

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

**Bedeutung von Rac1 und Connective Tissue Growth Factor für
strukturelles Remodeling bei Vorhofflimmern**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2009.

vorgelegt von: **Daniel Lavall**
geb. am: 12.08.1983 in Saarbrücken

*Der Mensch muß bei dem Glauben verharren, daß das
Unbegreifliche begreiflich sei; er würde sonst nicht
forschen.*

Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	8
1.1. Bedeutung von Rac1 und Connective Tissue Growth Factor für strukturelles Remodeling bei Vorhofflimmern	8
1.2. Importance of Rac1 and Connective Tissue Growth Factor for structural remodeling in atrial fibrillation	9
2. Einleitung und eigene Fragestellung	10
2.1. Epidemiologie und Ätiologie von Vorhofflimmern	10
2.1.1. Definition, Inzidenz und Prävalenz von Vorhofflimmern	10
2.1.2. Vorhofflimmern im kardiovaskulären Kontinuum	11
2.2. Pathophysiologie von Vorhofflimmern	12
2.2.1. Entstehung einer kreisenden Erregung (Reentry)	12
2.2.2. Fibrose und Vorhofflimmern	14
2.2.3. Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems	16
2.3. Molekularbiologie bei strukturellem Remodeling des Herzens	17
2.3.1. Zelluläre Vorhofstruktur	17
2.3.2. Rac1 GTPase, NADPH-Oxidase und Sauerstoffradikale	17
2.3.3. Connective Tissue Growth Factor und kardiales Remodeling	18
2.3.4. Interzelluläre Verbindungen im Myokard: N-cadherin und Connexin 43	19
2.4. Eigene Fragestellung	21
3. Material und Methodik	22
3.1. Zellkultur	22
3.1.1. Isolation und Kultivierung neonataler Rattenkardiomyozyten	22

3.1.2. Isolation und Kultivierung neonataler kardialer Rattenfibroblasten	23
3.2. Humane linksatriale Appendices	24
3.3. Transgene Mäuse mit kardialer Rac1-Überexpression (RacET)	26
3.4. Proteinexpression und Western Blot	28
3.4.1. Proteinbestimmung nach Lowry	28
3.4.2. Gelelektrophorese	28
3.4.3. Protein-Transfer	29
3.4.4. Antikörperinkubation	29
3.4.5. Abweichungen	29
3.4.6. Statistische Auswertung	30
3.5. Angiotensin II-ELISA	30
3.6. Immunhistochemische Färbungen	31
3.6.1. CTGF-immunhistochemische Färbung	31
3.6.2. Vimentin-immunhistochemische Färbung	32
3.6.3. α -sarcomeric Actin-immunhistochemische Färbung	32
3.6.4. Digitalisieren der immunhistochemischen Färbungen	33
3.7. Material	33
3.7.1. Medien, Lösungen, Puffer	33
3.7.2. Antikörper	34
3.7.3. Verbrauchsmaterial	34
3.7.4. Chemikalien, sonstige Reagenzien	35
3.7.5. Enzyme und Kits	36
3.7.6. Geräte	37
3.7.7. Software	38
4. Ergebnisse	39
4.1. Protein- und Genexpression von CTGF in humanen linksatrialen Appendices bei Vorhofflimmern	39
4.2. Angiotensin II-Gehalt in humanem Vorhofgewebe	40
4.3. Expression von N-cadherin und Connexin 43 in linksatrialen Appendices bei Patienten mit Vorhofflimmern	40

4.4. CTGF-abhängige Expression von N-cadherin und Connexin 43 im Zellkulturmodell	47
4.5. Rac1-abhängige Expression von CTGF im Zellkulturmodell	47
4.6. Rac1-abhängige Expression von N-cadherin und Connexin 43 im Zellkulturmodell	48
4.7. Einfluss von Statinen auf die CTGF-Expression <i>in vitro</i>	56
4.8. Einfluss von Statinen auf die Expression von CTGF bei transgenen Mäusen mit kardialer Überexpression von Rac1 (RacET)	58
5. Diskussion	61
6. Literaturverzeichnis	68
7. Publikationen/Dank	81
7.1. Publikationen	81
7.2. Abstracts	81
7.3. Dank	82
8. Lebenslauf	83

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Ang II	Angiotensin II
AT ₁ -Rezeptor	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
Aqua. dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
C	Kontrolle
°C	Grad Celsius
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CHI	chronische Herzinsuffizienz
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
CX43	Connexin 43
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
g, mg, µg, ng, pg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm, Pikogramm
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
kDa	Kilodalton
LAA	linksatrialer Appendix
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
M, mM, µM	Molar, Millimolar, Mikromolar
MW	Mittelwert
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
NSC	Rac1 small molecular inhibitor NSC 23766
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor-1
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
RacET	transgene Mäuse mit herzspezifischer Überexpression von konstitutiv aktivem Rac 1
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
Rosuva	Rosuvastatin

RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard Error of the Mean (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes)
Simva	Simvastatin
SR	Sinusrhythmus
TGF- β	Transforming Growth Factor β
U/min	Umdrehungen pro Minute
VHF	Vorhofflimmern
vs.	versus (gegen)
WT	Wildtyp

1. Zusammenfassung

1.1. Bedeutung von Rac1 und Connective Tissue Growth Factor für strukturelles Remodeling bei Vorhofflimmern

Vorhofflimmern ist die häufigste Herzrhythmusstörung. Die Bedeutung des strukturellen Remodelings für die Pathogenese des Vorhofflimmerns ist bisher nur teilweise verstanden.

An gepaarten Proben humaner linker Vorhöfe von Patienten mit Sinusrhythmus und Vorhofflimmern wurde eine Affymetrix-Analyse durchgeführt. Darin zeigten Patienten mit Vorhofflimmern eine erhöhte atriale Genexpression von Connective Tissue Growth Factor (CTGF) gegenüber Patienten mit Sinusrhythmus. Western Blot-Analysen bestätigten diese Beobachtung auf Proteinebene. Weiterhin zeigten sie eine gesteigerte Proteinexpression des kleinen G-Proteins Rac1, von N-cadherin, einem transmembranösen Regulator des Aktin-Zytoskeletts, und von Connexin 43 (CX43), einem Gap junction-Protein. In ELISA-Studien fand sich eine 7fach erhöhte Angiotensin II-Konzentration im linken Vorhofgewebe bei Patienten mit Vorhofflimmern. In kultivierten neonatalen Rattenkardiomyozyten und -kardiofibroblasten führte die Stimulation mit rekombinantem CTGF zu einer gesteigerten Expression von N-cadherin und CX43. In Zellkulturexperimenten zur Charakterisierung der Beziehung von Rac1 und CTGF in der Signaltransduktion zeigte sich, dass sowohl der Rac1 small molecular inhibitor NSC 23766 als auch Simvastatin die durch Angiotensin II induzierte erhöhte CTGF-Expression vollständig verhinderte. Um die Bedeutung von Rac1 für strukturelles Remodeling *in vivo* weiter zu untersuchen, verglichen wir transgene Mäuse mit herzspezifischer Überexpression (α MHC-Promoter) von konstitutiv aktivem Rac1 (RacET), die im hohen Alter spontan Vorhofflimmern entwickeln, mit Wildtyp-Tieren. Dabei zeigten sich erhöhte Proteinexpressionen von CTGF, N-cadherin und CX43 im Myokard von RacET- im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Eine Behandlung mit Statinen reduzierte die Expression von CTGF, N-cadherin und CX43 und verringerte die Inzidenz von Vorhofflimmern.

Zusammenfassend führt Angiotensin II über die Aktivierung von Rac1 und CTGF zu strukturellem Remodeling bei Vorhofflimmern. Dieser Signaltransduktionsmechanismus wird durch Statine *in vitro* wie *in vivo* gehemmt und könnte daher ein neues therapeutisches Ziel in der Prävention von strukturellem Remodeling bei Vorhofflimmern darstellen.

1.2. Importance of Rac1 and Connective Tissue Growth Factor for structural remodeling in atrial fibrillation

Atrial fibrillation (AF) is the most common sustained arrhythmia in clinical practice. The importance of structural remodeling for the pathogenesis of atrial fibrillation remains incompletely understood.

Matched samples of human left atria from patients with sinus rhythm (SR) and AF were subjected to Affymetrix analysis. Patients with AF showed marked upregulation of connective tissue growth factor (CTGF) mRNA levels compared to patients in sinus rhythm (SR). Western Blot analysis confirmed upregulation of CTGF protein expression. This was associated with an upregulation of the small G-protein Rac1, the transmembrane regulator of the actin cytoskeleton N-cadherin, and elevated protein expression of Connexin 43 (CX43), a gap junction protein. ELISA showed 7-fold elevated Angiotensin II tissue levels in AF. In primary neonatal rat cardiac myocytes and fibroblasts, stimulation with recombinant CTGF contributes to the upregulation of N-cadherin and CX43. In further cell culture experiments performed to investigate the role of rac1 and CTGF in signal transduction, both the specific small molecule inhibitor of Rac1 NSC 23766 and simvastatin completely prevented angiotensin II induced upregulation of CTGF. To study the importance of Rac1 to structural remodeling via CTGF *in vivo*, transgenic mice with cardiac specific overexpression (α MHC promoter) of Rac1 (RacET) who develop AF at old age were compared to wildtype. Myocardium of RacET mice was characterized by upregulation of CTGF, CX43 and N-cadherin protein expression. Inhibition of Rac1 activity by statin treatment diminished these changes and reduced the incidence of atrial fibrillation.

In summary, Angiotensin II contributes to structural remodeling via Rac1 activation and upregulation of CTGF. This signal transduction pathway can be inhibited by statins *in vitro* as well as *in vivo*, which may therefore represent a new therapeutic target for the prevention of structural remodeling in atrial fibrillation.

2. Einleitung und eigene Fragestellung

2.1. Epidemiologie und Ätiologie von Vorhofflimmern

2.1.1. Definition, Inzidenz und Prävalenz von Vorhofflimmern

Vorhofflimmern ist eine supraventrikuläre Arrhythmie, charakterisiert durch unkoordinierte Vorhoferregung und kontinuierliche Verschlechterung der mechanischen Vorhoffunktion. Elektrokardiographisch wird bei Vorhofflimmern die P-Welle durch oszillierende oder fibrillierende Wellen ersetzt, die in ihrer Amplitude, Form und ihrem zeitlichen Auftreten variieren, in Kombination mit unregelmäßiger Erregungsüberleitung auf die Kammern (Fuster et al., 2006).

Vorhofflimmern ist die häufigste anhaltende Herzrhythmusstörung des Menschen. Die Inzidenz ist altersabhängig und verdoppelt sich mit jeder Dekade. Sie steigt von 2-3 Neuerkrankungen pro 1000 Einwohner bei Personen zwischen 55 und 64 Jahren bis zu 35 Neuerkrankungen pro 1000 Einwohner in der Altersklasse von 85 bis 94 Jahren (Falk, 2001). Die Prävalenz beträgt 0,4 bis 1 % in der Allgemeinbevölkerung und steigt mit dem Lebensalter auf 8 % bei den über 80jährigen an. Nahezu 70 % der Patienten sind zwischen 65 und 85 Jahre alt (Feinberg et al., 1995; Fuster et al., 2006).

Vorhofflimmern belastet das Gesundheitssystem durch Krankenhausaufnahmen, Medikamente, Arztbesuche und Arbeitsausfälle. In Anbetracht der Prävalenz und der demografischen Entwicklung bedeutet dies eine gewaltige soziale Last (Fuster et al., 2006; Mewis et al., 2006).

Weiterhin beeinträchtigt Vorhofflimmern die Lebensqualität. Die Symptomatik ist dabei individuell sehr variabel, am häufigsten treten Palpitationen, Schwindel, Dyspnoe und Thoraxschmerzen auf. Jedoch sind nicht wenige Patienten asymptomatisch. Da ein prognostischer Vorteil von antiarrhythmischen Therapien nicht belegt ist, spielen symptomatische Verbesserungen, z.B. körperliche Belastbarkeit und Häufigkeit von Vorhofflimmerattacken, als Surrogatparameter eine wichtige Rolle. Demnach muss den subjektiven Beschwerden hinsichtlich psychischer, physischer und emotionaler Störungen im Therapiemanagement bei Patienten mit Vorhofflimmern Rechnung getragen werden (Gronefeld et al., 2003).

2.1.2. Vorhofflimmern im kardiovaskulären Kontinuum

In den meisten Fällen geht Vorhofflimmern mit verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen wie koronarer Herzkrankheit, Herzklappenvitien, arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus, Kardiomyopathien und chronischer Herzinsuffizienz einher. Ein entscheidender Mechanismus ist dabei die Volumen- bzw. Druckbelastung des Vorhofs mit resultierender Vorhofdilatation, die für die Rhythmusstörung prädisponiert. In der Framingham-Studie zeigte sich in einer 38jährigen Beobachtungszeit, dass in über 20 % der Personen, die Vorhofflimmern entwickelten, gleichzeitig eine Herzinsuffizienz vorlag, jedoch nur in etwa 3 % der Personen ohne Vorhofflimmern, wodurch die enge pathophysiologische Beziehung von chronischer Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern deutlich wird (Benjamin et al., 1994). Auch verschiedene extrakardiale Erkrankungen sind mit Vorhofflimmern assoziiert, darunter Atemwegsinfektionen, Elektrolytentgleisungen und Hyperthyreose (Fuster et al., 2006; Gronefeld et al., 2003). Bei 30 % der Patienten ist keine strukturelle kardiopulmonale Erkrankung einschließlich arterieller Hypertonie feststellbar, wobei dieser Zustand als „alleiniges Vorhofflimmern“ bezeichnet wird und meist Personen unter 60 Jahre betrifft (Fuster et al., 2006; Levy, 1997; Nattel, 2002).

Vorhofflimmern stellt einen unabhängigen Risikofaktor für Schlaganfall und Tod dar (Benjamin et al., 1998; Wolf et al., 1991). Die schnelle und irreguläre Vorhofaktivierung führt zu progredienter Verschlechterung der Vorhofkontraktilität („atrial stunning“). Durch den Wegfall der spätdiastolischen Vorhofkontraktion für die Kammerfüllung mit konsekutiv erniedrigtem ventrikulärem Schlagvolumen und die unregelmäßige Erregungsüberleitung auf die Kammern verschlechtert Vorhofflimmern die kardiale Hämodynamik. Dadurch kommt es zu einer Progression einer vorbestehenden linksventrikulären Dysfunktion und zu einer Risikoerhöhung für Tod durch Pumpversagen (Dries et al., 1998; Falk, 2001; Mewis et al., 2006).

Das Risiko, einen kardioembolischen Schlaganfall durch Thrombusbildung im linken Vorhof zu erleiden, wird um das 2- bis 7fache im Vergleich zu altersentsprechenden Personen im Sinusrhythmus erhöht. Jeder sechste Schlaganfall tritt bei einem Patienten mit Vorhofflimmern auf (Fuster et al., 2006).

2.2. Pathophysiologie von Vorhofflimmern

2.2.1. Entstehung einer kreisenden Erregung (Reentry)

Ein grundlegender elektrophysiologischer Mechanismus ist die Ausbildung einer oder mehrerer kreisender Erregungen (Reentry), die bei irregulärer Erregungsausbreitung zwischen verschiedenen Gewebearealen entstehen (Abbildung 1). Nach initialer Depolarisation (Erregung) sind Herzmuskelzellen eine gewisse Zeit refraktär, d.h. nicht wieder erregbar. Entsteht jetzt eine abnorme fokale Aktivität (Ektopie), d.h. eine elektrische Erregung außerhalb des Sinusknotens, in einem bereits nicht mehr refraktären Areal 2, während die Zellen in Areal 1 noch refraktär sind, kann Areal 1 zunächst nicht erregt werden. Daher wird die elektrische Erregung in anderen, nicht-refraktären Arealen weitergeleitet (Pfeil). Trifft die Erregung auf diesem Weg später auf Areal 1, das nun nicht mehr refraktär ist, wird dieses aktiviert, leitet den Impuls weiter zu Areal 2 und erregt dieses Areal erneut, falls der Zeitabstand seit der letzten Erregung hier groß genug war. Auf diese Weise können sich Zone 1 und Zone 2 wiederholt gegenseitig aktivieren und so die kreisende Erregung aufrechterhalten (Nattel, 2002).

Fibrotische Areale prädisponieren für einen solchen Reentry, da sie Regionen verlangsamer und heterogener Erregungsausbreitung bilden. Diese wiederum prädisponieren für Vorhofflimmern, da sie die Basis für einen unidirektionalen Leitungsblock und Makro-Reentry im Erregungskreislauf bilden (Burstein et al., 2008a; Li et al., 1999).

Auf dem Boden der morphologischen Veränderungen bedarf es zur Initiierung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern gewöhnlich einer oder mehrerer auslösender Impulse (Trigger). Als solche Triggerfaktoren wurden unter anderem Veränderungen im autonomen Rhythmus, akute oder chronische Veränderungen der atrialen Wandspannung, ektopie atriale Foci, inflammatorische Prozesse, endokardiale Dysfunktion, regionale Ischämie und kardiochirurgische Eingriffe identifiziert (Falk, 2001; Nattel, 2002; Nattel et al., 2006).

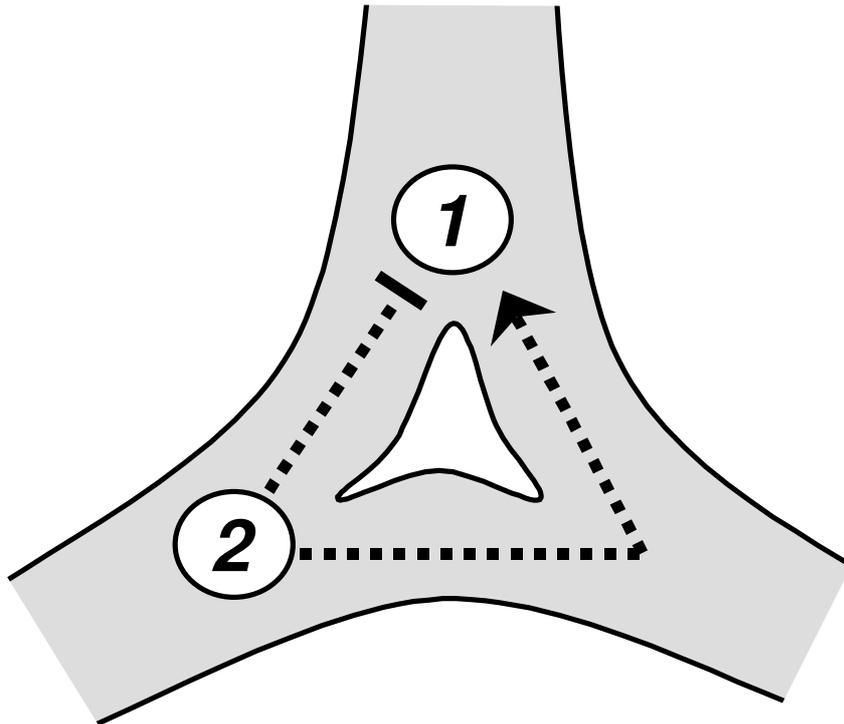


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Entstehung eines Re-entry zwischen zwei Gewebearealen 1 und 2.

(nach Nattel, 2002).

Mitte (weiß) = fibrotisches Areal, gestrichelte Linien = Erregungsausbreitung.

2.2.2. Fibrose und Vorhofflimmern

Fibrose entsteht, wenn zirkulierende oder lokal gebildete prokollagene Mediatoren auf residente Fibroblasten wirken und die Synthese von Kollagen induzieren ohne den Abbau von Kollagen zu erhöhen. Das resultierende Missverhältnis führt zu vermehrter Anhäufung von Kollagenfibrillen in der extrazellulären Matrix. Eine solche interstitielle Fibrose im Vorhof findet sich häufig bei Patienten mit Vorhofflimmern, und die Wahrscheinlichkeit für Auftreten und Persistenz von Vorhofflimmern steigt mit dem Ausmaß der Fibrose (Burstein et al., 2008a; Li et al., 2001).

Zahlreiche kardiovaskuläre Erkrankungen verursachen eine Fibrose der Vorhöfe, unter anderem die chronische Herzinsuffizienz, deren mechanistische Beziehung zu Vorhofflimmern in Abbildung 2 gezeigt ist. Die chronische Herzinsuffizienz mit einem global hypokontraktilen linken Ventrikel geht über die Zeit mit einem progredienten maladaptiven Remodeling einher. Die ventrikuläre Schädigung und die veränderten Lastbedingungen beeinträchtigen dabei auch das Vorhofmyokard, wobei elektrische und strukturelle Veränderungen entstehen. Im dilatierten Vorhof sind abgestorbene Myozyten durch Bindegewebszellen ersetzt worden (reparative Fibrose), wodurch Inhomogenitäten in der Erregungsausbreitung entstehen (Burstein et al., 2008b). Weiterhin ist das lokale Renin-Angiotensin-Aldosteron-System aktiviert, so dass im Zusammenhang mit einem veränderten Kalziumhaushalt die Aktionspotentialdauer verkürzt und aufgrund der Fibrose ein Makro-Reentry begünstigt wird (Burstein et al., 2008b; Goette et al., 2000; Nattel, 2002). Ebenso verursacht Vorhofflimmern seinerseits eine interstitielle Fibrose im Vorhofmyokard, deren molekularer Mechanismus jedoch unvollständig verstanden ist (Burstein et al., 2008b; Falk, 2001; Nattel, 2002). Vorhofflimmern selbst verändert auch die elektrischen Eigenschaften des Vorhofmyokards und prädisponiert dadurch für das erneute Auftreten und die Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern („Vorhofflimmern erzeugt Vorhofflimmern“), wobei diese Veränderungen nach Konversion in einen permanenten Sinusrhythmus reversibel sind (Wijffels et al., 1995).

2.2.3. Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems

Viele kardiovaskuläre Erkrankungen sind mit einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems verbunden, darunter myokardiale Fibrose bei hypertensiver Herzerkrankung, chronische Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt und Vorhofflimmern (Brilla et al., 1990; Goette et al., 2000; Li et al., 2001).

Angiotensin II vermittelt als Mediator des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems unter anderem über den Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (AT₁-Rezeptor) zahlreiche Wirkungen, darunter zelluläre Hypertrophie, Apoptose, Fibrose, Neutrophilen- und Monozyten-Infiltration, endotheliale Dysfunktion, Vasokonstriktion und Thrombozytenaktivierung (Casaclang-Verzosa et al., 2008). Angiotensin II wurde als ein zentrales Molekül bei kardialem Remodeling identifiziert, unter anderem wird ein mechanistischer Zusammenhang zwischen erhöhter atrialer Konzentration von Angiotensin II und strukturellem Remodeling, das zur Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern beiträgt, postuliert. Dabei induziert Angiotensin II über intrazelluläre Proteinkinasen Wachstum, Proliferation und Differenzierung von atrialen Zellen. Weiterhin steigert Angiotensin II die Synthese von Kollagen I und III, was zunehmende Fibrose bedeutet (Li et al., 2001).

Die Inhibierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems reduziert die Inzidenz von Vorhofflimmern, insbesondere bei Patienten mit linksventrikulärer Hypertrophie und chronischer Herzinsuffizienz (Ducharme et al., 2006; Fuster et al., 2006). Angiotensin Converting Enzyme (ACE)-Hemmer und Angiotensin-Rezeptor-Blocker (AT₁-Antagonisten) vermindern die Fibrosierung und beseitigen damit ein morphologisches Substrat für die Entstehung von Vorhofflimmern (Dudley, Jr. et al., 2005; Nattel, 2002).

Insgesamt nehmen Angiotensin II-vermittelte Effekte eine potentielle Schlüsselrolle in der Pathogenese, dem Remodeling und in der Therapie des Vorhofflimmern ein (Casaclang-Verzosa et al., 2008). Im Zellkultur- als auch im Tiermodell ist Angiotensin II daher als Aktivator zellulärer Signaltransduktionswege, wie sie bei vielen myokardialen Erkrankungen vorliegen, etabliert.

2.3. Molekularbiologie bei strukturellem Remodeling des Herzens

2.3.1. Zelluläre Vorhofstruktur

Lediglich 45 % des Vorhofmyokards besteht aus Kardiomyozyten, der Rest wird von Endothelzellen, kardialen Fibroblasten und extrazellulärer Matrix gebildet (Hinescu et al., 2006). Fibroblasten sind nicht nur für die Kollagensynthese und -sekretion verantwortlich, sondern haben auch morphologische Aufgaben im atrialen Zellverband, z.B. bei der Wundheilung. Bei veränderten kardialen Bedingungen können sie über auto- und parakrine Mechanismen, unter anderem über Wachstumsfaktoren und Zytokine, mit umgebenden Kardiomyozyten kommunizieren (Powell et al., 1999). Mechanische Dehnung des Vorhofs mit beginnender Dilatation führt, ebenso wie Exposition mit Angiotensin II und Transforming Growth Factor beta (TGF- β), zu erhöhter Kollagensynthese und -sekretion in kardialen Fibroblasten mit resultierender Fibrose. Darüber hinaus kann mechanische Dehnung von Fibroblasten direkt die elektrische Aktivität von Kardiomyozyten beeinflussen und stellt somit einen potentiell proarrhythmischen Mechanismus dar, der als mechano-elektrische Rückkopplung bezeichnet wird (Abbildung 2) (Burstein et al., 2008a). Im Zellkulturmodell wurde Connexin 43, ein Gap junction-Protein, eine möglicherweise ursächliche Beteiligung an dieser Interaktion zwischen Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten nachgewiesen, so dass Connexin 43 im fibrotischen Herz eine proarrhythmische Wirkung haben könnte (Chilton et al., 2007; Gaudesius et al., 2003).

2.3.2. Rac1 GTPase, NADPH-Oxidase und Sauerstoffradikale

Rac1 gehört zur Familie der kleinen (21 kDa) Signaltransduktionsproteine der Rho GTPasen, welche Guanosintriphosphat (GTP) binden und hydrolysieren. Rho-Proteine sind zentrale Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts und fungieren als Vermittler zwischen mechanischen Einwirkungen, Zellmorphologie und Genregulation. In ihrer aktiven, GTP-gebundenen Form spielt die Rac1 GTPase eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellmorphologie, Adhäsion, Endozytose, Sekretion und Wachstum (Aktories et al., 2000; Hall, 1998; Laufs et al., 2000; Van Aelst et al., 1997).

Im atrialen als auch im ventrikulärem Myokard führt eine erhöhte Aktivität der Rac1 GTPase zu vermehrter Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch die NADPH-Oxidase, da die Rac1 GTPase eine entscheidende Funktion für die Aktivierung des NADPH-

Oxidase Enzymsystems sowie für das Zusammenspiel ihrer Untereinheiten besitzt (Brown et al., 2006; Custodis et al., 2006; Diekmann et al., 1994; Dudley, Jr. et al., 2005; Maack et al., 2003; Takemoto M et al., 2001). Eine Hemmung der Rac1-Aktivität reduziert die Superoxid-Produktion der NADPH-Oxidase (Adam et al., 2007; Custodis et al., 2006; Diekmann et al., 1994; Laufs et al., 2002; Laufs et al., 2003). Weiterhin führt die Aktivierung der Rac1 GTPase zur Hypertrophie von Kardiomyozyten (Clerk et al., 2000; Pracyk et al., 1998).

Bei Vorhofflimmern kann die lokal vermehrte Bildung von ROS im linken Vorhof sowohl zu elektrischem Remodeling, unter anderem von Ionenkanälen, führen, wodurch das Phänomen „Vorhofflimmern erzeugt Vorhofflimmern“ determiniert wird, als auch die Thrombusbildung im linksatrialen Appendix über Modulierung von endokardial produzierten Gerinnungsfaktoren begünstigen (Dudley, Jr. et al., 2005; Kim et al., 2005). Freie Sauerstoffradikale induzieren außerdem Fibrose und Entzündungsvorgänge (Adam et al., 2007; Griendling et al., 2000). Des Weiteren ist die NADPH-Oxidase-Aktivität im Vorhof ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung von postoperativem Vorhofflimmern nach kardiochirurgischen Eingriffen (Kim et al., 2008).

Auch in der Pathogenese der Atherosklerose spielen Sauerstoffradikale eine wichtige Rolle, da sie die Endothelfunktion beeinträchtigen und die Progression atherosklerotischer Läsionen beschleunigen (Alexander, 1995; Griendling et al., 2001). Im kardiovaskulären Kontinuum, in dem etablierte kardiovaskuläre Risikofaktoren für Atherosklerose auch für das Auftreten von Vorhofflimmern prädisponieren (Benjamin et al., 1994), kommt oxidativem Stress durch Sauerstoffradikale daher auch in der Pathogenese des Vorhofflimmerns eine zentrale Rolle zu (Dudley, Jr. et al., 2005; Kim et al., 2008; Mihm et al., 2001).

2.3.3. Connective Tissue Growth Factor und kardiales Remodeling

Der Connective Tissue Growth Factor (CTGF) gehört zur *ctgf/cyr61/nov* (CCN)-Familie, einer Gruppe strukturell verwandter Moleküle. CTGF vermittelt die Proliferation, Migration und Adhäsion von Fibroblasten und die Bildung von extrazellulärer Matrix. CTGF ist auch an adaptivem Remodeling der extrazellulären Matrix, z.B. der Wundheilung, beteiligt. Seine Überexpression spielt eine Hauptrolle in der Signaltransduktion zur Fibrose, unter anderem bei der Fibrose von Organen, fibroproliferativer Erkrankungen und Narbenbildung. Unter bestimmten Bedingungen kann CTGF auch negative Effekte auf das Zellwachstum bis zur

Apoptose haben, zudem ist CTGF bei Prozessen wie Neovaskularisation, Umdifferenzierung und Atherosklerose von Bedeutung (Moussad et al., 2000).

CTGF ist am Remodeling bei unterschiedlichen Pathologien des Herzens beteiligt, unter anderem nach Myokardinfarkt (Dean et al., 2005), Myokarditis (Lang et al., 2008), diabetischer Kardiomyopathie (Candido et al., 2003; Way et al., 2002) sowie systolischer (Ahmed et al., 2004) und diastolischer (Koitabashi et al., 2007) Herzinsuffizienz. CTGF wird sowohl von Kardiomyozyten als auch von kardialen Fibroblasten exprimiert (Matsui et al., 2004). Endogene Stimuli wie Angiotensin II, Endothelin 1 und Transforming Growth Factor beta (TGF- β), ein Regulator von Zellwachstum und -differenzierung (Matsui et al., 2004), führen zu vermehrter Expression von CTGF in Kardiomyozyten. Über auto- und parakrine Mechanismen bedingt CTGF die Hypertrophie von Kardiomyozyten sowie die Proliferation und Synthese extrazellulärer Matrixproteine in kardialen Fibroblasten. Auf molekularer Ebene bewirkt CTGF eine vermehrte Expression von Fibronectin, Kollagen Typ I und Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1) in Kardiomyozyten wie Fibroblasten (Chen et al., 2000). Die CTGF vermittelte interstitielle Fibrose des Herzens kann zusammen mit der Entwicklung eines hypertrophen Phänotyps eine diastolische Dysfunktion verursachen (Hayata et al., 2008; Kemp et al., 2004; Koitabashi et al., 2007).

CTGF ist bei ventrikulären und atrialen Pathologien des Herzens als Mediator zu strukturellem Remodeling, insbesondere bei der Entwicklung von Hypertrophie und Fibrose, beteiligt (Cardin et al., 2007; Kato et al., 2008).

2.3.4. Interzelluläre Verbindungen im Myokard: N-cadherin und Connexin 43

Die strukturelle und funktionelle Integrität des Herzens wird von End-zu-End-Verbindungen zwischen Kardiomyozyten gebildet, die hauptsächlich aus drei Verbindungskomplexen bestehen: Adherens junctions, Desmosomen und Gap junctions (Forbes et al., 1985). Erstere ermöglichen feste Zell-Zell-Adhäsion durch den Cadherin/Catenin-Komplex, der mit dem zytoplasmatischen Aktin-Zytoskelett verbunden ist (Tepass et al., 2000). Auch Myofibrillen sind mit diesem Komplex verbunden und ermöglichen die Übertragung von Kontraktionskraft über die Zellmembran hinweg, wodurch das Myokard zu einem funktionellen Synzytium wird (Soler et al., 1994). Desmosomen sind Interzellulärverbindungen, welche die Intermediärfilamente von benachbarten Zellen in den Zellmembranen verankern und so über ein suprazelluläres, dreidimensionales Gerüst dem Gewebe mechanische Festigkeit verleihen

(Green et al., 2000). Gap junctions ermöglichen eine interzelluläre Kommunikation über elektrische Stimuli und den Austausch kleiner Moleküle.

Gap junctions sind unter anderen für die interzelluläre Erregungsausbreitung im Myokard verantwortlich, die als Zell-Zell-Kontakte zytoplasmatische Kompartimente von benachbarten Myozyten verbinden. Diese Gap junctions setzen sich pro Zelle aus sechs transmembranösen Protein-Untereinheiten, den Connexinen, zusammen (Saffitz, 2006; van der Velden et al., 2002). Sie ermöglichen eine elektrische und molekulare Signalfortleitung in Form von Ionen- und Molekülaustausch (<1 kDa) und sind daher äußerst wichtig für die kardiale Synchronisation und Funktion. Gap junction-Remodeling mit veränderter Expression oder Lokalisation von Connexinen bei kardialen Erkrankungen führt zu unregelmäßiger Erregungsausbreitung im Myokard und prädisponiert für ventrikuläre und atriale Arrhythmien, unter anderem Kammer- und Vorhofflimmern (Tribulova et al., 2008). In *in vitro*-Untersuchungen zeigte sich, dass Angiotensin II die Connexin 43-Expression beeinflussen kann, insbesondere unter pathologischen Bedingungen (Polontchouk et al., 2002).

In den Herzvorhöfen sind vor allem Connexin 40 und Connexin 43 von Bedeutung (Wetzel et al., 2005). Die Expression von Connexin 43 wurde qualitativ sowohl in Kardiomyozyten als auch in Fibroblasten nachgewiesen (Gaudesius et al., 2003). Untersuchungen an menschlichen linken Vorhöfen geben Hinweise darauf, dass Vorhofflimmern dort mit einer erhöhten Expression von Connexin 43 verbunden ist (Wetzel et al., 2005; Yan et al., 2004). Experimente in kultivierten Kardiomyozyten mit schneller Elektrostimulation zeigen eine vermehrte Expression von Connexin 43, induziert vor allem durch vermehrten Angiotensin II-Gehalt (Inoue et al., 2004). *In vitro*- als auch *in vivo*-Studien zeigen, dass das Adherens junction N-cadherin möglicherweise eine regulatorische Funktion in Bezug auf die Expression und/oder Lokalisation von Connexin 43 besitzt (Li et al., 2005; Li et al., 2008; Matsuda et al., 2006).

Cadherine gehören zu den Adherens junctions und sind transmembranöse Glykoproteine, die kalziumabhängig eine Zell-Zell-Adhäsion vermitteln. Intrazellulär sind sie über Catenine mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden und halten so die strukturelle Integrität von Zellen und Gewebe aufrecht (Steinberg et al., 1999; Tepass et al., 2000). Darüber hinaus sind Cadherine an weiteren Prozessen wie Differenzierung, Proliferation und Migration beteiligt; N-cadherin ist dabei in die Herzmuskeldifferenzierung involviert (Steinberg et al., 1999). Veränderungen in der Expression von N-cadherin, dem wichtigsten Cadherin im Herzen (Steinberg et al., 1999), führen zu dilatativer Kardiomyopathie (Ferreira-Cornwell et al., 2002) und erhöhter

Anfälligkeit für Arrhythmien (Li et al., 2008). Diese Beobachtungen gehen mit einer veränderten Expression und Lokalisation von Connexin 43 einher, was auf ein maladaptives Remodeling des Connexins als arrhythmogenes Substrat hinweist (Li et al., 2005).

2.4. Eigene Fragestellung

Trotz der hohen Prävalenz von Vorhofflimmern sind die molekularen Mechanismen, die zur Entstehung und Aufrechterhaltung der Rhythmusstörung beitragen, nur sehr wenig erforscht. Ein genaueres Verständnis der zugrunde liegenden Signaltransduktion zu strukturellem Remodeling der Vorhöfe könnte zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze in der Behandlung von Vorhofflimmern führen.

Im Rahmen der Arbeit werden die zellulären Signalwege zu strukturellem Remodeling bei Vorhofflimmern untersucht. Im Einzelnen wird dabei die Proteinexpression von CTGF, Connexin 43 und N-cadherin in linksatrialen Appendices von Patienten mit Vorhofflimmern mit linksatrialen Appendices von Patienten mit Sinusrhythmus verglichen. In Zellkulturexperimenten wird die Signaltransduktion charakterisiert, die zur Expression dieser Proteine führt, insbesondere unter dem Aspekt einer möglichen Beteiligung der Rac1 GTPase und eines potentiellen Effekts von Statinen auf diese Kaskade. Des Weiteren werden obige *in vitro*-Ergebnisse in einem Mausmodell mit herzspezifischer Überexpression von Rac1 verifiziert und ihre Rolle bei Vorhofflimmern *in vivo* weiter charakterisiert.

3. Material und Methodik

3.1. Zellkultur

3.1.1. Isolation und Kultivierung neonataler Rattenkardiomyozyten

Zur Isolation dieser Zellen wurden zwei bis fünf Tage alte Wistar Ratten enthauptet und der Körper kurz in 70 %igem Ethanol gespült. Der Thorax wurde links paramedian vorsichtig aufgeschnitten, ohne den Gastrointestinaltrakt zu verletzen (Gefahr der bakteriellen Kontamination). Durch sanfte transthorakale Massage erschien das Herz in der oberen Thoraxapertur, so dass seine Gefäßverbindungen durchtrennt und das Organ in einer zuvor mit ADS-Puffer vorbereiteten 100 mm Zellkulturschale aufgefangen wurde. Durch Präparation wurde das weitere perikardiales Gewebe, Gefäßstümpfe und die Vorhöfe entfernt. Das so erhaltene Ventrikelpräparat wurde in eine mit frischem ADS-Puffer gefüllte Zellkulturschale gegeben und in ca. 15 gleich große Stücke zerteilt. Der ADS-Puffer wurde nun abpipettiert und die Gewebesuspension in 10 ml Enzym-Mix unter mehrmaliger Resuspendierung in eine sterile Flasche überführt. In dieser wurde das Gewebelysate nun fünf Minuten in einem Schüttelwasserbad mit 80-100 U/min bei 37 °C inkubiert. Der sich hierbei bildende Überstand (Verdau) wurde ohne Mitnahme von Gewebestücken mittels einer Pipette entfernt und verworfen. Erneut wurden 10 ml Enzym-Mix hinzugegeben und die Suspension für 20 Minuten im Schüttelwasserbad inkubiert. In dieser Zeit wurde der Überstand in ein steriles 50 ml Test-tube-Gefäß gegeben, die Aktivität der Enzyme mit 2 ml Neonatal Calf Serum (NCS) gestoppt und bei 700 U/min für fünf Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Entfernung des Überstands durch vorsichtiges Schütteln in 4 ml zugewaschtem NCS gelöst. Diese Prozedur wurde noch weitere fünfmal durchgeführt, wobei sich lediglich die Verdau-Zeiten wie folgt unterschieden: 25 min.; 25 min.; 15 min.; 10 min.; 10 min. Nach der letzten Zentrifugation (700 U/min, fünf Minuten) wurde der Überstand verworfen und das Zellzentrifugat in 4 ml F 10-Medium durch vorsichtiges Schütteln resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nun in ein Falcon Cell Strainer (70 µm) filtriert, wobei vor und nach Filtration der Filter mit je 1 ml F 10 Medium gespült wurde. Diese 6 ml Zellsuspension wurde nun auf 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und für 60 Minuten bei 37 °C und in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO₂ inkubiert, wobei mikroskopisch die Adhäsion der Fibroblasten am Schalenboden kontrolliert wurde. Anschließend wurde das Medium mit den darin enthaltenen

Kardiomyozyten abgenommen und in ein 50 ml Test-tube-Gefäß überführt, um die Zellen zu zählen. Hierzu wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau-Lösung in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und vier große Eckquadrate (Vol. je Eckquadrat: 0,1 µl) ausgezählt und der Mittelwert (MW) gebildet. Die Gesamtzellzahl ergab sich aus $2 \cdot MW \cdot 10^4 \cdot \text{Volumen der Zellsuspension}$. Aufgrund der Berechnung wurde die Zellsuspension auf das gewünschte Volumen durch Zugabe von F 10-Medium gebracht und in jeweils 4 ml Medium mit $1,6 \cdot 10^6$ Zellen je P6 Primera Zellkulturschale ausgesät. Die Zellkulturschalen wurden bei 37 °C und in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO₂ für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurden sie für weitere 16 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert und danach stimuliert. Weitere Angaben zu Dosis und Stimulationszeit werden an entsprechender Stelle gemacht. Um die Proteinexpression bestimmen zu können, wurden die Zellen unter Zugabe eines hypotonen Lysepuffers von den Kulturschalen abgeschabt. Das gewonnene Gesamtlysate wurde 4 Minuten bei 95 °C erhitzt, um die Denaturierung der Proteine zu gewährleisten. Anschließend wurde eine quantitative Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot durchgeführt.

3.1.2. Isolation und Kultivierung neonataler kardialer Rattenfibroblasten

Die Fibroblasten wurden wie unter 3.1.1. beschrieben aus neonatalen Wistar Ratten gewonnen und durch Adhäsion von Kardiomyozyten getrennt. Diese p0-Generation wurde in F 10-Medium in einer 5 %igen CO₂-Atmosphäre bei 37 °C inkubiert. Nach zwei Tagen waren die Zellen zu etwa 90 % konfluent, so dass sie auf mehrere Zellkulturschalen (100 mm Zellkulturschale oder TC-plate 6 well) aufgesplittet wurden. Das ab dieser Passage (p1) verwendete Medium, DMEM-Nährmedium, wurde unter sterilen Bedingungen alle zwei Tage gewechselt. Die Zelllinien wuchsen, bis sie einen konfluenten Zellrasen bildeten und wurden etwa alle fünf Tage durch Trypsinierung (0,25 % Trypsin in PBS-Puffer) subkultiviert.

Nachdem die Zellen durch Kultivierung einen ca. 80 % konfluenten Zellrasen ausgebildet hatten, wurde das Nährmedium abgesaugt. Für einen Zeitraum von 12-24 Stunden wurden die Zellen in DMEM-Hungermedium inkubiert und anschließend, wenn nicht anders beschrieben, in DMEM-Hungermedium stimuliert. Angaben zu Dosis und Zeit der Stimulation werden an entsprechender Stelle gemacht.

Um die Proteinexpression bestimmen zu können, wurden die Zellen unter Zugabe eines hypotonen Lysepuffers von den Kulturschalen abgeschabt. Das gewonnene Gesamtlysate

wurde 4 Minuten bei 95 °C erhitzt, um eine Denaturierung der Proteine zu gewährleisten. Anschließend wurde eine quantitative Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot durchgeführt.

3.2. Humane linksatriale Appendices

Die Gewebeproben aus humanen linksatrialen Appendices (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Schäfers, Universität des Saarlandes) stammen von Patienten, die sich einer Mitralklappenoperation unterzogen (Adam et al., 2007). Präoperativ wurden diese Patienten elektrokardiographisch in Sinusrhythmus oder permanentes Vorhofflimmern unterschieden, wobei permanentes Vorhofflimmern als dokumentierte Rhythmusstörung über mehr als sechs Monate definiert wurde. Die Gruppen wurden nach Vorhofdurchmesser, linksventrikulärer Funktion und Medikation gepaart. Präoperativ erhielten alle Patienten mindestens zwölf Stunden keine Medikamente und wurden einer standardisierten Echokardiographie unterzogen. Das entnommene Gewebe wurde schockgefroren und bei minus 80 °C aufbewahrt.

Zur quantitativen Analyse wurde ein kleines Gewebestück in hypotonem Lysepuffer vollständig homogenisiert. Diese Probe wurde anschließend eine Minute bei 2000 U/min zentrifugiert und der Überstand zur weiteren Verwendung abgenommen. Daraus wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry und eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Die Charakteristika der Patienten sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Patienten-Charakteristika.

	SR	SEM	AF	SEM	P
n =	7		8		
männlich (weiblich)	5(2)		4(4)		
Alter [Jahre]	65,0	2,5	73,4	5,9	ns
Größe [cm]	172,0	2,7	176,12	2,3	ns
Gewicht [kg]	76,6	4,2	85,0	3,5	ns
LA [mm]	52,7	4,0	52,14	3,8	ns
LVEF [%]	58,3	8,1	64,5	6,6	ns
LVESd [mm]	42,5	5,3	35,2	2,0	ns
LVEDd [mm]	56,0	4,7	51,3	2,8	ns
FS [%]	30,2	5,2	32,3	1,2	ns
IVSd [mm]	11,2	0,6	13,2	1,0	ns
LVPWd [mm]	11,5	0,7	12,2	1,2	ns
Arterielle Hypertonie	5		7		
Raucher	1		4		
Diabetes mellitus	1		1		
Familienanamnese KHK	0		3		
Hyperlipidämie	2		0		
Beta-Blocker	4		5		
ACE-Hemmer	4		4		
AT ₁ -Antagonisten	1		1		
Kalzium-Antagonisten	1		0		
Diuretika	5		7		
Nitrate	0		1		
Digitalis	0		0		
Amiodaron	0		0		
Sotalol	0		0		
Statin	2		0		

ACE = Angiotensin Converting Enzyme, AT₁ = Angiotensin II-Rezeptor Typ 1, KHK = koronare Herzkrankheit, FS = Fraction of Shortening (Verkürzungsfraktion), IVSd = interventrikuläre Septumdicke, LA = linker Vorhof, LVEDd = linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser, LVEF = Linksventrikuläre Ejektionsfraktion, LVESd = linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser.

3.3. Transgene Mäuse mit kardialer Rac1-Überexpression (RacET)

Die transgenen Mäuse mit kardialer Überexpression von konstitutiv aktivem (V12) Rac1 unter Kontrolle des alpha-myosin heavy chain (MHC)-Promotors (RacET) wurden freundlicherweise von Mark A. Sussmann (San Diego State University, SDSU Heart Institute and Department of Biology, San Diego, CA, USA) zur Verfügung gestellt, der auch die Charakteristika der Tieren beschrieb (Sussman et al., 2000). Als Kontrolle dienten FVBN-Mäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld), die im Folgenden als Wildtyp (WT) bezeichnet werden. Die Mäuse wurden mit herkömmlichem Futter (ssniff) oder mit herkömmlichem Futter unter Zusatz von 0,4 mg Rosuvastatin pro Tag gefüttert. Gewählt wurde Rosuvastatin aufgrund von vorausgegangenen Mausexperimenten mit diesem Medikament (Adam et al., 2007; Custodis et al., 2006). Herzfrequenz, Herzrhythmus und die Existenz von P-Wellen wurde durch zwei elektrokardiographische Aufnahmen dokumentiert, am Tag vor und am Tag der Tötung. Alle Mäuse wurden transthorakal echokardiographiert. Lungen- und Leberperfusion wurden definiert als Feuchtgewicht minus Trockengewicht.

Nach der Tötung der Mäuse im Alter von zehn Monaten wurde ein kleines Gewebestück aus dem linken Ventrikel entnommen und in hypotonem Lysepuffer vollständig homogenisiert. Daraus wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry und eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Die Charakteristika der Tiere sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Charakteristika von WT-, RacET 10- und RacET 10 + Statin-Mäuse.

	WT	SEM	RacET 10	SEM	RacET 10 + Statin	SEM	P
Herzfrequenz [Schläge/Minute]	216,0	5,1	243,3	24,9	247,0	20,3	ns
Maus [g]	23,1	0,4	39,6	1,5	34,6	2,5	<0,001/ns/0,001
Tibia [mm]	16,8	0,2	18,2	0,3	17,2	0,1	<0,001/0,003/ns
Herz [mg]	131,0	14,0	238,1	17,4	224,3	22,4	<0,001/ns/0,001
Vorhof [mg]	10,3	1,0	19,4	1,3	17,4	2,5	<0,001/ns/0,007
LV [mg]	92,6	11,6	165,7	14,4	153,1	16,4	0,001/ns/0,006
RV [mg]	15,1	1,2	26,3	1,6	25,1	2,7	0,001/ns/0,001
Lungenwasser [µl]	151,0	15,7	164,3	23,4	175,8	7,8	ns
Leberwasser [µl]	751,4	113,3	1686,2	324,7	1342,0	73,4	0,003/ns/0,049
Herz[mg]/Tibia[mm]	7,7	0,7	14,3	1,5	13,4	1,3	0,001/ns/0,003
Vorhof[mg]/Tibia[mm]	0,6	0,0	1,0	0,1	1,0	0,1	ns
Vorhof[mg]/Herz[mg]/Tibia[mm]	4,6	0,2	4,5	0,3	4,5	0,5	ns

Wild-Typ Mäuse (WT) wurden mit zehn Monate alten RacET (RacET 10) und mit RacET 10 + Statin-Mäusen verglichen, die für zehn Monate mit 0,4 mg Rosuvastatin pro Tag behandelt wurden. n = 9.

LV = linker Ventrikel, RV = rechter Ventrikel.

3.4. Proteinexpression und Western Blot

Das Western Blot-Verfahren stellt eine molekularbiologische Methode zur quantitativen Proteinbestimmung dar. Dazu wird aus Zelllysaten gewonnenes Gesamtprotein gelelektrophoretisch aufgetrennt, um Proteine gemäß ihrer Molekulargröße zu separieren. Die aufgetrennten Proteine werden von dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Blot) und mit einem spezifischen, gegen das gesuchte Protein gerichteten Antikörper, inkubiert. Nach Abwaschen der ungebundenen Antikörperfragmente wird die Membran mit einem zweiten, Peroxidase-konjugierten Antikörper inkubiert. Nach erneutem Abwaschen wird ein Fluoreszenzfarbstoff hinzugegeben, welcher durch die Peroxidase katalysiert wird und zu fluoreszieren beginnt. Die Fluoreszenz wird mit Hilfe eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht und das Signal durch Densitometrie quantifiziert.

3.4.1. Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung des Gesamtlysats aus Kardiomyozyten, Fibroblasten, RacET-Mäusen und humanen linksatrialen Appendices erfolgte nach der Methode von Lowry (Lowry et al., 1951), eine der Biuret-Methode verwandte, kolorimetrische Methode.

Im ersten Schritt wird ein Kupfer-Protein-Komplex in alkalischer Lösung gebildet (Bio-Rad, D_C Protein Assay Reagent A). Dieser Komplex reduziert ein zugegebenes Phosphomolybdat-Phosphowolfram-Reagens (Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagens; Bio-Rad, D_C Protein Assay Reagent B), wobei sich die Lösung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration intensiv blau färbt. Die Absorption der Lösung wurde bei 540 nm photometrisch gemessen. Als Standard diente Rinderserumalbumin in einem Konzentrationsbereich von 100 - 1000 µg/ml.

3.4.2. Gelelektrophorese

Um die Konzentration des interessierenden Proteins bei verschiedenen Versuchsbedingungen vergleichen zu können, wurden, falls nicht anders angegeben, jeweils 50 µg Gesamtlysate auf ein 10 % SDS-Polyacrylamidgel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde in Anwesenheit einer äquivalenten Menge Ladepuffer durchgeführt.

3.4.3. Protein-Transfer

Die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte mit Hilfe eines Transferpuffers und Filtern sowie der Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell von Biorad.

Die Nitrozellulose-Membran wurde anschließend für circa 20 Stunden bei 4 °C in einer einprozentigen Blocking Solution belassen, um freie Oberflächen-Bindungsstellen zu blocken.

3.4.4. Antikörperinkubation

Um die Konzentration der unterschiedlichen Proteine auf den so hergestellten Nylonmembranen zu untersuchen wurden sie mit einem spezifischen Antikörper (Primärantikörper, 1:250 verdünnt) für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die nichtgebundenen Antikörperfragmente wurden mit PBS-Tween-Puffer abgewaschen. Danach wurden die Membranen mit einem zweiten, Peroxidase-konjugiertem Antikörper (Sekundärantikörper, 1:4000 verdünnt) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die ungebundenen Fragmente wurden wiederum mit PBS-Tween-Puffer abgewaschen. Die an die Proteinbanden gebundenen Fragmente wurden mit dem ECL-Kit (enhanced chemiluminescence) auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht und densitometrisch quantifiziert.

3.4.5. Abweichungen

Einzelne technische Abweichungen zu obigem Western-Blot-Verfahren werden im Folgenden gesondert angegeben.

Inkubation mit Connexin 43-Antikörper

- Western Blot mit 12 % SDS-Polyacrylamidgel,
- Primärantikörper: 1:2500 verdünnt.

Inkubation mit N-cadherin-Antikörper

- Western Blot mit 8 % SDS-Polyacrylamidgel, beladen mit 120 µg Gesamtlysat,
- geblockt in 5 % Trockenmilch für 1 h bei RT,

- Primärantikörper: 1:1000 verdünnt in 1 % Trockenmilch, inkubiert für 12 h bei 4 °C.

3.4.6. Statistische Auswertung

Die Intensitäten der Western Blot-Banden wurden mittels Densitometrie ausgewertet. Die angegebenen Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Unpaired Student's *t* tests, Mann-Whitney *U* test und ANOVA wurden für mehrfache Vergleiche angewendet. Dazu wurde die Sigma Stat-Software, Version 2.0, verwendet. Statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen.

3.5. Angiotensin II-ELISA

Der Angiotensin II-ELISA stellt ein quantitatives Verfahren dar, wobei mittels kompetitivem Enzym-Immunverfahren der Angiotensin II-Gehalt gemessen wird.

Die Gewebeproben aus humanem linksatrialem Appendix wurden zunächst in PBS-Pufferlösung mit 1 % Triton X-100 homogenisiert, anschließend 20 Minuten bei 14000 U/min zentrifugiert und der Überstand zur weiteren Verwendung abgenommen. Für die spätere Verrechnung wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt. Auf eine 96-Well-Mikroplatte, die mit einem Angiotensin II spezifischen polyklonalen Antikörper vorbeschichtet war, wurden je 50 μ l Gewebelysat pro Well gegeben und je 25 μ l biotinyliertes Angiotensin II zugefügt. Dieses konkurrierte nun während der zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur kompetitiv mit Angiotensin II aus dem Gewebelysat um die Bindungsstellen an dem vorbeschichteten Angiotensin II-Antikörper. Anschließend wurde ungebundenes Angiotensin II mit Waschpuffer abgewaschen, je 50 μ l Streptavidin-Peroxidase Konjugat pro Well zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren Waschgängen folgte die Zugabe von 50 μ l Chromogen Substrat, das 20 Minuten inkubierte, bis es durch Reaktion mit gebundenem Streptavidin-Peroxidase Konjugat seine blaue Farbe entwickelte. Nach Zugabe von 50 μ l einer Stopp-Lösung wechselte die Farbe von blau nach gelb. Unmittelbar wurde nun die Absorption mit einem ELISA-Reader bei 450 nm gemessen.

Aus jeder Gewebeprobe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Aus der erstellten Standardkurve aus Proben definierter Angiotensin II-Konzentrationen (4 ng/ml, 1 ng/ml, 0,25 ng/ml, 0 ng/ml) wurde der Gehalt an Angiotensin II im Gewebe errechnet.

3.6. Immunhistochemische Färbungen

Zur Herstellung der Paraffinschnitte wurde der operativ entnommene linksatriale Appendix zunächst über Nacht bewässert und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol entwässert. Danach wurde das Gewebe in Paraffin eingelegt. Zur weiteren Verwendung wurden am Mikrotom 5 µm dünne Schnitte auf einen Objektträger aufgetragen und die Adhäsion bei 60 °C gefestigt.

3.6.1. CTGF-immunhistochemische Färbung

Die Gewebeschnitte wurden zunächst in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und in destilliertem Wasser sowie in PBS-Tween-Puffer gewaschen. Anschließend wurden sie in einem 0,05 % Citraconsäureanhydrit Puffer (pH 7,4) für eine Stunde im 37 °C Wasserbad inkubiert. Nach einer 30minütigen Abkühlung auf Raumtemperatur und Waschen mit PBS-Tween-Puffer folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper gegen CTGF in einer Konzentration von 1:30 in PBS-Tween-Puffer über Nacht bei 4 °C. Am folgenden Tag wurden die Schnitte für zwei Stunden in der Feuchten Kammer im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und anschließend ungebundene Antikörperfragmente mit PBS-Tween-Puffer abgewaschen. Danach wurden freie Bindungsstellen in 5 % Trockenmilch während 30 Minuten geblockt. Anschließend folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper Anti-Goat IgG Peroxidase 1:500 in obiger Blocklösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nachdem ungebundene Antikörperfragmente mit PBS-Tween-Puffer abgewaschen worden waren, wurde die Färbung mit biotinyliertem Tyramide 1:50 in Amplific Dilution für 10 Minuten bei Raumtemperatur verstärkt. Darauf folgte die Inkubation mit Streptavidin TRITC Antikörper 1:50 in PBS-Tween-Puffer für 30 Minuten bei 37 °C. Ungebundene Antikörperfragmente wurden mit

PBS-Tween-Puffer abgewaschen und die Paraffinschnitte entweder gegen Vimentin oder gegen α -sarcomeric Aktin weiter gefärbt.

3.6.2. Vimentin-immunhistochemische Färbung

Die bereits gegen CTGF gefärbten Paraffinschnitte wurden nun mit dem Primärantikörper gegen Vimentin in einer Konzentration von 1:30 in PBS-Tween-Puffer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst für zwei Stunden in der Feuchten Kammer im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und anschließend ungebundene Antikörperfragmente mit PBS-Tween-Puffer abgewaschen. Es folgte die Sekundärantikörper-Inkubation mit Anti-Mouse FITC 1:30 in PBS-Tween-Puffer für eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad. Nachdem ungebundene Sekundärantikörperfragmente mit PBS-Tween-Puffer abgewaschen worden waren, wurden die Schnitte mit Dapi (Vectashield) und Mounting Medium (Dako) eingedeckt.

3.6.3. α -sarcomeric Actin-immunhistochemische Färbung

Die Paraffinschnitte wurden zunächst in SSC-Puffer gewaschen und freie Bindungsstellen in SSC-Puffer + 4 % BSA für 10 Minuten bei 37 °C im Wasserbad geblockt. Der Primärantikörper gegen α -sarcomeric Actin in einer Konzentration von 1:30 in obiger Blocklösung inkubierte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag folgte zunächst eine Inkubation für zwei Stunden in der Feuchten Kammer im Wasserbad bei 37 °C und anschließendes Abwaschen ungebundener Antikörperfragmente mit SSC-Puffer. Daraufhin wurden die Schnitte mit dem Sekundärantikörper Anti-Mouse FITC 1:50 in SSC-Puffer für eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nachdem ungebundene Antikörperfragmente mit SSC-Puffer abgewaschen worden waren, wurden die Schnitte mit Dapi (Vectashield) und Mounting Medium (Dako) eingedeckt.

3.6.4. Digitalisieren der immunhistochemischen Färbungen

Die Färbungen wurden lichtmikroskopisch (NIKON Eclipse E600) mit einer Digitalkamera aufgenommen und mittels der Lucia G Software ausgewertet.

3.7. Material

3.7.1. Medien, Lösungen, Puffer

ADS-Puffer	Aqua dest., 6,78 g/l NaCl, 4,76 g/l HEPES, 8 ml/l Na ₂ HPO ₄ , 1 g/l Glucose, 0,4 g/l KCl, 8 ml/l MgSO ₄ x 7 H ₂ O
1 % Blocking Solution	1 ml Blocking Solution in 100 ml PBS-Puffer
DMEM-Nährmedium	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (+ Glukose 4,5 g/l; + L-Glutamin; – Pyruvat), FKS (10 % [v/v]), Penicillin-Streptomycin (20 U/ml Penicillin G; 20 µg/ml), Gentamycinsulfat (0,08 mg/ml)
DMEM-Hungermedium	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (+ Glukose 4,5 g/l; + L-Glutamin; – Pyruvat), FKS (10 % [v/v]), Penicillin-Streptomycin (20 U/ml Penicillin G; 20 µg/ml), Gentamycinsulfat (0,08 mg/ml)
Elektrophoresepuffer	Aqua dest., 144 mg/ml Glycin, 30,3 mg/ml Tris, 10 mg/ml SDS
Enzym-Mix	ADS-Puffer, 0,6 mg/l Pankreatin, 0,5 mg/l Kollagenase
F 10 Medium	F 10 Medium (Ham + Glutamin), Horse Serum (10 % [v/v]), FKS (5 % [v/v]), Penicillin/Streptomycin (1 % [v/v])
Ladepuffer	Aqua dest., 5 ml 50 % Glycerol, 1,25 g 10 % SDS, 2,5 ml 0,625 M Tris, 125 µl/ml 1 M DTT
Lysepuffer	100 mM Tris pH 6,8, 4 % SDS, 20 % Glycerol, 1 µg/ml 100 mM PMSF, 1 µg/ml Leupeptin, 0,72 µg/ml Aprotinin

5 % (1 %) Trockenmilch	5 g Trockenmilchpulver (1 g) in 100 ml PBS-Tween-Puffer
PBS-Puffer	Aqua dest., 80 g/l NaCl, 2 g/l KCl, 14,4 g/l Na ₂ HPO ₄ , 2,4 g/l KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
PBS-Tween-Puffer	Aqua dest., 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 0,24 g/l KH ₂ PO ₄ , 1,44 g/l Na ₂ HPO ₄ , 1 ml/l Tween 20
SSC-Puffer	Aqua dest., 35,06 g/l NaCl, 17,95 g/l Natriumcitrat
Transferpuffer	Aqua dest., 200 ml/l Methanol, 14,5 mg/ml Glycin, 2,9 mg/ml Tris; pH 8,3

3.7.2. Antikörper

Primärantikörper

A-sarcomeric Actin, Mouse IgM	Sigma-Aldrich Chemie, München
CTGF (L-20), Goat IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Connexin 43, Rabbit	Sigma-Aldrich Chemie, München
N-cadherin (D-4), Mouse IgG ₁	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Rac1 (clone 23A8), Mouse IgG _{2b}	upstate cell signaling solutions, NY, USA
Vimentin, Mouse IgG	Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA

Sekundärantikörper

Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Konjugat	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Goat Anti-Rabbit IgG-Peroxidase	Sigma-Aldrich Chemie, München
Rabbit Anti-Goat IgG-Peroxidase	Sigma-Aldrich Chemie, München
Rhodamine (FITC)-conjugated Anti-Mouse IgG	Dianova, Hamburg
Rhodamine (FITC)-conjugated Anti-Mouse IgM	Dianova, Hamburg
Rhodamine (TRITC)-conjugated Streptavidin	Dianova, Hamburg

3.7.3. Verbrauchsmaterial

Cover Glasses	VWR International, Darmstadt
---------------	------------------------------

Falcon Cell Strainer (70 µm)	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
High Performance autoradiography film	GE Healthcare, München
Nitrocellulose/Filter Paper Sandwiches, 0,2 µm	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
P 6 Primera Zellkulturschalen	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
Polysine beschichtete Objektträger	VWR International, Darmstadt
PP-Test-tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner-bio.one, Frickenhausen
Zellkulturschale 100 mm	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschale TC-plate 6 well	Greiner-bio.one, Frickenhausen

3.7.4. Chemikalien, sonstige Reagenzien

Acrylamid Electrophoresis Purity Reagent 30%	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Albumin bovin Fraction V (BSA) pH 7,0	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Angiotensin II	Sigma-Aldrich Chemie, München
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Blocking Solution	Roche, Mannheim
Connective Tissue Growth Factor (CTGF)	Biozol, Eching
Citraconsäureanhydrit 98 %	Sigma-Aldrich Chemie, München
Fluorescent Mounting Medium	Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA
Dublecco's modifiziertes Eagle Medium	Gibcco BRL Life Technologies, Eggenstein
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)	VWR International, Darmstadt
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie, München
Ethanol	Merck, Darmstadt
F 10-Medium	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FKS)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Gentamycinsulfat	Merck, Darmstadt
Glukose	Sigma-Aldrich Chemie, München
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie, München
HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)piperaziny-N'-2-ethanesulfonsäure)	Sigma-Aldrich Chemie, München
Horse Serum	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe

Immersion Oil	Cargille Laboratories, Inc., Cedar Grove, NJ, USA
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenkarbonat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt
Trockenmilchpulver	Scufin, Zeven
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Neonatal Calf Serum (NCS)	Invitrogen, Karlsruhe
Paraffin	Leica Microsystems, Nussloch
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie, München
2-Propanol	VWR International, Darmstadt
Rosuvastatin (Crestor®)	AstraZeneca, London, UK
Futtermittel	ssniff, Soest, Germany
N,N,N`N`-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris)	VWR International, Darmstadt
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie, München
Trypsin-EDTA	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Tyramide Reagent Pack	PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, USA
Vectashield Mounting Medium with Dapi	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Wasser, vollentsalzt und destilliert (Aqua. dest.)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Xylol	Merck, Darmstadt

3.7.5. Enzyme und Kits

AssayMax Human Angiotensin II ELISA Kit	Assaypro, St. Charles, MO, USA
Dc Protein Assay Reagent A	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Dc Protein Assay Reagent B	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

ECL Western Blotting Detection Reagents
Kollagenase von Clostridium histolyticum

GE Healthcare, München
Worthington Biochemical, Lakewood, NJ,
USA

Pankreatin

Sigma-Aldrich Chemie, München

3.7.6. Geräte

Autoklaviergerät Tuttnauer 3850 EL

Tuttnauer Europe B.V., Breda,
Niederlande

Eismaschine Scotsman Frimont MF 22

Scotsman Frimont, Milano, Italien

ELISA Reader Model 550

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Entwicklungsautomat Curix 60

Agfa, Mortsels, Belgien

Magnetrührer Typ RCT

IKA Labortechnik, Staufen i. Br.

Metallblockthermostat HTMR-133

HLC Biotech, Bovenden, Deutschland

Mikroskope:

Nikon Eclipse E600

Nikon GmbH, Düsseldorf

Olympus CK 2 Inverted phase contrast

Olympus Deutschland GmbH, Hamburg

Mikrotom

Leica Microsystems, Nussloch

Mini-Protean 3 Cell

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Mini-Protean Gelgießstand

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Nikon Digital Camera DXM1200F

Nikon GmbH, Düsseldorf

pH-Meter 526

WTW GmbH, Weilheim

Spectrophotometer DU 730

Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA

Pipetterhilfe Pipetus Akku

Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt

Power Pac 200 Power Supply

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Röntgenkassette 24 x 30 cm

Dr. Goos-Suprema, Heidelberg

Scanner CanoScan 5000F

Canon Deutschland, Krefeld

Schüttel- und Mischgerät Polymax 1040

Heidolph Instruments, Schwabach

Schüttelwasserbad Typ 1086

Gesellschaft für Labortechnik,
Burgwendel

Stickstoffbehälter GT 140

Air Liquide, Düsseldorf

Stickstofftank Apollo 50

Messer Griesheim, Krefeld

Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Vortexer VV3

VWR International, Darmstadt

Waagen:

VIC-Series 0.01g Precision Balances

Acculab UK, Edgewood, NY

ALC-Series 0.0001g Analytical Balances

Acculab UK, Edgewood, NY

Überkopfschüttler REAX 2

Heidolph Instruments, Schwabach

Zählkammer BLAUBRAND, nach Neubauer

Blaubrand, Wertheim

Zellkulturgeräte:

Heracell 150 Cell Culture Incubator

Heraeus Holding, Hanau

Sicherheitswerkbank Heraeus HS 12

Heraeus Holding, Hanau

Sicherheitswerkbank Heraeus KS 12

Heraeus Holding, Hanau

Zentrifugen:

Biofuge pico

Heidolph Instruments, Schwabach

Megafuge 1,0

Heraeus Holding, Hanau

3.7.7. Software

LabWorks 4.6

UVP, Upland, CA, USA

Lucia G, Version 4.81

Laboratory Imaging, Praha, CZ

Sigma Stat-Software, Version 2.0

Systat Software GmbH, Erkrath

XnView

Pierre-Emmanuel Gougelet, Reims,
Frankreich

4. Ergebnisse

4.1. Protein- und Genexpression von CTGF in humanen linksatrialen

Appendices bei Vorhofflimmern

Die Gewebeproben des linksatrialen Appendix (LAA) stammen von Patienten mit Sinusrhythmus oder Vorhofflimmern, die sich einer Mitralklappenoperation unterzogen. Präoperativ wurden diese Patienten elektrokardiographisch in Sinusrhythmus (SR) oder permanentes Vorhofflimmern (VHF) unterschieden und nach Vorhof-Durchmesser, linksventrikulärer Funktion und Medikation gepaart (Tabelle 1). Die Patienten mit Vorhofflimmern enthielten gegenüber jenen im Sinusrhythmus mehr Kollagen im LAA (Adam et al., 2007).

Um Gene zu identifizieren, die möglicherweise an der Pathogenese von Vorhofflimmern beteiligt sind, führten wir in Zusammenarbeit mit Prof. Krömer, Universität Greifswald, eine Affymetrix-Analyse an humanen Vorhöfen durch. Die Affymetrix-Methode (GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0; Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) erlaubt die Analyse der Expression des gesamten humanen Genoms. Dabei wird die Transkription humaner Gene in einer Datenreihe quantifiziert und die Genexpression nach Unterscheidungskriterium, d.h. SR- und VHF-Patienten, verglichen. Anschließend werden die Gene funktionell klassifiziert und in entsprechende Kategorien gruppiert.

Unsere Affymetrix-Analyse ergab, dass sich Patienten mit Vorhofflimmern von Patienten mit Sinusrhythmus in ihrer Genexpression im linksatrialen Appendix unterscheiden. Unter anderem zeigte sich in der Kategorie der an der Proliferation von eukaryoten Zellen beteiligten Gene, dass Patienten mit Vorhofflimmern eine vermehrte mRNA-Expression von Connective Tissue Growth Factor (CTGF) aufweisen (211 ± 68 % SR, $p < 0,05$, Abbildung 3).

Wir evaluierten daher, ob CTGF auf Proteinebene bei Vorhofflimmern vermehrt exprimiert wird. In der Western Blot-Analyse humaner LAA zeigte sich eine Erhöhung der Proteinkonzentration von CTGF bei Patienten mit Vorhofflimmern auf 206 ± 29 % SR ($p = 0,0019$, Abbildung 4).

Da diese menschlichen Gewebeproben Lysate aus allen im Herzen vorkommenden Zelltypen darstellen, untersuchten wir mittels immunhistochemischer Färbungen, in welchen Zellen des

atrialen Myokards CTGF exprimiert wird. Dazu färbten wir Kardiomyozyten mit α -sarcomeric Actin, einem spezifischen Indikator für α -skeletales und α -kardiales Muskelaktin, und Fibroblasten mit Vimentin, einem Intermediärfilament-Protein im Zytoplasma von Zellen mesenchymalen Ursprungs, sowie CTGF spezifisch an. Es zeigte sich, dass CTGF überwiegend in Kardiomyozyten exprimiert wird (Abbildung 5), wohingegen kardiale Bindegewebszellen nur wenig CTGF exprimieren (Abbildung 6).

4.2. Angiotensin II-Gehalt in humanem Vorhofgewebe

Um die Rolle des lokalen Renin-Angiotensin-Systems zu untersuchen, führten wir in humanem linksatrialem Appendix-Gewebe einen Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) durch, der einen 7-fach erhöhten Gewebegehalt an Angiotensin II bei Patienten mit Vorhofflimmern gegenüber Patienten mit Sinusrhythmus zeigte ($28 \pm 3,4$ pg/mg Protein bei VHF gegenüber $4 \pm 1,4$ pg/mg Protein bei SR, Abbildung 7).

4.3. Expression von N-cadherin und Connexin 43 in linksatrialen Appendices bei Patienten mit Vorhofflimmern

Eine erhöhte Expression und Aktivität von Rac1, einem unter anderem an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts und der Zell-Zell-Adhäsion beteiligten Protein, wurde bei Patienten mit Vorhofflimmern bereits nachgewiesen (Adam et al., 2007). Wir untersuchten daher die Expression von N-cadherin, einem Transmembranregulator des Aktin-Zytoskeletts, und von Connexin 43, einem Gap-junction-Protein. Die Western Blot-Analyse zeigte eine vermehrte Expression von N-cadherin auf 196 ± 54 % SR ($p = 0,04$, Abbildung 8A) und von Connexin 43 auf 188 ± 18 % SR ($p < 0,001$, Abbildung 8C) in humanen LAA bei Patienten mit Vorhofflimmern.

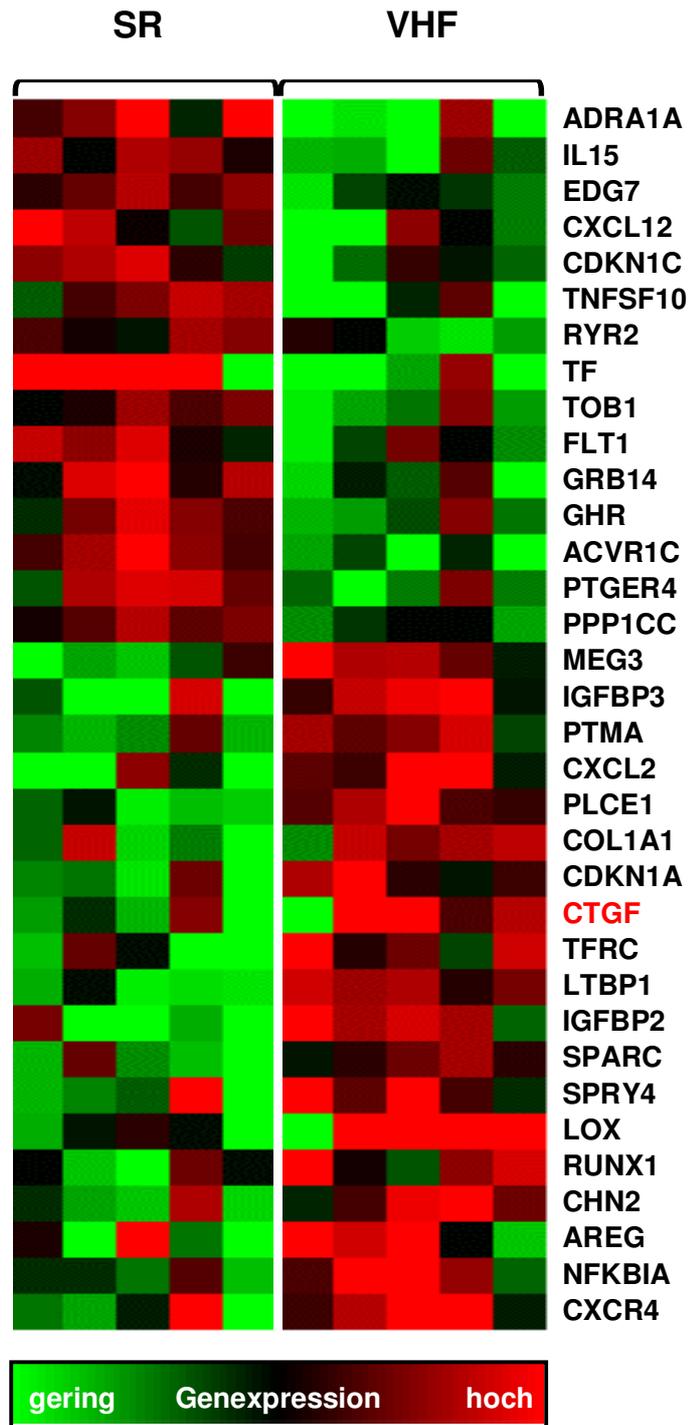


Abbildung 3: Patienten mit Vorhofflimmern weisen eine veränderte Genexpression auf.

Mittels eines Affymetrix-Assay (Prof. Krömer, Universität Greifswald) wurden die mit Vorhofflimmern assoziierten Veränderungen der Genexpression in humanen linksatrialen Appendices quantifiziert. Dargestellt sind an der Proliferation eukaryoter Zellen beteiligte Gene, wobei sich u.a. eine vermehrte mRNA-Expression von CTGF bei Patienten mit Vorhofflimmern zeigte.

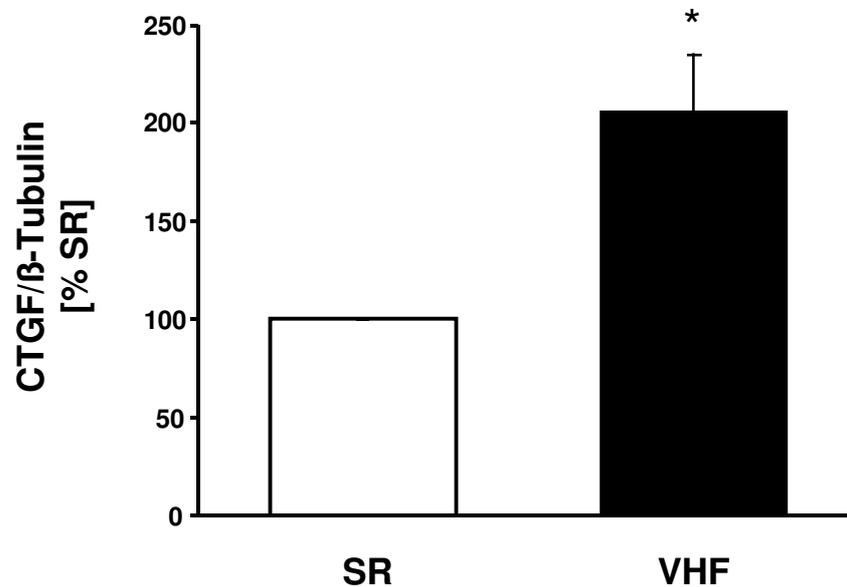
A**B**

Abbildung 4: Patienten mit Vorhofflimmern zeigen eine erhöhte Proteinexpression von CTGF.

Gewebeproben des humanen linksatrialen Appendix von Patienten mit Sinusrhythmus und Vorhofflimmern wurden hinsichtlich ihrer Proteinexpression von CTGF verglichen. **A**, die densitometrische Quantifizierung des Western Blots, normiert auf β -Tubulin als Proteinladekontrolle, zeigte eine Erhöhung der CTGF-Expression ($n = 6$, $*p = 0,0019$) in der Vorhofflimmer- gegenüber der Sinusrhythmus-Gruppe. **B**, repräsentativer Western Blot.

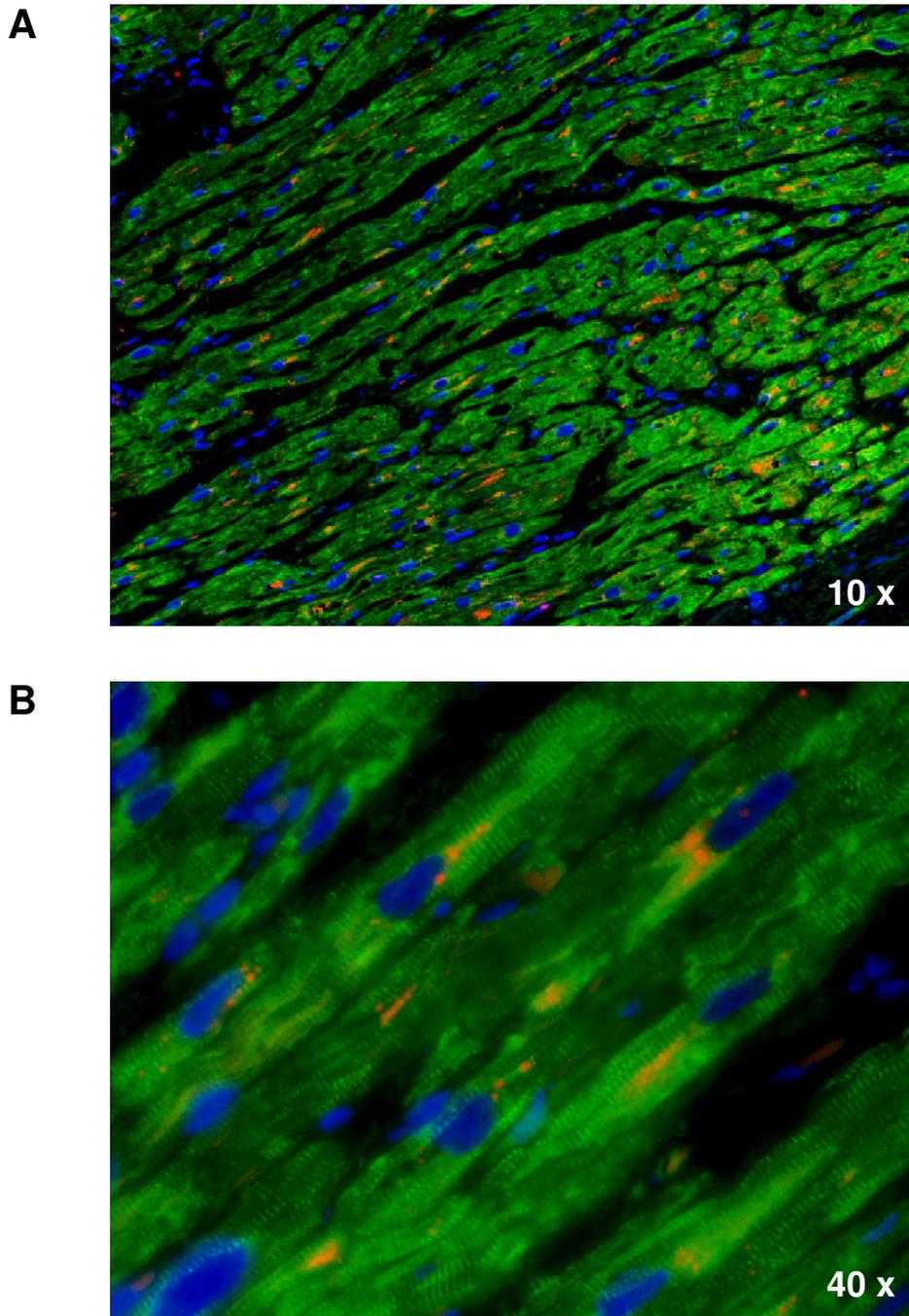


Abbildung 5: CTGF wird überwiegend in Kardiomyozyten exprimiert. Immunfluoreszenz-Bilder von CTGF (TRITC; rot) und α -sarcomeric Actin (FITC; grün) aus humanen linksatrialen Appendices. α -sarcomeric Actin ist ein spezifischer Indikator für α -skeletales und α -kardiales Muskelaktin, hier zur Darstellung von Kardiomyozyten mit charakteristischer Querstreifung. Die Zellkerne sind blau angefärbt. **A**, 10fache lichtmikroskopische Vergrößerung. **B**, 40fache lichtmikroskopische Vergrößerung.

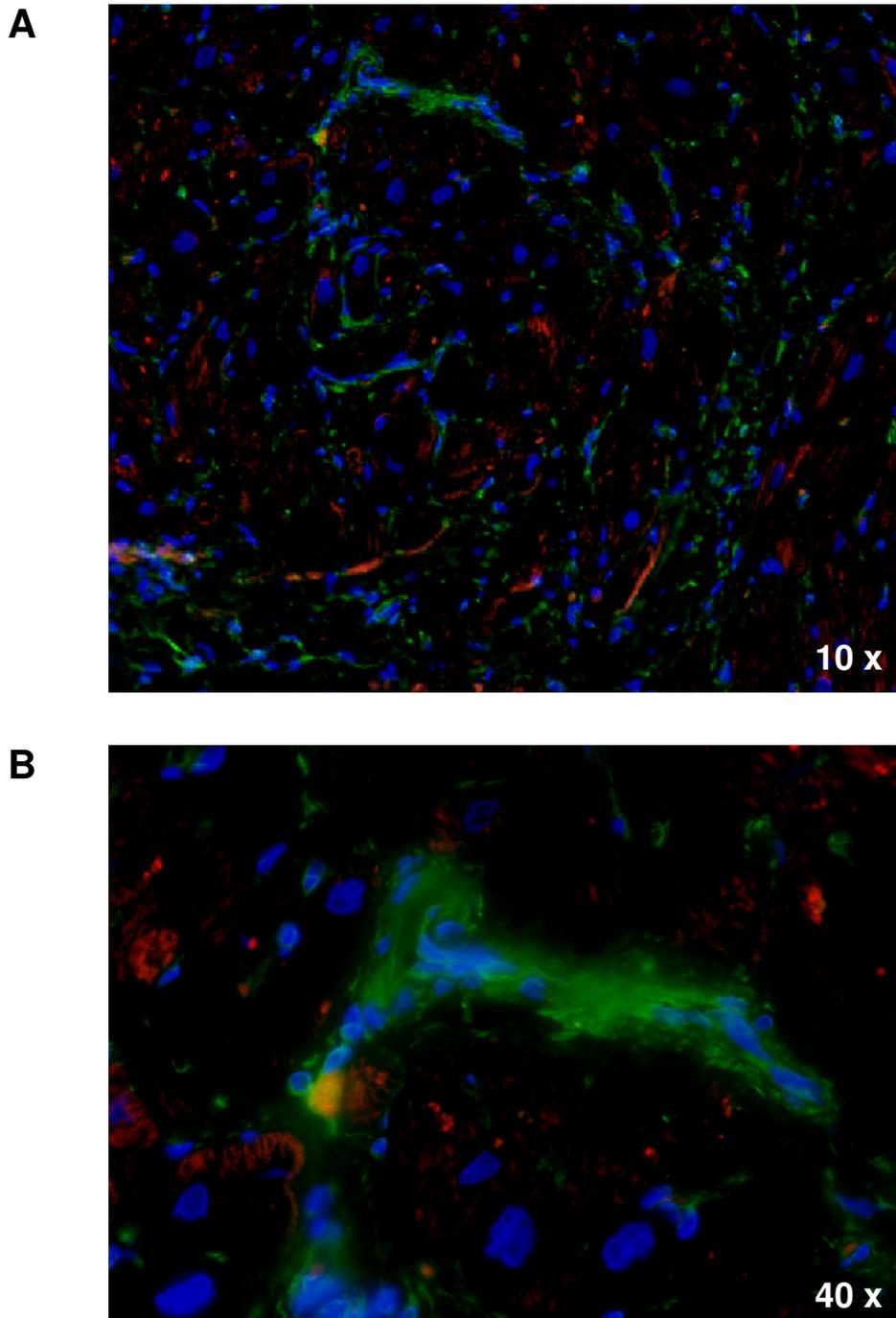


Abbildung 6: Kardiale Bindegewebszellen exprimieren wenig CTGF. Immunfluoreszenz-Bilder von CTGF (TRITC; rot) und Vimentin (FITC; grün) aus humanen linksatrialen Appendices. Vimentin ist ein Intermediärfilament-Protein im Zytoplasma von Zellen mesenchymalen Ursprungs, womit kardiale Bindegewebszellen angefarbt wurden. Die Abbildung zeigt Ausschnitte von interstitieller Fibrose, die bei Vorhofflimmern vermehrt auftritt. **A**, 10fache lichtmikroskopische Vergrößerung. **B**, 40fache lichtmikroskopische Vergrößerung.

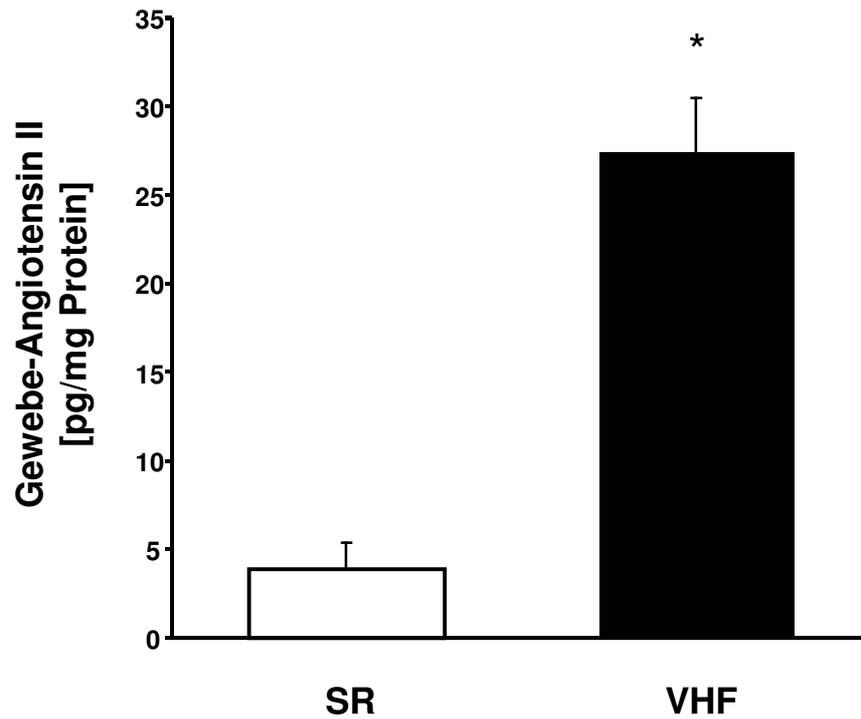


Abbildung 7: Vermehrter Gehalt an Angiotensin II im Vorhofgewebe bei Patienten mit Vorhofflimmern.

Die Quantifizierung des Gehalts an Angiotensin II im linksatrialen Appendixgewebe mittels ELISA zeigte eine 7fache Erhöhung bei Patienten mit Vorhofflimmern gegenüber jenen mit Sinusrhythmus (n = 8, *p < 0,05).

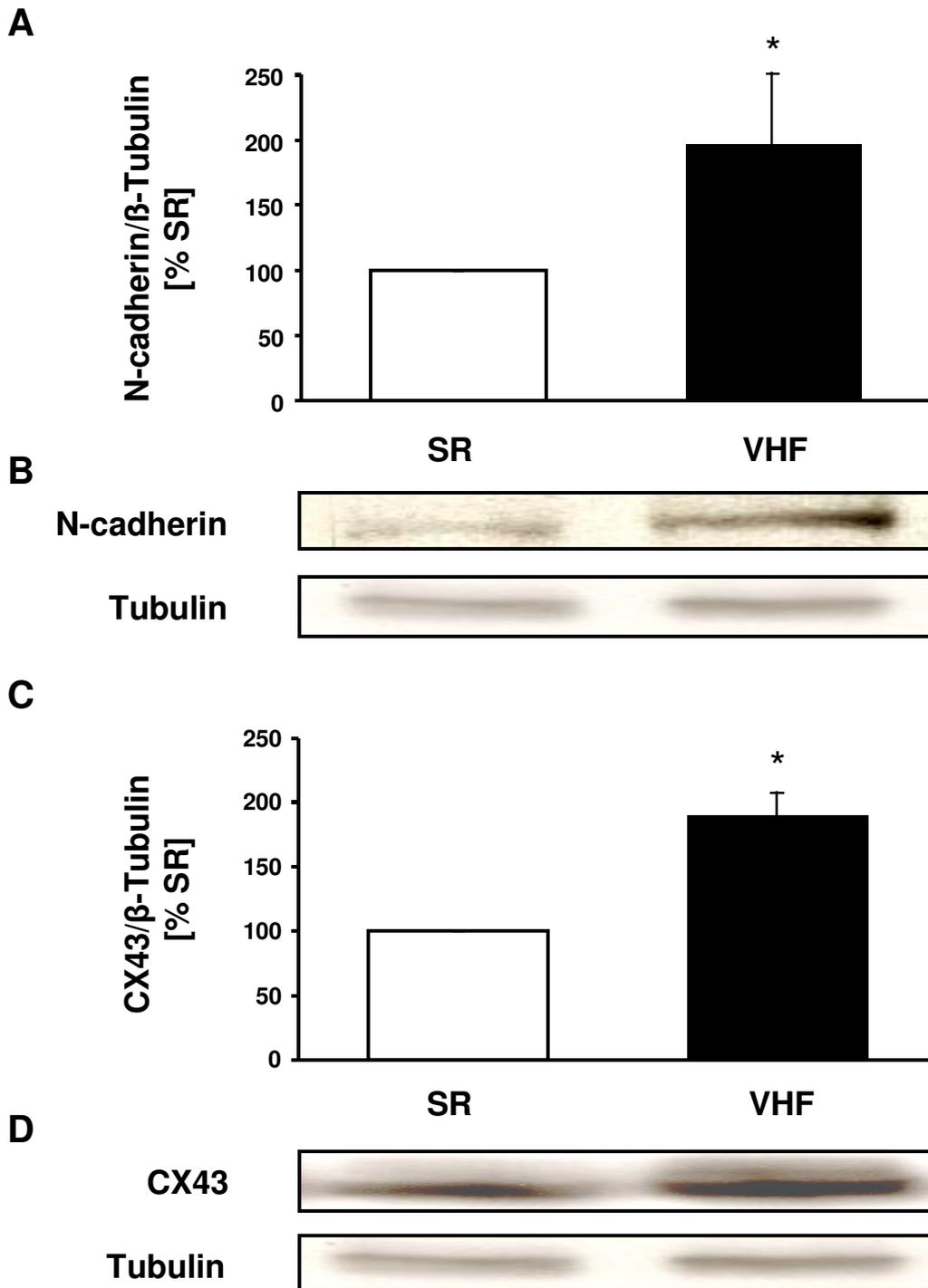


Abbildung 8: Patienten mit Vorhofflimmern weisen eine erhöhte Expression von N-cadherin und Connexin 43 im linksatrialen Appendix auf.

A, die densitometrische Quantifizierung des Western Blots, normiert auf β -Tubulin als Proteinladekontrolle, zeigte eine Erhöhung von N-cadherin (n = 5, *p = 0,04) und **C**, von CX43 (n = 6, *p < 0,001) in der Vorhofflimmer-Gruppe gegenüber der Sinusrhythmus-Gruppe. **B**, repräsentativer N-cadherin-Western Blot. **D**, repräsentativer CX43-Western Blot.

4.4. CTGF-abhängige Expression von N-cadherin und Connexin 43 im Zellkulturmodell

Da CTGF in immunhistochemischen Färbungen von humanen linksatrialen Appendices sowohl in Kardiomyozyten als auch in kardialen Fibroblasten nachgewiesen wurde, untersuchten wir in den folgenden *in vitro*-Experimenten beide Zelllinien bezüglich ihrer Signaltransduktionsmechanismen. Die folgenden Prozentangaben in den Abschnitten 4.4. bis 4.7. beziehen sich jeweils auf Zellen, die als Kontrollen mit Lösungsmittel behandelt wurden. Zur weiteren Differenzierung der Rolle von CTGF bei strukturellem Remodeling bei Vorhofflimmern inkubierten wir neonatale Kardiomyozyten und kardiale Fibroblasten mit und ohne (als Kontrolle) rekombinantem CTGF (1 ng/ml, 1 Stunde) und analysierten die Proteinexpression von N-cadherin und Connexin 43 mittels Western Blot. Die Stimulation mit CTGF führte zu einer fast zweifachen Erhöhung von N-cadherin auf $181 \pm 17 \%$ ($p = 0,03$, Abbildung 9A) und einer geringen, aber statistisch signifikanten Erhöhung der Expression von Connexin 43 auf $133 \pm 3 \%$ ($p < 0,001$, Abbildung 9C) in neonatalen Kardiomyozyten. Die zelluläre Rac1-Expression wurde von der CTGF-Behandlung weder im Zeitverlauf (Abbildung 10A) noch im Konzentrationsverlauf (Abbildung 10C) beeinflusst. In kardialen Fibroblasten zeigten sich ähnliche Ergebnisse. N-cadherin war nach CTGF-Behandlung mit $144 \pm 8 \%$ vermehrt exprimiert ($p = 0,029$, Abbildung 11A), Connexin 43 mit $190 \pm 43 \%$ ($p = 0,008$, Abbildung 11C).

4.5. Rac1-abhängige Expression von CTGF im Zellkulturmodell

Da humane linksatriale Appendices von Patienten mit Vorhofflimmern einen deutlich erhöhten Gehalt an Angiotensin II aufwiesen, behandelten wir kultivierte neonatale Kardiomyozyten und kardiale Fibroblasten mit Angiotensin II (1 μ M, 3 Stunden) und untersuchten die Proteinexpression von CTGF im Western Blot. In beiden Zelllinien zeigte sich nach Behandlung mit Angiotensin II eine Erhöhung der CTGF-Expression, in Kardiomyozyten auf $238 \pm 45 \%$ ($p = 0,01$, Abbildung 12) und in kardialen Fibroblasten auf $195 \pm 27 \%$ ($p = 0,006$, Abbildung 13). Um weiter zu untersuchen, ob Rac1 eine kausale Rolle bei der Proteinexpression von CTGF spielt, präinkubierten wir Zellen mit und ohne den spezifischen Rac1-Inhibitor NSC 23766 (100 nM, 21 Stunden) zusätzlich zur Stimulation mit

Angiotensin II. NSC 23766 verhindert die Aktivierung von Rac1 durch die Rac1-spezifischen guanine nucleotide exchange factors (GEFs) Trio und Tiam1, jedoch ohne die Cdc42- oder RhoA-Aktivität zu beeinträchtigen (Gao et al., 2004). In neonatalen Kardiomyozyten wurde durch Präinkubation mit NSC 23766 die durch Angiotensin II-induzierte erhöhte Expression von CTGF vollständig verhindert ($53 \pm 9 \%$, Abbildung 12). Ebenso war in kardialen Fibroblasten der Effekt von Angiotensin II auf die Expression von CTGF durch Präinkubation mit NSC 23766 vollständig aufgehoben ($79 \pm 24 \%$, Abbildung 13).

4.6. Rac1-abhängige Expression von N-cadherin und Connexin 43 im Zellkulturmodell

Da wir bereits gezeigt haben, dass CTGF die Proteinexpression von N-cadherin und von Connexin 43 zu beeinflussen vermag und die Expression von CTGF selber durch Rac1 reguliert wird, untersuchten wir nun den Einfluss der Rac1 GTPase auf die Expression von N-cadherin und Connexin 43. Diese Experimente führten wir wiederum in neonatalen Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten durch. In Kardiomyozyten beobachteten wir nach Stimulation mit Angiotensin II ($1 \mu\text{M}$, 3 Stunden) zunächst eine vermehrte Expression von N-cadherin auf $235 \pm 83 \%$ ($p < 0,05$, Abbildung 14A) und von Connexin 43 auf $254 \pm 65 \%$ ($p = 0,01$, Abbildung 14B). Dieser Anstieg der Proteinexpression wurde durch Präinkubation mit NSC 23766 (100 mM , 21 Stunden) vollständig verhindert, die Expression von N-cadherin betrug nach Behandlung mit Angiotensin II und NSC 23766 $83 \pm 16 \%$ (Abbildung 14A), die Expression von Connexin 43 $69 \pm 10 \%$ (Abbildung 14B).

In Fibroblasten beobachteten wir ähnliche Effekte. Die Angiotensin II-Behandlung steigerte die Expression von N-cadherin auf $139 \pm 13 \%$ ($p = 0,004$, Abbildung 15A) und von Connexin 43 auf $181 \pm 22 \%$ ($p < 0,001$, Abbildung 15B). Beide Effekte wurden durch Präinkubation mit NSC 23766 vollständig verhindert, die N-cadherin-Proteinexpression betrug nach Behandlung mit Angiotensin II und NSC 23766 $77 \pm 16 \%$ (Abbildung 15A), die Connexin 43-Proteinexpression $105 \pm 15 \%$ (Abbildung 15B).

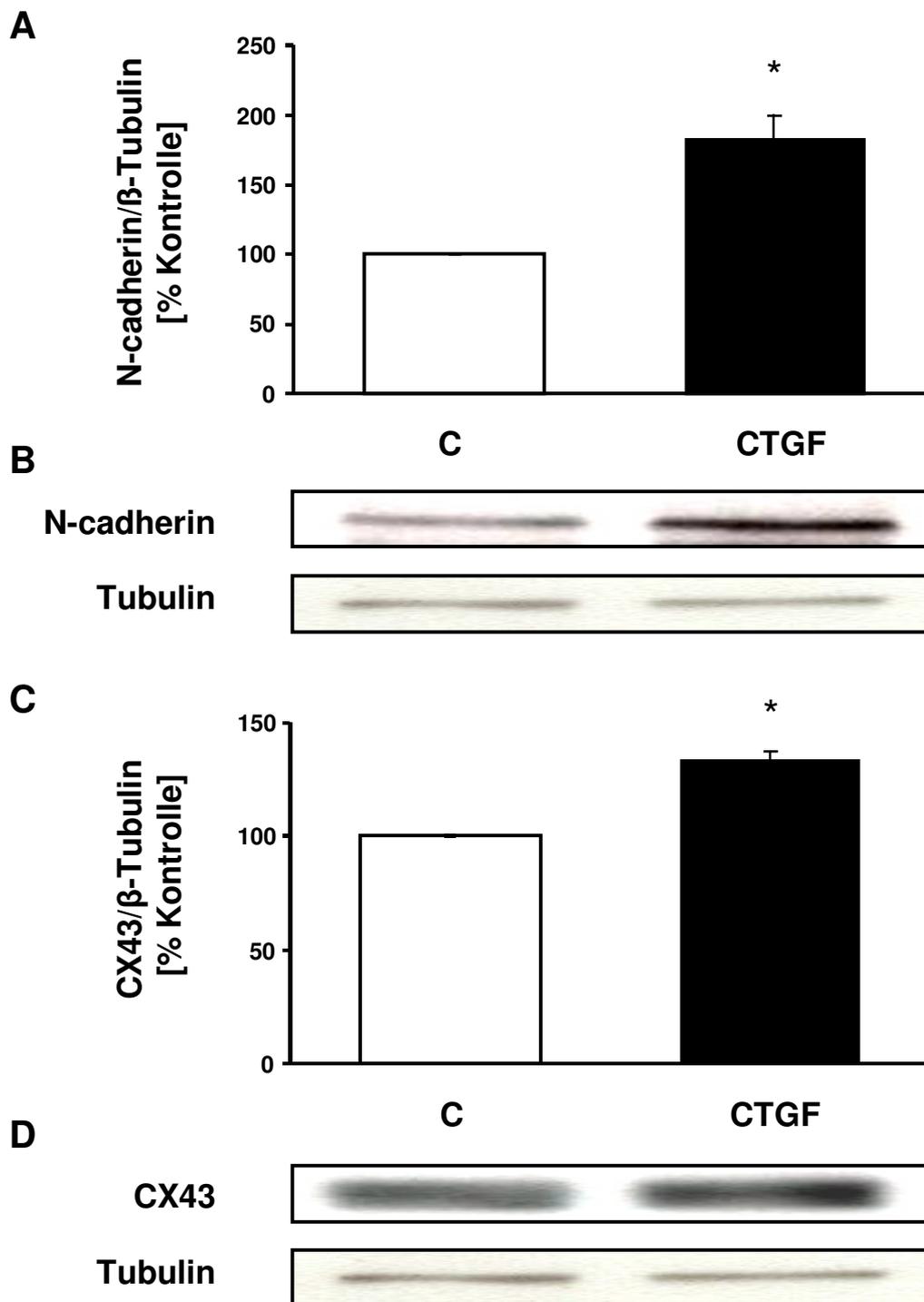


Abbildung 9: In kultivierten Kardiomyozyten führt CTGF zu erhöhter Proteinexpression von N-cadherin und CX43.

Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden mit rekombinatem CTGF (1 ng/ml, 1h) behandelt. **A**, in der densitometrischen Quantifizierung, normiert auf β -Tubulin als Proteinladekontrolle, zeigte sich eine Erhöhung der Expression von N-cadherin ($n = 4$, $*p = 0,03$) und **C**, eine geringe, aber statistisch signifikante Erhöhung von CX43 ($n = 4$, $*p < 0,001$). **B**, repräsentativer N-cadherin-Western Blot. **D**, repräsentativer CX43-Western Blot.

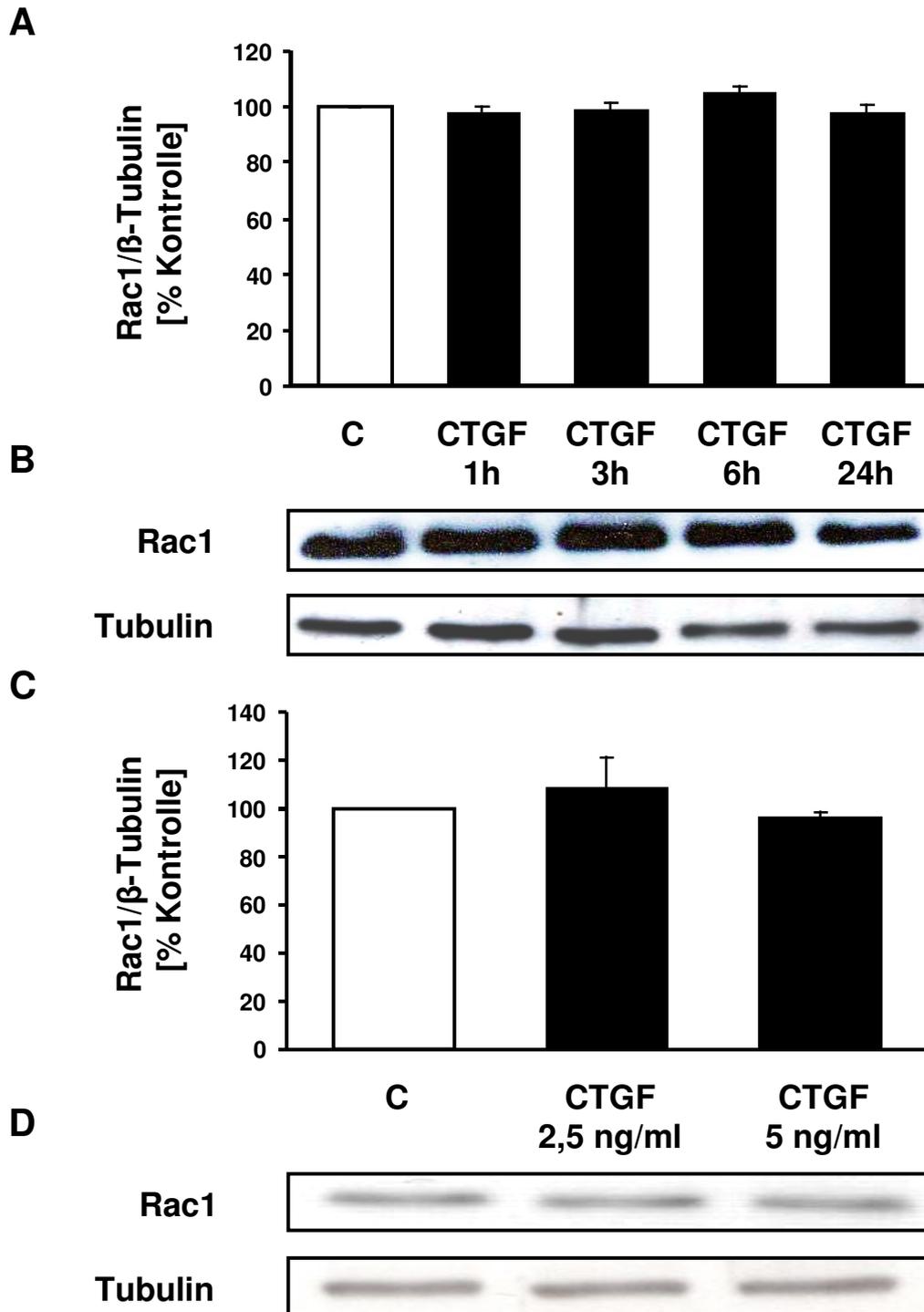


Abbildung 10: CTGF beeinflusst die Rac1-Expression in Kardiomyozyten nicht.

Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden mit rekombinantem CTGF behandelt. **A**, in der densitometrischen Quantifizierung, normiert auf β -Tubulin als Proteinladekontrolle, zeigte sich weder im Zeitverlauf (2,5 ng/ml, 1h, 3h, 6h, 24h), noch **C**, im Konzentrationsverlauf (2,5 ng/ml, 5 ng/ml, jeweils 24h), eine Veränderung der Proteinexpression von Rac1. **B** und **D**, repräsentative Rac1-Western Blots.

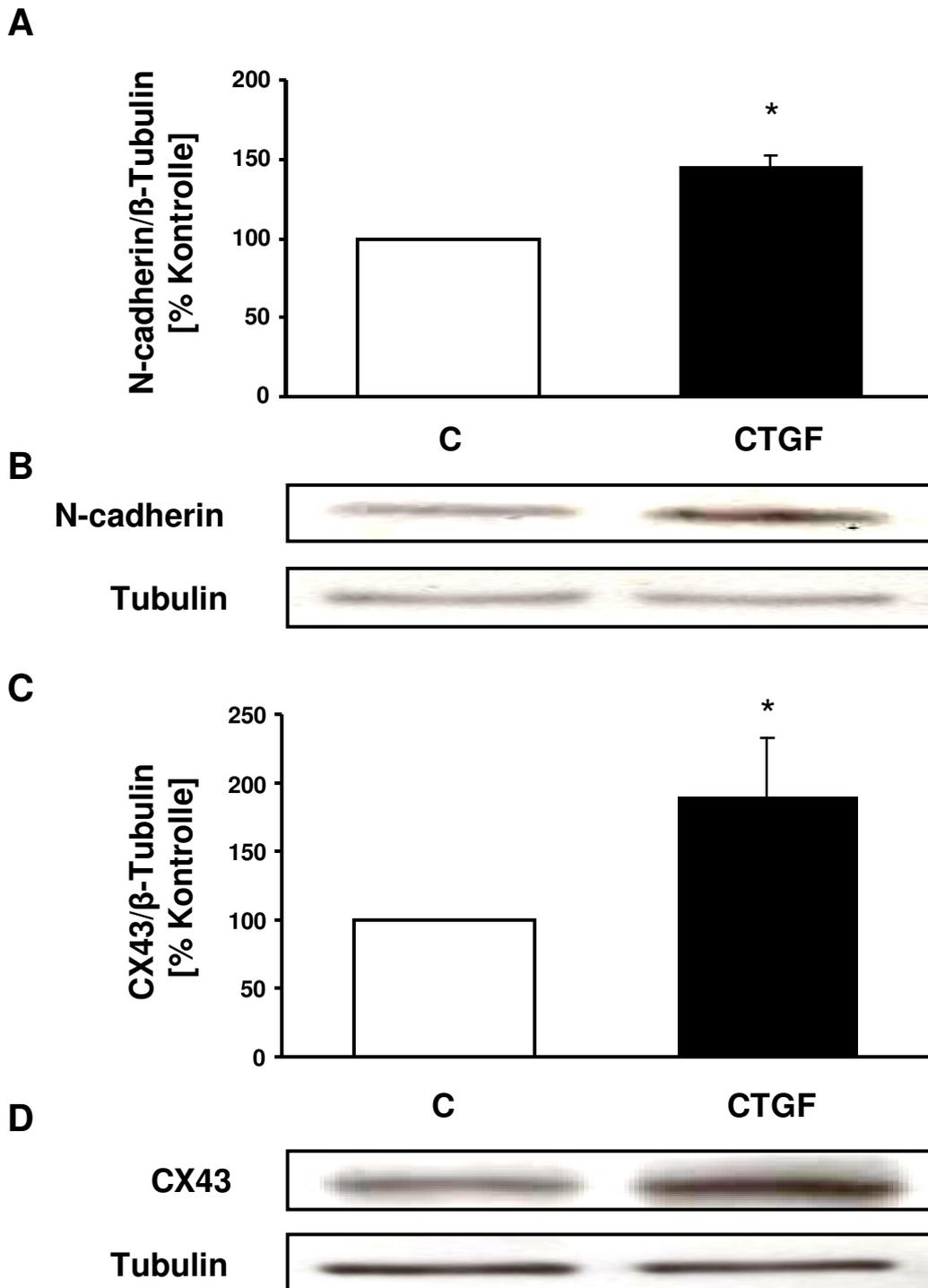


Abbildung 11: CTGF induziert eine vermehrte Proteinexpression von N-cadherin und CX43 in kultivierten kardialen Fibroblasten.

Kardiale Fibroblasten wurden mit rekombinantem CTGF (1 ng/ml, 1h) behandelt. **A**, die densitometrische Quantifizierung, normiert auf β -Tubulin als Proteinladekontrolle, zeigte eine vermehrte Expression von N-cadherin ($n = 4$, $*p = 0,029$) und **C**, von CX43 ($n = 5$, $*p = 0,008$). **B**, repräsentativer N-cadherin-Western Blot. **D**, repräsentativer CX43-Western Blot.

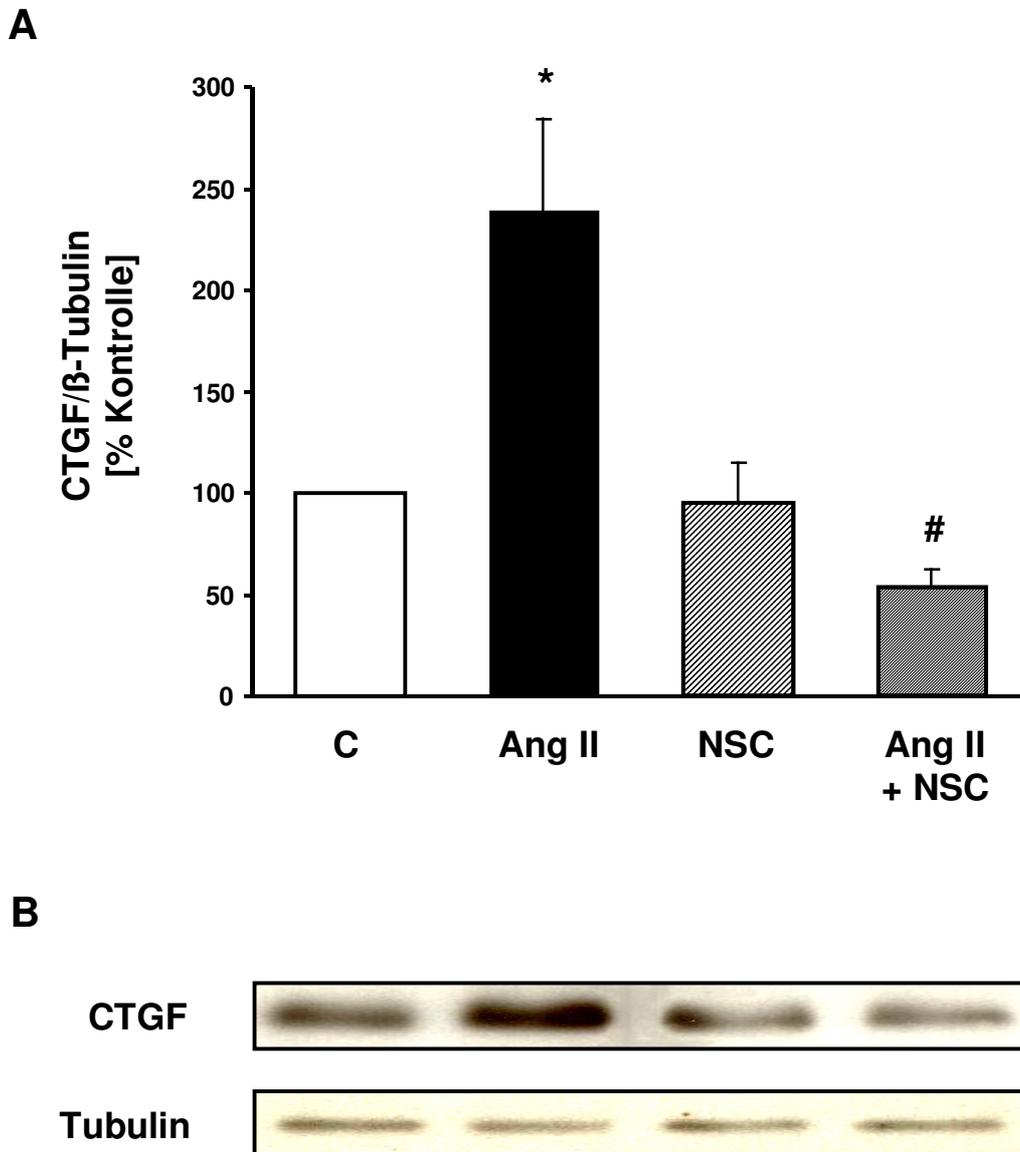


Abbildung 12: Angiotensin II induziert in Kardiomyozyten Rac1-abhängig eine vermehrte Expression von CTGF.

Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden mit Angiotensin II (1 μ M, 3h), mit und ohne Vorbehandlung mit dem spezifischen Rac1 small molecule inhibitor NSC 23766 (100 μ M, 21h), behandelt. **A**, in der densitometrischen Quantifizierung, normiert auf β -Tubulin als Proteinladekontrolle, induzierte Angiotensin II eine erhöhte Expression von CTGF (n = 5, *p < 0,05 vs. C), die durch Vorbehandlung mit NSC 23766 vollständig verhindert wurde (#p < 0,05 vs. Ang II). **B**, repräsentativer CTGF-Western Blot.

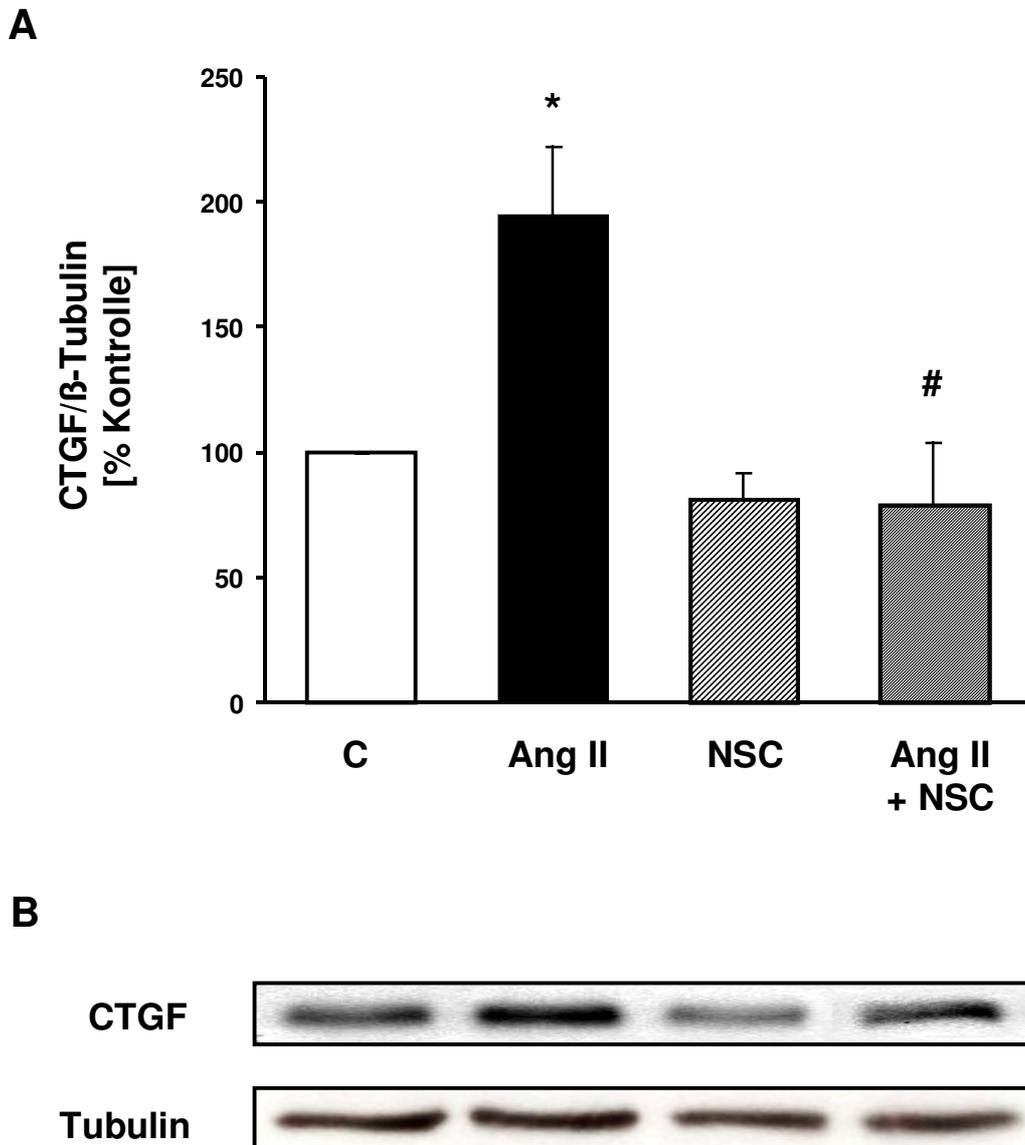


Abbildung 13: Angiotensin II induziert in kardialen Fibroblasten Rac1-abhängig eine vermehrte Expression von CTGF.

Kardiale Fibroblasten wurden mit Angiotensin II (1 μ M, 3h), mit und ohne Vorbehandlung mit dem spezifischen Rac1 small molecule inhibitor NSC 23766 (100 μ M, 16h), behandelt. **A**, in der densitometrischen Quantifizierung, normiert auf β -Tubulin als Proteinladekontrolle, induzierte Angiotensin II eine erhöhte Expression von CTGF (n = 5, *p < 0,05 vs. C), die durch Vorbehandlung mit NSC 23766 vollständig verhindert wurde (#p < 0,05 vs. Ang II). **B**, repräsentativer CTGF-Western Blot.

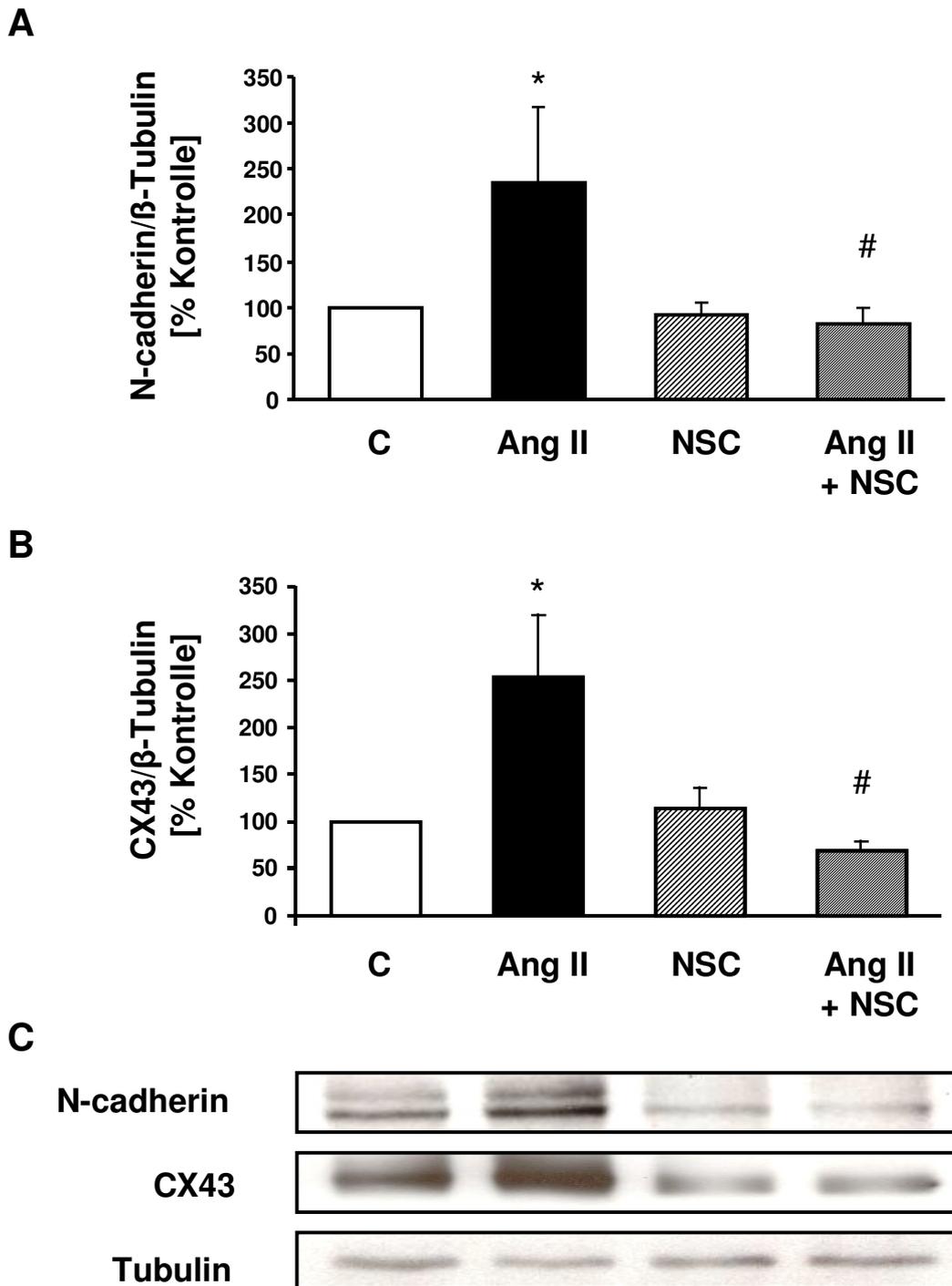


Abbildung 14: Angiotensin II erhöht in Kardiomyozyten Rac1-abhängig die Expression von N-cadherin und CX43.

Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden wie in Abbildung 12 stimuliert. **A**, in der densitometrischen Quantifizierung, normiert auf β -Tubulin als Proteinladekontrolle, führte Angiotensin II sowohl bei N-cadherin als auch **B**, bei CX43, zu einer vermehrten Expression ($n = 5$, $*p < 0,05$ vs. C), die jeweils durch Behandlung mit NSC 23766 vollständig verhindert wurde ($\#p < 0,05$ vs. Ang II). **C**, repräsentative N-cadherin- und CX43-Western Blots.

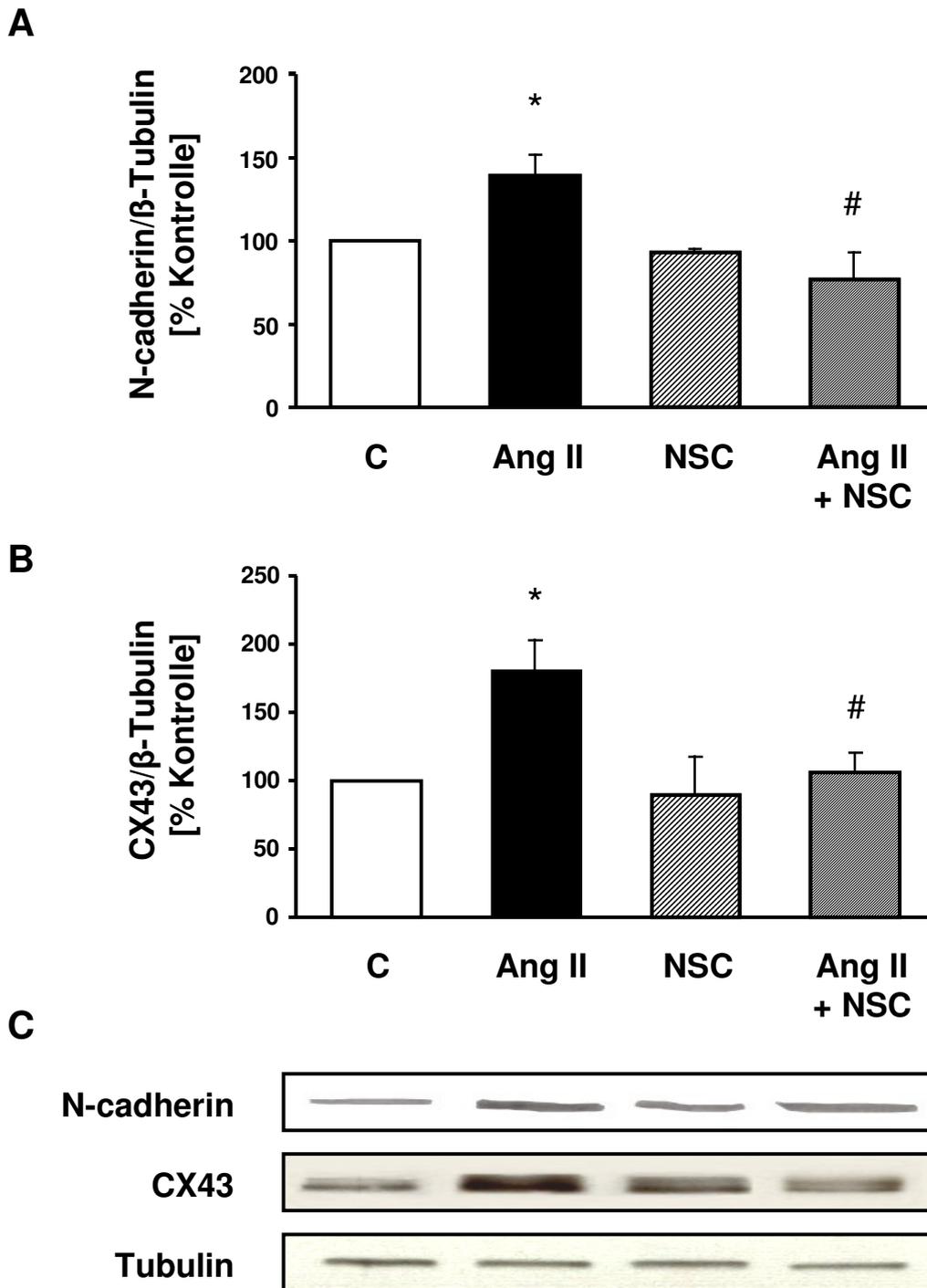


Abbildung 15: Angiotensin II erhöht Rac1-abhängig die Expression von N-cadherin und CX43 in kardialen Fibroblasten.

Diese wurden wie in Abbildung 13 stimuliert. **A**, in der densitometrischen Quantifizierung, normiert auf β -Tubulin als Proteinladekontrolle, führte Angiotensin II zu einer vermehrten Expression sowohl von N-cadherin als auch **B**, von CX43 ($n = 5$, $*p < 0,05$ vs. C), die jeweils durch Vorbehandlung mit NSC 23766 vollständig verhindert wurde ($\#p < 0,05$ vs. Ang II). **C**, repräsentative N-cadherin- und CX43-Western Blots.

4.7. Einfluss von Statinen auf die CTGF-Expression *in vitro*

Für HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine) wurde gezeigt, dass sie in der Lage sind, die Expression und Aktivität der Rac1-GTPase in Kardiomyozyten zu reduzieren (Custodis et al., 2006; Laufs et al., 2002; Tsai et al., 2008). Um einen potentiell günstigen Effekt von Statinen auf die Rac1-vermittelte Proteinexpression von CTGF zu untersuchen, behandelten wir Kardiomyozyten erneut mit Angiotensin II (10 μ M, 3 Stunden), jeweils mit und ohne Präinkubation mit Simvastatin (1 μ M, 24 Stunden). Es zeigte sich im Western Blot nach Behandlung mit Angiotensin II eine Erhöhung der Proteinexpression von CTGF auf 187 ± 10 % ($p < 0,05$, Abbildung 16), die durch Präinkubation mit Simvastatin vollständig verhindert wurde (103 ± 5 %, Abbildung 16).

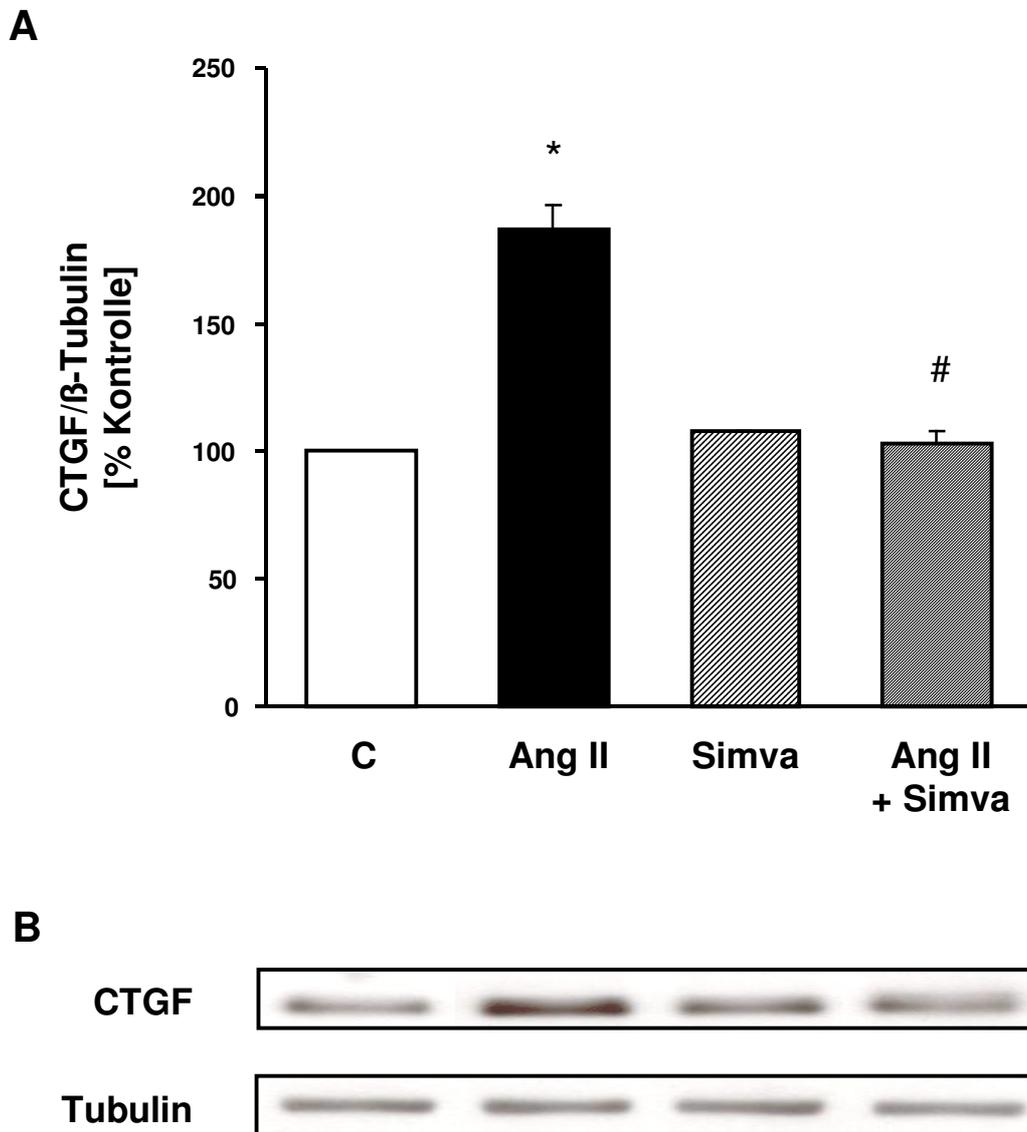


Abbildung 16: Statine reduzieren die Expression von CTGF *in vitro*. Die Angiotensin II-induzierte (10 μ M, 3h) vermehrte Expression von CTGF in Kardiomyozyten wurde durch Präinkubation mit Simvastatin (1 μ M, 24h) vollständig verhindert. **A**, densitometrische Quantifizierung des Western Blots, normiert auf β -Tubulin als Proteinladekontrolle (n = 3, *p < 0,05 vs. C, #p < 0,05 vs. Ang II). **B**, repräsentativer CTGF-Western Blot.

4.8. Einfluss von Statinen auf die Expression von CTGF bei transgenen Mäusen mit kardialer Überexpression von Rac1 (RacET)

Um die Bedeutung von Rac1 bei Vorhofflimmern *in vivo* zu untersuchen und einen potentiell therapeutischen Ansatz zur Verhinderung strukturellen Remodelings zu identifizieren, untersuchten wir die Auswirkungen einer Statin-Behandlung im Mausmodell. Dazu benutzten wir Mäuse mit herzspezifischer Überexpression von Rac1, die im Alter von 10 Monaten spontan Vorhofflimmern entwickeln. Diese Mäuse sind durch konstitutiv aktives (V12) Rac1 unter Kontrolle des MHC-Promotor (RacET) charakterisiert.

Wie in Vorarbeiten bereits gezeigt wurde, war die kardiale Rac1-Aktivität von RacET auf etwa das 30fache des Wildtyps gesteigert (Adam et al., 2007). Trotz der transgenen Expression von konstitutiv aktivem Rac1 reduzierte die Behandlung mit Rosuvastatin (0,4 mg pro Tag p.o. für 10 Monate, n = 9) die Rac1-Aktivität auf $77 \pm 3,3 \%$ ($p < 0,05$) im linken Ventrikel, bezogen auf unbehandelte RacET-Tiere. Dies war durch eine verminderte Membranexpression von Rac1 bedingt. Außerdem war die Statin-Behandlung mit einer geringeren Inzidenz von Vorhofflimmern als bei unbehandelten RacET-Tieren assoziiert. Die Statin-Behandlung verminderte die basale ebenso wie die Angiotensin II-induzierte NADPH-Oxidase-Aktivität in RacET-Mäusen. Die Rac1-Aktivität korrelierte direkt mit der stimulierten NADPH-Oxidase-Aktivität.

Die stark erhöhte Rac1-Aktivität bei RacET war mit einer deutlichen Zunahme der Expression von CTGF im Western Blot auf $369 \pm 28 \%$ ($p < 0,001$, Abbildung 17) gegenüber dem Wildtyp assoziiert. Die Statin-Behandlung reduzierte die CTGF-Expression auf $235 \pm 46 \%$, verglichen mit Wildtyp-Kontrollen (Abbildung 17). Ebenso waren N-cadherin auf $752 \pm 55 \%$ ($p = 0,004$, Abbildung 18A) und Connexin 43 auf $318 \pm 66 \%$ ($p = 0,02$, Abbildung 18B) vermehrt exprimiert in RacET- gegenüber Wildtyp-Tieren. Hier reduzierte die Behandlung mit Statinen die Rac1-bedingte Überexpression von N-cadherin auf $384 \pm 21 \%$ (Abbildung 18B) und die Expression von Connexin 43 auf $84 \pm 9 \%$ (Abbildung 18A), jeweils im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen.

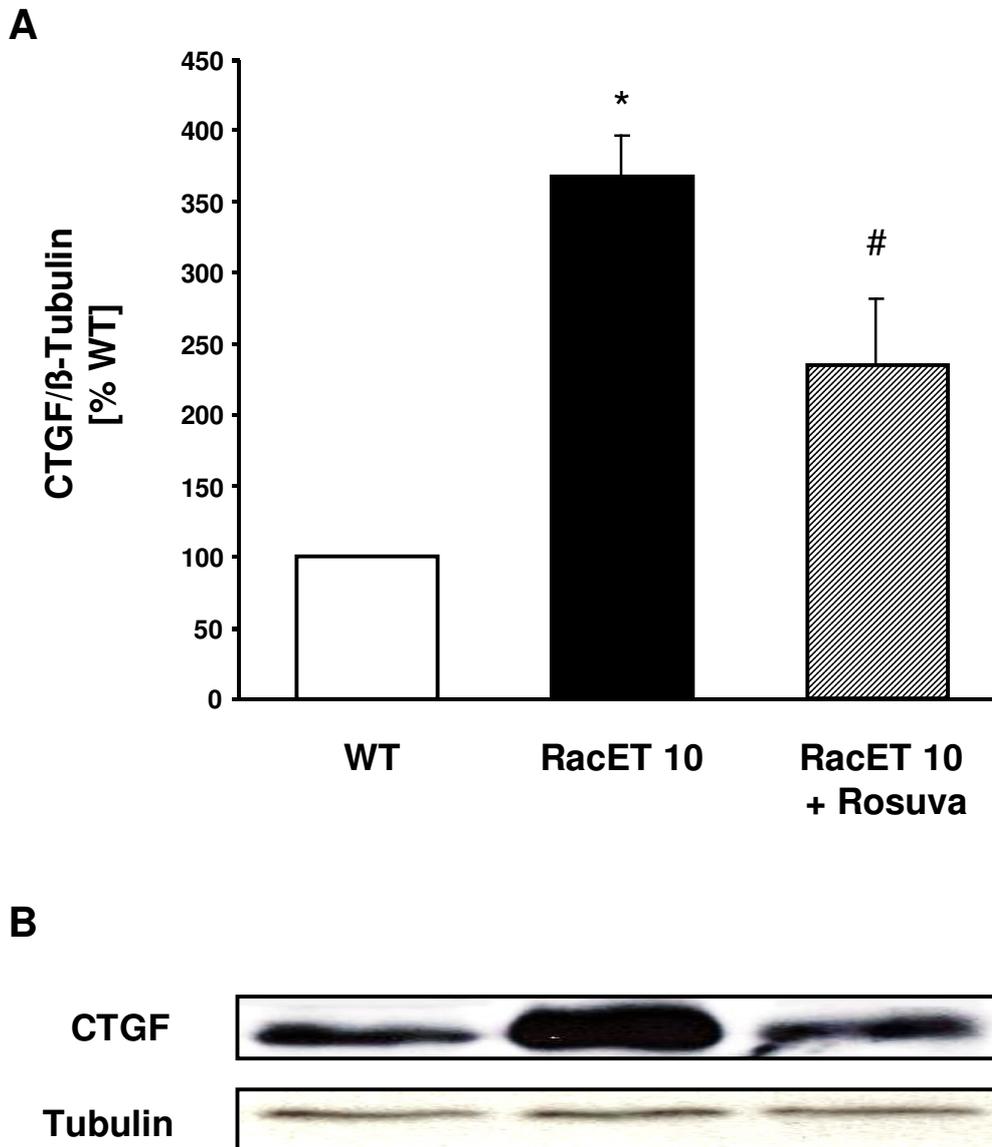


Abbildung 17: RacET-Mäuse exprimieren mehr CTGF im Myokard als Wildtyp-Mäuse, Statine reduzieren die CTGF-Expression.

10 Monate alte transgene Mäuse mit kardialer Überexpression von konstitutiv aktivem (V12) Rac1 zeigten einen deutlich erhöhten Proteingehalt von CTGF gegenüber Wildtyp-Kontrollen (WT). Dagegen enthielten RacET 10-Mäuse, die mit Rosuvastatin (0,4 mg/d p.o.) über 10 Monate gefüttert wurden (RacET 10 + Rosuva), weniger CTGF als unbehandelte RacET-Mäuse. **A**, densitometrische Quantifizierung, normiert auf β-Tubulin als Proteinladekontrolle (n = 10 pro Gruppe, *p < 0,001 vs. WT, #p < 0,05 vs. RacET 10). **B**, repräsentativer CTGF-Western Blot.

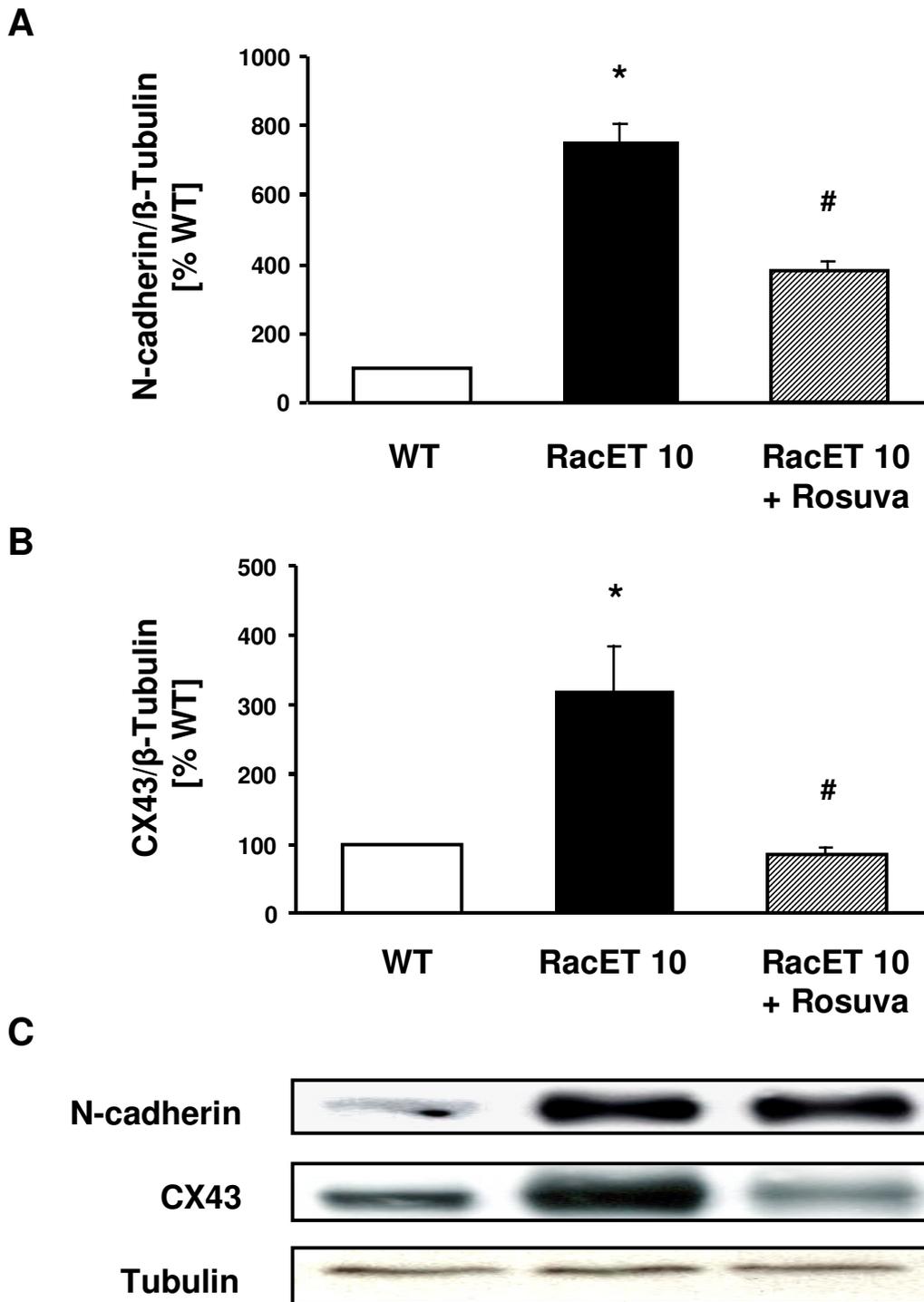


Abbildung 18: RacET exprimieren deutlich mehr N-cadherin und CX43 im Myokard als Wildtyp-Mäuse, Statine reduzieren deren Expression.

A, die densitometrische Quantifizierung zeigt, dass durch die Behandlung von 10 Monate alten RacET-Mäusen mit Rosuvastatin (0,4 mg/d p.o.) die Expression von N-cadherin und **B**, von CX 43, reduziert wurde (normiert auf β-Tubulin als Proteinladekontrolle, n = 10 pro Gruppe, *p < 0,05 vs. WT, #p < 0,05 vs. RacET 10). **C**, repräsentative N-cadherin- und CX43-Western Blots.

5. Diskussion

Diese Untersuchungen zeigen, dass Angiotensin II über das kleine G-Protein Rac1 GTPase und Connective Tissue Growth Factor (CTGF) die Signaltransduktion zu strukturellem Remodeling bei Vorhofflimmern in humanem Vorhofgewebe induziert (Abbildung 19).

Strukturelles Remodeling und kontraktile Dysfunktion des linken Vorhofs spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung und Persistenz von Vorhofflimmern und führen zu lokaler Thrombusbildung mit 2- bis 7fach erhöhter Gefahr einen thromboembolischen Schlaganfall zu erleiden (Allessie et al., 2002; Falk, 2001; Fuster et al., 2006). Vorhofflimmern entsteht im linken Vorhof (Nattel et al., 2006), weshalb in dieser Studie Gewebeproben von humanen linksatrialen Appendices untersucht wurden. Bisher ist in diesem Gewebe nur wenig über die Signaltransduktion bei Vorhofflimmern bekannt. Wir verglichen die Proben von Patienten im permanentem Vorhofflimmern mit Kontrollpersonen im Sinusrhythmus, die sich jeweils einer Mitralklappenoperation unterzogen. Die Vorhöfe beider Gruppen waren nur moderat dilatiert und unterschieden sich nicht in ihrer Größe. Übereinstimmend mit anderen Studien zeigten die Vorhöfe der Patienten mit Vorhofflimmern vermehrt interstitielle Fibrose (Adam et al., 2007; Allessie et al., 2002; Xu et al., 2004), als ein Determinant strukturellen Remodelings. Unsere Untersuchungen zeigen einen deutlich vermehrten Gehalt an Angiotensin II, eine erhöhte Expression von CTGF auf mRNA- und Proteinebene ebenso wie eine erhöhte Proteinexpression von N-cadherin und Connexin 43 in humanen linksatrialen Appendices von Patienten mit Vorhofflimmern. Außerdem wurde in diesen Proben eine erhöhte Rac1-Expression und -Aktivität nachgewiesen, die direkt mit erhöhter Aktivität der NADPH-Oxidase korreliert (Adam et al., 2007).

Die Rac1-GTPase ist ein notwendiger Bestandteil zur Aktivierung der NADPH-Oxidase, die ein Hauptproduzent von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) darstellt. (Brown et al., 2006; Custodis et al., 2006; Diekmann et al., 1994; Laufs et al., 2002; Maack et al., 2003; Takemoto M et al., 2001). Vorhofflimmern geht mit substantiellen oxidativen Veränderungen durch ROS einher, darunter veränderte Gentranskriptionsprofile, mitochondriale DNA-Schäden und Überaktivität von Enzymen, z.B. der NADPH-Oxidase (Korantzopoulos et al., 2003; Korantzopoulos et al., 2007; Lin et al., 2003). Mehrere Studien schreiben oxidativem Stress

durch ROS im Vorhofgewebe eine potentielle Rolle im strukturellen Remodeling bei Vorhofflimmern zu (Burstein et al., 2008b; Dudley, Jr. et al., 2005; Korantzopoulos et al., 2007; Mihm et al., 2001). ROS haben verschiedene pathologische Effekte im atrialen Myokard, darunter verminderte Freisetzung von endokardialem Stickstoffmonoxid (NO), lokale Aktivierung von Komponenten des Gerinnungssystems und prothrombotische Moleküle, darunter PAI-1 und Thromboplastin, Induktion von Fibrose, Entzündungsreaktionen und beeinträchtigte Funktion von Ionenkanälen (Allessie et al., 2002; Cai et al., 2002; Dudley, Jr. et al., 2005; Gassanov et al., 2006; Kim et al., 2005; Kumagai et al., 2004; Mihm et al., 2001; Nattel, 2002; Neuberger et al., 2006).

Es gibt Hinweise, wonach Angiotensin II die Superoxid-Produktion durch die NADPH-Oxidase über Aktivierung des AT₁-Rezeptors erhöht (Gassanov et al., 2006; Kim et al., 2005; Nakagami et al., 2003; Privratsky et al., 2003). Darüber hinaus wurde ein erhöhter Gehalt an Angiotensin Converting Enzyme und eine erhöhte Expression der Angiotensin II-Rezeptoren im Vorhofgewebe bei Patienten mit Vorhofflimmern beobachtet (Boldt et al., 2003; Goette et al., 2000). Unsere Daten zeigen nun einen deutlich erhöhten Gewebegehalt an Angiotensin II im linksatrialen Appendix bei Patienten mit Vorhofflimmern verglichen mit solchen im Sinusrhythmus. Analog dazu wurde unlängst ein erhöhter Gewebegehalt an Angiotensin II in humanen rechtsatrialen Appendices bei Patienten mit Vorhofflimmern nachgewiesen (Tsai et al., 2008). Es kann daher angenommen werden, dass Angiotensin II oxidativen Stress induziert, der zu atrialen Remodelingprozessen führt, da die Inhibierung von ROS auch atriales Remodeling verhindert (Kim et al., 2005; Shiroshita-Takeshita et al., 2004). Die im flimmernden Vorhof vermehrt auftretende interstitielle Fibrose könnte sowohl über ROS und nachgeschaltete Signalwege (Griendling et al., 2000; Wenzel et al., 2001) als auch direkt über oxidative Schäden, z.B. dysfunktionaler myofibrillärer Energiehaushalt oder Erschöpfung von Antioxidantien, z.B. NO, vermittelt werden (Carnes et al., 2007; Mihm et al., 2001).

Von CTGF, einem profibrotischen Mediator, wurde gezeigt, dass er in humanen linksatrialen Appendices von Patienten mit Vorhofflimmern ebenso wie in linken Ventrikeln von transgenen RacET-Mäusen, die im Alter von 10 Monaten mit hoher Inzidenz spontan Vorhofflimmern entwickeln, vermehrt exprimiert wird. CTGF vermittelt unterschiedliche zelluläre Prozesse, unter anderem Proliferation, Migration und Adhäsion von Fibroblasten, Wundheilung, Angiogenese, Bildung von extrazellulärer Matrix und kardiomyozytäre Hypertrophie (Matsui et al., 2004; Moussad et al., 2000). Eine Überexpression von CTGF wurde in atherosklerotischen und myokardialen Läsionen beim Menschen gefunden, ebenso

in der Aorta von Angiotensin II-infundierten Ratten, in allen Fällen assoziiert mit einer Anhäufung extrazellulärer Matrixproteine (Chen et al., 2000; Oemar et al., 1997; Rodriguez-Vita et al., 2005). Angiotensin II führt über den AT₁-Rezeptor zur Induktion von profibrotischen Wachstumsfaktoren, unter anderem CTGF (Matsui et al., 2004). Der AT₁-Rezeptor ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, der verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, unter anderem Proteinkinase MAPK und Rho Kinase, kleine G-Proteine inklusive Ras, Rac1 und RhoA, sowie Transkriptionsfaktoren und Redoxprozesse (Nishida et al., 2005; Ruiz-Ortega et al., 2005; Wenzel et al., 2001). Unsere Zellkulturexperimente belegen, dass Angiotensin II über Rac1 zu einer vermehrten Expression von CTGF in neonatalen Rattenkardiomyozyten und kardialen Rattenfibroblasten führt, da dieser Effekt vollständig durch den Rac1 spezifischen small molecule Inhibitor NSC 23766 verhindert wird. Diese Ergebnisse geben Hinweise auf eine neue Signaltransduktionskaskade in kardialen Zellen, Myozyten und Fibroblasten, von Angiotensin II über Rac1 zur Expression von CTGF, die bei strukturellem Remodeling bei Vorhofflimmern von Bedeutung sein könnte.

Die Rac1-GTPase ist an der Regulation zytoskeletaler Strukturen beteiligt, wobei strukturell veränderte Zell-Zell-Verbindungen entstehen (Brown et al., 2006; Ehrlich et al., 2002; Nakagawa et al., 2001; Noren et al., 2001; Steinberg et al., 1999). Gap junctions wie Connexin 43 sind wichtig für die interzelluläre Ionenleitfähigkeit und die metabolische Kopplung, Adherens junctions dagegen vermitteln mechanische Haftung zwischen Myozyten, örtlich eng an Gap junctions anliegend. In Kardiomyozyten ist N-cadherin eine der hauptsächlich vorkommenden Transmembran-Komponente der Adherens junctions, deren zytoplasmatische Domäne über Catenin mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden ist (Steinberg et al., 1999; Tepass et al., 2000). In kultivierten adulten Kardiomyozyten zeigte sich, dass der Anhäufung von Connexin 43 in dem Bereich der Intercalated Disc die Bildung von N-cadherin vorausgeht (Kostin et al., 1999). Weiterhin wurde berichtet, dass die Ausbildung von Gap junctions in Myozyten, die kein N-cadherin exprimieren, gestört ist (Luo et al., 2003), und dass die Expression von Connexin 43 in Myozyten mit herzspezifischem Verlust von N-cadherin vermindert ist (Li et al., 2005). Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass N-cadherin Bestandteil der Signaltransduktion ist, die die Expression und Lokalisation von Connexin 43 reguliert. Weiterhin wurde vor kurzem gezeigt, dass Cadherine über intrazelluläre Signalwege Proteine der Rho-Familie, darunter Rac1, aktivieren (Nakagawa et al., 2001; Noren et al., 2001). Interessanterweise wiesen Matsuda et al. in einer Studie nach,

dass die Lokalisation des Gap junction-Proteins Connexin 43 durch einen N-cadherin-nachgeschalteten Signalweg über Rac1 in Kardiomyozyten bestimmt wird (Matsuda et al., 2006). Daher untersuchten wir die Expression von N-cadherin und Connexin 43 in unseren drei Modellen. Humane linksatriale Appendices zeigten eine vermehrte Expression beider Junction-Proteine, Connexin 43 und N-cadherin, bei Patienten mit Vorhofflimmern. Die Daten aus unseren Zellkulturexperimenten zeigen sowohl in Kardiomyozyten als auch in kardialen Fibroblasten eine vermehrte Expression von N-cadherin und Connexin 43 durch Angiotensin II, die vollständig durch den Rac1-Inhibitor NSC 23766 veränderbar ist. Das bedeutet, im Gegensatz zu obiger Studie, dass N-cadherin und Connexin 43 über einen Rac1-abhängigen Signalweg reguliert werden. Dies bestätigen auch unsere *in vivo*-Untersuchungen an RacET-Mäusen mit konstitutiv aktivem Rac1 im Herzen, die eine deutlich erhöhte Expression sowohl von Connexin 43 als auch von N-cadherin im Myokard aufweisen.

Weiterhin resultiert nach Stimulation von Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten mit rekombinantem CTGF eine vermehrte Expression beider Junction-Proteine. Dies zeigt bezüglich N-cadherin eine neue mechanistische Verbindung zwischen CTGF und dem Zytoskelett, wie sie auch für andere Wachstumsfaktoren beschrieben ist (Steinberg et al., 1999). Die Einflüsse von CTGF auf Connexin 43 und N-cadherin *in vitro* deuten darauf hin, dass CTGF neben seinen bekannten profibrotischen Eigenschaften noch weitere strukturelle Umbauprozesse induzieren kann. Diese Erkenntnisse weisen auf CTGF als zentralen Mediator strukturellen Remodelings bei Vorhofflimmern hin.

HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine) haben neben ihrer primären Wirkung, der Hemmung der endogenen Cholesterin-Biosynthese, Cholesterin-unabhängige Effekte, darunter die Hemmung der Rac1 GTPase-Aktivität durch verminderte Isoprenylierung und durch Translokation von Rac1 an die Zellmembran (Laufs et al., 2002; Takemoto M et al., 2001; Wassmann et al., 2001). Verschiedene Tiermodelle belegen, dass die Hemmung von Rac1 durch Statine die Superoxid-Produktion durch die NADPH-Oxidase in Kardiomyozyten reduzieren und linksventrikuläre Hypertrophie vermindern kann (Custodis et al., 2006; Dechend et al., 2001; Laufs et al., 2002; Liao et al., 2005; Maack et al., 2003; Takemoto M et al., 2001). Basierend auf diesen Daten untersuchten wir den Effekt von Statinen in kultivierten Kardiomyozyten und in RacET-Mäusen auf die Rac1-abhängige Signaltransduktion des strukturellen Remodelings. Statine waren in der Lage, die durch Angiotensin II-induzierte erhöhte Expression von CTGF in kultivierten neonatalen Kardiomyozyten vollständig zu verhindern. In den Herzen von RacET-Mäusen reduzierten

Statine die stark erhöhte Rac1-Aktivität, jedoch blieb – nicht unerwartet – die resultierende Rac1-Aktivität höher als die des Wildtyps. Die erhöhte Expression von CTGF in RacET-Mäusen vermochten Statine ebenfalls zu vermindern, wenngleich auch hier die resultierende Expression deutlich höher lag als die des Wildtyps. Den linksatrialen Gehalt an Kollagen in RacET beeinflussten Statine jedoch nicht (Adam et al., 2007). Ähnlich wie CTGF waren N-cadherin und Connexin 43 bei RacET-Tieren deutlich überexprimiert, jedoch wurden auch diese Veränderungen durch Behandlung mit Statinen reduziert. Insgesamt waren die Veränderungen der Rac1-Aktivität und der Rac1-abhängigen Proteinexpression, u.a. von CTGF, mit einer 50 % niedrigeren Inzidenz von Vorhofflimmern verbunden, verglichen mit unbehandelten RacET-Mäusen (Adam et al., 2007). Wir haben somit *in vitro* und *in vivo* gezeigt, dass Statine einen hemmenden Einfluss auf die CTGF-Expression haben und dass dies im Tiermodell möglicherweise ein kausaler Mechanismus für die geringere Inzidenz von Vorhofflimmern unter der Statin-Behandlung ist.

Es gibt mehrere klinische Untersuchungen, die auf eine antiarrhythmischen Wirkung von Statinen bei Vorhofflimmern hinweisen (Adam et al., 2008). Zum Beispiel reduzieren Statine Vorhofflimmern bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit, nach chirurgischem Eingriff und nach elektrischer Kardioversion sowie bei Patienten mit paroxysmalen Vorhofflimmern (Dernellis et al., 2005; Marin et al., 2006; Ozaydin et al., 2006; Siu et al., 2003; Tveit et al., 2004; Young-Xu et al., 2003). Die unlängst publizierte prospektive ARMYDA-Studie zeigte eine Prävention von postoperativem Vorhofflimmern durch Statine (Patti et al., 2006). Unsere Daten deuten darauf hin, dass die Inhibierung von Rac1 GTPase-vermittelten Signaltransduktionswegen ein molekularer Mechanismus ist, der diesen Effekten zu Grunde liegen könnte. Wir mutmaßen weiterhin, dass die Hemmung der Angiotensin II-induzierten Rac1-Signalweiterleitung durch Statine und durch andere Mechanismen, beispielsweise durch Inhibierung des Renin-Angiotensin-Systems (Healey et al., 2005), zur Entwicklung weiterer Präventions- und Therapieoptionen von Vorhofflimmern führen könnte.

Zusammenfassend zeigen Patienten mit Vorhofflimmern im linksatrialen Appendix einen erhöhten Gewebegehalt an Angiotensin II und eine vermehrte Gen- und Proteinexpression von CTGF, einhergehend mit erhöhter Expression und Aktivität von Rac1. In neonatalen Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten führt Angiotensin II zu erhöhter Expression von CTGF, ebenso wie von N-cadherin und Connexin 43, über den Rac1-Signalweg. Weiterhin vermag CTGF die Proteinexpression von Connexin 43 und N-cadherin in beiden untersuchten

Zelllinien zu induzieren. Mäuse mit chronischer kardialer Überexpression von Rac1 sind durch eine vermehrte Expression von CTGF, Connexin 43 und N-cadherin gekennzeichnet und entwickeln in hohem Alter spontan Vorhofflimmern. Statine sind in der Lage, die Rac1-vermittelte erhöhte CTGF-Expression zu verhindern. Diese Studie zeigt zum ersten Mal eine mechanistische Verbindung zwischen der Rac1 GTPase und CTGF bei strukturellem Remodeling bei Vorhofflimmern (Abbildung 19), was ein neues Ziel in der Prävention und der Therapie von Vorhofflimmern darstellen könnte.

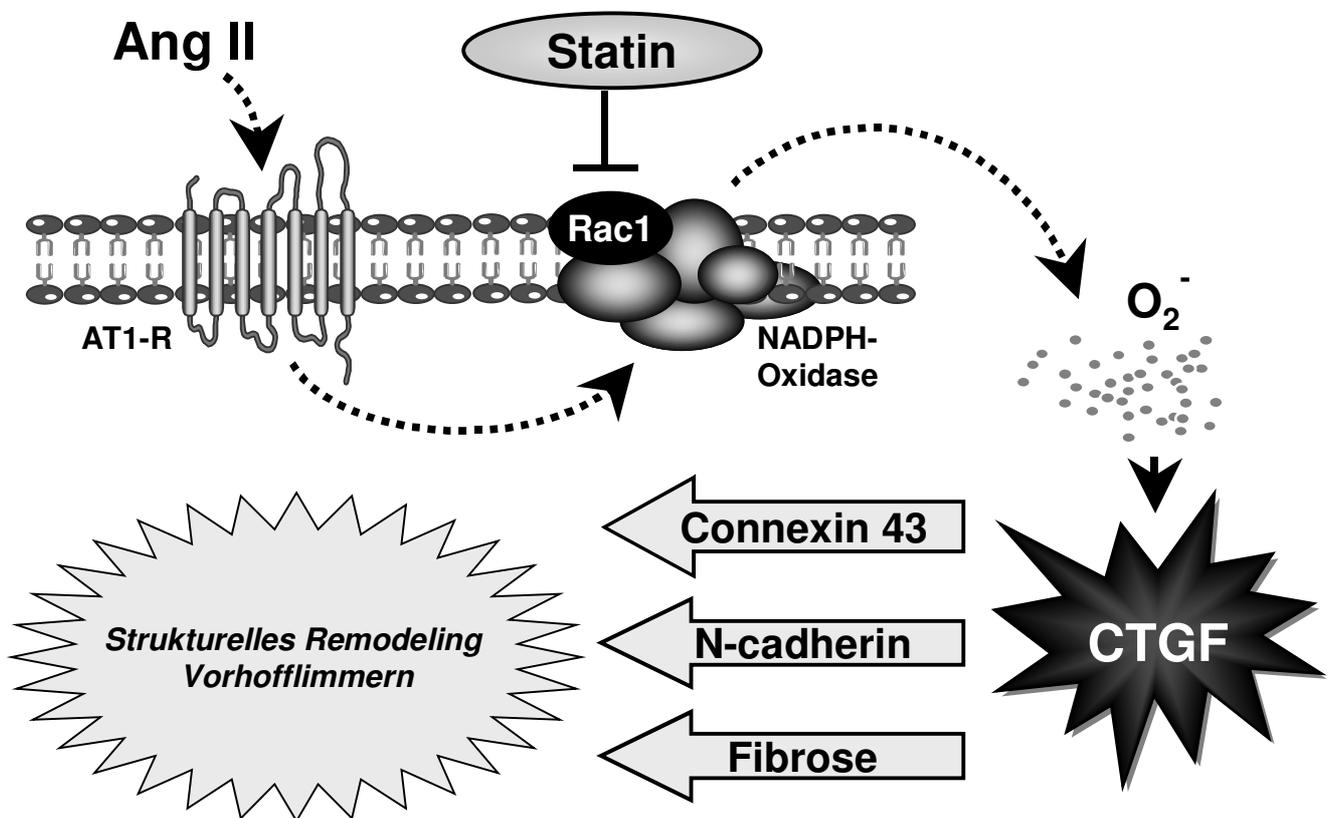


Abbildung 19: Mögliche Signaltransduktion des Angiotensin II-induzierten strukturellen Remodelings bei Vorhofflimmern.

Die Angiotensin II-induzierte Signaltransduktion in Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten führt über Rac1 und CTGF zu strukturellem Remodeling im Vorhof und zu Vorhofflimmern.

AT1-R = Angiotensin II-Rezeptor Typ 1, O_2^- = Superoxidanion.

6. Literaturverzeichnis

1. Adam O, Frost G, Custodis F, Sussman MA, Schäfers HJ, Böhm M, Laufs U (2007) Role of Rac1 GTPase activation in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 50:359-367
2. Adam O, Neuberger HR, Böhm M, Laufs U (2008) Prevention of atrial fibrillation with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Circulation.* 118:1285-1293
3. Ahmed MS, Oie E, Vinge LE, Yndestad A, Oystein AG, Andersson Y, Attramadal T, Attramadal H (2004) Connective tissue growth factor--a novel mediator of angiotensin II-stimulated cardiac fibroblast activation in heart failure in rats. *J Mol Cell Cardiol.* 36:393-404
4. Aktories K, Schmidt G, Just I (2000) Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. *Biol Chem.* 381:421-426
5. Alexander RW (1995) Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension.* 25:155-161
6. Allessie M, Ausma J, Schotten U (2002) Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 54:230-246
7. Benjamin EJ, Levy D, Vaziri SM, D'Agostino RB, Belanger AJ, Wolf PA (1994) Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort. The Framingham Heart Study. *JAMA.* 271:840-844
8. Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB, Levy D (1998) Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study. *Circulation.* 98:946-952
9. Boldt A, Wetzel U, Weigl J, Garbade J, Lauschke J, Hindricks G, Kottkamp H, Gummert JF, Dhein S (2003) Expression of angiotensin II receptors in human left and right atrial tissue in atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease. *J Am Coll Cardiol.* 42:1785-1792

10. Brilla CG, Pick R, Tan LB, Janicki JS, Weber KT (1990) Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res.* 67:1355-1364
11. Brown JH, Del Re DP, Sussman MA (2006) The Rac and Rho hall of fame: a decade of hypertrophic signaling hits. *Circ Res.* 98:730-742
12. Burstein B, Nattel S (2008a) Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 51:802-809
13. Burstein B, Nattel S (2008b) Atrial structural remodeling as an antiarrhythmic target. *J Cardiovasc Pharmacol.* 52:4-10
14. Cai H, Li Z, Goette A, Mera F, Honeycutt C, Feterik K, Wilcox JN, Dudley SC, Jr., Harrison DG, Langberg JJ (2002) - Downregulation of endocardial nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in atrial fibrillation: potential mechanisms for atrial thrombosis and stroke. *Circulation.* 106:2854-2858
15. Candido R, Forbes JM, Thomas MC, Thallas V, Dean RG, Burns WC, Tikellis C, Ritchie RH, Twigg SM, Cooper ME, Burrell LM (2003) A breaker of advanced glycation end products attenuates diabetes-induced myocardial structural changes. *Circ Res.* 92:785-792
16. Cardin S, Libby E, Pelletier P, Le Bouter S, Shiroshita-Takeshita A, Le Meur N, Leger J, Demolombe S, Ponton A, Glass L, Nattel S (2007) Contrasting gene expression profiles in two canine models of atrial fibrillation. *Circ Res.* 100:425-433
17. Carnes CA, Janssen PM, Ruehr ML, Nakayama H, Nakayama T, Haase H, Bauer JA, Chung MK, Fearon IM, Gillinov AM, Hamlin RL, Van Wagoner DR (2007) Atrial glutathione content, calcium current, and contractility. *J Biol Chem.* 282:28063-28073
18. Casaclang-Verzosa G, Gersh BJ, Tsang TS (2008) Structural and functional remodeling of the left atrium: clinical and therapeutic implications for atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 51:1-11
19. Chen MM, Lam A, Abraham JA, Schreiner GF, Joly AH (2000) CTGF expression is induced by TGF- beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *J Mol Cell Cardiol.* 32:1805-1819

20. Chilton L, Giles WR, Smith GL (2007) Evidence of intercellular coupling between co-cultured adult rabbit ventricular myocytes and myofibroblasts. *J Physiol.* 583:225-236
21. Clerk A, Sugden PH (2000) Small guanine nucleotide-binding proteins and myocardial hypertrophy. *Circ Res.* 86:1019-1023
22. Custodis F, Eberl M, Kilter H, Böhm M, Laufs U (2006) Association of RhoGDIalpha with Rac1 GTPase mediates free radical production during myocardial hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 71:342-351
23. Dean RG, Balding LC, Candido R, Burns WC, Cao Z, Twigg SM, Burrell LM (2005) Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis after myocardial infarction. *J Histochem Cytochem.* 53:1245-1256
24. Dechend R, Fiebeler A, Park JK, Muller DN, Theuer J, Mervaala E, Bieringer M, Gulba D, Dietz R, Luft FC, Haller H (2001) Amelioration of angiotensin II-induced cardiac injury by a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor. *Circulation.* 104:576-581
25. Dernellis J, Panaretou M (2005) Effect of C-reactive protein reduction on paroxysmal atrial fibrillation. *Am Heart J.* 150:1064
26. Diekmann D, Abo A, Johnston C, Segal AW, Hall A (1994) Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. *Science.* 265:531-533
27. Dries DL, Exner DV, Gersh BJ, Domanski MJ, Waclawiw MA, Stevenson LW (1998) Atrial fibrillation is associated with an increased risk for mortality and heart failure progression in patients with asymptomatic and symptomatic left ventricular systolic dysfunction: a retrospective analysis of the SOLVD trials. *Studies of Left Ventricular Dysfunction. J Am Coll Cardiol.* 32:695-703
28. Ducharme A, Swedberg K, Pfeffer MA, Cohen-Solal A, Granger CB, Maggioni AP, Michelson EL, McMurray JJ, Olsson L, Rouleau JL, Young JB, Olofsson B, Puu M, Yusuf S (2006) Prevention of atrial fibrillation in patients with symptomatic chronic heart failure by candesartan in the Candesartan in Heart failure: Assessment of Reduction in Mortality and morbidity (CHARM) program. *Am Heart J.* 152:86-92

29. Dudley SC, Jr., Hoch NE, McCann LA, Honeycutt C, Diamandopoulos L, Fukai T, Harrison DG, Dikalov SI, Langberg J (2005) Atrial fibrillation increases production of superoxide by the left atrium and left atrial appendage: role of the NADPH and xanthine oxidases. *Circulation*. 112:1266-1273
30. Ehrlich JS, Hansen MD, Nelson WJ (2002) Spatio-temporal regulation of Rac1 localization and lamellipodia dynamics during epithelial cell-cell adhesion. *Dev Cell*. 3:259-270
31. Falk RH (2001) Atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 344:1067-1078
32. Feinberg WM, Blackshear JL, Laupacis A, Kronmal R, Hart RG (1995) Prevalence, age distribution, and gender of patients with atrial fibrillation. Analysis and implications. *Arch Intern Med*. 155:469-473
33. Ferreira-Cornwell MC, Luo Y, Narula N, Lenox JM, Lieberman M, Radice GL (2002) Remodeling the intercalated disc leads to cardiomyopathy in mice misexpressing cadherins in the heart. *J Cell Sci*. 115:1623-1634
34. Forbes MS, Sperelakis N (1985) Intercalated discs of mammalian heart: a review of structure and function. *Tissue Cell*. 17:605-648
35. Fuster V, Ryden LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, Halperin JL, Le Heuzey JY, Kay GN, Lowe JE, Olsson SB, Prystowsky EN, Tamargo JL, Wann S, Smith SC, Jr., Jacobs AK, Adams CD, Anderson JL, Antman EM, Halperin JL, Hunt SA, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B, Priori SG, Blanc JJ, Budaj A, Camm AJ, Dean V, Deckers JW, Despres C, Dickstein K, Lekakis J, McGregor K, Metra M, Morais J, Osterspey A, Tamargo JL, Zamorano JL (2006) ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the Management of Patients with Atrial Fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2001 Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation): developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Circulation*. 114:e257-e354

36. Gao Y, Dickerson JB, Guo F, Zheng J, Zheng Y (2004) Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:7618-7623
37. Gassanov N, Brandt MC, Michels G, Lindner M, Er F, Hoppe UC (2006) Angiotensin II-induced changes of calcium sparks and ionic currents in human atrial myocytes: potential role for early remodeling in atrial fibrillation. *Cell Calcium.* 39:175-186
38. Gaudesius G, Miragoli M, Thomas SP, Rohr S (2003) Coupling of cardiac electrical activity over extended distances by fibroblasts of cardiac origin. *Circ Res.* 93:421-428
39. Goette A, Staack T, Rocken C, Arndt M, Geller JC, Huth C, Ansorge S, Klein HU, Lendeckel U (2000) Increased expression of extracellular signal-regulated kinase and angiotensin-converting enzyme in human atria during atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 35:1669-1677
40. Green KJ, Gaudry CA (2000) Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1:208-216
41. Griendling KK, Harrison DG (2001) Out, damned dot: studies of the NADPH oxidase in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 108:1423-1424
42. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 86:494-501
43. Gronefeld GC, Hohnloser SH (2003) Quality of life in atrial fibrillation: an increasingly important issue. *Eur Heart J Suppl.* 5:H25-H33
44. Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 279:509-514
45. Hayata N, Fujio Y, Yamamoto Y, Iwakura T, Obana M, Takai M, Mohri T, Nonen S, Maeda M, Azuma J (2008) Connective tissue growth factor induces cardiac hypertrophy through Akt signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 370:274-278
46. Healey JS, Baranchuk A, Crystal E, Morillo CA, Garfinkle M, Yusuf S, Connolly SJ (2005) Prevention of atrial fibrillation with angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 45:1832-1839

47. Hinescu ME, Gherghiceanu M, Mandache E, Ciontea SM, Popescu LM (2006) Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in atrial myocardium: ultrastructural and immunohistochemical characterization. *J Cell Mol Med.* 10:243-257
48. Inoue N, Ohkusa T, Nao T, Lee JK, Matsumoto T, Hisamatsu Y, Satoh T, Yano M, Yasui K, Kodama I, Matsuzaki M (2004) Rapid electrical stimulation of contraction modulates gap junction protein in neonatal rat cultured cardiomyocytes: involvement of mitogen-activated protein kinases and effects of angiotensin II-receptor antagonist. *J Am Coll Cardiol.* 44:914-922
49. Kato T, Yamashita T, Sekiguchi A, Tsuneda T, Sagara K, Takamura M, Kaneko S, Aizawa T, Fu LT (2008) AGEs-RAGE system mediates atrial structural remodeling in the diabetic rat. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 19:415-420
50. Kemp TJ, Aggeli IK, Sugden PH, Clerk A (2004) Phenylephrine and endothelin-1 upregulate connective tissue growth factor in neonatal rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 37:603-606
51. Kim YM, Guzik TJ, Zhang YH, Zhang MH, Kattach H, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM, Casadei B (2005) A myocardial Nox2 containing NAD(P)H oxidase contributes to oxidative stress in human atrial fibrillation. *Circ Res.* 97:629-636
52. Kim YM, Kattach H, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM, Casadei B (2008) Association of atrial nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity with the development of atrial fibrillation after cardiac surgery. *J Am Coll Cardiol.* 51:68-74
53. Koitabashi N, Arai M, Kogure S, Niwano K, Watanabe A, Aoki Y, Maeno T, Nishida T, Kubota S, Takigawa M, Kurabayashi M (2007) Increased connective tissue growth factor relative to brain natriuretic peptide as a determinant of myocardial fibrosis. *Hypertension.* 49:1120-1127
54. Korantzopoulos P, Kolettis T, Siogas K, Goudevenos J (2003) Atrial fibrillation and electrical remodeling: the potential role of inflammation and oxidative stress. *Med Sci Monit.* 9:RA225-RA229

55. Korantzopoulos P, Kolettis TM, Galaris D, Goudevenos JA (2007) The role of oxidative stress in the pathogenesis and perpetuation of atrial fibrillation. *Int J Cardiol.* 115:135-143
56. Kostin S, Hein S, Bauer EP, Schaper J (1999) Spatiotemporal development and distribution of intercellular junctions in adult rat cardiomyocytes in culture. *Circ Res.* 85:154-167
57. Kumagai K, Nakashima H, Saku K (2004) The HMG-CoA reductase inhibitor atorvastatin prevents atrial fibrillation by inhibiting inflammation in a canine sterile pericarditis model. *Cardiovasc Res.* 62:105-111
58. Lang C, Sauter M, Szalay G, Racchi G, Grassi G, Rainaldi G, Mercatanti A, Lang F, Kandolf R, Klingel K (2008) Connective tissue growth factor: a crucial cytokine-mediating cardiac fibrosis in ongoing enterovirus myocarditis. *J Mol Med.* 86:49-60
59. Laufs U, Adam O, Strehlow K, Wassmann S, Konkol C, Laufs K, Schmidt W, Böhm M, Nickenig G (2003) Down-regulation of Rac-1 GTPase by Estrogen. *J Biol Chem.* 278:5956-5962
60. Laufs U, Kilter H, Konkol C, Wassmann S, Böhm M, Nickenig G (2002) Impact of HMG CoA reductase inhibition on small GTPases in the heart. *Cardiovasc Res.* 53:911-920
61. Laufs U, Liao JK (2000) Targeting Rho in cardiovascular disease. *Circ Res.* 87:526-528
62. Levy S (1997) Factors predisposing to the development of atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol.* 20:2670-2674
63. Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S (1999) Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation.* 100:87-95
64. Li D, Shinagawa K, Pang L, Leung TK, Cardin S, Wang Z, Nattel S (2001) Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on the development of the atrial fibrillation substrate in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. *Circulation.* 104:2608-2614

65. Li J, Levin MD, Xiong Y, Petrenko N, Patel VV, Radice GL (2008) N-cadherin haploinsufficiency affects cardiac gap junctions and arrhythmic susceptibility. *J Mol Cell Cardiol.* 44:597-606
66. Li J, Patel VV, Kostetskii I, Xiong Y, Chu AF, Jacobson JT, Yu C, Morley GE, Molkenin JD, Radice GL (2005) Cardiac-specific loss of N-cadherin leads to alteration in connexins with conduction slowing and arrhythmogenesis. *Circ Res.* 97:474-481
67. Liao JK, Laufs U (2005) Pleiotropic Effects of Statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 45:89-118
68. Lin PH, Lee SH, Su CP, Wei YH (2003) Oxidative damage to mitochondrial DNA in atrial muscle of patients with atrial fibrillation. *Free Radic Biol Med.* 35:1310-1318
69. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-275
70. Luo Y, Radice GL (2003) Cadherin-mediated adhesion is essential for myofibril continuity across the plasma membrane but not for assembly of the contractile apparatus. *J Cell Sci.* 116:1471-1479
71. Maack C, Kartes T, Kilter H, Schäfers HJ, Nickenig G, Böhm M, Laufs U (2003) Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of rac1-GTPase and represents a target for statin treatment. *Circulation.* 108:1567-1574
72. Marin F, Pascual DA, Roldan V, Arribas JM, Ahumada M, Tornel PL, Oliver C, Gomez-Plana J, Lip GY, Valdes M (2006) Statins and postoperative risk of atrial fibrillation following coronary artery bypass grafting. *Am J Cardiol.* 97:55-60
73. Matsuda T, Fujio Y, Nariai T, Ito T, Yamane M, Takatani T, Takahashi K, Azuma J (2006) N-cadherin signals through Rac1 determine the localization of connexin 43 in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 40:495-502
74. Matsui Y, Sadoshima J (2004) Rapid upregulation of CTGF in cardiac myocytes by hypertrophic stimuli: implication for cardiac fibrosis and hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 37:477-481

75. Mewis C, Neuberger HR, Böhm M (2006) Atrial fibrillation. *Dtsch Med Wochenschr.* 131:2843-2854
76. Mihm MJ, Yu F, Carnes CA, Reiser PJ, McCarthy PM, Van Wagoner DR, Bauer JA (2001) Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. *Circulation.* 104:174-180
77. Moussad EE, Brigstock DR (2000) Connective tissue growth factor: what's in a name? *Mol Genet Metab.* 71:276-292
78. Nakagami H, Takemoto M, Liao JK (2003) NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 35:851-859
79. Nakagawa M, Fukata M, Yamaga M, Itoh N, Kaibuchi K (2001) Recruitment and activation of Rac1 by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion sites. *J Cell Sci.* 114:1829-1838
80. Nattel S (2002) New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature.* 415:219-226
81. Nattel S, Opie LH (2006) Controversies in atrial fibrillation. *Lancet.* 367:262-272
82. Neuberger HR, Schotten U, Blaauw Y, Vollmann D, Eijsbouts S, van Hunnik A, Allessie M (2006) Chronic atrial dilation, electrical remodeling, and atrial fibrillation in the goat. *J Am Coll Cardiol.* 47:644-653
83. Nishida M, Tanabe S, Maruyama Y, Mangmool S, Urayama K, Nagamatsu Y, Takagahara S, Turner JH, Kozasa T, Kobayashi H, Sato Y, Kawanishi T, Inoue R, Nagao T, Kurose H (2005) G alpha 12/13- and reactive oxygen species-dependent activation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase by angiotensin receptor stimulation in rat neonatal cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 280:18434-18441
84. Noren NK, Niessen CM, Gumbiner BM, Burridge K (2001) Cadherin engagement regulates Rho family GTPases. *J Biol Chem.* 276:33305-33308
85. Oemar BS, Werner A, Garnier JM, Do DD, Godoy N, Nauck M, Marz W, Rupp J, Pech M, Luscher TF (1997) Human connective tissue growth factor is expressed in advanced atherosclerotic lesions. *Circulation.* 95:831-839

86. Ozaydin M, Varol E, Aslan SM, Kucuktepe Z, Dogan A, Ozturk M, Altinbas A (2006) Effect of atorvastatin on the recurrence rates of atrial fibrillation after electrical cardioversion. *Am J Cardiol.* 97:1490-1493
87. Patti G, Chello M, Candura D, Pasceri V, D'Ambrosio A, Covino E, Di Sciascio G (2006) Randomized trial of atorvastatin for reduction of postoperative atrial fibrillation in patients undergoing cardiac surgery: results of the ARMYDA-3 (Atorvastatin for Reduction of MYocardial Dysrhythmia After cardiac surgery) study. *Circulation.* 114:1455-1461
88. Polontchouk L, Ebel B, Jackels M, Dhein S (2002) Chronic effects of endothelin 1 and angiotensin II on gap junctions and intercellular communication in cardiac cells. *FASEB J.* 16:87-89
89. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB (1999) Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol.* 277:C1-C9
90. Pracyk JB, Tanaka K, Hegland DD, Kim KS, Sethi R, Rovira II, Blazina DR, Lee L, Bruder JT, Kovesdi I, Goldshmidt-Clermont PJ, Irani K, Finkel T (1998) A requirement for the rac1 GTPase in the signal transduction pathway leading to cardiac myocyte hypertrophy. *J Clin Invest.* 102:929-937
91. Privratsky JR, Wold LE, Sowers JR, Quinn MT, Ren J (2003) AT1 blockade prevents glucose-induced cardiac dysfunction in ventricular myocytes: role of the AT1 receptor and NADPH oxidase. *Hypertension.* 42:206-212
92. Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Esteban V, Ruperez M, Egado J, Ruiz-Ortega M (2005) Angiotensin II activates the Smad pathway in vascular smooth muscle cells by a transforming growth factor-beta-independent mechanism. *Circulation.* 111:2509-2517
93. Ruiz-Ortega M, Ortiz A (2005) Angiotensin II and reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal.* 7:1258-1260
94. Saffitz JE (2006) Connexins, conduction, and atrial fibrillation. *N Engl J Med.* 354:2712-2714

95. Shiroshita-Takeshita A, Schram G, Lavoie J, Nattel S (2004) Effect of simvastatin and antioxidant vitamins on atrial fibrillation promotion by atrial-tachycardia remodeling in dogs. *Circulation*. 110:2313-2319
96. Siu CW, Lau CP, Tse HF (2003) Prevention of atrial fibrillation recurrence by statin therapy in patients with lone atrial fibrillation after successful cardioversion. *Am J Cardiol*. 92:1343-1345
97. Soler AP, Knudsen KA (1994) N-cadherin involvement in cardiac myocyte interaction and myofibrillogenesis. *Dev Biol*. 162:9-17
98. Steinberg MS, McNutt PM (1999) Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Curr Opin Cell Biol*. 11:554-560
99. Sussman MA, Welch S, Walker A, Klevitsky R, Hewett TE, Price RL, Schaefer E, Yager K (2000) Altered focal adhesion regulation correlates with cardiomyopathy in mice expressing constitutively active rac1. *J Clin Invest*. 105:875-886
100. Takemoto M, Node K, Nakagami H, Liao Y, Grimm M, Takemoto Y, Kitakaze M, Liao JK (2001) Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy. *J Clin Invest*. 108:1429-1437
101. Tepass U, Truong K, Godt D, Ikura M, Peifer M (2000) Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 1:91-100
102. Tribulova N, Knezl V, Okruhlicova L, Slezak J (2008) Myocardial gap junctions: targets for novel approaches in the prevention of life-threatening cardiac arrhythmias. *Physiol Res*. 57:S1-S13
103. Tsai CT, Lai LP, Kuo KT, Hwang JJ, Hsieh CS, Hsu KL, Tseng CD, Tseng YZ, Chiang FT, Lin JL (2008) Angiotensin II activates signal transducer and activators of transcription 3 via Rac1 in atrial myocytes and fibroblasts: implication for the therapeutic effect of statin in atrial structural remodeling. *Circulation*. 117:344-355
104. Tveit A, Grundtvig M, Gundersen T, Vanberg P, Semb AG, Holt E, Gullestad L (2004) Analysis of pravastatin to prevent recurrence of atrial fibrillation after electrical cardioversion. *Am J Cardiol*. 93:780-782

105. Van Aelst L, D'Souza-Schorey C (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 11:2295-2322
106. van der Velden HM, Jongsma HJ (2002) Cardiac gap junctions and connexins: their role in atrial fibrillation and potential as therapeutic targets. *Cardiovasc Res.* 54:270-279
107. Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, Muller K, Konkol C, Sauer H, Böhm M, Nickenig G (2001) Inhibition of Geranylgeranylation Reduces Angiotensin II-Mediated Free Radical Production in Vascular Smooth Muscle Cells: Involvement of Angiotensin AT1 Receptor Expression and Rac1 GTPase. *Mol Pharmacol.* 59:646-654
108. Way KJ, Isshiki K, Suzuma K, Yokota T, Zvagelsky D, Schoen FJ, Sandusky GE, Pechous PA, Vlahos CJ, Wakasaki H, King GL (2002) Expression of connective tissue growth factor is increased in injured myocardium associated with protein kinase C beta2 activation and diabetes. *Diabetes.* 51:2709-2718
109. Wenzel S, Taimor G, Piper HM, Schluter KD (2001) Redox-sensitive intermediates mediate angiotensin II-induced p38 MAP kinase activation, AP-1 binding activity, and TGF-beta expression in adult ventricular cardiomyocytes. *FASEB J.* 15:2291-2293
110. Wetzel U, Boldt A, Lauschke J, Weigl J, Schirdewahn P, Dorszewski A, Doll N, Hindricks G, Dhein S, Kottkamp H (2005) Expression of connexins 40 and 43 in human left atrium in atrial fibrillation of different aetiologies. *Heart.* 91:166-170
111. Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA (1995) Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation.* 92:1954-1968
112. Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB (1991) Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. *Stroke.* 22:983-988
113. Xu J, Cui G, Esmailian F, Plunkett M, Marelli D, Ardehali A, Odum J, Laks H, Sen L (2004) Atrial extracellular matrix remodeling and the maintenance of atrial fibrillation. *Circulation.* 109:363-368

114. Yan H, Chen JZ, Zhu JH, Ni YM, Yu GW, Hu SJ, Tao QM (2004) Expression of connexin in atrium of patients with atrial fibrillation and its signal transduction pathway. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 84:209-213
115. Young-Xu Y, Jabbour S, Goldberg R, Blatt CM, Graboys T, Bilchik B, Ravid S (2003) Usefulness of statin drugs in protecting against atrial fibrillation in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 92:1379-1383

7. Publikationen/Dank

7.1. Publikationen

Adam O, Lavall D, Grube M, Krömer HK, Böhm M, Laufs U (2009) Angiotensin II causes structural remodeling in atrial fibrillation via activation of Rac1 and Connective Tissue Growth Factor.

Manuscript submitted

7.2. Abstracts

Adam O, Lavall D, Schäfers HJ, Böhm M, Laufs U (2007) Rac1 GTPase Activity is Associated with Atrial Fibrosis and Fibrillation. Scientific Sessions, American Heart Association, Abstract 1346

Adam O, Lavall D, Böhm M, Laufs U (2008) Signaltransduktion bei Vorhofflimmern - Bedeutung der Rac1 GTPase. Med Klin 103:10

Adam O, Lavall D, Böhm M, Laufs U (2008) Bedeutung der Rac1 GTPase für strukturelles Remodeling bei Vorhofflimmern. Clin Res Cardiol 96: Suppl 1, 74. Jahrestagung der Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, V1644

Adam O, Lavall D, Böhm M, Laufs U (2008) Role of Rac1 GTPase for Structural Remodeling in Atrial Fibrillation. Eur Heart J. 29 (Abstract Supplement), 18-19

Adam O, Lavall D, Grube M, Krömer HK; Böhm M (2008) Angiotensin II Leads to Structural Remodeling in Atrial Fibrillation via Activation of Rac1 and Connective Tissue Growth Factor. Scientific Sessions, American Heart Association, Abstract 1518

7.3. Dank

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ulrich Laufs für die freundliche Überlassung des Themas und die stetige Bereitschaft, mich mit konstruktiven Kritiken zu unterstützen und zu motivieren.

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

Bei Herrn Prof. Dr. H.-J. Schäfers möchte ich mich für die freundliche Überlassung der humanen linksatrialen Gewebeproben bedanken.

Besonders möchte ich Herrn Dr. Oliver Adam für die sehr gute wissenschaftliche Betreuung in allen Abschnitten der Arbeit, seine produktiven Ideen und die hervorragende Zusammenarbeit danken.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei den Medizinisch-Technischen Assistentinnen Frau Simona Jäger und Frau Ellen Becker für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und die ständige Bereitschaft, mir mit Rat und Tat bei der Durchführung der Experimente zur Seite zu stehen.

Für die ständige Hilfsbereitschaft, das sehr angenehme Arbeitsklima und die schöne Zeit möchte ich mich bei allen Ärzten, Biologen, Doktoranden und Medizinisch-Technischen Assistentinnen des kardiologischen Forschungslabors herzlich bedanken.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Anschrift	Richard Wagner Straße 77 66111 Saarbrücken
Geburtsdatum	12. August 1983
Geburtstort	Saarbrücken
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

1990 - 1994	Grundschule Salbach in Heusweiler-Obersalbach
1994 - 2003	Realgymnasium Völklingen (heute Albert-Einstein-Gymnasium Völklingen)

Studium

10/2003	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes
08/2005	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2006 – 4/2008	Experimentelle Doktorarbeit bei Prof. Dr. med. U. Laufs in der Klinik für Innere Medizin – Klinisch- Experimentelle Medizin der Universität des Saarlandes
4/2008 – 7/2008	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Forschungsgruppe von Prof. Dr. med. U. Laufs
8/2008	Beginn des Praktischen Jahres

Famulaturen/Blockkurse

Kardiologie	SHG Kliniken Völklingen (2006)
Neurologie	Knappschaftskrankenhaus Püttlingen (2006)
Kardiologie/Angiologie	Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg (2007)
Herzchirurgie (Blockkurs)	Cardiocentro Ticino, Lugano, Schweiz (2007)
Allgemeinmedizin	Praxis Dr. med. A. Schwall/T. Pahl, Saarbrücken (2008)