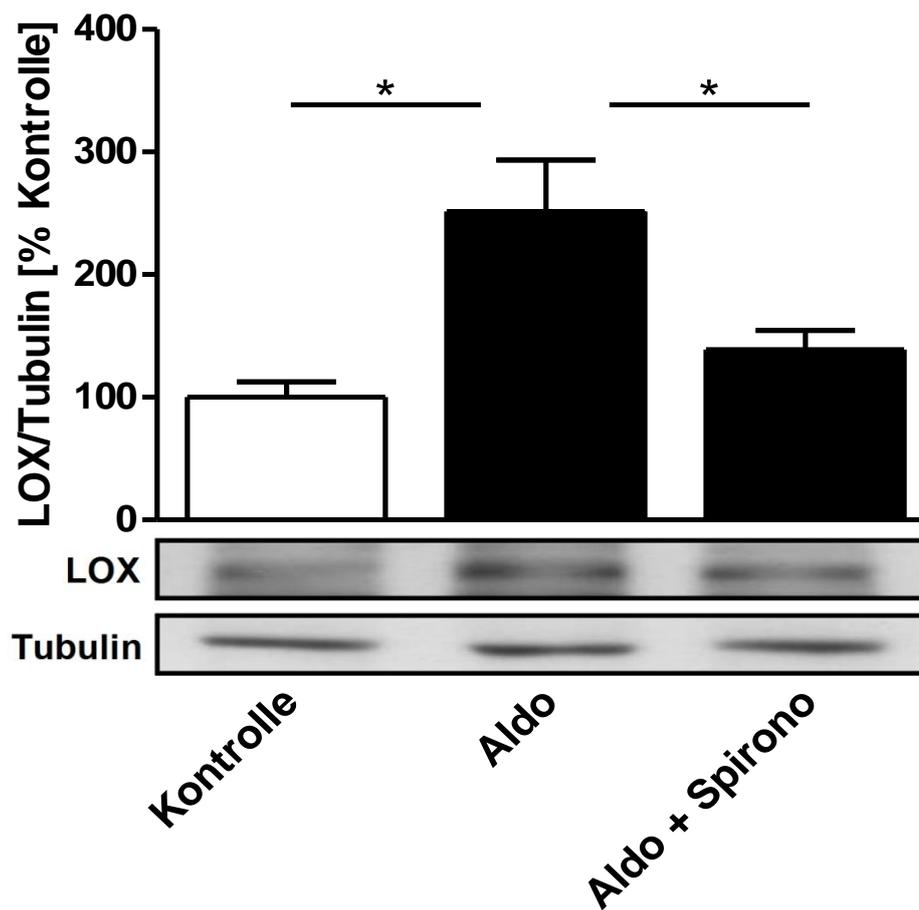


Abbildung 11: Aldosteron führte zu einer vermehrten Lysyl Oxidase (LOX) Expression. Die Präinkubation mit Spironolacton reduzierte diesen Effekt.

Kardiale Fibroblasten wurden mit Aldosteron [10 nM] oder Aldosteron [10 nM] und Spironolacton [500 nM] behandelt. Die Abbildung zeigt eine nach Aldosteronstimulation erhöhte LOX-Proteinexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die LOX-Proteinexpression, der mit Aldosteron behandelten Zellen wurde durch eine zusätzliche Präinkubation mit Spironolacton reduziert.

n = 6 (Kontrolle); n = 3 (Aldo); n = 3 (Aldo + BR-4628); *p < 0,05

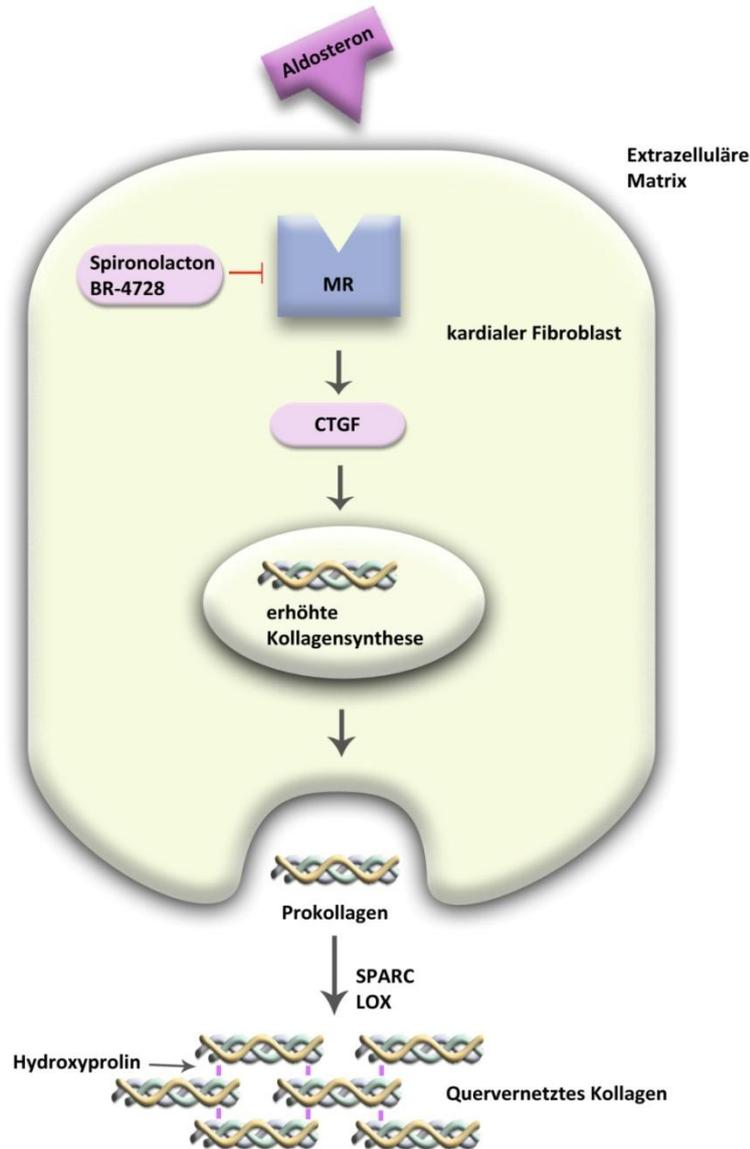


Abbildung 12: Übersicht der untersuchten Signaltransduktionswege bei atrialer Fibrose.

Aldosteron führt zu einer MR vermittelten, gesteigerten CTGF Expression und einer daraus resultierenden erhöhten Kollagen-Synthese. BR-4628 und Spironolacton hemmen den Mineralocorticoid-Rezeptor und bewirken eine Senkung der CTGF Konzentration. SPARC und LOX sind an der Quervernetzung von Prokollagen in der extrazellulären Matrix beteiligt. Hydroxyprolin stabilisiert die Triple Helix des Kollagens und ist ein quantitatives Maß für den Gesamtkollagengehalt.

5. Diskussion

Da bisher nur wenig über die Signaltransduktion bei Vorhofflimmern bekannt ist wurde in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung des Mineralocorticoid-Rezeptors (MR) bei Vorhofflimmern näher charakterisiert. Insbesondere die Regulation und Identifizierung profibrotischer Signaltransduktionswege, die an der Entstehung atrialer Fibrose bei Vorhofflimmern beteiligt sind, wurden eingehend untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen eine durch Aldosteron verursachte und über den MR vermittelte atriale Fibrose. Patienten mit Vorhofflimmern hatten in den untersuchten Gewebeproben eine gesteigerte Fibrose im Vergleich zu Patienten mit Sinusrhythmus. Des Weiteren konnte bei den Patienten mit Vorhofflimmern ein erhöhter Gehalt an Hydroxyprolin und Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) nachgewiesen werden.

Auch in kultivierten kardialen Fibroblasten lag nach erfolgter Aldosteronvorbehandlung eine erhöhte Expression von Hydroxyprolin vor. Eine Präinkubation der kultivierten Fibroblasten mit Aldosteron erhöhte ebenso die Expression von Connective Tissue Growth Factor (CTGF), wie auch die Expression der profibrotischen Lysyl Oxidase (LOX). Durch eine zusätzliche Vorbehandlung mit den MR-Antagonisten Spironolacton oder dem neuartigen BR-4628 konnten diese Aldosteron-Effekte verhindert werden.

Bei Patienten mit Herzinsuffizienz und linksventrikulärer Dysfunktion nach Myokardinfarkt ließ sich in klinischen Studien eine geringere Mortalität nachweisen, wenn deren medikamentöse Therapie zusätzlich einen MR-Antagonisten enthielt (Odermatt and Atanasov, 2009; Pitt et al., 2003; Pitt et al., 1999; Zannad et al., 2011). Das Mineralocorticoid Aldosteron hat maßgeblichen Anteil an der Entstehung kardialer fibrotischer Umbauprozesse, sowie an der Entstehung von Vorhofflimmern (Reil et al., 2012). Dementsprechend konnte die Inzidenz von Vorhofflimmern bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz durch die Gabe eines MR-Antagonisten reduziert werden (Swedberg et al., 2012).

Die mit der Entwicklung von Vorhofflimmern assoziierten Umbauprozesse, die mit einem charakteristischen Anstieg der Fibrose einhergehen, liegen im linken Vorhof. Aus diesem

Grunde wurden Proben von Patienten mit permanentem Vorhofflimmern im Vergleich zu Kontrollpersonen im Sinusrhythmus hinsichtlich des atrialen Durchmessers präoperativ gepaart (Adam et al., 2007; Casacang-Verzosa et al., 2008; Todd et al., 2003).

Hydroxyprolin stabilisiert die Tripelhelix innerhalb von Kollagenmolekülen und ist somit ein kollagensubtypunabhängiger Surrogat-Parameter der atrialen Fibrose (Gorres and Raines, 2010). Patienten mit Vorhofflimmern wiesen im Vergleich zu Patienten mit Sinusrhythmus eine 4-fach erhöhte Hydroxyprolin-Konzentrationen im LA auf. Als Zeichen einer gesteigerten Fibrose bei Vorhofflimmern konnte der gemessene Anstieg der Hydroxyprolin-Konzentration im linken Vorhof die bestehende Datenlage untermauern (He et al., 2011).

Hinsichtlich der Mineralocorticoid-Rezeptor messenger-RNA (MR-mRNA) Expression unterschieden sich die beiden Gruppen der Patienten mit und ohne Vorhofflimmern nicht. Im Zellkulturmodell mit kardialen Rattenfibroblasten ließ sich durch eine vorhergehende Stimulation mit Aldosteron ebenfalls keine vermehrte Expression des MR-Rezeptors feststellen. Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass profibrotische Umbauprozesse im Myokard unabhängig von der MR Dichte der Fibroblasten sind. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit konnte in zwei anderen Studien eine erhöhte Expression von MR im rechten und linken Vorhof von Patienten mit Vorhofflimmern festgestellt werden. (De-An et al., 2010; Tsai et al., 2010). In beiden Arbeiten waren jedoch die Vorhöfe von Patienten mit Vorhofflimmern größer als die Vorhöfe von Patienten mit Sinusrhythmus. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Vorhöfe von Patienten mit und ohne Vorhofflimmern hinsichtlich ihres atrialen Durchmessers gepaart. Die pathophysiologischen Prozesse, die mit einer Vorhofvergrößerung einhergehen führen zu einem strukturellen Remodeling welches mit einem reduzierten kardiovaskulären Outcome assoziiert ist (Abhayaratna et al., 2006). Es bleibt zu diskutieren ob eine Änderung der MR-mRNA Expression Zeichen unterschiedlicher Stadien eines atrialen Remodelings darstellen. Eine solche Abhängigkeit von der Größe der Vorhöfe konnte in einer anderen Studie für die Expression des profibrotischen Proteins Endothelin-1 gezeigt werden (Mayyas et al., 2010).

Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) gehört zu den matrizellulären Proteinen, die durch die Bindung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix regulieren (Dobaczewski et al., 2010; McCurdy et al., 2010). Die

SPARC-Expression im Vorhof war bei Patienten mit Vorhofflimmern gegenüber denen mit Sinusrhythmus erhöht. Da es in vorausgegangenen Studien widersprüchliche Angaben gibt, in welchen Zellen SPARC exprimiert wird (Chen et al., 2004; Harris et al., 2011), wurden immunhistochemische Färbungen an Proben des linken Vorhofes durchgeführt. Sowohl in Fibroblasten, wie auch in Myozyten war eine Expression von SPARC erkennbar. Daher ist eine Beteiligung dieser beiden Zellarten an der SPARC vermittelten Regulation der extrazellulären Matrix anzunehmen.

Im Zellkulturmodell mit kultivierten kardialen Fibroblasten wurde die Hydroxyprolinsekretion als Maß für den Gesamtkollagengehalt untersucht (Gorres and Raines, 2010). In den kardialen Fibroblasten war nach vorausgegangener Inkubation mit Aldosteron die Hydroxyprolinkonzentration und somit die Gesamtkollagenexpression erhöht.

Für den profibrotischen Mediator CTGF konnte eine entscheidende Rolle im strukturellen Remodeling aufgezeigt werden (Adam et al., 2010). CTGF ist in der Lage die Proliferation von Fibroblasten und die extrazelluläre Matrix-Produktion im Bindegewebe zu stimulieren (Matsui and Sadoshima, 2004; Moussad and Brigstock, 2000). Eine Inkubation mit Aldosteron vermag eine kardiale Fibrose und Vorhofflimmern zu induzieren (Reil et al., 2012). Auch in dieser Arbeit war nach Präinkubation mit Aldosteron die Konzentration von CTGF in den kardialen Rattenfibroblasten erhöht. Durch eine zusätzliche Stimulation mit einem Mineralocorticoid-Rezeptor-Antagonisten (MR-Antagonisten) war die CTGF-Konzentration auf dem Niveau der unbehandelten Gruppe. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist eine durch Aldosteron vermittelte CTGF Expression über den MR anzunehmen.

Die profibrotische Lysyl Oxidase (LOX) ist das Schlüsselenzym im letzten Schritt der Kollagenquervernetzung. Eine Stimulation mit Aldosteron führte, übereinstimmend mit vorausgegangenen Studien, zu einer gesteigerten Expression von LOX (Adam et al., 2011; Kagan and Trackman, 1991).

BR-4628 ist ein nicht steroidaler MR-Antagonist der Dihydropyridin-Klasse und weist eine mit Spironolacton vergleichbare Affinität für den MR auf. Bei hoher Spezifität von BR-4628 für den MR, besteht jedoch ein erheblicher Unterschied in der Affinität zu anderen Steroidrezeptoren im Vergleich zu Spironolacton (Fagart et al., 2010).

Die durch Aldosteron verursachten profibrotischen Umbauprozesse konnten durch eine Präinkubation mit einem MR-Antagonisten reduziert werden. Eine vorausgehende Inkubation mit BR-4628 war ebenso effektiv, wie eine Vorbehandlung mit Spironolacton. Eine Hemmung der Überexpression von Hydroxyprolin, CTGF ebenso von TGF- β und LOX konnte sowohl durch Spironolacton als auch durch BR-4628 beobachtet werden.

Offen bleibt eine genauere Charakterisierung der profibrotischen Signaltransduktionswege. Insbesondere sind die Regulation über die MR-mRNA Expression und deren Abhängigkeit vom atrialen Durchmesser bisher unzureichend untersucht. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten wurden überwiegend an einem Zellkulturmodell kardialer Fibroblasten von neonatalen Ratten erhoben. Die möglicherweise in vivo bestehenden zusätzlichen Faktoren, die fibrotische Umbauprozesse beeinflussen, bleiben in dem hier verwendeten Zellkulturmodell unberücksichtigt. Die durch diese Grundlagenforschung erhaltenen Ergebnisse müssen durch weitere Studien ihre klinische Bedeutung unter Beweis stellen.

Zusammenfassend zeigen die in dieser Arbeit erhobenen Daten, dass die durch Aldosteron induzierten fibrotischen Umbauprozesse MR-abhängig sind und eine entsprechende Blockade dieses Rezeptors fibrotische Umbauprozesse effektiv zu reduzieren vermag. Spironolacton und BR-4628 sind in der Lage die Einflüsse profibrotischer Mediatoren wie CTGF, TGF- β sowie LOX zu hemmen. Die Möglichkeit eines potentiellen Ansatzpunktes zur Prävention einer durch den MR vermittelten atrialen Fibrose, durch die entsprechende Hemmung dieses Rezeptors scheint gegeben zu sein. Durch den erbrachten Nachweis einer effektiven Hemmung des MR könnten Spironolacton und BR-4628 in der Lage sein, Vorhofflimmern und atriale Fibrosierung zu beeinflussen und stellen daher mögliche Ansatzpunkte einer neuen medikamentösen Therapie dar.

6. Literaturverzeichnis

1. Abhayaratna WP, Seward JB, Appleton CP, Douglas PS, Oh JK, Tajik AJ, et al. (2006) Left atrial size: physiologic determinants and clinical applications. *J Am Coll Cardiol* 47:2357-2363
2. Adam O, Frost G, Custodis F, Sussman MA, Schafers HJ, Bohm M, et al. (2007) Role of Rac1 GTPase activation in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 50:359-367
3. Adam O, Lavall D, Theobald K, Hohl M, Grube M, Ameling S, et al. (2010) Rac1-induced connective tissue growth factor regulates connexin 43 and N-cadherin expression in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 55:469-480
4. Adam O, Theobald K, Lavall D, Grube M, Kroemer HK, Ameling S, et al. (2011) Increased lysyl oxidase expression and collagen cross-linking during atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* 50:678-685
5. Ahmed MS, Oie E, Vinge LE, Yndestad A, Oystein Andersen G, Andersson Y, et al. (2004) Connective tissue growth factor--a novel mediator of angiotensin II-stimulated cardiac fibroblast activation in heart failure in rats. *J Mol Cell Cardiol* 36:393-404
6. Allessie M, Ausma J, Schotten U (2002) Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 54:230-246
7. Benjamin EJ, Levy D, Vaziri SM, D'Agostino RB, Belanger AJ, Wolf PA (1994) Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort. The Framingham Heart Study. *Jama* 271:840-844
8. Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB, Levy D (1998) Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study. *Circulation* 98:946-952

9. Blom IE, Goldschmeding R, Leask A (2002) Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy? *Matrix Biol* 21:473-482
10. Blomstrom-Lundqvist C, Scheinman MM, Aliot EM, Alpert JS, Calkins H, Camm AJ, et al. (2003) ACC/AHA/ESC guidelines for the management of patients with supraventricular arrhythmias--executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Supraventricular Arrhythmias). *Circulation* 108:1871-1909
11. Brilla CG, Matsubara LS, Weber KT (1993) Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. *J Mol Cell Cardiol* 25:563-575
12. Burstein B, Nattel S (2008a) Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 51:802-809
13. Burstein B, Nattel S (2008b) Atrial structural remodeling as an antiarrhythmic target. *J Cardiovasc Pharmacol* 52:4-10
14. Candido R, Forbes JM, Thomas MC, Thallas V, Dean RG, Burns WC, et al. (2003) A breaker of advanced glycation end products attenuates diabetes-induced myocardial structural changes. *Circ Res* 92:785-792
15. Cardin S, Libby E, Pelletier P, Le Bouter S, Shiroshita-Takeshita A, Le Meur N, et al. (2007) Contrasting gene expression profiles in two canine models of atrial fibrillation. *Circ Res* 100:425-433
16. Casaclang-Verzosa G, Gersh BJ, Tsang TS (2008) Structural and functional remodeling of the left atrium: clinical and therapeutic implications for atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 51:1-11

17. Chen H, Huang XN, Stewart AF, Sepulveda JL (2004) Gene expression changes associated with fibronectin-induced cardiac myocyte hypertrophy. *Physiol Genomics* 18:273-283
18. Chen MM, Lam A, Abraham JA, Schreiner GF, Joly AH (2000) CTGF expression is induced by TGF- β in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *J Mol Cell Cardiol* 32:1805-1819
19. Clark DM, Plumb VJ, Epstein AE, Kay GN (1997) Hemodynamic effects of an irregular sequence of ventricular cycle lengths during atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 30:1039-1045
20. De-An P, Li L, Zhi-Yun X, Jin-Yu H, Zheng-Ming X, Min W, et al. (2010) Increased expression of mineralocorticoid receptor and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human atria during atrial fibrillation. *Clin Cardiol* 33:23-29
21. de Jong S, van Veen TA, van Rijen HV, de Bakker JM (2011) Fibrosis and cardiac arrhythmias. *J Cardiovasc Pharmacol* 57:630-638
22. de Souza RR (2002) Aging of myocardial collagen. *Biogerontology* 3:325-335
23. Dean RG, Balding LC, Candido R, Burns WC, Cao Z, Twigg SM, et al. (2005) Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis after myocardial infarction. *J Histochem Cytochem* 53:1245-1256
24. Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG (2010) The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 48:504-511
25. Dries DL, Exner DV, Gersh BJ, Domanski MJ, Waclawiw MA, Stevenson LW (1998) Atrial fibrillation is associated with an increased risk for mortality and heart failure progression in patients with asymptomatic and symptomatic left ventricular

systolic dysfunction: a retrospective analysis of the SOLVD trials. *Studies of Left Ventricular Dysfunction. J Am Coll Cardiol* 32:695-703

26. Edwards CA, O'Brien WD, Jr. (1980) Modified assay for determination of hydroxyproline in a tissue hydrolyzate. *Clin Chim Acta* 104:161-167
27. Ehrlich JR, Nattel S, Hohnloser SH (2002) Atrial fibrillation and congestive heart failure: specific considerations at the intersection of two common and important cardiac disease sets. *J Cardiovasc Electrophysiol* 13:399-405
28. Ettinger PO, Wu CF, De La Cruz C, Jr., Weisse AB, Ahmed SS, Regan TJ (1978) Arrhythmias and the "Holiday Heart": alcohol-associated cardiac rhythm disorders. *Am Heart J* 95:555-562
29. Fagart J, Hillisch A, Huyet J, Barfacker L, Fay M, Pleiss U, et al. (2010) A new mode of mineralocorticoid receptor antagonism by a potent and selective nonsteroidal molecule. *J Biol Chem* 285:29932-29940
30. Falk RH (2001) Atrial fibrillation. *N Engl J Med* 344:1067-1078
31. Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Anderson CS (2003) Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century. *Lancet Neurol* 2:43-53
32. Feinberg WM, Blackshear JL, Laupacis A, Kronmal R, Hart RG (1995) Prevalence, age distribution, and gender of patients with atrial fibrillation. Analysis and implications. *Arch Intern Med* 155:469-473
33. Freeman WD, Aguilar MI (2011) Prevention of cardioembolic stroke. *Neurotherapeutics* 8:488-502
34. Frost L, Vestergaard P, Mosekilde L (2004) Hyperthyroidism and risk of atrial fibrillation or flutter: a population-based study. *Arch Intern Med* 164:1675-1678

35. Fuster V, Ryden LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, et al. (2006) ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the Management of Patients with Atrial Fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2001 Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation): developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Circulation* 114:e257-354
36. Gallagher MM, Camm AJ (1997) Classification of atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol* 20:1603-1605
37. Go AS, Hylek EM, Phillips KA, Chang Y, Henault LE, Selby JV, et al. (2001) Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *Jama* 285:2370-2375
38. Goette A, Honeycutt C, Langberg JJ (1996) Electrical remodeling in atrial fibrillation. Time course and mechanisms. *Circulation* 94:2968-2974
39. Gorres KL, Raines RT (2010) Prolyl 4-hydroxylase. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45:106-124
40. Gronefeld GC, Lilienthal J, Kuck KH, Hohnloser SH (2003) Impact of rate versus rhythm control on quality of life in patients with persistent atrial fibrillation. Results from a prospective randomized study. *Eur Heart J* 24:1430-1436
41. Harris BS, Zhang Y, Card L, Rivera LB, Brekken RA, Bradshaw AD (2011) SPARC regulates collagen interaction with cardiac fibroblast cell surfaces. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301:H841-847

42. He X, Gao X, Peng L, Wang S, Zhu Y, Ma H, et al. (2011) Atrial fibrillation induces myocardial fibrosis through angiotensin II type 1 receptor-specific Arkadia-mediated downregulation of Smad7. *Circ Res* 108:164-175
43. Hinescu ME, Gherghiceanu M, Mandache E, Ciontea SM, Popescu LM (2006) Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in atrial myocardium: ultrastructural and immunohistochemical characterization. *J Cell Mol Med* 10:243-257
44. Kagan HM, Trackman PC (1991) Properties and function of lysyl oxidase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5:206-210
45. Kato T, Yamashita T, Sekiguchi A, Tsuneda T, Sagara K, Takamura M, et al. (2008) AGEs-RAGE system mediates atrial structural remodeling in the diabetic rat. *J Cardiovasc Electrophysiol* 19:415-420
46. Koitabashi N, Arai M, Kogure S, Niwano K, Watanabe A, Aoki Y, et al. (2007) Increased connective tissue growth factor relative to brain natriuretic peptide as a determinant of myocardial fibrosis. *Hypertension* 49:1120-1127
47. Lang C, Sauter M, Szalay G, Racchi G, Grassi G, Rainaldi G, et al. (2008) Connective tissue growth factor: a crucial cytokine-mediating cardiac fibrosis in ongoing enterovirus myocarditis. *J Mol Med (Berl)* 86:49-60
48. Leask A (2007) TGFbeta, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovasc Res* 74:207-212
49. Levy S (1997) Factors predisposing to the development of atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol* 20:2670-2674
50. Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S (1999) Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation* 100:87-95

51. Li D, Shinagawa K, Pang L, Leung TK, Cardin S, Wang Z, et al. (2001) Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on the development of the atrial fibrillation substrate in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. *Circulation* 104:2608-2614
52. Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH (2000) Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta. *Mol Genet Metab* 71:418-435
53. Lin CS, Lai LP, Lin JL, Sun YL, Hsu CW, Chen CL, et al. (2007) Increased expression of extracellular matrix proteins in rapid atrial pacing-induced atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 4:938-949
54. Lip GY, Tse HF, Lane DA (2012) Atrial fibrillation. *Lancet* 379:648-661
55. Matsui Y, Sadoshima J (2004) Rapid upregulation of CTGF in cardiac myocytes by hypertrophic stimuli: implication for cardiac fibrosis and hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 37:477-481
56. Mayyas F, Niebauer M, Zurick A, Barnard J, Gillinov AM, Chung MK, et al. (2010) Association of left atrial endothelin-1 with atrial rhythm, size, and fibrosis in patients with structural heart disease. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 3:369-379
57. McCurdy S, Baicu CF, Heymans S, Bradshaw AD (2010) Cardiac extracellular matrix remodeling: fibrillar collagens and Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC). *J Mol Cell Cardiol* 48:544-549
58. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, et al. (2012) ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 33:1787-1847

59. Moussad EE, Brigstock DR (2000) Connective tissue growth factor: what's in a name? *Mol Genet Metab* 71:276-292
60. Nappi JM, Sieg A (2011) Aldosterone and aldosterone receptor antagonists in patients with chronic heart failure. *Vasc Health Risk Manag* 7:353-363
61. Nattel S (2002) New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 415:219-226
62. Odermatt A, Atanasov AG (2009) Mineralocorticoid receptors: emerging complexity and functional diversity. *Steroids* 74:163-171
63. Pelouch V, Dixon IM, Golfman L, Beamish RE, Dhalla NS (1993) Role of extracellular matrix proteins in heart function. *Mol Cell Biochem* 129:101-120
64. Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, et al. (2003) Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 348:1309-1321
65. Pitt B, Williams G, Remme W, Martinez F, Lopez-Sendon J, Zannad F, et al. (2001) The EPHEBUS trial: eplerenone in patients with heart failure due to systolic dysfunction complicating acute myocardial infarction. *Eplerenone Post-AMI Heart Failure Efficacy and Survival Study. Cardiovasc Drugs Ther* 15:79-87
66. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, et al. (1999) The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. N Engl J Med* 341:709-717
67. Reil JC, Hohl M, Selejan S, Lipp P, Drautz F, Kazakow A, et al. (2012) Aldosterone promotes atrial fibrillation. *Eur Heart J* 33:2098-2108
68. Robert V, Silvestre JS, Charlemagne D, Sabri A, Trouve P, Wassef M, et al. (1995) Biological determinants of aldosterone-induced cardiac fibrosis in rats. *Hypertension* 26:971-978

69. Saffitz JE, Schuessler RB, Yamada KA (1999) Mechanisms of remodeling of gap junction distributions and the development of anatomic substrates of arrhythmias. *Cardiovasc Res* 42:309-317
70. Steger C, Pratter A, Martinek-Bregel M, Avanzini M, Valentin A, Slany J, et al. (2004) Stroke patients with atrial fibrillation have a worse prognosis than patients without: data from the Austrian Stroke registry. *Eur Heart J* 25:1734-1740
71. Sun Y, Ramires FJ, Weber KT (1997) Fibrosis of atria and great vessels in response to angiotensin II or aldosterone infusion. *Cardiovasc Res* 35:138-147
72. Swedberg K, Zannad F, McMurray JJ, Krum H, van Veldhuisen DJ, Shi H, et al. (2012) Eplerenone and atrial fibrillation in mild systolic heart failure: results from the EMPHASIS-HF (Eplerenone in Mild Patients Hospitalization And Survival Study in Heart Failure) study. *J Am Coll Cardiol* 59:1598-1603
73. Todd DM, Skanes AC, Guiraudon G, Guiraudon C, Krahn AD, Yee R, et al. (2003) Role of the posterior left atrium and pulmonary veins in human lone atrial fibrillation: electrophysiological and pathological data from patients undergoing atrial fibrillation surgery. *Circulation* 108:3108-3114
74. Tsai CT, Chiang FT, Tseng CD, Hwang JJ, Kuo KT, Wu CK, et al. (2010) Increased expression of mineralocorticoid receptor in human atrial fibrillation and a cellular model of atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 55:758-770
75. Tsang TS, Petty GW, Barnes ME, O'Fallon WM, Bailey KR, Wiebers DO, et al. (2003) The prevalence of atrial fibrillation in incident stroke cases and matched population controls in Rochester, Minnesota: changes over three decades. *J Am Coll Cardiol* 42:93-100
76. Upshaw CB, Jr. (1997) Hemodynamic changes after cardioversion of chronic atrial fibrillation. *Arch Intern Med* 157:1070-1076

77. Villarreal FJ, Dillmann WH (1992) Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF-beta 1, fibronectin, and collagen. *Am J Physiol* 262:H1861-1866
78. Wang TJ, Larson MG, Levy D, Vasan RS, Leip EP, Wolf PA, et al. (2003) Temporal relations of atrial fibrillation and congestive heart failure and their joint influence on mortality: the Framingham Heart Study. *Circulation* 107:2920-2925
79. Way KJ, Isshiki K, Suzuma K, Yokota T, Zvagelsky D, Schoen FJ, et al. (2002) Expression of connective tissue growth factor is increased in injured myocardium associated with protein kinase C beta2 activation and diabetes. *Diabetes* 51:2709-2718
80. Weber KT (2001) Aldosterone in congestive heart failure. *N Engl J Med* 345:1689-1697
81. Weber KT, Janicki JS, Shroff SG, Pick R, Chen RM, Bashey RI (1988) Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium. *Circ Res* 62:757-765
82. Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA (1995) Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 92:1954-1968
83. Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB (1991) Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. *Stroke* 22:983-988
84. Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB (1987) Atrial fibrillation: a major contributor to stroke in the elderly. The Framingham Study. *Arch Intern Med* 147:1561-1564
85. Young M, Fullerton M, Dilley R, Funder J (1994) Mineralocorticoids, hypertension, and cardiac fibrosis. *J Clin Invest* 93:2578-2583

86. Zannad F, McMurray JJ, Krum H, van Veldhuisen DJ, Swedberg K, Shi H, et al. (2011) Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med* 364:11-21

7. Publikationen/Dank

7.1. Publikationen

Daniel Lavall, Christian Selzer, Oliver Adam, Hans-Joachim Schäfers, Michael Böhm and Ulrich Laufs. The mineralocorticoid receptor promotes structural remodeling in atrial fibrillation.

Manuscript submitted

7.2. Abstracts

Lavall D, Selzer C, Adam O, Böhm M, Laufs U: Mineralocorticoid receptor signaling mediates structural remodelling in atrial fibrillation. Clin Res Cardiol 101, Suppl 1, 78. Jahrestagung der Deutsche Gesellschaft für Kardiologie 2012, V513.

Daniel Lavall, Christian Selzer, Oliver Adam, Hans-Joachim Schäfers, Michael Böhm, Ulrich Laufs: The mineralocorticoid receptor promotes structural remodeling in atrial fibrillation: 36. Wissenschaftlichen Kongress 2012 der Deutschen Hochdruckliga e.V.

7.3. Dank

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Laufs für die freundliche Überlassung des Themas und die großzügigen Möglichkeiten der wissenschaftlichen Betätigung in seiner Arbeitsgruppe, sowie seiner konstruktiven Kritiken.

Herrn Prof. Dr. med. M. Böhm möchte ich danken für die Möglichkeit, die Experimente im kardiologischen Forschungslabor der Medizinischen Klinik durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Schäfers danke ich für die Kooperation und die Bereitstellung der humanen linksatrialen Gewebeproben bedanken.

Ein ganz besonderer Dank auch an Herrn Dr. med. Daniel Lavall für die sehr gute wissenschaftliche Betreuung in allen Abschnitten der Arbeit und für seine ständige Bereitschaft mir mit seinen hilfreichen Ideen und Kommentaren beratend zur Seite zu stehen.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei den Medizinisch-Technischen Assistentinnen Frau Ellen Becker, Frau Simone Jäger und Frau Catrin Pittke für die Einarbeitung im Labor, das Einweisen in die verschiedenen Arbeitstechniken und für ihre ständige Bereitschaft zur Unterstützung in allen Abschnitten dieser Arbeit.

Ferner danke ich allen Mitdoktoranden/innen und Assistenzärzten/innen des Labors für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Nicht zuletzt danke ich meiner Mutter für ihre selbstlose Unterstützung und die große Geduld, sowohl während meines Studiums als auch während dieser Arbeit.

Meiner Frau Phanee gebührt Dank für ihren Beistand, ihre Liebe und ihr Verständnis.

8. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.