

UNIVERSITÄTSKLINIKUM DES SAARLANDES  
INNERE MEDIZIN III KARDIOLOGIE, ANGIOLOGIE UND INTERNISTISCHE INTENSIVMEDIZIN  
KLINISCHE UND EXPERIMENTELLE MEDIZIN HOMBURG/SAAR  
PROF. DR. ULRICH LAUFS

# **Steigerung profibrotischer Signaltransduktion unter arrhythmischer Stimulation in Kardiomyozyten**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**

**der medizinischen Fakultät**

**der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

**2017**

**Jonathan Willi Slawik**  
geboren am 26.09.1992 in Recklinghausen

Tag der Promotion:  
Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1 Zusammenfassung	9
1.1 Deutschsprachige Zusammenfassung	9
1.2 Abstract	10
2 Einleitung	13
2.1 Grundlagen von Vorhofflimmern und Arrhythmie	13
2.1.1 Definition von Vorhofflimmern	13
2.1.2 Inzidenz, Prävalenz, Morbidität und Mortalität von Vorhofflimmern	13
2.1.3 Einfluss auf die Lebensqualität	14
2.2 Pathogenese des Vorhofflimmerns	14
2.2.1 Veränderungen am Vorhof – strukturelles und elektrisches Remodelling	15
2.3 Bedeutung und Mechanismen myokardialer Fibrose	16
2.3.1 Aufbau und Bestandteile der Extrazellulären Matrix	16
2.3.2 CTGF als zentraler Vermittler der Fibrose	17
2.3.1.2 Die 5'-AMP-aktivierte Kinase	18
2.3.3 Das System des oxidativen Stresses in Bezug auf Fibrose	20
2.3.3.1 Das antioxidative System der myokardialen Zelle	21
2.3.3.2 Die Bedeutung des Systems von IL33 und ST2 für die Fibrogenese	22
2.4 Fragestellung der Arbeit	23
3 Material	24
3.1 Antikörper	24
3.1.1 Primärantikörper	24
3.1.2 Sekundärantikörper	24
3.2 Enzyme, Kits, Sonden, Primer	24
3.3 Lösungen, Medien, Puffer	25

3.4 Sonstige Substanzen	27
3.5 Verbrauchsmaterialien	29
3.6 Geräte	29
3.7 Auswertprogramme	31
4 Methoden	32
4.1 Isolation neonataler Rattenkardiomyozyten	32
4.2 Behandlung der Zellen bis zur Stimulation	33
4.3 Stimulation der neonatalen ventrikulären Kardiomyozyten	33
4.4 Co-Kultur Modell	33
4.5 Zellen ernten für Western Blot	34
4.6 Quantitative Proteinbestimmung nach Lowry	34
4.7 Western Blot Verfahren	35
4.7.1 Gelelektrophorese	35
4.7.2 Proteintransfer	36
4.7.3 Proteindetektion	36
4.8 Polymerase-Ketten-Reaktion Verfahren	37
4.8.1 Zellen ernten nach Stimulation	37
4.8.2 RNA Isolation	37
4.8.3 Reverse Transkription	37
4.8.4 Quantitative Realtime-Polymerase-Kettenreaktion	38
4.9 8-oH Desoxyguanosin Färbung	39
4.9.1 Protokoll der Färbung	39
4.9.2 Detektion von Desoxyguanosin	40
4.10 Messung von ROS mittels ESR-Spektroskopie	40
4.11 Hydroxyprolin-Assay	41
4.12 Hylaluronsäure-Assay	42
5 Ergebnisse	43

5.1 Regulierung von CTGF unter Arrhythmie	43
5.1.1 Arrhythmie steigert die Expression von CTGF nach 24 Stunden und 48 Stunden Stimulierung	43
5.1.2 Arrhythmische Stimulierung führt zu einer stärkeren Expression von pAMPK nach 24 und 48 Stunden	44
5.1.3 Unter Behandlung mit Compound C kommt es zu einer verminderten pAMPK Expression	46
5.1.4 Unter Arrhythmie und Behandlung mit AIP oder CC kommt es zu einer Suppression der CTGF Expression	47
5.2 Oxidativer Stress unter Arrhythmie	48
5.2.1 Arrhythmie führt zur verstärkten Entstehung von reaktiven Oxygenspezies	48
5.2.2 Arrhythmische Stimulierung führt zu verstärkter Konzentration von Desoxyguanosin	48
5.3 Die antioxidativen Systeme der Zelle unter Arrhythmie	51
5.3.1 Arrhythmische Stimulierung hat keinen Einfluss auf die Expression von Nrf2	51
5.3.2 Arrhythmie führt zu einer erhöhten mRNA-Expression der Katalase	52
5.3.3 Die arrhythmische Stimulierung beeinflusst die mRNA Konzentration der Superoxiddismutase	53
5.4 Einfluss von ST2/IL-33 auf die Fibrogenese	54
5.4.1 Arrhythmische Stimulierung führt zu einer Konzentrationserhöhung der mRNA von sST2 und IL-33	54
5.4.2 Arrhythmische Stimulierung führt zu einer Erhöhung der Proteinexpression von ST2 aber nicht von IL-33	55
5.5 Einfluss der Arrhythmie auf direkte Fibroseparameter	56
5.5.1 Arrhythmie führt nicht zu einer Erhöhung der Hydroxyprolin-	56
5.5.2 Arrhythmie beeinflusst nicht die Konzentration von Hyaluronsäure	57
5.5.3 Unter arrhythmischer Stimulierung kommt es zu einer Steigerung der Kollagen I Expression	58

5.4.4 Arrhythmie führt zu einer Steigerung der Kollagen III Expression	59
6 Diskussion	60
6.1 CTGF Regulierung unter Arrhythmie	60
6.1.2 pAMPK als Indikator des myokardialen Stoffwechsels und Regulator von CTGF	62
6.2 Oxidativer Stress unter Arrhythmie	63
6.2.1 Das antioxidative System der Kardiomyozyten	64
6.3 Der Einfluss der Arrhythmie auf die Vermehrung der Extrazellulärmatrix	65
6.4 Limitationen dieser Forschungsergebnisse	66
6.5 Zusammenfassung der Studienergebnisse	66
7 Literaturverzeichnis	68
8 Dank	75
9	Lebenslauf
	<b>Fe</b>

**hier! Textmarke nicht definiert.**

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg, µl, mg, g	Mikrogramm, Mikroliter, Mikrogramm, Gramm
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	5'-AMP-aktivierte Kinase
ATP	Adenosintriphosphat
CC	Compound C
CCN-Protein	Cysteine-rich Angiogenic Protein
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ECM	Extrazellulärmatrix
EKG	Elektrokardiogramm
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAG	Glycosaminoglykane
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HA	Hyaluronsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hz	Herz
kDa	Kilodalton
KEAP-1	Kelch-like ECH-associated protein 1
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NCS	Newborn Calf Serum
Nrf2	nuclear factor-erythroid-2-related factor 2
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered Saline
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ROS	Reaktive Sauerstoffpezies
RT-PCR	Realtime-Polymerasekettenreaktion
rpm	Rounds per Minutes
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TEMED	Tetramethylethylenediamine

TGF- $\beta$

TRITC

VEGF

Transforming Growth Factor  $\beta$

Tetramethyl Rhodamin Isothiocyanat

Vascular Endothelial Growth Factor

# **1 Zusammenfassung**

## **1.1 Deutschsprachige Zusammenfassung**

### **Steigerung profibrotischer Signaltransduktion unter arrhythmischer Stimulierung**

Vorhofflimmern ist die häufigste Herzrhythmusstörung <sup>1</sup>. Durch das Vorhofflimmern kommt es zu elektrischem und strukturellem Remodelling des Vorhofes. Das wichtigste Kennzeichen dieses strukturellen Remodellings ist die Fibrose. Die genaue Pathogenese der profibrotischen Signaltransduktion ist nicht vollständig bekannt. Viele Arbeiten konnten bereits zeigen, dass es durch Vorhofflimmern zu einer Verstärkung der profibrotischen Signaltransduktion kommt. Die besondere Bedeutung der Arrhythmie für diese Prozesse ist hingegen bisher nur teilweise erforscht.

Daher entwickelten wir ein Zellkulturmodell mit neonatalen Rattenkardiomyozyten, um den singulären Einfluss der Arrhythmie auf die profibrotische Signaltransduktion weiter zu charakterisieren. Wir isolierten neonatale Kardiomyozyten aus Rattenherzen und stimulierten diese für 24 bzw. 48 Stunden in den Vergleichsgruppen rhythmisch und arrhythmisch, wobei beide Gruppen mit der gleichen Frequenz von 3Hz stimuliert wurden.

Zunächst untersuchten wir den Connective Tissue Growth Factor (CTGF) als zentralen Mediator der Fibrose. Dabei zeigte sich bereits nach 24 Stunden unter arrhythmischer Stimulierung eine gesteigerte Proteinexpression auf  $182\pm 16\%$ . Nach 48 Stunden Stimulation stieg diese Expression weiter auf  $223\pm 32\%$ . In beiden Gruppen konnten wir keine Steigerung der CTGF Expression unter rhythmischer Stimulierung feststellen. Die 5'-AMP-aktivierte Kinase (AMPK), als Indikator für erhöhte energieverbrauchende Stoffwechselprozesse, war ebenfalls nach 24 und 48 Stunden arrhythmischer Stimulation auf  $205\pm 16\%$  bzw.  $192\pm 21\%$  erhöht. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass es unter Arrhythmie und selektiver Ausschaltung der AMPK mit Compound C zu einer signifikanten Erniedrigung der CTGF Expression auf  $83\pm 10\%$  kommt.

Außerdem konnten wir zeigen, dass Arrhythmie zu einer signifikanten Steigerung der Expression von oxidativem Stress führt. Es zeigte sich eine Steigerung der Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) auf  $131\pm 18\%$ . Diese Erkenntnisse konnten wir durch eine

Anfärbung des 8-oH-Desoxyguanosin untermauern. In dieser Färbung zeigte sich unter Arrhythmie eine deutlich stärkere Expression von  $285\pm 57\%$ . Dem entgegen steht eine Aktivierung des antioxidativen Systems unter Arrhythmie. Es zeigte sich eine verstärkte Konzentration der Katalase mRNA von  $119\pm 6\%$ . Außerdem waren die Konzentrationen der Superoxiddismutasen signifikant gesteigert. Nrf2, ein diesen Antioxidativen übergeordneter Transkriptionsfaktor, war in unseren Untersuchungen unter Arrhythmie nicht signifikant gesteigert. Als Verbindung zwischen oxidativem Stress und Fibrose zeigten wir, dass es zu einer Erhöhung von sST2 unter Arrhythmie kommt und somit die antifibrotischen Effekte von IL-33 und ST2L abgeschwächt werden. Fibrose äußert sich in einer Vermehrung der Extrazellulärmatrix (ECM). Dazu untersuchten wir die Parameter Kollagen I und III, Hyaluronsäure und Hydroxyprolin als wichtigste Anteile dieser ECM. Dabei konnten wir keine signifikante Steigerung von Hyaluronsäure und Hydroxyprolin unter Arrhythmie feststellen. Kollagen I und III waren hingegen unter Arrhythmie sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden signifikant gesteigert. Arrhythmie führte zu einer Steigerung von Kollagen I nach 24 Stunden auf  $317\pm 70\%$  und nach 48 Stunden auf  $458\pm 81\%$ . Kollagen III war nach 24 Stunden unter Arrhythmie auf  $218\pm 61\%$  und nach 48 Stunden auf  $277\pm 22\%$  erhöht. Wir konnten somit eine Vermehrung der ECM auf Kollagenbasis unter Arrhythmie nachweisen. Alle aufgeführten Effekte waren signifikant mit  $p < 0,05$ .

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Arrhythmie zu einer profibrotischen Signaltransduktion führt. Durch eine erhöhte Expression von CTGF wird das strukturelle Remodelling entscheidend beeinflusst. Oxidativer Stress als Faktor, welcher CTGF beeinflusst, ist ebenfalls unter Arrhythmie erhöht. Diese Daten tragen zum zellulären Verständnis der Fibrogenese bei Vorhofflimmern bei.

## **1.2 Abstract**

### **Increase of profibrotic signal transduction due to arrhythmic stimulation of cardiomyocytes**

Atrial fibrillation is the most common arrhythmia. Atrial fibrillation is associated with electrical and structural remodelling in the atria. The most important characteristic of the structural remodelling is fibrosis. The pathogenesis of the profibrotic signal transduction is incompletely understood. Atrial fibrillation is a major reason for enhancement of profibrotic

signal transduction. The detailed role of arrhythmia for these processes is incompletely understood.

We developed a cell culture model with neonatal rat cardiomyocytes to characterize the singular influence of arrhythmia on profibrotic signal transduction. We isolated neonatal rat cardiomyocytes and stimulated them for 24 or 48 hours in groups of rhythmic and arrhythmic stimulation, whereas both groups were stimulated with same frequency of 3Hz.

After 24 hours of arrhythmic stimulation there was an increased protein expression of Connective Tissue Growth Factor (CTGF) up to  $182\pm 16\%$ . After 48 hours there was even an increase of expression of  $223\pm 32\%$ . In both groups there was no increase of expression after rhythmic stimulation. The 5'-AMP-aktivierte Kinase (AMPK) as an indicator for energy-guzzling metabolic processes was also increased after 24 and 48 hours of arrhythmic stimulation on  $205\pm 16\%$  or  $192\pm 21\%$ . Furthermore we showed under selective suppression of AMPK with Compound C a significant suppression of CTGF expression on  $83\pm 10\%$ .

Moreover we showed that arrhythmia leads to significant increase of expression of oxidative stress. There was a significant increase of reactive oxygen species (ROS) concentration on  $131\pm 18\%$ . We could confirm these results with the opacification of 8-oH-Desoxyguanosin. In this opacification there was a potentiation of its expression up to  $285\pm 57\%$ . In contrast to that there was an increase in mRNA concentration of catalase on  $119\pm 6\%$ . Moreover concentration of superoxidismutase was significantly increased. Nrf2 as a transcriptional factor was not increased in our study. As a linking between oxidative stress and fibrosis we showed that there was an increase in sST2 due to arrhythmia which is the reason for the suppression of the antifibrotic effects of IL-33 and ST2L.

We investigated collagen I and III, hyaluronic acid and hydroxyprolin as the most important amount of ECM. There was no significant increase of hyaluronic acid and hydroxyprolin after arrhythmia. Collagen I and III however were significantly increased after 24 or 48 hours of arrhythmia. Arrhythmia was the reason of the increase of collagen I on  $317\pm 70\%$  after 24 hours and  $458\pm 81\%$  after 48 hours. Collagen III was increased after 24 hours of arrhythmia on  $218\pm 61\%$  and on  $277\pm 22\%$  after 48 hours. In conclusion we could show a proliferation of

ECM due to collagen increase after arrhythmia. All mentioned effects were significant with  $p < 0,05$ .

In summary, arrhythmia plays an essential role in profibrotic signal transduction as part of atrial fibrillation. Due to increased expression of CTGF structural remodelling is crucially influenced. Oxidative stress as an influencer of CTGF is also increased. This profibrotic signal transduction identifies arrhythmia as an important factor for the proliferation of ECM as a characteristic of fibrosis.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Grundlagen von Vorhofflimmern und Arrhythmie**

#### **2.1.1 Definition von Vorhofflimmern**

Nach den Guidelines der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie wird bei einem Patienten im Elektrokardiogramm (EKG) ein Vorhofflimmern diagnostiziert, wenn sich dort unregelmäßige RR-Abstände mit nicht vorhandenen und nicht eindeutig identifizierbaren P-Wellen zeigen. Diese Veränderungen müssen sich mehr als 30 Sekunden im EKG abgebildet sein, um als Vorhofflimmern definiert zu werden. Die Patienten können dabei unter symptomatischen Episoden leiden. Es gibt aber auch asymptomatische Episoden. Bleiben diese unentdeckt, stellen sie ein fünffach erhöhtes Risiko für Schlaganfälle und Tod dar <sup>2</sup>.

Im klinischen Alltag wird dabei hauptsächlich zwischen den fünf folgenden Typen unterschieden <sup>3</sup>:

1. Neu diagnostiziertes Vorhofflimmern: Bei dem Patienten wird zum ersten Mal Vorhofflimmern diagnostiziert unabhängig von der Auftretensdauer
2. Paroxysmales Vorhofflimmern: Auftretensdauer bis 48 Stunden oder maximal 7 Tagen oder innerhalb von 7 Tagen kardiovertiertes Vorhofflimmern
3. Persistierendes Vorhofflimmern: länger als sieben Tage andauerndes Vorhofflimmern
4. Langanhaltendes Vorhofflimmern: länger als ein Jahr anhaltend mit Therapieversuchen
5. Permanentes Vorhofflimmern: von Patient und Arzt akzeptiertes Vorhofflimmern ohne weitere Behandlungsversuche

#### **2.1.2 Inzidenz, Prävalenz, Morbidität und Mortalität von Vorhofflimmern**

Im Jahre 2010 waren weltweit ca. 20,9 Millionen Männer und 12,6 Millionen Frauen von Vorhofflimmern betroffen, wobei diese Raten in entwickelten Ländern höher sind als in Entwicklungsländern <sup>1</sup>. Das entspricht 596,2 Männern und 373,1 Frauen pro 100.000 Einwohner. In aktuellen Studien wird davon ausgegangen, dass im Jahr 2030 allein in der Europäischen Union bereits 12,9 Millionen Patienten von Vorhofflimmern betroffen sind <sup>4</sup>.

In der Rotterdam Studie von Heeringa et al. mit 6808 Teilnehmern wurde eine Gesamtprävalenz an Vorhofflimmern von 5,5% ermittelt. Dabei konnte ein Unterschied in den verschiedenen Altersgruppen festgestellt werden. In der Gruppe der 55-59 Jährigen lag

die Prävalenz bei 0,7%. Diese stieg in der Gruppe der über 85 Jährigen auf 17,8%. Frauen haben dabei im Alter von 55 Jahren ein Lebenszeitrisiko von 22,2%, Männer im gleichen Alter sogar von 23,8%. Somit lebt jeder vierte bis fünfte Mensch mit dem Risiko an Vorhofflimmern zu erkranken <sup>5</sup>.

Männliche Patienten mit Vorhofflimmern haben ein zweifach und Frauen immerhin ein eineinhalbfach erhöhtes Risiko zu sterben<sup>6</sup>. Dabei ist es interessant, dass die Mortalitätsrate seit 1990 pro 100.000 Einwohner von 0,8 bei Männern und 0,9 bei Frauen bis 2010 kontinuierlich auf 1,6 bzw. 1,7 gestiegen ist anstatt zu sinken, wie man es vielleicht im Rahmen der medizinischen Entwicklung erwartet hätte <sup>1</sup>. Einhergehend mit dem erhöhten Risiko zu sterben geht das Risiko einen Schlaganfall zu erleiden. Durch Vorhofflimmern ist das Risiko für einen Schlaganfall fünfmal so hoch und ca. 15% aller Schlaganfälle sind auf unbehandeltes Vorhofflimmern zurückzuführen <sup>7</sup>.

### **2.1.3 Einfluss auf die Lebensqualität**

Natürlich hat Vorhofflimmern als Rhythmusstörung auch einen Einfluss auf die Lebensqualität der Patienten. Ca. 15-20% der Patienten geben an, unter einer verringerten Belastungsstärke in Form von Luftnot zu leiden. Zu dieser Luftnot kommen noch häufige Symptome wie Palpitationen und Müdigkeit hinzu<sup>8</sup>. Viele Patienten leiden unter der Angst vor Folgeerkrankungen, was sich auch auf ihren Gemütszustand auswirkt. Dies kann sich letztlich als Depression manifestieren und somit die Symptomatik des Vorhofflimmerns negativ beeinflussen <sup>9</sup>.

## **2.2 Pathogenese des Vorhofflimmerns**

Anfang der 1950er Jahre wurde der Begriff der „Lone Atrial Fibrillation“ geprägt; also des Vorhofflimmerns ohne kardiovaskuläre Erkrankungen wie Hypertonie oder Diabetes mellitus. In den meisten Fällen ist Vorhofflimmern allerdings mit kardiovaskulären Erkrankungen vergesellschaftet wie z.B. der koronaren Herzkrankheit, Herzklappenerkrankungen, chronischen Herzinsuffizienz und arteriellen Hypertonie <sup>10</sup>. Einzelne Wissenschaftler, wie Connelly, würden Vorhofflimmern an sich bereits dem kardiovaskulären Kontinuum zuordnen, da z.B. die arterielle Hypertonie, als wesentlicher Ursprung des Kontinuums, eine der wichtigsten Ursachen für Vorhofflimmern darstellt<sup>11,12</sup>. Die arterielle Hypertonie, aber auch oben genannte Erkrankungen wie Herzklappenerkrankungen, führen kompensatorisch zu

einer Dilatation des Vorhofes. Diese Dilatation scheint eine der Ursachen für das strukturelle und elektrische Remodelling des Vorhofes zu sein, welche dann zu Arrhythmien wie dem Vorhofflimmern führen können<sup>13,14</sup>. Weitere Risikofaktoren für Vorhofflimmern sind Alter, männliches Geschlecht, Rauchen, Übergewicht und Diabetes mellitus<sup>15,16,17</sup>. Auch Komorbiditäten wie z.B. Herzinsuffizienz oder Herzklappenerkrankungen beeinflussen dabei negativ die Prognose des Vorhofflimmerns und werden umgekehrt auch durch ein bestehendes Vorhofflimmern beeinflusst. Patienten mit Vorhofflimmern und mit anderen Komorbiditäten haben eine deutlich schlechtere Prognose als mit nur Vorhofflimmern oder nur mit der Herzinsuffizienz<sup>10</sup>. Allerdings konnte in neueren Studien belegt werden, dass eine bestehende Herzinsuffizienz mit folgendem Vorhofflimmern die Prognose deutlich verschlechtert als anders herum<sup>18</sup>. Zu erklären ist dies durch die unregelmäßige Kontraktion der Ventrikelmuskulatur, welche die Pumpleistung des linken Herzens verschlechtert und damit insgesamt die Herzinsuffizienz.

### **2.2.1 Veränderungen am Vorhof – strukturelles und elektrisches Remodelling**

Durch fibrotische Umbauprozesse bei Vorhofflimmern kommt es zu einer Veränderung der elektrischen Reizentstehung und -weiterleitung im Vorhofgewebe. Vorhofflimmern löst eine Verkürzung der Refraktärzeit der Kardiomyozyten aus, was vor allem durch eine Herunterregulierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms und einer Hochregulierung des  $\text{K}^{+}$ -Einstroms in die Zelle bedingt ist<sup>19</sup>. Dadurch kommt es zu Veränderungen der elektrophysiologischen Funktion und einer damit verbundenen unkoordinierten Reizweiterleitung vom Vorhofgewebe zum Ventrikel. Des Weiteren kommt es zu einem Remodelling der Gap-Junctions. Über diese Tunnelproteine, welche als Zell-Zell Kontakte dienen, kommunizieren die Zellen miteinander. Auch die Erregung wird über diese Gap-Junctions mittels  $\text{Na}^{+}$ -Einstrom weitergeleitet. In den veränderten Arealen des Vorhofes scheint es zu Veränderungen dieser Gap-Junctions zu kommen. Eine zentrale Rolle spielen dabei das Connexin 40 und Connexin 43<sup>20,21</sup>. Grundlage für die Arrhythmie sind sogenannte kreisende Erregungen oder Reentry-Kreisläufe. Dabei breitet sich die Erregung nicht wie im gesunden Gewebe vom Sinusknoten über das Vorhofgewebe und den AV-Knoten in die Ventrikel aus, sondern von so genannten Foci. Das sind strukturveränderte Areale im Vorhof, welche auf bestimmte Trigger mit einem erneuten Reiz reagieren können, da die Refraktärphase dieser Areale bereits beendet ist, während andere Myozyten noch in ihrer Refraktärphase stecken. Dadurch entwickeln sich autonome Areale, in denen die Erregung kreist. Infolgedessen kommt es zu einer

Asynchronität der Kontraktion und einer arrhythmischen Weiterleitung über den AV-Knoten<sup>20</sup>.

Für das oben genannte elektrische Remodelling prädisponieren fibrotisch veränderte Areale. Durch Vorhofflimmern kommt es zu einer strukturellen Veränderung des Vorhofgewebes. Ein grundlegender Mechanismus ist der fibrotische Umbau und eine deutliche Vermehrung der Interzellularsubstanz. Hinzu kommt ein Umbau auf zellulärer Ebene. Die Kardiomyozyten hypertrophieren und zeigen außerdem einen essentiellen Funktionsverlust<sup>22</sup>. Dabei kommt es zu einer erhöhten Proteinsynthese und erniedrigter Sarkomerdichte. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es zu einer Erhöhung nichtkontraktiler Elemente, vor allem Glycogen, kommt<sup>23</sup>. Fibrose an sich entsteht durch ein komplexes Zusammenspiel von profibrotischen Signalwegen, Entzündungen und oxidativem Stress. Diese Mediatoren wirken auf die Fibroblasten im Herzgewebe. Sie proliferieren und produzieren Anteile der Extrazellulärmatrix ohne dass diese abgebaut wird. Dadurch entsteht ein Überhang an Kollagenen und somit ein Missverhältnis von Extrazellulärmatrix und dem kontraktilem Apparat<sup>24</sup>.

## **2.3 Bedeutung und Mechanismen myokardialer Fibrose**

### **2.3.1 Aufbau und Bestandteile der Extrazellulären Matrix**

Die kardiale Extrazelluläre Matrix (ECM) wird durch eine Reihe an strukturgebenden und nicht strukturgebenden Proteinen gebildet und wird somit zu einem komplexen Gebilde aus verschiedensten Bestandteilen. Diese Zusammensetzung des Gewebes besteht aus Kollagen-Fibrillen, Elastin und den drei großen, nicht-strukturgebenden Makromolekülen: Glykoproteine, Glykosaminoglycanen und Proteoglycanen. In diese Matrix sind die zellulären Bestandteile des betreffenden Gewebes wie z.B. Fibroblasten und Makrophagen eingebunden<sup>25</sup>. Die Struktur der ECM ist aber keinesfalls ein starres und vorgegebenes Gebilde, sondern ist dynamisch und wird dauerhaft den Umständen und Einflüssen angepasst.

Solche Einflüsse können in Form von biochemischem oder biomechanischem Stress auftreten, was dann zu einer Aktivierung der Fibroblasten führt. Diese können durch autokrine oder parakrine Sekretion von Hormonen induziert werden. Beispiele für aktivierende Hormone sind Angiotensin II, Aldosteron, Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) oder TGF- $\beta$ . Über diese Aktivierungswege werden die Fibroblasten letztlich animiert, Kollagene zu bilden und somit den Anteil der ECM zu vergrößern<sup>26</sup>. Kollagen I und III sind dabei die mit 85% quantitativ am meisten vorhandenen Kollagene des Myokards und sind

verantwortlich für die Steifigkeit und Architektur der ECM <sup>25</sup>. Kollagen I und III werden durch Proteolyse terminaler Peptide aus ihren jeweiligen Procollagenen gebildet. Kollagen I besteht aus zwei  $\alpha 1$ -(I)-Ketten und einer  $\alpha 2$ -(I)-Kette. Kollagen III hingegen besteht aus drei gleichen  $\alpha 1$ -(I)-Ketten. Procollagen I wird sehr schnell in seine endgültige Form Kollagen I umgewandelt, während Procollagen III langsamer umgebaut wird und zum Teil nicht-kollagäre Domänen auch nach der Sekretion behält <sup>27</sup>. Patienten mit Vorhofflimmern zeigen eine verstärkte Expression von Kollagen I, wohingegen die Expression von Kollagen III unverändert bleibt. Die Expression der Kollagene war letztlich stärker bei Patienten mit permanentem Vorhofflimmern als bei Patienten mit persistierendem Vorhofflimmern ausgeprägt, was für eine zeitabhängige Bildung der Kollagene spricht <sup>24</sup>.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der ECM ist die Hyaluronsäure (HA). Sie gehört zur Gruppe der Glycosaminoglycanen (GAG). Sie wird gebildet durch sich abwechselnde Moleküle von UDP-Glucuronsäure und UDP-N-Acetylglucosaminen. Im Gegensatz zu den anderen GAG wird HA in der Plasmamembran durch Hyaluronsäure-Synthase Enzyme gebildet. Dabei ist HA nicht an ein Kernprotein gebunden. HA ist Teil der perizellulären Matrix und ist im Herz im Interstitium zu finden und umgibt dort die Kardiomyozyten. Seine Aufgabe ist es, für ein wässriges Milieu zu sorgen, welches Zellproliferation und -migration ermöglicht <sup>28</sup>. Außerdem kann die ECM selbst auch Fibrose induzieren, im Speziellen durch die hier besprochene HA. Durch die HA werden Entzündungszellen wie Monozyten und Makrophagen aktiviert, welche dann Zytokine und Chemokine ausschütten um darüber Fibrose zu induzieren <sup>29</sup>. Dabei ist die HA nicht nur ein Induktor der Fibrose, sondern ist bei herzinsuffizienten Patienten auch selbst erhöht und zeigt eine negative Korrelation mit der Ejektionsfraktion der Patienten <sup>30</sup>.

### **2.3.2 CTGF als zentraler Vermittler der Fibrose**

Ein zentraler Induktor der Fibrose ist der Connective Tissue Growth Factor, kurz CTGF. Dieses Protein gehört zur Familie der Cystein-reichen CCN-Proteine. Diese Gruppe besteht aus „cysteine-rich angiogenic protein 61 (CYR61 oder CCN1)“, Connective Tissue Growth Factor (CTGF oder CCN2)“ und „Nephroblastoma Overexpressed (NOV oder CCN3)“. Insgesamt besteht die Familie der CCN-Proteine aus sechs Proteinen. Zu den drei genannten gehören noch die Proteine „WNT 1 inducible signaling pathway 1-3 (WISP 1-3 oder CCN4-6) <sup>31</sup>. CTGF spielt bei der Entstehung der Fibrose über mehrere Wege eine Rolle, da es Fibroblasten in vielerlei Hinsicht aktiviert. CTGF fördert die Migration, Proliferation und

Adhäsion der Fibroblasten und hat Einfluss auf die Formation der Extrazellulärmatrix (ECM)<sup>32</sup>. Dabei wird CTGF nicht nur in kardialen Gewebe von Kardiomyozyten und Fibroblasten exprimiert, sondern spielt auch in der Genese von Erkrankungen anderer Gewebe eine wichtige Rolle. Zum Beispiel ist CTGF bei der hepatischen Fibrose durch Ethanol-Oxidation stark exprimiert<sup>33</sup>. Auch bei der Glomerulosklerose und der Tubulointestitiellen Fibrose in der Niere, der COPD in der Lunge und der Sklerodermie der Haut ist CTGF ein wichtiger Mediator für die Entstehung von Fibrose<sup>34, 35, 36</sup>.

Auch wenn der Name „Growth Factor“ es suggeriert, ist CTGF nicht als ein klassischer Wachstumsfaktor anzusehen, da es keinen bestimmten Rezeptor zu haben scheint, über den es seine Signalwirkung entfalten kann. Es ist eher als ein Protein der Zellulärmatrix zusehen, welches die Interaktion der Zellen mit der ECM beeinflusst und so dessen Phänotyp beeinflusst<sup>37</sup>. Dabei wirkt CTGF über unterschiedliche Wege. Zum einen ist es ein extrazellulärer Adapter, welcher Cytokine, wie z.B. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), bindet und so als Vermittler am eigentlichen Rezeptor wirkt. Auf der anderen Seite kann CTGF sowohl Rezeptoren der ECM als auch der Effektorzellen verändern und somit die Signaltransduktion beeinflussen. Außerdem kann CTGF über endozytische Wege in die Zelle aufgenommen werden und wirkt dann innerhalb der Zelle als Adapter am Zytoskelett oder Nucleus auf die Signalwege ein<sup>37</sup>.

CTGF wird durch mehrere verschiedene Cytokine aktiviert. Der „Transforming Growth Factor  $\beta$ “ (TGF- $\beta$ ) ist dabei ein direkter Aktivator von CTGF, welches somit ein Downstream-Protein in der Signalkaskade ist. Es wurde bereits gezeigt, dass TGF- $\beta$  dabei über mehrere Signalwege eine Hochregulierung von CTGF bewirkt. Besonders hervorzuheben ist dabei der SMAD-Signalweg und die Proteinkinase C, welche als Mediatoren zwischen TGF- $\beta$  und CTGF wirken. Auch andere Faktoren haben Einfluss auf CTGF. Reaktive Oxygenspezies (ROS), mechanischer Stress, VEGF, Angiotensin II, sowie viele weitere Faktoren führen zu einer Hochregulierung von CTGF<sup>38</sup>. cAMP und TNF $\alpha$  hingegen scheinen die Hochregulierung durch TGF- $\beta$  zu inhibieren<sup>39, 40</sup>.

### **2.3.1.2 Die 5'-AMP-aktivierte Kinase**

Die 5'-AMP-aktivierten Kinasen (AMPK) sind eine Gruppe von Isoenzymen, welche durch unterschiedlichen Stress, der auf die Zellen einwirkt, aktiviert werden. Bei besagtem Stress handelt es sich um Adenosintriphosphat (ATP) –verbrauchende Mechanismen wie Hypoxie, niedrige Glukoselevel, Ischämie und Hitzeschock. AMPK ist ein heterotrimeres Protein,

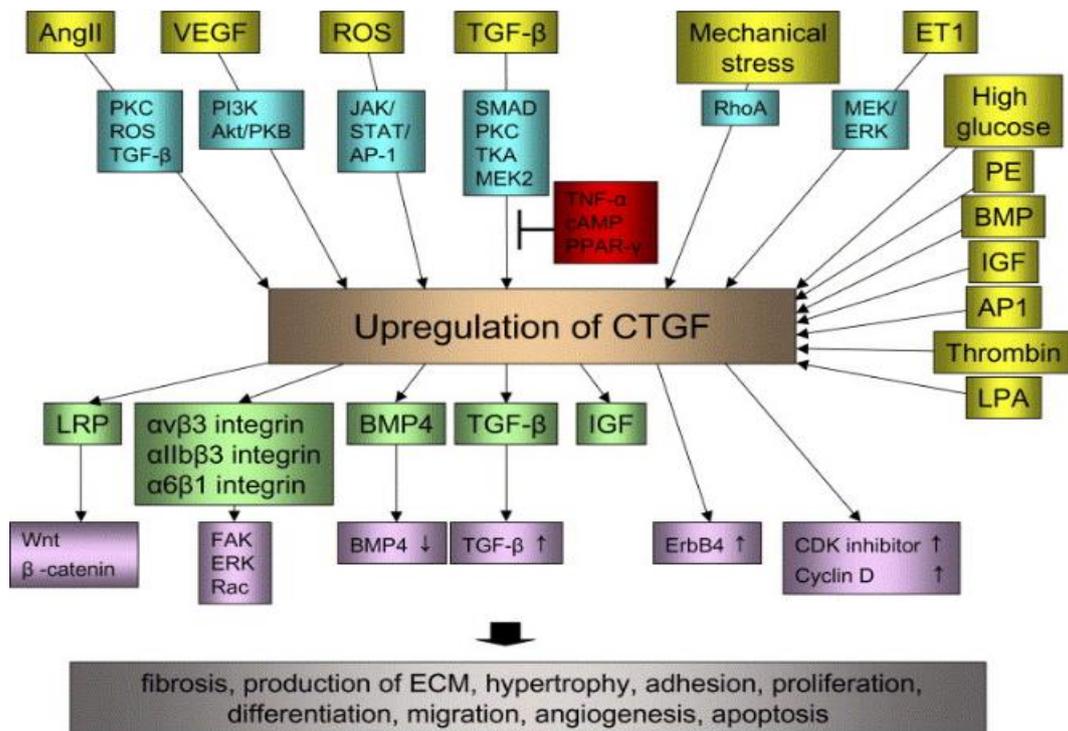
welches aus einer katalytischen  $\alpha$ -Einheit und einer regulatorischen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Einheit gebildet wird <sup>41</sup>.

Die AMPK wird durch ein verändertes ATP/ADP bzw. ATP/AMP Verhältnis aktiviert. Schon kleinste Erhöhungen von AMP oder ADP führen zu einer Aktivierung <sup>42</sup>. Die AMPK selbst wird durch eine Phosphorylierung (pAMPK) aktiviert. Die Phosphorylierung geschieht durch Upstream-Kinasen wie die AMPK-Kinase und wird unter anderem durch eine allosterische Bindung von AMP aufrechterhalten <sup>43</sup>.

Die AMPK spielt in vielen verschiedenen Bereichen des Körpers in der Regulierung von Stoffwechselprozessen eine zentrale Rolle. Dabei kommt ihr auch im Herz eine wichtige Rolle zu. Sie stimuliert die Fettsäureoxidation durch die Phosphorylierung und die damit verbundene Inhibition der Acetyl-CoA Carboxylase. Dadurch werden Transporter wie z.B. CD36 angeregt, welche den Übergang der Fettsäuren über die Membran der Mitochondrien zur Oxidation vermitteln <sup>44</sup>.

Auch kardiovaskuläre Erkrankungen wie Vorhofflimmern führen zu metabolischem Stress. Es wird angenommen, dass die AMPK dabei eine wichtige Rolle in der Abschwächung von negativen Effekten der Erkrankungen spielt. Deswegen wird vermutet, dass z.B. durch erhöhte ADP/ATP Verhältnisse auch die Phosphorylierung entsprechender protektiver Substrate während kardiovaskulärer Erkrankungen durch AMPK verstärkt ist. Des Weiteren ist bisher noch nicht eindeutig untersucht, inwieweit die AMPK protektiv gegen Arrhythmien oder sogar arrhythmiefördernd wirkt <sup>44</sup>.

Auch CTGF wird durch AMPK beeinflusst. Lu et al. konnten in ihrem Model mit renalen Maus-Fibroblasten zeigen, dass eine Aktivierung der AMPK durch Metformin zu einer verminderten Produktion von Collagen I durch TGF- $\beta$  führt. Dies führen sie auf eine Inaktivierung der CTGF Signaltransduktion zurück <sup>45</sup>. Darüber hinaus konnten Xiaowei et al. zeigen, dass auch im Herz die Entwicklung der Fibrose AMPK-abhängig ist. Auch sie konnten zeigen, dass es durch die Aktivierung der AMPK zu einer Inhibition der TGF- $\beta$  abhängigen Collagen I und III Synthese kommt.



**Abb. 1 Übersicht über die Signalwege von CTGF** AngII, Angiotensin II; PKC, Proteinkinase C; IGF, Insulin-like growth factor; BMP, Bone Morphogenic Protein; PE, Phenylephrin; cAMP, zyklisches AMP; STAT, signal transducer and activator of transcription; PPAR- $\gamma$ , Peroxisome Proliferator Activated Receptor- $\gamma$ ; JAK, Janus Kinase; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; ERK, extracellular-regulated Kinase; MEK, mitogen-activated Kinase; TNF- $\alpha$ , Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (weitere Abkürzungen im Text erläutert). Abbildung aus <sup>33</sup>.

### 2.3.3 Das System des oxidativen Stresses in Bezug auf Fibrose

Oxidativer Stress ist definiert als ein Ungleichgewicht zwischen der Produktion von reaktiven Oxygenspezies (ROS) und der Produktion von Antioxidantien. Dabei spielt oxidativer Stress eine wichtige Rolle in der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen wie der Herzinsuffizienz, Arteriosklerose, Hypertonie und der Schädigung von myokardialen Gewebe nach Reperfusion im Rahmen eines ischämischen Ereignisses <sup>46</sup>. ROS präsentieren sich in verschiedenen Formen. Es wird unterschieden zwischen freien Radikalen wie Superoxiden ( $O_2^{\cdot-}$ ) und Hydroxyl-Radikalen ( $\cdot OH$ ) sowie Nicht-Radikalen, wie  $H_2O_2$ , aus denen Radikale generiert werden können. Freie Radikale werden durch verschiedene Quellen produziert.  $O_2^{\cdot-}$  entsteht in intrazellulären, biochemischen Reaktionen durch Aktivierung der Nicotinamid-Adenin Dinucleotid Phosphat (NADPH) Oxidase oder der Xanthin-Oxidase. Außerdem entstehen Radikale durch die Entkopplung der NO-Synthase, durch den Verlust

von Radikalen während der Phosphorylierung in den Mitochondrien oder während des Elektronentransports in der Atmungskette. Hydroxyl-Radikale entstehen durch die Fenton-Reaktion aus  $H_2O_2$ . ROS spielt auf der einen Seite eine Rolle während der physiologischen Signaltransduktion der myokardialen Zellen, ist auf der anderen Seite aber auch Quelle für pathophysiologisches Remodelling, Dysfunktion und Apoptose <sup>47</sup>. Durch exzessiven Überschuss an ROS kommt es zu zellulärer Dysfunktion und Zelltod, welche auf der Zerstörung bzw. Beschädigung der DNA basieren. Des Weiteren führen die Radikale zu einer Peroxidation von Lipiden und Proteinen. Durch diese Schädigung der Proteine kommt es dementsprechend auch zu einer Schädigung der Proteine des kontraktilen Apparates im Herz, was in Folge zu einer Herzinsuffizienz führt <sup>48</sup>.

ROS ist letztlich in der Lage fibrotische Prozesse zu aktivieren. Dies passiert unter anderem durch eine Aktivierung von TGF- $\beta$ , welches wiederum CTGF über den SMAD-Signalweg aktiviert. Dabei beeinflussen sich TGF- $\beta$  und ROS gegenseitig. So kann ROS TGF- $\beta$  direkt aktivieren und auch dessen Expression steigern. Auf der anderen Seite beeinflusst TGF- $\beta$  ebenfalls direkt die ROS Produktion über die Aktivierung der NADPH-Oxidase oder indirekt über eine Aktivierung antioxidativer Systeme <sup>49</sup>.

ROS kann neben der direkten Messung mittels Spektroskopie auch über eine Anfärbung des 8-oH-Desoxyguanosins detektiert werden. Es ist ein Produkt, welches durch die Reparatur von durch freie Radikale entstandene DNA-Schädigungen entsteht. Studien zeigten, dass die Menge an Desoxyguanosin mit der Menge an oxidativem Stress korreliert <sup>50</sup>.

### **2.3.3.1 Das antioxidative System der myokardialen Zelle**

Um sich gegen den oxidativen Stress zu schützen, hat der Körper verschiedene Abwehrmechanismen zur Verfügung. Als ein für die antioxidativen Systeme übergeordneter Transkriptionsfaktor ist nuclear factor-erythroid-2-(NF-E2-) related factor 2 (Nrf2) anzusehen. Nrf2 gehört zur cap-n-collar (CNC) Familie zu der insgesamt Nrf1-3 und Bach1-2 gehören <sup>51</sup>. Nrf2 liegt inaktiviert im Zytosol der Zelle vor und ist dort über Cysteinbrücken mit dem Kelch-like ECH-associated protein 1(KEAP-1) verbunden. KEAP-1 hat dabei zwei Funktionen. Auf der einen Seite führt es Nrf2 dem proteosomalen Abbau und auf der anderen Seite ist KEAP-1 der Sensor für oxidativen Stress <sup>52</sup>. Nrf2 hat eine Halbwertszeit von lediglich 20min <sup>51</sup>. Durch Ubiquitinierung an KEAP-1 bleiben KEAP-1 und Nrf2 verbunden und werden in den Proteosomen abgebaut <sup>51</sup>. Durch oxidativen Stress hingegen kommt es zu einer Entpaarung des Nrf2/KEAP-1 Gebildes. Daraufhin geht Nrf2 vom Zytosol über in den

Nucleus der Zelle. Dort bindet es an antioxidative response elements (ARE). Das sind Promoterregionen entsprechender Phase-II Gene, die daraufhin transkribiert werden <sup>51</sup>.

In dieser Arbeit haben wir die Katalase und die Superoxiddismutasen 1-3 untersucht. Die Katalase ist ein tetrameres Enzym, welches aus vier gleichen Untereinheiten besteht und vier Ferriprotoporphyryngruppen pro Molekül enthält. Dabei ist die Katalase eines der effektivsten Enzyme. Sie setzt  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{O}_2$  um <sup>53</sup>.

$\text{H}_2\text{O}_2$  ist das Produkt, welches bei der Reaktion der Superoxiddismutasen (SOD) entsteht. Die SOD gibt es in drei Formen (SOD1-3), wobei alle drei die gleiche Reaktion katalysieren, bei welcher  $2\text{O}^-$  und  $2\text{H}^+$  zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  reagiert <sup>54</sup>. Die drei SOD unterscheiden sich in der Lokalisation. Die SOD1 ist ein intrazelluläres Enzym, die SOD2 ein mitochondriales und die SOD3 ist extrazellulär lokalisiert. So ist eine kompartimententsprechende Abwehr möglich <sup>54</sup>. SOD1 und 2 unterscheiden sich noch in ihrer Halbwertszeit. Während SOD2 5-6 Stunden besteht, hat SOD1 nur eine Halbwertszeit von 6-10 Minuten <sup>54</sup>.

### **2.3.3.2 Die Bedeutung des Systems von IL33 und ST2 für die Fibrogenese**

Zuletzt konnte gezeigt werden, dass das Zusammenwirken des Rezeptors ST2 in seiner unterschiedlichen Erscheinungsform mit seinem Liganden IL-33 sowohl eine profibrotische als auch eine antifibrotische Wirkung hervorrufen kann. Dies hängt von der exprimierten Form von ST2 ab, was wiederum durch verschiedene Einflussfaktoren beeinflusst wird.

ST2 ist ein Rezeptor der Interleukin-1 (IL-1) Familie und kommt in zwei verschiedenen Formen vor, die jeweils eine unterschiedliche Funktion haben. ST2 wird auf der einen Seite als lösliche Form (soluble ST2; sST2) und auf der anderen Seite als Transmembranrezeptor (ST2 ligand; ST2L) sowohl von Fibrozyten als auch von Kardiomyozyten exprimiert <sup>55</sup>. Es kommt zu einer Hochregulierung von ST2 durch biochemischen Stress, wie z.B. ROS, und mechanischen Stress im Gewebe <sup>55</sup>. Der Ligand für ST2 ist das Interleukin-33 (IL-33), welches sowohl von Fibrozyten als auch von Kardiomyozyten exprimiert wird, von Fibrozyten allerdings fünfmal so stark <sup>56</sup>.

Zusammen mit ST2 in seinen verschiedenen Formen entfaltet IL-33 seine antihypertrophe und antifibrotische Wirkung. Shoji et al. konnten bereits zeigen, dass IL-33 einer Hypertrophie der Kardiomyozyten im Mausmodell über eine Antagonisierung von Angiotensin-II und Phenylephrin entgegenwirkt. Dieser Effekt war deutlich abgeschwächt in ST2-defizienten Mäusen. So kamen sie zu dem Schluss, dass IL-33 über ST2 wirken muss.

Bei Behandlung mit rekombinanten IL-33 und gleichzeitig sST2 kommt es zu einer Aufhebung der antihypertrophen Wirkung von IL-33, weswegen sST2 als Abfangrezeptor für IL-33 gesehen wird <sup>56</sup>.

Seki et al. stellten in ihrem Rattenmodell eine Theorie zur antifibrotischen Wirkung von IL-33/ST2 auf. Sie konnten zeigen, dass mit IL-33 behandelte Kardiomyozyten eine deutliche Steigerung des antiapoptotischen Gens Bcl-2 und eine verringerte Aktivität der Caspase 3 zeigen, welche ein Schlüsselenzym des Apoptosemechanismus darstellt. Dieser Effekt entfiel bei ST2-defizienten Mäusen. Unter Behandlung mit sST2 kam es ebenfalls zu einer Abschwächung des protektiven Effektes. Durch diesen protektiven Mechanismus und längeres Überleben der Zelle wird der Fibrose entgegengewirkt <sup>57</sup>.

Luo et al. untersuchten sST2 hinsichtlich seiner Relevanz als Biomarker für Patienten mit Herzinsuffizienz. Sie fanden heraus, dass bei Patienten die Serumkonzentration von IL-33 und sST2 signifikant erhöht sind. Im Vergleich mit dem bisher klassischen Biomarker für Herzinsuffizienz NT-proBNP zeigte sich eine signifikant höhere Detektion von Herzinsuffizienzpatienten mit erhöhten IL-33 Serumspiegeln <sup>57</sup>.

## **2.4 Fragestellung der Arbeit**

Vorhofflimmern ist die häufigste arrhythmogene Herzerkrankung und hat einen großen Einfluss auf die Lebensqualität der Patienten. Zum Thema Vorhofflimmern und damit verbundenen Umbaumechanismen und profibrotischen Signalwegen ist bereits viel erforscht worden. Trotzdem ist dieses Krankheitsbild auf zellulärer Ebene noch nicht abschließend nachvollzogen. Eine genaue Untersuchung der Signaltransduktion der Fibroseentwicklung ist wichtig, um das Krankheitsbild vollständig zu verstehen und mögliche weitere Therapieansätze zu entwickeln. Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss der Arrhythmie unabhängig von der Frequenz der Kontraktion auf die fibrotische Signaltransduktion aufzuzeigen. Dabei soll auf folgende Fragestellung näher eingegangen werden:

- Einfluss der Arrhythmie auf die CTGF-Regulierung
- Einfluss der Arrhythmie auf die Entstehung von oxidativem Stress
- Einfluss der Arrhythmie auf die Expression des antioxidativen Systems der Zelle
- Einfluss der Arrhythmie auf die Vermehrung der Extrazellulärmatrix

## **3 Material**

### **3.1 Antikörper**

#### **3.1.1 Primärantikörper**

##### **Antikörper**

p-AMPK (Zhr172)

CTGF (L-20)

GAPDH (AB2302)

Nrf 2 (ab31163)

IL-33

ST2

##### **Hersteller**

Cell-Signaling

Santa Cruz Biotechnology

Merck Millipore

Abcam

Abcam

Abcam

#### **3.1.2 Sekundärantikörper**

##### **Antikörper**

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

Konjugat

Goat Anti-Rabbit IgG-Peroxidase

Rabbit Anti-Goat IgG-Peroxidase

Rhodamine (FITC)-conjugated Anti-Mouse IgG

Rhodamine (FITC)-conjugated Anti-Mouse IgM

Rhodamine (TRITC)-conjugated Anti-Rabbit IgG

##### **Hersteller**

Bio-Rad Laboratories

Sigma-Aldrich Chemie

Sigma-Aldrich Chemie

Dianova, Hamburg

Dianova, Hamburg

Dianova, Hamburg

### **3.2 Enzyme, Kits, Sonden, Primer**

##### **Substanz**

18S

Catalase Primer

Collagenase Typ 2

DC Protein Assay Reagent A

##### **Hersteller**

Applied Biosystems, Carlsbad,  
California, USA,

Biomol, Hamburg

Worthington Biochemical, Cell Systems

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA,  
USA

DC Protein Assay Reagent B	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Developer G 153 A	Agfa, Mortsel, Belgien
Developer G 153 B	Agfa, Mortsel, Belgien
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE, Healthcare, München
HPRT1	Thermo Fisher Scientific, Reinach
Hydroxyprolin-Assay	Qickzyme Biosciences, Leiden, Netherlands
Hyaluronsäure-Assay	Corgenix, Broomfield, Colorado, USA
Pancreatin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Rapid Fixer G 354	Agfa, Mortsel, Belgien
Superoxiddismutase 1	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Superoxiddismutase 2	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Superoxiddismutase 3	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
TaqMan PCR Master Mix (P/N 4304437)	Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA

### 3.3 Lösungen, Medien, Puffer

#### Lösung, Medium, Puffer

#### Zusammensetzung

PBS (10x)

Aqua dest.  
NaCl 80g/l  
KCL 2g/l  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14,4g/l  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,4g/l  
pH 7,4

---

PBS-Tween (10x)

PBS (10x)  
1% Tween 20

pH 7,4

---

Lysepuffer für Proteine

5ml 1M Tris pH 6

20 ml 10%SDS

10ml Glycerol

15ml Aqua dest.

vor Proteinernte hinzugeben:

1µl Leupeptin (10mg/ml) pro ml

Lysepuffer

1µl PMSF (100mM) pro ml Lysepuffer

0,6µl Aprotinin (10mg/ml) pro ml

Lysepuffer

---

Elektrophoresepuffer (10x)

144mg/ml Glycin

30,3mg/ml Tris

10mg/ml SDS

Aqua dest.

---

Transferpuffer für Western Blot (5x)

29mg/ml Tris

145mg/ml Glycin

5mg/ml SDS

Aqua dest.

---

Stripping buffer

31,25ml 1M Tris-HCl pH 6,8

10g SDS

3,5ml beta-Mercaptoethanol

500ml Aqua dest.

---

ADS-Puffer

4,78g/l NaCl

4,76g/l HEPES

8ml/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,1M in A.dest)

	1g/l Glukose
	0,4g/l KCl
	8ml/l MgSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O (0,1M in A.dest)
	Aqua dest.
Enzym-Mix für Kardiomyozyten-Isolation	80ml ADS-Puffer
	48mg Pankreatin (0,6mg/ml)
	40mg Collagenase (0,5mg/ml)
Kardiomyozyten-Nährmedium	500ml F10 (HAM+Glutamin)
	+ 10% Horse-Serum
	+ 5% Fetal Calf Serum (Kälberserum)
	+ 1% Penicillin/Streptomycin
Ladepuffer für Western Blot	5ml 50% Glycerol
	1,25g 10% SDS
	2,5ml 0,625M Tris
	125µl/ml 1M DTT
	Aqua dest.
	pH 7,6
5% Trockenmilch-Lösung	50ml 1xPBS-Tween
	2,5g Trockenmilchpulver
1% Trockenmilch-Lösung für Primär-Antikörper	1ml 5%-Trockenmilch-Lösung
	4ml 1xPBS-Tween

### 3.4 Sonstige Substanzen

#### Substanz

Acrylamid Electrophoresis Purity

Reagent 30%

Ammoniumpersulfat

#### Hersteller

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA,

USA

SERVA Electrophoresis, Heidelberg

Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Compound C	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogen	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
F 10 Medium	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
FKS (Fetales Kälberserum)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie, München
Horse-Serum	Gibco,Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumphosphat	Sigma-Aldrich Chemie, München
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Low Range Marker	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Methanol	Carl Roth, München
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
NCS (Neonatal Calf Serum)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
PMSF (Phenylmethansulfonfluorid)	Sigma-Aldrich Chemie, München
pegGOLD RNA Pure	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	VWR international, Darmstadt
TEMED (Tetramethylethylendiamid)	Sigma-Aldrich Chemie, München
Trypanblaulösung	Sigma-Aldrich Chemie, München
Trypsin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Vectashield Mounting Medium with Dapi

Vector Laboratories, Burlingame, CA,  
USA

Wasserstoffperoxid

Merck, Darmstadt

### 3.5 Verbrauchsmaterialien

#### Material

Cell Scraper

Sarstedt, Inc., Newton, USA

Eppendorf-Reaktionsgefäße

Sarstedt, Inc., Newton, USA

Falcon (50ml)

Greiner bio-one, Frickenhausen

Falcon Cell Strainer 70µm

Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA

High Performance Autoradiography Film

GE Healthcare, München

Objektträger

VWR International, Darmstadt

Mini-Trans-Blot Filterpapier

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA,  
USA

Glas-Pipettenspitzen (5,20, 25ml)

Greiner bio-one, Frickenhausen

Zellkulturschalen (6 bzw. 10x2cm)

TPP, Trasadingen, Schweiz

Zellkulturschalen P6 Primaria

Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA

MicroAmp-96-Well-Reaktionsplatten

Applied Biosystems, Carlsbad,  
California, USA

Wägschale

VWR International, Darmstadt

ThinCert PET Membrane 0,4µm

Greiner Bio-One, Kremsmünster,  
Österreich

### 3.6 Geräte

#### Gerät

Autoklaviergerät Tuttnauer 3850 EL

#### Hersteller

Tuttnauer Europe B.V., Breda,  
Niederlande

Cell Culture Stimulator C-PACE EP

ION Optix

Eismaschine Scotsman Frimont MF 22	Scotsman Frimont, Mailand, Italien
Entwicklungsautomat Curix 60	Agfa Mortsel, Belgien
Metallblockthermostat HTMR-133	HLC Biotech, Bovenden
Mikroskope:	
Olympus CK 2	Olympus
Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mini-Protean Gelgießstand	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mini-Trans-Blot System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Pipettierhilfe Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Power Pac 200 Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Px2 Thermal Cycler	Thermo-Cycler Industries, Union Mills, Indiana, USA
Röntgenkassette (24x30cm)	Dr. Goos-Suprema, Heidelberg
Scanner CanoScan D1250 V2F	Canon, Krefeld, Deutschland
Schüttel- und Mischgerät Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach
Schüttelwasserbad Typ 1086	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwandel
StepOnePlus, Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA
Vortexer VV3	VWR International, Darmstadt
Waagen:	
VLC-Series 0,01g Precision Balances	Acculab UK, Edgewood, NY
ALC-Series, 0,0001g Analytical Balances	Acculab UK, Edgewood, NY
Überkopfschüttler REAX 2	Heidolph Instruments, Schwabach

Heracell 150 Cell Cultur Incubator	Heraeus Holding, Hanau
Sicherheitswerkbank Heraeus HS12	Heraeus Holding, Hanau
Sicherheitswerkbank Heraeus KS12	Heraeus Holding, Hanau
Biofuge pico	Heidolph Instruments, Schwabach
Kühlzentrifuge 1K15 Harz	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am
Megafuge 1,0	Heraeus Holding, Hanau
Ultrazentrifuge L7-55	Beckmann Coulter, Fullerton, CA, USA

### 3.7 Auswertprogramme

#### Anwendungsgebiet

#### Auswertprogramm

Betriebssystem

Microsoft Windows 7

Western Blot Bandenanalyse

UVP Lab Works Version 4.6 Image  
Studio Light

Statistische Auswertung und

Microsoft Excel 2010 und Graph Pad  
Prism Diagrammerstellung 4.0

Statistische Test

Mann-Whitney-U-Tests

One-way Anova for multiple  
comparisons Post hoc comparisons:  
Bonferroni's Multiple Comparison Test

## **4 Methoden**

### **4.1 Isolation neonataler Rattenkardiomyozyten**

Für die Isolation der neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten (NRVM) wurden drei bis fünf Tage alte Sprague Dawley Ratten (Charles River) ausgewählt. Die Isolation begann mit der Dekapitierung der Tiere. Der Thorax wurde kurz in 70%igen Alkohol gehalten. Anschließend wurde der Thorax mittig mit einer kleiner Schere geöffnet. Durch leichtes Drücken unterhalb des Thorax trat das Herz hervor und konnte mit Hilfe einer Schere von den großen Gefäßen abgetrennt werden. Das Herz wurde in einer mit 10ml ADS-Puffer gefüllten 10cm Schale gesammelt. Nachdem alle Herzen in dieser Schale gesammelt wurden, wurden anhängendes Gewebe und die Vorhöfe vom Ventrikel abgetrennt. Die Herzen wurden in einer weiteren mit 10ml ADS-Puffer gefüllten 10cm Schale gesammelt und mit einem Cutter in ungefähr gleich große Stücke zerschnitten.

Der ADS-Puffer wurde anschließend, ohne Gewebestücke abzusaugen, abpipettiert und verworfen. Zu den Gewebestücken wurden 10ml Enzym-Mix hinzugegeben und mit einer 25ml Pipette resuspendiert und in eine sterile Flasche gegeben. Diese wurde fünf Minuten im Schüttel-Wasserbad bei 37°C und (80-100U/min) inkubiert. Der Überstand wurde verworfen. Es kamen abermals 10ml Enzym-Mix hinzu. Wieder wurden die Gewebestücke im Schüttelbad für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Überstand in einem 50ml Falcon gesammelt und mit 2ml NCS die Enzyme gestoppt. Der Falcon wurde bei Raumtemperatur fünf Minuten bei 700rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch vorsichtiges Schütteln in 4ml NCS gelöst. Der Falcon wurde im 37°C warmen Brutschrank gelagert. Die Schritte oben wurden noch fünf Mal wiederholt mit anderen Inkubationszeiten (25, 25, 15, 10 und 10 Minuten). Alle Zellsuspensionen wurden anschließend in einem 50ml Falcon gesammelt und bei 700rpm und Raumtemperatur für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 7ml Nährmedium gelöst. Daraufhin wurde die Zellsuspension durch einen mit 1ml Nährmedium vorgespültem Filter gefiltert. Es wurde mit 1ml Nährmedium nachgespült. Diese 9ml Zellsuspension wurden auf drei 6cm-Schalen verteilt und für 60 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. In dieser Zeit konnten die Fibroblasten adhären.

Anschließend wurden die Kardiomyozyten durch vorsichtiges Aufkippen abgelöst und in einem 50ml Falcon gesammelt. Die Zellen wurden mit Hilfe von Trypanblau angefärbt, wobei nur membrangeschädigte Zellen blau gefärbt werden. In einer Neubauer-Zählkammer wurden

die nicht geschädigten Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Anschließend konnten die Zellen in gewünschter Dichte in Sixwell-Platten ausgesät werden.

## **4.2 Behandlung der Zellen bis zur Stimulation**

Nach zwei Tagen Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen kontrolliert und das Nährmedium ausgetauscht.

## **4.3 Stimulation der neonatalen ventrikulären Kardiomyozyten**

Am vierten Tag nach Isolation wurde die Aktivität der Kardiomyozyten nochmals unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Die Zellen hatten zu diesem Zeitpunkt untereinander Zellverbindungen aufgebaut und es kontrahierten annähernd alle Zellen pro Well. Unter der Sterilbank wurden die Elektroden in die Sixwells eingehangen. Die Elektroden wurden vorher für mindestens eine Stunde in 70%igem Ethanol desinfiziert. Nach Anschluss der Elektroden an den Zellkulturstimulator wurden die gewünschte Frequenz und der Grad der Arrhythmogenität eingestellt. Wir wählten für unsere Experimente in der arrhythmogenen Gruppe eine 50%ige Arrhythmie bei einer Frequenz von 3Hz aus. Die rhythmische Gruppe wurde 100% rhythmisch bei ebenfalls 3Hz stimuliert. So waren die beiden Gruppen zwar in Bezug auf ihre Frequenz gleich, unterschieden sich aber in ihrem Rhythmus der Kontraktion. Unter dem Lichtmikroskop wurde kontrolliert, dass die Kardiomyozyten die gewünschte Stimulierung angenommen haben. Für die Zeit der Stimulierung wurden die Sixwells wieder im Brutschrank gelagert. Die Zellen wurden jeweils für 24 Stunden bzw. 48 Stunden stimuliert.

## **4.4 Co-Kultur Modell**

Um ausschließlich von Fibrozyten sezernierte Substrate zu untersuchen, entwickelten wir ein Co-Kultur Modell, wodurch wir die Interaktion der Kardiomyozyten mit den Fibrozyten simulierten. Dazu fand die Isolation der Kardiomyozyten nach oben genanntem Protokoll statt. Zusätzlich kultivierten wir die im Rahmen der Kardiomyozyten-Isolation abgetrennten Fibrozyten aus den neonatalen Rattenherzen auf 6cm Schalen. Nach zwei Tagen Inkubation im Brutschrank wurden die Fibrozyten gesplittet und auf die Co-Kultureinsätze verteilt. Dazu saugten wir das Medium von den Fibrozyten ab und wuschen die Zellen kurz mit sterilem

1xPBS ab. Anschließend verteilten wir 1,5ml Trypsin pro 6cm-Schale und inkubierten die Zellen für 3min im Brutschrank. Anschließend stoppten wir das Trypsin mit 1,5ml DMEM-Medium. Das Zelllysat pipettierten wir anschließend in einen 50ml-Falcon und führten eine Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer durch. Anschließend zentrifugierten wir das Zelllysat bei 1000rpm und Raumtemperatur für drei Minuten. Danach saugten wir den Überstand ab und lösten das Zellpellet in der sich nach der Anzahl der Einsätze richtenden Menge an DMEM-Medium. In den Einsatz wurden 0,9ml reines DMEM-Medium vorgelegt und mit 0,1ml Zelllysat aufgefüllt. Anschließend wurden die Fibrozyten in den Einsätzen nochmals für zwei Tage im Inkubator inkubiert. Am Tag der Stimulation wurden die Einsätze in das Medium der Kardiomyozyten in die Sixwells eingehangen, sodass eine Interaktion zwischen den Zellreihen stattfinden konnte. Die Stimulationsbedingungen waren auch in dem Co-Kulturmodell die Gleichen wie oben beschrieben.

#### **4.5 Zellen ernten für Western Blot**

Unmittelbar vor Ernten der Zellen nach der Stimulierung wurde dem Lysepuffer PMSF (1µl Stock/ml Lysepuffer), Leupeptin (1µl Stock/ml Lysepuffer) und Aprotinin (0,6µl Stock/ml Lysepuffer) hinzugefügt.

Das Nährmedium wurde aus dem Sixwell abgesaugt und dann mit 1xPBS gespült. Nach Absaugen von eben diesem wurden pro Sixwell 100µl von dem Lysepuffer über das Sixwell verteilt. Diese Menge wurde vorher für die Fläche berechnet. Anschließend wurden Kardiomyozyten vom Boden des Sixwells mittels Cellscrapper abgelöst. Diese Zellsuspension konnte nun in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pipetiert werden. Zum Abschluss wurden die Zelllysate in einem Heizblock für fünf Minuten bei 96°C gekocht. Anschließend wurden die Proben entweder bei -20°C gelagert oder direkt weiter für die Proteinbestimmung verwendet.

#### **4.6 Quantitative Proteinbestimmung nach Lowry**

Zunächst wurden 2µl der Probe mit sterilem H<sub>2</sub>O auf 1:10 verdünnt. Anschließend wurden diesem Ansatz 100µl DC Protein Assay Reagent A hinzugefügt. In diesem Schritt kommt es zur Komplexbildung zwischen Peptidbindungen und Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung. Das ist die sogenannte Biuret-Reaktion. Anschließend wurde dieser verdünnten Probe 800µl DC Protein Assay Reagent B (Molybdato-phosphorsäure und Wolframatophosphorsäure)

hinzugefügt. Die durch das Molybdänblau entstehende Blaufärbung wurde nach 15 Minuten Wartezeit zur quantitativen Proteinbestimmung mittels Photometer bei 750nm verwendet. Pro Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt, um daraus den Mittelwert zu bilden.

## **4.7 Western Blot Verfahren**

Beim Western Blot handelt es sich um ein Verfahren, wo die Proteine einer Probe zunächst durch eine Gelelektrophorese ihrer Größen nach aufgetrennt werden. Anschließend werden diese Proteinbanden auf eine Trägermembran übertragen. Ein hinzugegebener monoklonaler Primärantikörper detektiert das spezifische Protein auf der Membran. Dieser Komplex wird nun durch einen Fluoreszenz- oder Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Eine Quantifizierung ist im Anschluss daran mittels Intensitätsmessung der verschiedenen Banden möglich.

### **4.7.1 Gelelektrophorese**

Auf Grundlage der vorher durchgeführten Proteinbestimmung wurden 50µg des Gesamtproteins der Probe pipettiert und mit 1xLadepuffer in äquivalenter Menge vermischt. Diesem wurde zuvor im Verhältnis von 1:20 Dithiothreitol beigefügt, um die Disulfidbrücken des Proteins aufzubrechen. Dieses Gemisch wurde anschließend für sieben Minuten bei 70°C im Heizblock gekocht, um die Sekundär- und Tertiärstruktur weiter aufzulösen. Zusätzlich maskiert das im Ladepuffer enthaltene SDS die Eigenladung der Proteine und führt aufgrund der nun negativen Eigenladung zu Abstoßung weiterer Auflösung der Proteinstruktur.

Die Proteine wurden schließlich mittels SDS-Page-Gelelektrophorese (SDS-Page) aufgetrennt. Dazu wurden 10%ige SDS-Tris-Glycin-Polyacrylamid-Gele gegossen. Zunächst wurde in der Gelkammer (1,5mm tief) das Trenngel gegossen, welches mit einer Schicht Aqua dest. bedeckt wurde, um eine gerade Trennlinie zu erhalten. Nach Festwerden des Trenngels, was durch eine deutliche Grenzbildung zwischen Wasserspiegel und Trenngel deutlich wurde, wurde das Sammelgel gegossen. Dazu wurde der Wasserspiegel entfernt und das Sammelgel darauf pipettiert. Dort hinein wurde ein 1,5mm breiter Slotkamm mit 10 bzw. 15 Slots eingesetzt. Ein Low- oder High-Range Marker lief randständig für die Orientierungsbanden mit. Die Proben wurden mittels Hamilton-Spritze in die Slots pipettiert. Dann wurde die Gelelektrophorese bei 30mA gestartet.

Zusammensetzung des SDS-Tris-Glycin-Polyacrylamid-Gels:

Substanz	Trenngel (in ml, 10%)	Sammelgel (in ml)
Aqua dest.	7,9	3,4
30% Acrylamid-Mix	6,7	0,83
1,5 M Tris (pH 8,8)	5,0	0,0
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,0	0,63
10% SDS	0,2	0,05
10% Ammonium Persulfat	0,2	0,05
TEMED	0,008	0,005

#### 4.7.2 Proteintransfer

Für den Proteintransfer wurde das Semi-Dry System von BioRad verwendet. Dabei werden die Proteinbanden aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dafür wird senkrecht zum Gel ein elektrisches Feld aufgebaut. Dabei wandern die Proteine auf Grund von ionischen und polaren Wechselwirkungen in Richtung Anode. Das Verteilungsmuster der Proteine bleibt dabei erhalten und wird exakt auf die Membran übertragen. Das Semi-Dry System lief dafür 45 Minuten bei 200mA. Zum Abschluss wurden die Membranen noch in 5%iger Milch für 30 Minuten geschüttelt, um die Membranen zu blocken.

#### 4.7.3 Proteindetektion

Im Anschluss an den Proteintransfer wurden die Membranen anhand der mitgelaufenen Markerbande so zurechtgeschnitten, dass die zu untersuchenden Proteine auf zwei getrennten Membranteilen waren. Es wurde aus der 5% Milch eine 1% Milch mit 4ml 1xPBS-Tween angesetzt und der gewünschte Primärantikörper in entsprechender Konzentration hinzugeben. Die Membranen rotierten in dieser Lösung bei 4°C für ca. 12 Stunden. In dieser Zeit bindet der Primärantikörper an den entsprechenden Epitopen der Antigene auf der Membran. Anschließend wird der unspezifisch gebundene Antikörper in den Waschsritten 2x5min und 2x10min mit PBS-Tween und 2x3min mit PBS abgewaschen. Daraufhin wird der in 50ml PBS gelöste peroxidasekonjugierte Sekundärantikörper auf die Membran gegeben, der an der Fc-Region des Primärantikörpers bindet. Auch hier wird der überschüssige Sekundärantikörper durch oben genannte Waschsritte abgewaschen. Sichtbar werden die Banden durch eine Chemilumineszenz-Reaktion mit einem ECL-Kit (enhanced chemiluminescence) auf einem Röntgenfilm. Die abschließende Detektion findet durch das Einscannen der Banden am Computer statt und wird mit Hilfe von UVP Lab Works Version 4.6 und Image Studio Light durchgeführt.

## **4.8 Polymerase-Ketten-Reaktion Verfahren**

### **4.8.1 Zellen ernten nach Stimulation**

Nach der Stimulation der Zellen wird das F10-Nährmedium von den Zellen abgesaugt. Das Sixwell wird anschließend kurz mit sterilem PBS gespült. Daraufhin wird pro Well 1ml RNA pure auf den Zellen verteilt. Diese Zellsuspension wird dann mit einem Cellscrapper abgekratzt und in autoklavierte Eppendorf-Reaktionsgefäße abpipettiert. Die Proben können bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

### **4.8.2 RNA Isolation**

Der Zellsuspension wurden  $300\mu\text{l}$  Chloroform hinzugefügt. Das Gemisch wurde anschließend so lange gevortext, bis die Probe milchig war. Es folgte eine Inkubationszeit von 10min bei Raumtemperatur. Die Probe wurde dann bei  $4^{\circ}\text{C}$  30min bei  $14000\text{rpm}$  zentrifugiert. In der Zeit bereiteten wir neue autoklavierte Eppendorf-Reaktionsgefäße vor und legten  $400\mu\text{l}$  Isopropanol vor. Nach der Zentrifugation pipettierten wir die obere, wässrige Phase ab und gaben diese zum Isopropanol hinzu. Das Gemisch wurde über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Am nächsten Tag zentrifugierten wir die Probe 60min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $14000\text{rpm}$ . Der Überstand wurde abpipettiert und das verbliebene, kleine Pellet wurde in  $800\mu\text{l}$  eisgekühltem 70%igem Ethanol durch vortexen vom Gefäßboden abgelöst. Anschließend wurde die Probe nochmals bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $14000\text{rpm}$  für 15min zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin sehr sauber abpipettiert und das Pellet anschließend bei geöffnetem Eppendorf-Reaktionsgefäß getrocknet bis es durchsichtig war. Anschließend pipettierten wir zu dem Pellet  $20\mu\text{l}$  steriles Wasser und resuspendierten die Probe 100-mal. Danach kam die Probe für  $65^{\circ}\text{C}$  in einen Heizblock. Anschließend wurde die RNA-Konzentration mittels Spectrophotometrie gemessen und  $2\mu\text{g}$  Gesamt-RNA berechnet.

### **4.8.3 Reverse Transkription**

Durch vorherige Schritte wurde die RNA aus dem geernteten Gewebe gewonnen. In  $0,5\text{ml}$  Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurde anhand der zuvor auf  $2\mu\text{g}$  berechneten Menge an RNA so viel steriles Wasser vorgelegt, sodass der Mix aus  $2\mu\text{g}$  RNA und dem vorgelegten Wasser  $10\mu\text{l}$  entsprach. Zu dieser Probe wurden  $10\mu\text{l}$  eines zuvor angesetzten Mastermixes hinzugefügt. Dieser bestand aus  $2\mu\text{l}$  RT-Buffer,  $0,8\mu\text{l}$  dNTP-Mix,  $2\mu\text{l}$  RT-Random Primers,

1µl Multiscribe Reverse Transcriptase, 1µl RNase Inhibitor und 3,2µl sterilem Wasser. Dieser Probenmix wurde gevortext und anschließend zentrifugiert.

Anschließend wurde die Probe in den Thermocycler gegeben, in dem die eigentliche Reverse Transkription stattfand. Durch Erhitzen und Abkühlen wurde im Thermocycler die cDNA hergestellt. Im ersten Schritt wurde die Probe für 10min auf 25°C erwärmt. Im zweiten Schritt wurde die Probe auf 37°C für 120min erwärmt um im dritten Schritt auf 85°C für 5min erhitzt zu werden. Damit war die Reverse Transkription beendet. Anschließend wurde die Probe auf 4°C abgekühlt, um anschließend bei -20°C gelagert werden zu können.

#### **4.8.4 Quantitative Realtime-Polymerase-Kettenreaktion**

Prinzip der quantitativen Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) ist es genau wie bei der normalen PCR die DNA zu amplifizieren. Im Unterschied ist es in der qRT-PCR möglich, die vorhandene DNA zu quantifizieren. Dies ist möglich durch die Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes, welcher mit der DNA reagiert. Diese durch Amplifikation zunehmende Fluoreszenz wird mit einer Kamera im TaqMan-Gerät detektiert und ausgewertet. Je nach Menge der vorhandenen DNA und der damit verbundenen Zunahme der Fluoreszenz wird ein definierter Wert, der  $C_T$ -Wert, erreicht, welcher Aufschluss darüber gibt, wie viele Zyklen der AMplifikation nötig waren, um diesen definierten Schwellenwert zu erreichen.

Zunächst wurden die Probe, der TaqMan-Fast- Master-Mix und entsprechende Sonden langsam auf Eis aufgetaut. Der Probe wurden 180µl steriles Wasser hinzugegeben, sodass ein Verhältnis von 1:10 entstand. Anschließend wurde in jedes Well der Reaktionsplatte ein Mix aus 8µl sterilem Wasser, 1µl Sonde und 10µl des Mastermixes pipettiert. In jedes Well wurde anschließend 1µl der Probe hinzugefügt, sodass in jedem Well 20µl Reaktionslösung waren. Wir haben jeweils pro Probe eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Reaktionsplatte wurde mit einer Folie abgedeckt, zentrifugiert und schließlich ins TaqMan-System gegeben, um nach oben beschriebenem Prinzip analysiert zu werden.

## 4.9 8-oH Desoxyguanosin Färbung

### 4.9.1 Protokoll der Färbung

Als Grundlage für diese Färbung dienten auch hier die seit 24 Stunden rhythmisch und arrhythmisch stimulierten neonatalen Rattenkardiomyozyten in den Sixwells. Zusätzlich gab es noch die Kontrollgruppe, welcher keinerlei Behandlung unterzogen wurde.

1. Tag:

Unmittelbar nach der Stimulierung der wurden die Zellen zweimal für fünf Minuten mit 1xPBS gewaschen. Dafür wurde das 1xPBS vorsichtig auf die Zellen pipettiert, sodass diese vollständig bedeckt waren. Das wurde dann für fünf Minuten stehen gelassen und jeweils abgesaugt. Anschließend benetzten wir die Zellen mit 4% Formalin in 1xPBS für 20 Minuten bei Raumtempertaur. Danach wiederholte sich der erste Schritt, wo die Substanz zweimal für fünf Minuten mit 1xPBS abgewaschen wurde. Von außen wurde auf den Boden mithilfe eines Deckglases mit einem Edding eine kreisrunde Fläche markiert. In dem Sixwell wurde anschließend anhand dieser Linie mit einem Wattestab der Zellrasen entfernt und mit einem Fettstift umfahren. Anschließend wurde der Primärantikörper für das 8-oH-Desoxyguanosin 1:100 in 1xPBS-Tween gelöst und auf der markierten Fläche verteilt mit 100µl pro Sixwell. Die Zellen wurden anschließend über Nacht bei 4°C gelagert.

2. Tag:

Am nächsten Tag wurden die Sixwells über einem 37,5°C warmen Wasserbad für zweieinhalb Stunden erwärmt. Anschließend wurde dreimal für fünf Minuten 1XPBS-Tween auf den Zellen zum Abwaschen aufgetragen. Daraufhin wurde der Sekundärkörper anti-Goat TRITC 1:50 in PBS-Tween gelöst und abermals 100µl pro Well auf der markierten Fläche verteilt. Von diesem Punkt an ist das Ganze vor Licht zu schützen. Die Sixwells wurden nochmals für 40min bei 37,5°C über dem Wasserbad erwärmt. Anschließend wurden die Sixwells mit für dreimal fünf Minuten mit 1xPBS-Tween benetzt und über Nacht bei 4°C gelagert.

3. Tag:

Die Sixwell-Platten wurden wieder bei 37,5°C für zweieinhalb Stunden über dem Wasserbad erwärmt. Anschließend wurden die Wells dreimal für fünf mit Minuten mit 1xPBS-Tween

benetzt. Daraufhin wurde der anti-Mouse IG-M FITC Sekundärantikörper 1:50 in PBS-Tween gelöst und mit jeweils 100µl auf der markierten Fläche verteilt. Die Platten wurden anschließend nochmals für 60min über das Wasserbad bei 37,5°C erwärmt. Im Anschluss wurden die Wells nochmals dreimal für fünf Minuten mit 1xPBS-Tween benetzt. Daraufhin wurde auf der markierten Fläche DAPI für 10 Minuten auf der Fläche verteilt und anschließend einmal mit 1xPBS abgewaschen. Zum Abschluss wurde die markierte Fläche noch „Mountin Medium For Fluorescence Hard Set“ eingedeckt und ein Deckglas daraufgesetzt.

#### **4.9.2 Detektion von Desoxyguanosin**

Mithilfe des Mikroskops wurden in jedem Sixwell drei Blickfelder ausgewählt und die mit Kardiomyozyten bedeckte Fläche berechnet. In dem jeweiligen Blickfeld wurde anschließend die Lichtblende so verändert, dass das rot leuchtende Desoxyguanosin sich darstellte. Dieser rot leuchtende Bereich wurde abermals vermessen und der zuvor bemessenen Gesamtfläche ins Verhältnis gesetzt. Die so gewonnenen Werte konnten wir pro Gruppe auswerten.

#### **4.10 Messung von ROS mittels ESR-Spektroskopie**

Um die Reaktiven Oxygenspezies unmittelbar zu messen, nutzten wir die ESR-Spektroskopie. ESR steht dabei für Elektronenspinresonanz. Prinzip dieser Methode ist es, dass das Absorptionsspektrum von Mikrowellen in einem statischen Magnetfeld gemessen wird. Dazu wird die Probe in einem bestimmten Mikrowellenbereich bestrahlt und im Anschluss die Absorption gemessen. Geeignet sind dafür Substanzen mit freien Radikalen wie ROS.

Zunächst tauten wir ein Aliquot des KHB-Puffers aus, stellten den pH-Wert auf 7,4 ein und filtrierten diesen steril durch einen Filter mit der Porendichte 0,2µm. Mit diesem KHB-Puffer setzten wir die Chelatorenlösung an. Wir lösten 4,6mg DETC und 3,6mg Deferoxamin in jeweils 1ml KHB-Puffer. Schließlich nahmen wir 5000µl KHB-Puffer, verwarfen davon 24µl und fügten dieser 1,2µl der DETC-Lösung und 22,8µl der Deferoxamin-Lösung zu. Nun bereiteten wir die messenden Zellen vor. Dazu saugten wir das Nährmedium von den Zellen ab und wuschen die Reste mit ca. 1ml 1xPBS ab. Nun verteilten wir 700µl Trypsin auf den Zellen und stellten das Well 3min in den Inkubator bei 37°C, um die Zellen vom Sixwell zu lösen. Anschließend pipettierten wir 700µl Nährmedium hinzu, um das Trypsin zu stoppen. Die Zellsuspension pipettierten wir anschließend in 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße.

Anschließend führten wir eine Zellzählung mittel Neugebauer-Zählkammer und Trypan-Blau durch. Die Proben zentrifugierten wir im Anschluss bei 4°C und 14000rpm für 5min. Der Überstand verwarfen wir und lösten das Pellet in 48,5µl Chelatorenlösung. Daraufhin lösten wir 1,6mg CMH in der Chelatorenlösung. Im Anschluss daran begann die eigentliche Messung am Spektroskop. Dazu mischten wir die Probe nochmals vorsichtig mit einer Pipettenspitze. Der Probe fügten wir 1,5µl der angefertigten CMH-Lösung zu. Anschließend befüllten wir eine Kapillare blasenfrei und wischten die Glaskapillare ab. Die Kapillare wurde ins Messgerät gestellt und die Messung gestartet.

#### 4.11 Hydroxyprolin-Assay

Für die Messung der Hydroxyprolin-Konzentration in unserem Co-Kulturmodell verwendeten wir das Assay-Kit von Quickzyme Biosciences und führten die Messung nach der Protokoll durch. Nach der Stimulation pipettierten wir das Medium in die mitgelieferten Filterunits. Diese wurden bei 4000rpm für 18min zentrifugiert. Das konzentrierte Medium befand sich über dem Filter. Der Rest wurde verworfen. Anschließend führten wir eine Proteinbestimmung durch. Für die Hydrolyse pipettierten wir 60µl des konzentrierten Mediums und 60µl der Sircol Assay Control zusammen und fügten diesem Gemisch 60µl von 37%igem HCL zu. Dieses wurde unter dem Abzug für 20 Stunden bei 96°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde als Bezug eine Standardreihe pipettiert:

	<b>Probe von</b>	<b>4M HCL</b>	<b>Konzentration</b>
<b>S1</b>	30µl Stock	270µl	300
<b>S2</b>	120µl S1	60µl	200
<b>S3</b>	45µl S1	45µl	150
<b>S4</b>	90µl S2	90µl	100
<b>S5</b>	90µl S4	90µl	50
<b>S6</b>	90µl S5	90µl	25
<b>S7</b>	90µl S6	90µl	12,5
<b>S8</b>	0	90µl	0

Die Proben wurden nach der Hydrolyse auf Eis abgekühlt und anschließend 10min bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße abpipettiert. Anschließend wurden jeweils zweimal 35µl pro Probe für eine Doppelbestimmung in das Well der Reaktionsplatte pipettiert. Pro Well wurden 75µl des Assay Buffers hinzugefügt. Um das zu mischen wurde die Reaktionsplatte 20min bei Raumtemperatur auf den ELISA Schüttler bei einer Geschwindigkeit von 350 gestellt.

Anschließend wurde jedem Well 75µl Detectionsreagenz hinzugefügt. Diese wurde aus 30µl Reagenz A und 45µl Reagenz B hergestellt. Die Proben wurden anschließend nochmals für eine Stunde bei 60°C im Wärmeschrank inkubiert. Daraufhin wurde die Reaktionsplatte auf Eis abgekühlt. Anschließend fand die photometrische Messung bei 570nm im ELISA-Reader statt.

#### **4.12 Hyaluronsäure-Assay**

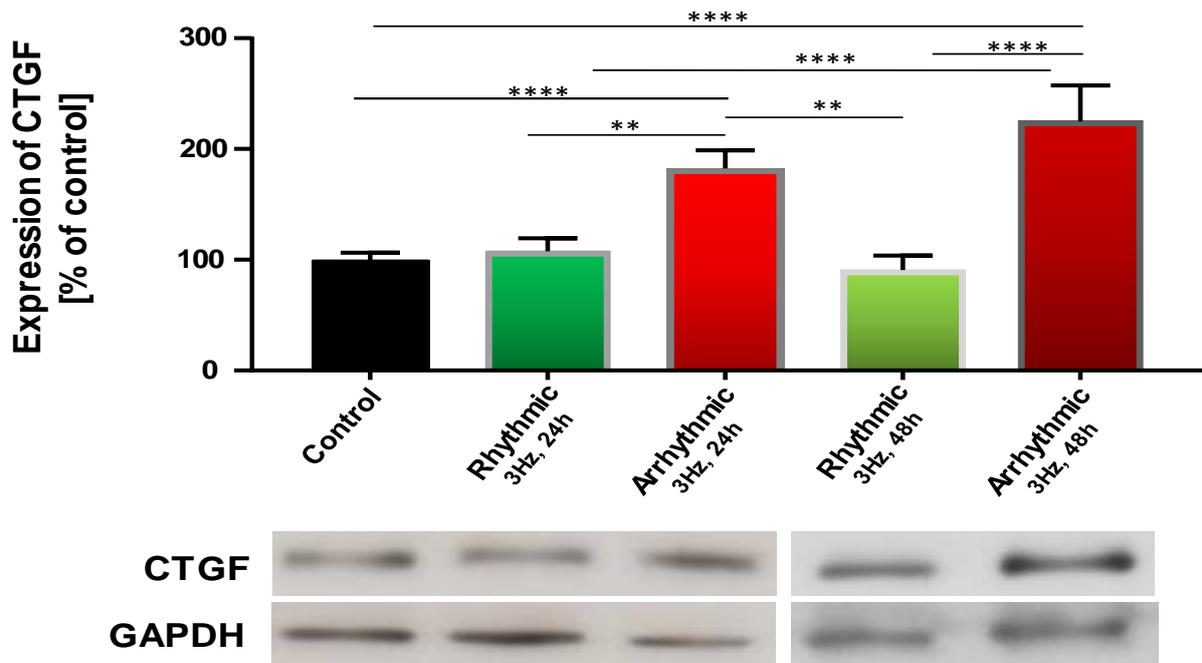
Für die Messung der Hyaluronsäure-Konzentration in unserem Co-Kulturmodell nutzten wir das Hyaluronsäure-Kit von Corgenix und führten die Messung nach deren Protokoll durch. Das Kit benutzte ein Bindemolekül mit dem Namen hyaluronic acid binding protein (HABP). In den Mikrowells reagierte die in unserem Medium der Co-Kultur enthaltene Hyaluronsäure mit dem HABP. Durch Waschschrte und die Zugabe von chromogenen Substraten wie Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid kam es zu einer Farbreaktion, welche je nach Konzentration der in der Probe enthaltenen Hyaluronsäure entsprechend stark ausfiel. Die Intensität der Farbe konnte photometrisch bei 450nm quantifiziert werden und in Relation zur Referenzkurve berechnet werden.

## **5 Ergebnisse**

### **5.1 Regulierung von CTGF unter Arrhythmie**

#### **5.1.1 Arrhythmie steigert die Expression von CTGF nach 24 Stunden und 48 Stunden Stimulierung**

Als Grundlage für die Ergebnisse dienten die von uns stimulierten Rattenkardiomyozyten. Dabei verglichen wir eine rhythmisch und eine arrhythmisch stimulierte Gruppe, welche sich aber explizit nicht in ihrer Frequenz unterschieden. Als erstes untersuchten wir den Einfluss der arrhythmischen Stimulierung auf die Expression von CTGF, welcher sich als einer der zentralen Mediatoren in der Pathogenese der Fibrose darstellt, in einer Western Blot Analyse. Nach 24 Stunden Stimulierung zeigte sich ein Anstieg der Expression unter arrhythmischer Stimulierung auf  $182 \pm 16\%$  ( $p < 0,01$ ). Wir haben daraufhin die Zellen 48 Stunden lang stimuliert, um zu schauen wie sich CTGF Expression dort unter rhythmischer und arrhythmischer Stimulierung verhält. Unter rhythmischer Stimulierung veränderte sich die Expression nicht im Vergleich zu der 24 stündigen Stimulierung. Unter arrhythmischer Stimulierung stieg die Expression auf  $223 \pm 32\%$  ( $p < 0,0001$ ). Dies war der rhythmischen Gruppe gegenüber signifikant. Gegenüber den 24 Stunden arrhythmisch stimulierten Zellen gab es keinen signifikanten Unterschied. Allerdings ist der Trend weiter ansteigend.

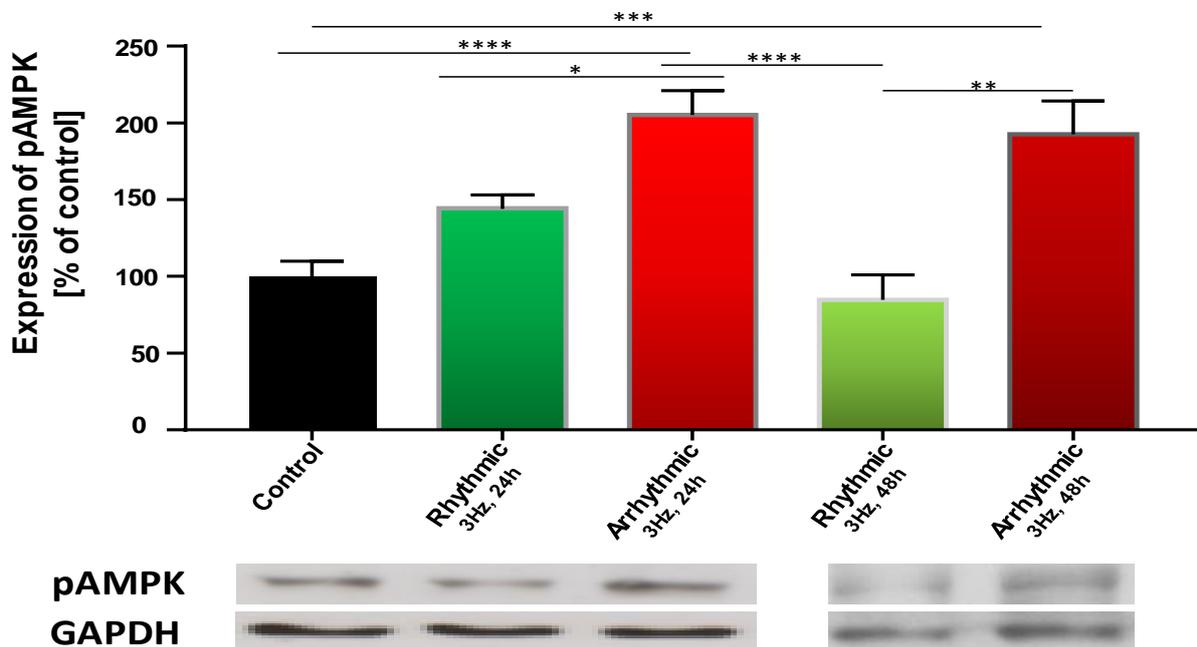


**Abb. 2: Effekt rhythmischer und arrhythmischer Stimulierung auf die Expression von CTGF in neonatalen Rattenkardiomyozyten nach 24 und 48 Stunden.** Western Blot Analyse von Connective Tissue Growth Factor (CTGF) in rhythmisch und arrhythmisch stimulierten Kardiomyozyten nach 24 und 48 Stunden. Es zeigt sich eine gesteigerte Expression von CTGF unter arrhythmischer Stimulierung im Vergleich zu Rhythmischer nach 24 Stunden. Nach 48 Stunden Stimulierung steigt die Expression von CTGF unter Arrhythmie weiter an. Rhythmische Stimulierung hat auch nach 48 Stunden keinen Einfluss auf die Expression. 24h Stimulierung: n=40 Control, (n=15) Rhythmic (n=13) und Arrhythmic (n=12). 48h Stimulierung: n=18 Control (n=6), Rhythmic (n=6) und Arrhythmic (n=6). \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 \*\*\*\*p<0,0001.

### 5.1.2 Arrhythmische Stimulierung führt zu einer stärkeren Expression von pAMPK nach 24 und 48 Stunden

Im nächsten Schritt untersuchten wir die phosphorylierte AMP-aktivierte Kinase als Marker für den Energiehaushalt der Kardiomyozyten und als Regulator von CTGF. In der Western Blot Analyse zeigte sich ein signifikanter Anstieg der pAMPK nach 24 Stunden Stimulierung gegenüber der rhythmischen Stimulierung auf  $205 \pm 16\%$  ( $p < 0,05$ ). Der Effekt der erhöhten pAMPK-Expression bleibt auch nach 48 Stunden arrhythmischer Stimulierung mit  $192 \pm 21\%$

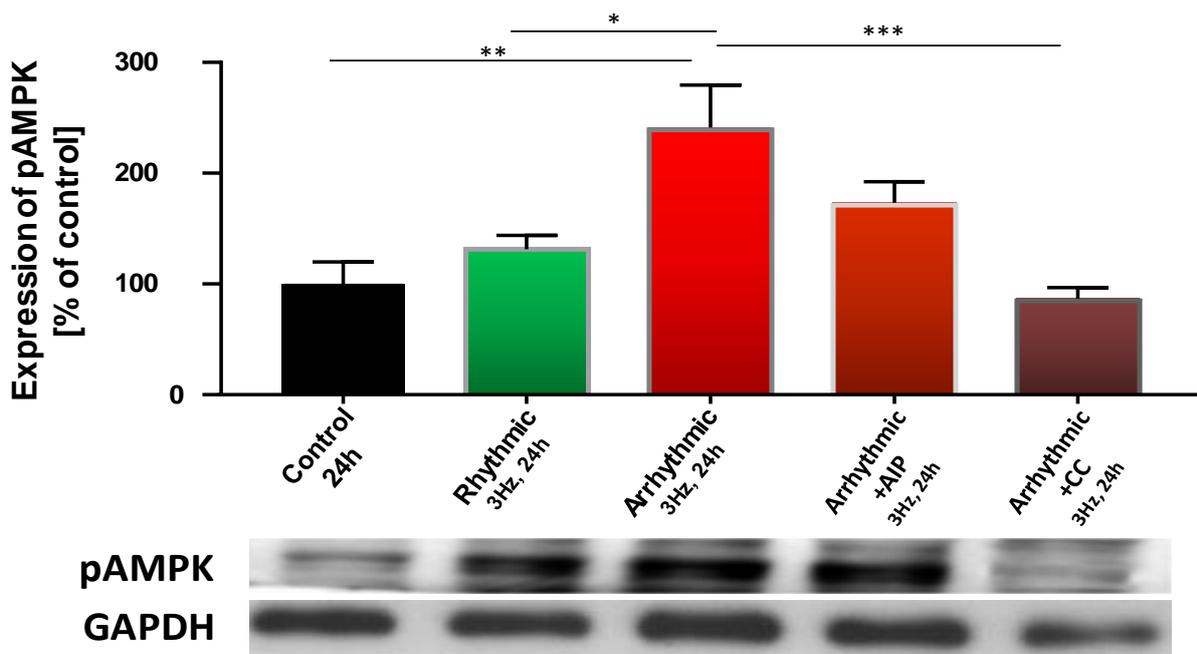
( $p < 0,01$ ) bestehen. Genau wie bei CTGF führt eine 48 stündige rhythmische Stimulierung der Kardiomyozyten nicht zu einer Erhöhung der pAMPK-Expression.



**Abb. 3: Effekt rhythmischer und arrhythmischer Stimulierung auf die Expression von pAMPK nach 24 und 48 Stunden in neonatalen Kardiomyozyten.** Western Blot Analyse und Quantifizierung der Phosphorylierung der AMP aktivierten Kinase (pAMPK) nach rhythmischer und arrhythmischer Stimulierung der Kardiomyozyten. Es zeigt sich nach 24 Stunden eine Steigerung der Expression der phosphorylierten AMPK nach arrhythmischer Stimulierung im Vergleich zu rhythmischer Stimulierung. Auch nach 48 stündiger arrhythmischer Stimulierung bleibt dieser Effekt bestehen. Auch die 48 stündige rhythmische Stimulierung führt zu keiner höheren Expression. 24h Stimulierung: n=38 Control (n=13), Rhythmisch (n=13) und Arrhythmisch (n=12). 48h Stimulierung: n=18 Control, (n=6) Rhythmic und (n=6) Arrhythmic (n=6). \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### 5.1.3 Unter Behandlung mit Compound C kommt es zu einer verminderten pAMPK Expression

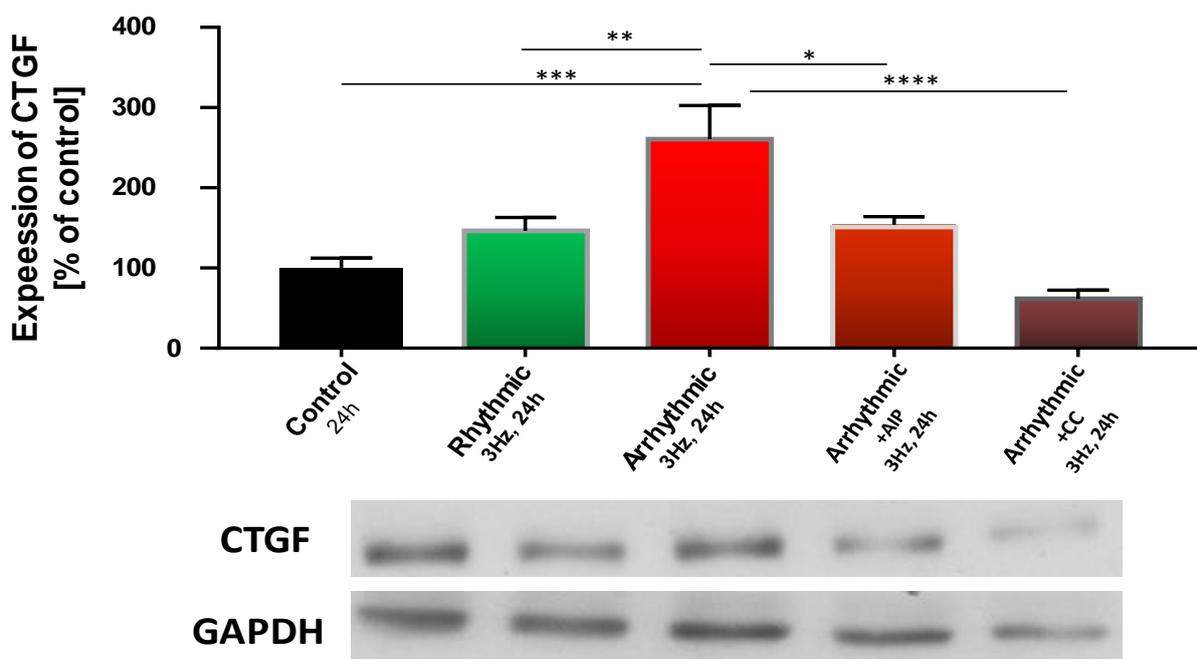
Aus der Literatur ist bekannt, dass Compound C ein Inhibitor der pAMPK Expression ist. Auch in unserem Kardiomyozytenmodell führte die Behandlung der Zellen mit Compound C und gleichzeitiger arrhythmischer Stimulierung zu einer signifikant verminderten Expression von pAMPK. Als Kontrolle für die erfolgreiche Stimulierung in dieser Versuchsreihe konnten wir wiederholt einen Anstieg der pAMPK Expression auf  $241 \pm 38\%$  ( $*p < 0,05$ ) feststellen. Unter Behandlung der Zellen mit Compound C und arrhythmischer Stimulierung war lediglich eine pAMPK Expression von  $94 \pm 9\%$  ( $***p < 0,001$ ) zu messen. Auch die Behandlung mit dem CamKinase II Inhibitor AIP und arrhythmischer Stimulierung führt zu einer verminderten Expression von pAMPK auf  $173 \pm 18\%$  ( $p > 0,05$ ). Dies war aber nicht signifikant im Vergleich zur rein arrhythmisch stimulierten Gruppe.



**Abb. 4** Effekt arrhythmischer Stimulierung von neonatalen Rattenkardiomyozyten auf die Phosphorylierung von AMP aktivierter Kinase (pAMPK) im Vergleich mit arrhythmisch und zusätzlich mit AIP bzw. Compound C behandelten Zellen. Arrhythmisch stimulierte Zellen, welche gleichzeitig mit AIP (10 $\mu$ l) oder Compound C (10 $\mu$ l) behandelt wurden, zeigen keine verstärkte Phosphorylierung der AMPK im Gegensatz zu den rein arrhythmisch stimulierten Zellen. n=38 Control (n=7), Rhythmic (n=8), Arrhythmic (n=8), Arrhythmic + AIP (n=8), Arrhythmic + CC (n=8)  $*p < 0,05$   $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$

### 5.1.4 Unter Arrhythmie und Behandlung mit AIP oder CC kommt es zu einer Suppression der CTGF Expression

Mit den gleichen Zellen aus Abbildung 4 haben wir die CTGF Expression unter Behandlung mit Compound C und AIP und gleichzeitiger arrhythmischer Stimulierung gemessen. Unter reiner arrhythmischer Stimulierung zeigte sich eine Expression von  $236 \pm 43\%$  ( $p < 0,01$ ), was als Kontrolle für den Erfolg der Stimulierung gesehen werden kann. Wird die CamKinase II nun mit AIP inhibiert kommt es trotz arrhythmischer Stimulierung nur zu einer Expression von  $154 \pm 9\%$  ( $p < 0,05$ ) an CTGF. Als wir die Kardiomyozyten mit dem pAMPK-Inhibitor Compound C behandelten, konnten wir trotz arrhythmischer Stimulierung eine CTGF Expression von lediglich  $83 \pm 10\%$  ( $p < 0,0001$ ) messen. Sowohl die Gruppe der AIP-behandelten als auch die Gruppe mit Compound C-behandelten Zellen zeigten eine signifikant erniedrigte Expression von CTGF.

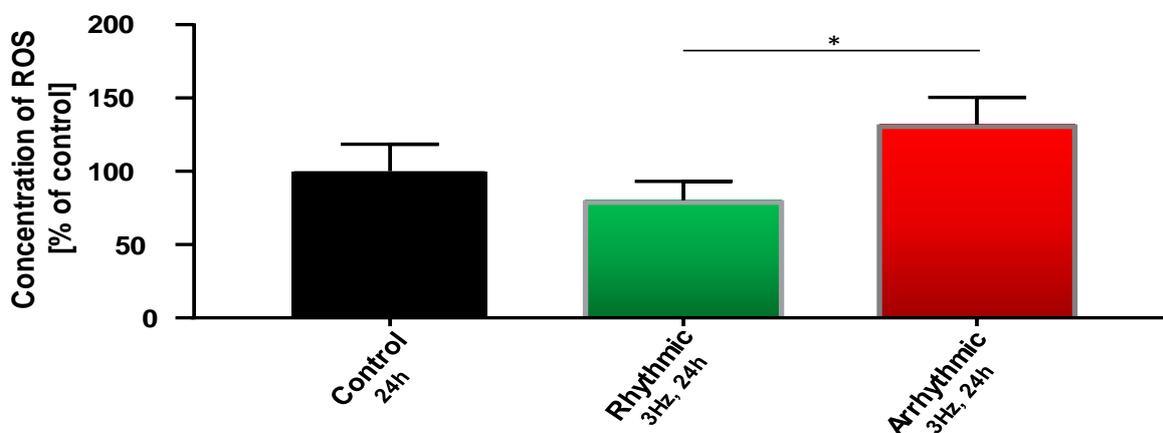


**Abb. 5: Effekt arrhythmischer Stimulierung neonataler Rattenkardiomyozyten nach 24 Stunden mit AIP- oder Compound C-Behandlung auf die Expression von CTGF im Vergleich zu rhythmischer Stimulierung.** Western Blot Analyse zur Expression von CTGF. Während unter reiner arrhythmischer Stimulierung die CTGF Expression ansteigt, bleibt dieser Effekt bei arrhythmisch stimulierten und mit entweder AIP (10 $\mu$ l) oder Compound C (10 $\mu$ l) behandelten Zellen aus. n=35, Control n=7, Rhythmic n=7, Arrhythmic n=6, Arrhythmic + AIP n=8 und Arrhythmic + CC n=7 \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

## 5.2 Oxidativer Stress unter Arrhythmie

### 5.2.1 Arrhythmie führt zur verstärkten Entstehung von reaktiven Oxygenspezies

24 stündige arrhythmische Stimulierung der Kardiomyozyten führt zur verstärkten Produktion reaktiver Oxygenspezies (ROS). Unter arrhythmischer Stimulierung steigt die Konzentration auf  $131 \pm 18\%$ , während die Messungen unter rhythmischer Stimulierung nur eine Konzentration von  $80 \pm 13\%$  ergeben hat.

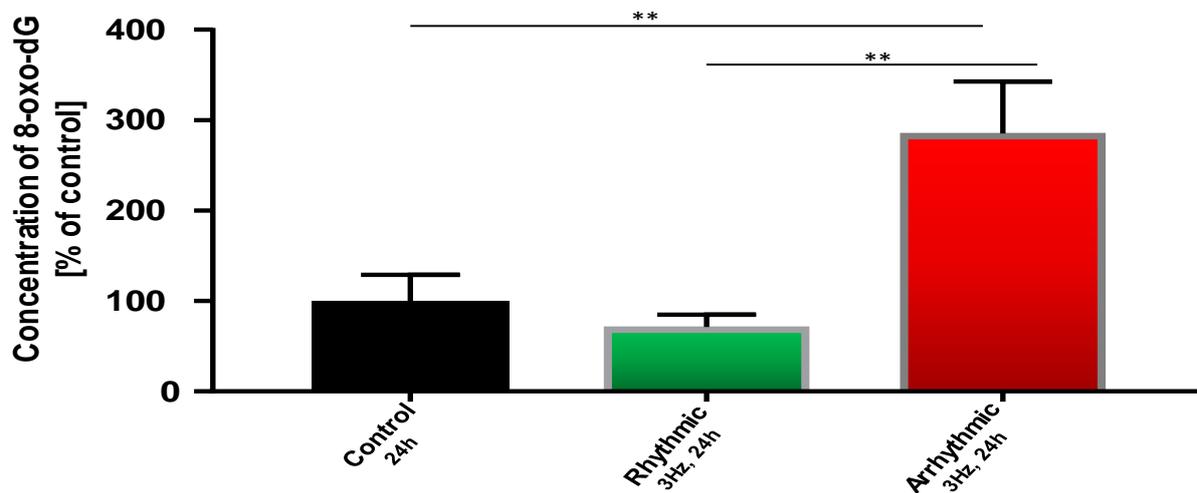


**Abb. 6: Effekt rhythmischer und arrhythmischer Stimulierung nach 24 Stunden auf die Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in neonatalen Rattenkardiomyozyten.** Es wurde die Konzentration von ROS mittel ESR Spektroskopie nach Stimulierung der Kardiomyozyten gemessen. Arrhythmische Stimulierung der Kardiomyozyten führt zu einer stärkeren Expression von reaktiven Sauerstoffspezies im Vergleich zu rhythmischer Stimulierung. n=36 Control (n=12), Rhythmic (n=12), Arrhythmic (n=12) \*p<0,05.

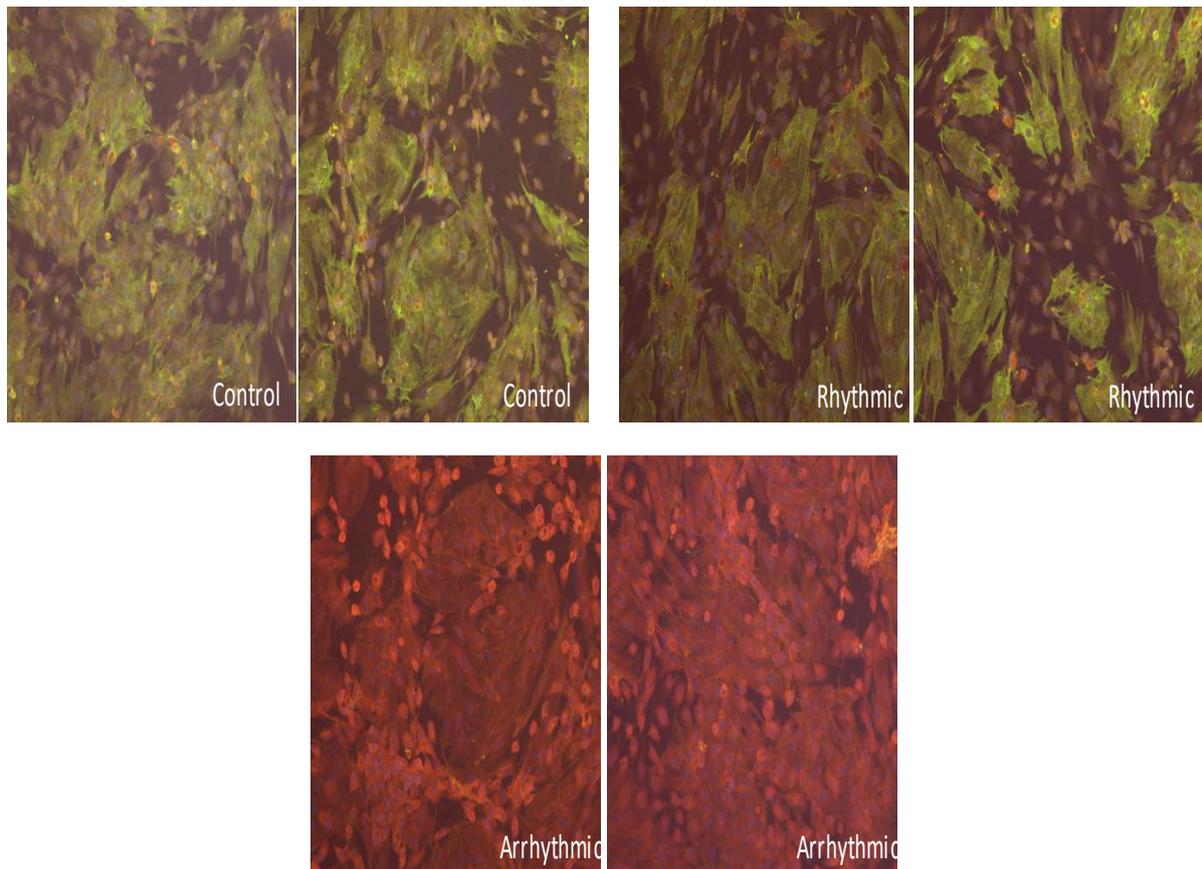
### 5.2.2 Arrhythmische Stimulierung führt zu verstärkter Konzentration von Desoxyguanosin

Im Weiteren untersuchten wir die oxygenierte Form des Deoxyguanosin als Marker für die Beschädigung durch oxidativen Stress und die Effizienz der antioxidativen Reparatursysteme.

Dazu führten wir eine Färbung des 7,8-Dihydro-8-oxo-deoxy-Guanosin durch. Dabei zeigte sich eine signifikante Steigerung der rot angefärbten Bereiche im Sichtfeld, was das Desoxyguanosin anzeigt. Unter Arrhythmie kam es zu einem Anstieg auf  $285 \pm 57\%$  ( $p < 0,01$ ), während die rhythmische Stimulierung mit  $76 \pm 13\%$  keine signifikante Veränderung der Konzentration zeigte.



**Abb. 7: Effekt von rhythmischer und arrhythmischer Stimulierung auf die Expression von 7,8-Dihydro-8-oxo-deoxy-Guanosin (8-oxo-dG) in neonatalen Rattenkardiomyozyten.** 8-oxo-dG Färbung von Kardiomyozyten nach 24 stündiger rhythmischer und arrhythmischer Stimulierung. Die arrhythmische Stimulierung führte zu einer deutlich erhöhten Expression von Dehydroxyguanosin im Vergleich zur rhythmischen Stimulation. n=47 Kontrolle (n=11), Rhythmic (n=12) und Arrhythmic (n=12) \*\* $p < 0,01$

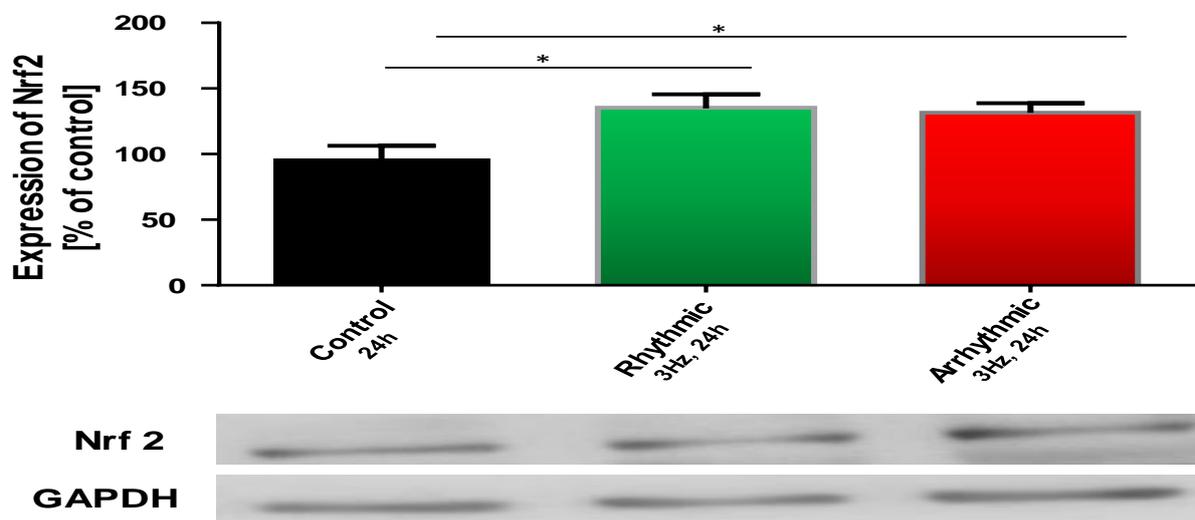


**Abb. 8: Beispielbilder der 7,8-Dihydro-8-oxo-deoxy-Guanosin-Färbung für die Kontrollgruppe, die rhythmische und die arrhythmische Gruppe.** Das Desoxyguanosin wird in der Färbung rot angefärbt. Unter rhythmischer Stimulation zeigt sich ein ähnliches Bild wie in der Kontrollgruppe. Es ist kaum Desoxyguanosin vorhanden. Unter rhythmischer Stimulierung kommt es allerdings zu einer verstärkten Konzentration des Desoxyguanosins, welches zu der starken roten Färbung führt.

## 5.3 Die antioxidativen Systeme der Zelle unter Arrhythmie

### 5.3.1 Arrhythmische Stimulierung hat keinen Einfluss auf die Expression von Nrf2

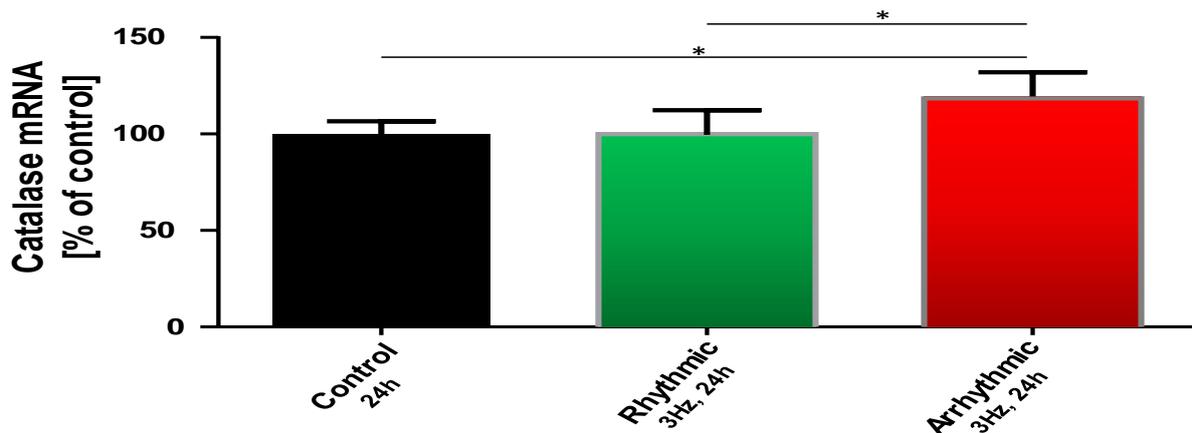
Als nächsten Schritt untersuchten wir, ob die antioxidativen Systeme der Kardiomyozyten aktiviert werden. Dafür untersuchten wir zunächst Nrf2 als einen den antioxidativen Systemen übergeordneten Transkriptionsfaktor. In der durchgeführten Western Blot Analyse zeigte sich allerdings kein Unterschied zwischen der rhythmisch und arrhythmisch stimulierten Gruppe.



**Abb. 9: Effekt von rhythmischer und arrhythmischer Stimulation nach 24 Stunden auf die Expression von Nrf 2 in Kardiomyozyten.** Western Blot Analyse zur Expression von Nrf 2 nach rhythmischer und arrhythmischer Stimulation. Die arrhythmische Stimulation der Kardiomyozyten führte zu keiner verstärkten Expression von Nrf 2 im Vergleich zur rhythmischen Stimulation. n=42 Control (n=14) Rhythmic (n=14) und Arrhythmic (n=14) \*p<0,05

### 5.3.2 Arrhythmie führt zu einer erhöhten mRNA-Expression der Katalase

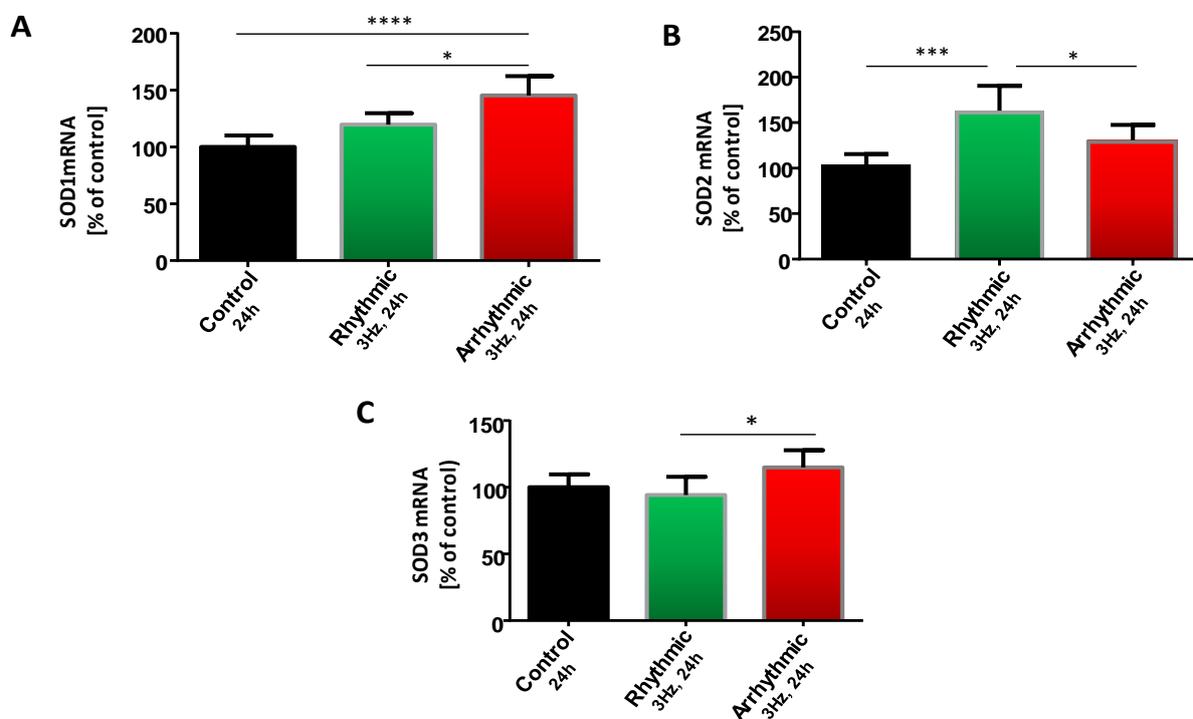
Als eins der potentesten antioxidativen Enzyme untersuchten wir die Katalase in einer RT-PCR Analyse hinsichtlich ihrer Konzentration nach 24 stündiger arrhythmischer Stimulierung. Im Vergleich zur rhythmisch stimulierten Gruppe zeigte sich eine signifikant gesteigerte Konzentration der Katalase auf  $119 \pm 6,2\%$  (\* $p < 0,05$ ).



**Abb. 10: Effekt arrhythmischer Stimulierung auf die mRNA-Expression von Katalase in neonatalen Rattenkardiomyozyten.** RT-PCR Messung zur mRNA-Konzentration von Katalase nach rhythmischer und arrhythmischer Stimulierung. Unter Arrhythmie kommt es zur Erhöhung der Katalase-Expression auf RNA Level im Vergleich zu rhythmischer Stimulierung. n=18 Control (n=6) Rhythmic (n=6) und Arrhythmic (n=6). \* $p < 0,05$

### 5.3.3 Die arrhythmische Stimulierung beeinflusst die mRNA Konzentration der Superoxiddismutase

Um die entstandenen Oxidradikale in den verschiedenen Kompartimenten der Zelle abzubauen, gibt es die Superoxiddismutase 1-3. Durch die arrhythmische Stimulierung kommt es zu einer signifikant höheren mRNA Konzentration der SOD1 auf  $145 \pm 7\%$  ( $p < 0,05$ ). Ebenfalls war die SOD3 unter arrhythmischer Stimulierung erhöht auf  $114 \pm 5\%$  ( $p < 0,05$ ) erhöht. Die rhythmische Stimulierung führte hingegen als antioxidatives System zu einer Erhöhung der SOD2 im Vergleich zur arrhythmischen Gruppe auf  $163 \pm 20\%$  ( $p < 0,05$ ) während in der Gruppe der arrhythmischen Stimulierung nur eine Konzentration von  $135 \pm 7\%$  ( $p < 0,05$ ) zu messen war.

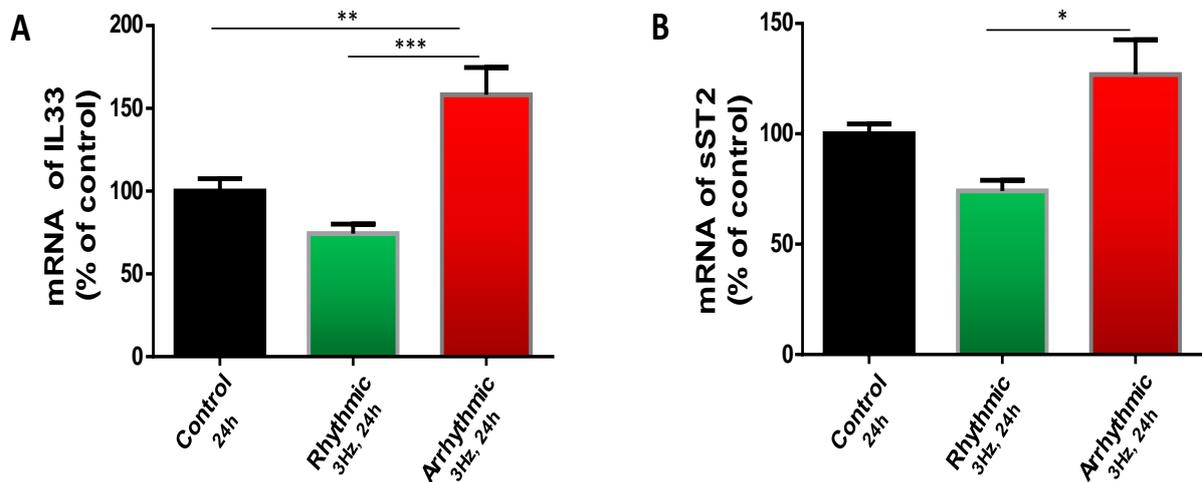


**Abb. 11: Effekt rhythmischer und arrhythmischer Stimulierung auf die Expression von Superoxiddismutase 1 (A), 2 (B) und 3 (C) nach 24 stündiger Stimulierung von neonatalen Rattenkardiomyozyten.** RT-PCR Messung zur Expression von Superoxiddismutasen auf RNA Level. Arrhythmie führt zur stärkeren Expression von SOD1 und SOD3. Dieser Effekt bleibt unter rhythmischer Stimulierung aus. Rhythmische Stimulierung führt allerdings zu einer gesteigerten RNA Expression der SOD2. Jeweils  $n=18$  Control ( $n=6$ ) Rhythmic ( $n=6$ ) Arrhythmic ( $n=6$ ). \* $p < 0,05$  \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

## 5.4 Einfluss von ST2/IL-33 auf die Fibrogenese

### 5.4.1 Arrhythmische Stimulierung führt zu einer Konzentrationserhöhung der mRNA von sST2 und IL-33

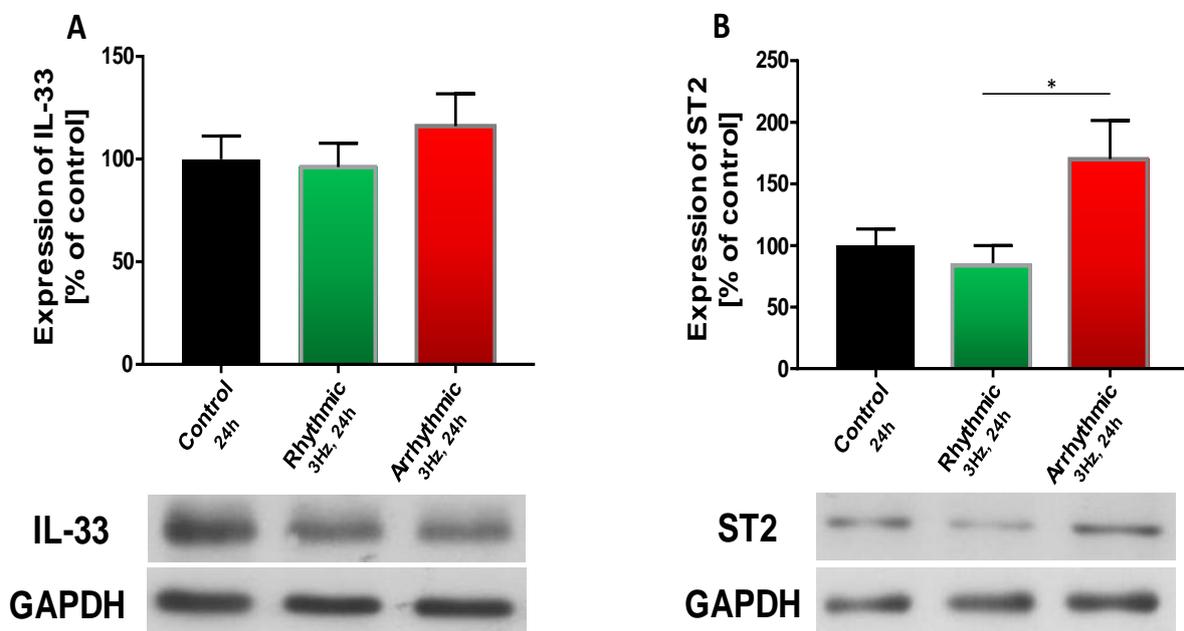
Die Interaktion von IL-33 und ST2 wird als wichtiger Regulatorprozess der Fibrogenese angesehen. In unserem Modell zeigte sich unter arrhythmischer Stimulierung sowohl eine mRNA-Konzentrationserhöhung von IL-33 als auch von sST2. So stieg die Konzentration der mRNA von IL-33 auf  $158 \pm 16\%$  ( $p < 0,01$ ) und die Konzentration von sST2 signifikant auf  $126 \pm 15\%$  ( $p < 0,05$ ) an.



**Abb. 12: Effekt rhythmischer und arrhythmischer Stimulierung auf die Expression von IL33 (A) und sST2 (B) in neonatalen Rattenkardiomyozyten.** Quantifizierung von IL33 (A) und sST2 (B) in einer RT-PCR. Arrhythmisch stimulierte Zellen exprimieren vermehrt IL33 im Vergleich zu rhythmisch stimulierten Zellen und den Kontrollen (A). Gleichzeitig erhöht Arrhythmie ebenfalls die RNA-Konzentration von sST2. n=17 Control(n=6), Rhythmic (n=5), Arrhythmic (n=6) \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

#### 5.4.2 Arrhythmische Stimulierung führt zu einer Erhöhung der Proteinexpression von ST2 aber nicht von IL-33

Zusätzlich zur RNA-Konzentration von sST2 und IL-33 untersuchten wir die Proteinexpression von IL-33 und ST2 in einer Western Blot Analyse. Dabei zeigte sich unter arrhythmischer Stimulierung eine signifikante Steigerung der ST2 Expression auf  $170 \pm 31\%$  ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur rhythmischen Stimulierung (B). Während es unter arrhythmischer Stimulierung noch zu einer signifikant höheren Konzentration der IL-33 mRNA kam (siehe Abb. 12) zeigte sich in der Western Blot Analyse und Messung der direkten Proteinexpression von IL-33 keine signifikant stärkere Expression.



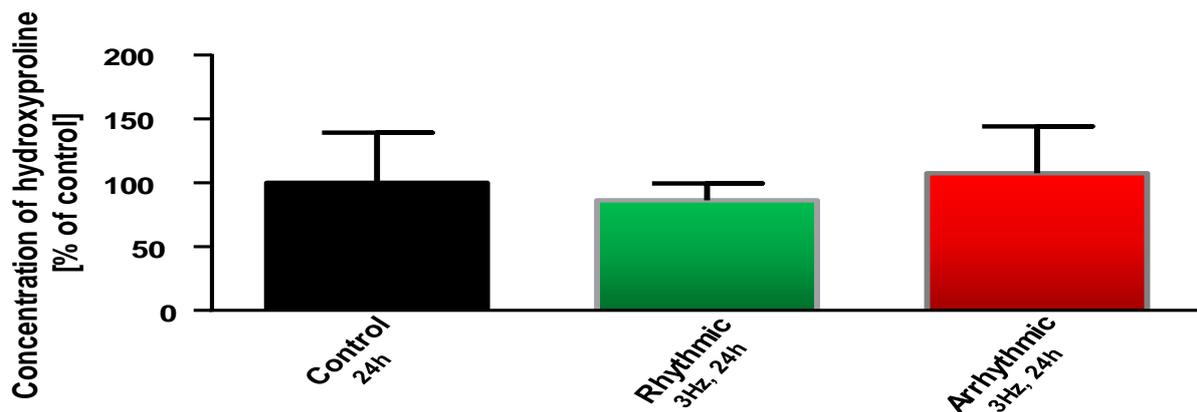
**Abb. 13: Effekt rhythmischer und arrhythmischer Stimulierung auf die Proteinexpression von IL-33 (A) und ST2 (B) nach 24 stündiger Stimulierung in neonatalen Rattenkardiomyozyten.** Western Blot Analyse zur Proteinexpression von IL-33 und ST2 nach 24 stündiger rhythmischer und arrhythmischer Stimulierung. Nach 24 Stunden zeigt sich keine signifikante Steigerung der IL-33 Expression unter arrhythmischer Stimulierung (A). Das Gesamtprotein ST2 hingegen ist unter arrhythmischer Stimulierung gegenüber der rhythmischen Stimulierung signifikant gesteigert (B). A n=31 Control (n=10), Rhythmic (n=11), Arrhythmic (n=10), B n=32 Control (n=11), Rhythmic (n=10) und Arrhythmic (n=11), \* $p < 0,05$

## 5.5 Einfluss der Arrhythmie auf direkte Fibroseparameter

Des Weiteren untersuchten wir direkte Parameter, welche eine mögliche Fibrosesteigerung anzeigen und einen direkten Umbau der Extrazellulärmatrix (ECM) bedingen.

### 5.5.1 Arrhythmie führt nicht zu einer Erhöhung der Hydroxyprolinkonzentration

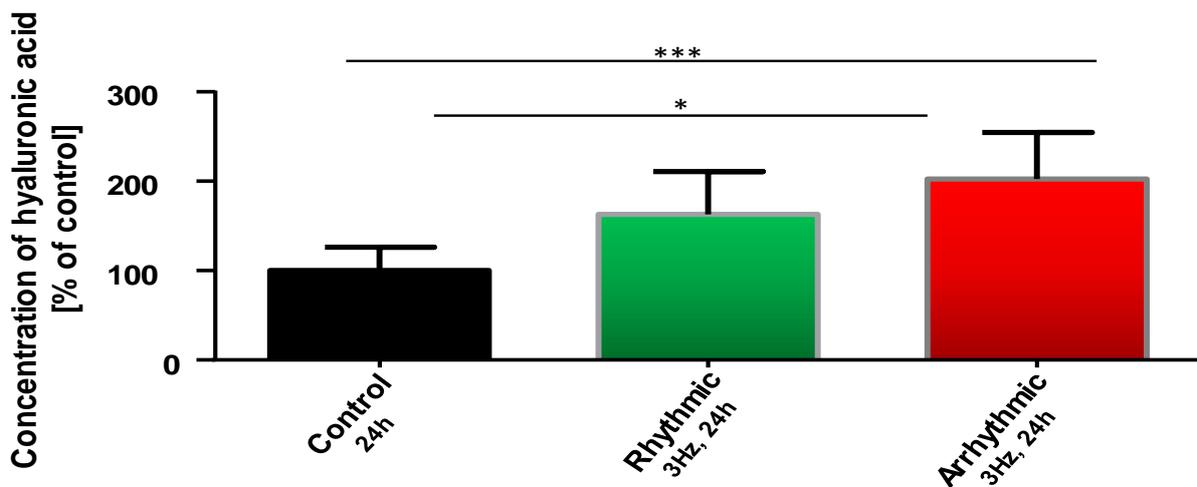
Hydroxyprolin wird in das Kollagen eingebaut, welches ein wichtiger Bestandteil der ECM ist. In dem von uns durchgeführten Hydroxyprolinassay konnten wir keine Steigerung der Konzentration im Medium unter Arrhythmie nachweisen.



**Abb. 14: Hydroxyprolinkonzentration im Medium von rhythmisch und arrhythmisch stimulierten neonatalen Rattenkardiomyozyten nach 24 Stunden.** Quantifizierung durch einen Hydroxyprolinassay. Unter Arrhythmie kam es zu keiner signifikanten Steigerung der Hydroxyprolinbildung. n=27, Control (n=9), Rhythmic (n=9) und Arrhythmic (n=9).

### 5.5.2 Arrhythmie beeinflusst nicht die Konzentration von Hyaluronsäure

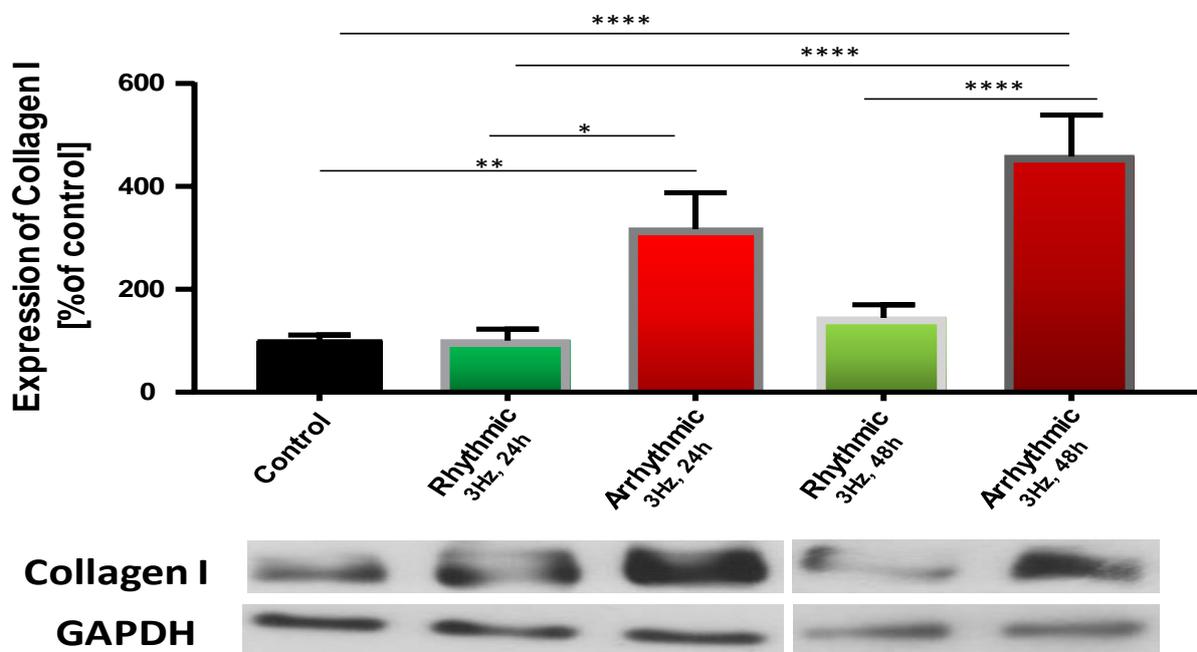
Als wichtigen Bestandteil der ECM untersuchten wir die Hyaluronsäurekonzentration nach 24 stündiger arrhythmischer Stimulierung im Vergleich zu rhythmischer Stimulierung. Dort ließ sich kein signifikanter Anstieg der Konzentration darstellen.



**Abb. 15: Hyaluronsäurekonzentration im Serum unter rhythmischer und arrhythmischer Stimulierung nach 24 Stunden in neonatalen Rattenkardiomyozyten.** Quantifizierung mittels Hyaluronsäureassay. Arrhythmie führt nicht zu einer stärkeren Konzentration von Hyaluronsäure als rhythmische Stimulierung. n=27, Control (n=9), Rhythmic (n=9) und Arrhythmic (n=9) \*p<0,05, \*\*\*p<0,001

### 5.5.3 Unter arrhythmischer Stimulierung kommt es zu einer Steigerung der Kollagen I Expression

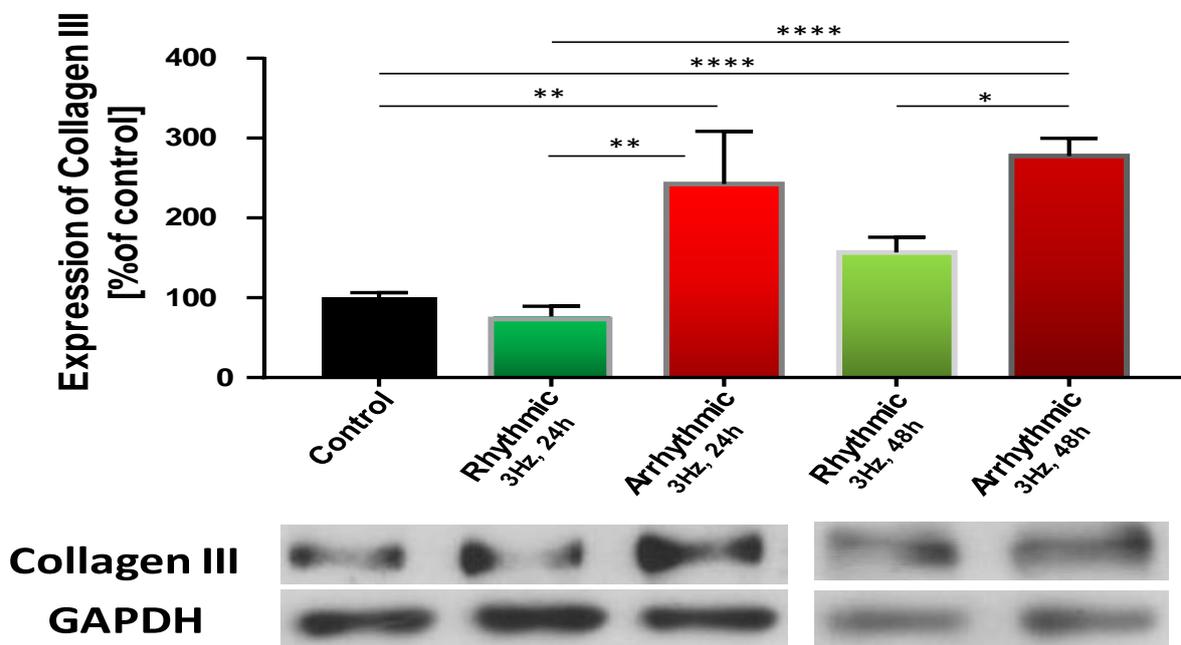
Als wichtigsten Parameter der Fibrose schauten wir uns die Kollagen Expression im Co-Kultur Modell an. Dort zeigte sich eine Steigerung der Kollagen I Expression bereits nach 24 Stunden auf  $317 \pm 70\%$  ( $p < 0,05$ ), während die rhythmische Stimulierung keinen Effekt zeigte. Im Verlauf untersuchten wir die rhythmische und arrhythmische Stimulierung der Kardiomyozyten nach 48 Stunden. Dabei zeigte sich ebenfalls, dass arrhythmische Stimulierung zu einer signifikant, verstärkten Expression führt mit einer Steigerung auf  $458 \pm 81\%$  ( $p < 0,0001$ ). Auch hier hatte die rhythmische Stimulierung keinen Einfluss.



**Abb. 16: Effekt rhythmischer und arrhythmischer Stimulierung neonataler Rattenkardiomyozyten nach 24 und 48 Stunden auf die Expression von Kollagen I.** In der Western Blot Analyse zeigt sich nach 24 Stunden arrhythmischer Stimulierung eine deutlich erhöhte Expression von Kollagen I im Vergleich zu rhythmischer Stimulierung. Auch nach 48 Stunden Stimulierung bleibt die erhöhte Expression unter arrhythmischer Stimulierung bestehen.  $n=49$ , Control ( $n=18$ ), Rhythmic 24h ( $n=7$ ), Arrhythmic 24h ( $n=7$ ), Rhythmic 48h ( $n=9$ ) und Arrhythmic 48h ( $n=8$ ) \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

#### 5.4.4 Arrhythmie führt zu einer Steigerung der Kollagen III Expression

Als zweiten wichtigen Vertreter der Kollagene der myokardialen Fibrose untersuchten wir das Kollagen III in seiner Expression in einer Western Blot Analyse. Dabei zeigte sich unter arrhythmischer, 24 stündiger Stimulierung eine signifikante Steigerung der Expression auf  $242 \pm 65\%$  ( $p < 0,01$ ) gegenüber der rhythmischen Stimulierung. Des Weiteren schauten wir uns die Expression nach 48 Stunden Stimulierung an. Unter Arrhythmie zeigte sich eine signifikante Steigerung der Expression auf  $277 \pm 22\%$  ( $p < 0,05$ ). Dementsprechend war auch die Steigerung nach 48 stündiger arrhythmischer Stimulierung gegenüber den 24 Stunden rhythmischer Stimulierung signifikant.



**Abb. 17: Effekt rhythmischer und arrhythmischer Stimulierung auf die Expression von Kollagen III in neonatalen Rattenkardiomyozyten nach 24 und 48 Stunden.** In der Western Blot Analyse zeigt sich bereits nach 24 Stunden unter arrhythmischer Stimulierung eine deutliche Erhöhung der Expression von Kollagen III im Vergleich zur rhythmischen Stimulierung. Nach 48 Stunden Stimulierung steigt die Kollagen III Expression weiter an. Control (n=17), Rhythmic 24h (n=7), Arrhythmic 24h (n=7), Rhythmic 48h (n=8) und Arrhythmic 48h(n=9) \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

## **6 Diskussion**

Vorhofflimmern als häufigste arrhythmogene Herzerkrankung hat einen großen, negativen Einfluss auf die Lebensqualität der Patienten. Diese negative Beeinflussung resultiert unter anderem aus einer Herzinsuffizienz, welche im weiteren Verlauf des Vorhofflimmerns bei einem Großteil der Patienten entstehen kann <sup>58</sup>. Dieser Pathomechanismus ist seit vielen Jahren bekannt. Grundlage für die Herzinsuffizienz sind neben anderen Gründen die fibrotischen Umbauprozesse, welche im Myokard des Herzens in Folge des Vorhofflimmerns stattfinden. Der Einfluss der Arrhythmie beim Vorhofflimmern auf die profibrotische Signaltransduktion und seine Einflussfaktoren ist noch nicht vollständig verstanden.

Wir untersuchten den Einfluss der Arrhythmie auf die profibrotische Signaltransduktion mit seinen Einflussfaktoren unabhängig von der Frequenz. Dies war uns möglich durch ein Zellkulturmodell mit neonatalen Rattenkardiomyozyten. Unsere Untersuchungsgruppen bestanden aus einer rhythmisch stimulierten Gruppe und einer arrhythmisch stimulierten Gruppe von neonatalen Rattenkardiomyozyten. Beide Gruppen wurden mit einer Frequenz von 3Hz für 24 bzw. 48 Stunden stimuliert, wodurch der Faktor Frequenz keinen Einfluss mehr auf unsere Untersuchungsergebnisse hatte und der Unterschied in den Versuchsgruppen einzig durch die Arrhythmie zu erklären ist.

### **6.1 CTGF Regulierung unter Arrhythmie**

Grundlage für fibrotische Umbauprozesse im Herzen ist eine vorangegangene profibrotische Signaltransduktion. Zentraler Mediator der kardialen Fibrose ist TGF- $\beta$  und sein Downstream-Protein Connective Tissue Growth Factor (CTGF) <sup>37</sup>, dessen Regulation wir in diesem Projekt unter Einfluss der Arrhythmie untersuchten. CTGF beeinflusst dabei die Extrazellulärmatrix (ECM) direkt wie auch über eine Aktivierung von Fibroblasten und mesenchymalen Zellen <sup>37</sup>.

Ko et al. zeigten 2011 in Herzgewebe von Patienten mit Vorhofflimmern eine signifikant erhöhte CTGF Expression sowohl auf Protein- als auch auf mRNA Ebene im Vergleich zu Herzgewebe von Patienten, welches im Sinusrhythmus geschlagen hat <sup>59</sup>. Sie konnten somit zeigen, dass das Vorhofflimmern ein Grund für eine erhöhte CTGF Expression darstellt. Des Weiteren konnten sie mit ihrer Versuchsreihe zeigen, dass CTGF sowohl von

Kardiomyozyten als auch von Fibrozyten exprimiert wird <sup>59</sup>. Auch die Arbeit von Adam et al. identifizierte 2010 CTGF als zentralen Mediator der kardialen Fibrose <sup>60</sup>. Sie konnten ebenfalls zeigen, dass es in den Vergleichsgruppen von Patienten mit Sinusrhythmus und Patienten mit Vorhofflimmern zu einer signifikant erhöhten Proteinexpression in der Western Blot Analyse und ebenfalls in der Real-Time PCR von CTGF kommt. In dieser Studie untersuchten sie die Expression in humanem linkem Vorhofgewebe. Vorhofflimmern ist allerdings durch zwei grundlegende Komponenten charakterisiert. Es unterscheidet sich vom Sinusrhythmus durch seine deutlich höhere Frequenz mit bis zu 600 Schlägen/Minute des Vorhofes und eben durch die Arrhythmie der Kontraktur der Herzmuskulatur. Eine Differenzierung dieser Einflüsse auf die Expression von CTGF als zentralen Mediator der Fibrose ist in diesen Arbeiten und auch in der weiteren Literatur bisher nicht beschrieben.

Ein weiterer Faktor für die Fibroseentwicklung unter Vorhofflimmern scheint die Dauer der Erkrankung zu sein. In der Studie von Ko et al. <sup>59</sup> litten die Patienten bis dato mindestens sechs Monate oder mehr unter dem Vorhofflimmern. In der Studie von Adam et al. <sup>60</sup> litten die Patienten zwar erst seit einer kürzeren Zeit unter Vorhofflimmern. Allerdings waren es in dieser Untersuchungsgruppe ebenfalls immerhin mindestens drei Monate.

Aufgrund dieser Datengrundlage stellte sich für uns die Frage, inwiefern Arrhythmie die CTGF-Expression in Kardiomyozyten beeinflusst und ob diese Regulation bereits nach 24 bzw. 48 Stunden nachzuvollziehen ist statt erst nach monatelanger Arrhythmie. Dazu stimulierten wir die reine Kardiomyozytenmonokultur für 24 bzw. 48 Stunden in den Vergleichsgruppen rhythmisch und arrhythmisch. Im Rahmen dessen konnten wir in der Western Blot Analyse zeigen, dass es bereits nach 24 Stunden zu einer deutlichen Hochregulierung des zentralen Fibrosemarkers CTGF in der arrhythmisch stimulierten Gruppe kommt. Um diese Erkenntnisse zu verifizieren untersuchten wir diesen Parameter auch nach 48 stündiger rhythmischer und arrhythmischer Stimulation. Dabei zeigte sich ebenfalls eine signifikant verstärkte Expression von CTGF in der Kardiomyozytenkultur. Auch unter diesen Untersuchungsbedingungen kam es unter rhythmischer Stimulation bei 3Hz zu keiner Erhöhung der CTGF Expression. Wir konnten also durch diese Untersuchungen zeigen, dass Arrhythmie einen ganz wesentlichen Einfluss auf die profibrotische Signaltransduktion mittels CTGF hat.

### 6.1.2 pAMPK als Indikator des myokardialen Stoffwechsels und Regulator von CTGF

Bekannt ist, dass Vorhofflimmern zu einer veränderten Stoffwechsellage der myokardialen Zelle führt und es somit zu einem erhöhten Verbrauch der Energiequelle ATP kommt. Dadurch erhöht sich der AMP/ATP bzw. ADP/ATP Quotient <sup>61</sup>. AMP bzw. ADP sind Substrate, welche die 5'AMP-aktivierte Kinase (AMPK) aktivieren. Diese dient somit als Indikator für die veränderte Stoffwechsellage des Gewebes <sup>41</sup>. Harada et al. zeigten in ihrer Arbeit die Beziehung zwischen Vorhofflimmern und der verstärkten Expression der aktiven, also phosphorylierten, Form der AMPK <sup>62</sup>. Allerdings simulierten sie in ihrem Zellkulturmodell den Energiemangel der Zelle durch eine inaktivierte Glykolyse und führten zusätzliche eine Stimulation der Kardiomyozyten mit 2Hz durch. Unter diesen Bedingungen kam es zu einer signifikanten Steigerung der pAMPK-Expression. In unserem Kardiomyozytenmodell mit rhythmischer und arrhythmischer Stimulierung konnten wir bereits nach 24 Stunden eine signifikante Steigerung der pAMPK-Expression zeigen. Dieses Bild bestätigte sich ebenfalls nach 48 stündiger Stimulierung. Durch diese Ergebnisse konnten wir zeigen, dass Arrhythmie als alleiniger Faktor bereits einen starken Einfluss auf energieverbrauchende Prozesse in den Kardiomyozyten zu haben scheint und die Stoffwechsellage in den kardialen Myozyten verschiebt.

Zusätzlich zur Rolle als Indikatorprotein für eine verstärkt energieverbrauchende Stoffwechsellage haben einige Arbeiten bereits gezeigt, dass die AMPK auch einen Einfluss auf die CTGF-Expression zu haben scheint. Dies konnte bereits in verschiedensten Modellversuchen gezeigt werden. So zeigten Lu J. et al. 2015, dass es in renalen Mausfibroblasten durch eine durch Metformin induzierte Hochregulierung von AMPK zu einer Runterregulierung von CTGF und der nachfolgenden Kollagenexpression kommt <sup>45</sup>. Zu der gleichen Grundaussage kamen Lu X. et al. im Jahre 2017. Sie konnten zeigen, dass es durch Behandlung von Mausovarien mit dem spezifischen AMPK-Inhibitor Compound C zu einer verstärkten mRNA-Konzentration von CTGF kam <sup>63</sup>.

Demgegenüber stehen die Ergebnisse unserer Western Blot Analysen bzgl. der Beeinflussung der CTGF Expression in Verbindung mit pAMPK. Wie oben beschrieben konnten wir in unserem Zellkulturmodell eine durch Arrhythmie verursachte Hochregulierung sowohl von pAMPK als auch von CTGF zeigen. Allerdings kamen wir zu anderen Ergebnissen, was die

gegenseitige Beeinflussung angeht. Wir behandelten unsere Zellen ebenfalls mit Compound C, wodurch wir eine starke Depression der pAMPK-Expression sehen konnten. Mit den gleichen Zellen führten wir allerdings auch eine Messung der CTGF-Expression in Western-Blot Analysen durch. Unter reiner arrhythmischer Stimulierung zeigte sich wieder eine signifikant erhöhte CTGF-Expression, was als Kontrolle für die erfolgreiche Stimulierung der Zellen angesehen werden kann. Die Zellen, welche mit Compound C behandelt wurden und ebenfalls arrhythmisch stimuliert wurden, zeigten aber wider Erwarten nicht eine verstärkte CTGF-Expression. Viel mehr kam es bei diesen Zellen zu einer signifikant verminderten CTGF-Expression, obwohl man aufgrund der vorhandenen Literatur eine mindestens gleich starke Expression wie in der rein arrhythmisch stimulierten Gruppe oder sogar eine verstärkte Expression erwartet hätte. Wir vermuten, dass es durch die Arrhythmie zu Veränderungen in der Signaltransduktion kommt, welche für diese Veränderungen der eigentlich bekannten Signalwege verantwortlich ist. Um diese Aussage zu verifizieren, bedarf es allerdings weitergehender und in die Signaltransduktion tiefer eingehender Forschung.

## **6.2 Oxidativer Stress unter Arrhythmie**

Durch die vorangegangenen Experimente konnten wir zeigen, dass es durch Arrhythmie verursacht zu einer veränderten Stoffwechsellage der Kardiomyozyten kommt. Durch den erhöhten Energiebedarf der Kardiomyozyten kommt es zu einer verstärkten Arbeit in den Mitochondrien. In Folge dessen kommt es zu einer vermehrten Produktion von Reaktiven Oxygen Spezies (ROS), da die Mitochondrien die Hauptquellen für ROS sind <sup>64</sup>. Jeong et al. zeigten in ihrer Übersichtsarbeit bzgl. der Beziehung von ROS und Arrhythmie, dass es durch ROS zu Veränderungen in der Struktur von Kanälen wie Natrium-, Kalium- und Kalziumkanälen kommt. Durch die Veränderung dieser für die Erregungsentstehung und –weiterleitung essentiellen Ionenkanäle kommt es zu vermehrter Entstehung von Arrhythmie wie beim Vorhofflimmern <sup>64</sup>.

In unserem Modell untersuchten wir die umgekehrte Beeinflussung. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass es durch die Arrhythmie zu einer signifikant erhöhten Entstehung von ROS kommt. Diese Ergebnisse wurden von uns noch durch die Färbung von Desoxyguanosin nach arrhythmischer Stimulierung untermauert. Auch dieser Parameter für oxidativen Stress war unter Arrhythmie signifikant erhöht. Wir kommen also zu dem Ergebnis, dass Arrhythmie verantwortlich ist für eine verstärkte Entstehung von oxidativem Stress. Zusammen mit den

Ergebnissen aus der Literatur kann man also sagen, dass die Beziehung zwischen oxidativem Stress und Arrhythmie einem Teufelskreis gleicht, da das eine jeweils die Entstehung des anderen fördert. Zusätzlich ist bereits bekannt, dass ROS ebenfalls ein Upstream-Protein von CTGF ist und somit eine profibrotische Wirkung hat.

### **6.2.1 Das antioxidative System der Kardiomyozyten**

Um das Bild des oxidativen Stresses unter Arrhythmie zu vervollständigen, schauten wir uns die antioxidativen Systeme der Kardiomyozyten an. Nuclear erythroid-2 like factor-2 (Nrf2) ist ein den meisten Antioxidativen übergeordneter Transkriptionsfaktor, welcher für die Aktivierung von vielen Phase II Proteinen essentiell ist. Nrf2 nimmt somit eine zentrale Rolle in der Prävention gegen oxidativen Stress ein. Diesen Umstand zeigten 2005 Zhu et al. in ihrer Arbeit, in der sie die Zytotoxizität in kardialen Fibroblasten in Wildtyp- und in Nrf2-defizienten Mäusen maßen. Durch ihre Versuche konnte gezeigt werden, dass es durch Nrf2 zu einer Aktivierung z.B. der Phase II Proteine Katalase und den Superoxiddismutasen kommt, welche wir ebenfalls in diesem Projekt untersuchten <sup>65</sup>. Abu-Rmaileh et al. zeigten zudem, dass Nrf2 auch antifibrotische Eigenschaften aufweist <sup>66</sup>.

Aufgrund dieser Literaturgrundlage untersuchten wir auch in diesem Projekt oben genannte Parameter des antioxidativen Systems, da wir bereits nachweisen konnten, dass es unter Arrhythmie zu einer Verstärkung des oxidativen Stresses kam. In Western Blot Analysen konnten wir allerdings keinen signifikanten Anstieg der Proteinexpression von Nrf2 nachweisen. Wir interpretieren dieses Ergebnis dahingehend, dass die 24 stündige Stimulation nicht ausreichend war, um eine signifikante Steigerung der Nrf2 Protein-Expression in den Western Blot Analysen zu detektieren. Wir konnten hingegen eine signifikante Steigerung der Katalase und ebenso der Superoxiddismutasen (SOD) unter arrhythmischer Stimulierung feststellen. Dies sind zwei Enzyme, welche aufgrund einer Nrf2 Stimulierung aktiviert werden <sup>65</sup>. Als Hypothese stellen wir auf, dass es durch den nachgewiesenen oxidativen Stress zu einer Abspaltung von KELCH-1 und damit zu einer Aktivierung von Nrf2 kommt. Somit kommt es zur verstärkten Expression von Katalase und SOD. Erst nach längerer arrhythmischer Stimulierung würde es dann zur verstärkten Expression von Nrf2 kommen. Um diese Hypothese zu untermauern bedarf es allerdings weiterer Nachforschungen.

Als Marker für eine direkte Verbindung zwischen oxidativem Stress und der Fibroseentwicklung rückte in den letzten Jahren immer mehr das System von IL-33 und ST2 in den Blickpunkt. ST2 ist eigentlich bekannt als Enzym bekannt in Verbindung mit Inflammation<sup>67</sup>. Zusammen mit seinem Liganden IL-33 zeigt ST2 in seinen Isoformen entweder eine profibrotische oder antifibrotische Wirkung. ST2L als membrangebundene Form führt zu einer Aufnahme von IL-33 in die Zelle und wirkt dort über eine Antagonisierung von Angiotensin II und Phenylephrin antifibrotisch<sup>56</sup>. Die lösliche Form des ST2 Rezeptors sST2 wirkt als Abfangrezeptor von IL-33 und hindert es somit an seiner antifibrotischen Wirkung. Während ST2L dauerhaft sekretiert wird, kommt es zu einer Hochregulierung von sST2 durch mechanischen oder oxidativen Stress<sup>55</sup>.

Wir konnten in unserer Arbeit zeigen, dass es auf mRNA Ebene zu einer signifikanten Steigerung von sST2 und IL-33 unter Arrhythmie kommt. Auch in der Western Blot Analyse bestätigte es sich, dass es zu einer signifikanten Vermehrung von ST2 kommt. Interessanterweise konnten wir die zuvor auf mRNA Ebene nachgewiesene verstärkte Expression von IL-33 nicht mehr auf Proteinebene nachweisen. Wir interpretieren diese Ergebnisse dahingehend, dass es durch die Steigerung von sST2 zu einem Abfangen von IL-33 kommt und dieses dem proteosomalen Abbau zugeführt wird. Dadurch verliert es seine antifibrotische Wirkung.

### **6.3 Der Einfluss der Arrhythmie auf die Vermehrung der Extrazellulärmatrix**

Diese Arbeit konnte bis zu diesem Zeitpunkt zeigen, dass es bereits nach 24 stündiger arrhythmischer Stimulation zu einer deutlichen Verstärkung der profibrotischen Signaltransduktion kommt und bestimmte Einflussfaktoren ebenfalls verstärkt sind. Deswegen stellte sich die Frage, ob es nach 24 Stunden Arrhythmie bereits zu Veränderungen an der Extrazellulärmatrix kommt, worauf die bisher untersuchte Signaltransduktion Hinweise gab. Somit untersuchten wir Kollagen I, Kollagen III, Hyaluronsäure und Hydroxyprolin, welche wichtige Bestandteile der Extrazellulärmatrix (ECM) darstellen.

Boldt et al. zeigten in ihrer Arbeit bereits 2004, dass es in Vorhofmyokard bei Patienten mit Vorhofflimmern zu einer signifikanten Steigerung der Kollagentypen I und III im Vergleich zur Patientengruppe mit Sinusrhythmus kommt<sup>67</sup>. Auch wir konnten in unserem

Zellkulturmodell zeigen, dass es unter Arrhythmie zu einer Steigerung der Kollagen I und III Expression kommt. In der Studie von Boldt waren es allerdings Patienten, die seit Jahren unter Vorhofflimmern leiden. Neu bei uns ist, dass wir nachweisen konnten, dass bereits der Einzelfaktor Arrhythmie zu einer verstärkten Expression führt. Außerdem ist es interessant, dass diese Vermehrung der ECM bereits nach 24 Stunden eintritt und sich nach 48 Stunden noch verstärkt. Die weiteren untersuchten Parameter Hyaluronsäure und Hydroxyprolin, welche in die ECM eingebaut werden, zeigten in unserem Modell keine signifikante Steigerung unter Arrhythmie.

#### **6.4 Limitationen dieser Forschungsergebnisse**

Die Forschungsergebnisse dieser Arbeit basieren auf einem Zellkulturmodell *in vitro* mit neonatalen Rattenkardiomyozyten. Mit diesem Modell versuchten wir die Pathophysiologie nachzuempfinden. Es ist aber nicht direkt auf den Menschen übertragbar.

Des Weiteren untersuchten wir die Kardiomyozyten isoliert und herausgelöst aus ihrem eigentlichen Zell-Zellverband mit z.B. Fibrozyten wie es *in vivo* vorliegt. Somit untersuchten wir isoliert den Einfluss der Arrhythmie auf die Kardiomyozyten und deren Signaltransduktion, die *in vivo* allerdings mit anderen Bestandteilen des Gewebes interagiert. Zudem leiden Patienten mit Vorhofflimmern oft mehrere Jahre unter ihrer Erkrankung. Aufgrund der Limitierung in unserem Modell war es uns nur möglich lediglich eine Zeitspanne von 24 bis maximal 48 Stunden zu untersuchen.

#### **6.5 Zusammenfassung der Studienergebnisse**

Zusammenfassend kann man anhand dieser Studienergebnisse sagen, dass der Faktor Arrhythmie, welcher Teil des Vorhofflimmerns ist, einen großen Einfluss auf die profibrotische Signaltransduktion und die Einflussfaktoren dieser hat.

Durch Arrhythmie kommt es zu einer signifikanten Erhöhung des zentralen Fibrosemediators CTGF. Zudem konnten wir zeigen, dass die CTGF-Expression durch AMPK ebenfalls beeinflusst wird. Außerdem kommt es zu einer Steigerung des oxidativen Stresses und konsekutiv dessen zu einer Erhöhung der antioxidativen Parameter, was insgesamt die

profibrotische Signaltransduktion unterstützt. Zuletzt zeigte sich außerdem, dass es nicht nur zu einer Verstärkung der profibrotischen Signaltransduktion kommt, sondern dass Arrhythmie bereits nach kurzer Zeit zu strukturellem Remodelling mit einer Vermehrung der ECM führt.

## **7 Literaturverzeichnis**

1. Chugh SS, Havmoeller R, Narayanan K, et al. Worldwide Epidemiology of Atrial Fibrillation: A Global Burden of Disease 2010 Study. *Circulation*. 2014;129(8):837-847. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005119.
2. Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. *Stroke*. 1991;22(8):983-988. doi:10.1161/01.STR.22.8.983.
3. Markides V, Schilling RJ. Atrial fibrillation: classification, pathophysiology, mechanisms and drug treatment. *Heart*. 2003;89(8):939-943. doi:10.1136/HEART.89.8.939.
4. Krijthe BP, Kunst A, Benjamin EJ, et al. Projections on the number of individuals with atrial fibrillation in the European Union, from 2000 to 2060. *Eur Heart J*. 2013;34(35).
5. Heeringa J, van der Kuip DAM, Hofman A, et al. Heeringa, Jan, Deirdre A.M. van der Kuip, Albert Hofman, Jan A. Kors, Gerard van Herpen, Bruno H.Ch. Stricker, and others, "Prevalence, Incidence and Lifetime Risk of Atrial Fibrillation: The Rotterdam Study", *European Heart Journal*, 27 (2006)Prevalence, . *Eur Heart J*. 2006;27(8).
6. Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB, Levy D. Impact of Atrial Fibrillation on the Risk of Death: The Framingham Heart Study. *Circulation*. 1998;98(10):946-952. doi:10.1161/01.CIR.98.10.946.
7. Kamel H, Okin PM, Elkind MSV, Iadecola C. Atrial Fibrillation and Mechanisms of Stroke. *Stroke*. 2016;47(3). <http://stroke.ahajournals.org/content/47/3/895>. Accessed May 24, 2017.
8. Ha ACT, Dorian P. Health-related quality of life questionnaires: an important method to evaluate patient outcomes in atrial fibrillation ablation. doi:10.1007/s10840-012-9721-2.
9. T Heidt Bs S, Kratz PhD A, Najarian PhD K, et al. Symptoms In Atrial Fibrillation: A Contemporary Review And Future Directions. *J Atr Fibrillation*. 2016;9(1):1422. doi:10.4022/jafib.1422.
10. Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, et al. 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2016;50(5):e1-e88. doi:10.1093/ejcts/ezw313.

11. Potpara TS, Lip GYH. Lone atrial fibrillation - an overview. *Int J Clin Pract.* 2014;68(4):418-433. doi:10.1111/ijcp.12281.
12. Blaeser-Kiel G. Vorhofflimmern: Teil des kardiovaskulären Kontinuums - Dtsch Arztebl 2003; 100(40). Dtsch Arztebl 2003; 100(40): A-2602. <https://www.aerzteblatt.de/archiv/38717/Vorhofflimmern-Teil-des-kardiovaskulaeren-Kontinuums>. Published 2003. Accessed February 19, 2017.
13. Cuspidi C, Meani S, Fusi V, et al. Prevalence and correlates of left atrial enlargement in essential hypertension: role of ventricular geometry and the metabolic syndrome: the Evaluation of Target Organ Damage in Hypertension study. *J Hypertens.* 2005;23(4):875-882. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15775794>. Accessed February 22, 2017.
14. Benjamin EJ, Levy D, Vaziri SM, D'Agostino RB, Belanger AJ, Wolf PA. Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort. The Framingham Heart Study. *JAMA.* 1994;271(11):840-844. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8114238>. Accessed February 22, 2017.
15. Magnani JW, Rienstra M, Lin H, et al. Atrial Fibrillation: Current Knowledge and Future Directions in Epidemiology and Genomics. *Circulation.* 2011;124(18):1982-1993. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.039677.
16. Kannel W., Wolf P., Benjamin E., Levy D. Prevalence, incidence, prognosis, and predisposing conditions for atrial fibrillation: population-based estimates 11Reprints are not available. *Am J Cardiol.* 1998;82(7):2N-9N. doi:10.1016/S0002-9149(98)00583-9.
17. Ball J, Carrington MJ, McMurray JJV, Stewart S. Atrial fibrillation: Profile and burden of an evolving epidemic in the 21st century. *Int J Cardiol.* 2013;167(5):1807-1824. doi:10.1016/j.ijcard.2012.12.093.
18. Jost N, Muntean DM, Kohajda Z, Fazekas T. Clinical & Experimental Cardiology Atrial Remodeling in Permanent Atrial Fibrillation: Mechanisms and Pharmacological Implications. *J Clin Exp Cardiol.* 2013;4(4). doi:10.4172/2155-9880.1000273.
19. Van Wagoner DR, Pond AL, Lamorgese M, Rossie SS, McCarthy PM, Nerbonne JM. Atrial L-Type Ca<sup>2+</sup> Currents and Human Atrial Fibrillation. *Circ Res.* 1999;85(5).
20. Schmidt C, Kisselbach J, Schweizer PA, Katus HA, Thomas D. The pathology and treatment of cardiac arrhythmias: focus on atrial fibrillation. *Vasc Health Risk Manag.*

- 2011;7:193-202. doi:10.2147/VHRM.S10758.
21. Nattel S, Burstein B, Dobrev D. Atrial Remodeling and Atrial Fibrillation. *Circ Arrhythmia Electrophysiol.* 2008;1(1).
  22. Weil BR, Ozcan C. Cardiomyocyte Remodeling in Atrial Fibrillation and Hibernating Myocardium: Shared Pathophysiologic Traits Identify Novel Treatment Strategies? *Biomed Res Int.* 2015;2015:587361. doi:10.1155/2015/587361.
  23. Schotten U, Ausma J, Stellbrink C, et al. Cellular Mechanisms of Depressed Atrial Contractility in Patients With Chronic Atrial Fibrillation. *Circulation.* 2001;103(5).
  24. Xu J, Cui G, Esmailian F, et al. Atrial Extracellular Matrix Remodeling and the Maintenance of Atrial Fibrillation. *Circulation.* 2004;109(3):363-368. doi:10.1161/01.CIR.0000109495.02213.52.
  25. Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, Cleutjens JP. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol.* 1994;26(3):279-292. doi:10.1006/jmcc.1994.1036.
  26. Bowers SLK, Banerjee I, Baudino TA. The extracellular matrix: At the center of it all. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48(3):474-482. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.08.024.
  27. Crouch E. Pathobiology of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol.* 1990;259(4 Pt 1):L159-84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2221080>. Accessed March 9, 2017.
  28. Lockhart M, Wirrig E, Phelps A, Wessels A. Extracellular matrix and heart development. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2011;91(6):535-550. doi:10.1002/bdra.20810.
  29. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 2012;18(7):1028-1040. doi:10.1038/nm.2807.
  30. Li G, Yan Q, Wei L. Serum concentrations of hyaluronic acid, procollagen type III NH2-terminal peptide, and laminin in patients with chronic congestive heart failure. *Chinese Med Sci J = Chung-kuo i hsueh k'o hsueh tsa chih.* 2006;21(3):175-178. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17086740>. Accessed March 10, 2017.
  31. Brigstock DR, Goldschmeding R, Katsube K, et al. Proposal for a unified CCN nomenclature. *Mol Pathol.* 2003;56(2):127-128. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12665631>. Accessed March 7, 2017.
  32. Moussad EE-DA, Brigstock DR. Connective Tissue Growth Factor: What's in a

- Name? *Mol Genet Metab.* 2000;71(1-2):276-292. doi:10.1006/mgme.2000.3059.
33. Rachfal AW, Brigstock DR. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis. *Hepatol Res.* 2003;26(1):1-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787797>. Accessed March 7, 2017.
  34. Yokoi H, Mukoyama M. Analysis of Pathological Activities of CCN Proteins in Fibrotic Diseases: Kidney Fibrosis. In: *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. Vol 1489. ; 2017:431-443. doi:10.1007/978-1-4939-6430-7\_36.
  35. Jang J-H, Chand HS, Bruse S, et al. Connective Tissue Growth Factor Promotes Pulmonary Epithelial Cell Senescence and Is Associated with COPD Severity. *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis.* December 2016:1-10. doi:10.1080/15412555.2016.1262340.
  36. Leask A. Transcriptional profiling of the scleroderma fibroblast reveals a potential role for connective tissue growth factor (CTGF) in pathological fibrosis. *Keio J Med.* 2004;53(2):74-77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15247510>. Accessed March 7, 2017.
  37. Lipson KE, Wong C, Teng Y, Spong S. CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. doi:10.1186/1755-1536-5-S1-S24.
  38. MATSUI Y. Rapid upregulation of CTGF in cardiac myocytes by hypertrophic stimuli: implication for cardiac fibrosis and hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;37(2):477-481. doi:10.1016/j.yjmcc.2004.05.012.
  39. Kothapalli D, Hayashi N, Grotendorst GR. Inhibition of TGF-beta-stimulated CTGF gene expression and anchorage-independent growth by cAMP identifies a CTGF-dependent restriction point in the cell cycle. *FASEB J.* 1998;12(12):1151-1161. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9737718>. Accessed March 8, 2017.
  40. Yu F, Chou C-W, Chen C-C. TNF-alpha suppressed TGF-beta-induced CTGF expression by switching the binding preference of p300 from Smad4 to p65. *Cell Signal.* 2009;21(6):867-872. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19385047>. Accessed March 8, 2017.
  41. AMPK Signaling Pathway | Cell Signaling Technology. <https://www.cellsignal.com/contents/science-pathway-research-cellular-metabolism/ampk-signaling-pathway/pathways-ampk>. Accessed March 17, 2017.

42. Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol.* 2011;13(9):1016-1023. doi:10.1038/ncb2329.
43. Carling D. The AMP-activated protein kinase cascade – a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci.* 2004;29(1):18-24. doi:10.1016/j.tibs.2003.11.005.
44. Masahide Harada, MD, PhD\*; Sarah Naomi Nattel, BA\*; Stanley Nattel M. AMP-Activated Protein Kinase Potential Role in Cardiac Electrophysiology and Arrhythmias. *Circ Arrhythmia Electrophysiol.* 2012. doi:10.1161/CIRCEP.112.972265.
45. Lu J, Shi J, Li M, et al. Activation of AMPK by metformin inhibits TGF- $\beta$ -induced collagen production in mouse renal fibroblasts. *Life Sci.* 2015;127:59-65. doi:10.1016/j.lfs.2015.01.042.
46. Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J.* 2009;73(3):411-418. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19194043>. Accessed March 11, 2017.
47. Takimoto E, Kass DA. Role of Oxidative Stress in Cardiac Hypertrophy and Remodeling. *Hypertension.* 2007;49(2):241-248. doi:10.1161/01.HYP.0000254415.31362.a7.
48. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *AJP Hear Circ Physiol.* 2011;301(6):H2181-H2190. doi:10.1152/ajpheart.00554.2011.
49. Krstit J, Trivanovit D, Mojsilovit S, Santibanez JF. Transforming Growth Factor-Beta and Oxidative Stress Interplay: Implications in Tumorigenesis and Cancer Progression. doi:10.1155/2015/654594.
50. Toyama K, Yamabe H, Uemura T, et al. Analysis of oxidative stress expressed by urinary level of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and biopyrrin in atrial fibrillation: Effect of sinus rhythm restoration. *Int J Cardiol.* 2013;168(1):80-85. doi:10.1016/j.ijcard.2012.09.068.
51. Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2013;53:401-426. doi:10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320.
52. Kobayashi A, Kang M-I, Watai Y, et al. Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell Biol.* 2006;26(1):221-229. doi:10.1128/MCB.26.1.221-229.2006.

53. Lledías F, Rangel P, Hansberg W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem.* 1998;273(17):10630-10637. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9553125>. Accessed March 20, 2017.
54. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(6):1583-1606. doi:10.1089/ars.2011.3999.
55. Januzzi JL. ST2 as a Cardiovascular Risk Biomarker: From the Bench to the Bedside. *J Cardiovasc Transl Res.* 2013;6(4):493-500. doi:10.1007/s12265-013-9459-y.
56. Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, et al. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J Clin Invest.* 2007;117(6):1538-1549. doi:10.1172/JCI30634.
57. Seki K, Sanada S, Kudinova AY, et al. Interleukin-33 Prevents Apoptosis and Improves Survival After Experimental Myocardial Infarction Through ST2 Signaling. *Circ Hear Fail.* 2009;2(6):684-691. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.873240.
58. Anter E, Jessup M, Callans DJ. Atrial Fibrillation and Heart Failure. *Circulation.* 2009;119(18). <http://circ.ahajournals.org/content/119/18/2516>. Accessed April 23, 2017.
59. Ko W-C, Hong C-Y, Hou S-M, et al. Elevated Expression of Connective Tissue Growth Factor in Human Atrial Fibrillation and Angiotensin II-Treated Cardiomyocytes. *Circ J.* 2011;75(7):1592-1600. doi:10.1253/circj.CJ-10-0892.
60. Adam O, Lavall D, Theobald K, et al. Rac1-Induced Connective Tissue Growth Factor Regulates Connexin 43 and N-Cadherin Expression in Atrial Fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55(5):469-480. doi:10.1016/j.jacc.2009.08.064.
61. Kim GE, Young LH. AMPK and the Atrial Response to Metabolic Inhibition. *J Am Coll Cardiol.* 2015;66(1):59-61. doi:10.1016/j.jacc.2015.04.054.
62. Harada M, Tadevosyan A, Qi X, et al. Atrial Fibrillation Activates AMP-Dependent Protein Kinase and its Regulation of Cellular Calcium Handling: Potential Role in Metabolic Adaptation and Prevention of Progression. *J Am Coll Cardiol.* 2015;66(1):47-58. doi:10.1016/j.jacc.2015.04.056.
63. Lu X, Guo S, Cheng Y, Kim J, Feng Y, Feng Y. Stimulation of ovarian follicle growth after AMPK inhibition. *Reproduction.* 2017;153(5):683-694. doi:10.1530/REP-16-

0577.

64. Jeong E-M, Liu M, Sturdy M, et al. Metabolic stress, reactive oxygen species, and arrhythmia. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52(2):454-463. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.09.018.
65. Zhu H, Itoh K, Yamamoto M, Zweier JL, Li Y. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: Protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. *FEBS Lett.* 2005;579(14):3029-3036. doi:10.1016/j.febslet.2005.04.058.
66. Abu-Rmaileh N, Kannan S, Tsushima K, et al. Abstract 284: Disruption of Nrf2 Promotes Atrial Remodeling and Fibrillation on Aging. *Circ Res.* 2015;113(Suppl 1). [http://circres.ahajournals.org/content/113/Suppl\\_1/A284](http://circres.ahajournals.org/content/113/Suppl_1/A284). Accessed May 2, 2017.
67. Milovanovic M, Volarevic V, Radosavljevic G, et al. IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. *Immunol Res.* 2012;52(1-2):89-99. doi:10.1007/s12026-012-8283-9.

## **8 Dank**

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Ulrich Laufs, danken, dass er mir dieses interessante Thema überlassen hat und mir das Vertrauen geschenkt hat in seiner Arbeitsgruppe mitzuarbeiten. Durch seine Betreuung und die damit verbundenen Ideen und Anregungen hat er dafür gesorgt, dass dieses Projekt immer weiter vorangetrieben wurde. Ich konnte mir seiner Unterstützung jederzeit sicher sein und fühlte mich bestärkt auch nach Niederschlägen immer weiterzumachen.

Außerdem möchte ich dem ganzen Team der kardiologischen Forschung für ihre Unterstützung bei der Suche nach Substanzen in den Tiefen des Labors oder eben bei der praktischen Durchführung von Experimenten danken. Ganz besonders hervorheben bei diesem Dank möchte ich die medizinisch-technische Assistentin Ellen Becker. Sie hat mich nicht nur in die Arbeit im Labor eingeführt und bei der Durchführung von Experimenten unterstützt, sondern auch die wissenschaftliche Planung des Projekts mit unterstützt. Ohne sie wäre das Projekt so nicht zu Ende zu bringen gewesen.

Nicht zuletzt möchte ich auch den lieben Menschen in meinem privaten Umfeld danken. Ich möchte meinen Eltern nicht nur dafür danken, dass sie mir das Medizinstudium ermöglicht haben, sondern auch dafür, dass sie meinen bisher eingeschlagenen Weg unterstützt haben und mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Außerdem möchte ich Josephin Weidinger danken, dafür dass sie die eine oder andere Entbehrung auf sich genommen hat, damit ich diese Arbeit zum Ende bringen konnte. Am Ende eines langen Tages war sie da und hat mich mit einem Lächeln wieder aufgebaut.