

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

**Die Wirkung des
Mineralocorticoid-Rezeptor-Antagonisten Finerenon
auf die pro-fibrotische Signaltransduktion
in kardialen Fibroblasten**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2016

vorgelegt von: **Nadine Jacobs**
geb. am 06.01.1992 in Merzig

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	8
1.1 Die Wirkung des Mineralocorticoid-Rezeptor-Antagonisten Finerenon auf die pro-fibrotische Signaltransduktion in kardialen Fibroblasten.....	8
1.2 Effect of the mineralocorticoid receptor antagonist finerenone on profibrotic signal transduction in cardiac fibroblasts.....	9
2 Einleitung und eigene Fragestellung	11
2.1 Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern.....	11
2.1.1 Definition, Epidemiologie und Klinik des Vorhofflimmerns	11
2.1.2 Definition, Epidemiologie und Klinik der Herzinsuffizienz.....	12
2.1.3 Komorbidität zwischen Vorhofflimmern und Herzinsuffizienz	13
2.2 Kardiale Fibrose	14
2.2.1 Fibrose als Folge kardiovaskulärer Erkrankungen.....	14
2.2.2 Pro-Arrhythmogenität reaktiver kardialer Fibrose.....	17
2.2.3 Fibrose und Herzinsuffizienz	20
2.2.4 Molekularbiologische Veränderungen bei kardialer Fibrose.....	20
2.3 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	22
2.3.1 Physiologische Funktion des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems.....	22
2.3.2 Das RAAS in der Pathophysiologie des kardialen Remodeling	23
2.4 Mineralocorticoid-Rezeptor-Antagonisten.....	24
2.4.1 Limitierungen des klinischen Einsatzes von Spironolacton und Eplerenon	25
2.4.2 Finerenon, ein neuer nicht-steroidaler MR-Antagonist.....	26
2.5 Eigene Fragestellung	28
3 Material und Methoden	29
3.1 Material	29
3.1.1 Medien, Lösungen, Puffer	29
3.1.2 Antikörper	30
3.1.3 Sonden und Primer	31
3.1.4 Verbrauchsmaterial	31
3.1.5 Chemikalien, sonstige Reagenzien.....	32

3.1.6	Kits	34
3.1.7	Geräte	35
3.1.8	Software	37
3.2	Methoden.....	38
3.2.1	Zellkultur.....	38
3.2.2	Proteinanalyse mittels Western-Blot.....	40
3.2.3	Genexpressionsanalyse mittels TaqMan®-PCR	43
3.2.4	MR-Immunfluoreszenz Färbung von Kardiofibroblasten.....	51
3.2.5	Statistische Auswertung	52
4	Ergebnisse	53
4.1	Finerenon hemmt die Translokation des Mineralocorticoid-Rezeptors in den Zellkern in kardialen Fibroblasten	53
4.2	Finerenon reduziert die basale CTGF-Expression in kardialen Fibroblasten	56
4.3	Finerenon verhindert die Aldosteron-induzierte CTGF-Überexpression in kardialen Fibroblasten	57
4.4	Finerenon verhindert die Aldosteron-Angiotensin II-induzierte CTGF-Überexpression in kardialen Fibroblasten.....	58
4.5	Angiotensin II reguliert Aldosteron-unabhängig die TGF- β -Expression in kardialen Fibroblasten	60
4.6	Finerenon reduziert die Aldosteron-Angiotensin II-induzierte Fibronektin-Überexpression in kardialen Fibroblasten.....	62
4.7	Finerenon verhindert die Aldosteron-induzierte LOX-Überexpression in kardialen Fibroblasten	64
4.8	Finerenon reduziert die Aldosteron-induzierte Mikro-RNA21-Überexpression in kardialen Fibroblasten.....	66
5	Diskussion	68
5.1	Finerenon schützt vor fibrotischem Remodeling	68
5.2	Finerenon als Prototyp einer neuen Generation von MR-Antagonisten	71
5.3	Limitierungen der Studie.....	73
5.4	Schlussfolgerung	74

6	Literaturverzeichnis.....	75
7	Publikationen/Dank	88
7.1	Publikationen.....	88
7.2	Abstracts.....	88
7.3	Dank	89
8	Lebenslauf.....	90

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A / mA	Ampere / Milliampere
ACE	Angiotensin Converting Enzyme (Angiotensin-konvertierendes Enzym)
Aldo	Aldosteron
Ang II	Angiotensin II
Aqua dest.	Wasser, vollentsalzt und destilliert
AT ₁ -Rezeptor	Angiotensin II-Rezeptor, Typ 1
ATPase	Adenosintriphosphatase
BSA	Bovines Serum-Albumin
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Kalzium
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	Cycle threshold (Zyklenschwellenwert)
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
Da / kDa	Dalton / Kilodalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DHP	Dihydropyridin
DMEM	Dulbecco`s Modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DOCA	Desoxycorticosteronacetat
ECL	Enhanced Chemiluminiscence
EF	Ejektionsfraktion
et al.	et alii, et aliae, et alia (und andere)
Fine	Finerenon
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
g / mg / µg / ng	Gramm / Milligramm / Mikrogramm / Nanogramm
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GR	Glukocorticoid-Rezeptor
h	Stunde(n)

HF-PEF	Heart Failure with Preserved Ejection Fraction
HF-REF	Heart Failure with Reduced Ejection Fraction
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IgG	Immunglobulin G
L / mL / µL	Liter / Milliliter / Mikroliter
LOX	Lysyl-Oxidase
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
M / nM / mM	molar / nanomolar / millimolar
m / cm / nm / µL	Meter / Zentimeter / Nanometer / Mikrometer
Mi21	Mikro-RNA21
min	Minute(n)
miRNA	Mikro-RNA
mol / mmol	Mol / Millimol
MR	Mineralocorticoid-Rezeptor
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
Na ⁺	Natrium
ns	nicht signifikant
nt	Nukleotid(e)
NYHA	New York Heart Association
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PR	Progesteron-Rezeptor
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RacET	transgene Mäuse mit Überexpression von konstitutiv aktivem Rac1
RNA	Ribonukleinsäure
RNU6B	kleine nukleäre RNA U6B
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
Spiro	Spirolacton

TAC	Transverse Aortic Constriction (transverse aortale Konstriktion)
Telmi	Telmisartan
TGF- β	Transforming Growth Factor β
U	Umdrehungen
V / mV	Volt / Millivolt
Δ	Delta

1 Zusammenfassung

1.1 Die Wirkung des Mineralocorticoid-Rezeptor-Antagonisten Finerenon auf die pro-fibrotische Signaltransduktion in kardialen Fibroblasten

Die Aktivierung des Mineralocorticoid-Rezeptors (MR) durch Aldosteron führt zu kardialer Fibrose, welche für Arrhythmien und Progredienz der Herzinsuffizienz prädisponiert. Ziel dieser Studie war es, die Effekte von Finerenon, einem selektiven, nicht-steroidalen MR-Antagonisten, auf die Mechanismen der Fibroseentstehung in kultivierten kardialen Fibroblasten zu untersuchen.

Aldosteron induzierte eine Translokation des MR vom Zytoplasma in den Kern von kardialen Fibroblasten (Verhältnis nukleärer zu zytoplasmatischer Lokalisation, Kontrolle $2,3 \pm 4,0$, Aldosteron $6,8 \pm 5,7$, $p < 0,0001$). Finerenon hemmte diese Aldosteron-induzierte MR-Translokation ($2,1 \pm 2,4$, $p < 0,0001$ verglichen mit Aldosteron). Finerenon verringerte konzentrationsabhängig die basale Expression von Connective Tissue Growth Factor (CTGF). Dieser Effekt von Finerenon in der Konzentration 500 nM war vergleichbar dem Effekt von Spironolacton in der Konzentration 500 nM (Finerenon $73,7 \pm 14,8$ %, $p < 0,01$, Spironolacton $69,9 \pm 18,7$ %, $p < 0,01$, jeweils verglichen mit Kontrolle). Finerenon verhinderte in einer Konzentration von 500 nM die Aldosteron-induzierte CTGF-Überexpression vollständig (Aldosteron $187,4 \pm 41,6$ %, $p < 0,01$ verglichen mit Kontrolle, Finerenon $89,0 \pm 34,1$ %, $p < 0,01$ verglichen mit Aldosteron). Die gleichzeitige Behandlung mit Angiotensin II und Aldosteron verstärkte die CTGF-Überexpression ($209,9 \pm 68,7$ %, $p < 0,0001$ verglichen mit Kontrolle). Dieser Effekt wurde durch Finerenon vollständig verhindert ($100,4 \pm 10,3$ %, $p < 0,001$ verglichen mit Aldosteron + Angiotensin II). Aldosteron beeinflusste im Gegensatz zu Angiotensin II die Expression von Transforming Growth Factor β (TGF- β) nicht (Angiotensin II $171,8 \pm 34,2$ %, $p < 0,0001$ verglichen mit Kontrolle). In Übereinstimmung mit diesem Befund war der Effekt von Finerenon auf die TGF- β -Expression neutral, wohingegen Telmisartan die Angiotensin II-induzierte Überexpression von TGF- β reduzierte ($116,5 \pm 29,4$ %, $p < 0,01$ verglichen mit Angiotensin II). Der durch Aldosteron und Angiotensin II bedingte Anstieg der Expression von Fibronectin ($186,8 \pm 44,8$ %, $p < 0,0001$ verglichen mit Kontrolle) wurde durch Finerenon reduziert ($116,0 \pm 28,4$ %, $p < 0,01$ verglichen mit Aldosteron + Angiotensin II). Finerenon verhinderte die

Aldosteron-induzierte Überexpression der Lysyl-Oxidase (Aldosteron $149,1 \pm 18,3$ %, $p < 0,001$ verglichen mit Kontrolle; Finerenon $86,6 \pm 29,8$ %, $p < 0,0001$ verglichen mit Aldosteron) und reduzierte die Aldosteron-induzierte Überexpression der Mikro-RNA21 (Aldosteron $353,9 \pm 228,7$ %, $p < 0,01$ verglichen mit Kontrolle; Finerenon $130,1 \pm 46,1$ %, $p < 0,05$ verglichen mit Aldosteron).

Zusammengefasst verhindert Finerenon die Aldosteron-induzierte MR-Translokation in den Zellkern und schützt vor pro-fibrotischen Veränderungen in kardialen Fibroblasten. Die Hemmung des Mineralocorticoid-Rezeptors durch Finerenon ist daher ein potentieller therapeutischer Ansatz, um das Risiko für die Entstehung kardialer Fibrose und daraus resultierende Herzrhythmusstörungen und Herzinsuffizienz zu vermindern.

1.2 Effect of the mineralocorticoid receptor antagonist finerenone on profibrotic signal transduction in cardiac fibroblasts

Activation of the mineralocorticoid receptor (MR) by aldosterone promotes cardiac fibrosis that predisposes to arrhythmias and that impairs heart failure. The aim of this study was to investigate the impact of finerenone, a selective non-steroidal MR antagonist, on mechanisms of genesis of fibrosis in cardiac fibroblasts.

Aldosterone induced nuclear translocation of MR in cardiac fibroblasts (nuclear to cytoplasm MR localization, control $2,3 \pm 4,0$, aldosterone $6,8 \pm 5,7$, $p < 0,0001$) that was reduced by finerenone ($2,1 \pm 2,4$, $p < 0,0001$ vs. aldosterone). Finerenone decreased the protein expression of connective tissue growth factor (CTGF) in a concentration-dependent manner. This effect of finerenone 500 nM was similar to spironolactone 500 nM (finerenone $73,7 \pm 14,8$ %, $p < 0,01$, spironolactone $69,9 \pm 18,7$ %, $p < 0,01$ vs. control, respectively). Finerenone 500 nM completely prevented the aldosterone induced CTGF overexpression (aldosterone $187,4 \pm 41,6$ %, $p < 0,01$ vs. control, finerenone $89,0 \pm 35,0$ %, $p < 0,01$ vs. aldosterone). Angiotensin II and aldosterone co-treatment enhanced CTGF upregulation ($209,9 \pm 68,7$ %, $p < 0,0001$ vs. control). This effect was completely prevented by finerenone ($100,4 \pm 10,3$ %, $p < 0,001$ vs. aldosterone + angiotensin II). In contrast to angiotensin II, aldosterone did not increase transforming growth factor β (TGF- β) expression (angiotensin II

171,8 ± 34,2 %, p < 0,0001 vs. control). In addition to that, finerenone did not have any effects on TGF-β expression but telmisartan prevented the angiotensin II induced TGF-β overexpression (116,5 ± 29,0 %, p < 0,01 vs. angiotensin II). The increase in fibronectin expression induced by the co-treatment aldosterone and angiotensin II (186,8 ± 44,8 %, p < 0,0001 vs. control) was reduced by finerenone (116,0 ± 28,4 %, p < 0,01 vs. aldosterone + angiotensin II). Finerenone inhibited the aldosterone induced alteration of the lysyl oxidase (aldosterone 149,1 ± 18,3 %, p < 0,001 vs. control; finerenone 86,6 ± 29,8 %, p < 0,0001 vs. aldosterone) and reduced the aldosterone induced alteration of the micro-RNA21 expression (aldosterone 353,9 ± 228,7 %, p < 0,01 vs. control; finerenone 130,1 ± 46,1 %, p < 0,05 vs. aldosterone).

Summarized, finerenone prevents aldosterone induced MR-translocation and pro-fibrotic changes in cardiac fibroblasts. Therefore, finerenone could serve as a therapeutic agent to prevent risk of structural cardiac remodeling and resulting arrhythmia and heart failure.

2 Einleitung und eigene Fragestellung

2.1 Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern

2.1.1 Definition, Epidemiologie und Klinik des Vorhofflimmerns

Vorhofflimmern ist eine supraventrikuläre tachykarde Arrhythmie, die durch unkoordinierte atriale Erregung charakterisiert ist und die mit einem Verlust der mechanischen Vorhoffunktion einhergeht (Fuster et al., 2011). Elektrokardiographisch ist Vorhofflimmern durch fehlende P-Wellen, die durch schnelle, unregelmäßige Flimmerwellen mit variierender Form und Amplitude ersetzt werden, sowie durch eine irreguläre Kammererregung charakterisiert (Falk, 2001).

Vorhofflimmern ist die häufigste anhaltende Herzrhythmusstörung. Die Prävalenz liegt bei 0,4-1 % und nimmt mit steigendem Alter zu, bei über 80-Jährigen beträgt sie mindestens 8 %. Die Inzidenz liegt bei unter 40-Jährigen bei 0,1 % pro Jahr und steigt auf 1,5-2 % pro Jahr bei Patienten über 80. Während der letzten Jahrzehnte haben die Krankenhauseinweisungen aufgrund von Vorhofflimmern stark zugenommen. Vorhofflimmern führt daher zu einer relevanten Belastung des Gesundheitssystems (vgl. zu diesem Abschnitt: Fuster et al., 2011).

Bei vielen Patienten bleibt Vorhofflimmern asymptomatisch (Page et al., 1994). Einige, vor allem jüngere Patienten, bei denen ein Vorhofflimmern ohne zugrunde liegende strukturelle Herzerkrankung vorliegt (sogenanntes „lone AF“) (Fuster et al., 2011), leiden an Palpitationen und Herzrasen (Falk, 2001; Fuster et al., 2011).

Eine wichtige Komplikation von Vorhofflimmern, welche zu einer hohen Morbidität und Mortalität führt, ist der kardioembolische Schlaganfall (Fuster et al., 2011). Durch Stase des Blutflusses im linksatrialen Appendix, endokardialen und koagulatorischen Veränderungen bilden sich Thromben im linken Vorhofohr, welche durch Embolisationen zu Schlaganfällen führen können (Watson et al., 2009). Jährlich erleiden 5 % der Patienten mit Vorhofflimmern einen Schlaganfall, mindestens einer von sechs Schlaganfällen ist auf Vorhofflimmern zurückzuführen (Hart und Halperin, 1999; Fuster et al., 2011).

Es besteht ein Bedarf an neuen präventiven Strategien, um das Auftreten von Vorhofflimmern und damit verbundene Komplikationen zu vermindern.

2.1.2 Definition, Epidemiologie und Klinik der Herzinsuffizienz

Herzinsuffizienz ist ein klinisches Syndrom mit typischen Symptomen, dem strukturelle oder funktionelle kardiale Abnormalitäten zugrunde liegen, welche in Ruhe oder bei Anstrengung zu einem verminderten kardialen Auswurf oder erhöhten intrakardialen Drücken führen (Ponikowski et al., 2016). Meist geht Herzinsuffizienz mit einer systolischen Dysfunktion und einer daraus resultierenden Verminderung der linksventrikulären Ejektions-Fraktion (LVEF) einher (systolische Herzinsuffizienz = Heart Failure with Reduced Ejection Fraction, HF-REF) (McMurray et al., 2012). Die Ejektions-Fraktion (EF) ist definiert als Anteil des Schlagvolumens am enddiastolischen Volumen (McMurray et al., 2012). Ist die Ejektionsfraktion nur gering vermindert, spricht man von Heart Failure with Preserved Ejection Fraction (Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion, HF-PEF) (McMurray et al., 2012; Ponikowski et al., 2016).

Mit einer Prävalenz von 2,3 % (Davies et al., 2001) stellt die systolische Herzinsuffizienz ein häufiges Krankheitsbild dar. Bei über 75-Jährigen liegt die Prävalenz sogar bei 8,4 % (Mosterd und Hoes, 2007). Aktuell stellt die Herzinsuffizienz den häufigsten Grund für Krankenhausaufenthalte in Deutschland dar ("State & society - Hospitals - Hospital patients - Federal Statistical Office (Destatis)," n.d.).

Patienten mit Herzinsuffizienz leiden unter Symptomen wie Atemnot und Orthopnoe, reduzierter Belastbarkeit, Müdigkeit und peripheren Ödemen (McMurray et al., 2012). Anhand der Symptomatik wird die Herzinsuffizienz durch die New York Heart Association-Klassifikation (NYHA) in symptomlose (NYHA I), milde (NYHA II), moderate (NYHA III) oder schwere (NYHA IV) Herzinsuffizienz eingeteilt (McMurray et al., 2012; Ponikowski et al., 2016). Die Prognose ist mit einer 5-Jahres-Mortalität zwischen 42 und 75 % schlecht (Mant et al., 2009).

2.1.3 Komorbidität zwischen Vorhofflimmern und Herzinsuffizienz

Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern sind stark miteinander assoziiert (Anter et al., 2009). Beide Erkrankungen haben ähnliche Risikofaktoren, zum Beispiel Bluthochdruck, Rauchen, Diabetes, Fettleibigkeit, Nierenschädigung, koronare Herzkrankheit und Schlafapnoe (Kotecha und Piccini, 2015). Vorhofflimmern kann sowohl Auslöser als auch Folge einer Herzinsuffizienz sein (Kotecha und Piccini, 2015).

In der Framingham-Studie hatten 38 % der Patienten mit Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern zuerst Vorhofflimmern entwickelt (Wang et al., 2003). Aus dem Verlust des Beitrags der atrialen Kontraktion zur Ventrikelfüllung beim Vorhofflimmern resultiert ein vermindertes ventrikuläres Schlagvolumen (Falk, 2001). Die unregelmäßige Kammererregung führt zu einer Verschlechterung der kardialen Hämodynamik (Falk, 2001). Vorhofflimmern kann eine Kammertachykardie zur Folge haben, welche zu einer Tachykardiomyopathie mit strukturellen Veränderungen und ventrikulärer Dysfunktion führt (Falk, 2001; Wang et al., 2003; Fuster et al., 2011).

41 % der Patienten mit den Komorbiditäten Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern in der Framingham-Studie entwickelten als erstes die Herzinsuffizienz (Wang et al., 2003). Herzinsuffizienz ist ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung von Vorhofflimmern (Anter et al., 2009; Kotecha und Piccini, 2015). Li et al. zeigten bei Hunden mit Herzinsuffizienz eine verlängerte Persistenz von Vorhofflimmern im Vergleich zur Kontrollgruppe (Li D et al., 1999). Die pathophysiologische Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) führt zu einer Erhöhung der Füllungsdrücke und der Nachlast (Kotecha und Piccini, 2015). Durch Dehnung der Vorhöfe und durch die direkten pro-fibrotischen Effekte von Angiotensin II und Aldosteron entsteht pro-arrhythmogene kardiale Fibrose (Burstein und Nattel, 2008; Adam et al., 2010; Kotecha und Piccini, 2015). Diese prädisponiert für die Entstehung sogenannter Reentry-Kreisläufe, welche das pathophysiologische Korrelat zu Vorhofflimmern darstellen (Nattel, 2002).

2.2 Kardiale Fibrose

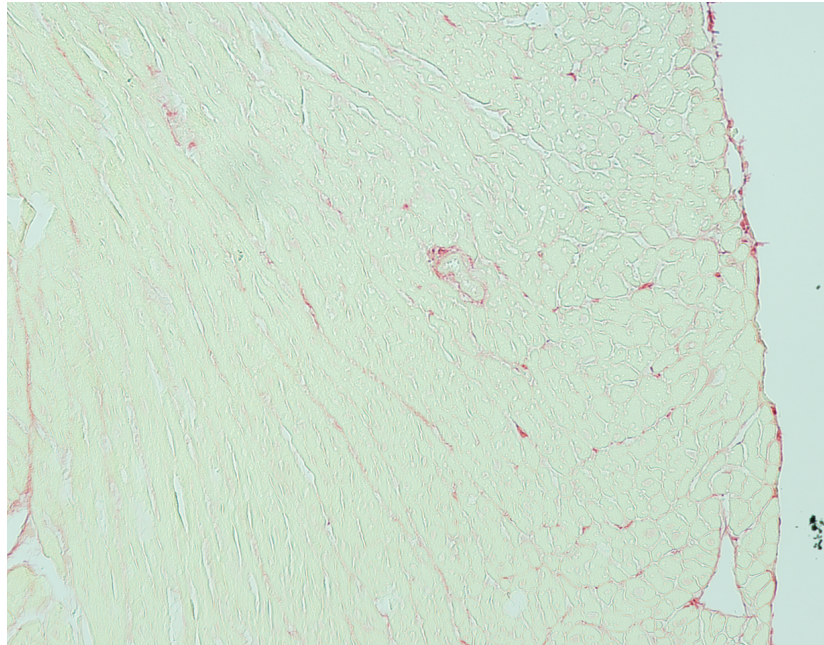
Im gesunden Herzen werden dicht gepackte Kardiomyozyten in eine unterstützende Matrix aus Fibroblasten und Plasmazellen, Kollagenfibrillen, Glykosaminoglykanen und Glykoproteinen eingebettet (Weber, 1989; Nguyen et al., 2014). Diese bindegewebige Matrix integriert die Myozyten optimiert in den Pumpvorgang des Herzens, verkoppelt sie mit den nährenden Gefäßen und spielt eine wichtige Rolle in der Abwehr von Krankheitserregern (Weber, 1989; Kong et al., 2014; Nguyen et al., 2014). Unter physiologischen Bedingungen entsteht ein ausgewogenes Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau von bindegewebigen Strukturen (Kong et al., 2014). Da sich myokardiales Gewebe nur geringfügig regenerieren kann (Nguyen et al., 2014), schützt reparative Fibrose den Herzmuskel während einer Verletzung durch Narbenbildung vor Rupturen (Weber, 1989; Kong et al., 2014; Nguyen et al., 2014). Zu starke und pathologische Fibrose kann demgegenüber negative Effekte auf den Herzmuskel haben.

2.2.1 Fibrose als Folge kardiovaskulärer Erkrankungen

Fibrose, die nicht durch den Untergang von Myozyten ausgelöst wird, wird als reaktive Fibrose bezeichnet (Burstein und Nattel, 2008). Bei einer Herzinsuffizienz führt die Aktivierung des RAAS sowohl direkt durch die pro-fibrotischen Effekte von Angiotensin II und Aldosteron als auch indirekt durch Volumenbelastung des Herzens zu reaktiver kardialer Fibrose (Kotecha und Piccini, 2015). Aus der Volumenbelastung resultiert eine mechanische Dehnung der Vorhöfe, wodurch die Synthese von Kollagen, dem wichtigsten Strukturprotein im fibrotischen Gewebe getriggert wird (Carver et al., 1991). Li et al. zeigten bei Hunden mit Herzinsuffizienz im linken Vorhof histologisch interstitielle Fibrose, wobei die Myofibrillen durch dicke Schichten fibrotischen Gewebes voneinander getrennt wurden (Li D et al., 1999). Auch andere Erkrankungen, die zu einer Volumenbelastung des Herzens führen, wie beispielsweise Klappeninsuffizienzen und Erkrankungen, die mit einer Druckbelastung einhergehen, zum Beispiel ein Hypertonus oder eine Aortenstenose können zu reaktiver kardialer Fibrose führen (Kong et al., 2014). Vorergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe (AG Laufs) zeigen im Atrium von transgenen Mäusen mit Überexpression von konstitutiv aktivem Rac1 (RacET), die im Alter spontan Vorhofflimmern entwickelten, gegenüber dem Wildtyp verstärkt Fibrose (Abb. 1). Hypertrophie und dilatative Kardiomyopathien können ebenfalls

Fibrose induzieren (Kong et al., 2014). Des Weiteren sind Noxen wie Alkohol und metabolische Einflüsse, beispielsweise Diabetes mellitus sowie das Altern mit kardialer Fibrose assoziiert (Kong et al., 2014).

A



B

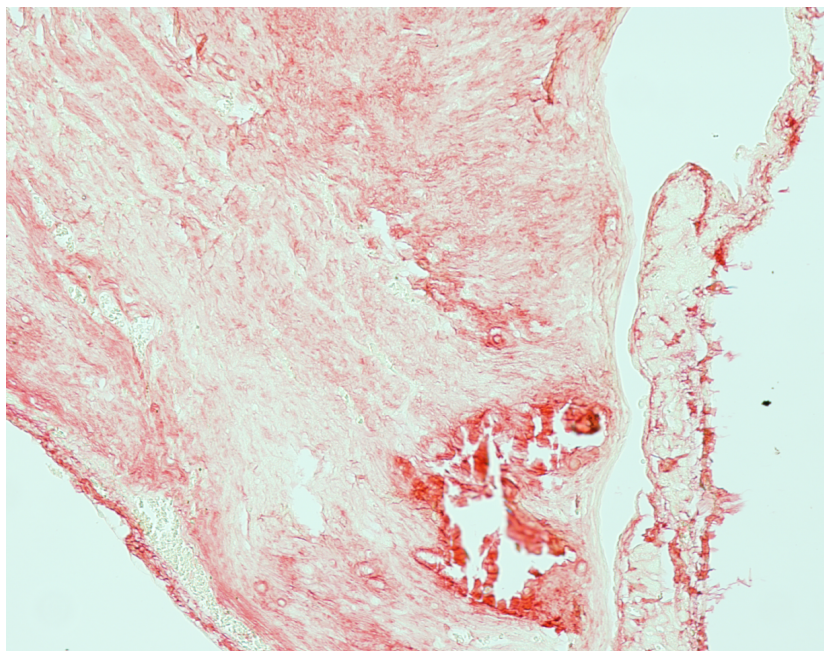


Abbildung 1: Fibrotisches Remodeling im Atrium von transgenen RacET-Mäusen mit Vorhofflimmern.

(Vorergebnisse AG Laufs)

Die Abbildungen zeigen histologische Präparate aus dem Atrium von Mäusen in 400-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung. Gefärbt wurde das Gewebe mit Sirius-Red-Färbung. **A** Wildtyp. Die Myofibrillen sind dicht gepackt mit wenig interstitiellem Bindegewebe. **B** RacET. Die Tiere entwickelten im Alter spontan Vorhofflimmern. Das Gewebe zeigt eine starke Akkumulation von Kollagenfasern (rot).

2.2.2 Pro-Arrhythmogenität reaktiver kardialer Fibrose

Reaktive Fibrose ist diffus zwischen den Kardiomyozyten angeordnet und durch die veränderten elektrischen Leitungsbedingungen, welche die Entstehung von Reentry-Kreisläufen fördern pro-arrhythmogen (Nguyen et al., 2014).

Eine abnorme Erregungsfortleitung kann in einem sogenannten Reentry-Kreislauf resultieren. Im Anschluss an eine Erregung ist jede Zelle für eine bestimmte Zeit refraktär und kann nicht erneut erregt werden. Entsteht im Atrium eine ektope atriale Erregung in einer Zone II, kann diese Erregung eine Zone I so lange nicht erregen, wie diese refraktär ist. Kommt es allerdings zu einer Veränderung in der Erregungsfortleitung, sodass die Erregung von Zone II zu Zone I einen längeren Weg über nicht-refraktäre Zellen zurücklegen muss, dauert es länger, bis die Erregung in Zone I eintrifft. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass Zone I bis zu diesem Zeitpunkt nicht mehr refraktär ist und erneut erregt werden kann. Aus Zone I kann die Erregung dann wiederum zu Zone II zurückkehren und diese mit der Voraussetzung, dass der Weg lang genug ist, abermals erregen. Durch diesen Mechanismus können sich Zone I und II wiederholt gegenseitig erregen, wodurch ein Reentry-Kreislauf entsteht (Abb. 2) (vgl. zu diesem Abschnitt: Nattel, 2002).

Die Entstehung von Reentry-Kreisläufen ist abhängig von der Dauer der Refraktärperiode und der Ausbreitungsgeschwindigkeit. Durch eine lange Refraktärperiode wird es wahrscheinlicher, dass der zirkulierende Impuls auf refraktäres Gewebe trifft und erlischt. Je schneller die Erregung wieder zum Ursprung zurück gelangt, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Refraktärperiode dort noch nicht vorüber ist. Daher muss zum Entstehen eines Reentry-Kreislaufes die Wellenlänge der Erregung (Dauer der absoluten Refraktärzeit \times Leitungsgeschwindigkeit) kürzer sein, als der Weg des Reentry-Kreises, damit dieser wieder in einem nicht-refraktären Gebiet eindringen kann (vgl. zu diesem Abschnitt: Wiener und Rosenblueth, 1946; Allesie et al., 1973; Allesie et al., 1976; Allesie et al., 1977; Boineau et al., 1980; Rensma et al., 1988).

Durch fibrotisches Gewebe mit Kollagenfibrillen werden die Kardiomyozyten voneinander separiert und der Weg von Zone II zu Zone I wird länger, so dass es wahrscheinlicher wird, dass ein Impuls aus Zone II in Zone I auf nicht mehr refraktäres Gewebe trifft und dieses erregt (Abb. 2). Dadurch entstehen Reentry-Kreisläufe, wodurch eine ektope atriale Erregung

leicht in einem Vorhofflimmern resultieren kann. Im Hundemodell mit Herzinsuffizienz von Li et al. zeigte sich eine ausgeprägte Heterogenität in der Dauer der Erregungsfortleitung mit Zonen von langsamer Fortleitung, woraus eine verlängerte Persistenz von Vorhofflimmern bei den herzinsuffizienten Tieren im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe resultierte (Li D et al., 1999). Verheule et al. zeigten bei Mäusen mit atrialer Fibrose eine erhöhte Vulnerabilität für das Auftreten von Vorhofflimmern (Verheule et al., 2004). Patienten mit Vorhofflimmern haben eine verlangsamte intraatriale Erregungsfortleitung verglichen mit Patienten ohne Vorhofflimmern (Kumagai et al., 1991; Akyürek et al., 2001).

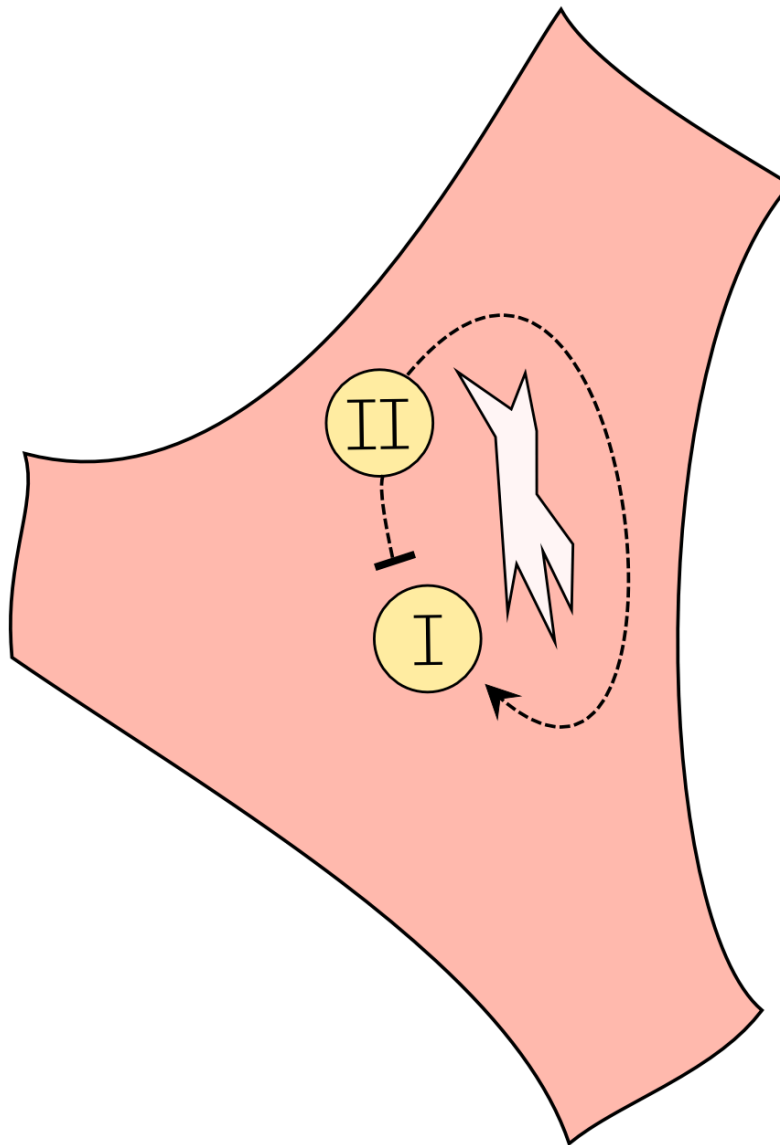


Abbildung 2: Entstehung eines Reentry-Kreislaufes

(Abbildung schematisch nach Nattel, 2002)

Gelangt eine ektope atriale Erregung, die in Zone II entsteht, über einen kurzen Weg zu Zone I, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass Zone I noch refraktär ist und nicht erregt werden kann. Durch interstitielle Fibrose (weißes Areal) ist der Weg zu Zone I länger und diese beim Eintreffen der Erregung nicht mehr refraktär, so dass sie erregt werden kann. Zone I kann dann wiederum Zone II erregen, falls diese nicht mehr refraktär ist, wodurch ein Reentry-Kreislauf entsteht.

2.2.3 Fibrose und Herzinsuffizienz

Fibrose führt zu einer Steifheit des Herzmuskels, welche eine systolische und eine diastolische Funktionsstörung bedingt und so eine Herzinsuffizienz verstärkt (Rockey et al., 2015). Kollagenfibrillen umgeben Kardiomyozyten, schnüren sie ein und vermindern ihre Arbeitsbelastung, so dass sie atrophieren können (Azibani et al., 2013). Des Weiteren wird durch die Akkumulation von Fibrose im perivaskulären Raum die Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen eingeschränkt (Krenning et al., 2010).

2.2.4 Molekularbiologische Veränderungen bei kardialer Fibrose

Bei fibrotischem Remodeling werden ruhende Fibroblasten durch die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren in kontraktile Zellen umgewandelt, welche Myofibroblasten genannt werden. Myofibroblasten haben ultrastrukturelle und phänotypische Merkmale von Muskelzellen und besitzen ein ausgedehntes endoplasmatisches Retikulum. Im Vergleich zu den kleineren Fibroblasten proliferieren sie stärker und produzieren mehr Kollagen. Myofibroblasten exprimieren „ α -smooth muscle protein“ (α -SMA), wodurch sie von Fibroblasten unterschieden werden können (vgl. zu diesem Abschnitt: Kong et al., 2014; Nguyen et al., 2014).

Fibroblasten und Myofibroblasten produzieren Kollagen, das wichtigste Strukturprotein in der interstitiellen Matrix (Weber, 1989). Die vorherrschenden Typen im kardialen Bindegewebe sind Kollagen Typ I und III, wobei Typ I mit 85 % die häufigste Form darstellt (Weber, 1989). Kardiale Fibrose ist charakterisiert durch eine interstitielle Akkumulation von Kollagen. Der Kollagen-Umsatz im gesunden Herzen wird normalerweise von ruhenden Fibroblasten reguliert: es wird genauso viel Kollagen abgebaut wie synthetisiert (Burstein und Nattel, 2008; Kong et al., 2014). Wird diese streng regulierte Balance zwischen Aufbau und Abbau von Kollagen gestört, resultiert dies in einer Kollagenablagerung im Gewebe und führt zu Fibrose (Burstein und Nattel, 2008; Kong et al., 2014).

Lysyl-Oxidase (LOX) ist ein kupferabhängiges 32 kDa Enzym, das von Bindegewebszellen synthetisiert und sezerniert wird (Kagan und Li, 2003). Im Extrazellulärraum ist es für die Quervernetzung des Kollagens durch Oxidierung spezifischer Lysin-Reste verantwortlich

(Kagan und Li, 2003). Die intrazellulären Formen von LOX kontrollieren Zelladhäsion und -motilität sowie die Expression bestimmter Gene (Li W et al., 1997; Kagan und Li, 2003; Saad et al., 2010). So resultiert die verstärkte Expression von LOX in einer erhöhten Expression von Droscha und Dicer, den wichtigsten Endonukleasen zur Bildung von Mikro-RNA (Ambros, 2004; Landthaler et al., 2004; Du und Zamore, 2005; Kuehbachner et al., 2007; Adam et al., 2012).

Mikro-RNAs (miRNAs) sind kleine, 20-30 Nucleotide lange, nicht kodierende RNAs, die komplementär zu bestimmten mRNAs sind und durch Anlagerung an diese deren Expression unterdrücken können (Matranga und Zamore, 2007; Ghildiyal und Zamore, 2009). Eine bedeutende Rolle in der Pathogenese atrialer Fibrose spielt Mikro-RNA21 (Adam et al., 2012). Eine wichtige Ziel-mRNA von Mikro-RNA21 ist Sprouty 1, ein Inhibitor des Ras/MEK/ERK-Signalwegs in Fibroblasten (Casci et al., 1999; Michel MC et al., 2001; Hanafusa et al., 2002; Wenzel et al., 2010; Adam et al., 2012). Dieser Signalweg reguliert das Fibroblasten-Überleben und die Sekretion von Wachstumsfaktoren, weshalb Mikro-RNA21, die über Inhibierung von Sprouty 1 diesen Signalweg aktiviert, eine pro-fibrotische Wirkung besitzt (Thum et al., 2008).

Ein weiteres wichtiges Protein der Extrazellulärmatrix, das von Fibroblasten gebildet wird, ist Fibronectin. Fibronectin ist ein dimeres Glykoprotein, welches in seiner nichtlöslichen Form als Polymere zusammengelagert eine Matrix bildet. Fibronectin besitzt viele Bindungsdomänen, unter anderen für Kollagen, Integrine, Fibrin und Heparin. Mit Zellen interagiert es durch Integrine und verbindet so die Extrazellulärmatrix mit dem Zytoskelett und intrazellulären Signalkaskaden (vgl. zu diesem Abschnitt: Magnusson und Mosher, 1998). Die Formation einer Fibronectin-Matrix ist notwendig für die Bildung eines Kollagen-Netzwerkes (Velling et al., 2002).

Connective Tissue Growth Factor (CTGF) ist ein zentraler pro-fibrotischer Wachstumsfaktor und Mediator kardialer Fibrose. CTGF gehört zur CCN (ctgf/cyr61/nov)-Gen-Familie (Moussad und Brigstock, 2000). Er wird von sowohl von kardialen Fibroblasten als auch von Kardiomyozyten produziert (Ohnishi et al., 1998; Chen MM et al., 2000;) und stimuliert neben der Proliferation, Adhäsion und Migration von Fibroblasten auch die Produktion von Komponenten der extrazellulären Matrix (Moussad und Brigstock, 2000). Eine Überexpression von CTGF korreliert mit einer verstärkten Fibronectin-, Kollagen- und

Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1-Produktion (Chen MM et al., 2000). Endothelin 1, Angiotensin II, Bone Morphogenetic Protein (BMP), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Insulin Like Growth Factor (IGF), sowie mechanischer und oxidativer Stress induzieren die Bildung von CTGF (Matsui und Sadoshima, 2004). Die Aktivierung des Mineralocorticoid-Rezeptors durch Aldosteron induziert eine CTGF-Überexpression (Lavall et al., 2014). Ein weiterer Induktor der CTGF-Synthese ist Transforming Growth Factor β (TGF- β) (Frazier et al., 1996; Grotendorst et al., 1996). Die Isoformen TGF- β 1, 2 und 3 sind an der Stimulation von Fibrose beteiligt (Leask und Abraham, 2004). TGF- β entfaltet seine pro-fibrotische Wirkung insbesondere durch Induktion der CTGF-Expression mit vermehrter Bildung extrazellulärer Matrix und Remodeling (Grotendorst et al., 1996; Grotendorst, 1997).

2.3 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

2.3.1 Physiologische Funktion des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) reguliert physiologisch den Blutdruck und den Elektrolythaushalt. Stimuli wie ein Abfall des Perfusionsdrucks der Nieren oder ein Abfall der Na^+ -Konzentration an der Macula Densa führen zu einer vermehrten Renin-Freisetzung aus den Zellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere. Renin ist eine Endopeptidase, welche die Spaltung von Angiotensinogen zu Angiotensin I katalysiert. Angiotensin I wird durch das Enzym Angiotensin Converting Enzyme (ACE) zu Angiotensin II gespalten. Angiotensin II bewirkt über AT_1 -Rezeptoren (Angiotensin II-Rezeptor, Typ I) einen Blutdruckanstieg durch Vasokonstriktion und eine Freisetzung von Aldosteron aus der Zona Glomerulosa der Nebennierenrinde (vgl. zu diesem Abschnitt: Paul et al., 2006).

Aldosteron ist ein Steroid-Hormon, welches Natrium- und Kaliumgleichgewicht reguliert sowie den Säure-Basenhaushalt beeinflusst. Seine Freisetzung wird einerseits durch Angiotensin II, andererseits durch einen erhöhten Kalium-Spiegel und durch Corticotropin stimuliert. Physiologisch erhöht Aldosteron die Natrium-Reabsorption sowie die Kalium- und Wasserstoffionen-Ausscheidung in den Epithelzellen im distalen Nephron (vgl. zu diesem Abschnitt: Spät und Hunyady, 2004).

Aldosteron diffundiert in die Zelle und bindet an dem intrazellulären Mineralocorticoid-Rezeptor (MR), der als Transkriptionsfaktor fungiert. Nachdem Aldosteron am MR gebunden hat transloziert dieser in den Zellkern, wo er die Expression verschiedener Gene reguliert. Dies führt im distalen Nephron zur Expression des epithelialen Natriumkanals (ENaC) und der Natrium-Kalium ATPase und zu deren Einbau in die Zellmembran (vgl. zu diesem Abschnitt: Fuller und Young, 2005).

2.3.2 Das RAAS in der Pathophysiologie des kardialen Remodeling

Die chronische Herzinsuffizienz geht, wie auch Vorhofflimmern oder die hypertensive Herzerkrankung, mit einer Aktivierung des RAAS einher (Brilla et al., 1990; Goette et al., 2000; Li D et al., 2001). Die systolische Herzinsuffizienz bedingt eine Verminderung des linksventrikulären Schlagvolumens, was zur Minderperfusion der Nieren und dadurch zur Renin-Ausschüttung führt (Nappi und Sieg, 2011). Daraus resultiert eine Erhöhung des intravaskulären Volumens, was das bereits insuffiziente Herz zusätzlich belastet (Nappi und Sieg, 2011). Des Weiteren spielen sowohl Angiotensin II als auch Aldosteron eine zentrale Rolle in der Vermittlung von maladaptiven fibrotischem Remodeling, das zu einer weiteren Verschlechterung der kardialen Funktion führt.

Eine Überexpression des AT₁-Rezeptors in transgenen Mäusen führt zu kardialer Hypertrophie, interstitieller Fibrose und Tod durch fortschreitende Herzinsuffizienz (Paradis et al., 2000). Angiotensin II stimuliert in kardialen Fibroblasten die Synthese von Kollagen und vermindert den Kollagenabbau durch Reduktion der Kollagenase-Aktivität (Brilla et al., 1994). AT₁-Rezeptor-Antagonisten vermindern ebenso wie ACE-Hemmer die Akkumulation von Kollagen in Rattenherzen nach Myokardinfarkt (van Krimpen et al., 1991; Smits et al., 1992). In der Pathogenese des fibrotischen Remodeling interagieren Mineralocorticoid- und AT₁-Rezeptor miteinander und potenzieren gegenseitig ihre Effekte (Mazak et al., 2004; Michel F et al., 2004; Xiao et al., 2004; Min et al., 2005; Di Zhang et al., 2008; Tsai et al., 2013).

Der Mineralocorticoid-Rezeptor befindet sich außer in der Niere auch in Blutgefäßen, im Gehirn und im Herz (Azibani et al., 2013). Seine Aktivierung durch Aldosteron in diesen Geweben induziert strukturelle und funktionelle Veränderungen wie Fibrose, vaskuläres

Remodeling und Inflammation (Azibani et al., 2013). Aldosteron induziert kardiales Remodeling, es führt zu verstärkter perivaskulärer und interstitieller Fibrose (Brilla et al., 1990; Brilla et al., 1993; Weber et al., 1993; Robert et al., 1994; Lavall et al., 2014) und prädisponiert so für Arrhythmien. Reil et al. zeigten bei Mäusen, die mit Aldosteron behandelt wurden im Atrium Fibrose, Myozytenhypertrophie und Störungen in der Erregungsfortleitung, was zu einer verstärkten Induzierbarkeit atrialer Arrhythmien im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe führte (Reil et al., 2012). Bei Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus fand sich eine erhöhte Prävalenz von Vorhofflimmern (Milliez et al., 2005). Im Herzen wird der MR unter anderem sowohl von Kardiomyozyten als auch von kardialen Fibroblasten exprimiert (Lavall et al., 2014). Seine Aktivierung stimuliert intrazelluläre Signalkaskaden wie zum Beispiel PI3-Kinase-p100 δ , was unter anderem die Expression von CTGF und Kollagen I und III fördert (Fuller und Young, 2005). Stockand et al. zeigten, dass Aldosteron MR-abhängig über Aktivierung von Ki-RasA (Kirsten Ras) die Proliferation von kardialen Rattenmyofibroblasten stimuliert (Stockand und Meszaros, 2002).

2.4 Mineralocorticoid-Rezeptor-Antagonisten

Spirolacton und Eplerenon sind strukturell verwandte steroidale MR-Antagonisten (Tab. 1). Bei Patienten mit Herzinsuffizienz zeigte sich in der Studie Randomized Aldactone Evaluation Study (RALES) eine Reduktion der Mortalität um 30 % bei zusätzlicher Gabe von Spirolacton zur konventionellen Herzinsuffizienztherapie (Pitt et al., 1999). Die Gabe von Eplerenon in der Studie Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficiency and Survival Study (EPHESUS) senkte die Mortalität bei Patienten mit Herzinsuffizienz um 15 % gegenüber der Placebogruppe (Pitt et al., 2001). Daher gehören MR-Antagonisten zur Standardtherapie der chronischen Herzinsuffizienz, wenn Patienten trotz Gabe eines ACE-Hemmers und eines β -Blockers symptomatisch bleiben (Ponikowski et al., 2016).

2.4.1 Limitierungen des klinischen Einsatzes von Spironolacton und Eplerenon

Obwohl MR-Antagonisten bei den meisten Patienten mit HF-REF indiziert sind, erhalten lediglich 9-30 % der Patienten Spironolacton oder Eplerenon (Samuel und Delcayre, 2010). Ihr klinischer Einsatz ist durch Nebenwirkungen limitiert.

Spironolacton, der erste verfügbare steroidale MR-Antagonist, ist mit einer IC_{50} (mittlere inhibitorische Konzentration) von 24 nM am MR sehr potent (Tab. 1). Seine Selektivität für den MR ist jedoch relativ gering, es bindet auch an anderen Steroidrezeptoren mit hoher Affinität (Tab. 1). Durch seinen Antagonismus am Androgen-Rezeptor führt Spironolacton bei 10 % der männlichen Patienten zu schmerzhafter Gynäkomastie. Am Progesteron-Rezeptor wirkt Spironolacton agonistisch und kann daher bei prämenopausalen Frauen eine Amenorrhoe zur Folge haben (vgl. zu diesem Abschnitt: Pitt et al., 1999; Samuel und Delcayre, 2010; Bramlage et al., 2016).

Eplerenon bindet selektiver am MR (Tab. 1) und führt daher seltener zu den genannten unerwünschten Wirkungen. Seine Affinität am MR ist mit einer IC_{50} von 990 nM deutlich geringer (Tab. 1), weshalb höhere Konzentrationen benötigt werden, um den MR zu besetzen (vgl. zu diesem Abschnitt: Bramlage et al., 2016).

Die Limitierung des Einsatzes beider Medikamente besteht in der Hyperkaliämie-Neigung, insbesondere bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Da Spironolacton und Eplerenon in der Niere vielfach stärker akkumulieren, als im Herzen, kommt es dort in hohem Maße zur Blockierung des MR, was eine starke Natriurese mit Kaliumrestriktion zur Folge hat (Kolkhof und Borden, 2012). Svensson et al. traten bei 36 % der Patienten, die Spironolacton erhielten Hyperkaliämien auf, wobei 10 % der Patienten Serum-Kalium-Werte von mehr als 6 mmol/L entwickelten (Svensson et al., 2004). In der EPHEBUS Studie zeigte sich bei 15,6 % der Patienten, die Eplerenon erhielten eine Hyperkaliämie (Pitt et al., 2008). Hyperkaliämien können unter anderem zu tödlichen ventrikulären Arrhythmien führen (Dunn et al., 2015). Vor allem ältere Patienten und solche, die bereits einen ACE-Hemmer erhalten und eine eingeschränkte Nierenfunktion haben, sind gefährdet, eine Hyperkaliämie zu entwickeln (Dunn et al., 2015). Des Weiteren ist die Entwicklung oder Aggravation einer renalen Dysfunktion ein Risiko von MR-Antagonisten. Svensson et al. zeigten einen Anstieg

des Serum-Kreatinins um mindestens 50 % bei 24 % der Patienten, die Spironolacton erhielten (Svensson et al., 2004).

Aufgrund dieser Nebenwirkungen ist der klinische Einsatz der steroidalen MR-Antagonisten limitiert. Es besteht daher ein Bedarf an neuen nebenwirkungsärmeren Substanzen.

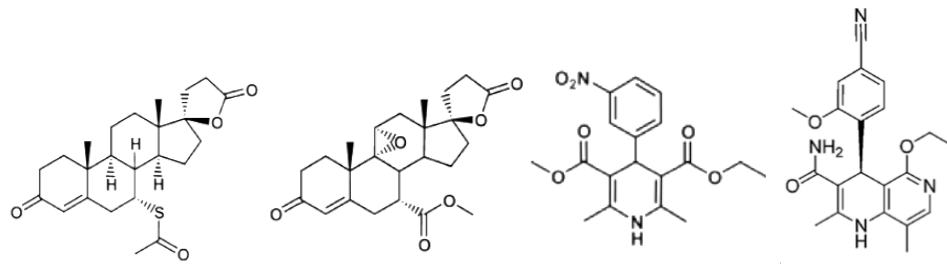
2.4.2 Finerenon, ein neuer nicht-steroidaler MR-Antagonist

Finerenon ist ein nicht-steroidaler MR-Antagonist, dessen chemische Struktur von den Dihydropyridinen (DHP) abgeleitet ist (Bärfacker et al., 2012). Seitdem 2004 entdeckt wurde, dass DHP, welche normalerweise Ca^{2+} -Kanäle blockieren, als Antagonisten am MR fungieren können, wurden verschiedene MR-Antagonisten mit DHP-Struktur entwickelt (Kolkhof und Borden, 2012).

In der klinischen Phase III Studie ist Finerenon. Finerenon hat mit einer IC_{50} von 17,8 nM eine ähnlich hohe Affinität am MR wie Spironolacton (Tab. 1). An anderen Steroid-Rezeptoren und an Ca^{2+} -Rezeptoren dagegen besitzt es eine sehr geringe Affinität (Tab. 1), weswegen Nebenwirkungen wie Gynäkomastie oder Amenorrhoe nicht zu erwarten sind (vgl. zu diesem Abschnitt: Bärfacker et al., 2012).

Finerenon verteilt sich in Niere und Herz annähernd gleich (Kolkhof et al., 2014), weshalb es in präklinischen und klinischen Studien bereits in geringen Konzentrationen kardioprotektive Effekte aufwies und weniger häufig zu Hyperkaliämien führte als Spironolacton oder Eplerenon (Pitt et al., 2013; Kolkhof et al., 2014; Pitt et al., 2015; Filippatos et al., 2016).

Tabelle 1



	Spironolacton	Eplerenon	Nitrendipin	Finerenon
MR (IC₅₀)	24	990	1996	18
GR (IC₅₀)	2400	22000	25760	> 10000
AR (IC₅₀)	77	21200	10050	> 10000
PR (EC₅₀)	740	31200	9730	> 10000
L-Typ Ca²⁺-Kanal (IC₅₀)			0,26	> 10000

Table 1: Chemical Structure and average inhibitory/effective concentration of Spironolacton, Eplerenon, Nitrendipin and Finerenon at various receptors.

(Table schematically according to/structure formulas from Fagart et al., 2010; Bärfacker et al., 2012; Bramlage et al., 2016)

Indication in nM. IC₅₀ = average inhibitory concentration, EC₅₀ = average effective concentration, MR = Mineralocorticoid-Receptor, GR = Glucocorticoid-Receptor, AR = Androgen-Receptor, PR = Progesteron-Receptor

2.5 Eigene Fragestellung

Die Aktivierung des Mineralocorticoid-Rezeptors in kardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten führt zur Bildung kardialer Fibrose und prädisponiert dadurch für Herzrhythmusstörungen und verstärkt eine Herzinsuffizienz. Die pharmakologische Hemmung des Mineralocorticoid-Rezeptors durch Mineralocorticoid-Rezeptor-Antagonisten ist demnach ein potentieller therapeutischer Ansatz, um das Auftreten kardialer Fibrose zu verhindern.

Finerenon ist ein neuer, nicht-steroidaler MR-Antagonist. Ziel dieser Studie war es, Finerenon auf die Mechanismen pro-fibrotischer Signaltransduktion in kardialen Fibroblasten zu untersuchen. Dabei wurde der Einfluss von Finerenon auf die Aldosteron-induzierte nukleäre Translokation des MR in kardialen Fibroblasten untersucht. Außerdem wurde die Wirkung von Finerenon auf die Expression der pro-fibrotischen Parameter CTGF, TGF- β , Lysyl-Oxidase, Fibronectin, und Mikro-RNA21 in kardialen Fibroblasten charakterisiert. Spironolacton wurde aufgrund der ähnlichen IC_{50} als Kontrollsubstanz verwendet.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Medien, Lösungen, Puffer

10 % (4 %) APS	1 g (0,4 g) APS in 10 ml Aqua dest.
5 % (1 %) Trockenmilch	5 g (1 g) Trockenmilchpulver in 100 ml PBS-Tween-Puffer
DMEM-Hungermedium	Dulbecco`s modifiziertes Eagle Medium (+ Glukose 4,5 g/l; + L-Glutamin; - Pyruvat, P/S (Penicillin/Streptomycin) (1 % [v/v]), Refobacin (0,02 mg/ml)
DMEM-Nährmedium	Dulbecco`s modifiziertes Eagle Medium (+ Glukose 4,5 g/l; + L-Glutamin; - Pyruvat), FKS (10 % [v/v]), P/S (Penicillin/Streptomycin) (1 % [v/v]), Refobacin (0,02 mg/ml)
DTT 1M	154,2 mg DTT in 1 ml Aqua dest.
Elektrophorese-Puffer	Aqua dest., 144 mg/ml Glycin, 30,3 mg/ml Tris, 10 mg/ml SDS
Ladepuffer	3 ml Aqua dest., 2 ml Glycerol, 2 ml 10 % SDS, 2 ml Stacking-Gel-Buffer (Aqua dest., 60,6 mg/ml Tris, 4 % (v/v) 10 % SDS pH 6,8), Bromphenolblau, 5 % 1 M DTT
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., 80 g/l NaCl, 2 g/l KCl, 14,4 g/l Na ₂ HPO ₄ , 2,4 g/l KH ₂ PO ₄ , 1 % (v/v) Tween20; pH 7,4
PMSF 1 M (0,1 M)	1,7419 g (0,17419 g) PMSF in 10 ml Ethanol absolute

Protein-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
Transferpuffer	Aqua dest. 2,9 mg/ml Tris, 14,5 mg/ml Glycin, 20 % (v/v) Methanol; pH 8,3

3.1.2 Antikörper

CTGF (L-20), Goat polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA
Fibronectin (O.N. 297), Mouse monoclonal IgG1	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA
Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson Immuno Research Labs, West Grove, PA, USA
GAPDH (6C5), Mouse polyclonal IgG1	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA
Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Goat Anti-Rabbit IgG Peroxidase Antibody	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
LOX, Rabbit polyclonal Ab	Abcam, Cambridge, UK
MCR (H-300), Rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA
Rabbit Anti-Goat IgG Peroxidase Antibody	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
β-Tubulin (H-235), Rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA

3.1.3 Sonden und Primer

TGF- β_1 -Sonde TaqMan®: Rn00572010_m1	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
18s-rRNA-Sonde TaqMan®: REF 4352655	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
hsa-miR-21-Sonde TaqMan®: TM000397	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
hsa-miR-21-Primer RT: RT000397	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
RNU6B-Sonde TaqMan®: TM001093	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
RNU6B-Primer RT: RT001093	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

3.1.4 Verbrauchsmaterial

Acryl Küvetten	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Amersham Hyperfilm™ ECL, High Performance Chemiluniniscence Film	GE Healthcare, München
Cell Scraper 2-Posit. Blade 25	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Cellstar® Serological Pipette 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellstar® Tubes 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cover Glass \varnothing 18 mm, Thickness No. 1,5	VWR International, Darmstadt
Dako Pen	Dako GmbH, Hamburg
Extra Thick Blot Paper, Filter Paper	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Micro Tube 0,5 ml, 1,5 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
MikroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate 0,1 μ L	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Nitrocellulose Membrans, 0,2 μ m	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Optical Adhesive Covers

Applied Biosystems, Foster City,
CA, USA

SafeSeal Micro Tube 2 ml

Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Serological Pipette 2 ml

Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Zellkulturschalen \varnothing 60 mm x 15 mm

TPP Techno Plastic Products AG,
Trasadingen, Schweiz

3.1.5 Chemikalien, sonstige Reagenzien

2-Propanol

Merck, Darmstadt

30 % Acrylamid/Bis solution 29:1

Bio-Rad Laboratories, Hercules,
CA, USA

Acid-Phenol-Chloroform CHCl_3

Ambion by life technologies,
Carlsbad, CA, USA

Albumin Bovine Fraction V, pH 7,0

SERVA Electrophoresis GmbH,
Heidelberg

Aldosterone ≥ 95 % (HPLC)

Sigma Aldrich Chemie GmbH,
München

AmershamTM ECLTM Western Blotting

GE Healthcare, München

Ammoniumpersulfat (APS) $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$

SERVA Electrophoresis GmbH,
Heidelberg

Angiotensin II human ≥ 93 % (HPLC)

Sigma Aldrich Chemie GmbH,
München

Aprotinin (Protease Inhibitor) from bovine lung

Sigma Aldrich Chemie GmbH,
München

Aqua ad iniectabilia

B. Braun Melsungen AG,
Melsungen

BAY 94-8862 (Finerenon)

Bayer AG, Leverkusen

Bovine Serum Secure

Gibco® by Life Technologies,
Carlsbad, CA, USA

Bromphenolblau Indikator (pH 3,0-4,6)

Merck, Darmstadt

Chloroform

Sigma Aldrich Chemie GmbH,
München

4',6-Diamidin-2-phenylindol (Dapi)	Merck Millipore, Merck, Darmstadt
Dc Protein Assay Reagent A	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Dc Protein Assay Reagent B	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Disodiumhydrogenphosphat Na_2HPO_4	Merck, Darmstadt
Dithiotreitol (DTT)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Ethanol absolute AnalaR NORMAPUR	VWR International GmbH, Darmstadt
F10 Nutrient Mixture	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Glycerol BioXtra $\geq 99\%$ (GC)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Glycin	VWR International GmbH, Darmstadt
Kaliumchlorid KCl	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
Leupeptin Hemisulfate Salt, microbial, $\geq 90\%$	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Methanol AnalaR NORMAPUR	VWR International GmbH, Darmstadt
Mounting Medium for Fluorescence Vectashield	Vector labs, Burlingame, CA, USA
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumchlorid NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
PegGOLD RNAPure™	VWR International GmbH, Darmstadt

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) C ₇ H ₇ FO ₂ S	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Prestained SDS-Page Standards, Low Range	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Refobacin 40 mg Injektionslösung	Merck Serono, Darmstadt
SDS Pellets ≥ 99 % C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Spironolacton	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Sucofin Magermilchpulver	TSI GmbH & Co. KG, Zeven
TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix (No AmpErase® UNG)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
TaqMan® 2X Fast Universal PCR Master Mix (No AmpErase® UNG)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Telmisartan	Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein
Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan	VWR International GmbH, Darmstadt
Trypsin EDTA 0,05 %	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Tween 20	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Wasser, vollentsalzt und destilliert (Aqua dest.)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

3.1.6 Kits

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
mirVana™ miRNA Isolation Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Taqman® MicroRNA Reverse Transcription Kit

Applied Biosystems, Foster City,
CA, USA

3.1.7 Geräte

Accurpette

VWR International GmbH,
Darmstadt

Biofuge Pico

Heraeus Holding GmbH, Hanau

CanoScan LiDE 90

Canon, Tokio, Japan

Centrifuge 5415C

Eppendorf AG, Hamburg

Eismaschine

Ziegra Eismaschinen GmbH,
Isernhagen

Elektrophoresekammer Mini Protean 3-Cell

Bio-Rad Laboratories, Hercules,
CA, USA

Elektrophoresekammer Mini Protean Tetra Cell

Bio-Rad Laboratories, Hercules,
CA, USA

Elektrophoresekammer Mini Trans-blot Cell

Bio-Rad Laboratories, Hercules,
CA, USA

Entwicklermaschine Curix 60

Agfa, Mortsel, Belgien

Hamilton-Spritze

Hamilton Germany GmbH,
Planegg-Martinsried

Handy Step Electronic

Brand GmbH & Co. KG,
Wertheim

Heiz-Blockthermostat HBT-2-131

HLC Haep Labor Consult,
Bovenden

Hera Cell 150 Cell Culture Incubator

Heraeus Holding GmbH, Hanau

Labdance Vortexer

VWR International GmbH,
Darmstadt

Magnetrührer Ikamag RCT

Ika-Werke GmbH & Co. KG,
Staufen

Megafuge 1.0

Heraeus Holding GmbH, Hanau

Megafuge 1.0R

Heraeus Holding GmbH, Hanau

Mini Oven

MWG Biotech, Ebersberg

Mini-Protean Gelgießstand	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
NanoDrop 2000 Spectrometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Nikon Digital Sight ds-u2	Nikon, Tokio, Japan
Nikon Eclipse E600	Nikon, Tokio, Japan
Olympus CK 2 Inverted Microscope	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Phase Condenser ULWCD 0.30	
Pipetboy	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Polymax 1040 Plattformschüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Power Pac Basic 300 V, 400 mA, 75 W	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Röntgen-Kassette 24 x 30 cm	Dr. Goos-Suprema, Heidelberg
S220 Seven Compact pH/Ionen-Messgerät	Mettler Toledo GmbH, Gießen
Sicherheitswerkbank Heraeus HS 12	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Sicherheitswerkbank Heraeus KS 12	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Spectrophotometer DU 730 Life Science UV/Vis	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Tube Rotator	VWR International GmbH, Darmstadt
Vortex-Genie® 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Vortexer VV3	VWR International GmbH, Darmstadt
Waage ALC210.4	Acculab, Bradford, MA, USA
Waage CS200	Ohaus Europe GmbH, Nänikon, Schweiz

Wasserbad WB 14

Memmert GmbH & Co. KG,
Schwabach

3.1.8 Software

Microsoft® Excel 2010

Microsoft Corporation, Redmond,
WA, USA

GraphPad Prism® 6.01

GraphPad Software, Inc. La Jolla,
CA, USA

Image Studio™ Lite Version 4.0

LI-COR, Lincoln, NE, USA

NanoDrop 2000 Software

Thermo Fisher Scientific,
Waltham, MA, USA

NIS Elements BR 3.2

Nikon, Tokio, Japan

StepOne™ Software V. 2.0

Applied Biosystems, Foster City,
CA, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Kultivierung neonataler Rattenkardiofibroblasten

Die neonatalen Rattenkardiofibroblasten stammten aus den Herzen zwei bis fünf Tage alter Sprague Dawley Ratten. Sie wurden durch Adhäsion am Schalenboden von 6 cm Zellkulturschalen von Kardiomyozyten separiert. Diese p0-Generation wurde zwei Tage in DMEM-Nährmedium bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Anschließend war der Zellrasen zu etwa 80 % konfluent und wurde auf mehrere 6 cm Zellkulturschalen gesplittet. Die so entstandene p1-Generation wurde in DMEM-Nährmedium wiederum bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre belassen. Das Nährmedium wurde alle 2 Tage unter sterilen Bedingungen gewechselt, bis die Zellen konfluent waren. Dann erfolgte abermaliges Passagieren auf 6 cm Zellkulturschalen und erneute Inkubation, bis die Zellen wiederum eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht hatten.

3.2.1.2 Passagieren neonataler Rattenkardiofibroblasten

Die Zellen wurden etwa alle 5 Tage im Verhältnis 1:2 oder 1:3 durch Trypsinierung auf 6 cm Zellkulturschalen subkultiviert. Zunächst wurde das DMEM-Nährmedium vollständig abgesaugt und die Schale mit PBS-Puffer gespült, um Rückstände des Mediums zu entfernen. Unter Zugabe von 0,05 % Trypsin wurden die Zellen 2 min bei 37°C inkubiert. Dabei lösten sich die Fibroblasten vom Schalenboden, was mikroskopisch verifiziert wurde. Um die Trypsinwirkung zu antagonisieren wurde die gleiche Menge DMEM-Nährmedium hinzugegeben, welches einen Trypsininhibitor enthielt. Das Medium mit den enthaltenen Zellen wurde im Anschluss abgesaugt und 3 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in entsprechender Menge DMEM-Nährmedium resuspendiert. Das Resuspendat wurde gleichmäßig auf mehreren 6 cm Zellkulturschalen verteilt und diese bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert.

3.2.1.3 Behandlung neonataler Rattenkardiofibroblasten

Sobald die Kardiofibroblasten in Passage 2 zu ca. 80 % konfluent waren, wurden sie für 12-24 h in 2 ml DMEM-Hungermedium belassen. In diesem Medium wurden sie dann nach unten stehender Tabelle (Tab. 2) behandelt.

Substanz	Konzentration in nM	Dauer in h
Aldosteron	10	24
Angiotensin II	1000	3
Finerenon*	50, 100, 500	24
Spironolacton*	500	24
Telmisartan*	20000	24

Tabelle 2: Konzentrations- und Zeitangaben für die Behandlung neonataler Rattenkardiofibroblasten.

* Bei zusätzlicher Behandlung mit Aldosteron oder Angiotensin II jeweils 1 h Präinkubation.

3.2.1.4 Vorbereitung neonataler Rattenkardiofibroblasten für Expressionsanalysen

Vorbereitung für Proteinanalyse

Die Zellen wurden unter Zugabe von 60 μ L, 80 μ L oder 100 μ L hypotonem Protein-Lysepuffer von den Kulturschalen abgeschabt. Das gewonnene Lysat wurde im Anschluss 4 min bei 95°C gekocht, um die Proteine zu denaturieren. Anschließend erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry. Gelagert wurden die Proteinlysate bei -20°C.

Vorbereitung für Genexpressionsanalyse

Zur Extraktion von Gesamt-RNA wurde 1 ml RNA-Lysepuffer zugegeben und die Zellen von den Kulturschalen abgeschabt. RNA-Lysepuffer enthielt Guanidinisothiocyanat, welches die Zellen lysierte und RNasen inaktivierte. Gelagert wurde das Lysat bei -80°C.

Zur Extraktion von Mikro-RNA wurden 450 µL Lysepuffer aus dem mirVana™ miRNA Isolation Kit zugegeben, die Zellen vom Kulturschalenboden abgeschabt und das Lysat unter Zugabe von Homogenate additive sofort zur Mikro-RNA-Isolation weiterverarbeitet.

3.2.2 Proteinanalyse mittels Western-Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren zur Quantifizierung von Proteinen. Zunächst werden Proteine eines Lysats, die gleichsinnig geladen sind, nach ihrer Größe aufgetrennt. Dies geschieht nach Anlegen einer Spannung bei Durchwanderung eines SDS-Polyacrylamidgels mit unterschiedlichen Porengrößen entlang eines elektrischen Gradienten. Im Anschluss werden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und schließlich durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht.

3.2.2.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Vor dem eigentlichen Western Blot muss die Menge an Gesamtprotein eines Lysats bestimmt werden. Die Proteinbestimmung des Lysats aus Kardiofibroblasten erfolgte nach der Methode von Lowry (Lowry et al., 1951). Diese beruht auf zwei aufeinander folgenden Reaktionen: Zuerst wird in einer alkalischen Lösung durch eine Biuret-Reaktion ein Komplex aus Kupferionen und Peptidbindungen gebildet (Bio-Rad, Dc Protein Assay Reagent A). Im zweiten Schritt reduziert der entstandene Kupfer-Protein-Komplex gelbfarbendes Phosphomolybdat-Phosphowolfram-Reagens (Folin-Ciocateu-Phenol-Reagenz; Bio-Rad, Dc Protein Assay Reagent B). Daraus resultiert in Abhängigkeit der Proteinkonzentration eine intensive Blaufärbung. Die Absorption der Lösung wurde anschließend bei 540 nm photometrisch gemessen.

3.2.2.2 Gelelektrophorese

Zunächst wurden 8 % oder 10 % SDS-Polyacrylamidgele nach unten stehenden Protokollen (Tab. 3) gegossen. Es wurden zu jeweils 50 µg Protein die gleiche Menge Ladepuffer gegeben und dieses Gemisch auf das SDS-Polyacrylamidgel geladen. Das im Ladepuffer enthaltene DTT konservierte dabei Proteine, indem es die Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen zu Disulfidbrücken durch Luftsauerstoff verhinderte. Außerdem war im Ladepuffer Bromphenolblau als Farbindikator enthalten, um die Lauffront des Gels während der Elektrophorese sichtbar zu machen. Die Elektrophoresekammer wurde mit Elektrophoresepuffer gefüllt und anschließend das Proteingemisch durch Anlegen einer Stromstärke von 30 bis 60 mA elektrophoretisch aufgetrennt, bis die Lauffront am unteren Ende des Gels angelangt war.

Substanz	10 %	8 %
	Menge in ml	
Aqua dest.	4,0	4,6
30 % Acrylamid	3,3	2,7
Tris 1,5 M	2,5	2,5
10 % SDS	0,1	0,1
10 % APS	0,1	0,1
TEMED	0,004	0,006

Tabelle 3: Protokoll für 8 % und 10 % SDS-Polyacrylamidgel.

3.2.2.3 Proteintransfer

Anschließend wurden die Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurden Filterpapier, Nitrozellulosemembran und Gel in Transferpuffer eingeweicht und in der Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell von Biorad übereinander geschichtet. Dann wurde je nach Größe des interessierenden Proteins 45-60 min bei 200 mA geblottet, wobei die

Proteine entlang eines elektrischen Gradienten auf die Membran wanderten. Die Nitrozellulose-Membran wurde anschließend für mindestens 30 min in 5 % Trockenmilch belassen, um freie Oberflächen-Bindungsstellen zu blocken.

3.2.2.4 Antikörperinkubation

Die Nitrozellulosemembran wurde anschließend über Nacht bei 4°C mit einer Lösung inkubiert, die Goat-, Rabbit oder Mouse-Antikörper gegen die interessierenden Proteine und gegen Tubulin oder GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) enthielt (Primärantikörper, 1:250, 1:500 oder 1:5000 verdünnt in 1 % Trockenmilch). Tubulin oder GAPDH wurden verwendet, da diese Proteine unabhängig von äußeren Faktoren und vom Zelltyp immer in nahezu gleicher Menge in den Zellen vorkommen. Die ungebundenen Antikörperfragmente wurden mit PBS-Tween-Puffer abgewaschen. Anschließend wurden die Membranen mit einem zweiten, gegen Goat, Rabbit oder Mouse gerichteten Peroxidase-konjugierten Antikörper (Sekundärantikörper, 1:5000 oder 1:6000 verdünnt in PBS-Puffer) für 20 oder 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die ungebundenen Antikörper wurden mit PBS-Tween-Puffer abgewaschen.

3.2.2.5 Detektion

Um die Proteine auf der Nitrozellulosemembran sichtbar zu machen, wurde die Chemilumineszenz benutzt. Die Membran wurde mit ECL (enhanced chemiluminescence) bedeckt, welche die Substrate für die am Sekundärantikörper gebundene Peroxidase enthielt. Die stattgefundenen Reaktion bewirkte eine Chemilumineszenz, deren Stärke mit der jeweils vorhandenen Menge des zu untersuchenden Proteins korrelierte. Sie schwärzte einen Röntgenfilm demnach umso stärker, je mehr jeweiliges Protein vorhanden war.

Die Intensität der Banden wurde anschließend mittels Densitometrie quantifiziert (Image Studio™ Lite Version 4.0) und gegen die Intensität der Banden von Tubulin oder GAPDH verrechnet.

3.2.2.6 Gele, Dauer des Blottings, Verdünnungen, Inkubationszeiten und Abweichungen bei verschiedenen Versuchen

CTGF

10 % Gel, 45 min blotten, Primärantikörper 1:250 verdünnt, Sekundärantikörper Anti-Goat-IgG, 1:6000 verdünnt in 5 % Trockenmilch für 20 min

Fibronectin

8 % Gel, 60 min blotten, Primärantikörper 1:250 verdünnt, Sekundärantikörper Anti-Mouse-IgG, 1:5000 verdünnt in PBS-Puffer für 20 min

LOX

10 % Gel, 45 min blotten, Primärantikörper 1:250 verdünnt, Sekundärantikörper Anti-Rabbit-IgG, 1:5000 verdünnt in PBS-Puffer für 30 min

GAPDH

Primärantikörper 1:5000 verdünnt, Sekundärantikörper Anti-Mouse-IgG, 1:5000 verdünnt in PBS-Puffer für 20 min

Tubulin

Primärantikörper 1:500 verdünnt, Sekundärantikörper Anti-Rabbit-IgG, 1:5000 verdünnt in PBS-Puffer für 30 min

3.2.3 Genexpressionsanalyse mittels TaqMan®-PCR

3.2.3.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte durch die Methode der Phasentrennung. Zunächst wurde zu dem gewonnenen Lysat (s.o.) Chloroform hinzugegeben. Durch anschließendes 30-minütiges Zentrifugieren bei 14.000 U/min und 4°C wurde das Lysat in 3 Phasen aufgetrennt: eine obere wässrige Phase, welche die RNA enthielt, eine intermediäre Phase mit DNA sowie einer unteren, milchigen Chloroformphase mit Proteinen. Die obere wässrige Phase wurde

anschließend abpipettiert und die enthaltene RNA in Isopropanol über Nacht präzipitiert. Durch 60-minütiges Zentrifugieren bei 14.000 U/min und 4°C und anschließendes Waschen in 70 % Ethanol erhielt man reine RNA, welche in RNase-freiem Aqua ad iniectabilia resuspendiert und anschließend für 5 min bei 65°C inkubiert wurde.

3.2.3.2 Konzentrationsbestimmung der RNA mittels Spektralphotometrie

Zur RNA-Konzentrationsbestimmung im Lysat wurde die Spektralphotometrie benutzt. Dabei wurde die optische Dichte des Lysats bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen (A260), da dies dem Absorptionsmaximum von RNA und DNA entspricht. Um zu kontrollieren, ob die Probe mit Protein verunreinigt ist, wurde des Weiteren die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen (A280), was dem Absorptionsmaximum von Proteinen entspricht. Durch den Quotienten A260/A280 konnte somit der Grad der Verunreinigung bestimmt werden. Reine RNA wurde bei einem Quotienten von 1,7 bis 2,0 angenommen. Da eine A260 von 1 dabei 40 ng/µL entspricht, ließ sich die RNA-Konzentration durch Multiplikation des A260-Wertes mit 40 ng/µL berechnen.

3.2.3.3 Mikro-RNA-Isolation

Bei der RNA-Isolation wird, wie oben beschrieben, im Anschluss an die Phasen-Extraktion die RNA mittels Alkohol-Präzipitation gefällt. Dabei kann kleine RNA wie Mikro-RNA nicht effizient isoliert werden und geht verloren. Zur Isolation von Mikro-RNA wurde das mirVanaTM miRNA Isolation Kit von Ambion verwendet. Das Kit benutzt die Phasen-Extraktion, gefolgt von einer Immobilisation und Reinigung der RNA mittels eines speziellen Glasfaser-Filters unter verschiedenen Bindungs- und Waschbedingungen. Durch diese Methode, die sich zwei unterschiedlich konzentrierten Ethanol-Lösungen bedient, kann effizient RNA aus Zell- oder Gewebeproben gewonnen werden, die reich an kleiner RNA ab 10 nt ist und nur sehr wenig RNA enthält, die größer als 200 nt ist.

Zunächst wurden die Zellen in 450 µL denaturierendem Lysepuffer lysiert. Dadurch wurde RNA stabilisiert und RNasen inaktiviert. Anschließend wurden dem Lysat 45 µL Mikro-RNA

Homogenate additive hinzugegeben und das ganze 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden der Lösung zur Phasen-Extraktion 450 μL Acid-Phenol-Chloroform hinzugegeben und dieses Gemisch 5 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Es bildete sich eine obere Phase, welche die RNA enthielt, eine mittlere Phase mit DNA und eine untere, in der sich Proteine sammelten. Die obere Phase (450 μL) wurde abpipettiert. Anschließend wurde soviel 100 % Ethanol zur RNA hinzugegeben, dass das Gemisch 25 % Ethanol enthielt (1/3 der Menge = 150 μL 100 % Ethanol). Dieses Probe/Ethanol-Gemisch wurde dann in einen Glasfaser-Filter gefüllt und 15 Sekunden bei 10.000 U/min zentrifugiert. Dabei wurde große RNA im Filter immobilisiert, wobei kleine RNA den Filter passierte und sich im Filtrat sammelte. Dieses Filtrat enthielt nun 55 % Ethanol. Das Filtrat wurde anschließend abermals in einen neuen Glasfaser-Filter gefüllt und 15 Sekunden bei 10.000 U/min zentrifugiert. Diesmal wurde die kleine RNA im Filter immobilisiert. Diese RNA wurde dann dreimal mittels 10-sekündiger Zentrifugation bei 10.000 U/min mit Mikro-RNA Wash Solution gewaschen. Im Anschluss wurde sie mittels einer 95°C heißen niedrig-ionischen Lösung (Elution Solution) durch 30-sekündiges Zentrifugieren bei 13.000 U/min aus dem Glasfaser-Filter herausgelöst. Die gewonnene Mikro-RNA wurde bei -80°C gelagert.

3.2.3.4 Reverse Transkription RNA

Durch die reverse Transkription wurden je 2 μg RNA in cDNA (= complementary DNA) umgeschrieben. Zu den 2 μg RNA, verdünnt zu jeweils 10 μL mit RNase-freiem Aqua ad iniectabilia, wurde jeweils 10 μL eines nach unten stehendem Protokoll (Tab. 4) pipettierten Master Mix (RNA) gegeben. Der Mix wurde im Thermocycler wie folgt inkubiert: 10 min bei 25°C, 120 min bei 37°C, 5 min bei 85°C. Dabei wurde durch die MultiScribe™ Reverse Transkriptase mit den RNA-Strängen als Vorlage mithilfe der Random Primer und unter Verbrauch der Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP) cDNA synthetisiert.

Substanz	Menge in μL
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	1
10X RT Random Primers	2
dNTP-Mix (100 mM)	0,8
10X RT Buffer	2
RNase-Inhibitor	1
Aqua ad iniectabilia	3,2

Tabelle 4: Protokoll für 10 μL Master Mix für Reverse Transkription RNA.

3.2.3.5 Reverse Transkription Mikro-RNA

Zur reversen Transkription von Mikro-RNA wurden zu 5 μL Mirko-RNA-Probe jeweils 7 μL Master Mix (Mikro-RNA) nach unten stehendem Protokoll (Tab. 5) pipettiert. Im Unterschied zur reversen Transkription von RNA wurden beim Umschreiben der Mikro-RNA in cDNA keine Random Primer, sondern spezielle Primer (jeweils 3 μL Primer-Lösung) für Mikro-RNA21 und RNU6B (kleine nukleäre RNA U6B) verwendet. Dieser Mix wurde folgendermaßen inkubiert: 30 min bei 16°C, 30 min bei 42°C, 5 min bei 85°C.

Substanz	Menge in μL
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	1
dNTP-Mix (100 mM)	0,15
10X RT-Buffer	1,5
RNase-Inhibitor	0,19
Aqua ad iniectabilia	4,16

Tabelle 5: Protokoll für 7 μL Master Mix für Reverse Transkription Mikro-RNA.

3.2.3.6 TaqMan®-PCR

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR), die 1988 von Saiki et al. beschrieben wurde (Saiki et al., 1988) dient zur Vervielfältigung und zur Quantifizierung von cDNA, welche zuvor durch reverse Transkription aus RNA hergestellt wurde. Man bedient sich dabei dem unterschiedlichen Verhalten von DNA bei unterschiedlichen Temperaturen. In dieser Arbeit fand die TaqMan®-PCR sowie die Fast-TaqMan®-PCR Verwendung.

Zunächst wurden cDNA, TaqMan® 2X (Fast) Universal PCR Master Mix (No AmpErase® UNG) und Sonden nach unten stehenden Protokollen (Tab. 6 + 7) in einer 96-Well-Reaktions-Platte zusammen pipettiert. TaqMan® 2X (Fast) Universal PCR Master Mix (No AmpErase® UNG) enthielt DNA-Polymerase und dNTPs sowie Puffer. Nach Abdecken der Platte mit einem Optical Adhesive Cover und kurzem Zentrifugieren wurde die PCR nach unten stehenden Thermocyclerprogrammen (Tab. 8 + 9) mit dem StepOnePlus™ Real-Time PCR System durchgeführt.

Substanz	Menge in µL
Aqua ad iniectabilia	8
TaqMan® 2X Fast Universal PCR Master Mix (No AmpErase® UNG)	10
Sonde*	1
Probe (cDNA)	1

Table 6: Protokoll für 20 µL Mix für Fast-TaqMan®-PCR (RNA).

* enthält RNA-spezifischen Forward-PCR-Primer, spezifischen Reverse-PCR-Primer, Fluorescein und Quencher.

Substanz	Menge in μL
Aqua ad iniectabilia	7,67
TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix (No AmpErase® UNG)	10
TaqMan® MicroRNA Assays 20X TaqMan® Assay (Sonde)*	1
Probe (cDNA)	1,33

Tabelle 7: Protokoll für 20 μL Mix für TaqMan®-PCR (Mikro-RNA).

* enthält Mikro-RNA-spezifischen Forward-PCR-Primer, spezifischen Reverse-PCR-Primer, Fluorescein und Quencher.

Schritt	Enzym-Aktivierung	PCR	
		Zyklus (40 Zyklen)	
		Denaturierung	Annealing/Elongation
Zeit	20 sec	1 sec	20 sec
Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	95	95	60

Tabelle 8: Thermocyclerprogramm für Fast-TaqMan®-PCR (RNA).

Schritt	Enzym-Aktivierung	PCR	
		Zyklus (40 Zyklen)	
		Denaturierung	Annealing/Elongation
Zeit	10 min	15 sec	60 sec
Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	95	95	60

Tabelle 9: Thermocyclerprogramm für TaqMan®-PCR (Mikro-RNA).

Zu Beginn der PCR wird die doppelsträngige cDNA zunächst bei 95°C denaturiert und in zwei Einzelstränge aufgespalten. Durch Abkühlen auf 60°C kommt es zur Anlagerung der spezifischen Forward- und Reverse-PCR-Primer an die 3'-Enden der zu quantifizierenden Sequenzen (Annealing). Anschließend lagert sich die thermostabile DNA-Polymerase an den DNA-Primer-Hybrid an. Diese synthetisiert aus den dNTPs unter Abspaltung von Diphosphat komplementäre DNA-Stränge (Elongation). Dadurch entstehen aus einem cDNA-Doppelstrang zwei Doppelstränge. Dieser Vorgang wird insgesamt 40 Mal wiederholt, so dass die Menge der DNA annähernd exponentiell ansteigt.

Durch die TaqMan®-PCR kann die Menge der produzierten DNA in Echtzeit gemessen werden. Dabei werden Sonden aus Oligonukleotiden verwendet, welche spezifisch an der zu untersuchenden Zielsequenz binden. An die Oligonukleotide sind jeweils ein Fluorochrom und ein Quencher gekoppelt. Das Fluorochrom sendet Leuchtsignale aus, welche durch die direkte Nachbarschaft vom Quencher absorbiert werden. Während der Elongation wird das Oligonukleotid durch die Nuklease-Funktion der DNA-Polymerase abgebaut. Dadurch kommt es zur räumlichen Trennung des Fluorochroms und des Quenchers, so dass dieser nicht mehr in der Lage ist, das Leuchtsignal zu absorbieren. Da pro Kopiervorgang also genau ein Leuchtsignal entsteht, ist das Fluoreszenzsignal direkt proportional zur gebildeten DNA-Menge. Die TaqMan®-PCR kann sehr kleine Mengen an DNA detektieren.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Menge der Ausgangs-DNA zu quantifizieren. Man unterscheidet die absolute von der relativen Quantifizierung, wobei in dieser Arbeit ausschließlich die relative Quantifizierung genutzt wurde. Dabei wurde die Menge der zu untersuchenden Sequenz auf die Menge eines House-Keeping-Gens bezogen. Ein House-Keeping-Gen ist ein Gen, welches unabhängig von äußeren Faktoren und vom Zelltyp immer in gleicher Menge exprimiert wird. Zur Quantifizierung von RNA wurde 18s-rRNA als House-Keeping-Gen benutzt, welche bei Eukaryoten am Aufbau der 40S-Untereinheit von Ribosomen beteiligt ist. Zur Quantifizierung von Mikro-RNA wurde RNU6B herangezogen, da diese sehr klein ist (45 nt) und daher bei der Isolation erhalten blieb.

Am Ende des Versuchs entstand für jede Probe eine Kurve, auf der die Emission gegen die Zyklenzahl aufgetragen wurde. Diese Kurve kann in 3 Abschnitte eingeteilt werden. Zunächst ist noch sehr wenig DNA als Ausgangsprodukt vorhanden und es ist somit unwahrscheinlich, dass alle Reaktionsteilnehmer aufeinandertreffen. Zu diesem Zeitpunkt entsteht eine lineare

Kurve. Irgendwann ist genug DNA vorhanden, so dass die Kurve exponentiell ansteigt. Schließlich sind die dNTPs fast aufgebraucht und die Reaktion verläuft immer langsamer, bis eine Sättigung erreicht ist. Der Übergang vom linearen zum exponentiellen Teil der Kurve ist umgekehrt proportional zur Menge der Ausgangs-DNA und korreliert sehr gut mit dieser. Je weniger Zyklen benötigt werden, um diesen Übergang zu erreichen (= cycle threshold, Ct-Wert = Zahl der Zyklen, die benötigt werden, um den Schwellenwert zum exponentiellen Teil der Kurve zu erreichen), desto mehr Ausgangs-DNA war vorhanden. Es gibt verschiedene Methoden, diesen Ct-Wert zur Quantifizierung der gesuchten Sequenz zu nutzen. Beide im Folgenden beschriebenen Methoden wurden verwendet.

1. Berechnung nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode

Zunächst wurde die Differenz zwischen dem Ct-Wert des zu bestimmenden Gens und dem Ct-Wert des jeweiligen House-Keeping-Gens (18s-RNA oder RNU6B) berechnet:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{Gen}) - \text{Ct}(18\text{s-RNA oder RNU6B})$$

Anschließend wurde die Differenz zwischen den ΔCt -Werten einer Probe und der Kontrolle bestimmt:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{Probe}) - \Delta\text{Ct}(\text{Kontrolle})$$

Um das Verhältnis zwischen den Proben zu berechnen, setzte man $\Delta\Delta\text{Ct}$ nun als negativen Exponenten der Zahl 2:

$$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

2. Berechnung mit Hilfe einer Standardkurve

Hierbei wurde vor der eigentlichen PCR eine Mittelung aus allen Proben gebildet, indem von jeder Probe die gleiche Menge zusammen pipettiert wurde (Standard 1). Deren „Quantity“ (Menge) wurde gleich 100 gesetzt. Diese Mittelung wurde nun 4 mal im Verhältnis 1:2 verdünnt, wodurch man „Quantities“ von 50, 25, 12,5 und 6,25 erhielt (Standards 2, 3, 4 und 5). Die Ct-Werte des interessierenden Gens und des House-Keeping-Gens der Standards wurden ebenfalls bestimmt und gegen die „Quantity“ der Standards in einer Kurve aufgetragen. Anhand dieser Kurve wurde dann die „Quantity“ der Proben mit ihren jeweiligen Ct-Werten abgelesen. Die „Quantity“ des zu untersuchenden Gens wurde dann in das Verhältnis zur „Quantity“ des House-Keeping-Gens gesetzt.

3.2.4 MR-Immunfluoreszenz Färbung von Kardiofibroblasten

3.2.4.1 Färbung

Nach dem Stimulieren der Kardiofibroblasten in Passage 1 wurde das DMEM-Hungermedium vollständig abgesaugt und die Zellkulturschalen mit PBS-Tween-Puffer gespült. Im Anschluss wurden die Zellen 10 min bei 4°C mit 2 % PFA (Paraformaldehyd) inkubiert, welches die Zellen durch Proteinvernetzung fixierte. Nach Waschen mit PBS-Tween-Puffer wurden die Zellen für 30 min bei Raumtemperatur in 1,5 % BSA (bovines Serum-Albumin) belassen, um freie unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurden die Zellen für 2 h bei Raumtemperatur mit Rabbit-Anti-MR Antikörper (Primärantikörper, 1:100 verdünnt in PBS-Puffer) inkubiert. Danach wurden die Zellen in PBS-Tween-Puffer gewaschen, um ungebundene Antikörper zu beseitigen. Im Anschluss wurde ein sekundärer, an den Fluoreszenzfarbstoff FITC (Fluorescein Isothiocyanat) gekoppelter Anti-Rabbit-Antikörper (Sekundärantikörper, 1:100 verdünnt in PBS-Puffer) zugegeben, mit dem die Zellen für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert wurden. Nach abermaligem Waschen in PBS-Tween-Puffer wurden die Zellen für 10 min bei Raumtemperatur in dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol) belassen. DAPI markiert DNA, indem es sich dieser vor allem an AT-reichen Regionen anlagert. Daraufhin wurde in PBS-Puffer gewaschen, um nicht angelagertes DAPI zu entfernen. Die Zellen wurden mit Mounting Medium for Fluorescence eingedeckt und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop mikroskopiert. DAPI fluoreszierte im ultravioletten Licht (Absorptionsmaximum 358 nm), wobei sich die Zellkerne in cyan-blauer Farbe (Emissionsmaximum 461 nm) darstellten. Die mit FITC markierten Mineralocorticoid-Rezeptoren leuchteten unter bläulich-grünem Licht (Absorptionsmaximum 495 nm) in grüner Farbe (Emissionsmaximum 519 nm).

3.2.4.2 Digitalisieren der Färbung

Die Färbungen wurden lichtmikroskopisch (NIKON Eclipse E600) mit einer Digitalkamera (NIKON Digital Sight DS-U2) aufgenommen und mittels der NIS Elements Basic Research Software (Version 3.2) ausgewertet.

3.2.5 Statistische Auswertung

Die ermittelten Daten aus der Western-Blot Proteinanalyse, der Analyse der Genexpression und der MR-Rezeptor-Verteilung werden als Mittelwerte \pm SD (Standard Deviation, Standardabweichung) angegeben. Die Werte der einzelnen Bedingungen sind dabei stets auf die Kontrollwerte bezogen worden. Kruskal-Wallis-Test und 1-way ANOVA wurden für Vergleiche unter den Ergebnissen angewendet. Dies geschah unter Verwendung der GraphPad Prism® Software (Version 6.01). Statistische Signifikanz wurde ab einem p-Wert $< 0,05$ angenommen, wobei p-Werte $< 0,05$ mit *, p-Werte $< 0,01$ mit **, p-Werte $< 0,001$ mit *** und p-Werte $< 0,0001$ mit **** gekennzeichnet wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Finerenon hemmt die Translokation des Mineralocorticoid-Rezeptors in den Zellkern in kardialen Fibroblasten

Kardiale Fibroblasten wurden frisch aus den Herzen neonataler Sprague Dawley Ratten isoliert und durch Adhäsion von Kardiomyozyten separiert. Nach Subkultivierung auf mehrere Zellkulturschalen wurde die Kardiofibroblasten mit Aldosteron (10 nM, 24 h) allein und zusätzlich mit Finerenon (500 nM, 1 h Präinkubation) oder Spironolacton (500 nM, 1 h Präinkubation) behandelt. Anschließend wurden der Mineralocorticoid-Rezeptor (MR) mittels FITC und die DNA mittels Dapi angefärbt und die Verteilung des MR im Zellkern und im Zytoplasma mikroskopisch quantifiziert.

Aldosteron bewirkte gegenüber der Kontrollgruppe eine Translokation des Mineralocorticoid-Rezeptors in den Zellkern (Verhältnis nukleärer zu zytoplasmatischer Lokalisation, Kontrolle $2,3 \pm 4,0$ Aldosteron $6,8 \pm 5,7$, $p < 0,0001$) (Abb. 3 + 4). In Zellen, die mit Aldosteron und Finerenon behandelt wurden, fanden sich die Mineralocorticoid-Rezeptoren im Vergleich zu den Zellen, die allein mit Aldosteron behandelt wurden, vermehrt im Zytoplasma ($2,1 \pm 2,4$, $p < 0,0001$ verglichen mit Aldosteron) (Abb. 3 + 4 + 5). Auch in den Zellen, die neben Aldosteron mit Spironolacton behandelt wurden, fanden sich im Vergleich zur Aldosteron-Gruppe vermehrt Mineralocorticoid-Rezeptoren im Zytoplasma ($2,7 \pm 3,7$, $p < 0,001$ verglichen mit Aldosteron) (Abb. 3 + 4 + 5).

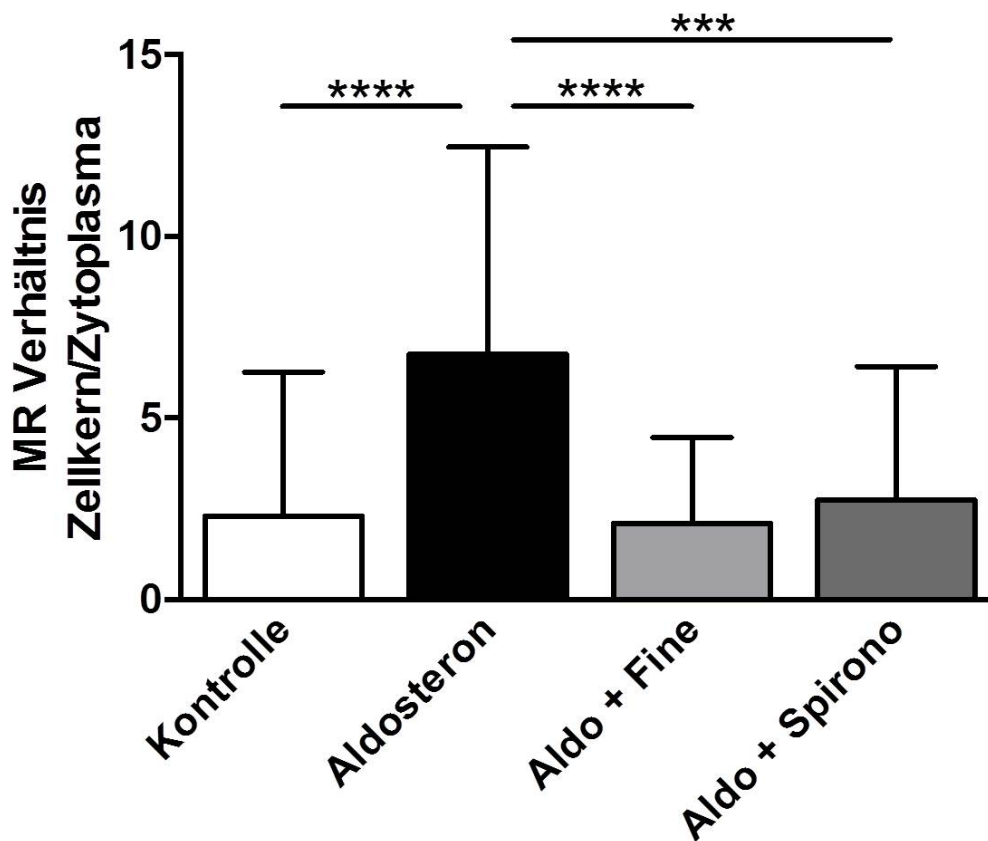


Abbildung 3: Finerenon hemmt die Aldosteron-induzierte nukleäre Translokation des Mineralocorticoid-Rezeptors in kardialen Fibroblasten.

Neonatale kardiale Fibroblasten wurden mit Aldosteron (10 nM, 24 h) allein und mit Finerenon (500 nM, 1 h Präinkubation) bzw. mit Spironolacton (500 nM, 1 h Präinkubation) behandelt und bezüglich der Translokation des Mineralocorticoid-Rezeptors vom Zytoplasma in den Zellkern mit einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen. Die Mineralocorticoid-Rezeptoren wurden mittels Immunfluoreszenz-Färbung (FITC) gefärbt und deren Zellkern/Zytoplasma-Verteilung mikroskopisch quantifiziert.

*** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$

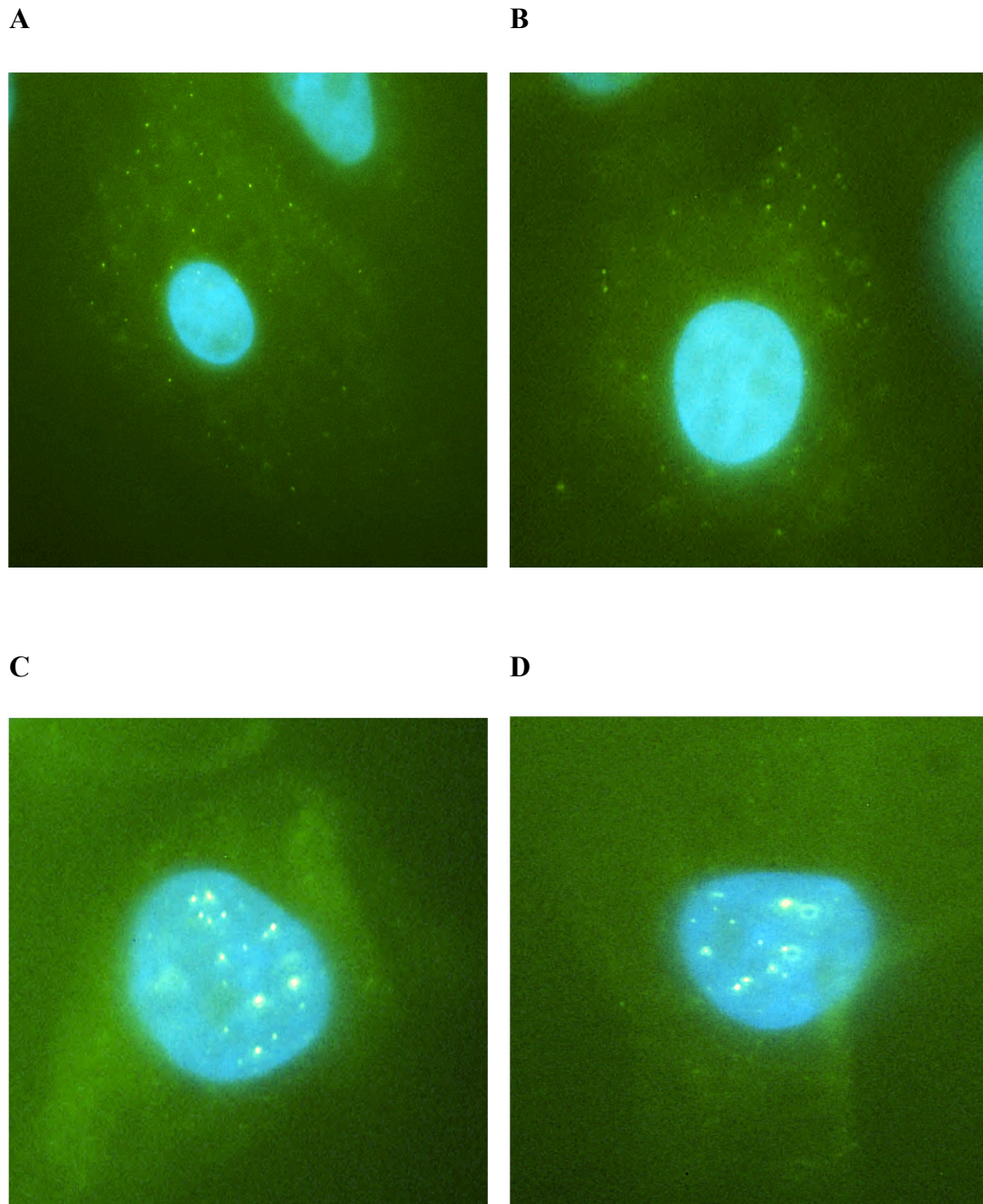


Abbildung 4: Aldosteron induziert eine MR-Translokation in den Zellkern in kardialen Fibroblasten.

Die Abbildungen zeigen Immunfluoreszenzbilder von unbehandelten kardialen Fibroblasten (**A + B**) und solchen, die mit Aldosteron (10 nM, 24 h) behandelt wurden (**C + D**) in 1000-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung. Angefärbt wurde die DNA (Dapi; blau) und die Mineralocorticoid-Rezeptoren (FITC; grün).

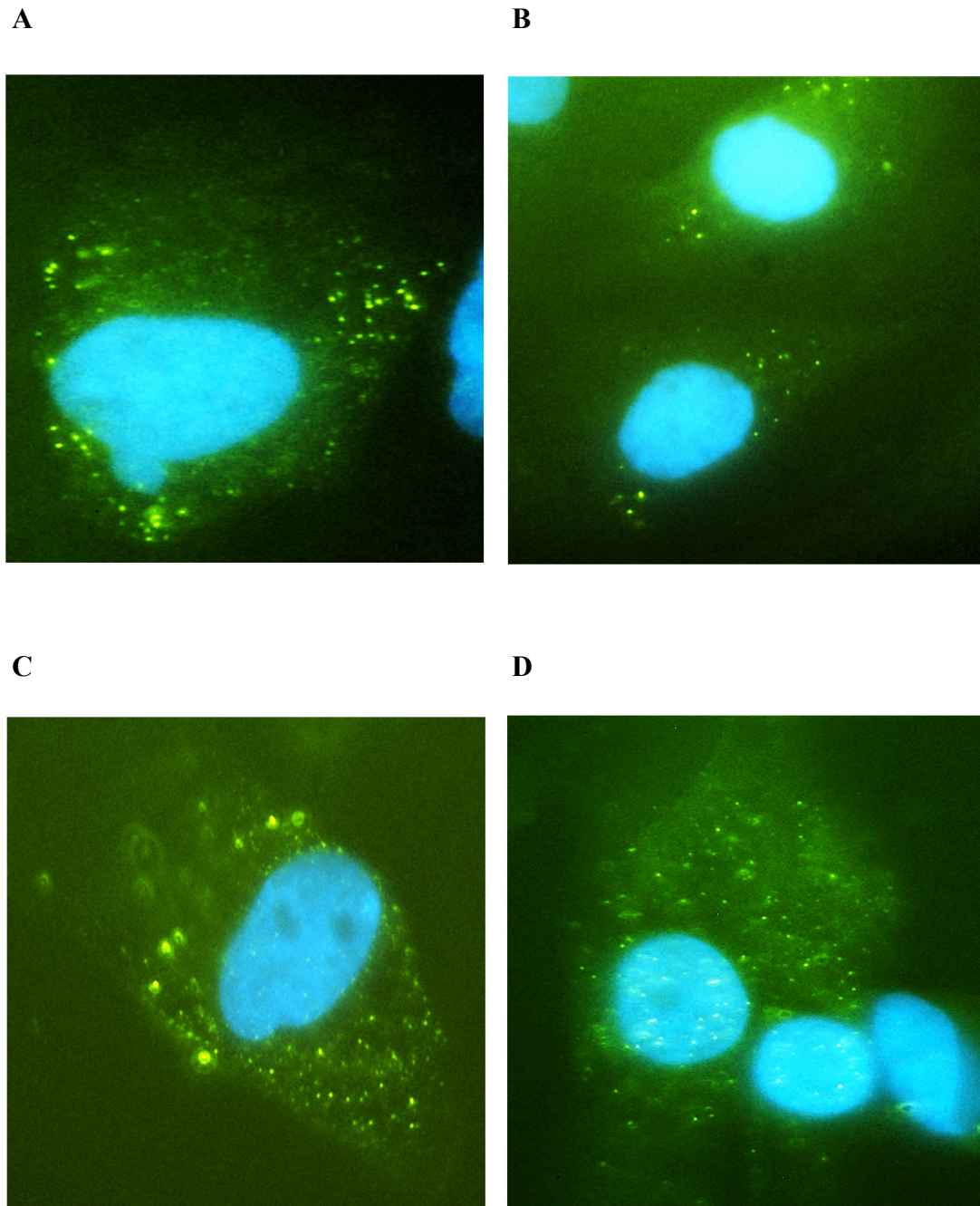


Abbildung 5: Finerenon und Spironolacton hemmen die Aldosteron-induzierte MR-Translokation in kardialen Fibroblasten.

Die Abbildungen zeigen Immunfluoreszenzbilder von kardialen Fibroblasten, die mit Aldosteron (10 nM, 24 h) und mit Finerenon (500 nM, 1 h Präinkubation) (A + B) bzw. Spironolacton (500 nM, 1 h Präinkubation) (C + D) behandelt wurden in 1000-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung. Angefärbt wurde die DNA (Dapi; blau) und die Mineralocorticoid-Rezeptoren (FITC; grün).

4.2 Finerenon reduziert die basale CTGF-Expression in kardialen Fibroblasten

Neonatale kardiale Fibroblasten wurden mit Finerenon in unterschiedlichen Konzentrationen sowie mit Spironolacton für jeweils 24 h behandelt. Finerenon wurde in den Konzentrationen 50 nM, 100 nM und 500 nM verwendet, Spironolacton in einer Konzentration von 500 nM. Anschließend wurde mittels Western Blot die Proteinexpression des Fibrose-fördernden Wachstumsfaktors Connective Tissue Growth Factor CTGF bestimmt und mit der CTGF-Expression unbehandelter kardialer Fibroblasten verglichen.

Finerenon in einer Konzentration von 50 nM änderte die basale CTGF-Expression nicht ($91,7 \pm 39,3 \%$, $p = \text{ns}$ verglichen mit Kontrolle) (Abb. 6A). In einer Konzentration von 100 nM verringerte Finerenon die basale CTGF-Expression ($76,3 \pm 18,0 \%$, $p < 0,05$ verglichen mit Kontrolle) (Abb. 6A). Die Verringerung der basalen CTGF-Expression durch Finerenon in einer Konzentration von 500 nM war vergleichbar mit der Verringerung der basalen CTGF-Expression von Spironolacton in einer Konzentration von 500 nM. (Finerenon $73,7 \pm 14,8 \%$, $p < 0,01$, Spironolacton $69,9 \pm 18,7 \%$, $p < 0,01$, jeweils gegen Kontrolle) (Abb. 6A).

4.3 Finerenon verhindert die Aldosteron-induzierte CTGF-Überexpression in kardialen Fibroblasten

Neonatale kardiale Fibroblasten wurden mit Aldosteron (10 nM, 24 h) allein und zusätzlich mit Finerenon in unterschiedlichen Konzentrationen (100 nM und 500 nM, 1 h Präinkubation) oder mit Spironolacton (500 nM, 1 h Präinkubation) behandelt. Im Anschluss wurde mittels Western Blot die Protein-Expression von CTGF bestimmt und mit der CTGF-Expression einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen.

Aldosteron bewirkte erwartungsgemäß nahezu eine Verdopplung der CTGF-Expression in kardialen Fibroblasten ($187,4 \pm 41,6 \%$, $p < 0,01$ verglichen mit Kontrolle) (Abb. 6B). Finerenon in einer Konzentration von 100 nM verminderte die CTGF-Überexpression ($128,0 \pm 35,0 \%$, $p < 0,05$ verglichen mit Aldosteron), Finerenon in einer Konzentration von 500 nM verhinderte die CTGF-Überexpression vollständig ($89,0 \pm 34,1 \%$, $p < 0,01$ verglichen mit

Aldosteron) (Abb. 6B). Auch Spironolacton in einer Konzentration von 500 nM verhinderte die CTGF-Überexpression fast vollständig ($107,3 \pm 12,7 \%$, $p < 0,05$ verglichen mit Aldosteron) (Abb. 6B).

4.4 Finerenon verhindert die Aldosteron-Angiotensin II-induzierte CTGF-Überexpression in kardialen Fibroblasten

Neonatale kardiale Fibroblasten wurden mit Aldosteron (10 nM, 24 h) allein, zusammen mit Angiotensin II (1 μ M, 3 h) und zusätzlich mit Finerenon (500 nM, 1 h Präinkubation) behandelt. Im Anschluss wurde die CTGF-Expression mittels Western Blot bestimmt und mit der CTGF-Expression in unbehandelten Fibroblasten verglichen.

Durch Aldosteron wurde die CTGF-Expression gesteigert ($160,7 \pm 41,9 \%$, $p < 0,05$ verglichen mit Kontrolle) (Abb. 6C). Die gleichzeitige Behandlung der Fibroblasten mit Aldosteron und Angiotensin II bewirkte eine Verstärkung des CTGF-Anstiegs um mehr als das Doppelte im Vergleich zum Kontrollniveau ($209,9 \pm 68,7 \%$, $p < 0,0001$) (Abb. 6C). Die zusätzliche Behandlung mit Finerenon verhinderte die Aldosteron-Angiotensin II-induzierte CTGF-Überexpression vollständig ($100,4 \pm 10,3 \%$, $p < 0,001$ verglichen mit Aldosteron + Angiotensin II) (Abb. 6C).

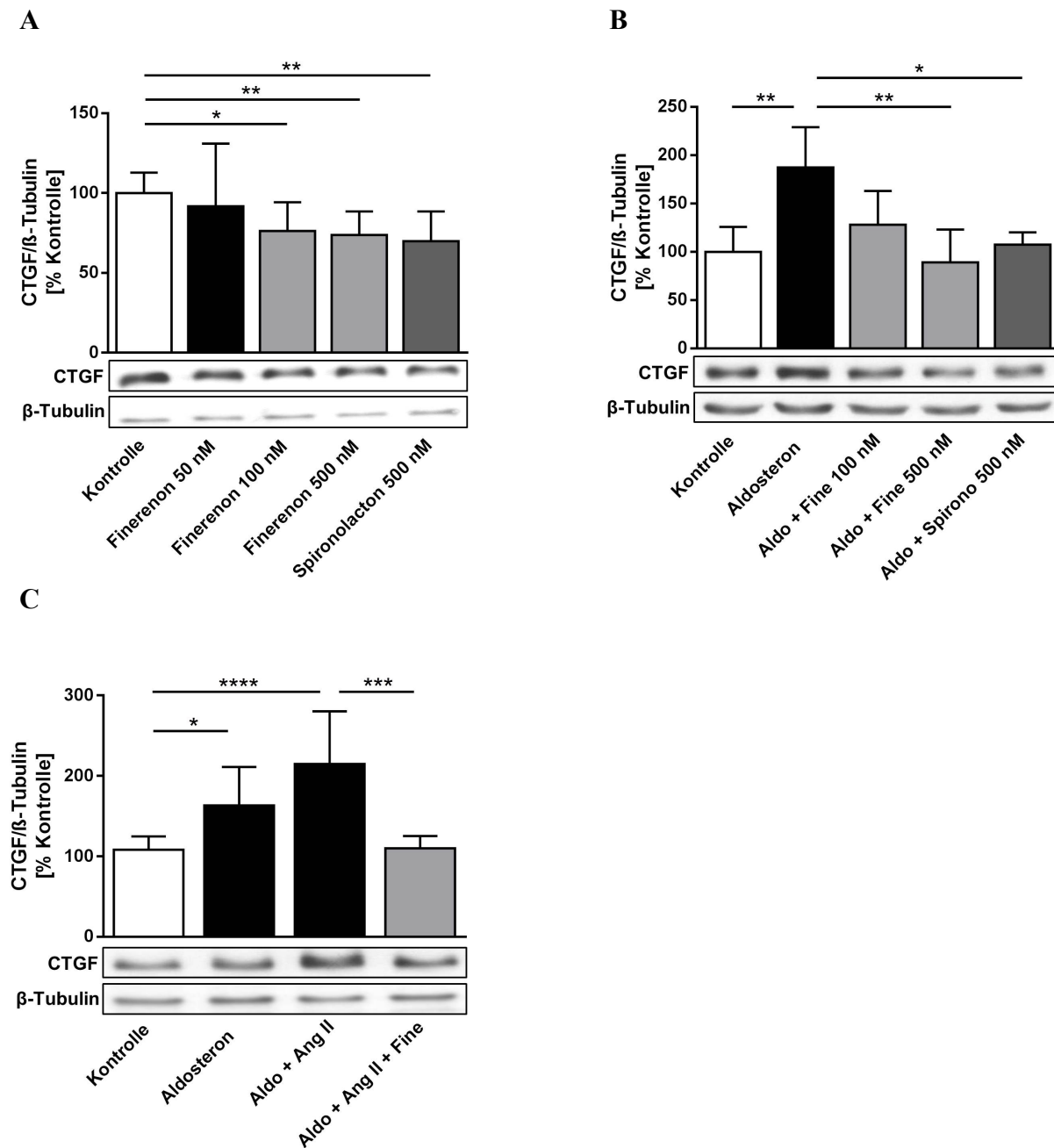


Abbildung 6: Finerenon reduziert basale, Aldosteron- und Aldosteron-Angiotensin II-induzierte CTGF-Expression in kardialen Fibroblasten.

Die Abbildungen zeigen die prozentualen Veränderungen der CTGF-Proteinexpression, jeweils bezogen auf die unstimulierte Kontrollgruppe. Die CTGF-Proteinexpression wurde mittels Western Blot quantifiziert. β -Tubulin diente als Ladekontrolle. **A** Neonatale kardiale Fibroblasten wurden mit Finerenon in den Konzentrationen 50 nM, 100 nM und 500 nM bzw. Spironolacton in einer Konzentration von 500 nM für jeweils 24 h behandelt. **B** Neonatale kardiale Fibroblasten wurden mit Aldosteron (10 nM, 24 h) allein und mit Finerenon (100 nM und 500 nM, 1 h Präinkubation) bzw. mit Spironolacton (500 nM, 1h Präinkubation) behandelt. **C** Neonatale kardiale Fibroblasten wurden mit Aldosteron (10 nM, 24 h) allein, zusammen mit Angiotensin II (1 μ M, 3 h) und zusätzlich Finerenon (500 nM, 1 h Präinkubation) behandelt.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

4.5 Angiotensin II reguliert Aldosteron-unabhängig die TGF- β -Expression in kardialen Fibroblasten

Um den Einfluss von Angiotensin II und Aldosteron auf die Expression des Fibrose-stimulierenden Wachstumsfaktors Transforming Growth Factor β TGF- β zu untersuchen, wurden kardiale Fibroblasten sowohl mit Aldosteron (10 nM, 24 h) allein und zusätzlich mit Finerenon (500 nM, 1 h Präinkubation), als auch mit Angiotensin II (1 μ M, 3 h) allein und zusätzlich mit dem AT₁-Antagonisten Telmisartan (20 μ M, 24 h) behandelt. Anschließend wurde mittels TaqMan®-PCR-Analyse die TGF- β -Expression bestimmt und mit der TGF- β -Expression in unbehandelten Fibroblasten verglichen.

Die Behandlung mit Aldosteron bewirkte keinen signifikanten Anstieg der TGF- β -Expression ($121,6 \pm 29,2$ %, $p = \text{ns}$ verglichen mit Kontrolle) (Abb. 7). Die Behandlung mit Aldosteron und Finerenon zeigte keinen Unterschied in der TGF- β -Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe oder zur Aldosterongruppe ($118,0 \pm 33,4$ %, $p = \text{ns}$ verglichen mit Kontrolle und mit Aldosteron) (Abb. 7).

Angiotensin II bewirkte eine TGF- β -Überexpression ($171,8 \pm 34,2$ %, $p < 0,0001$ verglichen mit Kontrolle) (Abb. 7). Diese TGF- β -Überexpression konnte durch gleichzeitige Behandlung mit Telmisartan vermindert werden ($116,5 \pm 29,4$ %, $p < 0,01$ verglichen mit Angiotensin II) (Abb. 7).

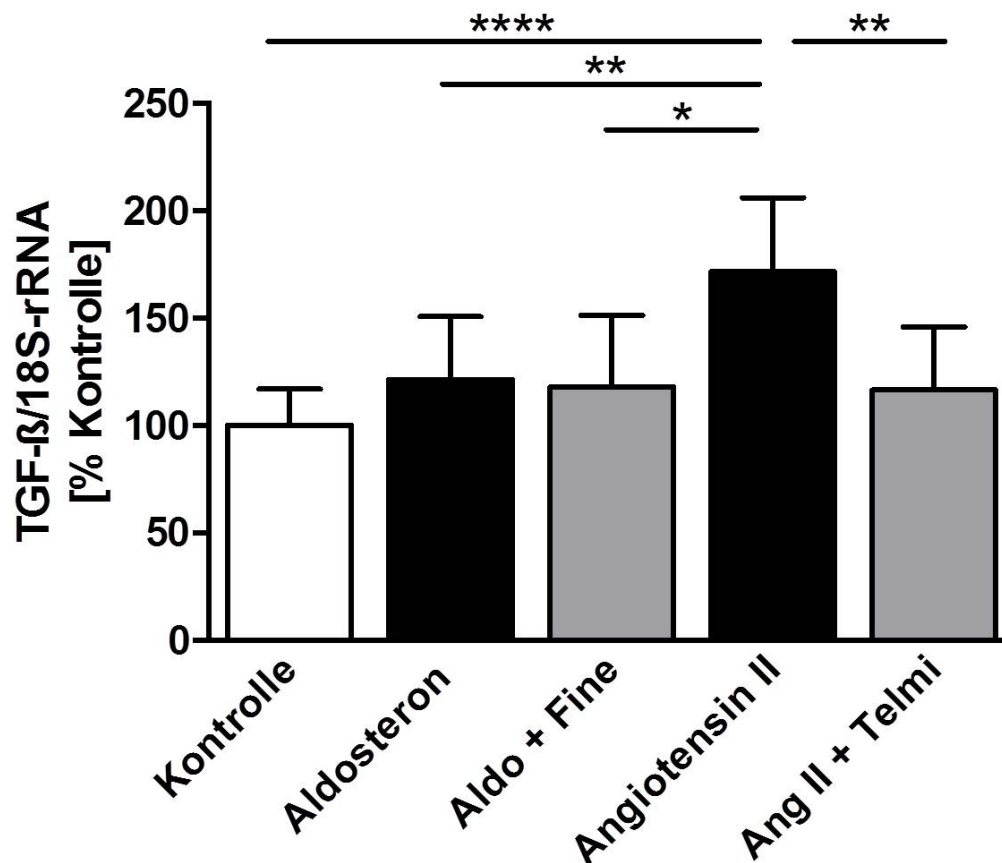


Abbildung 7: Angiotensin II reguliert die TGF- β -Expression in kardialen Fibroblasten.

Neonatale kardiale Fibroblasten wurden mit Aldosteron (10 nM, 24 h) mit und ohne Finerenon (500 nM, 1 h Präinkubation) bzw. mit Angiotensin II (1 μ M, 3 h) mit und ohne Telmisartan (20 μ M, 24 h) behandelt und die TGF- β -Expression mittels TaqMan®-PCR-Analyse quantifiziert. Die Abbildung zeigt die prozentualen Veränderungen der TGF- β -Expression bezogen auf die Kontrollgruppe. Die Expressionslevel wurden auf die 18s-rRNA bezogen.

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, **** = $p < 0,0001$

4.6 Finerenon reduziert die Aldosteron-Angiotensin II-induzierte Fibronectin-Überexpression in kardialen Fibroblasten

Neonatale kardiale Fibroblasten wurden mit Aldosteron (10 nM, 24 h) allein, zusammen mit Angiotensin II (1 μ M, 3 h) und zusätzlich mit Finerenon (500 nM, 1 h Präinkubation) behandelt. Im Anschluss wurde die Fibronectin-Expression mittels Western Blot bestimmt und mit der Fibronectin-Expression in unbehandelten Fibroblasten verglichen.

Aldosteron bewirkte eine Fibronectin-Überexpression ($151,9 \pm 39,9$ %, $p < 0,05$ verglichen mit der Kontrolle) (Abb. 8). Dieser Effekt wurde durch die gleichzeitige Behandlung mit Angiotensin II nochmal verstärkt ($186,8 \pm 44,8$ %, $p < 0,0001$ verglichen mit Kontrolle) (Abb. 8). Durch Behandlung mit Finerenon wurde die durch Aldosteron und Angiotensin II induzierte Fibronectin-Überexpression reduziert ($116,0 \pm 28,4$ %, $p < 0,01$ verglichen mit Aldosteron + Angiotensin II) (Abb. 8).

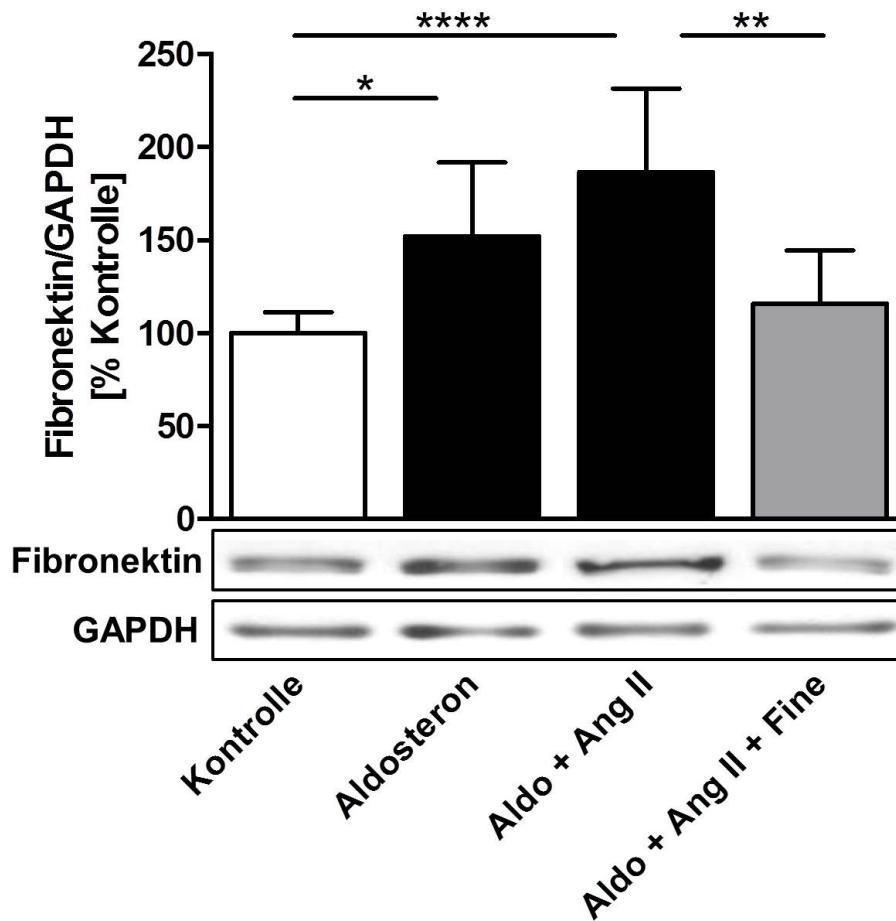


Abbildung 8: Finerenon reduziert die Aldosteron-Angiotensin II-induzierte Fibronectin-Überexpression in kardialen Fibroblasten.

Neonatale kardiale Fibroblasten wurden mit Aldosteron (10 nM, 24 h) allein, zusammen mit Angiotensin II (1 μ M, 3 h) und zusätzlich Finerenon (500 nM, 1 h Präinkubation) behandelt und die Fibronectin-Proteinexpression mittels Western Blot quantifiziert. Die Abbildung zeigt die prozentualen Veränderungen der Fibronectin-Proteinexpression bezogen auf die unstimulierte Kontrollgruppe. GAPDH diente als Ladekontrolle.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$

4.7 Finerenon verhindert die Aldosteron-induzierte LOX-Überexpression in kardialen Fibroblasten

Neonatale kardiale Fibroblasten wurden mit Aldosteron (10 nM, 24 h) allein und zusätzlich mit Finerenon in unterschiedlichen Konzentrationen (100 nM und 500 nM, 1 h Präinkubation) oder mit Spironolacton (500 nM, 1 h Präinkubation) behandelt. Im Anschluss wurde mittels Western Blot die Protein-Expression des Fibrose-fördernden Enzyms Lysyl-Oxidase LOX bestimmt und mit der LOX-Expression einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen.

Aldosteron induzierte eine Überexpression von LOX ($149,1 \pm 18,3 \%$, $p < 0,001$ verglichen mit Kontrolle) (Abb. 9). Durch zusätzliche Behandlung mit Finerenon in einer Konzentration von 100 nM und 500 nM konnte die Aldosteron-induzierte LOX-Überexpression konzentrationsabhängig (100 nM: $105,5 \pm 43,6 \%$, $p < 0,05$ verglichen mit Aldosteron; 500 nM: $86,6 \pm 29,8 \%$, $p < 0,0001$ verglichen mit Aldosteron) (Abb. 9) vermindert werden. Spironolacton verminderte ebenfalls die Aldosteron-induzierte LOX-Überexpression ($99,3 \pm 25,1 \%$, $p < 0,01$ verglichen mit Aldosteron) (Abb. 9).

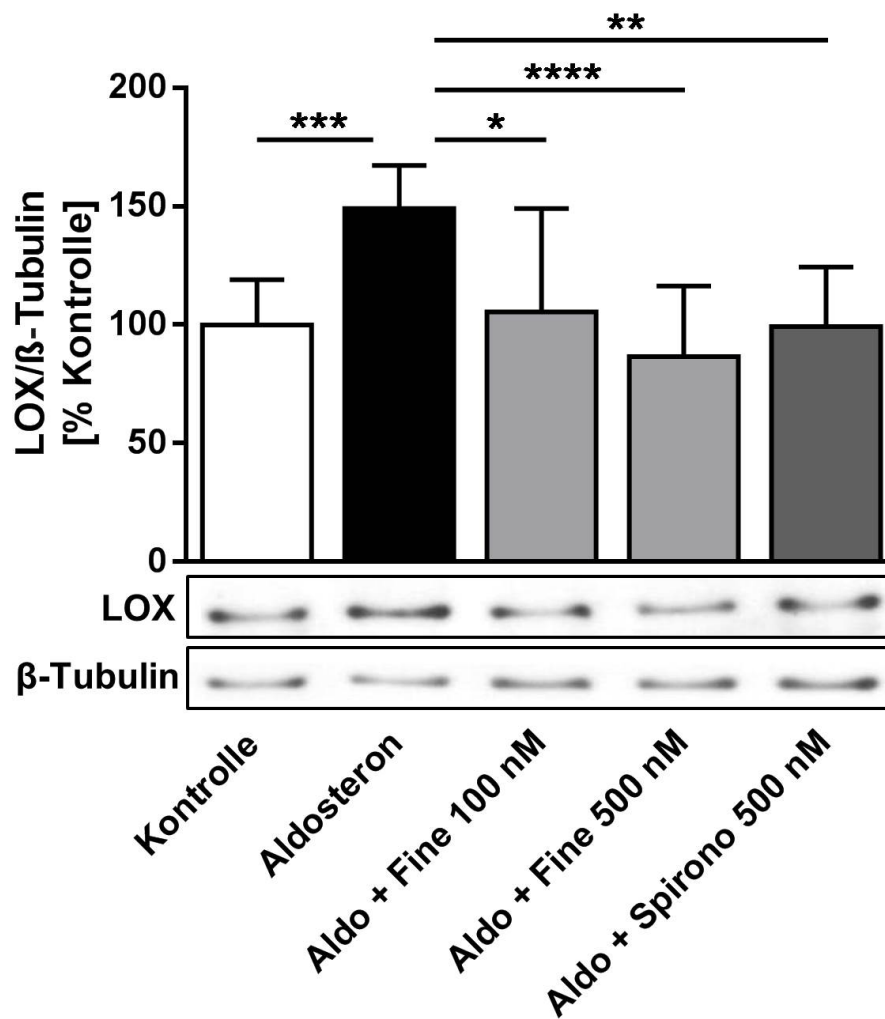


Abbildung 9: Finerenon verhindert die Aldosteron-induzierte LOX-Überexpression in kardialen Fibroblasten.

Neonatale kardiale Fibroblasten wurden mit Aldosteron (10 nM, 24 h) allein und mit Finerenon (100 nM und 500 nM, 1 h Präinkubation) bzw. mit Spironolacton (500 nM, 1h Präinkubation) behandelt und die LOX-Proteinexpression mittels Western Blot quantifiziert. Die Abbildung zeigt die prozentualen Veränderungen der LOX-Proteinexpression bezogen auf die unstimulierte Kontrollgruppe. β-Tubulin diente als Ladekontrolle.

*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001

4.8 Finerenon reduziert die Aldosteron-induzierte Mikro-RNA21-Überexpression in kardialen Fibroblasten

Neonatale kardiale Fibroblasten wurden mit Aldosteron (10 nM, 24 h) allein und zusätzlich mit Finerenon (500 nM, 1 h Präinkubation) oder Spironolacton (500 nM, 1 h Präinkubation) behandelt. Anschließend wurde mittels TaqMan®-PCR die Expression der pro-fibrotischen Mikro-RNA21 bestimmt und mit einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen.

Aldosteron bewirkte einen Anstieg der Mikro-RNA21-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe ($353,9 \pm 228,7$ %, $p < 0,01$ verglichen mit Kontrolle) (Abb. 10). Finerenon und Spironolacton reduzierten diesen Aldosteron-induzierten Anstieg (Finerenon $130,1 \pm 46,1$ %, $p < 0,05$, Spironolacton $136,5 \pm 59,2$ %, $p < 0,05$ jeweils verglichen mit Aldosteron) (Abb. 10).

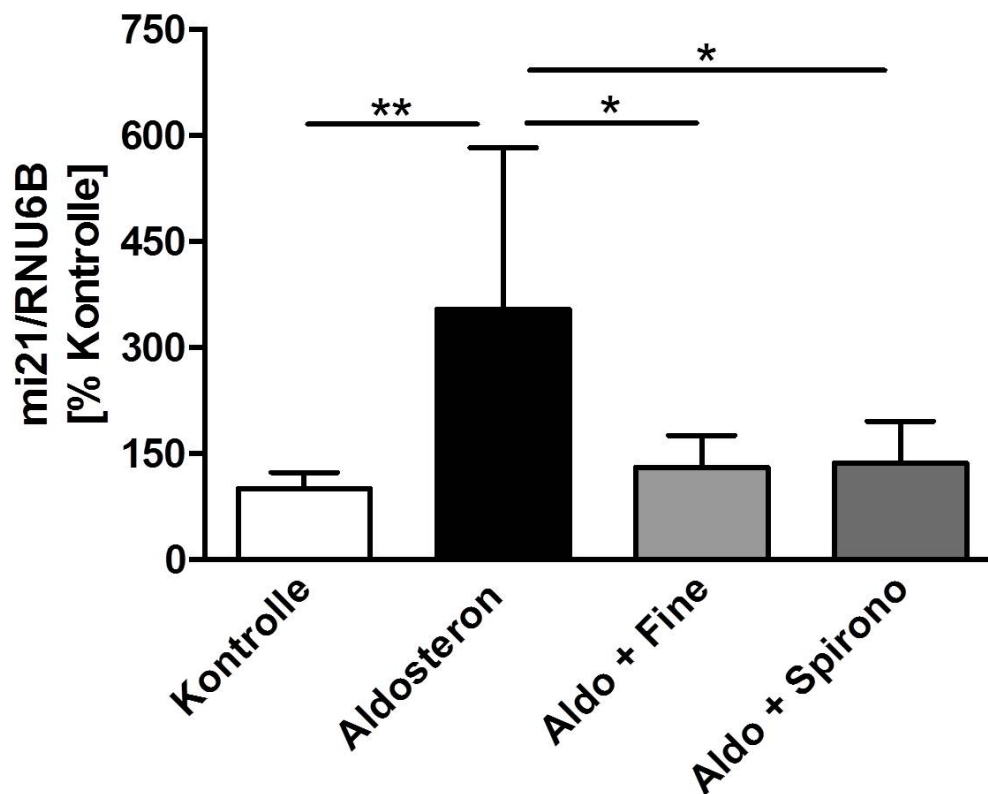


Abbildung 10: Finerenon reduziert die Aldosteron-induzierte Mikro-RNA21-Überexpression in kardialen Fibroblasten.

Neonatale kardiale Fibroblasten wurden mit Aldosteron (10 nM, 24 h) allein und mit Finerenon (500 nM, 1 h Präinkubation) bzw. mit Spironolacton (500 nM, 1 h Präinkubation) behandelt und die Mikro-RNA21-Expression mittels TaqMan®-PCR-Analyse quantifiziert. Die Abbildung zeigt die prozentualen Veränderungen der Mikro-RNA21-Expression bezogen auf die Kontrollgruppe. Die Expressionslevel wurden auf die von RNU6B bezogen.

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$.

5 Diskussion

5.1 Finerenon schützt vor fibrotischem Remodeling

Ziel dieser Studie war es, die Auswirkungen des MR-Antagonisten Finerenon im Zellkulturmodell auf Mechanismen der kardialen Fibroseentstehung zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen, dass Finerenon die Aldosteron-induzierte MR-Translokation in den Zellkern verhindert und vor pro-fibrotischen Veränderungen in kardialen Fibroblasten schützt.

Aldosteron bindet am Mineralocorticoid-Rezeptor im Zytoplasma, wodurch dieser aktiviert und in den Zellkern transloziert wird, wo er als Transkriptionsfaktor MR-regulierter Gene wirkt (Pascual-Le Tallec und Lombès, 2005; Fuller und Young, 2005). Finerenon bewirkte eine Hemmung der Aldosteron-induzierten Translokation des MR vom Zytoplasma in den Zellkern kardialer Fibroblasten. Amazit et al. zeigten in humanen Sammelrohrzellen der Niere ebenfalls eine Inhibierung der Aldosteron-induzierten nukleären Translokation des MR durch Finerenon (Amazit et al., 2015). Dieser Effekt von Finerenon auf die effektive Hemmung der MR-Translokation scheint daher organübergreifend in Herz und Niere vorhanden zu sein. Aldosteron induziert in Fibroblasten die Expression pro-fibrotischer Gene wie CTGF, Fibronectin, LOX oder Mikro-RNA21 (Chen D et al., 2013; Lavall et al., 2014). Durch die Hemmung der Translokation des MR in den Zellkern wird die Aldosteron-induzierte Überexpression solcher pro-fibrotischer Gene reduziert (Pascual-Le Tallec und Lombès, 2005; Fuller und Young, 2005).

CTGF ist ein pro-fibrotischer Wachstumsfaktor. Die Überexpression von CTGF spielt eine Rolle bei der Entstehung von Fibrose in verschiedenen Organen (Oemar et al., 1997; Oemar und Lüscher, 1997; Ohnishi et al., 1998; Rockey et al., 2015). Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass Finerenon in kardialen Fibroblasten konzentrationsabhängig die basale CTGF-Expression in Abwesenheit von Aldosteron reduziert. Auch die Aldosteron-induzierte CTGF-Überexpression wurde durch Finerenon verhindert. Grune et al. zeigten im Hypertrophiemodell der Maus durch chronische Druckbelastung mittels transverser aortaler Konstriktion (transverse aortic constriction, TAC), dass Finerenon die Hochregulation der CTGF-Genexpression reduziert (Grune et al., 2016). Finerenon hemmt also sowohl im Zellkultur- als auch im Tiermodell die CTGF-Expression als pro-fibrotischen Stimulus.

Durch die gleichzeitige Behandlung kardialer Fibroblasten mit Aldosteron und Angiotensin II konnte die CTGF-Überexpression verstärkt werden. Finerenon verhinderte diese Aldosteron-Angiotensin II-induzierte CTGF-Überexpression vollständig. Da Finerenon lediglich den MR und nicht AT₁-Rezeptoren antagonisiert, unterstreicht dies die sowohl in vivo als auch in vitro beobachteten synergistischen Effekte zwischen Aldosteron und Angiotensin II (Mazak et al., 2004; Michel F et al., 2004; Xiao et al., 2004; Min et al., 2005; Di Zhang et al., 2008; Tsai et al., 2013). Mazak et al. zeigten im Tiermodell in der glatten Gefäßmuskulatur eine Potenzierung der Angiotensin II-vermittelten Effekte durch Aldosteron (Mazak et al., 2004). Auch eine Reduktion von Angiotensin II-induziertem kardialem Remodeling durch MR-Blockade konnte im Tiermodell gezeigt werden (Di Zhang et al., 2008). Umgekehrt zeigten Tsai et al. in HL-1-Kardiomyozyten eine Verhinderung der Aldosteron-induzierten Überexpression pro-fibrotischer Parameter durch die Blockade des AT₁-Rezeptors mittels Losartan (Tsai et al., 2013). Angiotensin II und Aldosteron potenzieren sich also gegenseitig in ihrer pro-fibrotischen Wirkung. Finerenon ist bezüglich der CTGF-Expression ein potenter Inhibitor dieser synergistischen Effekte von Aldosteron und Angiotensin II.

TGF- β ist ein pro-fibrotischer Mediator, der die CTGF-Expression stimuliert und dadurch zur vermehrten Bildung extrazellulärer Matrix und fibrotischem Remodeling führt (Grotendorst et al., 1996; Grotendorst, 1997). Eine Überexpression von TGF- β ist mit kardialer Fibrose assoziiert (Seeland et al., 2002). Aldosteron bewirkte keine signifikante Zunahme der TGF- β -Expression in kardialen Fibroblasten. Chun et al. zeigten eine Regulation von Nitric Oxide Synthase in Ratten-Kardiomyozyten durch Aldosteron über TGF- β , konnten aber ebenfalls keine Aldosteron-induzierte Überexpression von TGF- β -mRNA oder -Protein nachweisen. Sie spekulierten daher, dass Aldosteron womöglich eine Umwandlung von latentem in die aktive Form von TGF- β (Khalil, 1999) bewirkt (Chun et al., 2003). Falls diese Hypothese zuträfe, würde Aldosteron zwar die Protein- und mRNA-Expression von TGF- β nicht verstärken, wohl aber dessen Aktivität und damit dessen Auswirkungen auf die Entstehung kardialer Fibrose. Um dies zu evaluieren sind weitere Studien notwendig, in denen nach Aldosteron-Behandlung die Menge an aktivem und inaktivem TGF- β eruiert wird.

Die Ergebnisse dieser Studie und von Chun et al. suggestieren, dass die Expression von TGF- β nicht durch Aldosteron reguliert wird. Im Gegensatz dazu stimulierte Angiotensin II die TGF- β -Expression in kardialen Fibroblasten. Frühere Studien zeigen einen vergleichbaren Effekt von Angiotensin II auf die TGF- β -Expression in kardialen Fibroblasten (Lee et al.,

1995; Campbell und Katwa 1997). Durch die Antagonisierung des AT₁-Rezeptors durch Telmisartan wurde die Angiotensin II-induzierte TGF- β -Überexpression reduziert. Kim et al. zeigten eine Reduzierung der TGF- β -Expression in hypertensiven Rattenherzen und –blutgefäßen durch Behandlung mit einem AT₁-Rezeptor-Antagonisten, woraus eine Verminderung kardialer Hypertrophie resultierte (Kim et al., 1995). Die Blockade des AT₁-Rezeptors hat also eine direkte Auswirkung auf kardiales Remodeling durch TGF- β .

Fibronectin ist ein Protein der Extrazellulärmatrix, welches die Signalvermittlung zwischen Intra- und Extrazellulärraum reguliert (Magnusson und Mosher, 1998) und außerdem für die Bildung eines Kollagennetzwerkes und somit für fibrotisches Remodeling notwendig ist (Velling et al., 2002). Finerenon reduzierte die durch Aldosteron-Angiotensin II-Kobehandlung induzierte Überexpression von Fibronectin in kardialen Fibroblasten. Bei Patienten mit Vorhofflimmern konnte im linken Atrium eine erhöhte Fibronectin-Expression nachgewiesen werden (Adam et al., 2011). Die Hemmung der Fibronectin-Expression durch Finerenon könnte daher strukturellem Remodeling und daraus resultierendem Vorhofflimmern vorbeugen.

Lysyl-Oxidase (LOX) ist ein Enzym, das die Kollagen-Quervernetzung katalysiert (Kagan und Li, 2003). Intrazellulär trägt es zur Stimulation von Fibrose bei, indem es unter anderem indirekt die Expression von Mikro-RNA21 stimuliert (Li D et al., 1999; Kagan und Li, 2003; Ambros, 2004; Landthaler et al., 2004; Du und Zamore, 2005; Kuehbacher et al., 2007; Saad et al., 2010). Die Aldosteron-induzierte LOX-Überexpression in kardialen Fibroblasten wurde durch Finerenon verhindert. In klinischen Studien konnten bei Herzinsuffizienz und bei Vorhofflimmern erhöhte Mengen von LOX nachgewiesen werden (López et al., 2009; Adam et al., 2011). Eine erhöhte LOX-Expression ist also mit Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern assoziiert, weshalb deren Hemmung durch Finerenon die Entstehung dieser Erkrankungen beeinflussen könnte.

Mikro-RNA21 reguliert die Expression verschiedener Gene, unter anderem ist sie an der Regulation des Fibroblasten-Überlebens beteiligt (Caschi et al., 1999; Michel MC et al., 2001; Hanafusa et al., 2002; Thum et al., 2008; Wenzel et al., 2010; Adam et al., 2012). Finerenon reduzierte die Aldosteron-induzierte Mikro-RNA21-Überexpression in kardialen Fibroblasten. Lai et al. zeigten eine erhöhte Expression von Mikro-RNA21 im linken Ventrikel von Patienten mit Herzinsuffizienz (Lai et al., 2015). Auch im linken Atrium von

Patienten mit Vorhofflimmern konnte eine erhöhte Mikro-RNA21-Expression gezeigt werden (Adam et al., 2012). Mikro-RNA21 scheint also eine Rolle in der Pathogenese von Vorhofflimmern und Herzinsuffizienz zu spielen, weshalb dessen Hemmung durch Finerenon den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen könnte.

Diese Studie zeigt insgesamt eine Hemmung von Fibroseparametern als Surrogat kardialer Fibrose in kardialen Fibroblasten durch Finerenon. Auch in Tiermodellen konnten protektive Effekte von Finerenon auf die Entstehung von kardialem Remodeling gezeigt werden (Kolkhof et al., 2014; Grune et al., 2016). Kolkhof et al. behandelten Ratten mit Desoxycorticosteronacetat (DOCA), einem Mineralocorticoid-Derivat, um eine Mineralocorticoid-abhängige kardiale Schädigung und Hypertension zu erzeugen. Histologisch zeigten sie durch DOCA induziertes kardiales Remodeling mit Fibrose und myokardialer Degeneration. Finerenon verminderte dieses DOCA-induzierte kardiale Remodeling. Auch das Herzgewicht konnte durch Finerenon reduziert werden (Kolkhof et al., 2014). Im Hypertrophiemodell der Maus durch chronische Druckbelastung mittels TAC von Grune et al. zeigte sich durch Finerenonbehandlung eine reduzierte linksventrikuläre Masse, eine verminderte Septum- und Hinterwanddicke und histologisch eine reduzierte Myozytenhypertrophie (Grune et al., 2016). Sowohl im Zellkultur- als auch in Tiermodellen scheint Finerenon vor fibrotischem Remodeling zu schützen.

5.2 Finerenon als Prototyp einer neuen Generation von MR-Antagonisten

Bereits frühere Studien zeigen, dass MR-Antagonisten wie Spironolacton Aldosteron-abhängige pro-fibrotische Veränderungen in kardialen Fibroblasten reduzieren (Brilla et al., 1994; Lavall et al., 2014). Finerenon und Spironolacton zeigten in dieser Studie bezüglich der anti-fibrotischen Wirkung auf kardiale Fibroblasten die gleiche Effektivität. Diese Ergebnisse sind aus pharmakologischer Sicht schlüssig, da Finerenon und Spironolacton eine ähnliche IC_{50} für den MR aufweisen (Fagart et al., 2010; Bärfacker et al., 2012; Bramlage et al., 2016). Ein pharmakologischer Vorteil für Finerenon liegt in der Gewebeanreicherung beider Substanzen, da Finerenon sich in Herz und Niere gleichermaßen verteilt (Kolkhof et al., 2014), Spironolacton aber in der Niere 6-fach höher akkumuliert als im Herzen (Kolkhof und

Borden, 2012). Dosen von Finerenon, die in vivo die gleichen natriuretischen Effekte aufweisen wie Spironolacton, könnten also theoretisch stärker vor kardialem Remodeling schützen. Spironolacton und Eplerenon können durch ihre starke renale Wirkung und daraus resultierenden Hyperkaliämien oftmals nicht in ausreichender Dosis angewendet werden, um im Herzen vor Fibrose zu schützen. Darin liegt ein potentieller Vorteil für die Anwendung von Finerenon vor allem für Patienten, die stark zu Hyperkaliämien neigen, wie zum Beispiel ältere Patienten oder solche mit vorbestehender Nierenerkrankung (Dunn et al., 2015). In den ersten klinischen Studien zeigte sich bereits ein günstigeres Nebenwirkungsprofil für Finerenon mit weniger Hyperkaliämien im Vergleich zu Spironolacton oder Eplerenon (Pitt et al., 2013; Filippatos et al., 2016). Zu erwarten sind auch weniger endokrine Nebenwirkungen wie Gynäkomastie oder Amenorrhoe durch Finerenon im Vergleich zu Spironolacton, da Finerenon selektiver am MR wirkt und für andere Steroidrezeptoren nur eine geringe Affinität aufweist (Bärfacker et al., 2012). Zur weiteren Evaluierung insbesondere der endokrinen Nebenwirkungen sind allerdings klinische Langzeitstudien notwendig (Pitt et al., 2013).

In der Mineralocorticoid Receptor Antagonist Tolerability Study (ARTS), einer randomisierten doppel-blind Phase II Studie, wurde die Sicherheit und Verträglichkeit von Finerenon bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz und milder bis moderater Niereninsuffizienz getestet. Finerenon reduzierte die Parameter für hämodynamischen Stress ebenso effektiv wie Spironolacton (Pitt et al., 2013). In der Mineralocorticoid Receptor Antagonist Tolerability Study – Heart Failure (ARTS – HF), einer Studie zur Dosis-Findung und Effizienz von Finerenon bei Patienten mit Herzinsuffizienz und Diabetes mellitus Typ II oder chronischer Niereninsuffizienz reduzierte Finerenon den Herzinsuffizienzmarker NT-proBNP (N-terminales Propeptid des B-Typ natriuretischen Peptids) ähnlich effektiv wie Eplerenon, wobei Mortalität, kardiovaskuläre Hospitalisierung und notfallmäßige Vorstellung wegen Verschlechterung der Herzinsuffizienz-Symptomatik in der Finerenon-Gruppe insgesamt weniger häufig waren, als in der Eplerenon-Gruppe (Filippatos et al., 2016). Die ersten klinischen Studien zeigen also eine günstige Wirkung von Finerenon bezüglich Herzinsuffizienz. Um zu beurteilen, inwieweit Finerenon die Prognose bei Herzinsuffizienz verbessert, sind prospektive Langzeitstudien unerlässlich.

Bisher existieren keine Daten zu der Fragestellung, ob Finerenon die Inzidenz von Vorhofflimmern reduziert. Frühere Studien zeigen aber, dass MR-Antagonisten das Auftreten von Arrhythmien senken können (Shroff et al., 2006; Swedberg et al., 2012; Liu et al., 2015).

Shroff et al. zeigten bei Hunden mit Herzinsuffizienz eine verminderte Induzierbarkeit atrialer Arrhythmien durch Eplerenon (Shroff et al., 2006). In einer Subanalyse der Studie Eplerenone in Mild Hospitalization And Survival Study in Heart Failure (EMPHASIS-HF) reduzierte Eplerenon die Inzidenz von neu aufgetretenem Vorhofflimmern (Swedberg et al., 2012). Eine Meta-Analyse aus randomisierten klinischen Studien zeigte, dass MR-Antagonisten das Auftreten von Vorhofflimmern bei Patienten mit Herzinsuffizienz, nach Herz-Operationen und nach Radiofrequenzkatheter-Ablation mindern (Liu et al., 2015). Da die Entstehung von Fibrose, welche für Vorhofflimmern prädisponiert, durch Finerenon gehemmt wird, könnte Finerenon vor Vorhofflimmern schützen. Es sind klinische Studien notwendig um zu evaluieren, ob Finerenon zu einer verminderten Inzidenz von Vorhofflimmern führt.

5.3 Limitierungen der Studie

Bei dieser Studie handelt es sich um eine Studie mit Zellkulturen. Eine natürliche Limitation liegt darin, dass einzelne, isolierte Zelllinien und keine gesamten Organismen untersucht werden, in denen Pharmakokinetik und Pharmakodynamik eine wichtige Rolle spielen. Gleichzeitig stellt dies eine Stärke der Studie dar, da mechanistische Effekte von Signalwegen Zelltyp-spezifisch unter kontrollierten Bedingungen charakterisiert werden können, die die Grundlage für weiterführende Untersuchungen an Tieren und Menschen darstellen. Da Finerenon eine andere Organverteilung aufweist als Spironolacton, sind in vivo-Experimente notwendig, um die anti-fibrotischen Effekte von Finerenon in der Zellkultur dort zu bestätigen. In der vorliegenden Studie wurde Ratten-Kardiofibroblasten verwendet, die möglicherweise nur begrenzt mit humanen Fibroblasten vergleichbar sind. Nicht alle Effekte lassen sich direkt auf humane Zellen übertragen. Um die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten zu verhindern, wurden sie nur bis zur Passage 3 verwendet. Des Weiteren wurde ausschließlich die Wirkung von Finerenon auf pro-fibrotische Parameter in kardialen Fibroblasten evaluiert, andere MR-regulierte Gene oder Proteine wurde nicht untersucht. Um die exakten Effekte von Finerenon auf kardiales Remodeling weiterführend zu charakterisieren sind daher Tiermodelle und klinische Studien erforderlich und in Durchführung.

5.4 Schlussfolgerung

Die Aktivierung des MR in kardialen Fibroblasten reguliert die Expression der pro-fibrotisch wirksamen Parameter CTGF, Fibronectin, LOX und Mikro-RNA21. Finerenon hemmt die MR-Translokation in den Zellkern und vermindert in kardialen Fibroblasten die Expression Aldosteron-induzierter pro-fibrotischer Parameter. Daher stellt Finerenon eine potentielle Substanz zur Prävention kardialer Fibrose und daraus resultierender Herzinsuffizienz und Herzrhythmusstörungen dar.

6 Literaturverzeichnis

1. Adam O, Lavall D, Theobald K, Hohl M, Grube M, Ameling S, Sussman MA, Rosenkranz S, Kroemer HK, Schäfers HJ, Böhm M, Laufs U (2010) Rac1-induced connective tissue growth factor regulates connexin 43 and N-cadherin expression in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 55:469–480.
2. Adam O, Löhfel B, Thum T, Gupta SK, Puhl SL, Schäfers HJ, Böhm M, Laufs U (2012) Role of miR-21 in the pathogenesis of atrial fibrosis. *Basic Res Cardiol* 107:278.
3. Adam O, Theobald K, Lavall D, Grube M, Kroemer HK, Ameling S, Schäfers HJ, Böhm M, Laufs U (2011) Increased lysyl oxidase expression and collagen cross-linking during atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* 50:678–685.
4. Akyürek O, Sayin T, Dinçer I, Karaoguz R, Güldal M, Oral D (2001) Lengthening of intraatrial conduction time in atrial fibrillation and its relation with early recurrence of atrial fibrillation. *Jpn Heart J* 42:575–584.
5. Allesie MA, Bonke FI, Schopman FJ (1973) Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. *Circ Res* 33:54–62.
6. Allesie MA, Bonke FI, Schopman FJ (1976) Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. II. The role of nonuniform recovery of excitability in the occurrence of unidirectional block, as studied with multiple microelectrodes. *Circ Res* 39:168–177.
7. Allesie MA, Bonke FI, Schopman FJ (1977) Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. III. The „leading circle“ concept: a new model of circus movement in cardiac tissue without the involvement of an anatomical obstacle. *Circ Res* 41:9–18.
8. Amazit L, Le Billan F, Kolkhof P, Lamribet K, Viengchareun S, Fay MR, Khan JA, Hillisch A, Lomès M, Rafestin-Oblin ME, Fagart J (2015) Finerenone Impedes Aldosterone-dependent Nuclear Import of the Mineralocorticoid Receptor and Prevents

- Genomic Recruitment of Steroid Receptor Coactivator-1. *J Biol Chem* 290:21876–21889.
9. Ambros V (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature* 431:350–355.
 10. Anter E, Jessup M, Callans DJ (2009) Atrial fibrillation and heart failure: treatment considerations for a dual epidemic. *Circulation* 119:2516–2525.
 11. Azibani F, Fazal L, Chatziantoniou C, Samuel JL, Delcayre C (2013) Aldosterone mediates cardiac fibrosis in the setting of hypertension. *Curr Hypertens Rep* 15:395–400.
 12. Bärfacker L, Kuhl A, Hillisch A, Grosser F, Figueroa-Pérez S, Heckroth H, Nitsche A, Ergüden JK, Glielen-Heartwig H, Schlemmer KH, Mittendorf J, Paulsen H, Platzek J, Kolkhof P (2012) Discovery of BAY 94-8862: a nonsteroidal antagonist of the mineralocorticoid receptor for the treatment of cardiorenal diseases. *ChemMedChem* 7:1385–1403.
 13. Boineau JP, Schuessler RB, Mooney CR, Miller CB, Wyldy AC, Hudson RD, Borremans JM, Brockus CW (1980) Natural and evoked atrial flutter due to circus movement in dogs. Role of abnormal atrial pathways, slow conduction, nonuniform refractory period distribution and premature beats. *Am J Cardiol* 45:1167–1181.
 14. Bramlage P, Swift SL, Thoenes M, Minguet J, Ferrero C, Schmieder RE (2016) Non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonism for the treatment of cardiovascular and renal disease. *Eur J Heart Fail* 18:28–37.
 15. Brilla CG, Matsubara LS, Weber KT (1993) Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. *J Mol Cell Cardiol* 25:563–575.
 16. 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.
 17. Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, Weber KT (1994) Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol* 26:809–820.

18. Burstein B, Nattel S (2008) Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 51:802–809.
19. Campbell SE, Katwa LC (1997) Angiotensin stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 29:1947-1958.
20. Carver W, Nagpal ML, Nachtigal M, Borg TK, Terracio L (1991) Collagen expression in mechanically stimulated cardiac fibroblasts. *Circ Res* 69:116–122.
21. Casci T, Vinós J, Freeman M (1999) Sprouty, an intracellular inhibitor of Ras signaling. *Cell* 96:655–665.
22. Chen D, Chen Z, Park C, Centrella M, McCarthy T, Chen L, Al-Omari A, Moeckel GW (2013) Aldosterone stimulates fibronectin synthesis in renal fibroblasts through mineralocorticoid receptor-dependent and independent mechanisms. *Gene* 531:23-30
23. 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.
24. Chun T-Y, Bloem LJ, Pratt JH (2003) Aldosterone inhibits inducible nitric oxide synthase in neonatal rat cardiomyocytes. *Endocrinology* 144:1712–1717.
25. Davies M, Hobbs F, Davis R, Kenkre J, Roafle AK, Hare R, Wosornu D, Lancashire RJ (2001) Prevalence of left-ventricular systolic dysfunction and heart failure in the Echocardiographic Heart of England Screening study: a population based study. *Lancet Lond Engl* 358:439–444.
26. Di Zhang A, Nguyen Dinh Cat A, Soukaseum C, Escoubet B, Cherfa A, Messaoudi S, Delcayre C, Samuel JL, Jaisser F (2008) Cross-talk between mineralocorticoid and angiotensin II signaling for cardiac remodeling. *Hypertension* 52:1060–1067.
27. Dunn JD, Benton WW, Orozco-Torrentera E, Adamson RT (2015) The burden of hyperkalemia in patients with cardiovascular and renal disease. *Am J Manag Care* 21:s307–315.
28. Du T, Zamore PD (2005) microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Dev Camb Engl* 132:4645–4652.

29. Fagart J, Hillisch A, Huyet J, Bäracker L, Fay M, Pleiss U, Pook E, Schäfer S, Rafestin-Oblin ME, Kolkhof P (2010) A new mode of mineralocorticoid receptor antagonism by a potent and selective nonsteroidal molecule. *J Biol Chem* 285:29932–29940.
30. Falk RH (2001) Atrial fibrillation. *N Engl J Med* 344:1067–1078.
31. Filippatos G, Anker SD, Böhm M, Gheorghiade M, Kober L, Krum H, Maggioni AP, Ponikowski P, Voors AA, Zannad F, Kim SY, Nowack C, Palombo G, Kolkhof P, Kimmerskamp-Kischbaum N, Pieper A, Pitt B (2016) A randomized controlled study of finerenone vs. eplerenone in patients with worsening chronic heart failure and diabetes mellitus and/or chronic kidney disease. *Eur Heart J* 37:2105–2114.
32. Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR (1996) Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol* 107:404–411.
33. Fuller PJ, Young MJ (2005) Mechanisms of mineralocorticoid action. *Hypertension* 46:1227–1235.
34. Fuster V, Rydén LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, Halperin JL, Kay GN, Le Huezey JY, Lowe JE, Olsson SB, Prystowsky EN, Tamargo JL, Wann LS, Estes M, Ezekowitz MD, Jackman WM, January CT, Page RL, Slotwiner DJ, Stevenson WG, Tracy CM (2011) 2011 ACCF/AHA/HRS focused updates incorporated into the ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines developed in partnership with the European Society of Cardiology and in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *J Am Coll Cardiol* 57:e101–198.
35. Ghildiyal M, Zamore PD (2009) Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet* 10:94–108.
36. Goette A, Staack T, Röcken C, Arndt M, Geller JC, Huth C, Ansoerge 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.
37. Grotendorst GR (1997) Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev* 8:171–179.
 38. Grotendorst GR, Okochi H, Hayashi N (1996) A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene. *Cell Growth Differ Mol Biol J Am Assoc Cancer Res* 7:469–480.
 39. Grune J, Benz V, Brix S, Salatzki J, Blumrich A, Höft B, Klopffleisch R, Foryst-Ludwig A, Kolkhof P, Kintscher U (2016) Steroidal and Nonsteroidal Mineralocorticoid Receptor Antagonists Cause Differential Cardiac Gene Expression in Pressure Overload-induced Cardiac Hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol* 67:402–411.
 40. Hanafusa H, Torii S, Yasunaga T, Nishida E (2002) Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat Cell Biol* 4:850–858.
 41. Hart RG, Halperin JL (1999) Atrial fibrillation and thromboembolism: a decade of progress in stroke prevention. *Ann Intern Med* 131:688–695.
 42. Kagan HM, Li W (2003) Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem* 88:660–672.
 43. Khalil N (1999) TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect Inst Pasteur* 1:1255–1263.
 44. Kim S, Ohta K, Hamaguchi A, Omura T, Yukimura T, Miura K, Inada Y, Ishimura Y, Chatani F, Iwao H (1995) Angiotensin II type I receptor antagonist inhibits the gene expression of transforming growth factor-beta 1 and extracellular matrix in cardiac and vascular tissues of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 273:509–515.
 45. Kolkhof P, Borden SA (2012) Molecular pharmacology of the mineralocorticoid receptor: prospects for novel therapeutics. *Mol Cell Endocrinol* 350:310–317.
 46. Kolkhof P, Delbeck M, Kretschmer A, Steinke W, Hartmann E, Bärffacker L, Eitner F, Albrecht-Küpper B, Schäfer S (2014) Finerenone, a novel selective nonsteroidal mineralocorticoid receptor antagonist protects from rat cardiorenal injury. *J Cardiovasc Pharmacol* 64:69–78.

47. Kong P, Christia P, Frangogiannis NG (2014) The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci CMLS* 71:549–574.
48. Kotecha D, Piccini JP (2015) Atrial fibrillation in heart failure: what should we do? *Eur Heart J* 36:3250–3257.
49. Krenning G, Zeisberg EM, Kalluri R (2010) The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J Cell Physiol* 225:631–637.
50. van Krimpen C, Smits JF, Cleutjens JP, Debets JJ, Schoemaker RG, Struyker Boudier HA, Bosman FT, Daeman MJ (1991) DNA synthesis in the non-infarcted cardiac interstitium after left coronary artery ligation in the rat: effects of captopril. *J Mol Cell Cardiol* 23:1245–1253.
51. Kuehbacher A, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S (2007) Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res* 101:59–68.
52. Kumagai K, Akimitsu S, Kawahira K, Kawanami F, Yamanouchi Y, Hiroki T, Arakawa K (1991) Electrophysiological properties in chronic lone atrial fibrillation. *Circulation* 84:1662–1668.
53. Lai KB, Sanderson JE, Izzat MB, Yu CM (2015) Micro-RNA and mRNA myocardial tissue expression in biopsy specimen from patients with heart failure. *Int J Cardiol* 199:79–83.
54. Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T (2004) The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol CB* 14:2162–2167.
55. Lavall D, Selzer C, Schuster P, Lenski M, Adam O, Schäfers HJ, Böhm M, Laufs U (2014) The mineralocorticoid receptor promotes fibrotic remodeling in atrial fibrillation. *J Biol Chem* 289:6656–6668.
56. Leask A, Abraham DJ (2004) TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 18:816–827.
57. Lee AA, Dillmann WH, McCulloch AD, Villarreal FJ (1995) Angiotensin II stimulates the autocrine production of transforming growth factor-beta 1 in adult rat cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 27:2347-2357.

58. 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.
59. 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.
60. Li W, Nellajappan K, Strassmaier T, Graham L, Thomas KM, Kagan HM (1997) Localization and activity of lysyl oxidase within nuclei of fibrogenetic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12817-12822.
61. Liu T, Korantzopoulos P, Shao Q, Zhang Z, Letsas KP, Li G (2015) Mineralocorticoid receptor antagonists and atrial fibrillation: a meta-analysis. *Europace* 18:672-678.
62. López B, Querejeta R, González A, Beaumont J, Larman M, Díez J (2009) Impact of treatment on myocardial lysyl oxidase expression and collagen cross-linking in patients with heart failure. *Hypertension* 53:236–242.
63. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275.
64. Magnusson MK, Mosher DF (1998) Fibronectin: structure, assembly, and cardiovascular implications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1363–1370.
65. Mant J, Doust J, Roalfe A, Barton P, Cowie MR, Glasziou P, Mant D, McManus RJ, Holder R, Deeks J, Fletcher K, Qume M, Sohanpal S, Sanders S, Hobbs FDR (2009) Systematic review and individual patient data meta-analysis of diagnosis of heart failure, with modelling of implications of different diagnostic strategies in primary care. *Health Technol Assess Winch Engl* 13:1–207, iii.
66. Matranga C, Zamore PD (2007) Small silencing RNAs. *Curr Biol CB* 17:R789–793.
67. 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.

68. Mazak I, Fiebeler A, Muller DN, Park JK, Shangdarsuren E, Lindschau C, Dechend R, Viedt C, Pilz B, Haller H, Luft FC (2004) Aldosterone potentiates angiotensin II-induced signaling in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 109:2792–2800.
69. McMurray JJV, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Kober L, Lip GYH, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Ronnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A (2012) ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail* 14:803–869.
70. Michel F, Ambroisine ML, Duriez M, Delcayre C, Levy BI, Silvestre JS (2004) Aldosterone enhances ischemia-induced neovascularization through angiotensin II-dependent pathway. *Circulation* 109:1933–1937.
71. Michel MC, Li Y, Heusch G (2001) Mitogen-activated protein kinases in the heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363:245–266.
72. Milliez P, Girerd X, Plouin PF, Blacher J, Safar ME, Mourad JJ (2005) Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. *J Am Coll Cardiol* 45:1243–1248.
73. Min LJ, Mogi M, Li JM, Iwanami J, Iwai M, Horiuchi M (2005) Aldosterone and angiotensin II synergistically induce mitogenic response in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 97:434–442.
74. Mosterd A, Hoes AW (2007) Clinical epidemiology of heart failure. *Heart Br Card Soc* 93:1137–1146.
75. Moussad EE, Brigstock DR (2000) Connective tissue growth factor: what's in a name? *Mol Genet Metab* 71:276–292.
76. Nappi JM, Sieg A (2011) Aldosterone and aldosterone receptor antagonists in patients with chronic heart failure. *Vasc Health Risk Manag* 7:353–363.
77. Nattel S (2002) New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 415:219–226.

78. Nguyen TP, Qu Z, Weiss JN (2014) Cardiac fibrosis and arrhythmogenesis: the road to repair is paved with perils. *J Mol Cell Cardiol* 70:83–91.
79. Oemar BS, Lüscher TF (1997) Connective tissue growth factor. Friend or foe? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:1483–1489.
80. Oemar BS, Werner A, Garnier JM, Do DD, Godoy N, Nauc M, März W, Rupp J, Pech M, Lüscher TF (1997) Human connective tissue growth factor is expressed in advanced atherosclerotic lesions. *Circulation* 95:831–839.
81. Ohnishi H, Oka T, Kusachi S, Nakanishi T, Takeda K, Nakehama M, Doi M, Murakami T, Ninomiya J, Takigawa M, Tsuji T (1998) Increased expression of connective tissue growth factor in the infarct zone of experimentally induced myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol* 30:2411–2422.
82. Page RL, Wilkinson WE, Clair WK, McCarthy EA, Pritchett EL (1994) Asymptomatic arrhythmias in patients with symptomatic paroxysmal atrial fibrillation and paroxysmal supraventricular tachycardia. *Circulation* 89:224–227.
83. Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FW, Thibault G, Nemer M (2000) Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:931–936.
84. Pascual-Le Tallec L, Lombès M (2005) The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. *Mol Endocrinol Baltim Md* 19:2211–2221.
85. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R (2006) Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 86:747–803.
86. Pitt B, Anker SD, Böhm M, Gheorghide M, Kober L, Krum H, Maggioni AP, Ponikowski P, Voors AA, Zannad F, Nowack C, Kim SY, Pieper A, Kimmerskamp-Kischbaum N, Filippatos G (2015) Rationale and design of MinerAlocorticoid Receptor antagonist Tolerability Study-Heart Failure (ARTS-HF): a randomized study of finerenone vs. eplerenone in patients who have worsening chronic heart failure with diabetes and/or chronic kidney disease. *Eur J Heart Fail* 17:224–232.

87. Pitt B, Bakris G, Ruilope LM, DiCarlo L, Mukherjee R; EPHESES Investigators (2008) Serum potassium and clinical outcomes in the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESES). *Circulation* 118:1643–1650.
88. Pitt B, Kober L, Ponikowski P, Gheorghiade M, Filippatos G, Krum H, Nowack C, Kolkhof P, Kim SY, Zannad F (2013) Safety and tolerability of the novel non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonist BAY 94-8862 in patients with chronic heart failure and mild or moderate chronic kidney disease: a randomized, double-blind trial. *Eur Heart J* 34:2453–2463.
89. Pitt B, Williams G, Remme W, Martinez F, Lopez-Sendon J, Zannad F, Neaton J, Roniker B, Hurley S, Burns D, Bittman R, Kleinman J (2001) The EPHESES trial: eplerenone in patients with heart failure due to systolic dysfunction complicating acute myocardial infarction. Eplerenone Post-AMI Heart Failure Efficacy and Survival Study. *Cardiovasc Drugs Ther Spons Int Soc Cardiovasc Pharmacother* 15:79–87.
90. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J (1999) The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 341:709–717.
91. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JG, Coats AJ, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola VP, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GM, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P (2016) 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail*. doi: 10.1002/ejhf.592
92. Reil JC, Hohl M, Selejan S, Lipp P, Drautz F, Kazakow A, Münz BM, Müller P, Steendijk P, Reil GH, Allessie MA, Böhm M, Neuberger HR (2012) Aldosterone promotes atrial fibrillation. *Eur Heart J* 33:2098–2108.

93. Rensma PL, Allessie MA, Lammers WJ, Bonke FI, Schalij MJ (1988) Length of excitation wave and susceptibility to reentrant atrial arrhythmias in normal conscious dogs. *Circ Res* 62:395–410.
94. Robert V, Van Thiem N, Cheav SL, Mouas C, Swynghedauw B, Delcayre C (1994) Increased cardiac types I and III collagen mRNAs in aldosterone-salt hypertension. *Hypertension* 24:30–36.
95. Rockey DC, Bell PD, Hill JA (2015) Fibrosis--A Common Pathway to Organ Injury and Failure. *N Engl J Med* 373:96.
96. Saad FA, Torres M, Wang H, Graham L (2010) Intracellular lysyl oxidase: effect of a specific inhibitor on nuclear mass in proliferating cells. *Biochem Biophys Res Commun* 396:944–949.
97. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487–491.
98. Samuel JL, Delcayre C (2010) Heart failure: aldosterone antagonists are underused by clinicians. *Nat Rev Cardiol* 7:125–127.
99. Seeland U, Haeuseler C, Hinrichs R, Rosenkranz S, Pfitzner T, Scharffetter-Kochanek K, Böhm M (2002) Myocardial fibrosis in transforming growth factor-beta(1) (TGF-beta(1)) transgenic mice is associated with inhibition of interstitial collagenase. *Eur J Clin Invest* 32:295–303.
100. Shroff SC, Ryu K, Martovitz NL, Hoit BD, Stambler BS (2006) Selective aldosterone blockade suppresses atrial tachyarrhythmias in heart failure. *J Cardiovasc Electrophysiol* 17:534–541.
101. Smits JF, van Krimpen C, Schoemaker RG, Cleutjens JP, Daemen MJ (1992) Angiotensin II receptor blockade after myocardial infarction in rats: effects on hemodynamics, myocardial DNA synthesis, and interstitial collagen content. *J Cardiovasc Pharmacol* 20:772–778.
102. Spät A, Hunyady L (2004) Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiol Rev* 84:489–539.

103. Stockand JD, Meszaros JG (2003) Aldosterone stimulates proliferation of cardiac fibroblasts by activating Ki-RasA and MAPK1/2 signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284:H176-184.
104. Svensson M, Gustafsson F, Galatius S, Hildebrandt PR, Atar D (2004) How prevalent is hyperkalemia and renal dysfunction during treatment with spironolactone in patients with congestive heart failure? *J Card Fail* 10:297–303.
105. Swedberg K, Zannad F, McMurray JJV, Krum H, van Veldhuisen DJ, Shi H, Vincent J, Pitt B; EMPHASIS-HF Study Investigators (2012) Eplerenone and atrial fibrillation in mild systolic heart failure: results from the EMPHASIS-HF (Eplerenone in Mild Patients Hospitalization And Survival Study in Heart Failure) study. *J Am Coll Cardiol* 59:1598–1603.
106. Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Kotelianski V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JTR, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S (2008) MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 456:980–984.
107. Tsai CF, Yang SF, Chu HJ, Ueng KC (2013) Cross-talk between mineralocorticoid receptor/angiotensin II type 1 receptor and mitogen-activated protein kinase pathways underlies aldosterone-induced atrial fibrotic responses in HL-1 cardiomyocytes. *Int J Cardiol* 169:17–28.
108. Velling T, Risteli J, Wennerberg K, Mosher DF, Johansson S (2002) Polymerization of type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins alpha 11beta 1 and alpha 2beta 1. *J Biol Chem* 277:37377–37381.
109. Verheule S, Sato T, Everett T, Engle SK, Otten D, Rubart-von der Lohe M, Nakajima H, Field LJ, Olgin JE (2004) Increased vulnerability to atrial fibrillation in transgenic mice with selective atrial fibrosis caused by overexpression of TGF-beta1. *Circ Res* 94:1458–1465.
110. Wang TJ, Larson MG, Levy D, Vasan RS, Leip EP, Wolf PA, D'Agostino RB, Murabito JM, Kannel WB, Benjamin EJ (2003) Temporal relations of atrial fibrillation

- and congestive heart failure and their joint influence on mortality: the Framingham Heart Study. *Circulation* 107:2920–2925.
111. Watson T, Shantsila E, Lip GYH (2009) Mechanisms of thrombogenesis in atrial fibrillation: Virchow's triad revisited. *Lancet Lond Engl* 373:155–166.
 112. Weber KT (1989) Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol* 13:1637–1652.
 113. Weber KT, Brilla CG, Janicki JS (1993) Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors. *Cardiovasc Res* 27:341–348.
 114. Wenzel S, Henning K, Habbig A, Forst S, Schreckenber R, Heger J, Maxeiner H, Schlüter KD (2010) TGF-beta1 improves cardiac performance via up-regulation of laminin receptor 37/67 in adult ventricular cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol* 105:621–629.
 115. Wiener N, Rosenblueth A (1946) The mathematical formulation of the problem of conduction of impulses in a network of connected excitable elements, specifically in cardiac muscle. *Arch Inst Cardiol México* 16:205–265.
 116. Xiao F, Puddefoot JR, Barker S, Vinson GP (2004) Mechanism for aldosterone potentiation of angiotensin II-stimulated rat arterial smooth muscle cell proliferation. *Hypertension* 44:340–345.
 117. State & society - Hospitals - Hospital patients - Federal Statistical Office (Destatis). <https://www.destatis.de/EN/FactsFigures/SocietyState/Health/Hospitals/Tables/20most Diagnoses.html>. Zugegriffen: 27. Mai 2016

7 Publikationen/Dank

7.1 Publikationen

Lavall D, Jacobs N, Kolkhof P, Böhm M, Laufs U. Finerenone prevents fibrotic remodeling in cardiac fibroblasts.

Manuskript in Bearbeitung

7.2 Abstracts

Lavall D, Jacobs N, Schuster P, Böhm M, Laufs U (2015) Role of Rac1 GTPase for the mineralocorticoid receptor mediated structural remodeling in atrial fibrillation. Eur Heart J (2015) 36 (Abstract Supplement) 692-693. European Society of Cardiology Congress 2015, P4085.

Lavall D, Jacobs N, Kolkhof P, Böhm M, Laufs U (2016) Finerenone prevents fibrotic remodeling in cardiac fibroblasts. Clin Res Cardiol 105 Suppl 1. 82. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie 2016, V1281.

Jacobs N, Lavall D, Kolkhof P, Böhm M, Laufs U (2016) Finerenon schützt vor fibrotischem Remodeling. 60. Jahreskongress der Saarländisch-Pfälzischen Internistengesellschaft 2016.

Lavall D, Jacobs N, Kolkhof P, Böhm M, Laufs U (2016) Finerenone inhibits mechanisms of cardiac fibrosis in vitro. Eur J Heart Fail Abstracts Supplement (2016) 18 (Supplement 1), 424. European Society of Cardiology Heart Failure Congress 2016, P1773.

7.3 Dank

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Laufs für die freundliche Überlassung meines Themas, die hilfreichen Kritiken und für die Möglichkeit, als Teil seiner wissenschaftlichen Arbeitsgruppe agieren zu können meinen herzlichsten Dank aussprechen.

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

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Daniel Lavall für die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit, die hervorragende Zusammenarbeit und seine Bereitschaft, mich jederzeit mit nutzbringenden Ratschlägen und hilfreichen Ideen zu unterstützen.

Mein herzlicher Dank gilt auch den Medizinisch-Technischen Assistentinnen Frau Simone Jäger und Frau Ellen Becker für die angenehme Zusammenarbeit im Labor, die Einarbeitung in die verschiedenen Arbeitstechniken und das ständige Bereitsein, mich bei der Durchführung meiner Experimente zu unterstützen.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei allen Ärzten, Biologen, Doktoranden und Medizinisch-Technischen Assistenten der kardiologischen Forschung des Universitätsklinikums des Saarlandes für die schöne Zeit, das angenehme Arbeitsklima und die ständige Hilfsbereitschaft.

Nicht zuletzt danke ich meiner Mama und meinem Freund Mathias, die immer für mich da waren, mir Rückhalt gegeben und mich stets motiviert haben, für die seelische Unterstützung und die große Geduld.

8 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird mein Lebenslauf in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.