

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

**Bedeutung der miRNA-21  
für die Pathogenese  
der atrialen Fibrose und Vorhofflimmern**

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

2012

vorgelegt von: Björn Löhfelme  
geb. am: 08.07.1986 in Wadern



**UKS**  
Universitätsklinikum  
des Saarlandes



Tag der Promotion: .....

Dekan: .....

Berichterstatter: .....

*Die Wissenschaft, richtig verstanden, heilt den Menschen von  
seinem Stolz; denn sie zeigt ihm seine Grenzen.*

Albert Schweitzer  
14.01.1875 - 04.09.1965  
Arzt, Philosoph und Theologe

*Phantasie ist wichtiger als Wissen, denn Wissen ist begrenzt.*

Albert Einstein  
14.03.1879 - 18.04.1955  
Deutscher Physiker und Nobelpreisträger

*gewidmet  
meinen Eltern  
Armin und Andrea Löhfel*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>11</b>
1.1.	Aktivierung von Rac1 durch Angiotensin II führt zu CTGF- und LOX- vermittelter Expressionssteigerung der miRNA-21 und verminderter Expression von Sprouty1 und trägt damit zum strukturellen Remodeling im Rahmen von Vorhofflimmern bei.....	11
1.2.	Activation of Rac1 by angiotensin II leads to a CTGF- and LOX-mediated increase of miRNA-21 and down-regulation of Sprouty1 expression contributing to structural remodeling during atrial fibrillation .....	12
<b>2.</b>	<b>Einleitung und eigene Fragestellung.....</b>	<b>14</b>
2.1.	Epidemiologie und Ätiologie von Vorhofflimmern .....	14
2.1.1.	Definition, Prävalenz und Inzidenz von Vorhofflimmern .....	14
2.1.2.	Einordnung von Vorhofflimmern im kardiovaskulären Kontinuum .....	16
2.2.	Pathophysiologische Mechanismen und Veränderungen bei Vorhofflimmern - strukturelles und elektrisches Remodeling am Vorhof .....	17
2.3.	Zell- und Molekularbiologie des strukturellen Remodelings am Vorhof .....	18
2.3.1.	Zelluläre Struktur des Vorhofs.....	18
2.3.2.	Schlüsselrolle des Renin-Angiotensin-Systems.....	19
2.3.3.	Bedeutung der Rac1-GTPase und der NADPH-Oxidase.....	20
2.3.4.	Bedeutung von CTGF und LOX für strukturelles Remodeling.....	22
2.4.	MicroRNAs - Definition, Synthese und Funktion.....	24
2.5.	Eigene Fragestellung .....	27
<b>3.</b>	<b>Material und Methodik.....</b>	<b>29</b>
3.1.	Materialien.....	29
3.1.1.	Antikörper .....	29
3.1.2.	Enzyme, Kits und Transfektionsmaterial.....	30
3.1.3.	Medien, Lösungen und Puffer.....	30
3.1.4.	Gele für Western Blot .....	31
3.1.5.	Verbrauchsmaterialien .....	32
3.1.6.	Chemikalien und sonstige Reagenzien .....	32
3.1.7.	Geräte .....	34
3.1.8.	Software .....	35

3.2.	Zellkultur .....	35
3.2.1.	Isolierung und Kultivierung neonataler kardialer Rattenfibroblasten .....	35
3.2.2.	Stimulation der neonatalen kardialen Rattenfibroblasten .....	37
3.3.	Humane linksatriale Appendices .....	37
3.4.	Transgene Mäuse mit kardialer Rac1-Überexpression (RacET) .....	39
3.5.	Infarktmäuse zur Behandlung mit Antagomir-21 .....	40
3.6.	Transfektionen .....	41
3.6.1.	siRNA-Transfektion .....	41
3.6.2.	cDNA-Transfektion .....	42
3.6.3.	pre-miR21- und anti-miR21-Transfektion .....	43
3.7.	Proteinexpression und Western Blot .....	43
3.7.1.	Proteinbestimmung nach Lowry .....	44
3.7.2.	Gelelektrophorese .....	45
3.7.3.	Protein-Transfer .....	46
3.7.4.	Antikörperinkubation .....	46
3.8.	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	47
3.8.1.	miRNA-Isolation .....	48
3.8.2.	Reverse Transkription (RT) .....	49
3.8.3.	Real-Time-PCR .....	50
3.9.	Immunfluoreszenzanalysen .....	51
3.9.1.	Sprouty1-Immunfluoreszenzfärbung .....	51
3.9.2.	Vimentin-Immunfluoreszenzfärbung .....	52
3.9.3.	$\alpha$ -sarkomerisches Aktin-Immunfluoreszenzfärbung .....	52
3.9.4.	Digitalisieren der Fluoreszenzfärbungen .....	53
3.10.	Immunhistochemische Kollagen-Färbung .....	53
3.11.	Statistische Auswertung .....	53
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>54</b>
4.1.	Die miRNA-21-Expression ist bei Vorhofflimmern in humanem Vorhofgewebe erhöht .....	54
4.2.	Die Sprouty1-Expression ist bei Vorhofflimmern in humanem Vorhofgewebe vermindert und ist negativ korreliert zur miRNA-21-Expression .....	54
4.3.	Sprouty1 wird in linken Vorhöfen bei Sinusrhythmus vermehrt in kardialen Fibroblasten exprimiert .....	56

4.4.	Angiotensin II, Rac1, CTGF und LOX als profibrotische Mediatoren korrelieren mit der miRNA-21-Expression in linken Vorhöfen .....	60
4.5.	Die miRNA-21-Expression hat keinen Einfluss auf die Expression von Angiotensin II, Rac1, CTGF und LOX im Zellkulturmodell .....	60
4.6.	Angiotensin II und CTGF erhöhen die Expression der miRNA-21 und vermindern die Expression von Sprouty1 in kardialen Fibroblasten .....	63
4.7.	Angiotensin II aktiviert Rac1, CTGF und LOX und reguliert so die Expression von miRNA-21 und Sprouty1 in kardialen Fibroblasten .....	66
4.8.	Angiotensin II und CTGF erhöhen die Proteinexpression der Endonukleasen der miRNA Drosha und Dicer .....	68
4.9.	LOX ist nicht nur extrazellulär, sondern auch intrazellulär in kardialen Fibroblasten nachweisbar .....	68
4.10.	Intrazelluläres LOX spielt eine wichtige Rolle für die Expression der Endonukleasen der miRNA Drosha und Dicer .....	71
4.11.	Statine senken durch Hemmung der Rac1-Aktivität die Expression der miRNA-21 <i>in vivo</i> .....	71
4.12.	Behandlung mit Antagomir-21 verhindert die Entstehung von atrialer Fibrose <i>in vivo</i> .....	73
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>77</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>88</b>
<b>7.</b>	<b>Publikationen/Dank.....</b>	<b>105</b>
7.1	Publikationen.....	105
7.2	Dank .....	105
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>108</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg, mg, g	Mikrogramm, Milligramm, Gramm
µl, ml, l	Mikroliter, Milliliter, Liter
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
AF	atrial fibrillation = Vorhofflimmern
Ang II	Angiotensin II
Aq dest	Aqua destillata - destilliertes Wasser
AT1-Rezeptor	Angiotensin II-Rezeptor Typ I
BAPN	B-Aminopropionitrile = LOX small molecule inhibitor
bp, kbp	Basenpaare, Kilobasenpaare
bpm	beats per minute = Schläge pro Minute
BSA	bovine serum albumin
C	Kontrolle
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
Cu <sup>2+</sup>	zweifach positiv geladenes Kupferion
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	DL-Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTP, GDP	Guanosintriphosphat, Guanosindiphosphat
H <sub>2</sub> O	Wasser

HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
IgM, G oder A	Immunglobulin M, G oder A
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Kaliumdihydrogenphosphat
KHK	koronare Herzkrankheit
LAA	linksatrialer Appendix
LOX	Lysyl Oxidase
LOXL 1,-2,-3,-4	Lysyl Oxidase-like proteins 1, 2, 3, 4
LV	linker Ventrikel
LVEDd	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVESd	linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser
mA, A	Milliampere, Ampere
$\text{MgSO}_4$	Magnesiumsulfat
MHC	$\alpha$ -myosin heavy chain
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
nm, $\mu\text{m}$ , mm, cm, m	Nanometer, Mikrometer, Millimeter, Zentimeter, Meter
nM, $\mu\text{M}$ , mM, M	Nanomolar, Mikromolar, Millimolar, Molar
NSC	NSC23766 = Rac1 small molecule inhibitor
p	Signifikanzwert
p 1,-2,-3,-4	Zell-Passage 1, 2, 3, 4
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	pH-Wert
po	per os
q-PCR	Real-Time-PCR
RacET	transgene Mäuse mit herzspezifischer Überexpression von konstitutiv aktivem Rac1
RAS	herzspezifisches lokales Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkription
RV	rechter Ventrikel
sc-Zellen	scrambled-Zellen = transfizierte Zellen ohne Knockdown



SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standard Error of the Mean - Mittelwert $\pm$ Standardfehler
si-CTGF, si-LOX	Zellen unter CTGF- bzw. LOX-Knockdown
Sirius Red F3BA	Farbstoff für Kollagen
siRNA	small interfering RNA
SR	Sinusrhythmus
SSC	Saline-Sodium Citrate
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
TRITC	Tetramethyl Rhodamin Isothiocyanat
U/min	Umdrehungen pro Minute
vs.	versus
WT	Wildtyp

---

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Droscha und Dicer sind die Schlüsselenzyme der Synthese und Prozessierung der miRNAs.
- Abb. 2: Patienten mit Vorhofflimmern zeigen eine erhöhte Expression von miRNA-21.
- Abb. 3: Patienten mit Vorhofflimmern zeigen eine verminderte Expression von Sprouty1.
- Abb. 4: Eine erhöhte miRNA-21-Expression ist negativ mit dem Proteingehalt an Sprouty1 korreliert.
- Abb. 5: Die Expression von Sprouty1 ist bei Patienten im Sinusrhythmus verglichen mit Patienten im Vorhofflimmern erhöht.
- Abb. 6: Die miRNA-21-Expression ist positiv korreliert zur Expression von Angiotensin II, Rac1, CTGF und LOX in linken Vorhöfen.
- Abb. 7: Verminderte oder erhöhte Expression der miRNA-21 führen zu keiner signifikanten Änderung der Proteinexpression von Rac1, CTGF und LOX.
- Abb. 8: Die profibrotischen Mediatoren Angiotensin II und CTGF induzieren in kardialen Fibroblasten eine vermehrte Expression von miRNA-21.
- Abb. 9: Die profibrotischen Mediatoren Angiotensin II und CTGF vermindern in kardialen Fibrozyten die Expression von Sprouty1.
- Abb. 10: Der siRNA-vermittelte Knockdown von CTGF und LOX verhindert die vermehrte Expression von miRNA-21 nach Stimulation mit Angiotensin II und CTGF.
- Abb. 11: Angiotensin II und CTGF steigern die Proteinexpression der Endonukleasen Droscha und Dicer.
- Abb. 12: Lysyl Oxidase wird nicht nur extrazellulär, sondern auch intrazellulär exprimiert.
- Abb. 13: Transfektion mit einem cDNA-Klon für LOX erhöht die LOX-Expression und führt zu einer Expressionssteigerung der Endonukleasen der miRNA Droscha und Dicer.
- Abb. 14: Die miRNA-21-Expression wird durch Hemmung der Rac1-Aktivität mit Statinen gesenkt.
- Abb. 15: Eine Behandlung mit Antagomir-21 reduziert einer Vorhoffibrose *in vivo*.
- Abb. 16: Angiotensin II, Rac1, Connective Tissue Growth Factor und Lysyl-Oxidase regulieren die Expression von miR-21 und Sprouty1 bei Vorhofflimmern.

## 1. Zusammenfassung

### 1.1. Aktivierung von Rac1 durch Angiotensin II führt zu CTGF- und LOX-vermittelter Expressionssteigerung der miRNA-21 und verminderter Expression von Sprouty1 und trägt damit zum strukturellen Remodeling im Rahmen von Vorhofflimmern bei

Vorhofflimmern ist die häufigste Herzrhythmusstörung. Ein entscheidendes Kennzeichen der strukturellen Veränderungen am Vorhof im Rahmen dieser Arrhythmie ist die Fibrose. Die Pathogenese der Fibrose bei Vorhofflimmern ist bisher jedoch nur unzureichend verstanden. Aktuelle Studien konnten zeigen, dass die MicroRNA-21 (miRNA-21) und deren Downstream-Target Sprouty1 (Spry1) eine wichtige Rolle in der Pathogenese der fibrotischen Veränderungen am Ventrikel bei Patienten mit Herzinsuffizienz spielen. Die Bedeutung der miRNA-21 und von Spry1 bei Vorhofflimmern ist aber noch unklar.

Daher untersuchten wir die Expression der miRNA-21 und Spry1 bei Vorhofflimmern, um anschließend die Hypothese zu prüfen, ob die miRNA-21 und Spry1 mit den profibrotischen Mediatoren Rac1, CTGF und LOX interagieren. Gewebe des linken Vorhofs von Patienten mit Vorhofflimmern zeigte verglichen mit Patienten im Sinusrhythmus eine erhöhte miRNA-21 Expression, die zudem mit dem Kollagen-Gehalt des Vorhofs positiv korrelierte. Die erhöhte miRNA-21-Expression ging einher mit einer verminderten Proteinexpression von Spry1 und war positiv korreliert zur Expression von Connective Tissue Growth Factor (CTGF), der Lysyl Oxidase (LOX) und der Rac1-GTPase. Neonatale kardiale Rattenfibroblasten, die mit Angiotensin II (Ang II) oder CTGF behandelt wurden, zeigten eine erhöhte miRNA-21- und eine verminderte Spry1-Expression. Vorbehandlung mit NSC23766, einem Inhibitor von Rac1, verminderte die durch Ang II induzierte Expressionssteigerung der miRNA-21. Behandlung der Fibroblasten mit BAPN, einem small molecule inhibitor von LOX, verhinderte die Erhöhung der miRNA-21-Expression durch Ang II und CTGF.

Um die Bedeutung von Rac1 für strukturelles Remodeling *in vivo* besser charakterisieren zu können, wurden transgene Mäuse mit herzspezifischer Überexpression von konstitutiv aktivem Rac1 (RacET), die im Alter spontan Vorhofflimmern entwickelten, mit Wildtyp-Tieren verglichen. Bei den RacET-Mäusen zeigte sich eine erhöhte Expression der miRNA-21 bei gleichzeitig verminderter Proteinexpression von Spry1. Durch Behandlung der RacET-Mäuse mit Rosuvastatin konnten diese Effekte verhindert werden. Eine Fibrosierung der

Vorhöfe bei Wildtyp-Mäusen nach Induktion eines Herzinfarktes konnte durch Behandlung mit Antagomir-21 effektiv verhindert werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass linke Vorhöfe von Patienten im Vorhofflimmern durch eine erhöhte miRNA-21- und eine verminderte Spry1-Expression charakterisiert sind. Eine Aktivierung der Rac1-GTPase durch Angiotensin II führt zu einer CTGF und LOX vermittelten Expressionssteigerung der miRNA-21 sowie verminderter Spry1-Proteinexpression und trägt über diesen Mechanismus zu strukturellem Remodeling bei Vorhofflimmern bei.

## **1.2. Activation of Rac1 by angiotensin II leads to a CTGF- and LOX-mediated increase of miRNA-21 and down-regulation of Sprouty1 expression contributing to structural remodeling during atrial fibrillation**

Atrial fibrillation (AF) is the most common arrhythmia. Fibrosis is a hallmark of atrial arrhythmogenic structural remodeling. The pathogenesis of this fibrosis during atrial fibrillation is incompletely understood. Recent evidence showed that the microRNA-21 (miRNA-21) and its down-stream target Sprouty1 (Spry1) play a role in the pathogenesis of ventricular fibrosis in patients with congestive heart failure, while the importance of miRNA-21 and Spry1 during AF is unknown.

We now investigated the role of miRNA-21 and Spry1 in atrial fibrillation to test the hypothesis of an interaction between miRNA-21/Spry1 and Rac1, CTGF and LOX. Left atria (LA) from AF patients showed an increased expression of miRNA-21 and a positive correlation between miRNA-21 and collagen content compared to LA of patients in sinus rhythm. This was associated with a reduced protein expression of Spry1 and positively correlated with expression of connective tissue growth factor (CTGF), lysyl oxidase (LOX) and Rac1-GTPase. Neonatal cardiac fibroblasts treated with angiotensin II (Ang II) or CTGF showed an increased miRNA-21 and decreased Spry1 expression. Pretreatment with an inhibitor of Rac1 NSC23766 reduced the Ang II induced up-regulation of miRNA-21. A small molecule inhibitor of LOX, BAPN, prevented the Ang II as well as CTGF induced miRNA-21 expression.

To characterize the importance of Rac1 in this signaling *in vivo*, transgenic mice with cardiac overexpression of Rac1 (RacET), which develop AF spontaneously, were compared to wildtypes. RacET showed up-regulation of miRNA-21 expression associated with reduced Spry1 expression. Treatment of RacET with rosuvastatin prevented these effects. In addition atrial fibrosis in wildtype mice secondary to myocardial infarction was prevented by antagomir-21 *in vivo*.

Left atria of patients with atrial fibrillation are characterized by up-regulation of miRNA-21 und reduced expression of Spry1. Activation of Rac1 by angiotensin II leads to a CTGF- and LOX-mediated increase of miRNA-21 and down-regulation of Spry1 expression contributing to structural remodeling during atrial fibrillation.

## 2. Einleitung und eigene Fragestellung

### 2.1. Epidemiologie und Ätiologie von Vorhofflimmern

#### 2.1.1. Definition, Prävalenz und Inzidenz von Vorhofflimmern

Vorhofflimmern ist eine Herzrhythmusstörung, die durch unregelmäßige und schnelle Erregung des Vorhofs, fehlende P-Wellen im Elektrokardiogramm und gestörte Erregungsüberleitung auf die Kammern charakterisiert ist. In den Richtlinien der European Society of Cardiology (ESC) und der American Heart Association (AHA) wird Vorhofflimmern definiert als eine supraventrikuläre Tachyarrhythmie mit unkoordinierter atrialer Kontraktion und konsequenter Reduktion der mechanischen Funktion (Fuster et al. 2006). Die P-Wellen, die normalerweise eine regelmäßige Erregung des Vorhofs repräsentieren, sind ersetzt durch oszillierende und flimmernde Wellen unterschiedlicher Amplitude und Form, die Impulsfrequenz des flimmernden Vorhofs liegt bei 350-600 /min. Als Folge der großen Anzahl von arrhythmischen Vorhofimpulsen, die auf den AV-Knoten treffen, ist die Erregung der Herzkammern unregelmäßig normofrequent oder zeigt sich als absolute Tachy- oder Bradyarrhythmie (Falk 2001). Abhängig von der Flimmerfrequenz und der Filterfunktion des AV-Knotens variieren die QRS-Komplexe der Kammer hinsichtlich Morphologie, Amplitude und Zykluslänge (Turner 1962).

Aktuell existieren verschiedene Klassifikationssysteme des Vorhofflimmerns, die dabei unterschiedlichste Kriterien zur Einteilung heranziehen. Die im klinischen Alltag gebräuchlichste Klassifikation, die auch in den Leitlinien der AHA und der ESC Anwendung findet, orientiert sich am zeitlichen Verlauf des Vorhofflimmerns und wurde erstmals von Gallagher und Camm beschrieben (Gallagher and Camm 1998). Hier werden seit der aktuellen Überarbeitung fünf Formen des Vorhofflimmerns unterschieden:

- 1) *Erstmals diagnostiziertes Vorhofflimmern* betrifft Patienten, bei denen das erste Mal klinisch Vorhofflimmern diagnostiziert wird.
- 2) *Paroxysmales Vorhofflimmern* tritt anfallsweise auf und endet spontan meistens innerhalb der ersten 48 Stunden, mindestens aber innerhalb einer Woche.
- 3) Davon unterschieden wird *persistierendes Vorhofflimmern*, das sich nicht spontan innerhalb von 7 Tagen terminiert, aber medikamentös oder mittels Kardioversion in einen normalen Sinusrhythmus überführt werden kann.

- 4) Eine neue Kategorie bildet das *langanhaltende persistierende Vorhofflimmern*. Hier muss Vorhofflimmern länger als ein Jahr vorliegen, gleichzeitig muss aber ein Therapieversuch zumindest möglich sein.
- 5) *Permanentes Vorhofflimmern* schließlich terminiert sich nicht mehr spontan und kann weder medikamentös noch durch elektrische Kardioversion in einen Sinusrhythmus überführt werden.

Weitere Klassifikationen teilen Vorhofflimmern nach anderen Kriterien ein, beispielsweise nach den auftretenden Symptomen (Camm et al. 2010). Das klinische Spektrum der mit Vorhofflimmern assoziierten Symptome ist dabei sehr groß. Während einige, vor allem ältere Patienten subjektiv völlig beschwerdefrei sind, führt Vorhofflimmern bei anderen zu schweren Symptomen wie Dyspnoe, Synkopen sowie Angstgefühlen und beeinträchtigt so massiv die Lebensqualität der Patienten (Komatsu et al. 2010).

Vorhofflimmern ist die mit Abstand häufigste anhaltende Herzrhythmusstörung des Menschen. In Europa und den USA ist Vorhofflimmern vor dem Hintergrund der immer älter werdenden Bevölkerung zu einem bedeutenden Faktor für Morbidität und Kosten im Gesundheitssystem geworden. Entsprechend der Rotterdam-Studie liegt die aktuelle Gesamtprävalenz in Westeuropa bei etwa 5,5 % (Heeringa et al. 2006), in Amerika sind mehr als 2,2 Millionen Menschen von Vorhofflimmern betroffen. Diese Zahl wird sich wegen der aktuellen demographischen Entwicklung in den kommenden 50 Jahren mehr als verdoppeln (Miyasaka et al. 2006). Dies liegt daran, dass Vorhofflimmern eine Erkrankung darstellt, die vor allem ältere Menschen betrifft. Fast 70 % aller Patienten sind zwischen 65 und 85 Jahren alt (Fuster et al. 2006). Dementsprechend beträgt die Prävalenz in der Altersgruppe unter 60 Jahren nicht einmal 1 %, wohingegen 17,8 % der über 85-Jährigen an Vorhofflimmern leiden. Auch die Inzidenz in unterschiedlichen Altersgruppen spiegelt diese Tatsache wider, sie liegt bei Menschen zwischen 55 und 59 Jahren bei 1-2 Neuerkrankungen pro 1000 Einwohner und in der Altersgruppe von 80-84 Jahren bereits bei 20,7 Neuerkrankungen pro 1000 Einwohner (Magnani et al. 2011). Sowohl die Prävalenz als auch die Inzidenz liegen bei Männern etwas höher als bei Frauen. Das Lebenszeitrisko an Vorhofflimmern zu erkranken beträgt bei Männern 23,8 % und bei Frauen 22,2 % (Lloyd-Jones et al. 2004). In Anbetracht der hohen und in Zukunft weiterhin steigenden Prävalenz wird schnell ersichtlich, dass Vorhofflimmern enorme Kosten im Gesundheitssystem verursacht. Viele Patienten müssen im Krankenhaus behandelt und über sehr lange Zeiträume mit Medikamenten versorgt werden. Die jährlichen Behandlungskosten pro Patient betragen dabei ungefähr 3600 \$ bzw. 3000 € (Le Heuzey et al. 2004).

### 2.1.2. Einordnung von Vorhofflimmern im kardiovaskulären Kontinuum

Nur bei etwa 12 % der Patienten mit Vorhofflimmern lässt sich keine zusätzliche kardiopulmonale Erkrankung inklusive Diabetes mellitus und arterieller Hypertonie nachweisen. In diesem Fall spricht man von „alleinigem Vorhofflimmern“, das fast immer Patienten unter 60 Jahren betrifft (Kopecky et al. 1987; Fuster et al. 2006). In den meisten Fällen jedoch geht Vorhofflimmern mit weiteren Erkrankungen des Herzkreislaufsystems einher. Dazu zählen unter anderem arterielle Hypertonie, chronische Herzinsuffizienz, koronare Herzkrankheit und verschiedene Klappenvitien (Fuster et al. 2006). Der entscheidende Mechanismus für diesen direkten Zusammenhang von strukturellen Veränderungen des Herzens und Vorhofflimmern scheint hierbei die zunehmende Volumen- und Druckbelastung des Vorhofs mit daraus resultierender Dilatation des Vorhofgewebes zu sein. Das dilatierte und umstrukturierte Gewebe prädisponiert in der Folge für die Entwicklung einer Rhythmusstörung (Benjamin et al. 1994; Fuster et al. 2006). Weitere Risikofaktoren, die entsprechend großer Studien das Risiko an Vorhofflimmern zu erkranken erhöhen, sind Alter, Rauchen, Alkoholkonsum, Diabetes mellitus, Übergewicht, Hyperthyreodismus und Elektrolytstörungen (Cappola et al. 2006; Sanoski 2009). Gleichzeitig bestehende pathologische Veränderungen am Herzen verschlechtern dabei signifikant die Prognose des Vorhofflimmerns, gleiches gilt aber auch umgekehrt. So verschlechtert sich beispielsweise die Prognose der Herzinsuffizienz bei Auftreten von komorbidem Vorhofflimmern deutlich (Magnani et al. 2011). Anhand der Daten der Framingham Studie konnte umgekehrt nachgewiesen werden, dass das zusätzliche Auftreten einer Herzinsuffizienz die Mortalität des Vorhofflimmerns verglichen mit alleinigem Vorhofflimmern fast verdreifacht (Wang et al. 2003).

Vorhofflimmern geht insgesamt also einher mit erhöhter Mortalität und Morbidität. Am wichtigsten ist dabei das deutlich erhöhte Risiko, einen klinisch manifesten oder unbemerkten Schlaganfall durch Thrombusbildung im linken Vorhof zu erleiden (Ezekowitz et al. 1995). Dabei steigt nicht nur das Schlaganfallrisiko durch Vorhofflimmern um mehr als das Fünffache an, auch die Schwere und Fulminanz der Schlaganfälle nimmt deutlich zu (Wolf et al. 1978). Zudem kann die unregelmäßige Vorhofkontraktion die globale Pumpfunktion des Herzens verschlechtern und so eine bestehende Dysfunktion des Ventrikels verschlimmern und zum plötzlichen Herztod führen.



## **2.2. Pathophysiologische Mechanismen und Veränderungen bei Vorhofflimmern - strukturelles und elektrisches Remodeling am Vorhof**

Bestehendes Vorhofflimmern führt am Gewebe des Vorhofs zu Veränderungen, die die mechanische und elektrophysiologische Funktion in entscheidender Weise beeinflussen. So führt Vorhofflimmern zu morphologischen Alterationen des Vorhofgewebes (strukturelles Remodeling), die sich vor allem als fibrotische Umwandlung und Vermehrung der Interzellulärsubstanz manifestieren. Atriale Fibrose ist dabei das entscheidende Charakteristikum des Vorhofflimmerns. Auch auf zellulärer Ebene lassen sich Veränderungen beobachten, beispielsweise zunehmende Hypertrophie der Myozyten, Verlust von Zell-Zell-Verbindungen und Umbau der Zellarchitektur (Unverferth et al. 1984; Goette and Lendeckel 2006). Diese morphologischen Veränderungen können zu einer Erregungsbildungs- und Erregungsleitungsstörungen im Vorhof beitragen und das atriale Aktionspotential verändern (elektrisches Remodeling). Schließlich wird dadurch auch die atriale Kontraktilität negativ beeinflusst (Wijffels et al. 1995; Allessie et al. 2002).

Fibrose entsteht, wenn zirkulierende und lokal wirksame profibrotische Mediatoren auf die Fibroblasten eines Gewebes einwirken. Auch mechanischer Stress, Entzündungsprozesse und Sauerstoffmangel stimulieren die Aktivität und die Proliferation der Fibroblasten, die daraufhin große Mengen an Kollagen produzieren, ohne dass gleichzeitig dessen Abbau gefördert wird. Damit nimmt die Menge an extrazellulärer Matrix des Vorhofs immer weiter zu, wodurch Zell-Zell-Kontakte und -Verbindungen zunehmend verloren gehen (Everett et al. 2000; Xu et al. 2004). Auch die Apoptose der Fibroblasten wird durch einige profibrotische Mediatoren gehemmt, sodass abgestorbene Myozyten durch neue Fibroblasten ersetzt werden (reparative Fibrose) und der Anteil an Bindegewebszellen immer weiter zunimmt (Frustaci et al. 1997; Burstein and Nattel 2008).

Zahlreiche Studien konnten belegen, dass der Gehalt an Kollagen I und III und damit die Ausprägung des strukturellen Remodelings im Vorhof mit der Häufigkeit und der Schwere von Vorhofflimmern korrelieren (Li et al. 1999; Boldt et al. 2004). Ob die Fibrose aber als ursächlich für die Entstehung von Vorhofflimmern anzusehen ist oder aber erst in dessen Folge entsteht, konnte bis heute noch nicht eindeutig belegt werden. Viele weitere kardiovaskuläre Erkrankungen sind ebenfalls mit einer Fibrose der Vorhöfe assoziiert, beispielsweise die chronische Herzinsuffizienz, die die Struktur des Vorhofs vermutlich durch

die veränderten Volumen- und Druckbedingungen beeinträchtigt (Burstein and Nattel 2008). Sicher ist aber einerseits, dass fibrotische Veränderungen die Entstehung von Vorhofflimmern begünstigen sowie die Prognose des Vorhofflimmerns verschlechtern, und zum anderen, dass Vorhofflimmern selbst zu vermehrter Fibrose des Vorhofs führt (Sanfilippo et al. 1990; Xu et al. 2004; Nattel et al. 2008).

Fibrotische Areale prädisponieren dabei für die Entstehung und Aufrechterhaltung von elektrophysiologischen Veränderungen im Rahmen des elektrischen Remodelings. Ein grundlegender Mechanismus ist hier die Ausbildung von sogenannten kreisenden Erregungen oder Reentry-Kreisläufen (Nattel and Opie 2006). Diese entstehen, wenn sich die elektrische Erregung nur irregulär im Vorhof ausbreiten kann, da verschiedene Gewebeareale strukturell verändert sind und hier die Erregungsleitung verlangsamt oder heterogen stattfindet. Dadurch läuft die Vorhofdepolarisation nicht mehr synchron vom Sinusknoten zum AV-Knoten, wodurch große Unterschiede bezüglich der Erregbarkeit beziehungsweise der Refraktärzeit der Myozyten in unterschiedlichen Arealen des Vorhofs entstehen. Trifft nun ein bestimmter Impuls (Trigger) auf einen Bereich noch erregbarer Zellen, während sich andere Myozyten bereits in der Refraktärphase befinden, so kann hier eine kreisende Erregung entstehen. Mögliche Triggerfaktoren für diesen Mechanismus können dabei sowohl ektope Foci im Vorhof, Veränderungen im autonomen Rhythmus oder mechanische Reize sein (Falk 2001; Nattel et al. 2008; Schmidt et al. 2011).

## **2.3. Zell- und Molekularbiologie des strukturellen Remodelings am Vorhof**

### **2.3.1. Zelluläre Struktur des Vorhofs**

Im gesunden Vorhofgewebe machen Kardiomyozyten nicht einmal die Hälfte der Zellen des Gewebes aus, Fibroblasten bilden als nicht-myozytäre Zellen den größten Anteil (Banerjee et al. 2007). Weiterhin finden sich in geringem Ausmaß Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen im Gewebe des Vorhofs. Fibroblasten sind dabei die entscheidenden Zellen für strukturelles Remodeling und fibrotische Umwandlung. Während Fibroblasten traditionell eher als passive Zellen zwischen den Myozyten des Myokards angesehen wurden, wurde in den letzten Jahren zunehmend erkannt, dass die Fibroblasten selbst eine

entscheidende Bedeutung für die Struktur des Vorhofs und seine Funktion haben (Powell 2000). Sie leisten dabei weitaus mehr als nur die Synthese und Sekretion von Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) wie Kollagen I und III, Fibronectin oder Laminin, sondern übernehmen zahlreiche weitaus komplexere Aufgaben. Sie können so induziert durch auto- und parakrine Stimulation oder auf den Vorhof einwirkende mechanische Belastungen weiter proliferieren und sich weiter differenzieren. Als bedeutende Mediatoren für diesen Mechanismus der Proliferation der Fibrozyten wurden in vorangegangenen Studien Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ ) und Angiotensin II identifiziert (Lee et al. 1995; Pietsch et al. 1999). Auch hohe Wandspannungen des Vorhofs durch Druckbelastungen stimulieren die Fibroblasten. Je nach Grad von Proliferation und Differenzierung produzieren die Bindegewebszellen in der Folge eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren, Zytokinen, ECM-Proteinen und Proteasen und beeinflussen damit die Funktion aller Zellen des Vorhofs (Burstein and Nattel 2008).

Auch eine direkte Kommunikation der einzelnen Zellen des Vorhofs untereinander findet durch ein dichtes Geflecht von Zell-Zell-Kontakten und Gap-Junctions statt, was so beispielsweise eine direkte elektrische Reaktion auf mechanische Reize möglich macht. Vorarbeiten zu diesem Thema konnten bei Vorhofflimmern Expressionsänderungen bei Gap-Junction-Proteinen wie beispielsweise dem Connexin 43 identifizieren. Diese Zellverbindungen scheinen durch mechano-elektrische Rückkopplung unter den Zellen im fibrotisch veränderten Vorhof eine Arrhythmie-fördernde Wirkung zu haben (Chilton et al. 2007; Adam et al. 2010). Gleichzeitig trägt aber auch ein zunehmender Verlust der regulär exprimierten Zell-Zell-Verbindungen der Myozyten (Adherens-Junctions, Desmosomen und Gap-Junctions) durch Zunahme der Extrazellulärschubstanz im Rahmen der Fibrose entscheidend zur Entstehung von Erregungsleitungsstörungen und damit wiederum zum Auftreten von Vorhofflimmern bei (Forbes and Sperelakis 1985).

### 2.3.2. Schlüsselrolle des Renin-Angiotensin-Systems

Eine zentrale pathogenetische Bedeutung für strukturelles Remodeling bei vielen Erkrankungen des Herzens kommt der Dysregulation des lokalen Renin-Angiotensin-Systems (RAS) zu. Die vermehrte Bildung von Angiotensin II und erhöhte Expression des Angiotensin II-Rezeptor Typ I wurden in vielen Studien als wichtige Mechanismen für die Entstehung pathologischer Veränderungen am Ventrikel und am Vorhof erkannt (Weber et al. 1993). Zum einen führt die Ausschüttung von Angiotensin II im Körper zu einer generellen

Vasokonstriktion. Diese erhöht die Nachlast des Herzens und induziert durch die Druckbelastung eine linksventrikuläre Hypertrophie. Indirekt wird durch diesen Mechanismus auch der Vorhof belastet. Zum anderen induziert Angiotensin II durch Bindung an seinen Rezeptor über Aktivierung von intrazellulären Proteinkinasen direkt das Wachstum und die Proliferation von Zellen. Wichtige durch Angiotensin II vermittelte Wirkungen am Vorhof umfassen die Ausbildung von zellulärer Hypertrophie, Hemmung der Apoptose der Fibroblasten, sowie die Steigerung der Synthese von Kollagen I und III, was schließlich in zunehmender Fibrose resultiert (Li et al. 2001). So zeigen transgene Mäuse mit erhöhter Angiotensin II-Expression oder herzspezifischer Überexpression von Angiotensin Converting Enzyme (ACE) deutlich vergrößerte, dilatierte Vorhöfe mit fibrotischer Veränderung und vermehrtem Auftreten von Vorhofflimmern (Xiao et al. 2004). Weiterhin konnte durch zahlreiche Untersuchungen an Tiermodellen gezeigt werden, dass strukturelle Erkrankungen des linken Ventrikels, besonders die Linksherzinsuffizienz, zu einer Aktivierung des atrialen Angiotensin-II-Systems führen und dadurch die Entwicklung einer proarrhythmogenen fibrotischen Gewebeveränderung bedingen können (Li et al. 1999). Diese Angiotensin-II-vermittelte Fibrose des Vorhofs spielt so vermutlich eine bedeutende Rolle für die Entstehung von Vorhoffarrhythmien im Rahmen einer bestehenden Herzinsuffizienz (Goette et al. 2000). Retrospektive klinische Studien konnten belegen, dass die Inzidenz von Vorhofflimmern bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz und linksventrikulärer Dysfunktion durch die Behandlung mit ACE-Hemmern und Angiotensin II-Rezeptorblockern signifikant gesenkt werden kann (Pedersen et al. 1999; Zaman et al. 2004; Boldt et al. 2006). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Angiotensin II und die durch diesen Mediator vermittelten profibrotischen Effekte eine Schlüsselrolle für strukturelles Remodeling und Pathogenese des Vorhofflimmerns einnehmen.

### 2.3.3. Bedeutung der Rac1-GTPase und der NADPH-Oxidase

Vorangegangene Arbeiten konnten nachweisen, dass das kleine Signaltransduktionsprotein Rac1, das unter anderem direkt durch die profibrotischen Mediatoren Angiotensin II und TGF- $\beta$  aktiviert werden kann, eine entscheidende Rolle für strukturelles und elektrisches Remodeling am Vorhof und die Entwicklung von Vorhofflimmern spielt (Laufs and Liao 2000; Brown et al. 2006; Reil et al. 2010). Die nur 21 kDa große Rac1-GTPase gehört zur Gruppe der Rho-GTPasen. Diese binden nach ihrer Aktivierung Guanosinriphosphat (GTP) und üben in ihrer aktivierten GTP-gebundenen Form wichtige regulatorische Funktionen in

Zellen aus. So beeinflussen sie beispielsweise die Zellmorphologie, regulieren die Protein- und Genexpression und steuern Wachstum und Proliferation im Gewebe des Vorhofs und des Ventrikels (Schwartz and Shattil 2000; Laufs et al. 2002; Brown et al. 2006).

Weiterhin ist Rac1 im Myokard direkt für die Aktivierung der NADPH-Oxidase verantwortlich, einem Zellmembran-gebundenen Enzymkomplex, der in seiner aktiven Form reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bildet (Takemoto et al. 2001; Maack et al. 2003; Custodis et al. 2006; Adam et al. 2007). Um einen Effekt auf die NADPH-Oxidase ausüben zu können, muss Rac1 durch posttranslationale Isoprenylierung aus dem Zytosol zur Zellmembran translozieren. Dort wird das gebundene GTP zu GDP gespalten und Rac1 damit wieder inaktiviert, gleichzeitig aber der NADPH-Oxidase-Enzymkomplex stimuliert und so die Bildung von Sauerstoffradikalen induziert (Diekmann et al. 1994; Brown et al. 2006). Diese hochreaktiven Sauerstoffspezies spielen nachgewiesenermaßen eine entscheidende Rolle für fibrotische Umwandlungsprozesse, strukturelles und elektrisches Remodeling sowie die Ausbildung kardialer Hypertrophie (Custodis et al. 2006; Adam et al. 2007; Reil et al. 2010). Auch für die Entstehung der Atherosklerose und der koronaren Herzkrankheit wird den ROS wegen ihrer proinflammatorischen und endothelschädigenden Wirkung große Bedeutung zugesprochen (Alexander 1995; Kim et al. 2005). In Studien zur Bedeutung der ROS bei Vorhofflimmern konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Aktivität der NADPH-Oxidase und dem Auftreten von Vorhofflimmern nach einem operativen Eingriff am Herzen hergestellt werden (Kim et al. 2008). Auch für das Auftreten von atrialer Thrombusbildung stellt der Gewebespiegel an reaktiven Sauerstoffmetaboliten einen direkten Risikofaktor dar (Dudley et al. 2005).

Die Rac1-GTPase kann durch den Einsatz von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine) effektiv gehemmt werden, da sie die Isoprenylierung und damit die Translokation von Rac1 an die Zellmembran verhindern (Laufs et al. 2002; Liao and Laufs 2005; Laufs and Adam 2012). Dadurch lassen sich auch die NADPH-Oxidase und die durch sie induzierte Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite indirekt inhibieren. Eine Hemmung der Rac1-Aktivität reduziert so nachweislich die Superoxid-Produktion (Maack et al. 2003; Adam and Laufs 2008). Dies führte in Versuchen zu verminderter Fibrose, verminderter Hypertrophie und geringer ausgeprägtem strukturellem Remodeling (Dechend et al. 2001; Laufs et al. 2002; Custodis et al. 2006; Adam et al. 2007). Im Tierversuch an Rac1-überexprimierenden Mäusen konnte sogar nachgewiesen werden, dass die Statinbehandlung die Inzidenz von Vorhofflimmern deutlich senken kann (Adam et al. 2007).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass der Rac1-GTPase, der NADPH-Oxidase und den von ihr gebildeten reaktiven Sauerstoffmetaboliten eine Schlüsselrolle für eine Vielzahl von pathologischen Veränderungen im kardiovaskulären Kontinuum zukommt. Der oxidative Stress durch Sauerstoffradikale ist dabei ein wichtiger Mechanismus für strukturelles und elektrisches Remodeling am Vorhof und ist für die Pathogenese des Vorhofflimmerns von entscheidender Bedeutung.

#### 2.3.4. Bedeutung von CTGF und LOX für strukturelles Remodeling

Eines der zentralen Effektorproteine der Fibrose, dessen Expression durch Angiotensin II und TGF- $\beta$  induziert werden kann, ist der Connective Tissue Groth Factor (CTGF oder CCN2). CTGF gehört zur Familie der Cystein-reichen CCN-Proteine. CCN ist hierbei die Abkürzung für die ersten drei der insgesamt sechs Mitglieder der Proteinfamilie: Cysteine-rich 61 (CYR61), Connective Tissue Groth Factor (CTGF) und Nephroblastoma Overexpressed (NOV) (Brigstock 1999). Zahlreiche Studien konnten belegen, dass die CTGF-Expression bei verschiedenen fibrotischen Erkrankungen der Haut, Niere, Lunge sowie des kardiovaskulären Systems deutlich gesteigert ist (Phanish et al. 2010; Cabello-Verrugio et al. 2011; Dendooven et al. 2011). Auch für strukturelles und elektrisches Remodeling am Herzen wurde CTGF eine Schlüsselrolle zugesprochen, unter anderem nach Myokardinfarkt, bei diabetischer Kardiomyopathie sowie bei systolischer und diastolischer Herzinsuffizienz (Way et al. 2002; Dean et al. 2005; Koitabashi et al. 2007). Die Expression von CTGF wird dabei von verschiedenen Faktoren und Signalmolekülen gesteuert. Hierzu gehören Aktivatoren von G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren, Angiotensin II, TGF- $\beta$ , Wachstums- und stressinduzierte Faktoren, oxidativer Stress durch ROS sowie hohe Glukosespiegel (Ihn 2002; Way et al. 2002; Matsui and Sadoshima 2004; Adam et al. 2010). Am Herzen wird CTGF nach Stimulation sowohl von Myozyten als auch von Fibroblasten exprimiert, wobei die entscheidenden Effektorzellen die Fibroblasten darstellen (Matsui and Sadoshima 2004). Hier vermittelt CTGF vermutlich durch Bindung an Integrine der Zellen mehrere Effekte, die direkt zur Entstehung von Fibrose führen können. Dazu zählen die vermehrte Bildung von ECM-Proteinen sowie gesteigerte Proliferation, Adhäsion und Chemotaxis (Chen et al. 2000; Matsui and Sadoshima 2004). Neuere Daten deuten außerdem darauf hin, dass CTGF direkt weitere profibrotische Mediatoren wie beispielsweise die Lysyl Oxidase aktivieren kann (Adam et al. 2010; Adam et al. 2011). Zusammenfassend betrachtet spielt CTGF damit über



verschiedene auto- und parakrine Mechanismen an Fibroblasten eine entscheidende Rolle für strukturelles Remodeling und Fibrose am Vorhof.

Auch die durch CTGF induzierbare Lysyl Oxidase (LOX) konnte in Vorarbeiten als wichtiges Enzym für die Ausbildung von fibrotischen Veränderungen identifiziert werden. Die Lysyl Oxidase ist eine Aminoxidase aus der Familie der LOX-Proteine, die aus LOX und vier weiteren Lysyl Oxidase-like proteins (LOXL-1,-2,-3 und -4) besteht (Molnar et al. 2003). Funktionell betrachtet sind LOX-Proteine dabei Kupfer-abhängige, proteolytisch wirksame Enzyme, die das von Fibroblasten sezernierte lösliche Prokollagen-Molekül durch posttranslationale Modifikation und sogenanntes Kollagen-Crosslinking in unlösliches organisiertes Kollagen umwandeln. Durch diesen Mechanismus leisten sie einen entscheidenden Beitrag zur Bildung und Stabilisierung der extrazellulären Matrix (Li et al. 1999; Maki et al. 2002). LOX wird nach seiner Translation und anschließender Modifikation im Endoplasmatischen Retikulum als 50 kDa großes Propeptid in den Extrazellularraum sezerniert, wo es zum aktiven Enzym aktiviert wird. Hier erfolgt schließlich die LOX-katalysierte Stabilisierung der Kollagenmatrix durch das oben beschriebene Crosslinking der einzelnen Kollagen- und Elastin-Fibrillen (Smith-Mungo and Kagan 1998; Csiszar 2001). Die Lysyl Oxidase wirkt ihre Effekte jedoch nicht wie ursprünglich angenommen ausschließlich extrazellulär aus. So konnte nachgewiesen werden, dass LOX auch im Zytoplasma und im Zellkern von Fibroblasten einen wichtigen profibrotischen Mediator darstellt, indem LOX als aktiviertes Enzym aus dem Extrazellularraum zurück in intrazelluläre Kompartimente transloziert (Li et al. 1997; Kagan and Li 2003). Hier kann LOX viele Funktionen, darunter Adhäsion, Zellmigration und Genregulation der Bindegewebszellen, beeinflussen (Kagan and Li 2003). Wie wichtig die Lysyl Oxidase dabei für die Ausbildung der extrazellulären Matrix ist, verdeutlicht der experimentelle Knockout der LOX im Mausmodell. Diese Tiere litten durch fehlende Struktur extrazellulärer Proteine an zahlreichen pathologischen Veränderungen vieler Organe und des Herzkreislaufsystems, darunter Gefäßrupturen, Dissektionen und Gefäßfehlbildungen (Maki et al. 2002). Andererseits konnte aber auch die pathogenetische Bedeutung einer erhöhten Expression der Lysyl Oxidase in vielen Studien nachgewiesen werden. So sind zahlreiche durch fibrotischen Umbau gekennzeichnete Krankheiten wie die Leber-, Lungen- und Nierenfibrose durch eine deutlich vermehrte LOX-Expression und -Aktivität charakterisiert. Auch die pathologischen Veränderungen des Herzens, die mit strukturellem Remodeling einhergehen, zeigen deutlich erhöhte LOX-Gewebespiegel (Chen et al. 2005; Spurney et al. 2008; Lu and Mehta 2011). Aktuelle Studien belegen diesen Zusammenhang zwischen LOX-Expression und fibrotischem Remodeling

auch für Vorhofflimmern, hier wird der Lysyl Oxidase eine entscheidende Bedeutung für die Signaltransduktion der Vorhoffibrose im Rahmen von Vorhofflimmern zugesprochen (Adam et al. 2011).

## **2.4. MicroRNAs - Definition, Synthese und Funktion**

Die nur 20-25 Nukleotide langen MicroRNAs (miRNAs, miRs) sind kleine nicht-kodierende RNA-Moleküle, die eine bedeutende Rolle für die post-transkriptionale Genregulation spielen (Ambros 2004; Mattick and Makunin 2005).

MiRNAs sind in der Lage durch Bindung an komplementäre Sequenzen ihrer jeweiligen Ziel-mRNAs deren Proteinbiosynthese zu beeinflussen. Dieser Mechanismus wird als RNA-Interferenz bezeichnet, welcher der zielgerichteten Regulierung von Genen dient. Im Menschen konnten gegenwärtig bereits mehr als 700 unterschiedliche miRNAs identifiziert werden (Lagos-Quintana et al. 2002; Ibanez-Ventoso et al. 2008). MiRNAs gehören mit etwa 1 % der exprimierten Gene zu den größten Genfamilien überhaupt, was ihre Bedeutung deutlich unterstreicht (Berezikov et al. 2005). Obwohl viele Funktionen der miRNAs noch nicht vollständig verstanden sind und bisher nicht in vollem Umfang erforscht werden konnten, wurden in den letzten 10 Jahren bereits viele miRNAs als bedeutende Regulatoren und Modulatoren für zelluläre Prozesse wie Zellentwicklung, Wachstum und Proliferation beschrieben (Zhang et al. 2007; Bartel 2009).

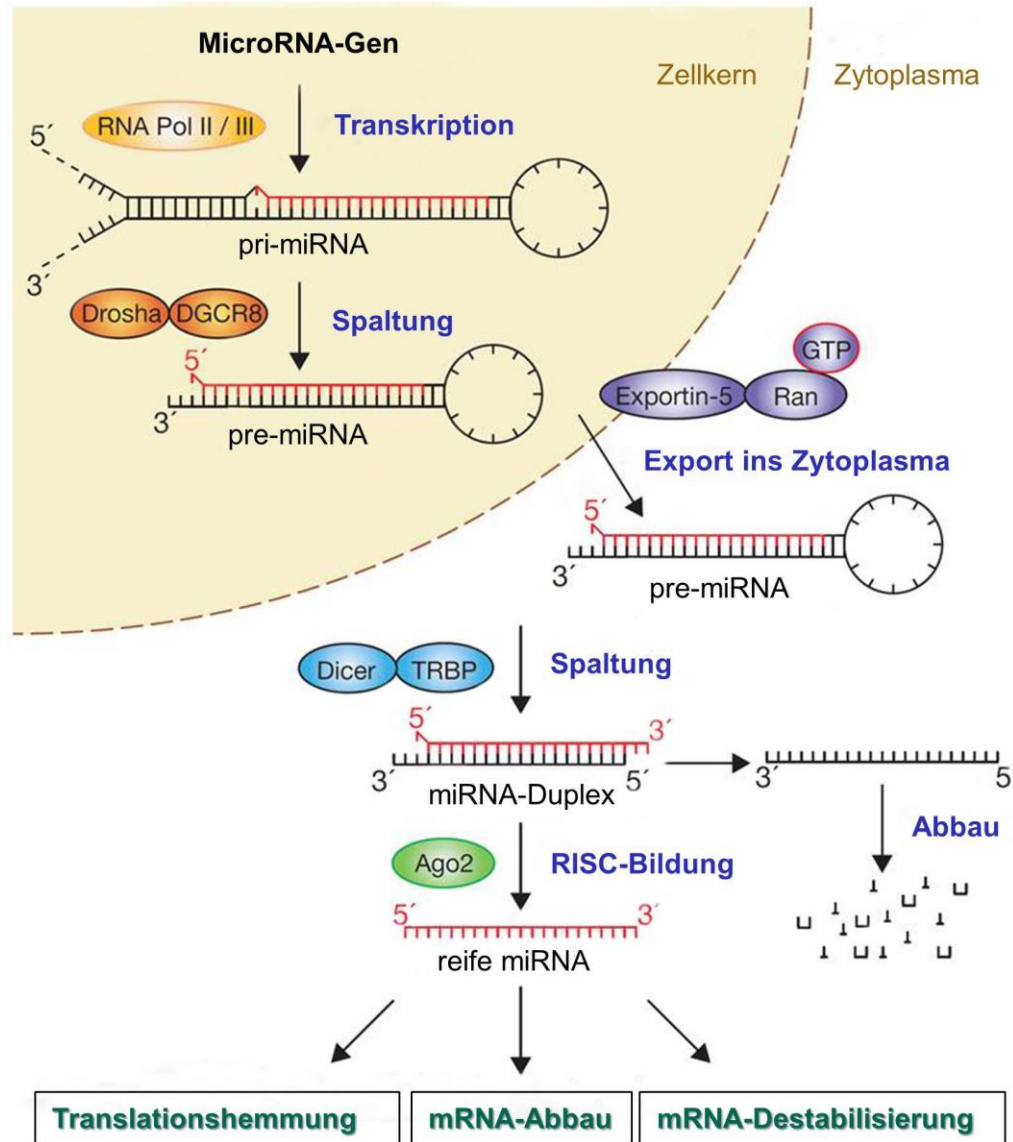
Die Synthese einer reifen MicroRNA ist ein in mehreren Schritten ablaufender Prozess, der sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma stattfindet (Abbildung 1). Die Transkription der miRNA-Sequenzen, die im Genom als einzelne Transkriptionseinheiten oder größere Cluster vorliegen, erfolgt durch die RNA-Polymerase II (Lee et al. 2004; Rodriguez et al. 2004). Diese bildet die mehr als tausend Basen umfassenden primary miRNAs (pri-miRNAs).

Die pri-miRNAs werden anschließend im Zellkern durch den Mikroprozessor-Komplex bestehend aus dem RNase-III-Enzym Drosha und dem Kofaktor DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8) zu sogenannten precursor-miRNAs (pre-miRNAs) weiter prozessiert (Lee et al. 2003; Kim 2005). Die Aktivität des Mikroprozessors ist ein entscheidender Schritt der miRNA-Synthese. Eine gezielte Suppression von Drosha oder DGCR8 in embryonalen Zellen der Maus führt so zu gestörter miRNA-Prozessierung mit der Folge von schweren Proliferations- und Differenzierungsdefekten (Wang et al. 2007; Feng et al. 2011).



Abbildung 1

Schaubild



**Abbildung 1: Drosha und Dicer sind die Schlüsselenzyme der Synthese und Prozessierung der miRNAs.**

Im Zellkern erfolgt die Transkription zum Primärtranskript (pri-miRNA) durch die RNA Polymerase II. Der Mikroprozessorkomplex bestehend aus dem Enzym Drosha und DGCR8 prozessiert das erste Transkript weiter zur Vorläufer-miRNA (pre-miRNA). Exportin-5 vermittelt den Transport ins Zytoplasma der Zelle. Dort wird durch den das Enzym Dicer die Haarnadelschleife der pre-miRNA entfernt, wodurch eine miRNA-Duplexstruktur entsteht. Die reife 20-25 Nukleotide lange miRNA wird in den RISC-Komplex inkorporiert, der das Gen-Silencing vermittelt. Bei vollständig komplementärer Zielsequenz kommt es zur Spaltung der Ziel-mRNA, bei nur partieller Komplementarität zur Hemmung der Translation (nach J. Winter et al 2009, Nature Cell Biology).

Die durch den Mikroprozessor gebildete pre-miRNA wird anschließend durch Exportin-5 mit dem Kofaktor Ran-GTP in einem aktiven Prozess aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert (Bohnsack et al. 2004; Lund et al. 2004). Die folgende Abspaltung der terminalen Haarnadelschleife der exportierten pre-miRNA wird durch das Enzym Dicer im Komplex mit den beiden Kofaktoren TRBP (TAR RNA binding protein) und PACT (PKR activation protein) ausgeführt (Ketting et al. 2001). Durch diesen Schritt entstehen etwa 20-25 Nukleotide lange miRNA-Duplexstrukturen. Dicer ist wie Drosha auch ein RNase-III-Enzym, das von fast allen eukaryonten Zellen exprimiert wird. Die Aktivität von Dicer ist dabei genau wie die Aktivität von Drosha essentiell für die Synthese der miRNA.

Nach der Prozessierung der miRNA durch Dicer kommt es zur Ausbildung eines Effektor-Komplexes namens RISC (RNA-induced silencing complex), der aus TRBP und den Kernstrukturen des RISC, den sogenannten Argonaut-Proteinen Ago 1, 2, 3 und 4, besteht (Gregory et al. 2005; Wang et al. 2009). Durch den RISC wird die miRNA-Duplex entwunden und schließlich als reife, einzelsträngige miRNA wieder in den Komplex eingebunden, während der Gegenstrang durch Nukleasen abgebaut wird (Hutvagner 2005). Die im RISC eingebundene miRNA vermittelt schließlich das RNA-Silencing. Je nach Komplementarität zwischen miRNA und der zu inhibierenden mRNA kommt es entweder zur direkten Spaltung der Ziel-mRNA oder lediglich zur Hemmung der Translation (Ameres et al. 2007; Bartel 2009).

Durch diese inhibierende Funktion scheinen miRNAs eine entscheidende Rolle für viele Prozesse in nahezu allen Zellen des Körpers spielen. So ist die Aktivität der miRNAs nachgewiesenermaßen eng assoziiert mit strukturiert ablaufendem Zellwachstum, Proliferation und Apoptose (Latronico et al. 2007). Nachdem die Schlüsselrolle der miRNAs für die Genexpression des Menschen inzwischen als erwiesen gilt, stellt sich in den letzten Jahren zunehmend die Frage nach der Bedeutung dieser regulatorischen RNAs bei Krankheiten und pathologischen Prozessen.

Zahlreiche Vorarbeiten, die die miRNA-Expression in verschiedenen Zellen des Herzens untersuchten, konnten zeigen, dass miRNAs auch für das Herzkreislaufsystem eine Schlüsselrolle bei der Entstehung pathologischer Veränderungen zu spielen scheinen. Bei Herzkrankheiten, die phänotypisch fibrotische Veränderungen und Hypertrophie zur Folge haben, zeigen sich so beispielsweise deutlich verminderte Expressionslevel an miRNA-133 und miRNA-30 im Gewebe des Herzens (Duisters et al. 2009). Für die miRNA-29, die vor allem in Fibroblasten vorkommt und die Bildung zahlreicher Proteine der extrazellulären Matrix inhibieren kann, wurden bei Patienten mit Herzinsuffizienz ähnliche Ergebnisse

ermittelt (van Rooij et al. 2008). Auch für die Entstehung der Vorhoffibrille im Rahmen des Vorhofflimmerns spielen verschiedene miRNAs, wie beispielsweise die miR-328 oder die miRNA-1, durch Induktion von elektrophysiologischen und strukturellen Veränderungen eine wichtige Rolle (Lu et al. 2010).

Am Ventrikel wurde die miRNA-21 als eine derjenigen miRNAs identifiziert, die nach dem Auftreten von kardialen Stress und Belastungen des Herzens am deutlichsten nach oben reguliert sind (van Rooij et al. 2006). In einer erst kürzlich veröffentlichten Arbeit konnten Thum et al. nachweisen, dass die miRNA-21 bei Herzinsuffizienz und dilatativer Kardiomyopathie in Fibroblasten der Ventrikel vermehrt exprimiert wird und hier zu verlängertem Überleben der ventrikulären Fibroblasten, vermehrter Bildung von extrazellulären Matrixproteinen und strukturellem Remodeling an den Herzkammern führt (Thum et al. 2008).

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass miRNAs wichtige Regulatoren für das kardiovaskuläre System und dessen pathologische Veränderungen darstellen. Besonders interessant sind dabei die Ergebnisse, die darauf hindeuten, dass eine einzige miRNA bereits in der Lage sein kann, kardiales Remodeling und seine Folgen auszulösen. Damit könnten potentielle neue Therapiemöglichkeiten durch spezifische Hemmung dieser miRNAs verbunden sein.

## **2.5 Eigene Fragestellung**

Vorhofflimmern stellt die häufigste Herzrhythmusstörung des Menschen dar und ist mit deutlich erhöhter Morbidität und Mortalität sowie einer gewaltigen sozioökonomischen Belastung verbunden. Trotz der großen Bedeutung des Vorhofflimmerns im kardiovaskulären System sind die molekularen Mechanismen und die Pathophysiologie, die zur Entstehung und zur Aufrechterhaltung der Rhythmusstörung beitragen, bisher nur unzureichend verstanden. Ein besseres Verständnis der Signaltransduktion, die schließlich zur fibrotischen Veränderung führt, ist notwendig um neue Präventions- und Therapiemöglichkeiten zu identifizieren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die zellulären Signalwege, die zu atrialem strukturellem Remodeling bei Vorhofflimmern führen, untersucht und die Bedeutung der miRNA-21 bei diesem Vorgang charakterisiert werden. Um diese Rolle zu klären, wird daher die Expression der miRNA-21 und von Sprouty1 im Vorhofgewebe von Patienten bei Vorhofflimmern und

im Sinusrhythmus untersucht. Im Folgenden soll überprüft werden, ob die miRNA-21-Expression entweder direkt durch bisher bekannte profibrotische Mediatoren beeinflussbar ist oder deren Expression möglicherweise selbst reguliert. In Zellkulturexperimenten an Fibroblasten soll anschließend die zur Fibrose führende Signaltransduktionskaskade der miRNA-21 näher charakterisiert werden, insbesondere unter dem Aspekt einer möglichen Beteiligung von Angiotensin II, der Rac1-GTPase und der Lysyl Oxidase. Schließlich gilt es, die so gewonnenen *in vitro*-Ergebnisse auch *in vivo* am Modell der Rac1-überexprimierenden Maus, welche spontan Vorhofflimmern entwickelt, zu verifizieren und potentielle Effekte einer Statin- und Antagomir-Behandlung auf die miRNA-21-Expression nachzuweisen.

### 3. Material und Methodik

#### 3.1. Materialien

##### 3.1.1. Antikörper

###### *Primärantikörper*

Produkt	Hersteller
$\alpha$ -sarcomeric Actin, Mouse IgM	Sigma-Aldrich Chemie, München
Rac1 (clone 23A8), Mouse IgG	Upstate cell signaling solutions, NY, USA
Dicer (sc-136979), Mouse IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Drosha (ab58589), Goat IgG	Abcam, Cambridge, UK
Sprouty1 (ab75492), Rabbit polyclonal	Abcam, Cambridge, UK
LOX (ab31238), Rabbit IgG	Abcam, Cambridge, UK
CTGF (L-20), Goat IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Vimentin, Mouse IgG	Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA
$\beta$ -Tubulin (H-235), Rabbit IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
GAPDH, Mouse IgG	Abcam, Cambridge, UK

###### *Sekundärantikörper*

Produkt	Hersteller
Goat Anti-Mouse IgG 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-Rabbit IgG	Dianova, Hamburg

### 3.1.2. Enzyme, Kits und Transfektionsmaterial

Produkt	Hersteller
cDNA-Klon für LOX (sc118674)	Origene Technologies, Rockville, USA
DC Protein Assay Reagent A	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
DC Protein Assay Reagent B	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, München
Fluoreszein-konjugierte siRNA (sc-36869)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Fluoreszein-konjugierter Vektor (PS100010)	Origene Technologies, Rockville, USA
Lipofectamine 2000 Transfection Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
MegaTran 1.0 Transfection Reagent	Origene Technologies, Rockville, USA
mirVana miRNA Isolation Kit (am1561)	Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA
Pankreatin	Sigma-Aldrich Chemie, München
TaqMan MicroRNA RT-Kit (PN4366596)	Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA
Sircol Kollagen-Assay-Kit	Biocolor Ltd., Carrickfergus, Northern Ireland, UK
siRNA-CTGF (sc-39330)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
siRNA-LOX (sc-156158)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
TaqMan PCR Master Mix (P/N 4304437)	Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA
TaqMan miR-21 microRNA assay	Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA
TaqMan small RNA molecule U6 assay	Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA
Transfektionskit	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

### 3.1.3. Medien, Lösungen und Puffer

Produkt	Zusammensetzung
ADS-Puffer	Aqua dest, 6,78 g/l NaCl, 4,76 g/l HEPES, 8 ml/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1 g/l Glukose, 0,4 g/l KCl, 8 ml/l MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
Citraconsäurepuffer 0,05 %	50 µl Citraconsäureanhydrid + 100 ml Aqua dest, pH 7,4 einstellen
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 ohne Zugabe von FKS (+ Glukose 4,5 g/l; + L-Glutamin; – Pyruvat), 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)
Protein-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	PMSF, 1 µg/ml Leupeptin, 0,72 µg/ml Aprotinin
1 % Trockenmilch	1 g Trockenmilchpulver in 100 ml PBS-Tween-Puffer
5 % Trockenmilch	5 g Trockenmilchpulver in 100 ml PBS-Tween-Puffer
PBS-Puffer	Aqua dest, 80 g/l NaCl, 2 g/l KCl, 14,4 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2,4 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4 einstellen
PBS-Tween-Puffer	Aqua dest, 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 0,24 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1,44 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1 ml/l Tween 20
PFA-Lösung	8 g Paraformaldehyd + 200 ml steriles 1xPBS, ~ pH 7,5 einstellen
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

### 3.1.4. Gele für Western Blot

Produkt	Zusammensetzung
SDS-Polyacrylamidgel 10 %ig (Proteine > 30 kDa)	<p>Sammelgel:</p> <p>30 % Acrylamid: 830 µl; Tris (pH 6,8): 630 µl; 10% SDS: 50 µl; Aqua dest.: 3,4 ml; 10% APS: 50 µl; TEMED: 5 µl</p> <p>Trenngel:</p> <p>30 % Acrylamid: 6,7 ml; Tris (pH 8,8): 5 ml; 10% SDS: 200 µl; Aqua dest.: 7,9 ml; 10% APS: 200 µl; TEMED: 8 µl</p>
SDS-Polyacrylamidgel 8 %ig (Proteine > 80 kDa)	<p>Sammelgel:</p> <p>30 % Acrylamid: 830 µl; Tris (pH 6,8): 630 µl; 10% SDS: 50 µl; Aqua dest.: 3,4 ml; 10% APS: 50 µl; TEMED: 5 µl</p> <p>Trenngel:</p> <p>30 % Acrylamid: 8,0 ml; Tris (pH 8,8): 5 ml; 10% SDS: 200 µl; Aqua dest.: 6,6 ml; 10% APS: 200µl; TEMED: 8 µl</p>



### 3.1.5. Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Cover Glasses	VWR International, Darmstadt
Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA
Falcon Cell Strainer (70 µm)	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
High Performance Autoradiography Film	GE Healthcare, München
MicroAmp-96-Well-Reaktionsplatten	Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA
Nitrocellulose/Filter Paper Sandwiches, 0,2 µm	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
P 6 Primera Zellkulturschalen	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
Polysine beschichtete Objektträger	VWR International, Darmstadt
PP-Testtubes (15 ml, 50 ml)	Greiner-bio.one, Frickenhausen
Cell Scraper	Sarstedt, Newton, USA
Wägeschale	VWR International, Darmstadt
Zellkulturschale 100 mm	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschale TC-plate 6 well	Greiner-bio.one, Frickenhausen

### 3.1.6. Chemikalien und sonstige Reagenzien

Produkt	Hersteller
Acrylamid Electrophoresis Purity Reagent 30%	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Agarose	Lonza, Basel, Schweiz
Albumin bovin Fraction V (BSA) pH 7,0	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Angiotensin II	Sigma-Aldrich Chemie, München
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie, München
BAPN	Sigma-Aldrich Chemie, München
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie, München
Connective Tissue Growth Factor (CTGF)	Biozol, Eching
Fluorescent Mounting Medium	Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium	Gibcco BRL Life Technologies, Eggenstein
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)	VWR International, Darmstadt
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie, München
Ethanol	Merck, Darmstadt



F 10-Medium	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Farbstoff Sirius RED F3BA	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Farbstoff Fast Green FCF	Appllichem GmbH, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FKS)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Futtermittel	ssniff, Soest, Germany
Gentamycinsulfat	Merck, Darmstadt
Glukose	Sigma-Aldrich Chemie, München
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie, München
Glycin	VWR International, Darmstadt
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie, München
High range marker	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Horse Serum	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Immersiosöl	Cargille Laborat., Inc., Cedar Grove, NJ, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenkarbonat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Low range marker	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Magermilchpulver	Scufin, Zeven
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Neonatal Calf Serum (NCS)	Invitrogen, Karlsruhe
NSC 23766	Merck, Darmstadt
Paraffin	Leica Microsystems, Nussloch
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie, München
Rosuvastatin (Crestor®)	AstraZeneca, London, UK
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Tris-hydroxymethyl-Aminomethan (Tris)	VWR International, Darmstadt
Triton	Sigma-Aldrich Chemie, München
Trypsin-EDTA	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Vectashield Mounting Medium with Dapi	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Wasser, vollentsalzt und destilliert (Aq dest)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

---

## 3.1.7. Geräte

Produkt	Hersteller
Autoklaviergerät Tuttnauer 3850 EL	Tuttnauer Europe B.V., Breda, Niederlande
Eismaschine Scotsman Frimont MF 22	Scotsman Frimont, Milano, Italien
Entwicklungsautomat Curix 60	Agfa, Mortsel, Belgien
Glas-Teflon-Potter	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Hamilton-Spritze	Hamilton Company, Reno, Nevada, USA
Magnetrührer Typ RCT	IKA Labortechnik, Staufen i. Br.
Metallblockthermostat HTMR-133	HLC Biotech, Bovenden, Deutschland
Mikroskop Nikon Eclipse E600	Nikon GmbH, Düsseldorf
Mikroskop Olympus CK 2 Inverted phase contrast	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Mikrotom	Leica Microsystems, Nussloch
Mini-Protean 3 Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mini-Protean Gelgießstand	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Nikon Digital Camera DXM1200F	Nikon GmbH, Düsseldorf
pH-Meter 526	WTW GmbH, Weilheim
Spectrophotometer DU 730	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Power Pac 200 Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
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
TaqMan System	Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA
Thermal Cycler	Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Vortexer VV3	VWR International, Darmstadt
Waage VIC-Series 0.01g Precision Balances	Acculab UK, Edgewood, NY
Waage ALC-Series 0.0001g Analytical Balances	Acculab UK, Edgewood, NY
Überkopfschüttler REAX 2	Heidolph Instruments, Schwabach
Zellkultur-Inkubator Heraeus 150	Heraeus Holding, Hanau
Zellkultur-Sicherheitswerkbank Heraeus KS 12	Heraeus Holding, Hanau
Zellkultur-Sicherheitswerkbank Heraeus HS 12	Heraeus Holding, Hanau
Zentrifuge Biofuge pico	Heidolph Instruments, Schwabach
Zentrifuge Megafuge 1,0	Heraeus Holding, Hanau

### 3.1.8. Software

Produkt	Hersteller
LabWorks, Version 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

## 3.2. Zellkultur

### 3.2.1. Isolierung und Kultivierung neonataler kardialer Rattenfibroblasten

Zur Isolation der kardialen Fibroblasten nutzten wir zwei bis fünf Tage alte Sprague-Dawley-Ratten (Custodis et al. 2006). Die sterile Präparation begann mit der Enthauptung der Ratten und der anschließenden Spülung des eröffneten Körpers mit 70 %igem Ethanol. Danach wurde der Thorax der Ratten links paramedian eröffnet. Dabei war es wichtig Verletzungen des Darms zu vermeiden, um bakterielle Kontaminationen der Zellen zu verhindern. Durch vorsichtige Massage des Brustkorbs wurde das Herz in die obere Thoraxapertur verlagert. Durch diesen Zugang war es möglich, die Gefäßverbindungen des Herzens zu durchtrennen, das Organ zu entnehmen und es schließlich in einer zuvor mit ADS-Puffer vorbereiteten 100 mm Zellkulturschale aufzufangen. Durch weiteres vorsichtiges Präparieren konnten nun perikardiales Gewebe, Gefäßstümpfe und die hier nicht zu präparierenden Vorhöfe entfernt werden. Das dadurch erhaltene Ventrikelpräparat wurde in eine neue Zellkulturschale mit frischem ADS-Puffer gegeben und dort in ungefähr 15-20 etwa gleich große Stücke zerteilt. Der ADS-Puffer wurde nach dem Schneiden mit der Pipette abgenommen und die so erhaltene Gewebssuspension mit 10 ml Enzym-Mix unter mehrmaligem Auf- und Abpipettieren in eine sterile Flasche überführt. Die Flasche mit dem erhaltenen Gewebelysat wurde dann fünf Minuten bei 37 °C in einem Schüttelwasserbad bei 80-100 U/min inkubiert. Nach diesem Schritt bildete sich ein Überstand, der möglichst ohne Mitnahme von Gewebstücken mittels einer Pipette abgenommen und verworfen wurde. Nach erneuter Zugabe von 10 ml Enzym-Mix in die Flasche wurde die Suspension für weitere 20 Minuten

im Schüttelwasserbad inkubiert. Danach wurde der Überstand in ein steriles 50 ml-Test-Tube-Gefäß überführt. Zum Überstand wurden nun 2 ml Neonatal Calf Serum (NCS) hinzugegeben, um die Aktivität der Enzyme zu stoppen. Das Gefäß wurde bei 700 U/min für fünf Minuten zentrifugiert, wodurch sich ein Zellpellet am Boden des Gefäßes bildete. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das verbliebene Pellet durch vorsichtiges Schütteln in 4 ml NCS resuspendiert. Die gerade beschriebenen Arbeitsschritte wurden anschließend noch weitere fünfmal wiederholt, allerdings mit unterschiedlichen Verdauungszeiten: 25 min; 25 min; 15 min; 10 min; 10 min. Nach Abschluss der letzten fünfminütigen Zentrifugation bei 700 U/min wurde der Überstand dann ein letztes Mal verworfen. Zu dem verbliebenen Zellzentrifugat wurden 4 ml F10-Medium gegeben und die Zellen durch vorsichtiges Schütteln resuspendiert. Die so erhaltenen 4 ml Zellsuspension wurden nun in einen Falcon Cell Strainer (70 µm) filtriert. Der Filter wurde vor und nach der Filtration mit je 1 ml F10-Medium gespült, sodass am Ende des Filtrationsvorgangs 6 ml Zellsuspension vorlagen. Das erhaltene Lysat wurde auf zwei 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und diese anschließend für 60 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt im Brutschrank inkubiert. Die Adhäsion der Fibroblasten am Schalenboden wurde dabei immer wieder mikroskopisch kontrolliert. Das Medium, in dem nun die Kardiomyozyten enthalten waren, wurde abpipettiert und in ein neues 50 ml Test-Tube-Gefäß überführt, um die Myozyten für andere Versuchsreihen nutzen zu können. Die durch Adhäsion von den Kardiomyozyten getrennten Fibroblasten wurden als p0-Generation in F10-Medium bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C weiter inkubiert.

Nach ungefähr zwei Tagen im Inkubator waren die Fibroblasten zu etwa 80-90 % konfluent, sodass die Zellen schließlich auf mehrere Zellkulturschalen (60 mm, 100 mm Zellkulturschale oder TC-6-Well-Platte) passagiert werden konnten. Ab dieser Passage p1 wurde DMEM-Nährmedium verwendet, welches etwa alle zwei Tage unter sterilen Bedingungen gewechselt werden musste. Wenn die Zelllinien soweit gewachsen waren, dass sie einen konfluenten Zellrasen bildeten, wurden sie durch Trypsinierung (0,25 % Trypsin in PBS-Puffer) subkultiviert. Dies war je nach Wachstumsgeschwindigkeit alle fünf bis sieben Tage notwendig.

Nachdem die Fibroblasten auf genügend Zellkulturschalen für den jeweiligen Versuch gesplittet waren und wieder ungefähr 80 %ige Konfluenz erreicht hatten, konnte das Nährmedium abgenommen und durch DMEM-Hungermedium ersetzt werden. Nach einer Inkubationszeit von etwa 24 Stunden wurden die Zellen direkt in DMEM-Hungermedium stimuliert. Genaue Angaben zur Stimulation folgen im nächsten Kapitel.

Nach erfolgter Stimulation der Fibroblasten wurde das Hungermedium abgesaugt und die Zellen mehrmals mit autoklaviertem 1×PBS gewaschen. Nun konnte die Zellernte eingeleitet werden. Durch Zugabe von 100 µl eines hypotonen Lysepuffers auf die Fibroblasten und durch Zuhilfenahme eines Zellschabers wurde der Zellverband auf Eis aufgelöst. Das Zelllysate wurde in Eppendorfgläser überführt und anschließend für vier Minuten auf 95 °C erhitzt. Dieser Schritt garantierte die Denaturierung der Proteine. Nun konnten die Bestimmung der Proteinkonzentration und danach die quantitative Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot durchgeführt werden. Das restliche Gesamtlysate wurde bei -20 °C eingefroren.

### 3.2.2. Stimulation der neonatalen kardialen Rattenfibroblasten

Um testen zu können, wie die Fibroblasten auf äußere Stimuli reagieren, wurden die kultivierten Zellen 24 Stunden mit DMEM-Hungermedium inkubiert. Danach wurde die zu testende Substanz in entsprechender Konzentration direkt dem Hungermedium zugegeben. Genaue Konzentration und Dauer der Stimulation waren dabei abhängig von der im jeweiligen Versuch eingesetzten Substanz. Die folgende Tabelle 1 listet die genauen Konzentrationen und Inkubationszeiten auf.

*Tabelle 1: zur Stimulation der Fibroblasten genutzte Substanzen*

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Dauer</b>
AngII	1 µM	3 Stunden
CTGF	1 ng/ml	1 Stunde
NSC	100 nM	24 Stunden
BAPN	100 nM	18 Stunden

### 3.3. Humane linksatriale Appendices

Die linksatrialen Appendices stammen von Patienten, die sich in der Klinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikums Homburg einer chirurgischen Mitralklappenoperation unterzogen. Das Gewebe wurde uns freundlicherweise von Prof. Joachim Schäfers zur Verfügung gestellt.

Alle Patienten wurden präoperativ elektrokardiographisch untersucht. Dabei wurden zwei Patientengruppen als Grundlage der späteren Versuchsreihe gebildet: Unterschieden wurden Sinusrhythmus und permanentes Vorhofflimmern, wobei permanentes Vorhofflimmern als dokumentierte Rhythmusstörung über mindestens drei Monate definiert wurde. Die Gruppen wurden außerdem nach Vorhofdurchmesser, linksventrikulärer Funktion und Medikation gepaart. Erfragt wurden auch weitere Parameter wie beispielweise Gewicht, Vorerkrankungen und Nikotinkonsum der Patienten. Alle Patienten erhielten präoperativ für mindestens zwölf Stunden keine Medikamente. Zusätzlich wurde jeder Patient vor der Operation einer standardisierten Echokardiographie unterzogen. Die bei der Operation entnommenen linksatrialen Appendices wurden zur Konservierung schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Zur quantitativen Analyse der Proben wurde ein kleines Gewebestück in hypotonem Lysepuffer mit Hilfe eines Glas-Teflon-Potters vollständig homogenisiert. Das Lysat wurde eine Minute bei 2000 U/min zentrifugiert. Danach konnte der Überstand zur weiteren Verwendung abgenommen werden. Das damit erhaltene Gewebelysat wurde entweder zur quantitativen Proteinbestimmung mittels Western-Blot-Analyse oder zur miRNA-Expressionsbestimmung mittels Polymerase-Kettenreaktion verwendet.

Alle Versuche an humanen linksatrialen Appendices wurden von der Ethik-Kommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt (No. 131/00). Die genauen Charakteristika der Patienten sind in der folgenden Tabelle 2 dargestellt.

*Tabelle 2: Patienten-Charakteristika der humanen linksatriale Appendices*

	SR	SEM	AF	SEM	P-Wert
n =	5		5		
männlich (weiblich)	4 (1)		4 (1)		
Alter [Jahre]	67,0	6,3	63,6	7,9	Ns
Größe [cm]	170,0	3,2	174,0	2,2	Ns
Gewicht [kg]	72,8	4,8	78,0	4,6	Ns
LA [mm]	54,2	2,2	55,4	1,8	Ns
LVEF [%]	59,2	5,6	61,0	5,8	Ns
LVESd [mm]	43,4	4,6	41,6	9,3	Ns
LVEDd [mm]	58,6	2,4	56,8	3,8	Ns
FS [%]	27,2	1,8	28,2	2,8	Ns

LVSD [mm]	11,0	1,0	11,8	0,4	Ns
LVPWd [mm]	11,2	1,1	11,6	1,1	Ns
Beta-Blocker	3		4		
ACE-Hemmer	5		5		
AT <sub>1</sub> -Antagonisten	0		0		
Kalzium-Antagonisten	1		1		
Diuretika	4		5		
Nitrate	0		0		
Digitalis	0		2		
Amiodaron	0		0		
Sotalol	0		0		
Statin	0		0		

ACE = Angiotensin Converting Enzyme, AT<sub>1</sub> = Angiotensin II-Rezeptor Typ 1, FS = Fraction of Shortening (Verkürzungsfraction), LVSD = interventrikuläre Septumdicke, LA = linker Vorhof, LVEDd = linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser, LVEF = Linksventrikuläre Ejektionsfraction, LVESd = linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser, LVPWd = diastolische Hinterwanddicke

### 3.4. Transgene Mäuse mit kardialer Rac1-Überexpression (RacET)

Die in unseren Versuchen eingesetzten RacET-Mäuse wurden erstmalig von Mark A. Sussman (San Diego State University, SDSU Heart Institute and Department of Biology, San Diego, California, USA) hergestellt. Er beschrieb auch die entscheidenden Charakteristika der RacET-Tiere (Sussman et al., 2000). Transgene RacET-Mäuse zeichnen sich durch kardiale Überexpression an konstitutiv aktivem (V12) Rac1, unter Kontrolle des alpha-myosin heavy chain (MHC)-Promotors, aus. Als Kontrolltiere dienten uns FVBN-Mäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld), die wir im Folgenden als Wildtyp (WT) bezeichnen. Im Alter von 10 Monaten hatten bereits 44 % der RacET-Mäuse Vorhofflimmern entwickelt, während im Vergleich dazu keine einzige Wildtyp-Maus von Vorhofflimmern betroffen war (Adam et al. 2007; Reil et al. 2010). Je nachdem welcher Versuchsgruppe die Mäuse zugeordnet wurden, fütterten wir einige der Tiere mit herkömmlichen Futter (sniff) oder aber mit herkömmlichen Futter plus Zusatz von 0,4 mg Rosuvastatin/Tag. Rosuvastatin wurde daher ausgewählt, da mit diesem Medikament in unserem Labor schon zahlreiche erfolgreiche Versuche in den

letzten Jahren durchgeführt wurden (Adam et al., 2007; Custodis et al., 2006). Alle Mäuse wurden zwei Mal elektrokardiographisch untersucht. Dokumentiert wurden Herzfrequenz, Herzrhythmus und die Existenz von P-Wellen im EKG. Außerdem wurde von allen Versuchsmäusen ein transthorakales Echokardiogramm angefertigt. Auch Lungen- und Leberperfusion wurden erfasst und definiert als Feuchtgewicht minus Trockengewicht.

Die Mäuse wurden im Alter von 10 Monaten getötet und anschließend ein Gewebestück des linken Ventrikels entnommen. Das Gewebe wurde in hypotonem Lysepuffer suspendiert und unter Zuhilfenahme eines Glas-Teflon-Potters homogenisiert. Aus dem Lysat konnte nun eine Proteinbestimmung nach Lowry und danach Western-Blot-Analysen durchgeführt werden. Außerdem wurde das Gewebelysat für miRNA-Expressionsanalysen genutzt.

Die Tierversuche erfolgten dabei unter Berücksichtigung der Richtlinien der „NIH and International Animal Care“. Die Versuche wurden von der Ethikkommission der Universität des Saarlandes genehmigt. Es erfolgte keinerlei Förderung durch die pharmazeutische Industrie.

### **3.5. Infarktmäuse zur Behandlung mit Antagomir-21**

Für diese Versuchsreihe wurden männliche C57BL/6-Mäuse im Alter von 8-10 Wochen eingesetzt. Die Mäuse wiesen zu Beginn des Versuchs nahezu identische Werte bezüglich Gewicht, Größe, Herzfunktion, Blutdruck und Herzfrequenz auf. Wir ordneten die Tiere zufällig jeweils einer von 3 Versuchs-Gruppen zu.

Die erste Gruppe bildeten Mäuse, die einer operativen Koronararterien-Ligatur unterzogen wurden (MI). Dabei wird durch den Verschluss der linken vorderen Koronararterie (LAD) ein Myokardinfarkt ausgelöst, der bei den betroffenen Mäusen in der Folge zu atrialer Fibrose führt (Fiedler et al. 2011). Auch bei den Mäusen der zweiten Gruppe wurde durch den oben beschriebenen Eingriff ein Infarkt ausgelöst. Diesen Tieren wurde aber zusätzlich sofort und 48 Stunden nach dem operativen Eingriff Antagomir-21 (80mg/kg/d) retroorbital verabreicht (MI+Antag21). Die dritte Gruppe diente als Kontrollgruppe und bestand aus Mäusen, bei denen lediglich der Brustkorb geöffnet, aber keine Ligatur und damit keine aktive Veränderung am Herz-Kreislaufsystem durchgeführt wurde (SHAM).



Die Versuchsreihe wurde von der Ethikkommission der Universität des Saarlandes genehmigt und berücksichtigte die Richtlinien des US National Institute of Health (NIH Pub. No. 85-23, 1996). Es erfolgte keinerlei Förderung durch die pharmazeutische Industrie.

## **3.6. Transfektionen**

### **3.6.1. siRNA-Transfektion**

Um die genauen Zusammenhänge in der Signaltransduktion von kardialen Rattenfibroblasten besser verstehen zu können, entschlossen wir uns dazu eine Synthesehemmung der beiden wichtigen Effektoren LOX und CTGF in den Zellen durchzuführen. Dies erreichten wir durch Transfektion der Zellen mit den entsprechenden siRNAs (small interfering RNA) für LOX und CTGF. Durch die siRNAs wird eine mRNA-Zielsequenz spezifisch degradiert (Silencing), womit eine verminderte Expression des entsprechenden Proteins erreicht wird. Genutzt wurden je nach Versuch LOX-spezifische Sequenzen (siRNA-LOX; sc-156158, Santa Cruz) oder CTGF-spezifische Sequenzen (siRNA-CTGF; sc-39330, Santa Cruz), sowie unspezifische Fluoreszin-konjugierte siRNA (scrambled siRNA; sc-36869, Santa Cruz) zur Kontrolle des Transfektionserfolgs.

Vor der eigentlichen Transfektion musste der Transfektions-Mix für die jeweiligen Fall- und Kontrollproben hergestellt werden, der dann zur Transfektion in die Zellkulturschalen auf die Fibroblasten aufgetragen wurde. Die Reaktions-Lösung für die Kontroll-siRNA setzte sich zusammen aus 2 µl Kontroll-siRNA, 2 µl Transfektionsreagenz und 200 µl Transfektionsmedium pro Transfektion, die Reaktions-Lösung für die LOX-siRNA und die CTGF-siRNA bestand aus 6 µl der jeweiligen siRNA, 6 µl Transfektionsreagenz und 200 µl Transfektionsmedium. Die Lösungen wurden nach Mischen 30 Minuten im Dunkeln inkubiert und anschließend durch Zugabe von Transfektionsmedium auf 800 µl aufgefüllt und resuspendiert.

Die kardialen Rattenfibroblasten, die wir für die Transfektion einsetzen, wurden in 6-Well-Zellkulturplatten kultiviert bis sie nahezu konfluent waren. Die Zellen wurden dann zweimal mit jeweils 1 ml Transfektionsmedium gewaschen und anschließend für 7 Stunden mit den jeweils 800 µl der siRNA-Transfektionslösung pro Well inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Transfektions-Mix von den Zellen abgenommen und die Fibroblasten für etwa 24 Stunden mit je 2 ml DMEM-Nährmedium im Brutschrank weiter

kultiviert. Anschließend wurden die Zellen weitere 24 Stunden gehungert, bevor je nach Versuch weitere Substanzen zur Stimulation auf die Fibroblasten aufgetragen werden konnten. Genaue Angaben zu Konzentrationen und Dauer der Stimulation können Kapitel 3.2.2. entnommen werden. Nach Ende der Inkubationszeit konnten die Zellen geerntet werden, um danach entweder die Proteinexpression im Western-Blot oder die miRNA-Expression mittels PCR zu bestimmen.

### 3.6.2. cDNA-Transfektion

Vor der Durchführung der eigentlichen Transfektion mussten sowohl der cDNA-Klon für LOX (sc118674, Origene) als auch der Fluoreszein-konjugierte, leere Vektor zur Kontrolle des Transfektionserfolgs (PS100010, Origene) durch Zugabe von 100 µl sterilem H<sub>2</sub>O resuspendiert und die Lösung anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Die im Versuch eingesetzten neonatalen Rattenfibroblasten sollten für die Transfektion laut Herstellerprotokoll zu etwa 60-80 % konfluent sein.

Im ersten Schritt der eigentlichen Transfektion galt es den Komplex aus cDNA-Lösung und MegaTran1.0-Transfektionsreagenz herzustellen, der dann im folgenden Schritt zum DMEM-Medium ohne Serum auf die Zellen hinzugegeben wurde. Entsprechend der Herstellerangaben liefert hier ein Verhältnis DNA/Transfektionsreagenz von 1:3 die besten Ergebnisse. Der Komplex wurde in einem 0,5 ml-Eppendorfgefäß zusammenpipettiert und setzte sich schließlich für jede zu transfizierende Zellkulturschale zusammen aus 100 µl DMEM-Medium, 30 µl der cDNA (entspricht 3 µg cDNA) und 90 µl MegaTran1.0-Transfektionsreagenz. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur konnte der Komplex direkt zu den 1,8 ml DMEM-Hungermedium, das wir bereits frisch auf die Zellen vorgelegt hatten, hinzugegeben werden. Dabei hielten wir uns genau an die Empfehlungen des Herstellers, der hier ein Verhältnis zwischen DNA-MegaTran1.0-Komplex/Nährmedium von 1:10 als optimal vorschlägt. Die Transfektionszeit betrug 36 Stunden, danach wurde die Transfektionslösung entfernt und durch 2 ml neues DMEM-Nährmedium ersetzt. Die Fibroblasten wurden dann für etwa 24 Stunden im Brutschrank kultiviert. Danach konnten die Zellen geerntet werden, um anschließend die Proteinexpression im Western-Blot untersuchen zu können.

### 3.6.3. pre-miR21- und anti-miR21-Transfektion

Zur Transfektion nutzten wir, wie bei allen Transfektionsversuchen, isolierte kardiale Rattenfibroblasten. Wir transfizierten einen Teil der Zellen mit einem Präkursor der miRNA-21 (pre-miR21, Ambion), um die miRNA21-Expression der Zellen zu erhöhen, und die restlichen Fibroblasten mit einem Inhibitor der miRNA-21 (antiMiR21, Ambion), um deren Expression zu hemmen. Als Transfektionsreagenz verwendeten wir Lipofectamin 2000 (Invitrogen). Bei der Durchführung der Transfektion gingen wir genau nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll vor. Die Zellen sollten für die Transfektion mit Lipofectamin 2000 etwa 90 % konfluent sein.

Der erste Schritt der Transfektion bestand in der Lösung von je 3 µg preMiR21 oder 3 µg antiMiR21 in 250 µl DMEM-Medium ohne Serum für jedes Well der 6-Well-Platte. Im nächsten Schritt wurde in einem separaten Eppendorfgefäß Lipofectamin 2000 im laut Hersteller optimalen Verhältnis zur DNA von 3:1, in unserem Versuch also 10 µl, ebenfalls in 250 µl DMEM ohne Serum gelöst und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der 5 minütigen Inkubation konnten die DNA- und die Lipofectamin 2000-Lösung kombiniert werden, was damit ein Gesamtvolumen von 500 µl der fertigen Transfektionslösung ergab. Diese wurde gründlich gevortext und weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, ehe die Transfektionslösung direkt zum frisch auf die Zellen aufgetragenen Hungermedium hinzugefügt werden konnte. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt im Brutschrank für 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsmedium gegen neues DMEM-Medium ohne Serum ausgetauscht und die Zellen weitere 36 Stunden im Inkubator kultiviert, ehe sie für die Analyse der Proteinexpression im Western Blot geerntet werden konnten.

## 3.7. Proteinexpression und Western Blot

Der Western-Blot ist eine seit langem etablierte molekularbiologische Methode, um Proteine quantitativ zu bestimmen, indem ein vorher gewonnenes Gesamtproteingemisch aus Zelllysaten zunächst elektrophoretisch aufgetrennt wird. Dabei macht man sich das unterschiedliche Wanderungsverhalten verschiedener Proteine in elektrischen Feldern zunutze, um die Proteine separieren zu können. Dieses Verhalten im elektrischen Feld

begründet sich dadurch, dass unterschiedliche Proteine verschiedene Molekulargröße, Nettoladung und Konformation haben.

Zu Beginn wird ein Gesamtproteinlysate auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und durch Anlegen eines elektrischen Feldes elektrophoretisch aufgetrennt. Die so im Gel aufgetrennten Proteine werden von dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, von diesem Schritt leitet sich auch der Name „Blot“ ab. Diese Membran wird im Anschluss mit einem möglichst spezifischen, gegen das gesuchte Protein gerichteten Antikörper inkubiert. Nach dem Abwaschen der ungebundenen Antikörper wird in einem zweiten Schritt ein Peroxidase-konjugierter sekundärer Antikörper zugegeben, der an den konstanten Teil des vorher aufgetragenen Primärantiköper binden kann. Wieder werden die ungebundenen Antikörper abgewaschen und anschließend ein Substrat auf die Membran gegeben, das mit der Peroxidase reagiert und dadurch zu fluoreszieren beginnt. Die Fluoreszenz kann mit Hilfe eines Röntgenfilmes detektiert werden. Das so erhaltene Signal kann im letzten Schritt durch Densitometrie quantifiziert werden.

### 3.7.1. Proteinbestimmung nach Lowry

Zunächst wurde bei jedem verwendeten Gesamtlysate (aus den geernteten Fibroblasten, aus den Gewebeproben der RacET-Mäuse und aus Gewebe der humanen linksatrialen Appendices) der Gesamtproteingehalt bestimmt. Dies erfolgte nach der kolorimetrischen Methode nach Lowry (LOWRY et al., 1951), die eng mit der Biuret-Methode verwandt ist. Das Verfahren läuft in zwei grundlegenden Schritten ab. Zunächst wird dabei in alkalischer Lösung ein Kupfer-Protein-Komplex gebildet, der dann im nächsten Schritt ein appliziertes Phosphomolybdat-Phosphowolfram-Reagens reduzieren kann, was eine intensive Blaufärbung bewirkt. Die Konzentration an Proteinen der jeweiligen Lösung ist dabei proportional zur Intensität ihrer Blaufärbung. Diese kann durch photometrische Messung der Absorption bei 540 nm ermittelt werden, als Standard dient bei dieser Messung Rinderserumalbumin im Konzentrationsbereich von 100-1000 µg/ml.

Zu Beginn der Proteinbestimmung wurde das zu messende Lysate im Verhältnis 2:20 mit H<sub>2</sub>O verdünnt (2 µl Probe + 18 µl Aq dest). Anschließend wurde die verdünnte Lösung in zwei Schritten zunächst mit 100 µl Reagens A (Bio-Rad, D<sub>c</sub> Protein Assay Reagent A), dann mit 800 µl Reagens B (Bio-Rad, D<sub>c</sub> Protein Assay Reagent B) versetzt und gevortext. Die Lösung wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, ehe schließlich die Absorption der Proben bei 540nm gegen einen Leerwert (20 µl Aq dest, 100 µl Reagens A, 800 µl Reagens B)

photometrisch bestimmt wurde. Von jeder Probe wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt, um dadurch eventuelle Schwankungen der Proteinkonzentration herausmitteln zu können.

### 3.7.2. Gelelektrophorese

Zunächst wurden je nach zu detektierendem Protein 10 %ige oder 8 %ige Gele gegossen, entscheidend für die Wahl des Gels war dabei jeweils das Molekulargewicht des zu detektierenden Proteins. Die Anpassung der Porengröße der Gele ist wichtig für die Trennschärfe der einzelnen Proteinbanden. Wir verwendeten 8 %ige Gele für Proteine mit einem MG > 70 kDa und 10 %ige Gele für Proteine mit einem MG von 30-70 kDa. Zur Herstellung der Gele wurden die dafür nötigen Substanzen im richtigen Verhältnis gemischt, die genaue Zusammensetzung der jeweiligen Gele wird unter Punkt 3.1.5. beschrieben. Die Aushärtung der SDS-Polyacrylamid-Gele erfolgte mit Hilfe von Glasplatten und Spacern. Dadurch erreichten wir, dass die Dimensionen der Gele immer einheitlich bei 16 cm x 16 cm x 1,5 mm mit jeweils 10 Spuren für die Proben lagen.

Da wir die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben bereits nach der Lowry-Methode bestimmt hatten, konnten wir die ermittelten Werte heranziehen, um eine quantitative Proteinäquivalenz der Proben zu gewährleisten. Damit wurde sichergestellt, dass in jede Spur genau gleich viel Gesamtprotein geladen wurde, falls nicht anders angegeben immer genau 100 µg Protein. Dazu wurden jeweils 100 µg des Proteinlysats mit einer äquivalenten Menge Ladepuffer versetzt (5 µl Mercapto-Ethanol pro 100 µl Probenpuffer). Das Protein-Ladepuffer-Lysat wurde kurz gevortext, für 7 Minuten auf 70 °C erhitzt und schließlich vorsichtig mit einer Pipette auf das SDS-Polyacrylamidgel geladen. Um die gesuchten Banden später auch identifizieren zu können, wurde ein gültiger Marker parallel zu den Proben in die jeweils erste oder letzte Spur des Gels appliziert. Dafür wurde entweder ein High Range Marker im MG-Standardbereich von 36-205 kDa oder ein Low Range Marker im MG-Standardbereich von 6-66 kDa eingesetzt.

Die mit den Proben beladenen SDS-Polyacrylamidgele wurden schließlich in eine Elektrophorese-Kammer gegeben, diese mit Elektrophoresepuffer gefüllt und ein elektrisches Feld mit einer Stromstärke von 30 mA angeschlossen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine bis zur maximalen Selektivität des Gels dauerte ungefähr 180 Minuten.

### 3.7.3. Protein-Transfer

Nach der Gelelektrophorese erfolgte die Übertragung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran, also der eigentliche Blotting-Vorgang. Dies gelang durch Einsatz der Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell der Firma Bio-Rad unter Zugabe einer genügenden Menge von Transferpuffer und zwei Filtern. An diese Blotting-Kammer wurde ein elektrisches Feld mit der Stromstärke 200 mA angelegt. Nach 45 Minuten im elektrischen Feld der Kammer wurde die Nitrozellulose-Membran entfernt und anschließend für etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur in eine 5 %ige Milchpulver-Wasser-Lösung gelegt, um damit die freien Bindungsstellen auf der Oberfläche der Membran zu blocken.

### 3.7.4. Antikörperinkubation

Um die geblotteten Proteine auf der Membran nachweisen und quantifizieren zu können, wurden die proteinbeladenen Nylonmembranen anschließend mit einem spezifischen Antikörper über Nacht bei 4 °C unter langsamen Schütteln inkubiert. Nach mindestens 12 Stunden Inkubationszeit wurden die Membranen mehrmals mit 1xPBS-Tween und 1xPBS gewaschen, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen. Ein zweiter, Peroxidase-konjugierter Antikörper gegen den konstanten Teil des Primärantikörpers wurde appliziert und die Membranen nochmals für 30 Minuten bei Raumtemperatur dynamisch inkubiert. Wieder wurde die Membran mit PBS-Tween-Puffer und 1xPBS abgewaschen, um auch die ungebundenen Sekundärantikörper zu entfernen.

Nun waren nur noch an den gesuchten Proteinbanden Primär- und Sekundärantikörper gebunden, die wir mit dem ECL-Kit (enhanced chemiluminescence, GE Healthcare) auf Röntgenfilmen sichtbar machen konnten. Die an den Sekundärantikörper gebundene Peroxidase bewirkte dabei mit den Reagenzien des Kits eine Chemilumineszenz-Reaktion, die eine Röntgenfilmschwärzung im Bereich der gesuchten Banden bewirkte. Die Filme wurden anschließend in der Dunkelkammer mithilfe des Curix-Entwicklersystems sowie AGFA-Entwickler-Reagenzien entwickelt und die Aufnahmen danach densitometrisch quantifiziert. Die Intensität der Röntgenfilmschwärzung des Western-Blots ist proportional zum Proteingehalt des detektierten Proteins. Die so auf dem Film sichtbar gewordenen Banden wurden mittels Densitometrie am PC ausgewertet. Hierzu verwendeten wir das Programm Labworks in der Version 4.6 (Labworks, UVP Inc.).

Tabelle 3 und Tabelle 4 geben Auskunft über die genauen Konzentrationen der in den Versuchen verwendeten Antikörper.

*Tabelle 3: verwendete Primärantikörper*

Antikörper	Konzentration	Dauer	Gel
Sprouty1	1:1000	über Nacht	10 %
LOX	1:200	über Nacht	10 %
Rac1	1:1000	über Nacht	10 %
CTGF	1:250	über Nacht	10 %
Drosha	1:500	über Nacht	8 %
Dicer	1:100	über Nacht	8 %
Tubulin	1:500	über Nacht	entsprechend
GAPDH	1:10000	über Nacht	entsprechend

*Tabelle 4: verwendete Sekundärantikörper*

Antikörper	Konzentration	Dauer
Anti-mouse	1:5000	20 min
Anti-goat	1:5000	30 min
Anti-rabbit	1:4000	30 min

### 3.8. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Analyse der miRNA-Expression nutzen wir die Polymerasekettenreaktion, die durch den Einsatz spezifischer Oligonukleotide (=Primer, Sonden) genau definierte Genabschnitte nachweisen kann. Im ersten Schritt muss dazu zuerst möglichst spezifisch die miRNA aus den untersuchten Zellen isoliert werden. Die so extrahierte miRNA muss danach unter Einsatz des Enzyms Reverse Transkriptase in die komplementäre cDNA-Sequenz umgeschrieben werden, da die folgenden Reaktionsschritte der Polymerasekettenreaktion an DNA durchgeführt werden.

Das durch die Reverse Transkription erhaltene cDNA-Syntheseprodukt wird im nächsten Schritt im TaqMan-System (Applied Biosystems) durch kontrolliertes Erhitzen aufgetrennt. Die so aufgetrennten cDNA-Stränge dienen dann in den folgenden Syntheseschritten als Matrize für die dazu passenden Primer der Gene, die untersucht werden sollen. Nach der Anlagerung der Primer an den passenden cDNA-Strang replizieren hitzestabile DNA-Polymerasen den betreffenden Genabschnitt. So entstehen doppelsträngige Hybridisierungsprodukte. Durch zyklisches Erhitzen und Abkühlen im TaqMan-Gerät wird diese Reaktion danach vielfach automatisch wiederholt. Damit wird das gesuchte DNA-Fragment sequenzgleich exponentiell vermehrt und kann anschließend quantitativ gemessen werden.

### 3.8.1. miRNA-Isolation

Vor der Durchführung der Polymerasekettenreaktion galt es, die in den kultivierten Fibroblasten oder Gewebeproben enthaltene miRNA zu isolieren. Hierzu nutzen wir das mirVana miRNA Isolation Kit (Applied Biosystems) und gingen genau nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll vor. Die Isolation begann mit der Applikation von je 300 µl Lysis-Puffer (RNA-Isolutionslösung) in die Zellkulturschale oder in ein Eppendorfgefäß mit einem Gewebestück. Danach mussten die Zellen mit einem Zell-Schaber geerntet beziehungsweise das Gewebe mit einem Glas-Teflon-Potter homogenisiert werden. Als nächstes wurde zu jeder Probe 30 µl miRNA Homogenate Additive gegeben und das Lysat-Gemisch 10 Minuten auf Eis inkubiert. Daran anschließend folgte die eigentliche Extraktion der RNAs durch die Zugabe von 300 µl Chloroform in jedes Gefäß, gründliches Vortexen und 10 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Proben wurden danach mindestens 5 Minuten bei 10000 U/min zentrifugiert. Dies bewirkte eine Auftrennung der gelösten Makromoleküle, in jedem Eppendorfgefäß konnten nun zwei Phasen unterschieden werden: die obere eher wässrige Phase enthielt die RNA, die basale Phase enthielt DNA und Proteine. Daher wurde die obere Phase mit den darin enthaltenen RNAs und miRNAs vorsichtig in ein frisches Eppendorfgefäß überführt.

In den folgenden Schritten wurde durch zweimalige Zugabe von unterschiedlich konzentriertem Ethanol und zweimaligem Filtrieren durch einen Fiberglas-Filter sichergestellt, dass die miRNA konzentriert und von der RNA getrennt wurde.

Zuerst wurden dafür 100 µl 100 %iger Ethanol zu dem abgenommenen Überstand gegeben und die Lösung in einer Zentrifuge 15 Sekunden bei 10000 U/min durch einen Fiberglas-



Filter filtriert. Der Filter wurde daraufhin verworfen, in ihm waren nun die größeren RNAs enthalten. Der Durchfluss wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und diesmal mit 200 µl 100 %igem Ethanol versetzt. Wieder wurde das Lysat-Ethanol-Gemisch bei gleicher Einstellung der Zentrifuge durch einen neuen Filter filtriert. Diesmal waren die miRNAs im Filter angereichert und der Durchfluss konnte verworfen werden. Dreimaliges Waschen des Filters mit den im Kit mitgelieferten Waschlösungen 1 und 2 reicherterte die miRNAs noch weiter im Filter an. Im letzten Schritt musste nun die miRNA nur noch aus dem Filter gelöst werden, was durch Zugabe von 100 µl 95 °C heißer Elution-Lösung mit anschließendem Zentrifugieren für 30 Sekunden bei 10000 U/min erreicht wurde. Die so gewonnenen miRNA-Isolate konnten anschließend bei -20 °C gelagert werden.

### 3.8.2. Reverse Transkription (RT)

Da DNA das Substrat für die Polymerasekettenreaktion darstellt, muss die aus den zu untersuchenden Zellen extrahierte miRNA erst in komplementäre cDNA-Sequenzen umgeschrieben werden. Dies wird durch die Reverse Transkription ermöglicht, bei der das Enzym Reverse Transkriptase diese Reaktion katalysiert. Dabei verwendeten wir ein RT-Kit (TaqMan MicroRNA RT-Kit, Applied Biosystems), welches alle für die Reverse Transkription nötigen Substanzen enthielt. Weiterhin gingen wir genau nach dem für das Kit entwickelten Protokoll vor.

Zuerst wurden die isolierte miRNA-Lösung, die einzelnen Substanzen aus dem RT-Kit und die passenden komplementären Primer der nachzuweisenden Gene (miRNA-21 RT-Primer und Rnu6-2 RT-Primer, Applied Biosystems) langsam auf Eis aufgetaut, danach gevortext und zentrifugiert. Dann konnten in 0,5 ml-Eppendorfgefäßen die Reaktionslösungen nach Protokoll zusammenpipettiert werden. Jede der Proben setzte sich zusammen aus 5 µl miRNA-Isolat, 3 µl Primer-Sonde komplementär zur gesuchten RNA und 7 µl eines RT-Master-Mix. Dieser bestand pro 7 µl Master-Mix aus 4,16 µl Aqua dest, 1,5 µl RT-Buffer, 0,15 µl dNTP, 0,19 µl RNase-Inhibitor und 1 µl Multiscribe RT-Enzym.

Die Proben wurden in den Thermocycler gegeben, in dem durch eine temperaturgesteuerte Reaktion die eigentliche Reverse Transkription ablaufen kann. In dem Gerät wurden die Proben zu Beginn für 60 Minuten auf 37 °C erhitzt, wodurch die Reverse Transkription von RNA in cDNA gestartet wurde. Nach einer Stunde wurde die Reaktion durch fünfminütiges Erhitzen der Ansätze auf 95 °C beendet, da die Reverse Transkriptase bei diesen

Temperaturen denaturiert wird. Schließlich erfolgte noch eine 5-minütige Kühlung der Proben auf 4 °C. Das so gewonnene cDNA-RT-Produkt wurde zur Lagerung bei -20 °C eingefroren.

### 3.8.3. Real-Time-PCR

Ziel der q-PCR ist es, genau wie bei der herkömmlichen PCR auch, bestimmte Gene zu amplifizieren. Die q-PCR ermöglicht aber zusätzlich dazu eine gleichzeitig ablaufende Quantifizierung der so gewonnenen DNA. Dies wird durch den Einsatz von fluoreszierenden Farbstoffen erreicht, die mit der amplifizierten DNA interkalieren. Fluoreszenzmessungen am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus detektieren das Signal, dessen Intensität sich proportional zur Anzahl der PCR-Produkte verhält. Verwendet haben wir den DNA-bindenden Farbstoff SYBR Green I, der als ungebundene Form in der Reaktionslösung nur sehr schwach fluoresziert. Bei Interaktion mit doppelsträngiger DNA während der Amplifikation wird die Fluoreszenz aber deutlich verstärkt und kann so mit einer Kamera im TaqMan-Gerät gemessen werden. Damit kann die PCR zeitnah analysiert und die PCR-Progression sogar noch während der Reaktion ausgewertet werden. Für jede Probe erstellt das Gerät einen sogenannten Amplification-Plot, der Fluoreszenzsignal und Zyklusnummer vergleicht und graphisch abbildet. Außerdem wird der  $C_T$ -Wert (Zyklusnummer, bei der das Fluoreszenzsignal eine definierte Schwelle überschreitet) ermittelt.

Die cDNA-Proben, der Zielgen-Primer (miRNA-21, Applied Biosystems), der Referenzgen-Primer (Rnu6-2, small RNA molecule, Applied Biosystems) und ein für die Reaktion notwendiger TaqMan PCR Master-Mix (Applied Biosystems) wurden langsam auf Eis aufgetaut. Danach wurden die PCR-Reaktionslösungen direkt in jedes Well der bis zu 96 Proben umfassenden Reaktionsplatte zusammenpipettiert. Jede einzelne Probe setzte sich schließlich zusammen aus 10 µl Master-Mix, 1,33 µl cDNA-RT-Produkt, 1 µl des Primers und 7,67 µl Aqua dest. Damit waren in jedem Well genau 20 µl Reaktionslösung enthalten. Schließlich wurden die PCR-Ansätze mit einer Folie abgedeckt, zentrifugiert und die Platte in das korrekt konfigurierte Taq-Man-System (Applied Biosystems) gegeben.

Abschließend erfolgte die Bestimmung der quantitativen Genexpression nach der oben beschriebenen komparativen  $C_T$ -Methode. Dabei wird die relative Effizienz von Zielgen- und Referenzgen-Amplifikation berechnet und aufeinander bezogen. Verglichen wurde also die miRNA-21-Expression mit der Expression des Housekeeping-Gens Rnu6-2.

### 3.9. Immunfluoreszenzanalysen

Die für diese Arbeit angefertigten Immunfluoreszenzanalysen wurden alle an Paraffinschnitten von isolierten linksatrialen Appendices durchgeführt. Das Gewebe wurde zur Fixierung zunächst über Nacht bewässert. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Entwässerung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol. Die Appendices wurden in Paraffin eingelegt und schließlich am Mikrotom 5  $\mu\text{m}$  dünne Schnitte angefertigt, die auf einen Objektträger aufgetragen wurden. Um eine bessere Adhäsion der Paraffinschnitte am Objektträger zu erreichen, wurden diese auf 60 °C erhitzt.

Die so hergestellten Schnitte wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen Vimentin zur Anfärbung von Fibroblasten,  $\alpha$ -sarkomerisches Aktin zur Anfärbung von Kardiomyozyten und gegen Sprouty1 inkubiert. Zellkerne wurden mittels DAPI blau angefärbt. Die gegen die Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper waren FITC- oder TRITC-konjugiert (FITC = grüne, TRITC = rote Fluoreszenz). Als Negativkontrolle dienten Paraffinschnitte, die ausschließlich mit diesen Sekundärantikörpern inkubiert wurden. So konnten auch eventuell auftretende unspezifische Bindungen ausgeschlossen werden.

#### 3.9.1. Sprouty1-Immunfluoreszenzfärbung

Zunächst wurden die Paraffinschnitte in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und danach mehrmals in destilliertem Wasser gewaschen. Zur Demaskierung der Antigenstrukturen wurden die Schnitte in eine Plastikkuvette mit 0,05 %igem Citraconsäurepuffer (pH 7,4) gegeben und darin im Wasserbad eine Stunde auf 98 °C erhitzt. Anschließend wurden die Objektträger für 20 Minuten abkühlen gelassen und zwei Mal für 5 Minuten mit PBS-Tween gewaschen. Nach zehnmütiger Blockung in SSC-Puffer mit 0,5 % BSA in der Feuchten Kammer bei 37 °C erfolgte die Inkubation mit dem Sprouty1-Antikörper in einer Konzentration von 1:20 in der Blocking-Lösung. Dafür applizierten wir etwa 60-75  $\mu\text{l}$  BSA-Spouty1-Antikörper-Lösung auf jeden Schnitt und inkubierten die Schnitte über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank. Am nächsten Tag wurden die Objektträger für zwei Stunden in einer Feuchten Kammer im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden danach dreimalig mit 4x SSC-Puffer plus 0,01 % Tween abgewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper FITC-anti-rabbit-IgG im Verhältnis 1:15 in SSC-Puffer für eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad. Wiederum wurden die ungebundenen

Antikörper durch dreimaliges Waschen für 5 Minuten mit SSC-Puffer und PBS-Tween entfernt. Im Anschluss konnten die Paraffinschnitte entweder gegen Vimentin oder gegen  $\alpha$ -sarkomerisches Aktin weiter gefärbt werden.

### 3.9.2. Vimentin-Immunfluoreszenzfärbung

Nach der Sprouty1-Färbung führten wir weitere Fluoreszenzfärbungen der Schnitte als Gegenfärbung durch, um die verschiedenen Zelltypen des Vorhofgewebes unterscheiden und die Lokalisation von Spouty1 bestimmen zu können. Dazu färbten wir bei einem Teil der Schnitte Fibroblasten an. Dabei erfolgte die Inkubation mit Primärantikörpern gegen Vimentin im Verhältnis 1:30 gelöst in PBS-Tween-Puffer. Die Antikörper wurden über Nacht bei 4 °C auf den Schnitten belassen. Am darauffolgenden Tag wurden die Gewebeschnitte zunächst für zwei Stunden in einer Feuchten Kammer im Wasserbad bei 37 °C weiter inkubiert. Die ungebundenen Antikörper wurden anschließend mit PBS-Tween-Puffer abgewaschen. Danach wurden die Sekundärantikörper TRITC-anti-mouse-IgG im Verhältnis 1:30 in PBS-Tween-Puffer auf die Schnitte aufgetragen und diese eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Wieder wurden ungebundene Sekundärantikörper mit PBS-Tween abgewaschen. Schließlich konnten die Schnitte mit Dapi und Mounting Medium eingedeckt werden.

### 3.9.3. $\alpha$ -sarkomerisches Aktin-Immunfluoreszenzfärbung

Statt durch Vimentin-Färbung die Fibroblasten anzufärben, konnte auch die Färbung von  $\alpha$ -sarkomerischem Aktin, das in Myozyten vorkommt, zur Gegenfärbung genutzt werden. Hierzu wurden die Gewebeschnitte zunächst in SSC-Puffer gewaschen und im Anschluss in SSC-Puffer mit 4 % BSA für 10 Minuten bei 37 °C im Wasserbad geblockt. Direkt in diese Blocklösung wurden dann die Primärantikörper gegen  $\alpha$ -sarkomerisches Aktin im Verhältnis 1:30 gegeben. Nach der Inkubation über Nacht im Kühlschrank bei 4°C wurden die Objektträger zunächst wieder für zwei Stunden in die Feuchte Kammer im Wasserbad bei 37°C gegeben. Danach wurden die ungebundenen Antikörper mit SSC-Puffer abgewaschen. Die Schnitte wurden im nächsten Schritt mit dem Sekundärantikörper TRITC-anti-mouse-IgM im Verhältnis 1:50 in SSC-Puffer für eine Stunde bei 37 °C in der Feuchten Kammer im

Wasserbad inkubiert. Im letzten Schritt wurden auch diese Gewebeschnitte mit Dapi und Mounting Medium eingedeckt.

#### 3.9.4. Digitalisieren der Fluoreszenzfärbungen

Die Floreszenz-Färbungen wurden am Lichtmikroskop NIKON Eclipse E600 mit einer Digitalkamera erfasst und anschließend mittels der Software Lucia G digitalisiert und aufbereitet.

### 3.10. Immunhistochemische Kollagen-Färbung

Die angefertigten immunhistochemischen Färbungen von Kollagen wurden an Paraffinschnitten von isolierten linksatrialen Appendices der Herzen von Infarkt- und Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Die Anfertigung der Schnitte erfolge dabei genau wie bereits in Kapitel 3.8. beschrieben, die Schnittdicke am Mikrotom war mit 10  $\mu\text{m}$  hier aber etwas dicker. Die Paraffinschnitte wurden mit Sirius Red F3BA angefärbt, einem spezifischen Indikator für Kollagen-Komponenten. Nicht-Kollagen-Anteile konnten durch Fast Green FCF angefärbt werden. Anschließend wurden die Aufnahmen der gefärbten Paraffinschnitte am Lichtmikroskop NIKON Eclipse E600 mit einer Digitalkamera erfasst. Sie wurden mittels der Software Lucia G digitalisiert und aufbereitet.

### 3.11. Statistische Auswertung

Die im Ergebnisteil vorgestellten Daten werden immer als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Unpaired Student's t Tests und Mann-Whitney Rank Sum Test wurden für einfache Vergleiche angewendet, während bei mehrfachen Vergleichen ANOVA und Newman-Keuls post-hoc analysis als statistische Tests eingesetzt wurden. Hierzu verwendeten wir die Software Sigma Stat (Version 2.0). Statistische Signifikanz wurde für  $p < 0,05$  angenommen.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Die miRNA-21-Expression ist bei Vorhofflimmern in humanem Vorhofgewebe erhöht**

Am Anfang unserer Arbeit stand die Frage, ob die miRNA-21 ähnlich wie am Ventrikel auch am Vorhof bei strukturellem Remodeling im Rahmen von Vorhofflimmern überhaupt von Bedeutung ist. Dafür galt es zunächst festzustellen, ob die Expression der miRNA-21 bei Vorhofflimmern verändert ist. Um dies zu überprüfen, führten wir TaqMan-PCR-Analysen der miRNA-21-Expression an Vorhofgewebe von Patienten im Sinusrhythmus und Patienten mit Vorhofflimmern durch. Die hierzu verwendeten linksatrialen Appendices stammten von Patienten, die sich in unserer Klinik einer Mitralklappenoperation unterzogen haben. Bereits vor dem operativen Eingriff wurden diese Patienten elektrokardiographisch in Sinusrhythmus (SR, n=5) oder permanentes Vorhofflimmern (AF, n=5) unterschieden.

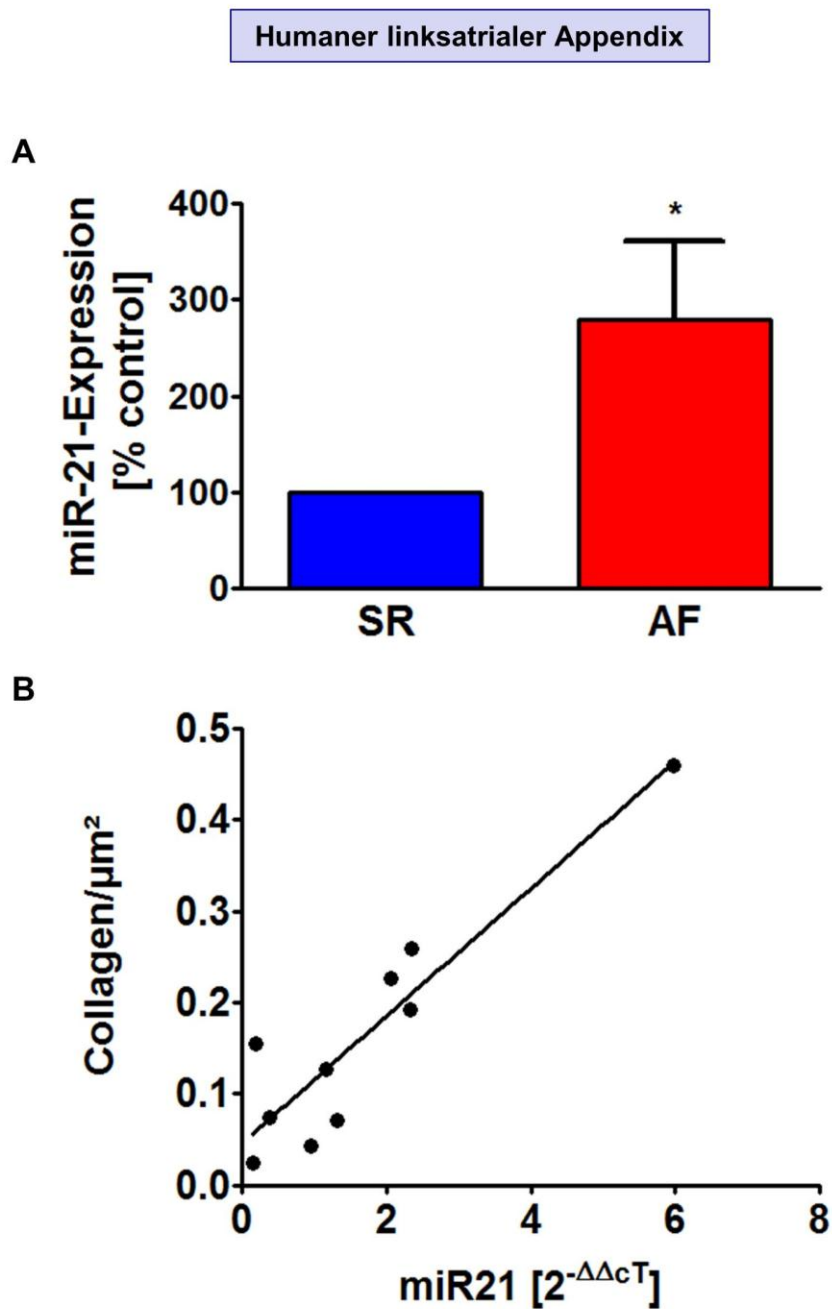
Wir konnten zeigen, dass die miRNA-21 Expression im linksatrialen Gewebe bei Vorhofflimmern deutlich erhöht ist auf  $280 \pm 81$  % verglichen mit Gewebe bei Sinusrhythmus ( $p=0,008$ , Abbildung 2A).

Die Expression der miRNA-21 korrelierte in unserer Analyse außerdem mit dem Kollagengehalt der untersuchten Vorhöfe. Je höher die miRNA21-Expression war, desto mehr Kollagen war insgesamt im Vorhofgewebe der Patienten enthalten ( $r=0,9201$ ,  $p=0,0002$ , Abbildung 2B).

### **4.2. Die Sprouty1-Expression ist bei Vorhofflimmern in humanem Vorhofgewebe vermindert und ist negativ korreliert zur miRNA-21-Expression**

Nachdem wir im vorherigen Versuch zeigen konnten, dass die miRNA-21 in Vorhofgewebe bei Vorhofflimmern vermehrt exprimiert wird, galt es nun zu untersuchen, ob auch die Sprouty1-Proteinexpression als potenzielles Downstream-Substrat Veränderungen unterliegt. Dazu führten wir an unseren humanen Vorhöfen Western-Blot-Analysen für Sprouty1 durch.

Abbildung 2



**Abbildung 2: Patienten mit Vorhofflimmern zeigen eine erhöhte Expression von miRNA-21.**

(A) Gewebeproben des humanen linksatrialen Appendix von Patienten im Sinusrhythmus (SR) und im Vorhofflimmern (AF) wurden durch TaqMan-PCR auf miRNA-21 untersucht. Bei Patienten mit Vorhofflimmern ist die miRNA-21-Expression verglichen mit Patienten im Sinusrhythmus erhöht ( $280 \pm 81\%$ ,  $p=0,008$ ). (B) Die Expression der miRNA-21 korreliert außerdem mit dem Kollagengehalt der untersuchten linken Vorhöfe ( $r=0,9201$ ,  $p=0,0002$ ).



In der Vorhofflimmer-Gruppe zeigte sich eine statistisch signifikante Verminderung der Sprouty1-Expression auf  $56 \pm 9\%$  ( $p=0,002$ , Abbildung 3).

Um den Zusammenhang zwischen miRNA-21-Expression und Sprouty1-Expression besser darstellen zu können, verglichen wir die Ergebnisse der TaqMan-Analyse auf miRNA-21 und des Western-Blots für Sprouty1 der einzelnen Proben direkt miteinander. Wir konnten dabei eine negative Korrelation zwischen miRNA-21-Expression und Gehalt an Sprouty1 nachweisen ( $r=-0,733$ ,  $p=0,02$ , Abbildung 4) und damit belegen, dass hohe miRNA-Expressionsraten mit verminderter Sprouty1-Expression einhergehen.

### **4.3. Sprouty1 wird in linken Vorhöfen bei Sinusrhythmus vermehrt in kardialen Fibroblasten exprimiert**

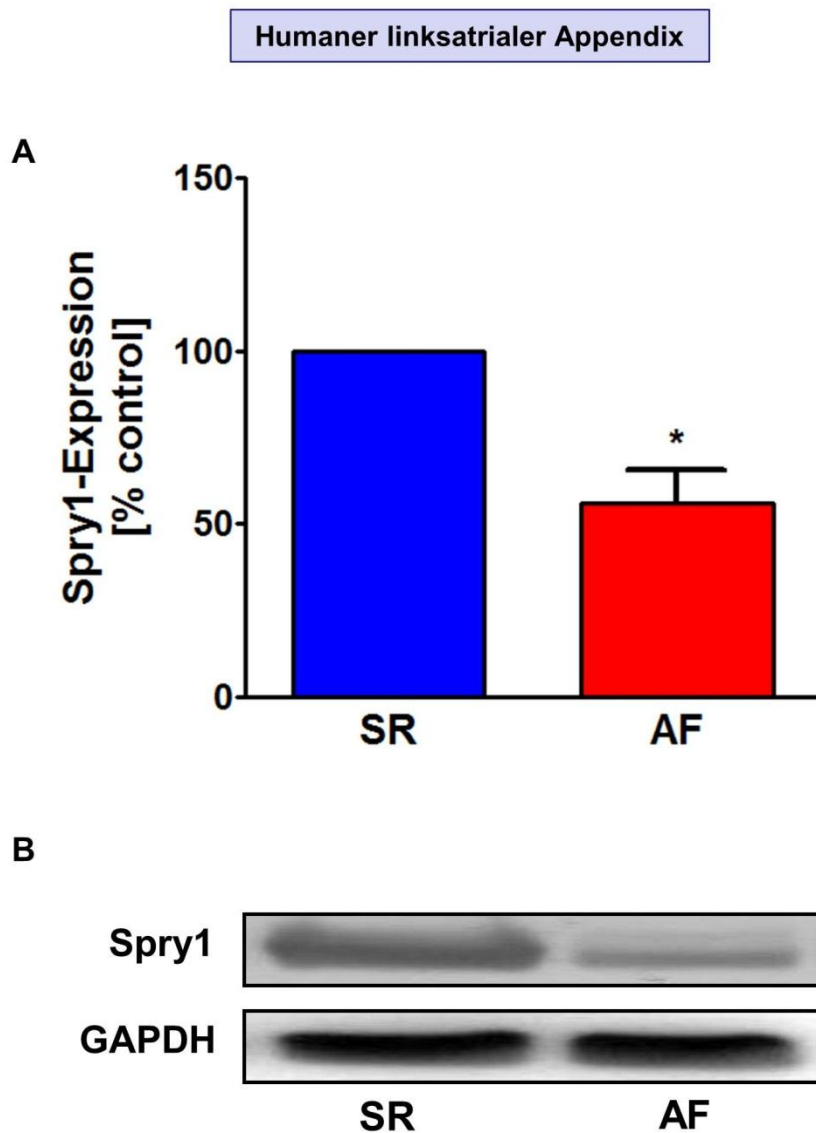
Da die in den bisherigen Versuchen eingesetzten linksatrialen Gewebeproben Lysate aus allen im linken menschlichen Vorhof vorkommenden Zellentypen darstellten, untersuchten wir im nächsten Schritt mittels immunhistochemischen Färbungen, in welchen Zellen des Herzens Sprouty1 überhaupt exprimiert wird. Dazu wurden Paraffinschnitte aus humanem Vorhofgewebe im Sinusrhythmus und bei Vorhofflimmern angefertigt, welche daraufhin mit Sprouty1-Antikörpern inkubiert wurden. Als Sekundärantikörper diente FITC-konjugiertes anti-rabbit IgG. Als Gegenfärbung färbten wir bei der Hälfte der Schnitte Kardiomyozyten mit Antikörpern gegen  $\alpha$ -sarkomerisches Aktin an. Bei der anderen Hälfte der Schnitte wurden Fibroblasten mit Antikörpern gegen Vimentin, einem Intermediärfilamentprotein von Zellen mesenchymalen Ursprungs, spezifisch angefärbt. Alle Paraffinschnitte wurden mit TRITC-konjugierten Sekundärantikörpern inkubiert. Zellkerne wurden mittels DAPI blau angefärbt.

Bei der mikroskopischen Untersuchung der Schnitte zeigte sich, dass Sprouty1 überwiegend in Fibroblasten exprimiert wird, wohingegen Myozyten nur sehr wenig Sprouty1 exprimieren. Weiterhin konnten wir mit den Immunfluoreszenzaufnahmen nachweisen, dass Spouty1 in den Vorhöfen im Sinusrhythmus signifikant stärker exprimiert wird als in den flimmernden Vorhöfen (Abbildung 5).

Bei der Analyse der Vimentin-gefärbten Schnitte konnten wir außerdem zeigen, dass eine hohe Proteinexpression von Sprouty1 mit verminderter fibrotischer Veränderung bei insgesamt deutlich weniger Fibroblasten und geringerem Vimentin-Gehalt der Vorhöfe einhergeht.



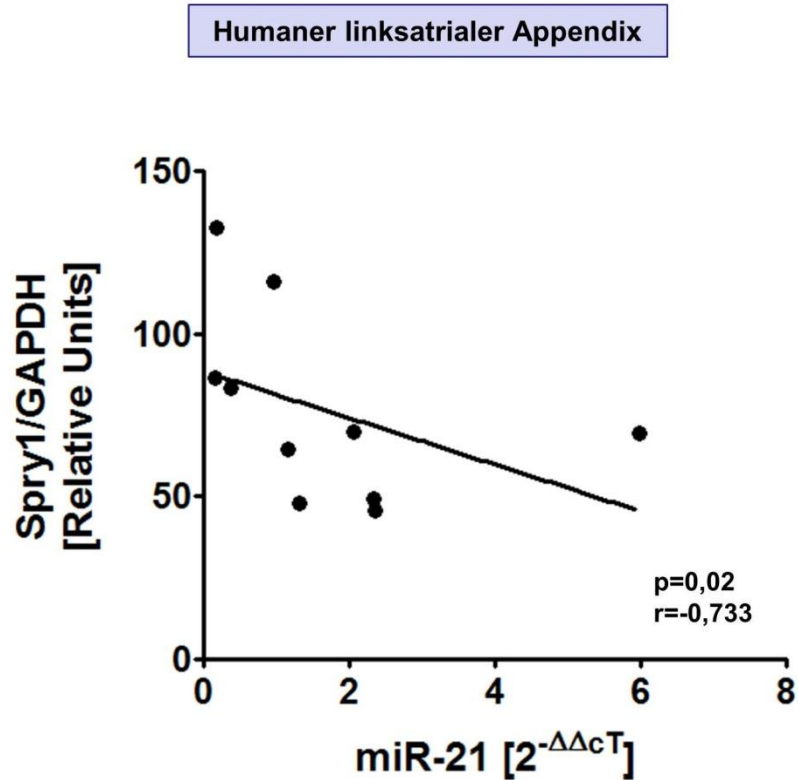
Abbildung 3



**Abbildung 3: Patienten mit Vorhofflimmern zeigen eine verminderte Expression von Sprouty1.**

Gewebeproben des humanen linksatrialen Appendix von Patienten im Sinusrhythmus (SR) und im Vorhofflimmern (AF) wurden mittels Western Blot analysiert. **(A)** Die densitometrische Quantifizierung, normiert auf GAPDH als Proteinladekontrolle, zeigt eine Verminderung der Sprouty1-Expression auf  $56 \pm 9 \%$  ( $p=0,002$ ) in der Vorhofflimmer-Gruppe gegenüber der Gruppe im Sinusrhythmus. **(B)** Repräsentativer Sprouty1-Western Blot verglichen mit der entsprechenden GAPDH-Proteinladekontrolle.

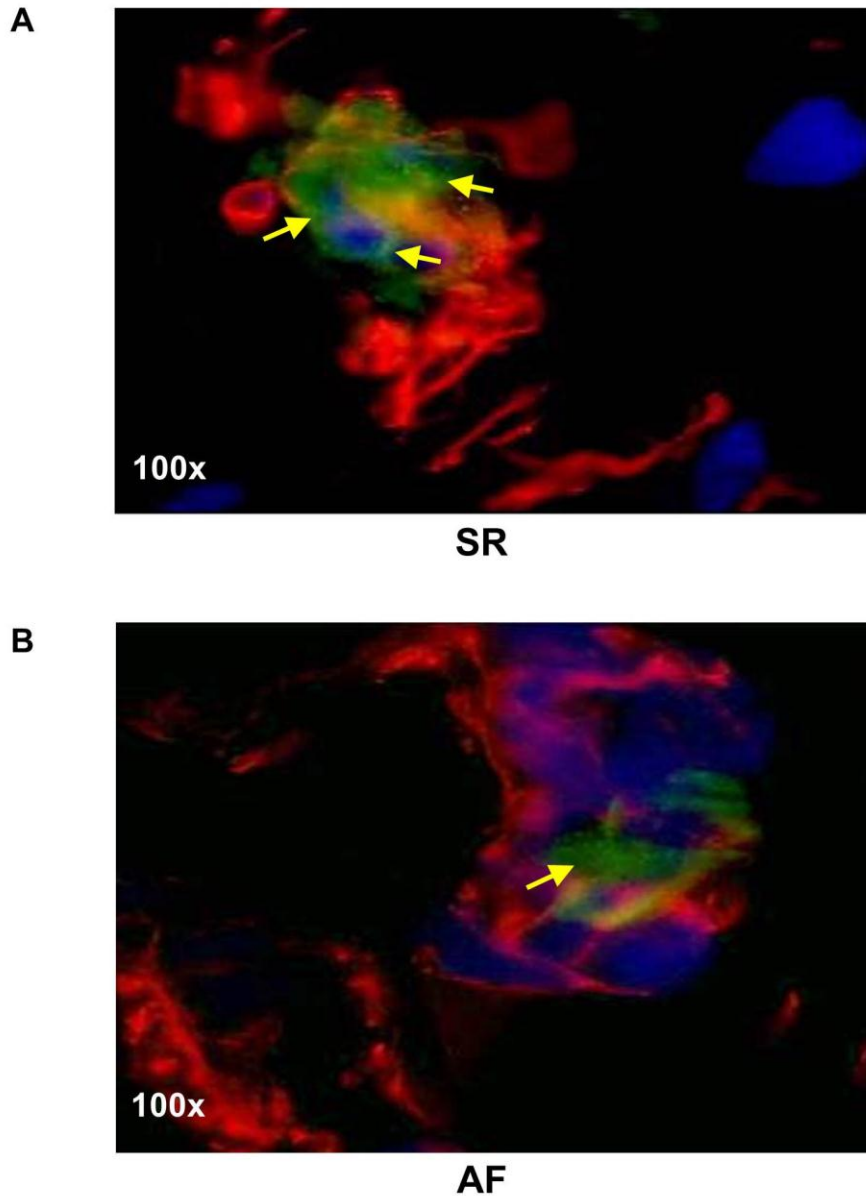
Abbildung 4



**Abbildung 4: Eine erhöhte miRNA-21-Expression ist negativ mit dem Proteingehalt an Sprouty1 korreliert.**

Verglichen wurden Expression von miRNA-21 mittels TaqMan-PCR und die Expression von Sprouty1 im Western Blot der entsprechenden Proben von Patienten im Vorhofflimmern und im Sinusrhythmus. Dabei zeigte sich eine negative Korrelation zwischen miRNA-21-Expression und Gehalt an Sprouty1 ( $r=-0,733$ ,  $p=0,02$ ). Eine hohe Expression der miRNA-21 geht mit verminderten Expression von Sprouty1 einher.

## Humaner linksatrialer Appendix



**Abbildung 5: Die Expression von Sprouty1 ist bei Patienten im Sinusrhythmus verglichen mit Patienten im Vorhofflimmern erhöht.**

Repräsentative Immunfluoreszenz-Aufnahmen von linken Vorhöfen in 100-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung; sichtbar sind Sprouty1 (FITC, grün; gelbe Pfeile), der Marker für Fibroblasten Vimentin (TRITC, rot) und Zellkerne (DAPI, blau). Die Bilder der linksatrialen Appendices zeigen, dass Sprouty1 in den Vorhöfen im Sinusrhythmus (**A**) höher exprimiert ist als in den flimmernden Vorhöfen (**B**). Außerdem ist zu erkennen, dass Sprouty1 nahezu ausschließlich in kardialen Fibroblasten exprimiert wird.

#### **4.4. Angiotensin II, Rac1, CTGF und LOX als profibrotische Mediatoren korrelieren mit der miRNA-21-Expression in linken Vorhöfen**

Vorherige Arbeiten konnten eine Verbindung zwischen der Fibrose des linken Vorhofs und erhöhten Angiotensin II-Gewebespiegeln sowie einer erhöhten Proteinexpression der profibrotischen Mediatoren Rac1, CTGF und LOX herstellen (Adam et al. 2007; Adam et al. 2010; Adam et al. 2011).

Die hier durchgeführten Assoziationsstudien zeigten eine positive Korrelation zwischen der Expression der miRNA-21 und dem Gehalt an Angiotensin II ( $r=0,9526$ ,  $p<0,0001$ , Abbildung 6A), der Rac1-Expression ( $r=0,9462$ ,  $p<0,0001$  Abbildung 6B), der CTGF-Expression ( $r=0,8755$ ,  $p=0,0009$  Abbildung 6C) und der LOX-Expression ( $r=0,8155$ ,  $p=0,0040$  Abbildung 6D).

#### **4.5. Die miRNA-21-Expression hat keinen Einfluss auf die Expression von Angiotensin II, Rac1, CTGF und LOX im Zellkulturmodell**

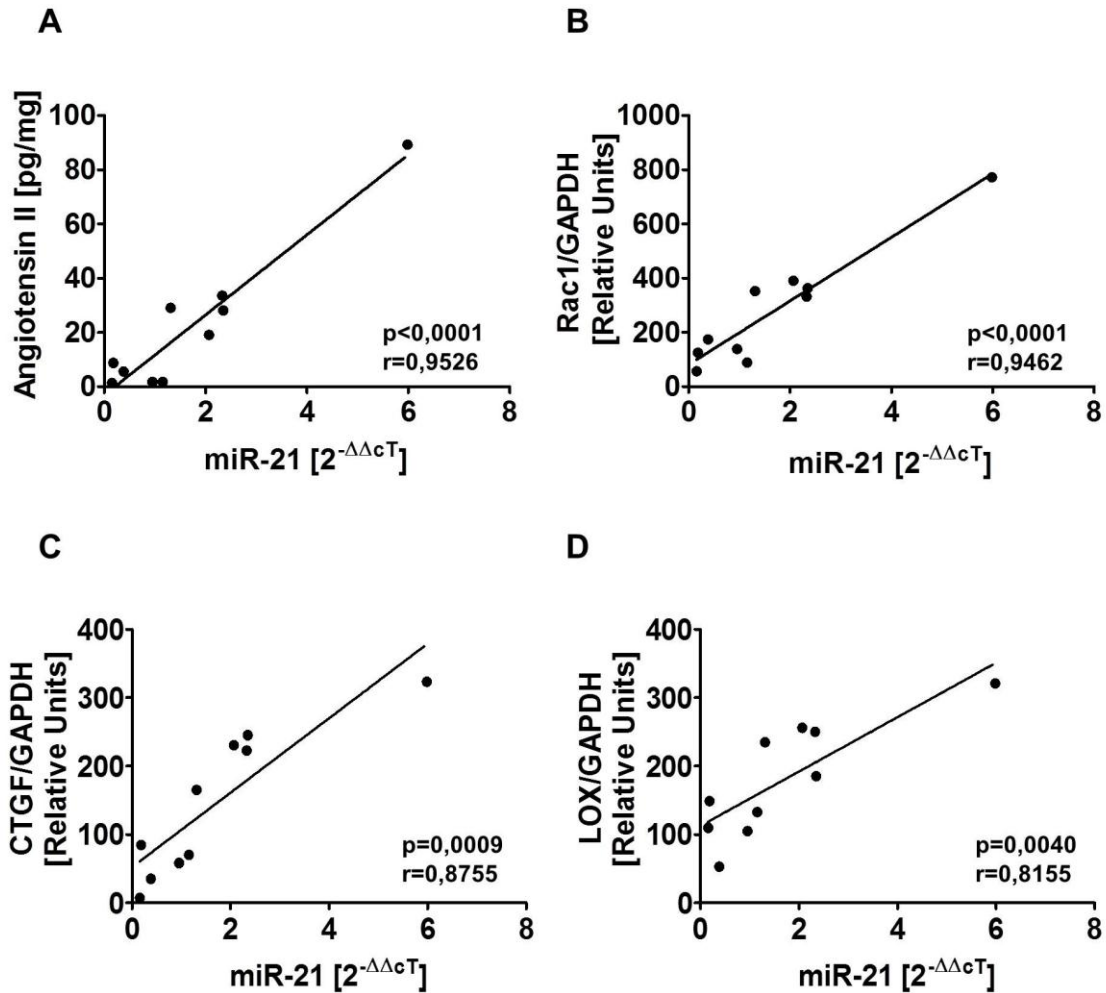
Die bisher durchgeführten Versuche deuteten darauf hin, dass die miRNA-21 und ihr Downstream-Target Sprouty1 neben den bisher bekannten profibrotischen Mediatoren eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion der Fibrose im Rahmen von Vorhofflimmern spielen könnten. Anhand eines Zellkulturmodells galt es nun zu untersuchen, auf welche Weise die miRNA-21 an der Pathogenese der fibrotischen Veränderung beteiligt ist.

Um den zugrundeliegenden Pathomechanismus zu identifizieren, wurden neonatale kardiale Rattenfibroblasten mit einem miRNA-21-Inhibitor (anti-miR-21) oder einen miRNA-21-Präkursor (pre-miR-21) transfiziert. Drei Tage nach der Transfektion kontrollierten wir den Transfektionserfolg, indem wir die miRNA-21-Expression quantitativ mittels TaqMan-Analyse untersuchten. Die Expression der miRNA-21 war bei den anti-miR-21 behandelten Fibroblasten auf 50-70 % reduziert, bei den pre-miR-21 behandelten Fibroblasten auf das 14fache erhöht. Damit war die Effizienz der Transfektion bewiesen.

Erstaunlicherweise führten aber weder die Inhibition der miRNA-21 noch deren Expressionssteigerung zu Änderungen in der Proteinexpression von Rac1, CTGF und LOX (Abbildung 7).

Abbildung 6

## Humaner linksatrialer Appendix

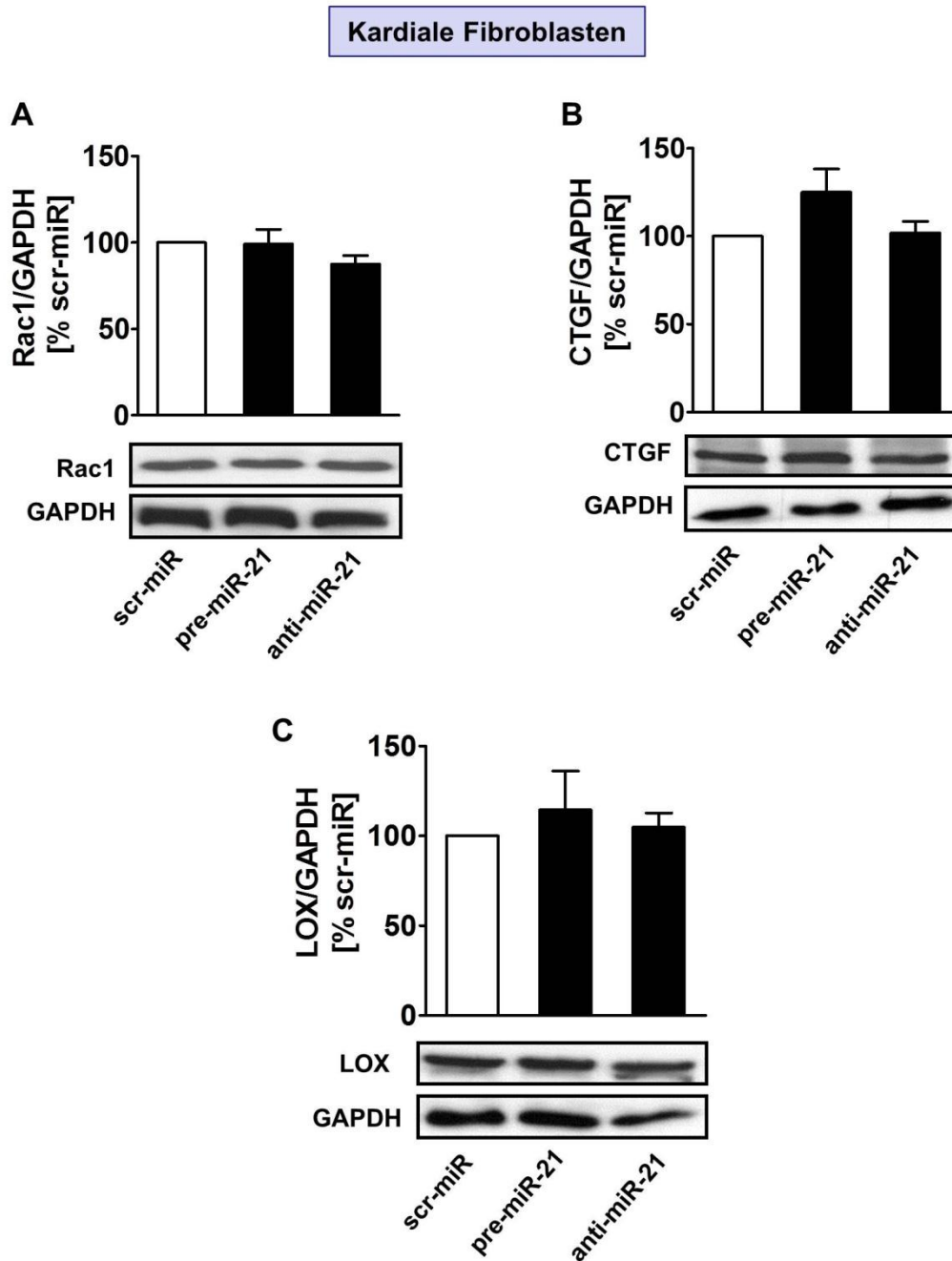


**Abbildung 6: Die miRNA-21-Expression ist positiv korreliert zur Expression von Angiotensin II, Rac1, CTGF und LOX in linken Vorhöfen von Patienten mit und ohne Vorhofflimmern.**

Verglichen wurde jeweils die Expression der miRNA-21 (bestimmt mittels TaqMan-PCR) mit der Gewebekonzentration an Angiotensin II (pg/mg) beziehungsweise der Expression an Rac1, CTGF und LOX (bestimmt durch Western Blot verglichen mit der entsprechenden GAPDH-Proteinkontrolle).

(A) Positive Korrelation zwischen miRNA-21-Expression und Angiotensin II-Konzentration ( $r=0,9526$ ,  $p<0,0001$ ). (B) Positive Korrelation zwischen miRNA-21-Expression und Rac1-Expression ( $r=0,9462$ ,  $p<0,0001$ ). (C) Positive Korrelation zwischen miRNA-21-Expression und CTGF-Expression ( $r=0,8755$ ,  $p=0,0009$ ). (D) Positive Korrelation zwischen miRNA-21-Expression und LOX-Expression ( $r=0,8155$ ,  $p=0,0040$ )

Abbildung 7



**Abbildung 7: Verminderte oder erhöhte Expression der miRNA-21 führen zu keiner signifikanten Änderung der Proteinexpression von Rac1, CTGF und LOX.**

Kardiale Fibroblasten wurden mit dem spezifischen Inhibitor der miRNA-21 (anti-miR-21) oder der Präkursor-miRNA (pre-miR-21) transfiziert. Danach wurde die Proteinexpression von Rac1 (A), CTGF (B) und LOX (C) mittels Western Blot untersucht. Die densitometrische Quantifizierung, normiert auf GAPDH als Proteinladekontrolle, ergab dabei keine signifikanten Änderungen. Unter dem Graphen jeweils repräsentativer Western Blot verglichen mit entsprechender GAPDH-Proteinladekontrolle.



Da die miRNA-Expression keinen Einfluss auf die Expression der profibrotischen Mediatoren hatte, schlossen wir daraus unter Berücksichtigung der Ergebnisse der vorherigen Versuche, dass die miRNA-21 und Spouty1 offenbar hinter Ang II, Rac1, CTGF und LOX in die Signalkaskade eingeordnet werden müssen.

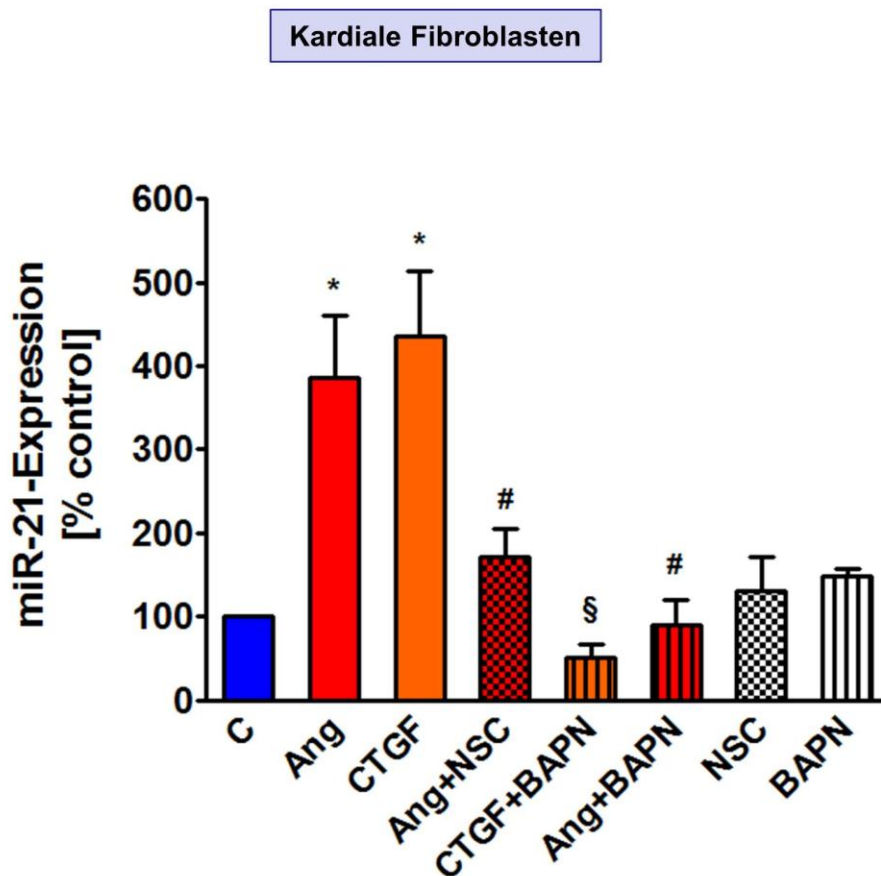
#### **4.6. Angiotensin II und CTGF erhöhen die Expression der miRNA-21 und vermindern die Expression von Sprouty1 in kardialen Fibroblasten**

Der vorherige Versuch zeigte uns, dass Änderungen in der Expression der miRNA-21 keine Veränderung der Expression der profibrotischen Mediatoren Angiotensin II, der Rac1-GTPase, CTGF und LOX bedingen. Daher galt es nun zu eruieren, ob sich stattdessen eine erhöhte oder verminderte Expression dieser Substrate auf die miRNA-21 und Sprouty1-Expression auswirken.

Um unsere Theorie zu prüfen wurden neonatale kardiale Fibroblasten mit Angiotensin II (1  $\mu$ M, 3h) oder CTGF (1 ng/ml, 1h) stimuliert. Die anschließende Taq-Man-Analyse zeigte eine deutliche Steigerung der miRNA-21-Expression, sowohl bei Angiotensin II auf  $385 \pm 75\%$  ( $p < 0,05$ ) als auch bei CTGF auf  $435 \pm 78\%$  ( $p < 0,05$ ). Wurden die Fibroblasten vorher mit NSC23766, einem small molecule Inhibitor der Rac1-GTPase, behandelt, so konnte die Angiotensin II induzierte Expressionssteigerung der miRNA-21 deutlich reduziert werden ( $171 \pm 33\%$ ,  $p < 0,05$ ). Durch Vorbehandlung mit dem small molecule Inhibitor von LOX, b-aminopropionitrile (BAPN), wurde die miRNA-21-Expressionssteigerung vollständig verhindert (Abbildung 8).

Daraufhin führten wir den Versuch unter gleichen Stimulationsbedingungen ein weiteres Mal durch, untersuchten hier aber die Proteinexpression von Sprouty1 im Western-Blot. Die Stimulation der kardialen Fibroblasten mit Angiotensin II (1  $\mu$ M, 3h) verminderte dabei die Sprouty1-Expression auf  $50 \pm 9\%$ , ( $p < 0,05$ ). Ähnliche Ergebnisse erhielten wir nach der Stimulation der Zellen mit CTGF (1 ng/ml, 1h), hier beobachteten wir eine verminderte Expression von Sprouty1 auf  $49 \pm 6\%$  ( $p < 0,05$ ). Wurden die Zellen vorher mit NSC23766 oder BAPN behandelt, konnte die Verminderung der Sprouty1-Expression vollständig verhindert werden (Abbildung 9).

Abbildung 8



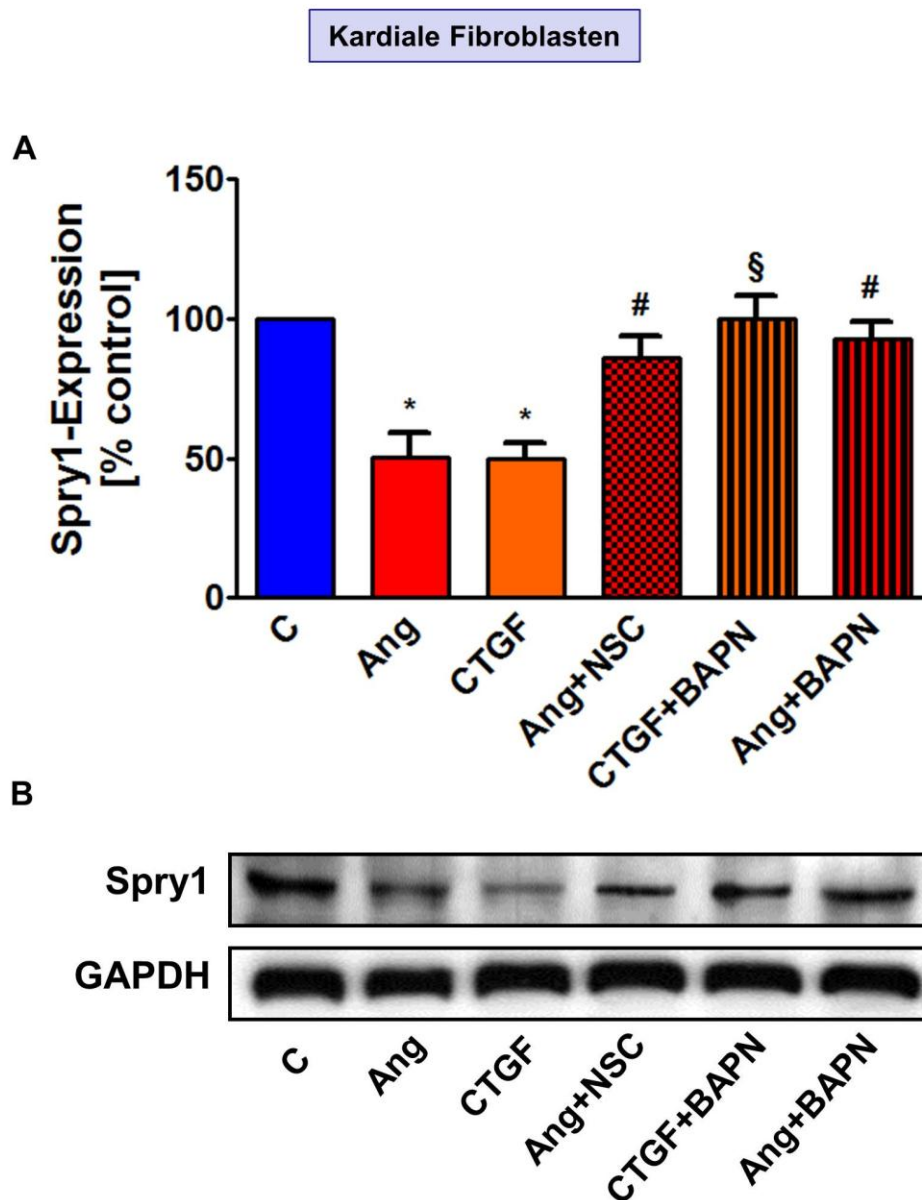
**Abbildung 8: Die profibrotischen Mediatoren Angiotensin II und CTGF induzieren in kardialen Fibroblasten eine vermehrte Expression von miRNA-21.**

Neonatale Rattenfibroblasten wurden mit Angiotensin II (Ang, 1  $\mu$ M, 3h) oder rekombinantem Connective Tissue Growth Factor (CTGF, 1 ng/ml, 1h) behandelt. Dies führte zu einem Anstieg der miRNA-21-Expression, unter Angiotensin II auf  $385 \pm 75$  % ( $p < 0,05$ ) und unter CTGF auf  $435 \pm 77$  % ( $p < 0,05$ ).

Durch Vorbehandlung mit dem small molecule inhibitor von Rac1 NSC23766 (NSC, 100  $\mu$ M, 24h) konnte dieser Effekt deutlich vermindert werden ( $171 \pm 33$  %,  $p < 0,05$ ). Die Vorbehandlung mit b-Aminopropionitrile, einem synthetischen Hemmstoff der Lysyl-Oxidase (BAPN, 100 nM, 16h), verhinderte die miRNA-21-Expressionssteigerung durch Angiotensin II und auch CTGF vollständig ( $p < 0,05$ ).



Abbildung 9



**Abbildung 9: Die profibrotischen Mediatoren Angiotensin II und CTGF vermindern in kardialen Fibrozyten die Expression von Sprouty1.**

Neonatale Fibroblasten wurden mit Angiotensin II (1  $\mu$ M, 3h) oder rekombinatem CTGF (1 ng/ml, 1h) behandelt. **(A)** Dies führte zu einer Abnahme der Sprouty1-Expression, unter Angiotensin II  $50 \pm 9\%$  und unter CTGF  $49 \pm 5\%$  (\* $p < 0,05$  gegen Kontrolle).

Durch Vorbehandlung mit dem Rac1 small molecule inhibitor NSC23766 (NSC, 100  $\mu$ M, 24h) konnte dieser Effekt aufgehoben werden (# $p < 0,05$  gegen Ang). Ebenso wurde die Verringerung der Sprouty1-Expression durch die Vorbehandlung mit b-Aminopropionitrile, einem LOX-Hemmstoff (BAPN, 100 nM, 16h), vollständig verhindert (# $p < 0,05$  gegen Ang, § $p < 0,05$  gegen CTGF). **(B)** Repräsentativer Sprouty1-Western Blot verglichen mit GAPDH-Proteinladekontrolle.

#### **4.7. Angiotensin II aktiviert Rac1, CTGF und LOX und reguliert so die Expression von miRNA-21 und Sprouty1 in kardialen Fibroblasten**

Ziel der folgenden Versuche war es unter Berücksichtigung der bisher bekannten Signaltransduktion der Fibrose zu untersuchen, wie genau die miRNA-21 und Sprouty1 in diesem System reguliert werden könnten. Bekannt war bisher, dass Angiotensin II die Rac1-GTPase der Fibroblasten aktiviert und zur vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies anregt. Diese Sauerstoffmetabolite wiederum fördern die Expression von CTGF, das schließlich die Proteinbiosynthese von LOX erhöht.

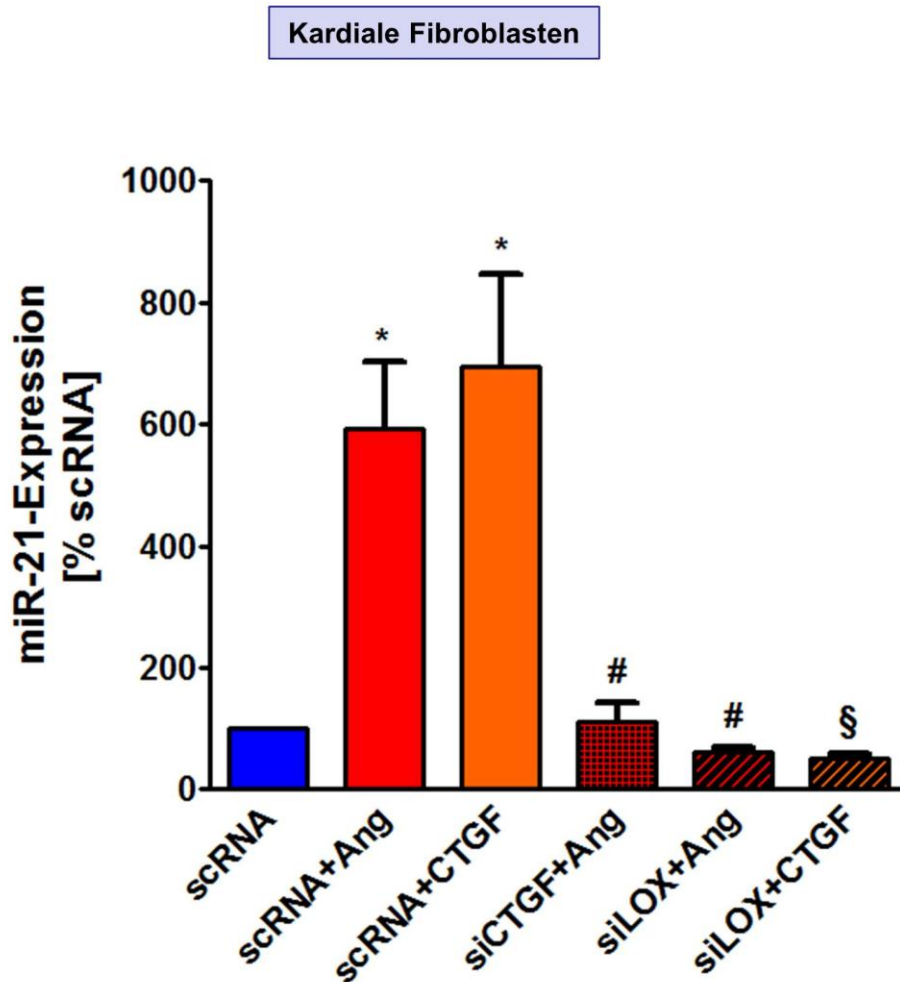
Aufbauend auf den Ergebnissen unserer vorherigen Versuche war es daher nötig, die Rolle von CTGF und LOX als wichtige Metabolite der Signaltransduktionskaskade jetzt bezüglich ihrer Bedeutung für die miRNA-21 näher zu untersuchen.

Zu diesem Zweck transfizierten wir neonatale kardiale Fibroblasten mit sogenannten small interfering RNAs (siRNA) für CTGF oder LOX, was zu einer deutlichen Synthesehemmung der Effektoren in den transfizierten Zellen führte. Die Kontrollgruppe bildeten Zellen, die lediglich mit einer fluoreszenzmarkierten scRNA (scrambled RNA) transfiziert wurden, die keinerlei Veränderung der Genexpression bewirkte. Nach der erfolgreich durchgeführten Transfektion wurden die Fibroblasten entweder mit Angiotensin II (1  $\mu$ M, 3h) oder CTGF (1 ng/ml, 1h) stimuliert.

Wie bereits zu vermuten war, erhöhte die Stimulation mit Angiotensin II und CTGF bei den lediglich mit scRNA transfizierten Zellen die miRNA-21-Expression deutlich. Die siRNA-vermittelte Hemmung der CTGF-Expression verhinderte die Steigerung der miRNA-21-Expression durch Angiotensin II aber vollständig ( $110 \pm 32$  %,  $p < 0,05$  vs. scRNA+Ang). Weiterhin konnte auch die siRNA-vermittelte Inhibition von LOX die miR-21-Expressionssteigerung durch Angiotensin II ( $62 \pm 6$  %,  $p < 0,05$  vs. scRNA+Ang) als auch durch CTGF ( $52 \pm 8$  %,  $p < 0,05$  vs. scRNA+CTGF) verhindern (Abbildung 10).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Rac1-GTPase, Connective Tissue Groth Factor und die Lysyl Oxidase eine entscheidende Rolle für die Angiotensin II induzierte Regulation der miRNA-21 und Sprouty1 spielen müssen. Eine Schlüsselrolle nimmt hierbei offenbar die Lysyl Oxidase ein.

Abbildung 10



**Abbildung 10: Der siRNA-vermittelte Knockdown von CTGF und LOX verhindert die vermehrte Expression von miRNA-21 nach Stimulation mit Angiotensin II und CTGF.**

Neonatale Rattenfibroblasten wurden mit CTGF-siRNA oder LOX-siRNA (siRNA = small interfering RNA) transfiziert; die Kontrollgruppe bildeten Zellen, die mit scRNA transfiziert wurden (scRNA = scrambled RNA). Die Behandlung mit Angiotensin II (Ang, 1  $\mu$ M, 3h) oder CTGF (1 ng/ml, 1h) führte bei den nur mit scRNA behandelten Zellen zu einer miRNA-21-Expressionssteigerung (Ang II  $592 \pm 110$  %, CTGF  $695 \pm 150$  %, \* $p < 0,05$  gegen Kontrolle).

Der siRNA-vermittelte CTGF-Knockdown verhinderte die Hochregulation der miRNA-21-Expression durch Angiotensin II vollständig ( $110 \pm 32$  %, # $p < 0,05$  gegen scRNA+Ang). Ebenso verhinderte die siRNA-vermittelte LOX-Hemmung die miRNA-21-Expressionssteigerung durch Angiotensin II ( $62 \pm 6$  %, # $p < 0,05$  gegen scRNA+Ang) und CTGF ( $52 \pm 8$  %,  $p < 0,05$  gegen scRNA+CTGF).

#### **4.8. Angiotensin II und CTGF erhöhen die Proteinexpression der Endonukleasen der miRNA Drosha und Dicer**

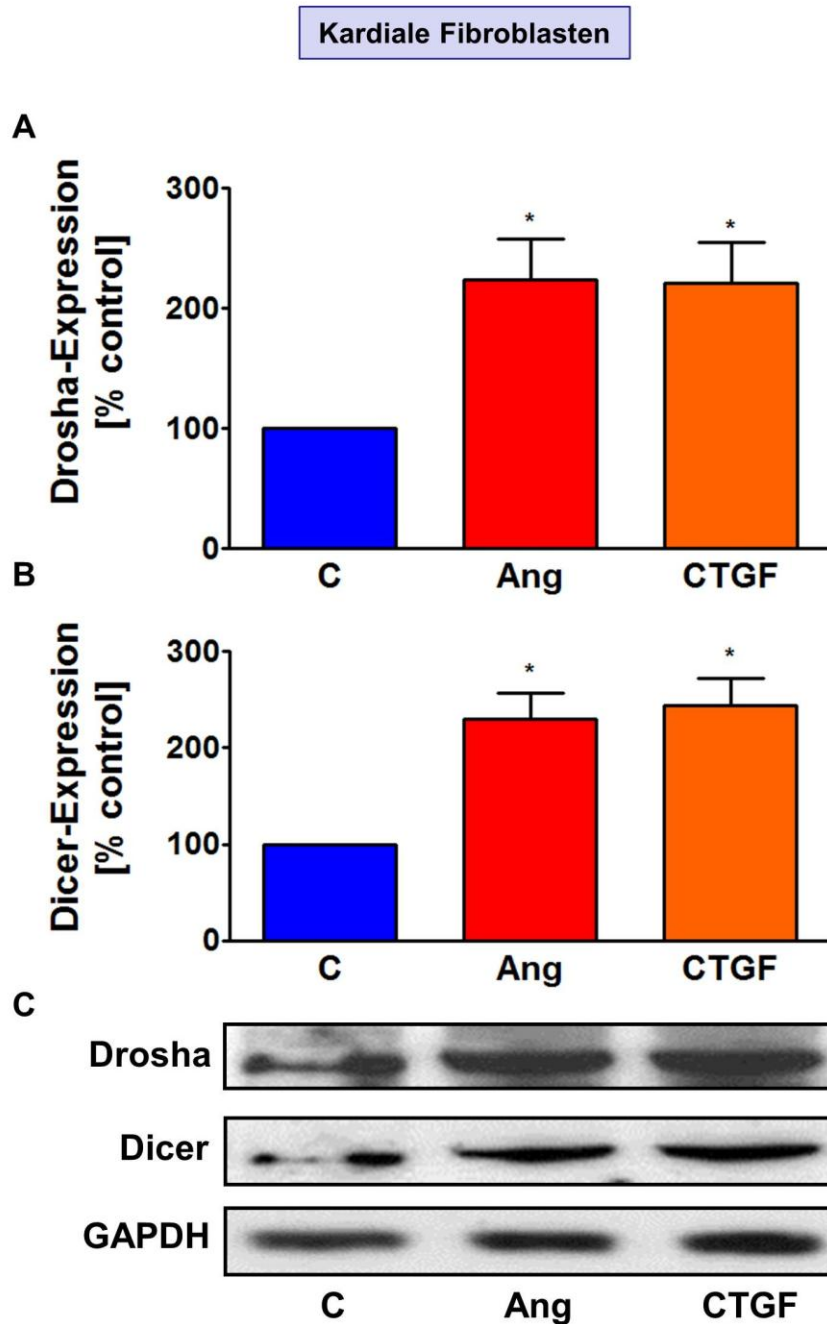
Um den Mechanismus der Regulation der miRNA-21 durch die profibrotischen Mediatoren Angiotensin II und CTGF näher zu untersuchen, stimulierten wir neonatale kardiale Rattenfibroblasten mit Angiotensin II (1  $\mu$ M, 3h) oder CTGF (1 ng/ml, 1h). Dann betrachteten wir die Wirkung dieser Stimulation auf die Expression von Dicer und Drosha, welche die beiden wichtigen Endonukleasen für die Biosynthese der miRNAs darstellen (Ambros 2004; Landthaler et al. 2004; Du and Zamore 2005; Kuehbacher et al. 2007).

Sowohl die Stimulation mit Angiotensin II als auch die Stimulation mit CTGF erhöhten die Expression von Drosha signifikant (Ang II  $224 \pm 34$  %,  $p < 0,05$ ; CTGF  $221 \pm 34$  %,  $p < 0,05$ ). Sehr ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch für die Proteinexpression von Dicer (Ang II  $229 \pm 27$  %,  $p < 0,05$ ; CTGF  $243 \pm 28$  %,  $p < 0,05$ , Abbildung 11). Diese Daten gaben uns durch den Nachweis der Regulation der Endonukleasen Drosha und Dicer wichtige Hinweise, durch welchen Mechanismus Angiotensin II und CTGF die Expression der miRNA-21 und schließlich Sprouty1 beeinflussen können.

#### **4.9. LOX ist nicht nur extrazellulär, sondern auch intrazellulär in kardialen Fibroblasten nachweisbar**

Im nächsten Schritt galt es zu untersuchen, welche Rolle die Lysyl Oxidase als wichtiger Mediator der Signaltransduktion der Vorhoffibrose für die Regulation der miRNA-21-Expression spielen könnte. Aktuelle Daten zeigen, dass LOX nicht wie ursprünglich angenommen nur extrazellulär als Schlüssel-Enzym für die Kollagen-Vernetzung aktiv ist. Vielmehr scheint das Enzym ebenso wichtige Aufgaben intrazellulär, also im Zytoplasma und im Zellkern selbst, zu haben (Li et al. 1997; Kagan and Li 2003; Saad et al. 2010).

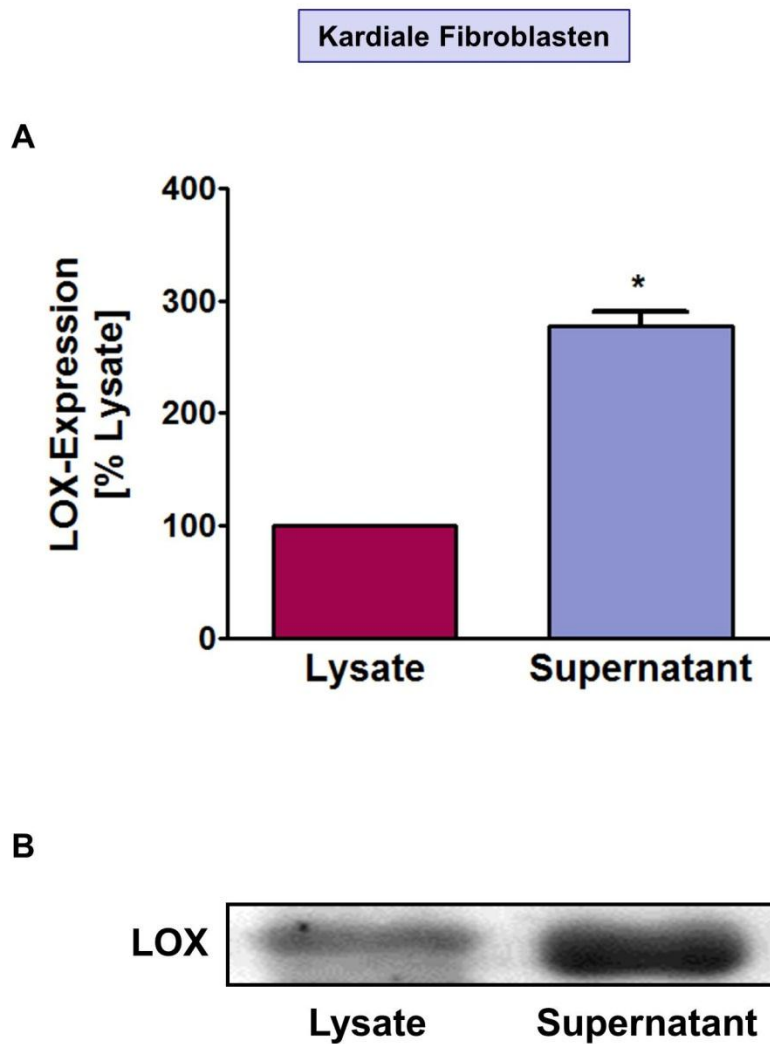
Daher untersuchten wir an kultivierten kardialen Fibroblasten mittels Western Blot die Expression von LOX getrennt im reinen Zelllysate (intrazelluläres LOX) und im Überstand der Zellen (extrazelluläres LOX). Wie zu erwarten war, zeigte sich eine deutlich höhere LOX-Proteinexpression im Zellüberstand, insgesamt fast dreimal so hoch wie im Zelllysate. Die Expressionsanalyse belegte aber, dass LOX auch im reinen Lysate von Fibroblasten in nicht unerheblicher Menge exprimiert wird (Abbildung 12).



**Abbildung 11: Angiotensin II und CTGF steigern die Proteinexpression der Endonukleasen Drosha und Dicer.**

Neonatale Fibroblasten wurden mit Angiotensin II (Ang, 1  $\mu$ M, 3h) oder rekombinatem CTGF (1 ng/ml, 1h) inkubiert. **(A)** In der densitometrischen Quantifizierung, normiert auf GAPDH als Ladekontrolle, zeigte sich eine mehr als zweifache Überexpression von Drosha (Ang II  $224 \pm 34$  %; CTGF  $221 \pm 34$  %,  $n=4$ ,  $*p<0,05$  gegen Kontrolle). **(B)** Ebenso zeigte sich eine Expressionssteigerung von Dicer (Ang II  $229 \pm 27$  %; CTGF  $243 \pm 28$  %,  $n=4$ ,  $*p<0,05$  gegen Kontrolle). **(C)** Repräsentative Drosha- und Dicer-Western Blots verglichen mit der entsprechenden GAPDH-Proteinladekontrolle.

Abbildung 12



**Abbildung 12: Lysyl Oxidase wird nicht nur extrazellulär, sondern auch intrazellulär exprimiert.**

Kardiale Fibroblasten wurden kultiviert und anschließend konzentrierter Zell-Überstand (=extrazelluläres LOX) und das Zelllysate (=intrazelluläres LOX) untersucht. **(A)** Die densitometrische Quantifizierung des Western Blots ergibt eine fast dreifach höhere Expression von LOX extrazellulär auf  $278 \pm 12 \%$  ( $n=5$ ,  $*p<0,05$ ). LOX ist aber nicht nur extrazellulär, sondern auch im Zelllysate nachweisbar. **(B)** Repräsentativer LOX-Western Blot von Lysate und Überstand.



#### **4.10. Intrazelluläres LOX spielt eine wichtige Rolle für die Expression der Endonukleasen der miRNA Drosha und Dicer**

Um die Rolle von Lysyl Oxidase für die Expression der miRNA-21 näher charakterisieren zu können, transfizierten wir neonatale kardiale Fibroblasten mit einem cDNA-Klon für LOX (pCMV6-XL5-LOX, sc118674, Origene, USA). Die Zellen der Kontrollgruppe wurden mit einem Fluoreszein-konjugierten, leeren Vektor (empVector, PS100010, Origene, USA) transfiziert, um den Transfektionserfolg dokumentieren zu können.

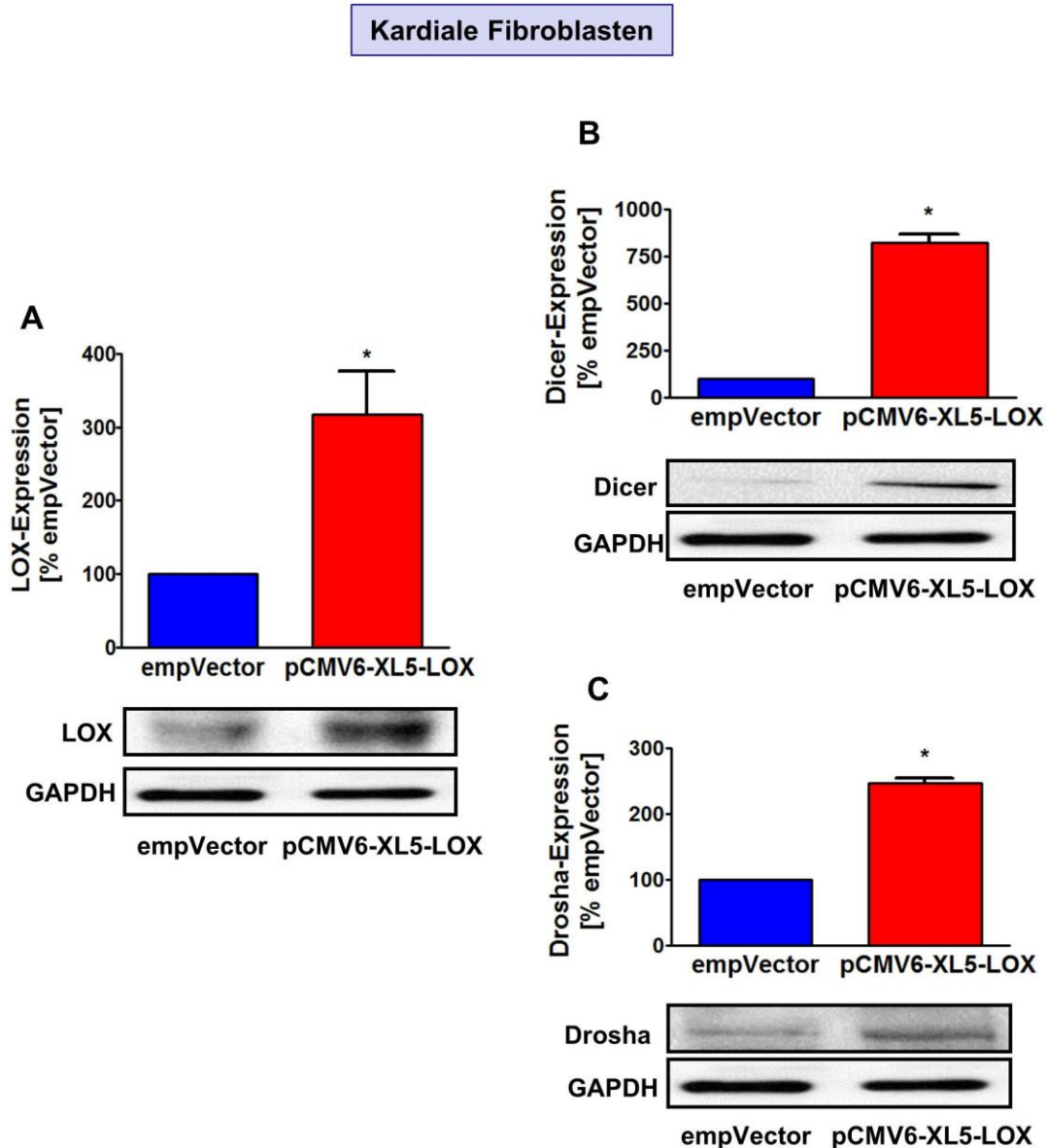
Die Analyse der LOX-Proteinexpression mittels Western-Blot belegte die Effektivität der Transfektion, denn die cDNA-LOX-transfizierten Zellen zeigten eine Steigerung der intrazellulären LOX-Expression auf  $318 \pm 58 \%$  ( $n=4$ ,  $*p<0,05$  gegen Kontrolle, Abbildung 13A).

Danach untersuchten wir die Drosha- und Dicer-Expression der transfizierten Fibroblasten. Die Transfektion mit der LOX-cDNA führte bei diesen Zellen zu einer mehr als achtfach gesteigerten Proteinexpression von Dicer (Abbildung 13B) und einer fast dreifach gesteigerten Proteinexpression von Drosha (Abbildung 13C) verglichen mit den Kontrollen. Diese Daten deuten darauf hin, dass Angiotensin II und CTGF via intrazellulärer Aktivierung der Lysyl Oxidase die Expression von Dicer und Drosha und somit die Expression der miRNA-21 und von Sprouty1 regulieren.

#### **4.11. Statine senken durch Hemmung der Rac1-Aktivität die Expression der miRNA-21 *in vivo***

Um die Interaktion zwischen Rac1, miRNA-21 und Sprouty1 bei Vorhofflimmern *in vivo* charakterisieren zu können, untersuchten wir transgene RacET-Mäuse, die sich durch kardiale Überexpression an konstitutiv aktivem (V12) Rac1 unter Kontrolle des alpha-myosin heavy chain (MHC)-Promotors auszeichnen. Diese Mäuse entwickeln im hohen Alter spontan Vorhofflimmern (Adam et al. 2007). Verglichen mit Wildtyp-Mäusen zeigen RacET-Mäuse eine deutlich höhere Rac1-Aktivität, was diese transgenen Mäuse für unseren Versuch besonders eignet (Adam et al. 2007). Zur Hemmung von Rac1 nutzten wir HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine). Für Statine konnte in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass sie die Expression und Aktivität der Rac1-GTPase in Kardiomyozyten hemmen

Abbildung 13



**Abbildung 13: Transfektion mit einem cDNA-Klon für LOX erhöht die LOX-Expression und führt als Folge zu einer Expressionssteigerung der Endonukleasen der miRNA Drosha und Dicer.**

Neonatale Fibroblasten wurden mit pCMV6-XL5-LOX (= cDNA-LOX) transfiziert; die Kontrollgruppe bildeten Zellen, die lediglich mit einem fluoreszenzmarkiertem Vektor (empVector = empty vector) transfiziert wurden.

(A) Die cDNA-LOX-Transfektion führte in der densitometrischen Quantifizierung zu einer Steigerung der intrazellulären LOX-Expression auf  $318 \pm 58 \%$  ( $n=4$ ,  $*p<0,05$  gegen Kontrolle). (B) Die densitometrische Quantifizierung ergibt bei den cDNA-LOX-Fibroblasten eine mehr als achtfach erhöhte Dicer-Expression auf  $824 \pm 54 \%$  und (C) eine erhöhte Expression von Drosha auf  $247 \pm 7 \%$  (jeweils  $n=4$ ,  $*p<0,05$ ). Unter den Graphen jeweils repräsentative Western Blots verglichen mit der GAPDH-Proteinladekontrolle.



(Laufs et al. 2002; Liao and Laufs 2005; Adam et al. 2007). Ebenso wurde bereits nachgewiesen, dass die Behandlung mit Statinen bei RacET-Mäusen die Expression von LOX und CTGF vermindert und einen positiven Einfluss auf die Fibrosierungsprozesse des Vorhofs nimmt (Adam et al. 2010; Adam et al. 2011).

Daher untersuchten wir RacET-Mäuse und den Effekt der Behandlung mit Rosuvastatin 0.4 mg/d po über 10 Monate auf die miRNA-21- und Sprouty1-Expression mittels TaqMan-Analyse und Western Blot. Wir verglichen die Ergebnisse mit denen normaler Wildtyp-Mäuse.

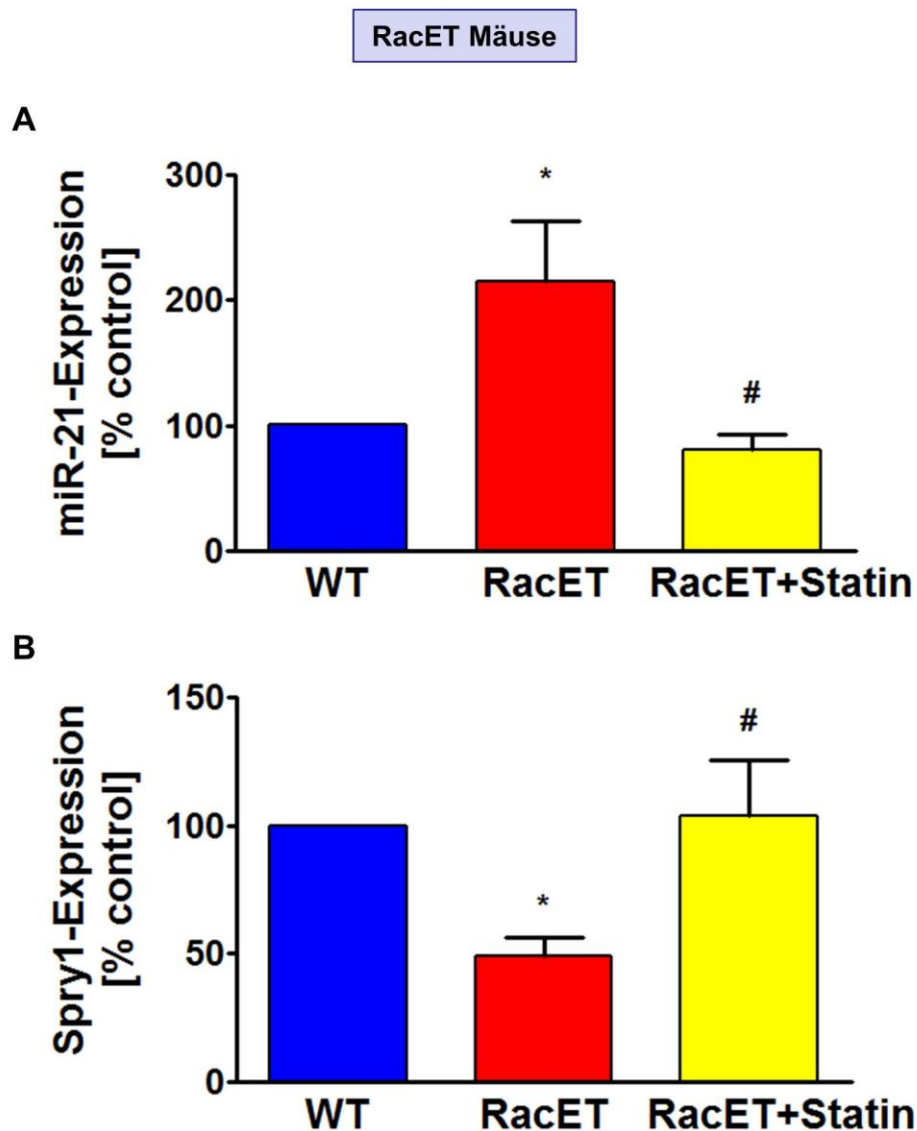
Interessanterweise zeigten RacET eine deutlich erhöhte Expression der miRNA-21 auf  $215 \pm 48\%$  ( $p < 0,05$ ) und eine verminderte Sprouty1-Expression auf  $49 \pm 7\%$  ( $p < 0,05$ ) verglichen mit den Wildtyp-Mäusen. Die Behandlung mit Statinen aber verhinderte Änderungen der miRNA-21- und Sprouty1-Expression vollständig. Nach 10 monatiger Behandlung mit Statinen zeigten die RacET-Mäuse nahezu identische Expressionswerte der miRNA-21 und von Sprouty1 wie die Wildtyp-Mäuse (Abbildung 14). Weiterhin lag die Prävalenz von Vorhofflimmern bei den mit Statinen behandelten RacET-Tieren deutlich niedriger als bei den unbehandelten RacET-Mäusen (Adam et al. 2007). Damit konnten wir nachweisen, dass auch *in vivo* durch die Hemmung der Rac-1-GTPase indirekt eine Expressionshemmung der miRNA-21 erfolgt und dass sich dieser Effekt günstig auf das Auftreten von Vorhofflimmern auswirken kann.

#### **4.12. Behandlung mit Antagomir-21 verhindert die Entstehung von atrialer Fibrose *in vivo***

Vorangegangene Studien an Mäusen konnten zeigen, dass der Verschluss der linken vorderen Koronararterie und damit das Auslösen eines Myokardinfarktes (MI) bei den betroffenen Mäusen in der Folge zu atrialer Fibrose führt (Fiedler et al. 2011). Dieses Modell eignete sich daher für uns zur Untersuchung, wie sich die Behandlung mit Inhibitoren der miRNA-21 durch das spezifische Antagomir-21 auf Fibrosevorgänge am Vorhof *in vivo* auswirken könnte.

Wir bildeten dazu drei Versuchstier-Gruppen. Eine Gruppe wurde einer operativen Koronararterien-Ligatur unterzogen und so ein Herzinfarkt ausgelöst (MI). Bei einem Teil der so operierten MI-Mäuse wurde nach dem operativem Eingriff zweimalig Antagomir-21 (80mg/kg/d) retroorbital verabreicht (MI+Antag21). Die Kontrollgruppe bestand aus Tieren,

Abbildung 14



**Abbildung 14: Die miRNA-21-Expression wird durch Hemmung der Rac1-Aktivität mit Statinen gesenkt.**

Transgene Mäuse mit kardialer Überexpression von aktivem (V12) Rac1 unter Kontrolle des  $\alpha$ -myosin-heavy-chain-(MHC)-promoter (RacET) wurden oral mit Rosuvastatin 0,4 mg/d (RacET+Statin) behandelt oder normalem Futter 10 Monate lang gefüttert und mit gleich alten Wildtyp-Kontrollen (WT) verglichen.

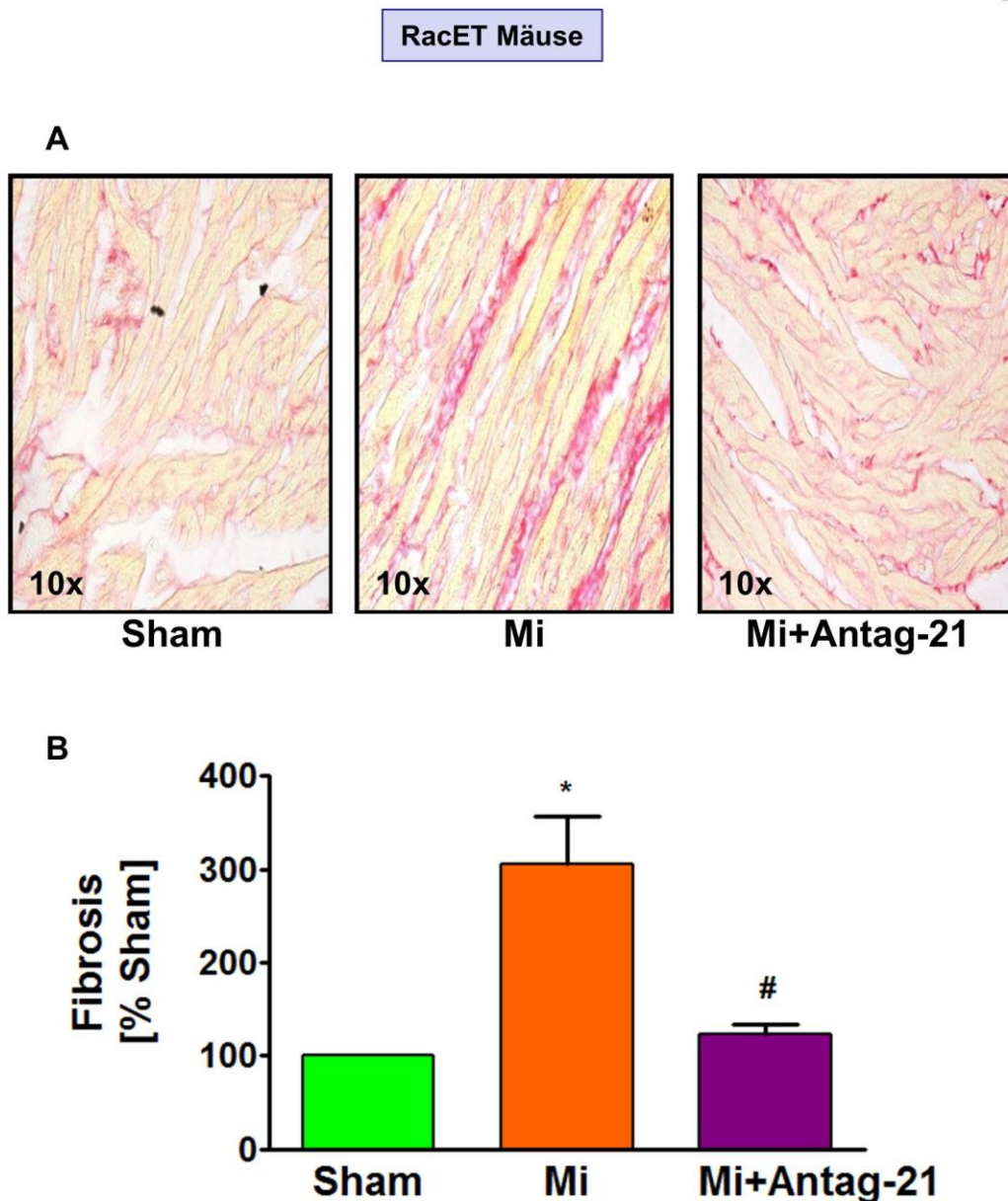
(A) RacET-Mäuse zeigen in der Quantifizierung mittels TaqMan-PCR eine signifikant erhöhte miR-21-Expression ( $215 \pm 48$  %,  $n=4$  pro Gruppe,  $*p<0,05$  gegen WT,  $\#p<0,05$  gegen RacET) und (B) in der densitometrische Quantifizierung des Western Blots eine verminderte Sprouty1-Expression ( $49 \pm 7$  %,  $n=4$  pro Gruppe,  $*p<0,05$  gegen WT,  $\#p<0,05$  gegen RacET).

Die Behandlung mit Statinen verhinderte diese Effekte vollständig, nach 10 Monaten zeigten die mit Statinen behandelten RacET-Mäuse gleiche miRNA-21- und Spouty1-Expressionslevel wie die Wildtyp-Mäuse.

bei denen lediglich der Brustkorb eröffnet wurde, ohne einen Eingriff am Herzen durchzuführen (SHAM).

Drei Wochen nach dem Myokardinfarkt untersuchten wir den Kollagengehalt des linksatrialen Myokards der Versuchsmäuse. Dieser lag, wie zu erwarten war, bei den Infarkt-Mäusen dreimal so hoch wie bei den SHAM-Kontrolltieren ( $305 \pm 50 \%$ ,  $p < 0,05$ ). Die Behandlung mit Antagomir-21 konnte diese sekundäre Fibrose nach dem Myokardinfarkt vollständig verhindern. Der Kollagengehalt der MI+Antag21-Mäuse war mit  $122 \pm 11 \%$ ,  $*p < 0,05$  gegen SHAM,  $\#p < 0,05$  gegen MI nahezu identisch zu den nur SHAM-operierten Tieren (Abbildung 15). In diesem Versuch zeigte sich die Behandlung mit Antagomir-21 als effektive Methode, um atriale Fibrosierung zu verhindern.

Abbildung 15



**Abbildung 15: Eine Behandlung mit Antagomir-21 reduziert einer Vorhoffibrose *in vivo*.**

(A) Repräsentative Sirius-red-Färbungen (bei 10-facher Vergrößerung) sowie (B) Quantifizierung der Fibrose in den entsprechenden linken Vorhöfen zeigen, dass der Verschluss der LAD mit anschließendem Infarkt (Mi) zu vermehrter Fibrose im linken Vorhof verglichen mit Kontrollmäusen (Sham) führt. Der Kollagengehalt war 3 Wochen nach Infarkt mehr als dreifach höher als bei den Sham-operierten Mäusen ( $305 \pm 50 \%$ ,  $p < 0,05$ ).

Eine Behandlung mit Antagomir-21 (Mi+Antag-21) konnte die sekundäre atriale Fibrose und den Anstieg des Kollagengehalts nach Myokardinfarkt jedoch nahezu vollständig verhindern ( $122 \pm 11 \%$ ,  $n=4-5$  pro Gruppe,  $*p < 0,05$  gegen Sham,  $\#p < 0,05$  gegen Mi).

## 5. Diskussion

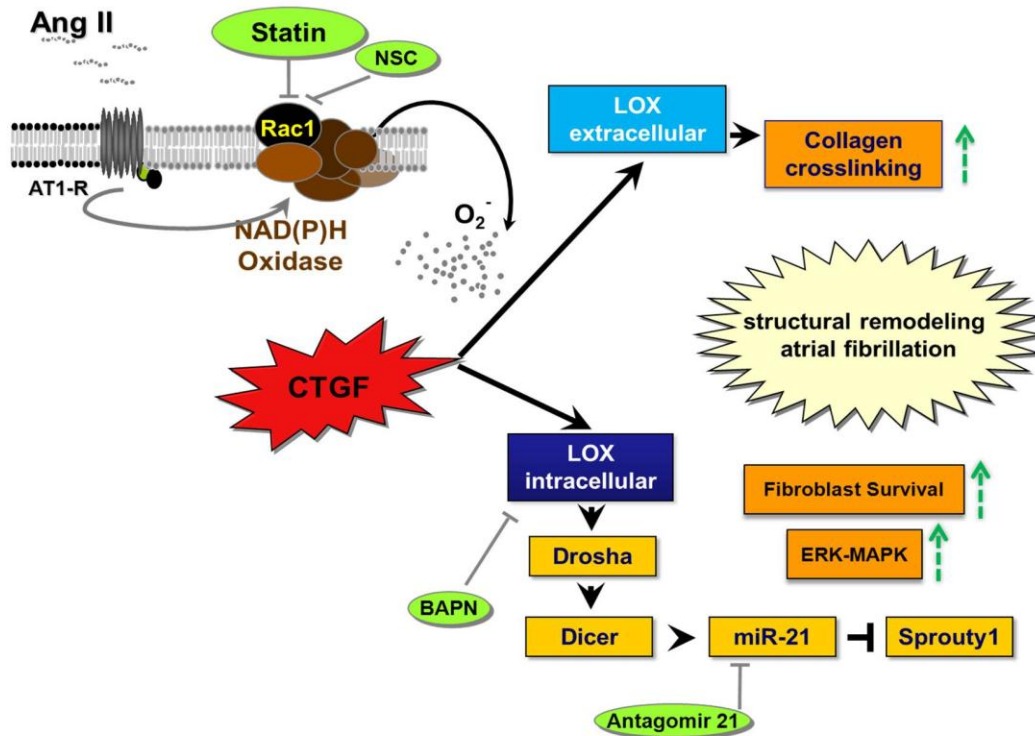
Unsere Ergebnisse zeigen, dass die miRNA-21 einen wichtigen Regulator der fibrotischen Remodelingprozesse am Vorhof bei Vorhofflimmern darstellt. Wir konnten die Rolle der miRNA-21 für die Signaltransduktionskaskade der Fibrose am Vorhof charakterisieren und die bereits bekannte Kaskade so um einen weiteren neuen Mechanismus ergänzen. Zusammenfassend induziert Angiotensin II durch Aktivierung der Rac1-GTPase und der profibrotischen Mediatoren Connective Tissue Growth Factor und Lysyl Oxidase die Bildung der miRNA-21. Die erhöhte miRNA-21-Expression verhindert in der Folge die Expression von Sprouty1 und führt über diesen Mechanismus zu vermehrter interstitieller Fibrose und zu strukturellem Remodeling am Vorhof (Abbildung 16).

Das strukturelle Remodeling sowie die darauf folgende kontraktile Dysfunktion des linken Vorhofs spielen eine bedeutende Rolle für die Entstehung und Aufrechterhaltung des Vorhofflimmerns (Falk 2001; Nattel et al. 2008). Inwiefern die Persistenz von Vorhofflimmern und die Ausprägung der atrialen Fibrose aber genau kausal zusammenhängen, beziehungsweise welches der beiden Phänomene eigentlich am Anfang steht, wird nach wie vor kontrovers diskutiert (Nattel 2002; Nattel and Opie 2006). In naher Zukunft wird sich schwer belegen lassen, ob einerseits das Flimmern des Vorhofs zur Initiierung von fibrotischen Umbauprozessen führt oder ob es andererseits die Ausbildung eines fibrotisch veränderten Vorhofs ist, die in der Folge die Rhythmusstörung bedingt (Li et al. 1999; Lin et al. 2007). Auch wenn die Frage nach der primären, ursprünglichen Ursache von Fibrose und Vorhofflimmern noch zu klären sein wird, gilt es letzten Endes aber als gesichert, dass sich beide Prozesse gegenseitig bedingen können und zusammen zur Ausbildung eines Teufelskreises aus strukturellem Remodeling und flimmerndem Gewebe führen (Wijffels et al. 1995). Wijffels et al. prägten hier erstmals die Aussage „atrial fibrillation begets atrial fibrillation“, die den Mechanismus wohl treffend beschreibt. Flimmerndes Vorhofgewebe führt so durch Induktion vermehrter Fibrose wiederum zu erhöhtem arrhythmogenem Potential.

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden bereits über 700 verschiedene miRNAs beschrieben. Sie übernehmen als nicht-kodierende kleine RNAs verschiedene Aufgaben als wichtige genetische Regulatoren, insbesondere beim Gen-Silencing in menschlichen Zellen (Berezikov et al. 2005). Nicht alle bisher identifizierten miRNAs kommen in jedem Gewebe des Körpers



Schaubild



**Abbildung 16: Angiotensin II, Rac1, Connective Tissue Growth Factor und Lysyl-Oxidase regulieren die Expression von miR-21 und Sprouty1 bei Vorhofflimmern.**

Die Rac1-GTPase, die durch Angiotensin II aktiviert und durch Statine gehemmt werden kann, spielt eine Schlüsselrolle für die Aktivierung von Connective Tissue Growth Factor. CTGF erhöht sowohl die intrazelluläre als auch die extrazelluläre Aktivität der Lysyl Oxidase. Während das extrazelluläre LOX direkt das Crosslinking von Kollagen und damit Entstehung von Fibrose fördert, aktiviert das intrazelluläre LOX die Endonukleasen der miRNA Drosha und Dicer. Dies führt im Folgenden zur Expressionssteigerung der miRNA-21, damit zu verminderter Expression des Downstream-Targets der miRNA-21 Sprouty1 und schließlich zur Zunahme der Fibrose des Vorhofs.

Dieser hier beschriebene Mechanismus charakterisiert neue Aspekte der Signaltransduktionskette, die zu strukturellem Remodeling im Vorhof bei Vorhofflimmern führt.

vor, viele von ihnen übernehmen organspezifische Aufgaben oder sind für den ordnungsgemäßen Ablauf nahezu aller Phasen der Zellentwicklung verantwortlich (Houbaviy et al. 2003; Clop 2009; Anokye-Danso et al. 2011; Yue 2011). Transgene Embryos des Zebrafischs beispielsweise, die eine Mutation des Dicer-Gens aufweisen und die daher keine miRNAs prozessieren können, entwickeln sich so zuerst wenige Tage normal, ehe die Entwicklung spätestens 8 Tage nach der Befruchtung zum Stillstand kommt (Wienholds et al. 2003). Weitere Arbeiten konnten zeigen, dass miRNAs für eine normale Entwicklung aller tierischen und menschlichen Gewebe zwingend notwendig zu sein scheinen (Lagos-Quintana et al. 2002). Viele dieser kleinen regulatorisch-wirksamen RNAs spielen daher auch eine Rolle für die kardiovaskuläre Biologie und sind momentan Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten. miRNAs sind so beispielsweise beteiligt an der Regulation der Endothelfunktion (Lee et al. 1993), strukturellem und elektrischen Remodeling am Vorhof (Bonauer et al. 2009; Girmatsion et al. 2009; Lu et al. 2010; Wang et al. 2011) und ventrikulärer Hypertrophie und Dilatation (Kuehbacher et al. 2007; Barringhaus and Zamore 2009). Zahlreiche weitere aktuelle Studien an verschiedensten Organsystemen deuten auf ein hohes pathogenetisches Potential der miRNAs hin. So ist die Expression einiger miRNAs in Tumoren verglichen mit normalem Gewebe deutlich verändert. Beispiele hierfür sind die miRNAs 17-92 bei Tumoren der Lunge (Hayashita et al. 2005; He et al. 2005), die miRNA-96 bei Pankreaskarzinomen (Yu et al. 2010) und die miRNA-520e beim Leberzellkarzinom (Zhang et al. 2011). Auch bei neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen wie der Alzheimer Demenz scheinen miRNAs eine Rolle bei der Krankheitsentstehung zu spielen (Abelson et al. 2005; Hebert et al. 2008). Für die Pathogenese von Diabetes mellitus (Poy et al. 2004; Kolfschoten et al. 2009; Shantikumar et al. 2011), Asthma (Tan et al. 2007) und verschiedenen Autoimmunkrankheiten (Dai et al. 2007; Stanczyk et al. 2011) könnten miRNAs ebenso von entscheidender Bedeutung sein.

Obwohl miRNAs also zukünftig einen potentiellen therapeutischen Ansatzpunkt für viele pathologische Veränderungen des Herzens darstellen könnten, sind die genauen Mechanismen, über die miRNAs wirken können, bisher erst unvollständig verstanden. Gleiches gilt ebenso für die Rolle der miRNA für das strukturelle Remodeling bei Vorhofflimmern. Dabei gibt es neue Hinweise, dass die miRNA-21 eine entscheidende Rolle bei fibrotischen Veränderungen am Ventrikel spielt (Thum et al. 2008). Hier beeinflusst sie die Aktivität der ERK-MAP-Kinase (extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase) der ventrikulären Fibroblasten (Huebert et al. 2004). Die ERK-MAP-Kinase

ist ein wichtiger Aktivator der Proliferation von Fibroblasten und verhindert zudem die Apoptose der Zellen (Pages et al. 1993). Stressbelastungen des Herzens führen zu einem miRNA-21-vermittelten Anstieg der ERK-MAP-Kinase-Aktivität (Thum et al. 2008) durch verminderte Expression von Sprouty1, einem Cystein-reichen Signalprotein (Hacohen et al. 1998). Aufgabe der Proteine der Spouty-Familie ist die Hemmung von Rezeptor-Tyrosinkinasen. Werden Fibroblasten durch Wachstums- oder Stressfaktoren stimuliert, translozieren Sprouty-Proteine aus dem Zytosol zur Plasmamembran, werden an den dort liegenden Rezeptoren phosphoryliert und können schließlich an diese binden, um inhibierend zu wirken (Hanafusa et al. 2002). Sprouty1 als ein direkter Inhibitor der ERK-MAP-Kinase beeinflusst also das Überleben der Fibroblasten im gesunden Myokard positiv (Casci et al. 1999). Eine Expressionshemmung von Spouty1 führt daher in der Folge zu Vermehrung der Fibrozyten, Fibrose, Hypertrophie des Herzmuskels und folgender kardialer Dysfunktion. Neue Ergebnisse von Nathan et al. zur Bedeutung von Sprouty1 für den MAPK-Pathway deuten darauf hin, dass es neben Sprouty1 aber weitere Regulatoren der ERK-MAP-Kinase geben muss (Charles et al. 2010). Durch Überexpression von Sprouty1 im Mausmodell konnte die Aktivität von ERK1/2 in dieser Studie nicht signifikant gesenkt werden. Ebenso zeigten sich in dieser Arbeit keine sichtbaren Veränderungen an der Zellmorphologie und -struktur des Myokards durch die erhöhte Sprouty1-Expression.

Das Gewebe des Herzens besteht je nach untersuchter Spezies zu lediglich 30-54 % aus Myozyten, während sich die übrigen Anteile auf kardialen Fibroblasten, Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen verteilen (Nag 1980; Banerjee et al. 2007). Diese verschiedenen Zelltypen stehen biochemisch, mechanisch und elektrisch in engem Kontakt zueinander und bilden so ein äußerst komplexes Netzwerk (Camelliti et al. 2005). Trotz dieser Diversität der Zellen lag das Interesse in vielen früheren Arbeiten vor allem auf Kardiomyozyten, während Fibroblasten eher im Hintergrund standen (Souders et al. 2009). Fibrose und fibrotische Veränderungen gelten bisher als Sekundärphänomene, die primäre Effekte an Kardiomyozyten lediglich begleiten oder in deren Folge auftreten. Im Gegensatz zur dieser traditionellen Sichtweise der Fibrose deuten die Daten der Arbeit zur Bedeutung der miRNA-21 am Ventrikel von Thum et al. und weitere aktuelle Veröffentlichungen darauf hin, dass die Fibroblasten selbst primäre Effekte auf noch unveränderte Kardiomyozyten ausüben und somit eine Schlüsselrolle für die Entwicklung der myokardialen Dysfunktion spielen (Thum et al. 2008). Expressionsanalysen dazu belegen in der Tat, dass die miRNA-21 in Kardiomyozyten nur minimal exprimiert wird und dass sich die myozytäre miRNA-21-



Expression am pathologisch veränderten Herz nicht signifikant ändert. Diese Daten deuten darauf hin, dass die miRNA-21 in Kardiomyozyten keine bedeutende Funktion haben dürfte, zumal auch Inhibierung und Expressionssteigerung der miRNA-21 keinerlei Effekt auf die Muskelzellen haben. In Fibroblasten jedoch liegen die miRNA-21-Expressionslevel schon am gesunden Herz signifikant höher, bei Stressbelastung des Herzens steigt die Expression hier nochmals deutlich an (Sayed et al. 2008; Thum et al. 2008; Kumarswamy et al. 2011). Unsere Arbeit konnte durch Expressionsanalysen und mikroskopische Untersuchungen zeigen, dass linke Vorhöfe von Patienten bei Vorhofflimmern besonders durch einen vermehrten Kollagen-Gehalt und vermehrten Anteil an Fibroblasten charakterisiert sind. Dieser korreliert mit der miRNA-21-Expression und ist negativ korreliert zur Proteinexpression von Sprouty1. An den Myozyten lassen sich dahingegen phänotypisch keine Veränderungen zwischen Sinusrhythmus und Vorhofflimmern feststellen.

Vorarbeiten an Fibroblasten konnten bereits nachweisen, dass die GTPase Rac1 sowie die Mediatoren Connective Tissue Growth Factor und Lysyl Oxidase eine Schlüsselrolle für die Pathogenese des Vorhofflimmerns spielen und zusammen eine Signaltransduktionskaskade bilden, die zu vermehrter Fibrose führt (Adam et al. 2007; Adam et al. 2011; Kiryu et al. 2012). Am Anfang dieser Kaskade steht extrazellulär zirkulierendes Angiotensin II, das nach Bindung an seinen Rezeptor die Rac1-GTPase durch Translokation an die Zellmembran aktiviert (Ford et al. 1999). Rac1 wiederum aktiviert in der Folge die NADPH-Oxidase, die dadurch vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bilden kann (Brown et al. 2006; Custodis et al. 2006; Adam et al. 2007). Diese Signaltransduktionskaskade, die zu vermehrtem oxidativem Stress auf die Zellen führt, wurde inzwischen auch in anderen Geweben, beispielsweise in Epithelzellen der Niere, beschrieben (Kiryu et al. 2012). Vorangegangene Studien wiesen nach, dass bei Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) oder dilatativer Kardiomyopathie (DCM) sowohl die Aktivität der NADPH-Oxidase als auch die Aktivität der Rac1-GTPase deutlich erhöht sind (Maack et al. 2003; Adam et al. 2007). Weiterhin konnte bereits nachgewiesen werden, dass Vorhofflimmern mit substantiellen oxidativen Veränderungen durch ROS einhergeht, darunter mitochondriale DNA-Schäden und Überaktivität von proliferativ wirksamen Enzymen im Gewebe des Vorhofs (Adam et al. 2010).

Ziel unserer Arbeit war es nun, die Rolle der miRNA-21 in der Pathogenese der atrialen Fibrose bei Vorhofflimmern zu identifizieren und eine mögliche Beteiligung der miRNA-21

an der oben beschriebenen Signaltransduktion aufzuzeigen. Zu diesem Zweck führten wir Experimente an kardialen Fibroblasten durch. Diese zeigen eine Expressionssteigerung der miRNA-21 durch Angiotensin II als wichtigem Regulator des strukturellen Remodelings und Aktivator der Rac1-GTPase, CTGF und LOX (Goette et al. 2000; Li et al. 2001; Ruperez et al. 2003; Adam et al. 2011). Die Spouty1-Expression hingegen wurde durch Angiotensin II signifikant gesenkt. Diese Effekte auf die miRNA-21- und Spouty1-Expression lassen sich durch Behandlung mit einem spezifischen Hemmer von Rac1 vollständig aufheben. Interessant ist, dass auch die alleinige Stimulation mit CTGF, einem Aktivator von LOX (Adam et al. 2011), ebenfalls zu einer Expressionssteigerung der miRNA-21 und verminderter Spouty1-Expression führt. Behandelt man die Zellen gleichzeitig mit dem small molecule inhibitor BAPN, einem spezifischen Hemmstoff von LOX, so lassen sich alle Änderungen der Expression der miRNA-21 und von Spouty1 vollständig verhindern. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass durch die Behandlung der kardialen Fibroblasten mit einer small interfering RNA (siRNA) für LOX oder CTGF die Effekte von Angiotensin II auf die miRNA-21-Expression komplett aufgehoben werden können. Zusammenfassend kann man festhalten, dass unsere Ergebnisse Rac1, CTGF und LOX als wichtige Mediatoren für die Angiotensin II-induzierte Regulation der miRNA-21 und Spouty1 identifizieren.

Als weiteres Schlüsselenzym für fibrotische Veränderungen und strukturelles Remodeling ist in Vorarbeiten die Lysyl Oxidase identifiziert worden. Die Lysyl Oxidase, die Kupfer-abhängig arbeitet, ist essentiell für die Bildung vieler Proteine der extrazellulären Matrix, darunter Typ I-III Prokollagene (Maki et al. 2002; Hornstra et al. 2003). Außerdem ist LOX verantwortlich für das sogenannte Crosslinking von Kollagen. Durch diesen Prozess wandelt LOX lösliche Kollagen-Moleküle in unlösliche, fibrotisch organisierte Formen um (Smith-Mungo and Kagan 1998; Lopez et al. 2009). Studien konnten nachweisen, dass eine erhöhte Expression und Aktivität der Lysyl Oxidase bei zahlreichen pathologischen Veränderungen des Herzens nachzuweisen ist. Dazu zählen fibrotische Veränderungen des linksventrikulären Myokards (Maki et al. 2002), linke Ventrikel von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (Sivakumar et al. 2008) und linke Vorhöfe von Patienten bei Vorhofflimmern (Adam et al. 2011). Die profibrotischen Effekte von LOX wurden inzwischen in zahlreichen Arbeiten untersucht und bestätigt (Lopez et al. 2010; Voloshenyuk et al. 2011). Aktuell rückt die Lysyl Oxidase zunehmend auch ins Interesse der Tumorbiologie, da sie eine wichtige Rolle für Metastasierungsvorgänge und Tumorwachstum zu spielen scheint (Wilgus et al. 2011; Xiao and Ge 2012). In der Vergangenheit ging man davon aus, dass die Lysyl Oxidase

ausschließlich extrazelluläre Effekte ausübt, denn LOX wird als Proenzym in den Extrazellulärraum sezerniert und erst dort zum aktiven Enzym weiter prozessiert (Molnar et al. 2003; Lopez et al. 2010). Neue Daten deuten aber darauf hin, dass das sezernierte und prozessierte LOX zum Teil wieder aus dem Extrazellulärraum in die Zelle hinein gelangt. In der Zelle übernehmen zytosolische und intranukleäre Formen der Lysyl Oxidase wichtige Kontrollfunktionen für die Zelladhäsion, Zellmotilität und Genexpression (Li et al. 1997; Kagan and Li 2003; Saad et al. 2010). In unserer Arbeit konnten wir einerseits zeigen, dass die Lysyl Oxidase auch im reinen Lysat von neonatalen kardialen Fibroblasten exprimiert wird und damit in diesen Zellen auch intrazellulär vorkommen muss. Andererseits führt eine Expressionssteigerung der Lysyl Oxidase durch Transfektion mit einem cDNA-Klon für LOX zu vermehrter Expression von Droscha und Dicer, die die wichtigsten Endonukleasen der miRNA darstellen (Ambros 2004; Landthaler et al. 2004; Du and Zamore 2005; Kuehbacher et al. 2007). Damit gelang es erstmals einen Zusammenhang zwischen dem profibrotischen Mediator LOX und der Synthese der miRNA-21 herzustellen und die Signaltransduktionskaskade um diesen Mechanismus zu erweitern.

Um die Rolle der myokardialen Rac1-GTPase für die miRNA-21- und Spouty1-Expression auch *in vivo* charakterisieren zu können, untersuchten wir transgene RacET-Mäuse, die sich durch kardiale Überexpression an konstitutiv aktivem Rac1 unter Kontrolle des alpha-myosin heavy chain (MHC)-Promotors auszeichnen. Die RacET-Mäuse entwickeln, wie bereits nachgewiesen wurde, im Alter von etwa sechs Monaten spontan Vorhofflimmern (Adam et al. 2007; Adam et al. 2010; Reil et al. 2010; Adam et al. 2011). Vorarbeiten zu diesem Thema zeigten, dass RacET-Mäuse durch vermehrte Expression von CTGF und LOX charakterisiert sind. Außerdem sind die Vorhöfe der Tiere durch vermehrte Fibrose gekennzeichnet (Adam et al. 2007; Adam et al. 2010). Die von uns durchgeführten TaqMan-Analysen ergaben deutlich erhöhte miRNA-21-Expressionslevel in den linken Vorhöfen der RacET-Mäuse, die mit einer verminderten Sprouty1-Expression assoziiert sind. Diese Ergebnisse deuten auf eine Rac1-abhängige Regulation fibrotischer Prozesse durch die miRNA-21 und Sprouty1 *in vivo* hin. Die Rac1-GTPase lässt sich durch HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine), die die G-Protein-Funktion hemmen (Takemoto et al. 2001; Laufs et al. 2002; Custodis et al. 2006), effektiv inhibieren. Tatsächlich zeigte sich, dass die Behandlung der RacET-Mäuse mit Statinen die miRNA-21-Expression deutlich senkt und die Sprouty1-Expression steigert. Die Expressionshemmung der miRNA-21 erfolgt dabei indirekt über eine Verminderung der

Rac1-Aktivität. Diese Effekte gehen weiterhin einher mit einem verminderten Auftreten von Vorhofflimmern bei den im Versuch genutzten RacET-Mäusen.

Um schließlich die direkte Rolle der miRNA-21 für atriale Fibrose *in vivo* näher charakterisieren zu können, untersuchten wir den Effekt der Behandlung mit chemisch modifizierten Antisense-Oligonukleotiden (Krützfeldt et al. 2005) spezifisch gegen miRNA-21, sogenanntes Antagomir-21 (Thum et al. 2008). Wir analysierten dazu den Kollagengehalt in linken Vorhöfen von Mäusen nach einem Myokardinfarkt, hervorgerufen durch Ligation der LAD. Die Behandlung mit Antagomir-21 verhinderte effektiv die durch den Infarkt induzierte Fibrose der Vorhöfe, wie sie bei unbehandelten Infarktmäusen auftritt (Fiedler et al. 2011). Aufgrund dieser Ergebnisse zeigt sich in unserer Arbeit die direkte Hemmung der miRNA-21 durch korrespondierende Antagomirs als potentiell therapeutisches Ziel zur Prävention der atrialen Fibrose. Antagomirs wirken dabei in den Zellen auf verschiedenen Wegen. Sie können zum einen direkt an die korrespondierende miRNA binden und als kompetitiver Inhibitor wirken. Eine weitere Möglichkeit ist die Bindung an die pre-miRNA, was eine weitere Prozessierung in fertige miRNA verhindert. Schließlich können Antagomirs auch direkt im Zellkern wirken und hier den Export der pre-miRNA stören (van Rooij et al. 2008). Antagomirs als chemisch modifizierte Oligonukleotide beeinflussen dabei die miRNA-Expression hocheffektiv (Krützfeldt et al. 2005). Eine einzelne intravenöse Antagomir-Applikation reicht im Tierversuch aus, um die Funktion der entsprechenden miRNA für mehrere Wochen zu inhibieren (van Rooij et al. 2008). Chemische Modifizierungen der Antagomirs wie die in vielen Studien angewandte MOE-Methode (2-O-methoxyethylphosphorothioat) oder die 2-O-Methylierung (Esau et al. 2006; Weiler et al. 2006; Peek and Behlke 2007) helfen dabei, eine bessere Wirksamkeiten zu erreichen. Verabreicht wurden den Versuchstieren in aktuellen Versuchsreihen sehr hohe Dosen, in den meisten Fällen bis zu 80 mg/kg. Die korrespondierenden miRNAs werden zudem als Folge der Behandlung in allen Geweben des Körpers gehemmt und nicht spezifisch in nur einem gewünschten Organ oder Zelltyp (Krützfeldt et al. 2005). Damit besteht aufgrund der multiplen Funktionen und Interaktionen der miRNAs immer auch die Möglichkeit, neben der gewünschten Wirkung am Zielorgan weitere Reaktionen oder sogar pathologische Veränderungen im restlichen Körper zu induzieren (sogenannte Off-target-Effekte). Ein besseres Verständnis der Wirkmechanismen und Abhängigkeiten der einzelnen miRNAs voneinander muss zukünftig dazu beitragen vor allem dieses Problem zu lösen und regulatorische Effekte der Antagomirs besser einschätzen zu können. Aktuell sind zahlreiche Verbesserungen der Antagomirs, die

für den therapeutischen Einsatz am Menschen notwendig wären, Gegenstand zahlreicher Studien (van Rooij et al. 2008). Einige wichtige, hier zu nennende Punkte sind beispielsweise die Steigerung der Gesamt-Bioverfügbarkeit (Akinc et al. 2008), das Erreichen von größtmöglicher Zellspezifität und der Einsatz von neuen, weniger toxischen Modifikationen (Soutschek et al. 2004). Antagomirs dürften daher in Anbetracht der Vielzahl neu-identifizierter, wichtiger miRNAs zu einer bedeutenden zukünftigen Therapieoption für unterschiedlichste metabolische, neoplastische und infektiöse Krankheiten werden.

Nicht ohne Erwähnung bleiben sollte eine erst kürzlich publizierte Arbeit der Forschungsgruppe von David M. Patrick der University of Texas in Dallas. Auch er untersuchte die Rolle der miRNA-21 bezüglich Fibrose und Hypertrophie des Ventrikels und nutze dafür ein transgenes miRNA-21<sup>-/-</sup>-Mausmodell, also Mäuse, die keine miRNA-21 exprimieren können. Ergänzend wurde in dieser Studie die Wirkung eines neuen, aber mit nur 8 Nukleotiden Länge sehr kurzem anti-miRNA-21-Oligonukleotids für die Entwicklung der Fibrose nach Belastung des Ventrikels *in vivo* untersucht (Patrick et al. 2010). Dabei konnte Patrick die Ergebnisse von Thum et al. nicht bestätigen. Die transgenen miRNA-21-defizitären Mäuse entwickelten nahezu identische fibrotische Veränderungen sowie strukturelles Remodeling nach Induktion verschiedener Formen von kardialen Stress wie auch die Wildtyp-Mäuse. Ebenso erbrachte die anti-miRNA-21-Behandlung von Mäusen, bei denen durch Transverse Aortic Constriction (TAC) Hypertrophie und Fibrose des Ventrikels ausgelöst wurde, keinen Benefit verglichen mit unbehandelten TAC-Mäusen. Daraus schloss Patrick, dass die miRNA-21 nur geringe Bedeutung für Fibrose und strukturelles Remodeling haben muss. Die daraufhin durchgeführten Untersuchungen von Thum et al. und Liu et al. konnten die Daten von Patrick jedoch entkräften (Xiao et al. 2010; Thum et al. 2011). Thum wies nach, dass sowohl im eigenen Versuch als auch in klinischen Studien die von Patrick eingesetzte 8-Nukleotid anti-miRNA-21 der hochspezifischen 22- und 15-Nukleotid anti-miR-21 deutlich unterlegen ist. Er konnte experimentell die schlechte Wirksamkeit der 8-Nukleotid anti-miRNA-21 bestätigen und damit die Ergebnisse von Patrick bezüglich dieses Punktes relativieren (Rosie et al. 2007; Thum et al. 2011). Aktuell ist allerdings noch nicht bekannt, warum sich der von Patrick et al. genutzte kongenital miR-21-defizitäre Phänotyp anders verhält als die über lange Zeit mit Antagomir-21 behandelten Mäuse. Genetische Kompensationsmechanismen, die erst durch die vollständige Löschung des miRNA-21-Gens aktiviert werden, könnten hier eine mögliche Erklärung bieten, müssen aber in zukünftigen Studien noch untersucht werden.

Wir mussten bei der Durchführung unserer Arbeit auch Limitierungen in Kauf nehmen. Wir nutzten in der Zellkultur neonatale kardiale Fibroblasten, um die Signalkaskade der Fibrose näher untersuchen zu können und spezielle Schritte der Kaskade zu beschleunigen oder zu inhibieren. Diesen isolierten und kultivierten Zellen mangelt es aber an Bedingungen, denen Fibroblasten *in vivo* ausgesetzt sind. So fehlen den kardialen Fibroblasten in der Zellkultur beispielsweise der Kontakt zu anderen Zelltypen, die auf die Zellen einwirkenden mechanischen Kräfte des Herzens und die elektrische Stimulation des Vorhofes *in vivo*. Um daher zusätzlich bessere Daten zur Situation *in vivo* zu erhalten, untersuchten wir neben den kultivierten Zellen sowohl humane linksatriale Gewebe-Proben als auch zwei verschiedene Maus-Modelle. Da Vorhofflimmern dabei fast immer im linken Vorhof entsteht (Nattel et al., 2006), zogen wir in dieser Arbeit linksatriale Appendices als Gewebe für unsere Untersuchungen heran. Die Proben stammten von Patienten, die sich in unserer herzchirurgischen Klinik einer Mitralklappenoperation unterzogen und wir unterschieden Patienten im permanenten Vorhofflimmern von Kontrollpersonen im Sinusrhythmus. Wie schon aus vorangegangenen Studien bekannt war, zeigten die Vorhöfe bei Vorhofflimmern vermehrt interstitielle Fibrose (Allessie et al. 2002; Adam et al. 2007) als Determinante des strukturellen Remodelings.

Auch die Versuche an den Maus-Modellen konnten wir teilweise nur mit Einschränkungen durchführen. So war es uns nicht möglich, den Effekt einer Langzeitbehandlung von RacET-Mäusen mit Antagomir-21 zu testen. Dieser Versuch hätte unsere Daten zur Statinbehandlung der RacET-Tiere sinnvoll ergänzt und uns zeigen können, ob die langfristige Hemmung der miRNA-21 die Prävalenz von Vorhofflimmern und Fibrose bei diesen Tieren effektiv senken kann. Das Problem hierbei lag darin, dass erste Vorhofflimmer-Episoden der RacET-Mäuse im Alter von ungefähr sechs Monaten auftreten (Reil et al. 2010) und daraus resultierend eine Behandlung mit Antagomir-21 über durchschnittlich zehn Monate nötig gewesen wäre. Dieser Versuch ist aufgrund der aktuell noch sehr hohen Kosten der Antagomirs nicht zu finanzieren. Daher entschieden wir uns im RacET-Modell für eine Behandlung mit Statinen und konnten dadurch nachweisen, dass die Statinbehandlung zu deutlich verminderter miRNA-21-Expression und einer damit assoziierten Senkung der Prävalenz von Vorhofflimmern führt. In einem weiteren Versuch konnten wir mit Hilfe des Myokardinfarkt-Modells schließlich auch Antagomir-21 einsetzen, da hier die Fibrose innerhalb eines viel kürzeren Zeitraums induziert wird und daher eine deutlich kürzere Behandlungsdauer nötig ist. Hier konnten wir zeigen, dass die Fibrose des Vorhofs nach dem Infarkt durch die

Antagomir-21-Behandlung effektiv verhindert werden kann. Betrachtet man die Ergebnisse zusammen mit den Auswertungen der menschlichen Vorhofproben, so zeigen sich deutliche Hinweise auf die funktionelle Bedeutung der miRNA-21 für die Pathogenese der Fibrose des Vorhofs bei Vorhofflimmern *in vivo*.

Zusammenfassend können wir festhalten, dass linke Vorhöfe von Patienten bei Vorhofflimmern durch eine vermehrte Expression der miRNA-21 und verminderte Expression des Downstream-Targets Sprouty1 charakterisiert sind. Angiotensin II erhöht die miRNA-21-Expression durch Aktivierung der Rac1-GTPase, CTGF und LOX. LOX reguliert das Kollagen-Crosslinking im Extrazellularraum und intrazellulär die Aktivierung der Endonukleasen der miRNA Drosha und Dicer. Das bessere Verständnis der Signaltransduktion der Fibrose des Vorhofs könnte zukünftig bei der Identifizierung neuer therapeutischer Angriffspunkte helfen. Ein Beispiel hierfür ist die Regulation der miRNA-21 durch Antagomir-21.



## 6. Literaturverzeichnis

1. Abelson, J. F., K. Y. Kwan, B. J. O'Roak, D. Y. Baek, A. A. Stillman, T. M. Morgan, C. A. Mathews, D. L. Pauls, M. R. Rasin, M. Gunel, N. R. Davis, A. G. Ercan-Sencicek, D. H. Guez, J. A. Spertus, J. F. Leckman, L. S. t. Dure, R. Kurlan, H. S. Singer, D. L. Gilbert, A. Farhi, A. Louvi, R. P. Lifton, N. Sestan and M. W. State (2005). "Sequence variants in *SLITRK1* are associated with Tourette's syndrome." *Science* 310(5746): 317-320.
2. Adam, O., G. Frost, F. Custodis, M. A. Sussman, H. J. Schafers, M. Bohm and U. Laufs (2007). "Role of Rac1 GTPase activation in atrial fibrillation." *J Am Coll Cardiol* 50(4): 359-367.
3. Adam, O. and U. Laufs (2008). "Antioxidative effects of statins." *Arch Toxicol* 82(12): 885-892.
4. Adam, O., D. Lavall, K. Theobald, M. Hohl, M. Grube, S. Ameling, M. A. Sussman, S. Rosenkranz, H. K. Kroemer, H. J. Schäfers, M. Böhm and U. Laufs (2010). "Rac1-induced connective tissue growth factor regulates connexin 43 and N-cadherin expression in atrial fibrillation." *J Am Coll Cardiol* 55(5): 469-480.
5. Adam, O., K. Theobald, D. Lavall, M. Grube, H. K. Kroemer, S. Ameling, H. J. Schafers, M. Bohm and U. Laufs (2011). "Increased lysyl oxidase expression and collagen cross-linking during atrial fibrillation." *J Mol Cell Cardiol* 50(4): 678-685.
6. Akinc, A., A. Zumbuehl, M. Goldberg, E. S. Leshchiner, V. Busini, N. Hossain, S. A. Bacallado, D. N. Nguyen, J. Fuller, R. Alvarez, A. Borodovsky, T. Borland, R. Constien, A. de Fougères, J. R. Dorkin, K. Narayanannair Jayaprakash, M. Jayaraman, M. John, V. Kotliansky, M. Manoharan, L. Nechev, J. Qin, T. Racie, D. Raitcheva, K. G. Rajeev, D. W. Sah, J. Soutschek, I. Toudjarska, H. P. Vornlocher, T. S. Zimmermann, R. Langer and D. G. Anderson (2008). "A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics." *Nat Biotechnol* 26(5): 561-569.
7. Alexander, R. W. (1995). "Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective." *Hypertension* 25(2): 155-161.
8. Allesie, M., J. Ausma and U. Schotten (2002). "Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation." *Cardiovasc Res* 54(2): 230-246.
9. Ambros, V. (2004). "The functions of animal microRNAs." *Nature* 431(7006): 350-355.

10. Ameres, S. L., J. Martinez and R. Schroeder (2007). "Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC." *Cell* 130(1): 101-112.
11. Anokye-Danso, F., C. M. Trivedi, D. Juhr, M. Gupta, Z. Cui, Y. Tian, Y. Zhang, W. Yang, P. J. Gruber, J. A. Epstein and E. E. Morrisey (2011). "Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency." *Cell Stem Cell* 8(4): 376-388.
12. Banerjee, I., J. W. Fuseler, R. L. Price, T. K. Borg and T. A. Baudino (2007). "Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(3): H1883-1891.
13. Barringhaus, K. G. and P. D. Zamore (2009). "MicroRNAs: regulating a change of heart." *Circulation* 119(16): 2217-2224.
14. Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." *Cell* 136(2): 215-233.
15. Benjamin, E. J., D. Levy, S. M. Vaziri, R. B. D'Agostino, A. J. Belanger and P. A. Wolf (1994). "Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort. The Framingham Heart Study." *JAMA* 271(11): 840-844.
16. Berezikov, E., V. Guryev, J. van de Belt, E. Wienholds, R. H. Plasterk and E. Cuppen (2005). "Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes." *Cell* 120(1): 21-24.
17. Bohnsack, M. T., K. Czaplinski and D. Gorlich (2004). "Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs." *RNA* 10(2): 185-191.
18. Boldt, A., A. Scholl, J. Garbade, M. E. Resetar, F. W. Mohr, J. F. Gummert and S. Dhein (2006). "ACE-inhibitor treatment attenuates atrial structural remodeling in patients with lone chronic atrial fibrillation." *Basic Res Cardiol* 101(3): 261-267.
19. Boldt, A., U. Wetzels, J. Lauschke, J. Weigl, J. Gummert, G. Hindricks, H. Kottkamp and S. Dhein (2004). "Fibrosis in left atrial tissue of patients with atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease." *Heart* 90(4): 400-405.
20. Bonauer, A., G. Carmona, M. Iwasaki, M. Mione, M. Koyanagi, A. Fischer, J. Burchfield, H. Fox, C. Doebele, K. Ohtani, E. Chavakis, M. Potente, M. Tjwa, C. Urbich, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2009). "MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice." *Science* 324(5935): 1710-1713.

21. Brigstock, D. R. (1999). "The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family." *Endocr Rev* 20(2): 189-206.
22. Brown, J. H., D. P. Del Re and M. A. Sussman (2006). "The Rac and Rho hall of fame: a decade of hypertrophic signaling hits." *Circ Res* 98(6): 730-742.
23. Burstein, B. and S. Nattel (2008). "Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation." *J Am Coll Cardiol* 51(8): 802-809.
24. Cabello-Verrugio, C., G. Morales, D. Cabrera, C. P. Vio and E. Brandan (2011). "Angiotensin ii receptor type 1 blockade decreases CTGF/CCN2-mediated damage and fibrosis in normal and dystrophic skeletal muscles." *J Cell Mol Med*.
25. Camelliti, P., A. D. McCulloch and P. Kohl (2005). "Microstructured cocultures of cardiac myocytes and fibroblasts: a two-dimensional in vitro model of cardiac tissue." *Microsc Microanal* 11(3): 249-259.
26. Camm, A. J., P. Kirchhof, G. Y. Lip, U. Schotten, I. Savelieva, S. Ernst, I. C. Van Gelder, N. Al-Attar, G. Hindricks, B. Prendergast, H. Heidbuchel, O. Alfieri, A. Angelini, D. Atar, P. Colonna, R. De Caterina, J. De Sutter, A. Goette, B. Gorenek, M. Heldal, S. H. Hohloser, P. Kolh, J. Y. Le Heuzey, P. Ponikowski, F. H. Rutten, A. Vahanian, A. Auricchio, J. Bax, C. Ceconi, V. Dean, G. Filippatos, C. Funck-Brentano, R. Hobbs, P. Kearney, T. McDonagh, B. A. Popescu, Z. Reiner, U. Sechtem, P. A. Sirnes, M. Tendera, P. E. Vardas, P. Widimsky, V. Agladze, E. Aliot, T. Balabanski, C. Blomstrom-Lundqvist, A. Capucci, H. Crijns, B. Dahlof, T. Folliguet, M. Glikson, M. Goethals, D. C. Gulba, S. Y. Ho, R. J. Klautz, S. Kose, J. McMurray, P. Perrone Filardi, P. Raatikainen, M. J. Salvador, M. J. Schalij, A. Shpektor, J. Sousa, J. Stepinska, H. Uuetoa, J. L. Zamorano and I. Zupan (2010). "Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC)." *Europace* 12(10): 1360-1420.
27. Cappola, A. R., L. P. Fried, A. M. Arnold, M. D. Danese, L. H. Kuller, G. L. Burke, R. P. Tracy and P. W. Ladenson (2006). "Thyroid status, cardiovascular risk, and mortality in older adults." *JAMA* 295(9): 1033-1041.
28. Casci, T., J. Vinos and M. Freeman (1999). "Sprouty, an intracellular inhibitor of Ras signaling." *Cell* 96(5): 655-665.
29. Charles, N. J., R. C. Huebert, S. Lee, N. Adhikari, S. Polster, J. E. Rider, E. Braunlin, A. Mariash, M. Robledo, D. Schuweiler and J. L. Hall (2010). "Targeted Sprouty1 overexpression in cardiac myocytes does not alter myocardial remodeling or function." *Mol Cell Biochem* 342(1-2): 57-62.

30. Chen, K., J. Chen, Y. Liu, J. Xie, D. Li, T. Sawamura, P. L. Hermonat and J. L. Mehta (2005). "Adhesion molecule expression in fibroblasts: alteration in fibroblast biology after transfection with LOX-1 plasmids." *Hypertension* 46(3): 622-627.
31. Chen, M. M., A. Lam, J. A. Abraham, G. F. Schreiner and A. H. Joly (2000). "CTGF expression is induced by TGF- beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis." *J Mol Cell Cardiol* 32(10): 1805-1819.
32. Chilton, L., W. R. Giles and G. L. Smith (2007). "Evidence of intercellular coupling between co-cultured adult rabbit ventricular myocytes and myofibroblasts." *J Physiol* 583(Pt 1): 225-236.
33. Clop, A. (2009). "Insights into the importance of miRNA-related polymorphisms to heart disease." *Hum Mutat* 30(8): v.
34. Csiszar, K. (2001). "Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 70: 1-32.
35. Custodis, F., M. Eberl, H. Kilter, M. Bohm and U. Laufs (2006). "Association of RhoGDIalpha with Rac1 GTPase mediates free radical production during myocardial hypertrophy." *Cardiovasc Res* 71(2): 342-351.
36. Custodis, F., M. Eberl, H. Kilter, M. Böhm and U. Laufs (2006). "Association of RhoGDIalpha with Rac1 GTPase mediates free radical production during myocardial hypertrophy." *Cardiovasc.Res.* 71(2): 342-351.
37. Dai, Y., Y. S. Huang, M. Tang, T. Y. Lv, C. X. Hu, Y. H. Tan, Z. M. Xu and Y. B. Yin (2007). "Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients." *Lupus* 16(12): 939-946.
38. Dean, R. G., L. C. Balding, R. Candido, W. C. Burns, Z. Cao, S. M. Twigg and L. M. Burrell (2005). "Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis after myocardial infarction." *J Histochem Cytochem* 53(10): 1245-1256.
39. Dechend, R., A. Fiebeler, J. K. Park, D. N. Muller, J. Theuer, E. Mervaala, M. Bieringer, D. Gulba, R. Dietz, F. C. Luft and H. Haller (2001). "Amelioration of angiotensin II-induced cardiac injury by a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor." *Circulation* 104(5): 576-581.
40. Dendooven, A., K. G. Gerritsen, T. Q. Nguyen, R. J. Kok and R. Goldschmeding (2011). "Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) ELISA: a novel tool for monitoring fibrosis." *Biomarkers* 16(4): 289-301.

41. Diekmann, D., A. Abo, C. Johnston, A. W. Segal and A. Hall (1994). "Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity." *Science* 265(5171): 531-533.
42. Du, T. and P. D. Zamore (2005). "microPrimer: the biogenesis and function of microRNA." *Development* 132(21): 4645-4652.
43. Dudley, S. C., Jr., N. E. Hoch, L. A. McCann, C. Honeycutt, L. Diamandopoulos, T. Fukai, D. G. Harrison, S. I. Dikalov and J. Langberg (2005). "Atrial fibrillation increases production of superoxide by the left atrium and left atrial appendage: role of the NADPH and xanthine oxidases." *Circulation* 112(9): 1266-1273.
44. Duisters, R. F., A. J. Tijssen, B. Schroen, J. J. Leenders, V. Lentink, I. van der Made, V. Herias, R. E. van Leeuwen, M. W. Schellings, P. Barenbrug, J. G. Maessen, S. Heymans, Y. M. Pinto and E. E. Creemers (2009). "miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling." *Circ Res* 104(2): 170-178, 176p following 178.
45. Esau, C., S. Davis, S. F. Murray, X. X. Yu, S. K. Pandey, M. Pear, L. Watts, S. L. Booten, M. Graham, R. McKay, A. Subramaniam, S. Propp, B. A. Lollo, S. Freier, C. F. Bennett, S. Bhanot and B. P. Monia (2006). "miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting." *Cell Metab* 3(2): 87-98.
46. Everett, T. H. t., H. Li, J. M. Mangrum, I. D. McRury, M. A. Mitchell, J. A. Redick and D. E. Haines (2000). "Electrical, morphological, and ultrastructural remodeling and reverse remodeling in a canine model of chronic atrial fibrillation." *Circulation* 102(12): 1454-1460.
47. Ezekowitz, M. D., K. E. James, S. M. Nazarian, J. Davenport, J. P. Broderick, S. R. Gupta, V. Thadani, M. L. Meyer and S. L. Bridgers (1995). "Silent cerebral infarction in patients with nonrheumatic atrial fibrillation. The Veterans Affairs Stroke Prevention in Nonrheumatic Atrial Fibrillation Investigators." *Circulation* 92(8): 2178-2182.
48. Falk, R. H. (2001). "Atrial fibrillation." *N Engl J Med* 344(14): 1067-1078.
49. Feng, Y., X. Zhang, Q. Song, T. Li and Y. Zeng (2011). "Drosha processing controls the specificity and efficiency of global microRNA expression." *Biochim Biophys Acta* 1809(11-12): 700-707.
50. Fiedler, J., V. Jazbutyte, B. C. Kirchmaier, S. K. Gupta, J. Lorenzen, D. Hartmann, P. Galuppo, S. Kneitz, J. T. Pena, C. Sohn-Lee, X. Loyer, J. Soutschek, T. Brand, T. Tuschl, J. Heineke, U. Martin, S. Schulte-Merker, G. Ertl, S. Engelhardt, J. Bauersachs and T. Thum (2011). "MicroRNA-24 Regulates Vascularity After Myocardial Infarction." *Circulation* 124(6): 720-730.

51. Forbes, M. S. and N. Sperelakis (1985). "Intercalated discs of mammalian heart: a review of structure and function." *Tissue Cell* 17(5): 605-648.
52. Ford, C. M., S. Li and J. G. Pickering (1999). "Angiotensin II stimulates collagen synthesis in human vascular smooth muscle cells. Involvement of the AT(1) receptor, transforming growth factor-beta, and tyrosine phosphorylation." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(8): 1843-1851.
53. Frustaci, A., C. Chimenti, F. Bellocci, E. Morgante, M. A. Russo and A. Maseri (1997). "Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation." *Circulation* 96(4): 1180-1184.
54. Fuster, V., L. E. Ryden, D. S. Cannom, H. J. Crijns, A. B. Curtis, K. A. Ellenbogen, J. L. Halperin, J. Y. Le Heuzey, G. N. Kay, J. E. Lowe, S. B. Olsson, E. N. Prystowsky, J. L. Tamargo, S. Wann, S. C. Smith, Jr., A. K. Jacobs, C. D. Adams, J. L. Anderson, E. M. Antman, S. A. Hunt, R. Nishimura, J. P. Ornato, R. L. Page, B. Riegel, S. G. Priori, J. J. Blanc, A. Budaj, A. J. Camm, V. Dean, J. W. Deckers, C. Despres, K. Dickstein, J. Lekakis, K. McGregor, M. Metra, J. Morais, A. Osterspey and J. L. Zamorano (2006). "ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: full text: 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." *Europace* 8(9): 651-745.
55. Fuster, V., L. E. Ryden, D. S. Cannom, H. J. Crijns, A. B. Curtis, K. A. Ellenbogen, J. L. Halperin, J. Y. Le Heuzey, G. Neal Kay, J. E. Lowe, S. Bertil Olsson, E. N. Prystowsky, J. L. Tamargo and S. Wann (2006). "[Guidelines for the management of patients with atrial fibrillation. Executive summary]." *Rev Esp Cardiol* 59(12): 1329.
56. Gallagher, M. M. and J. Camm (1998). "Classification of atrial fibrillation." *Am J Cardiol* 82(8A): 18N-28N.
57. Girmatsion, Z., P. Biliczki, A. Bonauer, G. Wimmer-Greinecker, M. Scherer, A. Moritz, A. Bukowska, A. Goette, S. Nattel, S. H. Hohnloser and J. R. Ehrlich (2009). "Changes in microRNA-1 expression and IK1 up-regulation in human atrial fibrillation." *Heart Rhythm* 6(12): 1802-1809.
58. Goette, A., M. Arndt, C. Rocken, A. Spiess, T. Staack, J. C. Geller, C. Huth, S. Ansoerge, H. U. Klein and U. Lendeckel (2000). "Regulation of angiotensin II receptor subtypes during atrial fibrillation in humans." *Circulation* 101(23): 2678-2681.

59. Goette, A., M. Arndt, C. Rocken, A. Spiess, T. Staack, J. C. Geller, C. Huth, S. Ansorge, H. U. Klein and U. Lendeckel (2000). "Regulation of angiotensin II receptor subtypes during atrial fibrillation in humans 96." *Circulation* 101(23): 2678-2681.
60. Goette, A. and U. Lendeckel (2006). "[Morphological remodeling in atrial fibrillation]." *Herz* 31(2): 101-107; quiz 142-103.
61. Gregory, R. I., T. P. Chendrimada, N. Cooch and R. Shiekhattar (2005). "Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing." *Cell* 123(4): 631-640.
62. Hacohen, N., S. Kramer, D. Sutherland, Y. Hiromi and M. A. Krasnow (1998). "sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the *Drosophila* airways." *Cell* 92(2): 253-263.
63. Hanafusa, H., S. Torii, T. Yasunaga and E. Nishida (2002). "Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway." *Nat Cell Biol* 4(11): 850-858.
64. Hayashita, Y., H. Osada, Y. Tatematsu, H. Yamada, K. Yanagisawa, S. Tomida, Y. Yatabe, K. Kawahara, Y. Sekido and T. Takahashi (2005). "A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation." *Cancer Res* 65(21): 9628-9632.
65. He, L., J. M. Thomson, M. T. Hemann, E. Hernando-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S. W. Lowe, G. J. Hannon and S. M. Hammond (2005). "A microRNA polycistron as a potential human oncogene." *Nature* 435(7043): 828-833.
66. Hebert, S. S., K. Horre, L. Nicolai, A. S. Papadopoulou, W. Mandemakers, A. N. Silahatoglu, S. Kauppinen, A. Delacourte and B. De Strooper (2008). "Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(17): 6415-6420.
67. Heeringa, J., D. A. van der Kuip, A. Hofman, J. A. Kors, G. van Herpen, B. H. Stricker, T. Stijnen, G. Y. Lip and J. C. Witteman (2006). "Prevalence, incidence and lifetime risk of atrial fibrillation: the Rotterdam study." *Eur Heart J* 27(8): 949-953.
68. Hornstra, I. K., S. Birge, B. Starcher, A. J. Bailey, R. P. Mecham and S. D. Shapiro (2003). "Lysyl oxidase is required for vascular and diaphragmatic development in mice." *J Biol Chem* 278(16): 14387-14393.
69. Houbaviy, H. B., M. F. Murray and P. A. Sharp (2003). "Embryonic stem cell-specific MicroRNAs." *Dev Cell* 5(2): 351-358.



70. Huebert, R. C., Q. Li, N. Adhikari, N. J. Charles, X. Han, M. K. Ezzat, S. Grindle, S. Park, S. Ormaza, D. Fermin, L. W. Miller and J. L. Hall (2004). "Identification and regulation of Sprouty1, a negative inhibitor of the ERK cascade, in the human heart." *Physiol Genomics* 18(3): 284-289.
71. Hutvagner, G. (2005). "Small RNA asymmetry in RNAi: function in RISC assembly and gene regulation." *FEBS Lett* 579(26): 5850-5857.
72. Ibanez-Ventoso, C., M. Vora and M. Driscoll (2008). "Sequence relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology." *PLoS One* 3(7): e2818.
73. Ihn, H. (2002). "Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF." *Curr Opin Rheumatol* 14(6): 681-685.
74. Kagan, H. M. and W. Li (2003). "Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell." *J Cell Biochem* 88(4): 660-672.
75. Ketting, R. F., S. E. Fischer, E. Bernstein, T. Sijen, G. J. Hannon and R. H. Plasterk (2001). "Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*." *Genes Dev* 15(20): 2654-2659.
76. Kim, V. N. (2005). "MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing." *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(5): 376-385.
77. Kim, Y. M., T. J. Guzik, Y. H. Zhang, M. H. Zhang, H. Kattach, C. Ratnatunga, R. Pillai, K. M. Channon and B. Casadei (2005). "A myocardial Nox2 containing NAD(P)H oxidase contributes to oxidative stress in human atrial fibrillation." *Circ Res* 97(7): 629-636.
78. Kim, Y. M., H. Kattach, C. Ratnatunga, R. Pillai, K. M. Channon and B. Casadei (2008). "Association of atrial nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity with the development of atrial fibrillation after cardiac surgery." *J Am Coll Cardiol* 51(1): 68-74.
79. Kiryu, M., S. Niwano, H. Niwano, J. Kishihara, Y. Aoyama, H. Fukaya, Y. Masaki and T. Izumi (2012). "Angiotensin II-mediated up-regulation of connective tissue growth factor promotes atrial tissue fibrosis in the canine atrial fibrillation model." *Europace*.
80. Koitabashi, N., M. Arai, S. Kogure, K. Niwano, A. Watanabe, Y. Aoki, T. Maeno, T. Nishida, S. Kubota, M. Takigawa and M. Kurabayashi (2007). "Increased connective tissue growth factor relative to brain natriuretic peptide as a determinant of myocardial fibrosis." *Hypertension* 49(5): 1120-1127.

81. Kolfshoten, I. G., E. Roggli, V. Nesca and R. Regazzi (2009). "Role and therapeutic potential of microRNAs in diabetes." *Diabetes Obes Metab* 11 Suppl 4: 118-129.
82. Komatsu, T., H. Tachibana, Y. Sato, M. Ozawa, F. Kunugida and M. Nakamura (2010). "Efficacy of antiarrhythmic drug therapy in preventing recurrence of atrial fibrillation and long-term cardiovascular prognosis in patients with asymptomatic paroxysmal atrial fibrillation." *Int Heart J* 51(2): 98-104.
83. Kopecky, S. L., B. J. Gersh, M. D. McGoon, J. P. Whisnant, D. R. Holmes, Jr., D. M. Ilstrup and R. L. Frye (1987). "The natural history of lone atrial fibrillation. A population-based study over three decades." *N Engl J Med* 317(11): 669-674.
84. Krützfeldt, J., N. Rajewsky, R. Braich, K. G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan and M. Stoffel (2005). "Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'." *Nature* 438(7068): 685-689.
85. Kuehbacher, A., C. Urbich, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2007). "Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis." *Circ Res* 101(1): 59-68.
86. Kumarswamy, R., I. Volkmann and T. Thum (2011). "Regulation and function of miRNA-21 in health and disease." *RNA Biol* 8(5).
87. Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, A. Yalcin, J. Meyer, W. Lendeckel and T. Tuschl (2002). "Identification of tissue-specific microRNAs from mouse." *Curr Biol* 12(9): 735-739.
88. Landthaler, M., A. Yalcin and T. Tuschl (2004). "The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis." *Curr Biol* 14(23): 2162-2167.
89. Latronico, M. V., D. Catalucci and G. Condorelli (2007). "Emerging role of microRNAs in cardiovascular biology." *Circ Res* 101(12): 1225-1236.
90. Laufs, U. and O. Adam (2012). "Acute effects of statins." *J Am Coll Cardiol* 59(1): 71-73.
91. Laufs, U., H. Kilter, C. Konkol, S. Wassmann, M. Böhm and G. Nickenig (2002). "Impact of HMG CoA reductase inhibition on small GTPases in the heart." *Cardiovasc.Res.* 53(4): 911-920.
92. Laufs, U. and J. K. Liao (2000). "Targeting Rho in cardiovascular disease." *Circ Res* 87(7): 526-528.

93. Le Heuzey, J. Y., O. Piziaud, O. Piot, M. A. Said, X. Copie, T. Lavergne and L. Guize (2004). "Cost of care distribution in atrial fibrillation patients: the COCAF study." *Am Heart J* 147(1): 121-126.
94. Lee, A. A., W. H. Dillmann, A. D. McCulloch and F. J. Villarreal (1995). "Angiotensin II stimulates the autocrine production of transforming growth factor-beta 1 in adult rat cardiac fibroblasts." *J Mol Cell Cardiol* 27(10): 2347-2357.
95. Lee, R. C., R. L. Feinbaum and V. Ambros (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." *Cell* 75(5): 843-854.
96. Lee, Y., C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim and V. N. Kim (2003). "The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing." *Nature* 425(6956): 415-419.
97. Lee, Y., M. Kim, J. Han, K. H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek and V. N. Kim (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." *EMBO J* 23(20): 4051-4060.
98. Li, D., S. Fareh, T. K. Leung and S. Nattel (1999). "Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort 1." *Circulation* 100(1): 87-95.
99. Li, D., K. Shinagawa, L. Pang, T. K. Leung, S. Cardin, Z. Wang and S. Nattel (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(21): 2608-2614.
100. Li, W., K. Nellaippan, T. Strassmaier, L. Graham, K. M. Thomas and H. M. Kagan (1997). "Localization and activity of lysyl oxidase within nuclei of fibrogenic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(24): 12817-12822.
101. Liao, J. K. and U. Laufs (2005). "Pleiotropic Effects of Statins." *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 45: 89-118.
102. Lin, C. S., L. P. Lai, J. L. Lin, Y. L. Sun, C. W. Hsu, C. L. Chen, S. J. Mao and S. K. Huang (2007). "Increased expression of extracellular matrix proteins in rapid atrial pacing-induced atrial fibrillation." *Heart Rhythm* 4(7): 938-949.
103. Lloyd-Jones, D. M., T. J. Wang, E. P. Leip, M. G. Larson, D. Levy, R. S. Vasan, R. B. D'Agostino, J. M. Massaro, A. Beiser, P. A. Wolf and E. J. Benjamin (2004). "Lifetime risk for development of atrial fibrillation: the Framingham Heart Study." *Circulation* 110(9): 1042-1046.

104. Lopez, B., A. Gonzalez, N. Hermida, F. Valencia, E. de Teresa and J. Diez (2010). "Role of lysyl oxidase in myocardial fibrosis. From basic science to clinical aspects." *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.
105. Lopez, B., A. Gonzalez, N. Hermida, F. Valencia, E. de Teresa and J. Diez (2010). "Role of lysyl oxidase in myocardial fibrosis: from basic science to clinical aspects." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299(1): H1-9.
106. Lopez, B., R. Querejeta, A. Gonzalez, J. Beaumont, M. Larman and J. Diez (2009). "Impact of treatment on myocardial lysyl oxidase expression and collagen cross-linking in patients with heart failure." *Hypertension* 53(2): 236-242.
107. Lu, J. and J. L. Mehta (2011). "LOX-1: a critical player in the genesis and progression of myocardial ischemia." *Cardiovasc Drugs Ther* 25(5): 431-440.
108. Lu, Y., Y. Zhang, N. Wang, Z. Pan, X. Gao, F. Zhang, H. Shan, X. Luo, Y. Bai, L. Sun, W. Song, C. Xu, Z. Wang and B. Yang (2010). "MicroRNA-328 contributes to adverse electrical remodeling in atrial fibrillation." *Circulation* 122(23): 2378-2387.
109. Lund, E., S. Guttinger, A. Calado, J. E. Dahlberg and U. Kutay (2004). "Nuclear export of microRNA precursors." *Science* 303(5654): 95-98.
110. Maack, C., T. Kartes, H. Kilter, H. J. Schafers, G. Nickenig, M. Bohm and U. Laufs (2003). "Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of rac1-GTPase and represents a target for statin treatment." *Circulation* 108(13): 1567-1574.
111. Magnani, J. W., M. Rienstra, H. Lin, M. F. Sinner, S. A. Lubitz, D. D. McManus, J. Dupuis, P. T. Ellinor and E. J. Benjamin (2011). "Atrial fibrillation: current knowledge and future directions in epidemiology and genomics." *Circulation* 124(18): 1982-1993.
112. Maki, J. M., J. Rasanen, H. Tikkanen, R. Sormunen, K. Makikallio, K. I. Kivirikko and R. Soininen (2002). "Inactivation of the lysyl oxidase gene *Lox* leads to aortic aneurysms, cardiovascular dysfunction, and perinatal death in mice." *Circulation* 106(19): 2503-2509.
113. Matsui, Y. and J. Sadoshima (2004). "Rapid upregulation of CTGF in cardiac myocytes by hypertrophic stimuli: implication for cardiac fibrosis and hypertrophy." *J Mol Cell Cardiol* 37(2): 477-481.
114. Mattick, J. S. and I. V. Makunin (2005). "Small regulatory RNAs in mammals." *Hum Mol Genet* 14 Spec No 1: R121-132.

115. Miyasaka, Y., M. E. Barnes, B. J. Gersh, S. S. Cha, K. R. Bailey, W. P. Abhayaratna, J. B. Seward and T. S. Tsang (2006). "Secular trends in incidence of atrial fibrillation in Olmsted County, Minnesota, 1980 to 2000, and implications on the projections for future prevalence." *Circulation* 114(2): 119-125.
116. Molnar, J., K. S. Fong, Q. P. He, K. Hayashi, Y. Kim, S. F. Fong, B. Fogelgren, K. M. Szauter, M. Mink and K. Csiszar (2003). "Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins." *Biochim Biophys Acta* 1647(1-2): 220-224.
117. Nag, A. C. (1980). "Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution." *Cytobios* 28(109): 41-61.
118. Nattel, S. (2002). "New ideas about atrial fibrillation 50 years on." *Nature* 415(6868): 219-226.
119. Nattel, S., B. Burstein and D. Dobrev (2008). "Atrial remodeling and atrial fibrillation: mechanisms and implications." *Circ Arrhythm Electrophysiol* 1(1): 62-73.
120. Nattel, S. and L. H. Opie (2006). "Controversies in atrial fibrillation." *Lancet* 367(9506): 262-272.
121. Pages, G., P. Lenormand, G. L'Allemain, J. C. Chambard, S. Meloche and J. Pouyssegur (1993). "Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(18): 8319-8323.
122. Patrick, D. M., R. L. Montgomery, X. Qi, S. Obad, S. Kauppinen, J. A. Hill, E. van Rooij and E. N. Olson (2010). "Stress-dependent cardiac remodeling occurs in the absence of microRNA-21 in mice." *J Clin Invest* 120(11): 3912-3916.
123. Pedersen, O. D., H. Bagger, L. Kober and C. Torp-Pedersen (1999). "Trandolapril reduces the incidence of atrial fibrillation after acute myocardial infarction in patients with left ventricular dysfunction." *Circulation* 100(4): 376-380.
124. Peek, A. S. and M. A. Behlke (2007). "Design of active small interfering RNAs." *Curr Opin Mol Ther* 9(2): 110-118.
125. Phanish, M. K., S. K. Winn and M. E. Dockrell (2010). "Connective tissue growth factor (CTGF, CCN2)--a marker, mediator and therapeutic target for renal fibrosis." *Nephron Exp Nephrol* 114(3): e83-92.
126. Pietsch, J. B., J. A. Whitlock, C. Ford and M. C. Kinney (1999). "Management of pleural effusions in children with malignant lymphoma." *J Pediatr Surg* 34(4): 635-638.

127. Powell, D. W. (2000). "Myofibroblasts: paracrine cells important in health and disease." *Trans Am Clin Climatol Assoc* 111: 271-292; discussion 292-273.
128. Poy, M. N., L. Eliasson, J. Krutzfeldt, S. Kuwajima, X. Ma, P. E. Macdonald, S. Pfeffer, T. Tuschl, N. Rajewsky, P. Rorsman and M. Stoffel (2004). "A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion." *Nature* 432(7014): 226-230.
129. Reil, J. C., M. Hohl, M. Oberhofer, A. Kazakov, L. Kaestner, P. Mueller, O. Adam, C. Maack, P. Lipp, C. Mewis, M. Allessie, U. Laufs, M. Böhm and H. R. Neuberger (2010). "Cardiac Rac1 overexpression in mice creates a substrate for atrial arrhythmias characterized by structural remodelling." *Cardiovasc Res* 87(3): 485-493.
130. Rodriguez, A., S. Griffiths-Jones, J. L. Ashurst and A. Bradley (2004). "Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units." *Genome Res* 14(10A): 1902-1910.
131. Rosie, Y., G. Richard and L. Arthur (2007). *Basic Principles of the Pharmacokinetics of Antisense Oligonucleotide Drugs*. Antisense Drug Technology, CRC Press: 183-215.
132. Ruperez, M., O. Lorenzo, L. M. Blanco-Colio, V. Esteban, J. Egido and M. Ruiz-Ortega (2003). "Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis." *Circulation* 108(12): 1499-1505.
133. Saad, F. A., M. Torres, H. Wang and L. Graham (2010). "Intracellular lysyl oxidase: effect of a specific inhibitor on nuclear mass in proliferating cells." *Biochem Biophys Res Commun* 396(4): 944-949.
134. Sanfilippo, A., V. Abascal, M. Sheehan, L. Oertel, P. Harrigan, R. Hughes and A. Weyman (1990). "Atrial enlargement as a consequence of atrial fibrillation. A prospective echocardiographic study." *Circulation* 82(3): 792-797.
135. Sanoski, C. A. (2009). "Clinical, economic, and quality of life impact of atrial fibrillation." *J Manag Care Pharm* 15(6 Suppl B): S4-9.
136. Sayed, D., S. Rane, J. Lypowy, M. He, I. Y. Chen, H. Vashistha, L. Yan, A. Malhotra, D. Vatner and M. Abdellatif (2008). "MicroRNA-21 targets Sprouty2 and promotes cellular outgrowths." *Mol Biol Cell* 19(8): 3272-3282.
137. Schmidt, C., J. Kisselbach, P. A. Schweizer, H. A. Katus and D. Thomas (2011). "The pathology and treatment of cardiac arrhythmias: focus on atrial fibrillation." *Vasc Health Risk Manag* 7: 193-202.
138. Schwartz, M. A. and S. J. Shattil (2000). "Signaling networks linking integrins and rho family GTPases." *Trends Biochem Sci* 25(8): 388-391.

139. Shantikumar, S., A. Caporali and C. Emanuelli (2011). "Role of microRNAs in diabetes and its cardiovascular complications." *Cardiovasc Res*.
140. Sivakumar, P., S. Gupta, S. Sarkar and S. Sen (2008). "Upregulation of lysyl oxidase and MMPs during cardiac remodeling in human dilated cardiomyopathy." *Mol Cell Biochem* 307(1-2): 159-167.
141. Smith-Mungo, L. I. and H. M. Kagan (1998). "Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology." *Matrix Biol* 16(7): 387-398.
142. Souders, C. A., S. L. Bowers and T. A. Baudino (2009). "Cardiac fibroblast: the renaissance cell." *Circ Res* 105(12): 1164-1176.
143. Soutschek, J., A. Akinc, B. Bramlage, K. Charisse, R. Constien, M. Donoghue, S. Elbashir, A. Geick, P. Hadwiger, J. Harborth, M. John, V. Kesavan, G. Lavine, R. K. Pandey, T. Racie, K. G. Rajeev, I. Rohl, I. Toudjarska, G. Wang, S. Wuschko, D. Bumcrot, V. Koteliansky, S. Limmer, M. Manoharan and H. P. Vornlocher (2004). "Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs." *Nature* 432(7014): 173-178.
144. Spurney, C. F., S. Knoblach, E. E. Pistilli, K. Nagaraju, G. R. Martin and E. P. Hoffman (2008). "Dystrophin-deficient cardiomyopathy in mouse: expression of Nox4 and Lox are associated with fibrosis and altered functional parameters in the heart." *Neuromuscul Disord* 18(5): 371-381.
145. Stanczyk, J., C. Ospelt, E. Karouzakis, A. Filer, K. Raza, C. Kolling, R. Gay, C. D. Buckley, P. P. Tak, S. Gay and D. Kyburz (2011). "Altered expression of microRNA-203 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and its role in fibroblast activation." *Arthritis Rheum* 63(2): 373-381.
146. Takemoto, M., K. Node, H. Nakagami, Y. Liao, M. Grimm, Y. Takemoto, M. Kitakaze and J. K. Liao (2001). "Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy." *J.Clin.Invest* 108(10) 1429-1437.
147. Tan, Z., G. Randall, J. Fan, B. Camoretti-Mercado, R. Brockman-Schneider, L. Pan, J. Solway, J. E. Gern, R. F. Lemanske, D. Nicolae and C. Ober (2007). "Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma." *Am J Hum Genet* 81(4): 829-834.
148. Thum, T., D. Catalucci and J. Bauersachs (2008). "MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease." *Cardiovasc Res* 79(4): 562-570.



149. Thum, T., N. Chau, B. Bhat, S. K. Gupta, P. S. Linsley, J. Bauersachs and S. Engelhardt (2011). "Comparison of different miR-21 inhibitor chemistries in a cardiac disease model." *The Journal of Clinical Investigation* 121(2): 461-462.
150. Thum, T., C. Gross, J. Fiedler, T. Fischer, S. Kissler, M. Bussen, P. Galuppo, S. Just, W. Rottbauer, S. Frantz, M. Castoldi, J. Soutschek, V. Koteliansky, A. Rosenwald, M. A. Basson, J. D. Licht, J. T. Pena, S. H. Rouhanifard, M. U. Muckenthaler, T. Tuschl, G. R. Martin, J. Bauersachs and S. Engelhardt (2008). "MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts." *Nature* 456(7224): 980-984.
151. Turner, R. W. (1962). "Clinical electrocardiography in general practice. IV.-Disorders of the heart beat. I." *Practitioner* 188: 553-560.
152. Unverferth, D. V., R. H. Fertel, B. J. Unverferth and C. V. Leier (1984). "Atrial fibrillation in mitral stenosis: histologic, hemodynamic and metabolic factors." *Int J Cardiol* 5(2): 143-154.
153. van Rooij, E., W. S. Marshall and E. N. Olson (2008). "Toward microRNA-based therapeutics for heart disease: the sense in antisense." *Circ Res* 103(9): 919-928.
154. van Rooij, E., L. B. Sutherland, N. Liu, A. H. Williams, J. McAnally, R. D. Gerard, J. A. Richardson and E. N. Olson (2006). "A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(48): 18255-18260.
155. van Rooij, E., L. B. Sutherland, J. E. Thatcher, J. M. DiMaio, R. H. Naseem, W. S. Marshall, J. A. Hill and E. N. Olson (2008). "Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(35): 13027-13032.
156. Voloshenyuk, T. G., E. S. Landesman, E. Khoutorova, A. D. Hart and J. D. Gardner (2011). "Induction of cardiac fibroblast lysyl oxidase by TGF-beta1 requires PI3K/Akt, Smad3, and MAPK signaling." *Cytokine* 55(1): 90-97.
157. Wang, H. W., C. Noland, B. Siridechadilok, D. W. Taylor, E. Ma, K. Felderer, J. A. Doudna and E. Nogales (2009). "Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex." *Nat Struct Mol Biol* 16(11): 1148-1153.
158. Wang, T. J., M. G. Larson, D. Levy, R. S. Vasan, E. P. Leip, P. A. Wolf, R. B. D'Agostino, J. M. Murabito, W. B. Kannel and E. J. Benjamin (2003). "Temporal relations of atrial fibrillation and congestive heart failure and their joint influence on mortality: the Framingham Heart Study." *Circulation* 107(23): 2920-2925.

159. Wang, Y., R. Medvid, C. Melton, R. Jaenisch and R. Blelloch (2007). "DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal." *Nat Genet* 39(3): 380-385.
160. Wang, Z., Y. Lu and B. Yang (2011). "MicroRNAs and atrial fibrillation: new fundamentals." *Cardiovasc Res* 89(4): 710-721.
161. Way, K. J., K. Isshiki, K. Suzuma, T. Yokota, D. Zvagelsky, F. J. Schoen, G. E. Sandusky, P. A. Pechous, C. J. Vlahos, H. Wakasaki and G. L. King (2002). "Expression of connective tissue growth factor is increased in injured myocardium associated with protein kinase C beta2 activation and diabetes." *Diabetes* 51(9): 2709-2718.
162. Weber, K. T., C. G. Brilla, S. E. Campbell, E. Guarda, G. Zhou and K. Sriram (1993). "Myocardial fibrosis: role of angiotensin II and aldosterone." *Basic Res Cardiol* 88 Suppl 1: 107-124.
163. Weiler, J., J. Hunziker and J. Hall (2006). "Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease?" *Gene Ther* 13(6): 496-502.
164. Wienholds, E., M. J. Koudijs, F. J. van Eeden, E. Cuppen and R. H. Plasterk (2003). "The microRNA-producing enzyme Dicer1 is essential for zebrafish development." *Nat Genet* 35(3): 217-218.
165. Wijffels, M. C., C. J. Kirchhof, R. Dorland and M. A. Allessie (1995). "Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats." *Circulation* 92(7): 1954-1968.
166. Wilgus, M. L., A. C. Borczuk, M. Stoopler, M. Ginsburg, L. Gorenstein, J. R. Sonett and C. A. Powell (2011). "Lysyl oxidase: a lung adenocarcinoma biomarker of invasion and survival." *Cancer* 117(10): 2186-2191.
167. Wolf, P. A., T. R. Dawber, H. E. Thomas, Jr. and W. B. Kannel (1978). "Epidemiologic assessment of chronic atrial fibrillation and risk of stroke: the Framingham study." *Neurology* 28(10): 973-977.
168. Xiao, H. D., S. Fuchs, D. J. Campbell, W. Lewis, S. C. Dudley, Jr., V. S. Kasi, B. D. Hoit, G. Keshelava, H. Zhao, M. R. Capecchi and K. E. Bernstein (2004). "Mice with cardiac-restricted angiotensin-converting enzyme (ACE) have atrial enlargement, cardiac arrhythmia, and sudden death." *Am J Pathol* 165(3): 1019-1032.
169. Xiao, Q. and G. Ge (2012). "Lysyl Oxidase, Extracellular Matrix Remodeling and Cancer Metastasis." *Cancer Microenviron.*

170. Xiao, W., Y. Wang, E. Y. Lau, J. Luo, N. Yao, C. Shi, L. Meza, H. Tseng, Y. Maeda, P. Kumaresan, R. Liu, F. C. Lightstone, Y. Takada and K. S. Lam (2010). "The use of one-bead one-compound combinatorial library technology to discover high-affinity alphavbeta3 integrin and cancer targeting arginine-glycine-aspartic acid ligands with a built-in handle." *Mol Cancer Ther* 9(10): 2714-2723.
171. Xu, J., G. Cui, F. Esmailian, M. Plunkett, D. Marelli, A. Ardehali, J. Odum, H. Laks and L. Sen (2004). "Atrial extracellular matrix remodeling and the maintenance of atrial fibrillation." *Circulation* 109(3): 363-368.
172. Yu, S., Z. Lu, C. Liu, Y. Meng, Y. Ma, W. Zhao, J. Liu, J. Yu and J. Chen (2010). "miRNA-96 suppresses KRAS and functions as a tumor suppressor gene in pancreatic cancer." *Cancer Res* 70(14): 6015-6025.
173. Yue, J. (2011). "miRNA and vascular cell movement." *Adv Drug Deliv Rev* 63(8): 616-622.
174. Zaman, A. G., M. T. Kearney, C. Schechter, S. G. Worthley and J. Nolan (2004). "Angiotensin-converting enzyme inhibitors as adjunctive therapy in patients with persistent atrial fibrillation." *Am Heart J* 147(5): 823-827.
175. Zhang, B., Q. Wang and X. Pan (2007). "MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants." *J Cell Physiol* 210(2): 279-289.
176. Zhang, S., C. Shan, G. Kong, Y. Du, L. Ye and X. Zhang (2011). "MicroRNA-520e suppresses growth of hepatoma cells by targeting the NF-kappaB-inducing kinase (NIK)." *Oncogene*.

## **7. Publikationen/Dank**

### **7.1 Publikationen**

#### 7.1.1 Kongressbeiträge

Adam, O., B. Löhfelm, T. Thum, S. Puhl, M. Böhm, U. Laufs (2011). “Bedeutung der microRNA-21 bei atrialer Fibrose und Vorhofflimmern.“ Clin Res Cardiol 100, Suppl 1:V152

Adam, O., B. Löhfelm, T. Thum, S. Puhl, M. Böhm, U. Laufs (2011). “Role of microRNA-21 for atrial fibrosis and atrial fibrillation.” Europ Heart J 2011;32 Abstract Suppl. 475

Adam, O., B. Löhfelm, T. Thum, S. Puhl, M. Böhm, U. Laufs (2011). “Lysyl-Oxidase Mediated Regulation of Mir-21 and Spry1 Contributes to Structural Remodeling During Atrial Fibrillation.” Circulation 201;124:A11898

Adam, O., B. Löhfelm, D. Lavall, T. Thum, M. Böhm, U. Laufs (2012). “Aktivierung der microRNA-21 bei atrialer Fibrose und Vorhofflimmern durch die intrazelluläre Lysyl-Oxidase.“ Clin Res Cardiol 101, Suppl 1:V885

#### 7.1.2 Publikation

Adam, O., B. Löhfelm, T. Thum, S. K. Gupta, S. Puhl, H. J. Schäfers, M. Böhm, U. Laufs (2012). “Role of miR-21 in the pathogenesis of atrial fibrosis.” Basic Res Cardiol, Sep 2012;107(5):278. Epub 2012 Jul 4

### **7.2 Dank**

Mein ganz besonderer Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Ulrich Laufs, zum einen natürlich für die freundliche Überlassung des Themas der Arbeit, aber viel mehr auch für die stetige Unterstützung und Beratung, der ich mir während meiner Arbeit zu jeder Zeit immer gewiss sein konnte. Seiner Rolle als Doktorvater, die er sowohl fachlich, beruflich als auch menschlich in wunderbarer Weise ausgefüllt hat, ist es zu verdanken, dass allen

Ermüdungsphasen zu Trotz diese Arbeit verwirklicht werden konnte. Einen besseren Teamleiter wird man in der Welt der Forschung wohl lange suchen müssen und in dieser Form wahrscheinlich nicht noch einmal finden können.

Bei Herrn Prof. Dr. Michael Böhm möchte ich mich bedanken für die Möglichkeit, die für diese Arbeit notwendigen Experimente im kardiologischen Forschungslabor der Medizinischen Klinik in Homburg auch als Neuling in der kardiovaskulären Forschung durchführen zu können. Mein Dank gilt ebenso Herrn Prof. Dr. H.-J. Schäfers für die freundliche Überlassung der humanen linksatrialen Gewebeproben, deren Auswertung diese Arbeit sehr bereichert hat.

Ganz besonders und herzlich möchte ich meinem Betreuer und Gestalter der Arbeit Herrn Dr. Oliver Adam danken. Er stand mir zu jeder Zeit mit bestem wissenschaftlichem Rat und Tat zur Seite und hat mich in allen Abschnitten der Arbeit hervorragend betreut. Immer konnte ich mich auf seinen Master-Plan und seine Ideen verlassen, was mir Sicherheit und Zuversicht in der oft doch schwer durchschaubaren Welt der Forschung gab. Ohne seine Motivation und Unterstützung würde diese Arbeit so mit Sicherheit nicht existieren. Und auch aus menschlicher Sicht kann ich mir beim besten Willen keinen besseren „Boss“ und Betreuer vorstellen. Meinen herzlichsten Dank für die hervorragende Zusammenarbeit und hoffentlich andauernde Freundschaft Oliver!

Ebenso herzlich bedanken möchte ich mich bei den beiden medizinisch-technischen Assistentinnen Simone Jäger und Ellen Becker. Ihrer Hilfsbereitschaft habe ich es zu verdanken, dass ich es als Forschungs-Neuling überhaupt erst erlernen durfte, wie man sich halbwegs selbstständig in einem Labor zu bewegen hat und Versuche überhaupt durchführen kann. Ohne eure Unterstützung, Motivation und letztendlich auch Geduld mit mir würde es diese Arbeit in dieser Form nicht geben. Ich danke euch für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und die ständige Bereitschaft, mir mit Rat und Tat bei der Durchführung der Experimente zur Seite zu stehen.

Weiterhin danke ich natürlich allen Ärzten, Biologen, Doktoranden, medizinisch-technischen Assistentinnen und wissenschaftlichen Mitarbeitern des kardiologischen Forschungslabors in Homburg, die mir zu jeder Zeit mit offenem Ohr und helfender Hand zur Seite gestanden haben. Das Arbeitsklima im Labor war dabei immer hervorragend; war ein Versuch auch noch so frustrierend, bin ich am Ende doch immer mit einem Lächeln aus dem Labor gekommen. Bleibt als Team bitte so wie ihr seid, denn ihr seid (nicht nur wissenschaftlich)

absolute Spitze! Herzlichsten Dank für eure Hilfe und Freundschaft in allen Lagen des Laborlebens, ich werde die Zeit bei euch sicherlich niemals vergessen!

In diesem Sinne möchte ich mich auch bei allen weiteren Menschen bedanken, die in irgendeiner Form dabei mitgewirkt haben diese Arbeit entstehen zu lassen. Hierzu zählen in besonderer Weise auch meine Freunde, Kollegen, Sportkameraden und Studienkommilitonen, deren Hilfe und Rückendeckung ich mir zu jeder Zeit immer bewusst sein konnte. Herzlichen Dank an euch alle!

Zuletzt gilt mein unendlicher und kaum in Worte zu fassender Dank meiner gesamten Familie. Ohne eure immerwährende Liebe, Unterstützung und Motivation hätte ich wohl so einige Male das Ziel des Studiums aus den Augen verloren. Euer Verständnis und Beistand in allen auch noch so schwierigen Lebenslagen haben mich inspiriert und mir immer wieder Flügel verliehen, wenn ich sie am dringendsten brauchen konnte. Was auch immer im Leben passieren mag, ihr werdet für immer in meinem Herzen bleiben! Meinen Eltern Armin und Andrea, meiner Schwester Aline und meinen Großeltern Lydia, Ilka und Siegbert das größte nur erdenkliche Dankeschön!

## 8. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Björn Manfred Löhfeld
Anschrift	Primsweilerstraße 12 66839 Schmelz Tel.: 06887 6701
geboren am	08.07.1986 in Wadern
Eltern	Vater Armin - Polizeibeamter Mutter Andrea - Hausfrau
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	römisch-katholisch

### Schulbildung

1993-1996	Grundschule Hüttersdorf
1996-2006	Johannes-Kepler-Gymnasium Lebach
Schulabschluss	Abitur, Allgemeine Hochschulreife

### Hochschule

09/2006	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes Homburg
08/2008	Abschluss des Physikums (1. Staatsexamen)
09/2008 - 02/2012	Klinischer Abschnitt des Medizinstudiums
02/2012	Beginn des Praktischen Jahres im Caritas-Klinikum St. Theresia in Saarbrücken
08/2010 - 02/2012	Experimentelle Doktorarbeit in der Medizinischen Klinik III - Kardiologie unter Professor Dr. Ulrich Laufs und Professor Dr. Michael Böhm zum Thema „Bedeutung der miRNA-21 für die Pathogenese der atrialen Fibrose und Vorhofflimmern“



- 03/2009 - heute Arbeit als studentischer Tutor im Institut für Mikrobiologie an der Universitätsklinik des Saarlandes in Homburg
- 10/2009 - heute Arbeit am e-Learning-Projekt der Homburger Universitätsklinik: „Campus - Der virtuelle Patient“
- 01/2011 – heute Stipendium der „Studienstiftung Saar“
- 08/2011 Teilnahme am „ESC-Kongress 2011“ in Paris als Stipendiant der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie

### **Famulaturen**

- 2009 Kardiologie im Elisabeth-Krankenhaus Saarlouis bei Chefarzt Dr. Walter Blank
- 2010 und 2011 Allgemeinmedizin und Innere Medizin in der allgemeinmedizinischen und internistischen Praxis von Dr. Bruno Selzer und Josef Schmitt in Honzrath
- 2011 Gynäkologie im DRK-Krankenhaus Saarlouis bei Chefarzt Dr. Johannes Bettscheider