

Aus dem Bereich Innere Medizin III
Klinische und Experimentelle Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
(Prof. Dr. med. Michael Böhm)

**Rolle des lysosomalen Enzyms Cathepsin A bei der Entstehung
arrhythmogener Substrate im Vorhof an einem Rattenmodell mit
ventrikulärer Ischämie und Reperfusion**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2018

vorgelegt von: Katharina Erb
geb. am 29.08.1989 in Speyer

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Zusammenfassung/Summary	4
1.1 Zusammenfassung	4
1.2 Summary	6
2. Einleitung	8
2.1 Epidemiologie des Vorhofflimmerns	8
2.2 Trigger und Substrate für Vorhofflimmern	8
2.3 Einfluss des atrialen strukturellen Remodelings auf die Entstehung von Vorhofflimmern und die atriale Kontraktilität	12
2.4 Die Serin Carboxypeptidase Cathepsin A	13
2.5 Der spezifische Cathepsin A Inhibitor SAR	15
3. Ziele der Arbeit	17
4. Material und Methoden	18
4.1 Ischämie/Reperfusion (I/R)-Modell der Ratte	18
4.2 Transgenes Cathepsin A-Mausmodell	20
4.3 Methoden	21
4.3.1 Atriales Mapping und Vorhofstimulation	21
4.3.2 RNA-Isolation	23
4.3.3 Reverse Transkription	24
4.3.4 Real-Time-Polymerasekettenreaktion	25
4.3.5 Immunfärbung für Cathepsin A	28
4.3.6 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	30
4.3.7 Sirius Red Färbung	31
4.3.8 TUNEL-Färbung	32
5. Ergebnisse	34
5.1 I/R-Rattenmodell	34
5.2 Atriale Cathepsin A-Expression bei I/R-Ratten	34
5.3 Atriales strukturelles Remodeling bei I/R-Ratten	35
5.3.1 Linksatriale Fibrose	36
5.3.2 Atriale kardiomyozytäre Hypertrophie	40
5.4 Lateralisierung des Connexins 43	42
5.5 Elektrophysiologische Studien bei I/R-Ratten	43

5.6	Cathepsin A Überexpression beim transgenen Mausmodell	45
5.7	Atriales strukturelles Remodeling bei CatA-transgenen Mäusen	47
5.7.1	Atriale Fibrose	47
5.7.2	Atriale Hypertrophie	49
5.8	Atriale Apoptose	54
5.9	Induzierbare Vorhofflimmerdauer	55
6.	Diskussion	57
6.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	57
6.2	Atriales Remodeling	57
6.3	Atriales kontraktiles Remodeling bei I/R-Ratten	60
6.4	Regulation von Cathepsin A im Vorhof	61
6.5	Mögliche Mechanismen	62
6.6	Schlussfolgerung	63
6.7	Klinische Relevanz	63
7.	Literaturverzeichnis	65
8.	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	71
9.	Präsentationen/ Abstracts/ Publikation	74
10.	Danksagung	76
11.	Erklärung	79

1. Zusammenfassung/Summary

1.1 Zusammenfassung

Einleitung: Die Herzinsuffizienz ist mit der Entstehung arrhythmogener Substrate im Vorhof assoziiert. Die lysosomale Carboxypeptidase Cathepsin A (CatA) ist an Remodelingprozessen der extrazellulären Matrix beteiligt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss eines CatA-Inhibitors (SAR) mit dem eines Hemmers des Angiotensin-Converting Enzyms (ACE) auf die Entstehung arrhythmogener Substrate im Vorhof in einem Rattenmodell mit Herzinsuffizienz untersucht werden.

Methoden: In männlichen Wistar Ratten wurde durch eine 30-minütige Ligatur der linksanterioren deszendierenden (LAD) Koronararterie gefolgt von einer 3-monatigen Reperfusion (I/R) arrhythmogene strukturelle und kontraktile Veränderungen im Vorhof induziert. Während der 3-monatigen Reperfusionsphase wurden Ratten mit dem CatA-Inhibitor SAR (30 mg/kg/Tag, n=12) oder mit dem ACE-Inhibitor Ramipril (1 mg/kg/Tag, n=12) therapiert. 9 Sham-operierte und 13 Plazebo-therapierte I/R-Ratten dienten als Kontrollen. Nach 3 Monaten Reperfusion wurde die linksatriale (LA) Entleerungsfunktion mittels Magnet Resonanz Tomographie (MRT) und die LA Elektrophysiologie mittels einer elektrophysiologischen Studie untersucht, bevor die Herzen für weitere histologische und biochemische Analysen fixiert wurden.

Ergebnisse: Nach drei monatiger Reperfusion zeigte sich im linken Ventrikel der I/R-Ratten eine verminderte linksventrikuläre (LV) Ejektionsfraktion, ein erhöhter LV enddiastolischer Druck, längere induzierbare Vorhofflimmerepisoden und eine reduzierte atriale Entleerungsfunktion. Die LA CatA Genexpression (2.1 ± 0.3 vs. 1.3 ± 0.3 , $p=0.009$) und die ACE Plasma Aktivität waren erhöht in I/R-Ratten verglichen mit den Sham-operierten Ratten. SAR und Ramipril konnten bessere LA Entleerungsfunktion erhalten ($47 \pm 2\%$ und $46 \pm 3\%$ jeweils gegen $37 \pm 3\%$ in Plazebo-therapierten I/R-Ratten, $p=0.008$), die Verlängerung der induzierbaren Vorhofflimmerepisoden (1.4 ± 0.4 s und 4.3 ± 1.7 s jeweils gegen 32.6 ± 19.0 s in Plazebo-therapierten I/R-Ratten, $p=0.02$) und die Verlängerung der totalen atrialen Aktivierungszeit (11.9 ± 0.6 ms; 12.9 ± 0.3 ms jeweils gegen 15.2 ± 1.7 ms in Plazebo-therapierten I/R-Ratten, $p=0.007$). Der linksatriale Fibrosegehalt wurde durch SAR

signifikant und durch Ramipril nur tendenziell reduziert ($41\pm 2\%$ in Plazebo-therapierten I/R-Ratten; SAR: $34\pm 1\%$ ($p=0.009$ vs. Plazebo, Ramipril: $37.5\pm 1.4\%$ $p>0.05$ vs. Plazebo), die Kollagen 1a Genexpression (SAR: 9.05 ± 1.3 ; Ramipril: 9.7 ± 2.5 vs. 14.6 ± 2.0 in Plazebo-therapierten I/R-Ratten, $p=0.03$) und die Lateralisierung des Connexins 43 bei I/R-Ratten. Eine Kardiomyozyten-spezifische CatA-Überexpression in einem transgenen Mausmodell war mit einer erhöhten atrialen Fibrosebildung, Hypertrophie und einer Verlängerung der induzierbaren Vorhofflimmerepisoden im linken Vorhof vergesellschaftet.

Fazit: CatA ist an der Entstehung arrhythmogener Substrate im Vorhof beteiligt. Die pharmakologische Inhibition von CatA durch SAR reduzierte die Auslösbarkeit von Vorhofflimmern und die Verschlechterung der LA-Entleerungsfunktion bei I/R-Ratten vergleichbar zu Ramipril. Die atriale Fibrosebildung wird hauptsächlich durch SAR und nicht durch Ramipril beeinflusst.

Introduction: Congestive heart failure (CHF) is associated with the development of an arrhythmogenic substrate in the atria. The lysosomal carboxypeptidase Cathepsin A (CatA) has been shown to be involved in remodeling processes of the extracellular matrix. We investigated the effect of the novel inhibitor of CatA (SAR) in comparison to the inhibitor of the angiotensin converting enzyme (ACE) ramipril on susceptibility to atrial fibrillation (AF) and left atrial (LA) emptying function.

Method: In male Wistar rats, we investigated the effect of chronic treatment with SAR (30 mg/kg/d, n=12) and ramipril (1 mg/kg/d, n=12) for 3 months on atrial electrophysiology and the development of an atrial arrhythmogenic structural and contractile substrate during CHF induced by 30min of myocardial ischemia followed by reperfusion (I/R). 9 sham-operated and 13 placebo-treated I/R-rats served as a control. LA-emptying function (magnetic resonance imaging) and atrial electrophysiological parameters were measured before the hearts were harvested for histological and biochemical analysis. In transgenic mice, the effect of CatA overexpression on atrial remodeling was investigated.

Results: Three months after surgery I/R-rats showed increased left ventricular (LV) enddiastolic pressure, dilated LA, longer inducible AT-durations and reduced atrial contractile function. LA CatA gene-expression (2.1 ± 0.3 vs. 1.3 ± 0.3 ; $p = 0.009$) as well as ACE-plasma activity were increased in I/R-rats compared to sham operated rats. CatA inhibition by SAR and ACE-inhibition by ramipril attenuated the effect of I/R on LA total percent emptying ($47 \pm 2\%$ and $46 \pm 3\%$, respectively, vs. $37 \pm 3\%$ in I/R, $p = 0.008$), susceptibility to AF (1.4 ± 0.4 s and 4.3 ± 1.7 s, respectively, vs. 32.6 ± 8.2 s in I/R, $p = 0.02$) and total atrial activation time (11.9 ± 0.6 ms; 12.9 ± 0.3 ms, respectively vs. 15.2 ± 1.7 ms in placebo, $p < 0.007$). SAR and Ramipril treatment reduced the amount of total atrial fibrosis which SAR reduced significantly (SAR: $34 \pm 1\%$, Ramipril: $37.5 \pm 1.4\%$ vs. $41 \pm 2\%$ in placebo treated I/R-rats, $p = 0.009$), collagen1a mRNA expression (SAR: 9.05 ± 1.3 ; Ramipril: 9.7 ± 2.5 vs. 14.6 ± 2.0 in placebo treated I/R-rats, $p = 0.03$) and connexin 43 lateralization in I/R-rats. Transgenic mice overexpressing CatA demonstrated enhanced atrial fibrosis formation and increased AF-susceptibility.

Conclusion: SAR attenuates the development of an atrial arrhythmogenic substrate and preserves LA-emptying function parameters in I/R-rats comparable to ramipril. Atrial fibrosis formation can mostly be affected by SAR and not by ramipril.

2. Einleitung

2.1 Epidemiologie des Vorhofflimmerns

In den westlichen Industrienationen sind 1% der Gesamtbevölkerung und 5-10% der über 60-jährigen von Vorhofflimmern betroffen, in Deutschland sind das etwa 80.000 Männer und Frauen.^{1,2} Verschiedene Studien zeigten eine starke Altersabhängigkeit. Ab dem 50. Lebensjahr verdoppelt sich die Prävalenz mit jeder Altersdekade. Jenseits des 40. Lebensjahres beträgt die Inzidenz 0,1-2,3%, bei über 70-jährigen 3-6% und bei über 90-jährigen schon ungefähr 15%. Männer sind generell geringfügig häufiger betroffen als Frauen.³ Verschiedene Faktoren wie Hypertonus, Herzinsuffizienz und Schlafapnoe sind bei der Entstehung von Vorhofflimmern beteiligt.

Die Mortalität und Morbidität ist bei Vorhofflimmerpatienten erhöht.⁴ Vorhofflimmern ist mit einem erhöhten Auftreten von Schlaganfällen vergesellschaftet. Es lassen sich etwa 20-25% aller Schlaganfälle auf den Verlust der Vorhofkontraktilität und die damit verbundene Neigung zur Thrombenbildung bei Vorhofflimmern zurückführen.^{5,6} Nicht frequenzkontrolliertes Vorhofflimmern, das heißt Vorhofflimmern mit schneller Kammerfrequenz, kann die Progression von Herzinsuffizienz durch eine „Tachykardiomyopathie“ begünstigen.⁷

2.2 Trigger und Substrate für Vorhofflimmern

Die Mechanismen des Vorhofflimmerns beinhalten sowohl einen Auslöser (Trigger) als auch ein Substrat zur Stabilisierung des Vorhofflimmerns. Die wichtigsten „Trigger“ stellen atriale Extrasystolen dar, die zumeist im Bereich der Pulmonalvenen entstehen. Diese spontanen fokalen elektrischen Entladungen können, wenn sie frühzeitig während der relativen Refraktärzeit eintreffen, Vorhofflimmerepisoden auslösen.⁸

Das arrhythmogene „Substrat“ ist entscheidend bei der Aufrechterhaltung und Stabilisierung von Vorhofflimmern beteiligt und basiert auf strukturellen und elektrophysiologischen Umbauprozessen des Vorhofmyokards (sog. atriales Remodeling). Das strukturelle Remodeling ist durch eine Vermehrung der extrazellulären Matrix als auch durch eine Größenzunahme (Hypertrophie) der atrialen Kardiomyozyten charakterisiert. Zusätzlich kommt es zu einer Umverteilung der Connexine. Connexine sind Transmembranproteine, die den Austausch von Molekülen zwischen Zellen gestatten. Bei diesen atrialen Umbauprozessen spielen Faktoren wie Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, inflammatorische Prozesse und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies eine entscheidende Rolle.^{9,10} Diese strukturellen atrialen Veränderungen führen zu einer zunehmenden Inhomogenität der Erregungsleitung im Vorhofmyokard.^{11,12,13}

Zusätzlich führt Vorhofflimmern selbst zu elektrophysiologischen Veränderungen, die insbesondere durch eine Verkürzung des Aktionspotentials und somit durch die Verkürzung der atrialen Refraktärzeit charakterisiert sind (elektrisches Remodeling) (siehe **Abb.1**). Erstmals wurde dieses Phänomen in einem Ziegenmodell beschrieben. Über einen implantierten Schrittmacher im Vorhof wurde dieser hochfrequent stimuliert, und so Vorhofflimmern ausgelöst und aufrechterhalten. Wurde die hochfrequente Stimulation unterbrochen, stellte sich anfangs sofort der Sinusrhythmus wieder ein. Eine kurze erneute hochfrequente Stimulation (kurzes Burst-Pacing) konnte allenfalls kurz anhaltendes Vorhofflimmern auslösen (wenige Sekunden). Je länger der Vorhof hochfrequent vorstimuliert wurde, umso länger waren die Vorhofflimmer-Paroxysmen, die durch eine identische Stimulation (kurzes Burst-Pacing) ausgelöst wurden. Diese Beobachtung wurde sehr eindrücklich als „AF begets AF“ (Vorhofflimmern erzeugt Vorhofflimmern) bezeichnet.¹⁴ Auch in einem Hundemodell konnte durch eine Vorhofstimulation von 6h und somit ausgelöstem Vorhofflimmern, ebenfalls die Bildung von elektrischem Remodeling beobachtet werden.¹⁵ In einem Rattenmodell führen bereits kürzere Vorhofstimulationen im Minutenbereich zu einem elektrischem Remodeling.¹⁶

Während die elektrophysiologischen Veränderungen (elektrisches Remodeling) innerhalb von Stunden bis wenigen Tagen stattfindet,¹⁴ benötigen strukturelle

Veränderungen (strukturelles Remodeling) eine Zeitspanne von Wochen bis Monaten.¹⁷

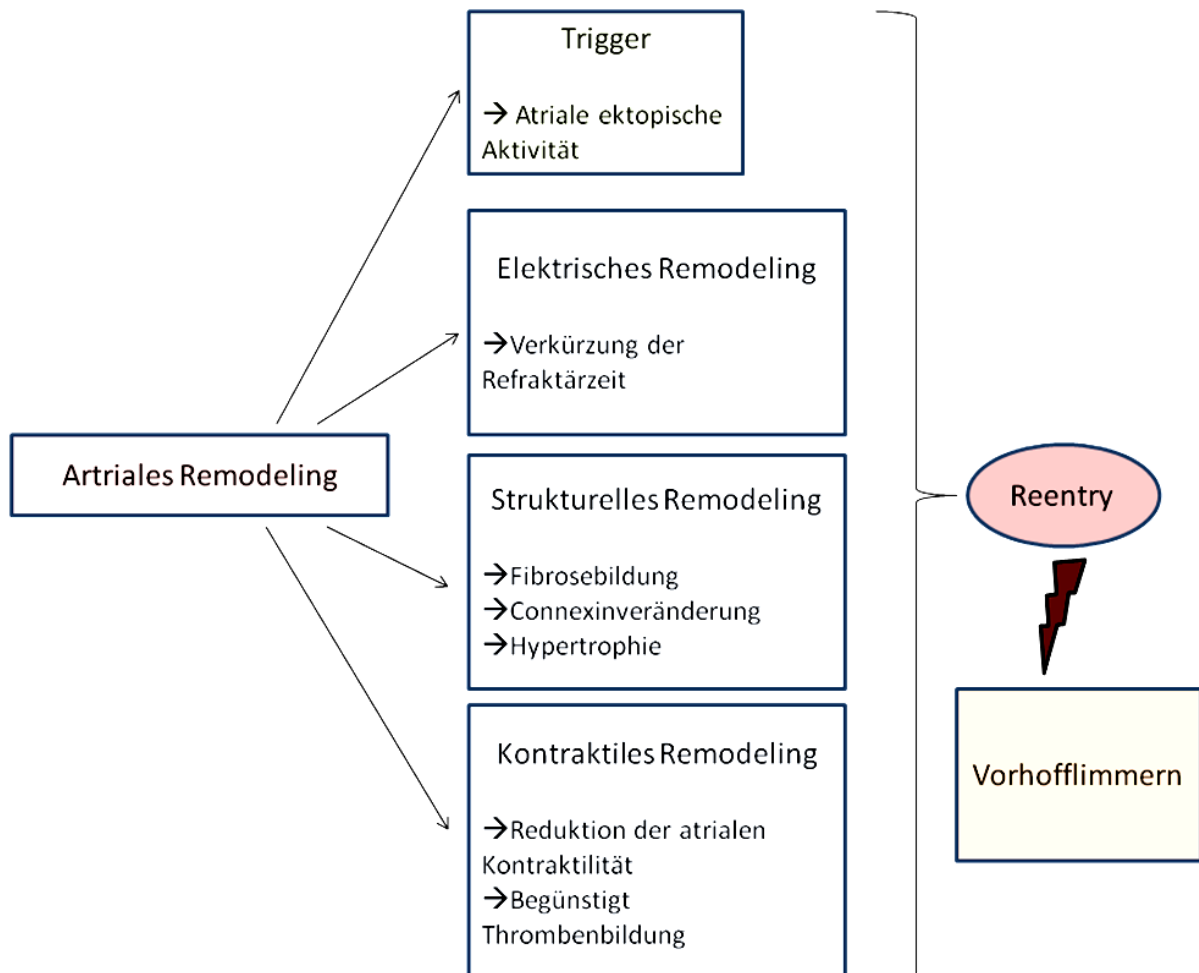


Abb. 1: Auslösende Faktoren für Vorhofflimmern.

In der klassischen Theorie zur Erklärung des Vorhofflimmerns wird Vorhofflimmern durch das Vorhandensein multipler kreisender Erregungen (Reentries) aufrechterhalten. Hierzu muss es den Erregungsfronten gewährleistet werden, immer ein Gebiet zu erreichen, welches nicht refraktär ist (refraktär = unempfindlich, nicht erregbar). Abhängig von der Größe des Reentry-Kreises, der Refraktärzeit der beteiligten Strukturen des Myokards und der Leitungsgeschwindigkeit sind bestimmte Areale entweder absolut refraktär, relativ refraktär oder wieder erregbar. Letzteres wird als erregbare Lücke bezeichnet.¹⁸

Eine kurze Refraktärzeit führt bei Reduzierung der Fortleitungsgeschwindigkeit zu einer Verkürzung der Wellenlänge (Produkt aus Refraktärzeit und Fortleitungszeit)

und somit zu einer Vergrößerung der erregbaren Lücke. Somit kann die Entstehung und Aufrechterhaltung von kreisenden Erregungen und folglich Vorhofflimmern begünstigt werden.^{6,19}

Substrate für Vorhofflimmern sind durch mehrere Komponenten charakterisiert. Dazu gehören die Bildung von kardialer Fibrose, Veränderungen der Connexine und die myokardiale Hypertrophie. Fibrose kann in reparierende/ersetzende Fibrose (nach dem Zelltod) und reaktive/interstitielle/endomysiale Fibrose (ohne vorherigen Zelltod) unterteilt werden.²⁰ Die endomysiale Fibrose führt zu einer transversalen Separation der Myozytenbündel, besonders an der Außenseite des Vorhofs, was zu einem Verlust der Kontinuität der epikardialen Schicht und dadurch zu einem Verlust der transversalen Leitfähigkeit führt.²¹ Die endomysiale Fibrose kann durch z.B. atriale Dehnung, welche die dünnen epikardialen Schichten mehr beeinflussen als das darunterliegende Netzwerk aus Trabekeln, induziert werden.²² In einem Tierversuch wurde demonstriert, dass der Übergang von persistierenden Vorhofflimmern in permanente Vorhoffarrhythmien histologisch durch eine Zunahme der endomysialen Fibrose charakterisiert ist.²¹ In einem Maus-Herzinsuffizienzmodell wurden atriale Fibroblasten signifikant schneller zur Proliferation aktiviert als die Fibroblasten des Ventrikels. Dies erklärt, warum die Bildung von interstitieller Fibrose im Vorhof schneller und massiver abläuft. Des Weiteren wurde gezeigt, dass atriale Fibroblasten stärker auf den Wachstumsfaktor Angiotensin II reagieren als ventrikuläre Fibroblasten.²³ Patienten mit Vorhofflimmern zeigen einen erhöhten Fibrosegehalt im Vorhof.²⁴ Ein erhöhter atrialer Fibrosegehalt und eine zunehmende Kollagenakkumulation führen zu einer Einschränkung der Pumpfunktion und zu einer zunehmenden Inhomogenität der lokalen elektrischen Erregungsleitung, die bei der Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern eine wichtige Rolle spielen kann.^{25,26}

Neben der atrialen Fibrose hat auch eine Zunahme des Kardiomyozytendurchmessers einen Einfluss auf die Leitungsfähigkeit des Vorhofes. Die Hypertrophie der Kardiomyozyten führen zu einer Anisotropie der Erregungsleitung und diese Fortleitungsstörungen können bei der Stabilisierung von Vorhofflimmern beteiligt sein.²⁷

Weitere wichtige Bausteine der kardiomyozytären Zellmembran sind die Connexine, welche zur Familie der Transmembranproteine gehören. Je sechs Connexine lagern sich in der Membran zu einem Connexon zusammen, das eine Pore umschließt. Jeweils zwei Connexone zweier benachbarter Zell-Membranen bilden einen Gap Junction-Kanal. Gap-Junction-Kanäle ermöglichen eine direkte Kommunikation zwischen benachbarten Zellen.²⁸ In Herzmuskelzellen von Säugetieren wurden bisher drei Connexin-Proteine nachgewiesen: Cx40, Cx43 und Cx45. Für das Arbeitsmyokard des Ventrikels ist Cx43 typisch. Im Vorhofmyokard und im Erregungsleitungssystem ist Cx40 charakteristisch. Cx45 bildet eine funktionell leitungsverzögernde Grenzschrift zwischen Erregungsleitungssystem und umgebender Muskulatur. Im gesunden Herzen befinden sich die Connexine jeweils im Bereich der polaren Zellmembran. Verschiedene myokardiale Schädigungen wie Volumen-/ Druckbelastung oder Ischämie können zu einer Connexin-Defizienz an der polaren Zellmembran und zu einer vermehrten Expression von Connexinen im Bereich der lateralen Zellmembran führen.¹¹ Unklar ist jedoch, wie genau die Zelle die Lokalisation für neue Kanäle bestimmt. Eine Lateralisierung und/oder reduzierte polare Expression von Cx43 in Gap-Junctions wurde bei Patienten mit Hypertonus, Vorhofflimmern und Klappenfehlern beschrieben.²⁹ Dieses Remodeling der Connexine ist sowohl beim Mensch als auch im Tiermodell mit Vorhofflimmern assoziiert.²⁹

2.3 Einfluss des atrialen strukturellen Remodelings auf die Entstehung von Vorhofflimmern und die atriale Kontraktilität

Die extrazelluläre Matrix (EZM) umfasst alle Gewebsstrukturen im Interzellularraum. Sie besteht vornehmlich aus Strukturproteinen und den Kollagenen und bildet ein dreidimensionales Netzwerk, welches die myokardialen Zellen umgibt.^{30,31} Zum einen gewährleistet sie eine Stützfunktion, und zum anderen stellt sie ein Reservoir an Makromolekülen wie z.B. das prohypertrophe wirkende Hormon Angiotensin II (AngII), den Vasokonstriktor Endothelin-1 sowie verschiedene Wachstumsfaktoren und Signalmoleküle dar, die die Synthese und Degradation der EZM beeinflussen.^{32,33} Durch anhaltende mechanische oder neurohumorale Stimuli erfolgt

der Umbau der EZM durch die Zunahme der Kollagensynthese und die Aktivierung der Fibroblastenproliferation. Dieser Prozess wird durch AngII verstärkt.³⁴ AngII fördert die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).³⁵ ROS sind hochreaktive Sauerstoffradikale von kurzer Halbwertszeit, die physiologisch bei der Zellatmung und bei zellulärem Stress (z.B. bei erhöhter Herzarbeit) entstehen. In gesunden Zellen werden ROS durch verschiedene antioxidative Scavengersysteme abgepuffert.³⁶ ROS-induzierte Oxidation und Zellschädigung führt zu Apoptose und Nekrose von Myozyten.³⁷ In-vitro Versuche zeigten, dass ein erhöhter oxidativer Stress die Bildung des profibrotischem Transforming Growth Factor β (TGF β) in kardialen Fibroblasten erhöht. TGF β induziert die Kollagensynthese und stimuliert die Myofibroblasten-Differenzierung.¹⁰ Strukturelles Remodeling im atrialen Myokard, insbesondere die Fibrosebildung, ist ein weiterer wichtiger Faktor, der verantwortlich ist für die gestörte Organisation der Gap Junction-Kanäle.²²

2.4 Die Serin Carboxypeptidase Cathepsin A

In den letzten 10 Jahren sind Cathepsine und ihrer Rolle bei der pathophysiologischen Entstehung der Herzinsuffizienz in den Fokus des Interesses getreten. Die Familie der Cathepsine lässt sich in drei Gruppen einteilen, die große Gruppe der Cystein-Cathepsine und die kleineren Gruppen der Aspartyl- und der Serin-Cathepsine.³⁸ Als Ursache verschiedener Kardiomyopathien wurde bereits ein Defekt verschiedener lysosomaler Cystein-Proteasen und eine veränderte Aktivität dieser Enzyme identifiziert.^{39,40} Über die Gruppe der Serin-Cathepsine, zu der Cathepsin A (CatA) gehört, und über ihre Rolle bei der Entstehung einer kardialen Remodelings ist weniger bekannt. CatA ist eine Carboxypeptidase und ist Teil eines lysosomalen Multiproteinkomplexes. Intrazellulär steuert das CatA-Protein strukturell die Kompartimentierung, die Rekrutierung und Entleerung der Lysosomen an der Plasmamembran. Eine verminderte Expression des CatA-Proteins äußert sich in einer lysosomalen Speichererkrankung (Galaktosialidose). Experimente in-vivo zeigten, dass CatA-Knockout Mäuse nicht lebensfähig sind und bereits kurz nach der Geburt sterben.⁴² Im Vergleich dazu führte eine Mutation von CatA, die die katalytische Funktion des Enzyms reduziert ohne die Struktur des Proteins zu beeinflussen, nicht zu dem typischen Phänotyp der Galaktosialidose.⁴¹

Neben seiner strukturellen Funktion in den Lysosomen ist CatA auch im extrazellulären Raum lokalisiert. Die proteolytische Aktivität von CatA reguliert die Degradation von verschiedenen extrazellulären Peptiden.^{43,44}

In vitro Experimente zeigten, dass CatA die Synthese von AngII aus AngI katalysieren kann.⁴⁷ AngII trägt maßgeblich zur Bildung interstitieller Fibrose bei und spielt eine wichtige Rolle beim EZM Remodeling.^{45,46} Neben einer möglichen Beteiligung an der lokalen Produktion von AngII scheint CatA auch an der Spaltung von Bradykinin beteiligt zu sein. Bradykinin wirkt über ein lokales Kallikrein-Kinin System direkt am Herzen und vermittelt dort anti-inflammatorische, anti-fibrotische und anti-hypertrophe Effekte.^{48,49,50} Eine erste Studie konnte zeigen, dass eine pharmakologische Inhibierung der CatA Aktivität zu einer Erhöhung von Bradykinin in der Niere führte und so eine Salz-induzierte Hypertonie verhindern werden konnte.⁴¹ Die lokale AngII Synthese und die Spaltung von Bradykinin stellen zwei mögliche prohypertrophe und profibrotische Mechanismen dar, welche zum kardialen Remodeling beitragen können (siehe **Abb. 2**).

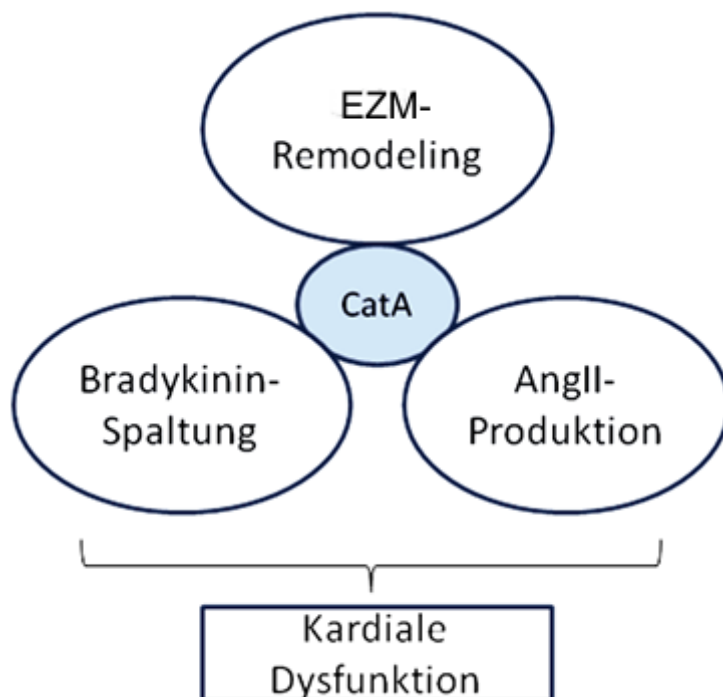


Abb. 2: Cathepsin A als Regulator verschiedener Remodeling Prozesse.

2.5 Der spezifische Cathepsin A Inhibitor SAR

Die spezifische Inhibition der Aktivität eines Enzyms stellt eine gute Methode dar, um dessen physiologischen und pathophysiologischen Aufgabe genauer zu untersuchen.

Sanofi (Frankfurt Höchst, Deutschland) synthetisierte in den letzten Jahren einige CatA-Inhibitoren. Ein Hochdurchsatz-Screening der synthetisierten Substanzen erbrachte mehrere Trefferserien mit mikromolaren Zielaffinitäten. Röntgenanalysen und Andockungsstudien identifizierten den CatA-Inhibitor (C₂₁H₁₉FN₃NaO₄) mit einer Zielaffinität von 5nM, der im Folgenden „SAR“ (stehend für „Sanofi Aventis Research“) genannt wird (siehe **Abb. 3**). Eine genauere Beschreibung der Substanz, der genauen Pharmakodynamik und Pharmakokinetik wurde bereits in einer umfangreichen Publikation veröffentlicht.⁵¹

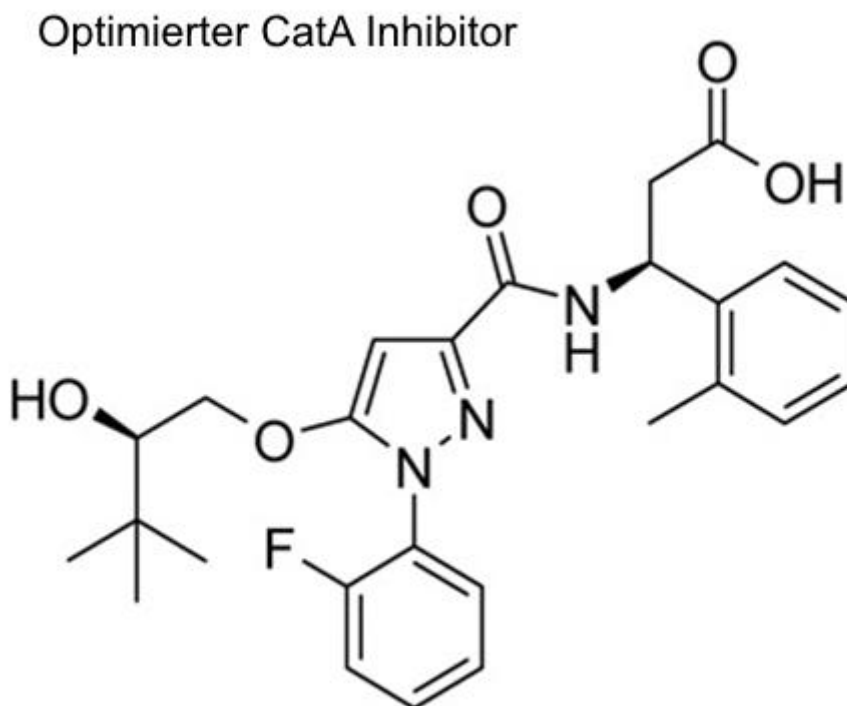


Abb. 3: Struktur des optimierten CatA-Inhibitors (C₂₁H₁₉FN₃NaO₄) SAR (Sanofi Research).⁵¹

In einem Modell mit ApoE-Knockout Mäusen, in welchem die linksventrikuläre Hypertrophie durch eine Angiotensin II Infusion induziert wurde, verbesserte die

Gabe von SAR die linkskardiale Funktion und verhinderte die linksventrikuläre Hypertrophie. Es wurde kein Effekt auf den Blutdruck beobachtet.^{41,48}

2. Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es die Rolle von CatA auf die Entstehung arrhythmogener Substrate im Vorhof zu untersuchen.

Hierzu wurden zwei Ansätze gewählt:

1. Welche Auswirkung hat eine pharmakologische CatA-Inhibition auf die Entstehung struktureller und arrhythmogener Substrate im Vorhof an einem Rattenmodell mit ventrikulärer Ischämie/Reperfusion (I/R)?

In einem chronischen I/R-Modell, einem Modell für die chronische Volumenbelastung des Vorhofs (Kooperation mit Thorsten Sadowski (Frankfurt)), sollte der Einfluss einer gezielten pharmakologischen Inhibition von CatA auf die Entstehung eines arrhythmogenen und strukturellen Remodelings des Vorhofs charakterisiert werden. Die atriale Fibrose-Bildung, Lateralisierung der Connexine und die Entstehung einer Hypertrophie der Myozyten wurden immunohistochemisch quantifiziert und die Ergebnisse mittels Real-Time PCR untermauert. Die Induzierbarkeit von Vorhofflimmern wurde im Rahmen einer elektrophysiologischen Studie bestimmt.

2. Führt eine erhöhte CatA Expression im Herzen zu einem atrialen Remodeling?

Dieser Aspekt meiner Arbeit sollte in einem transgenen Maus-Modell untersucht werden. In Mäusen wurde das humane CatA-Gen Kardiomyozyten-spezifisch überexprimiert. Neben einer histologischen und biochemischen Charakterisierung des atrialen Remodelingprozesses wurde die Induzierbarkeit von Vorhofflimmern im Rahmen einer elektrophysiologischen Studie untersucht.

Die Aufklärung der Funktion von CatA innerhalb des atrialen Umbauprozesses könnte dazu beitragen die Therapie von Vorhofflimmern in Zukunft zu verbessern.

4. Material und Methoden

4.1 Das Ischämie/Reperfusion (I/R)–Modell der Ratte

Mit Hilfe des I/R-Tiermodells an der Ratte können die pathophysiologischen Auswirkungen einer chronisch atrialen Volumenbelastung aufgrund einer eingeschränkten linksventrikulären Pumpleistung nach ventrikulärer I/R auf die Entstehung eines strukturellen atrialen Remodelings des Vorhofes nachgestellt werden. Daher eignet sich dieses Modell auch dazu, die Auswirkungen verschiedener pharmakologischer Substanzen auf das atriale Remodeling und die Entstehung arrhythmogener Substrate zu untersuchen.

Die Operation der Tiere und die Haltung erfolgte in Frankfurt (Kooperation mit Thorsten Sadowski; Sanofi, Frankfurt). Auf eine 30-minütige Ligatur der linken anterioren deszendierenden Koronararterie (LAD), welche einen Myokardinfarkt induzierte, folgte eine 3-monatige Reperfusion durch erneutes Öffnen der verschlossenen LAD. Nach diesen 3 Monaten wurde die kardiale Funktion mittels Magnet Resonanz Tomographie (MRT) analysiert. Das Vorhandensein einer reduzierten systolischen linksventrikulären Funktion wurde bereits von der Frankfurter Arbeitsgruppe bestimmt (siehe Tabelle 1). Neben einer verminderten Ejektionsfraktion (EF), wiesen I/R Plazebo-Ratten einen erhöhten linksventrikulären enddiastolischen Druck (LVedP), und einen erhöhten Brain natriuretisches Peptid (BNP) Serum-Gehalt auf. Im Vorfeld konnte bereits gezeigt werden, dass 3 Monate Reperfusion nach einer 30-minütigen Ischämie zu einer signifikanten Heraufregulation der ACE-Aktivität im Plasma führte (Sham: 92.0 ± 3.4 vs. LAD-Ligatur: 145.2 ± 5.1 units/l; $p=0.008$). Basierend auf dieser Beobachtung wurde folgendes Versuchsprotokoll erarbeitet: Zu Versuchsbeginn wurden die Tiere in 4 Gruppen eingeteilt. In der Sham-Gruppe ($n=10$) wurde der Thorax der Tiere eröffnet, jedoch erfolgte keine LAD Ligatur (Sham-OP). In der Placebo-Gruppe ($n=15$) wurde durch Ligation ein Verschluss der LAD durchgeführt, die Tiere erhielten nur das Lösungsmittel (Vehikel), jedoch keine Medikation. Die Ramipril-Gruppe erhielt nach der LAD Ligatur den ACE-Hemmer Ramipril ($n=15$, 1 mg/kg Körpergewicht). Eine weitere Gruppe wurde nach der LAD Ligatur mit dem CatA-Inhibitor SAR ($n=15$, 30

mg/kg Körpergewicht) behandelt. Die jeweilige Dosierung der Medikation basiert auf Vorversuchen von Sanofi, die unter der jeweiligen Dosierung eine komplette Inhibition des CatA- bzw. ACE-Aktivität zeigte. Die Therapie mit dem CatA-Inhibitor SAR oder dem ACE-Blocker Ramipril führte zu einer Verbesserung der links ventrikulären Auswurf Funktion (EF) und zu einer signifikanten Senkung des BNP-Serum Spiegels.

Außerdem wurde mittels MRT die linksatriale Entleerungsfunktion während eines kardialen Zyklus bestimmt. Die totale und aktive Entleerung des Vorhofs war in Plazebo-therapierten Tier reduziert und konnte durch die Behandlung mit SAR bzw. Ramipril um etwa 15% verbessert werden (Tabelle 1). Im Rahmen einer elektrophysiologischen Untersuchung wurde in diesen Tieren 3 Monate nach der I/R-Operation durchgeführt, um die arrhythmogenen Substrate zu charakterisieren. Das Vorhofgewebe der Tiere wurde im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit biochemisch und histologisch charakterisiert.

Tabelle 1: Ventrikuläre und atriale Funktion. Diese Daten wurden im Vorfeld von der Arbeitsgruppe Sadowski bei Sanofi erhoben.

	Sham	Plazebo	Ramipril	CatA-Inhibitor SAR
Linksventrikuläre Funktion				
EF [%]	60.6±1.7	42.6±2.1 [#]	45.5±3.9	49.4±5.4
LVEDP [mmHg]	3.4±0.3	10.2±2.6 [#]	6.9±1.3	5.0±0.5 [§]
Serum-BNP [pg/ml]	105.0±5.0	188.0±13.0 [*]	103.0±6.3 [¥]	80.0±4.8 [§]
MRT-Daten zur links-atrialen Entleerungsfunktion				
Totale Entleerung [%]	50.0±2.0	37.0±3.0 [*]	46.0±3.0 [¥]	47.0±2.0 [§]
Aktive Entleerung [%]	37.0±4.0	26.0±4.0 [*]	33.0±3.0 [¥]	34.0±2.0 [§]
# p<0.05 Sham vs. Plazebo; § p<0.05 Plazebo vs. SAR; * p<0.01 Sham vs. Plazebo \$ p<0.05 Plazebo vs. SAR; ¥ p<0.01 Plazebo vs. Ramipril				
EF = Ejektions Fraktion; LVEDP = Linksventrikulärer Enddiastolischer Druck; BNP = brain natriuretic Peptide				

4.2 Das transgene Cathepsin A-Mausmodell

Um die Auswirkung einer erhöhten CatA Expression auf das atriale Remodeling genauer zu untersuchen, wurden Versuche in einem transgenen Mausmodell durchgeführt. In diesen Mäusen wurde das Gen, welches für das humane Cathepsin A kodiert, Kardiomyozyten-spezifisch überexprimiert. Dazu wurde das humane CatA Minigen (cDNA clone ID: CLN16325899) in einen Vektor inkloniert, dem ein Maus alpha-MHC Promotor vorgeschaltet war und in C57BL6 Mausembryonen injiziert. Gleichaltrige C57BL6-Wildtyp Tiere (WT) dienten als Kontrollgruppe. Die Mäuse wurden im Labor von Thorsten Sadowski (Sanofi Aventis, Frankfurt) hergestellt und uns freundlicherweise zur weiteren histologischen und biochemischen Charakterisierung zur Verfügung gestellt.

4.3 Methoden

4.3.1 Atriales Mapping und Vorhofstimulation

Elektrophysiologische Studie: Alle Messungen wurden unter Vollnarkose (intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (100 mg/kg i.p.)), 13 Wochen nach der I/R-Operation durchgeführt. Das Oberflächen EKG (Ableitung II) wurde über subkutane Nadeln abgeleitet.

Der Thorax wurde oberhalb des Scaphoids eröffnet und die Rippen V-förmig aufgeschnitten. Um die atriale Erregung zu analysieren wurde eine individuell gefertigte Mapping Elektrode mit 4x5 unipolaren Elektroden (1mm Distanz zwischen den einzelnen Elektroden) auf die freie Wand des linken Vorhofes mit einem geringen Druck gehalten. Eine Silberplatte im Thorax diente als Referenzelektrode. Unipolare atriale Signale wurden über einen individuell gefertigten Mapping Verstärker aufgenommen (gefilterte Bandweite: 0.1-408 Hz, Abtastrate: 1kHz, analoge-digitale Umsetzung: 16 bits). Durch eine Stimulationselektrode (Tip Elektrode) wurde nach Bestimmung der atriale Stimulationsschwelle eine unipolare Stimulation des rechten Atriums mit einer Pulsdauer von 1ms und einer zweifachen diastolischen Reizschwelle bei einer Stimulationszykluslänge von 150ms vorgenommen. Aufzeichnungen von 5 aufeinanderfolgenden Vorhoferregungen wurden analysiert und die lokale Aktivierungszeit durch Markierung der lokalen Erregungszeiten anhand der unipolaren Elektrogramme identifiziert (siehe **Abb. 4 A**).

Für die Analyse wurde ein individuell angefertigtes Computerprogramm (basierend auf Matlab) genutzt. Die effektive Leitungsgeschwindigkeit wurde bei jedem Aktivierungszeitpunkt und allen benachbarten Aktivierungszeiten in einem Zeitfenster von 8ms bestimmt (>12ms für Elektrodenpaare, maximal von 3x3 Elektroden). Das Feld zeigte lokale Richtungen (Orientierung des Feldes) und Geschwindigkeit (reziproker Wert der Steilheit der Fläche) für jeden lokalen Aktivierungspunkt.

Die lokale Aktivierungszeitdifferenz wurde zwischen zwei benachbarten Elektroden berechnet (Leitungsgeschwindigkeit). Leitungsgeschwindigkeiten von >0,2ms galten als verlängert (lokale Fortleitungsstörung).⁵⁷ Die totale atriale Aktivierungszeit war

definiert als die Zeitdifferenz zwischen der rechten atrialen Aktivierungszeit, visualisiert durch einen multiplen Aktionspotential (MAP-) Katheter (Franz Elektrode) und der letzten links atrialen Aktivierungszeit aufgenommen durch die Mapping Elektrode während der Vorhofstimulation (Stimulationszykluslänge: 150ms). Die atriale effektive Refraktärzeit (AERP) wurde bei einer Zykluslänge von 150ms an der freien Wand des linken Vorhofs gemessen. Die atriale Antwort wurde visualisiert durch den MAP-Katheter neben der Stimulationselektrode. Der Mittelwert von 3 AERP Messungen wurde zur Analyse genutzt. Die Induzierbarkeit von Vorhofflimmern durch Burststimulationen für 1 Sekunde (Zykluslänge: 10ms) wurde untersucht. Zwischen den Burststimulationen wurde eine Pause von mindestens 30s eingehalten. Schnelle Vorhofaktivierungen mit einer Zykluslänge <70ms und einer Dauer von mindestens 5 Schlägen wurde als Vorhofflimmern diagnostiziert (siehe **Abb. 4 B**). Die atriale Aktivierung während der Vorhoftachykardie war relativ regelmäßig in unseren Ratten. Die induzierbare Vorhofflimmern-Dauer wurde aus der gemittelten Dauer der längsten drei Episoden von Vorhoftachykardie/ Vorhofflimmern ermittelt.

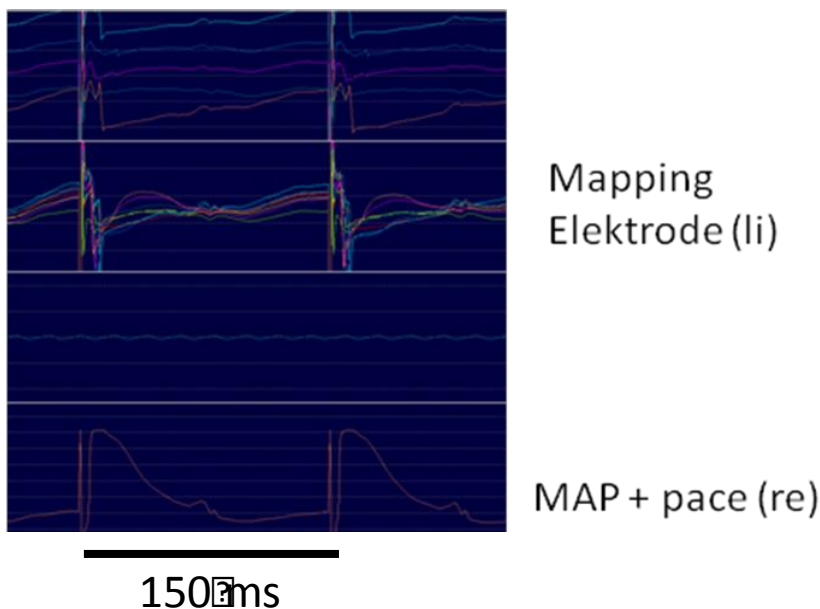


Abb. 4 A: Aufzeichnungen der Mapping Elektrode des linken Vorhofs (li) dargestellt mit dem gleichzeitigen Mapping und der Vorhofstimulation des rechten Vorhofs (re) mit einem multiplen Aktionspotential (MAP-) Katheter (Zykluslänge: 150ms).

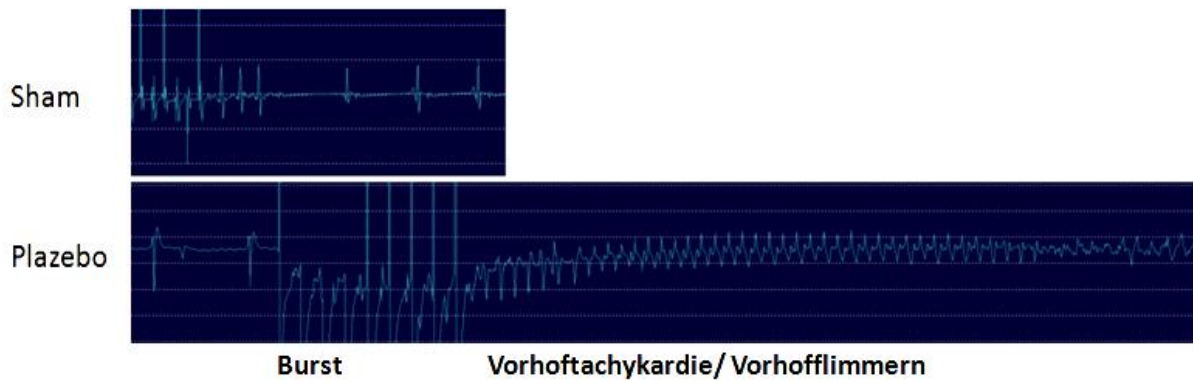


Abb. 4 B: Vorhofflimmerdauer nach Vorhofstimulation mittels Burst Stimulation. Sham-operierte Ratten im Vergleich zu Plazebo-therapierten I/R-Ratten.

4.3.2 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte nach dem Protokoll der Firma Peqlab (Erlangen, Deutschland). Ein Teil des linken Vorhofes wird mit 500µl phenolhaltigem peqGoldTrifast (PeqGold Trifast, Cat. 30-2020) versetzt und mittels eines Gewebehomogenisators zerkleinert. Es folgt eine 5-minütige Inkubation, bei der die Zellen lysiert werden. Danach gibt man weitere 500µl peqGoldTrifast-Lösung hinzu, sowie 200 µl Chloroform (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland; #C2432), und vortext anschließend mindestens 25 sec. Dieser Ansatz bleibt 8 min unter dem Abzug bei Raumtemperatur stehen und wird anschließend 5 min bei 10.000 Umdrehungen pro Minute (rpm: rounds per minute) bei 4°C in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Aufgrund unterschiedlicher Dichtegradienten ergeben sich 3 Phasen, eine obere wässrige Phase, eine schmale mittlere Intermediärphase und eine untere organische Phase. Die obere wässrige Phase enthält die gewünschte RNA. Beim Überführen der oberen wässrigen Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß sollte es zu keiner Phasenvermischung kommen. Für die RNA-Präzipitation werden dem Überstand 500 µl 100 % Isopropanol (Merck, Darmstadt, Deutschland; #1.09634.2511) zugegeben und die Probe für 10 min auf Eis gefällt. Anschließend wird die Probe für 10 min bei 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Das so erhaltene kleine Pellet mit angereicherter RNA wird 2-mal mit 1 ml 75% Ethanol (VWR, Darmstadt, Deutschland; #20821.330) gewaschen und erneut zentrifugiert um störende Salze zu entfernen. Das Pellet wird dann für etwa 5 min bei

Raumtemperatur getrocknet. Zum Lösen des RNA-Pellets wird es mit 50 µl 0,1% DEPC-H₂O versetzt, wobei der Zusatz von Diethylpyrocarbonat (DEPC, VWR; #E174) zum Wasser die RNAsen inhibiert.

Als nächstes erfolgt die RNA-Messung, welche an einem Photometer, dem NanoDrop 2000 Spectrophotometer (PqLab), durchgeführt wurde. Hierbei pipettiert man 1 µl unverdünnte Probe in das Photometer. RNA absorbiert aufgrund seiner Struktur im UV-Bereich, das Absorptionsmaximum liegt bei 260 nm.

Während der Isolation kann es vorkommen, dass auch chromosomale DNA- ausgefällt wird, die sich anschließend im RNA-Pellet wiederfinden. Um diese Kontaminationen zu entfernen, wird vor der Reverse Transkription ein DNase Verdau durchgeführt. Dieser wird wie folgt angesetzt:

10 x DNase-Puffer	2,0 µl
DNase I (PqLab, Cat. 04-1180)	2,0 µl
RNAse Inhibitor (40 U/µl von Promega, Cat.N2611)	0,5 µl
Volumen Total	10,0 µl
Nuclease-free H ₂ O	5,5 µl
RNA (2µg)	gelöst in 50 µl 0,1%DEPC-H ₂ O

Der Ansatz inkubiert in einem Thermocycler (VWR):

Step 1	37°C	30 min
Step 2	75°C	5 min
Storage	4°C	Unendlich

Nach dem DNase-Verdau kann die Ribonukleinsäure für eine Reverse Transkription eingesetzt werden. Gelagert wird die RNA bei -80°C.

4.3.3 Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription benötigt man die isolierte mRNA, welche nun in mehreren Schritten in cDNA (copyDNA) umgeschrieben wird. Das Enzym Reverse

Transkriptase schreibt die einzelsträngige mRNA in komplementäre doppelsträngige cDNA um. Mit dieser cDNA können jetzt weitere Versuche wie die Real-Time PCR durchgeführt werden. Bei der Reversen Transkription wurde das Kit und das Protokoll der Firma Applied Biosystems (Warrington, UK) verwendet (High capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Cat. 4368814).

Zur Herstellung eines 20 µl Ansatzes pipettiert man die Substanzen aus dem Kit mit 1 µg RNA in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß folgendermaßen zusammen:

10 x Buffer	2,0 µl
10 x Random Primers	2,0 µl
25 x dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1 µl (200U)
RNAse Inhibitor	1,0 µl
H ₂ O	3,2 µl
1µg RNA	gelöst in 10µl H ₂ O
Volumen Total	20,0 µl

Dieser Mix wird in einem Thermocycler (VWR) mit folgendem Programm inkubiert:

Step 1 (Annealing)	25°C	10 min
Step 2 (Elongation)	37°C	120 min
Step 3 (Termination)	85°C	5 min
Storage	4°C	Unendlich

Die cDNA wurde in unseren Versuchen für Real-Time PCRs eingesetzt. Aufbewahrt wurde sie bei -20°C.

4.3.4 Real-Time-Polymerasekettenreaktion

Die Real-Time Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nucleinsäuren die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet.

Hier verwendet wurden TaqMan-Sonden, die hochspezifisch an die zu untersuchende Zielsequenz binden. Bei der TaqMan PCR wird durch die TaqMan-Sonde, dem sog. Quencher genau ein Lichtsignal pro Kopiervorgang, ausgesendet. Dies führt zu einer sehr großen Sensitivität der Messung, das bedeutet auch, dass sehr niedrige Expressionslevel eines Gens zuverlässig gemessen werden können. Das Prinzip des TaqMans basiert auf dem fluorescence resonance energy transfer. Dabei setzt sich eine Sonde aus einem Oligonucleotid, gekoppelt mit einem Fluorochrom und Quencher, welche sich in unmittelbarer Nachbarschaft befinden, zusammen. Das Oligonucleotid bindet spezifisch an die target-cDNA und erhöht damit die Sensitivität der Amplifikation. Das Fluorochrom (= erstes Molekül von 3' → 5'- Ende auf dem Oligonucleotid betrachtet) ist der Donator, gibt also Licht einer bestimmten Wellenlänge E1 an den benachbarten Quencher ab, welcher das Licht verschluckt. Der Quencher hat die Funktion, die vom Donator gesendete Energie E1 so zu minimieren, dass keine Fluoreszenz gemessen werden kann, bis das Oligonucleotid von der Polymerase abgebaut wird und nach Trennung des Fluorochroms vom Quencher die frei gewordene Energie E1 als Lichtsignal messbar wird. Das gemessene Fluoreszenzsignal ist direkt proportional zu der DNA-Menge in der Probe und wird nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode quantifiziert. Anhand dieser Intensität der Leuchtsignale kann mit Hilfe entsprechender Software in Echtzeit die Menge an gebildetem PCR Produkt und somit die Geschwindigkeit der PCR gemessen werden, ohne dass für die Genexpressionsanalyse eine Gelelektrophorese erfolgen muss. Am Bildschirm wird die PCR Kurve sichtbar, sobald die gebildete DNA-Menge ein Mindestmaß (die so genannte Baseline) überschreitet. Zu erkennen ist eine Exponentialkurve und der Cycle Threshold (=Ct-Wert) bzw. Schwellenwert ist der Zyklus, bei dem die PCR am schnellsten läuft bzw. die Reaktion ihr Optimum hat. Dieser Ct-Wert korreliert mit der im Ansatz vorhandenen cDNA-Menge. Je mehr PCR-Produkt da ist, desto schneller läuft die Reaktion. Im späteren Verlauf der PCR läuft die Reaktion wieder langsamer, da sich das Gleichgewicht zugunsten einer Übersättigung mit PCR-Produkt und einem Mangel an dNTPs verschiebt.

Bei dieser relativen Quantifizierung trägt man die Emission gegen die Zyklenanzahl auf und bezieht die Expression des gesuchten Gens auf die Expression des Housekeeping-Gene, hier der GAPDH, da die Expression dieses Gens unter

verschiedenen Versuchsbedingungen nicht beeinflusst wird. Die Berechnung nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ - Methode setzt eine gleiche Effizienz der abgelaufenen PCR- Reaktionen voraus. Beträgt diese 100%, so verdoppelt sich die DNA Menge in jedem Reaktionszyklus. Die Effizienz kann mit der Formel $E = 10^{(-1/m)}$ berechnet werden.

ΔCt gibt den Expressionsunterschied bezogen auf GAPDH an:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct (Gen)} - \text{Ct (Housekeeping Gen)}$$

$\Delta\Delta\text{Ct}$ gibt die Expressionsdifferenz zwischen zwei Gruppen an:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct (Gruppe1)} - \Delta\text{Ct Kontrolle}$$

Das $\Delta\Delta\text{Ct}$ kann zur Berechnung der Ratio zwischen diesen Gruppen herangezogen werden, indem man es als negativen Exponenten zur Zahl 2 setzt: $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ Zum Einsatz kam ein PCR-Gerät StepOne Plus der Firma Applied Biosystems. Die Substanzen für den TaqMan sind von der Fa. Applied Biosystems (Cat. #4369016).

TaqMan Mastermix-Ansatz:

2x TaqMan Gene Expression Master Mix	10,0 μl
20x TaqMan Gene Expression Assay (Sonde)	1,0 μl
RNase-freies Wasser	9,0 μl
Volumen Total	20,0 μl
Template (cDNA)	1,0 μl

TaqMan Sonden (Applied Biosystems)

Mouse CatA	Mm00447197_m1(Probennummer)
Mouse ANP	Mm01255770_g1(Probennummer)
Mouse BNP	Mm01255770_g1(Probennummer)
Mouse GAPDH	Mm99999915_g1(Probennummer)
Rat Col4a	Rn01482927_m1(Probennummer)
Rat Col1a1	Rn01463848_m1(Probennummer)
Rat Col3a1	Rn01437681_m1(Probennummer)
Rat GAPDH	Rn01775763_g1(Probennummer)
Rat CatA	Rn01424035_g1(Probennummer)

4.3.5 Immunfärbung für Cathepsin A

Prinzip

Bei dieser Färbung wird der Cathepsin A Gehalt farblich in den Zellen des Vorhofs transgener Tiere und Wildtypen dargestellt.

Lösungen

Xylol (VWR, Darmstadt, Deutschland; #28975.325)

70% EtOH

85% EtOH

100% EtOH (VWR, Ethanol absolute #20821.330)

1x PBS-Tween 20 Buffer

0,05% Citraconsäureanhydrid (Merck; #841321)

Citratpuffer (100 mM Citronensäure-Monohydrat, pH 6.0; (Merck, Darmstadt, Deutschland; #1.00244.1000)

Primärantikörper: Mouse monoklonal gegen CatA (Santa Cruz Biotechnology, #SC-73766)

Sekundärantikörper: Anti-Goat-IgG-Biotin (Dianova, #705-065-147)

AEC-chromogen (3-amino-9-ethylcarbazole; #K3464 DAKO), Diaminobenzidin/DAB-Chromogen (DAB+ liquid DAKO #K3467)

Hämatoxylin n. Ehrlich (Waldeck, Münster, Deutschland; #2C-163)

Aquatex® (Merck, Darmstadt, Deutschland; #108562)

Durchführung

Zuerst werden die Herzen schnellst möglich aus den Mäusen entnommen, von nicht kardialen Gewebe befreit und gewogen. Anschließend wird das linke Atrium für 24h in 4%igem Formaldehyd (Fischer, Saarbrücken, Deutschland; #PZN 02653048) fixiert. Anschliessend werden die Gewebe mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe im Gewebeeinbettautomaten (Excelsior, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland), entwässert (70%→80%→96%→100% →Xylol→Paraffin) und danach in Paraffinblöckchen eingebettet (TissueTek®, Sakura, Staufen, Deutschland). Danach werden von den Vorhöfen 5 µm dicke Schnitte angefertigt und die Organschnitte jeweils auf einem Objektträger bei 56 Grad Celsius über Nacht fixiert.

Am Tag 1 werden die Organschnitte auf dem Objektträger entparaffiniert. Dazu werden sie 30 min auf eine 70 Grad Celsius warme Heizplatte gelegt. Anschließend kommen die Objektträger für 3x10 min unter dem Abzug in ein Xylol-Bad, um dann für jeweils 5 min in der absteigenden Alkoholreihe (100%,85%,70% Ethanol) die letzten Paraffinreste zu entfernen. Danach kommen die Objektträger in eine Glas-Färbeküvette und werden bei Raumtemperatur für 2x5 min in 1xPBS-Tween (1x Phosphate-Buffered Saline: 137mmol/L NaCl; 2.7mmol/L KCl; 4.3mmol/L Na₂HPO₄; 1.47mmol/L KH₂PO₄, pH7.4 enthält 0.1% Tween 20 (Sigma, #P2287))() inkubiert. Dann werden die Objektträger in der Färbeküvette mit Citratpuffer (pH 6,0) übergossen und in der Mikrowelle für 30 min bei 800 Watt gekocht, wobei immer nachgefüllt wird (mischen 1:1 Citratpuffer und Aqua dest).

Im nächsten Schritt wird alles für 30 min auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt. Anschließend kommen die Objektträger für 10 min in PBS-Tween 20 bei RT. Als letzter Schritt des ersten Tages wird nun der Primärantikörper: Mouse monoklonal gegen CatA (Santa Cruz Biotechnologie; SC-73766) 1:300 oder 1:500 in PBS-Tween 20 dazugegeben, auf die Objektträger verteilt und über Nacht in einer feuchten Kammer im Kühlschrank bei +4 Grad inkubiert, jedoch nicht weniger als 12h.

Am Tag 2 wird zu Beginn für 3h in der feuchten Kammer im Wasserbad bei 37 Grad Celsius inkubiert. Danach kommt der 1x PBS-Tween für 3x5 min hinzu bei RT und anschließend der Sekundärantikörper: Anti Mouse IgG Peroxidase bei 1:30 (Sigma) in 1x PBS-Tween. Inkubiert wird für 2h in der feuchten Kammer im Wasserbad bei 37 Grad Celsius. Darauf folgt wieder ein Waschschrift mit 1x PBS für 3x5 min bei RT. Dann wird mit dem Diaminobenzidin/DAB-Chromogen (DAB+ liquid DAKO K3467) für max. 5-10 min in der feuchten Kammer bei RT inkubiert. Anschließend folgt einmal Aqua dest. für 5 min und die Gegenfärbung mit Hämatoxylin n. Ehrlich für 5 min, welche im Anschluss wieder kurz mit Aqua dest. abgespült wird. Darauf folgt das Bläuen unter Leitungswasser für 15 min. Danach wird der Objektträger kurz mit Aqua dest. abgespült und die Präparate anschliessend mit Aquatex® (Merck) eingedeckt. Anschließend werden die Schnitte unter dem Lichtmikroskop bei verschiedenen Vergrößerungen (40x Objektiv + 10x Okular; 10x Obj. + 10x Oku.) beurteilt. Dazu vergleicht man optisch den Cathepsin A Gehalt in den verschiedenen Schnitten (Transgene Tiere vs. Wildtyp) der sich farblich (rot) darstellt.

4.3.6 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Prinzip

Bei dieser Färbung werden die Zellkerne mit einem basischen Farbstoff (Eisen-Hämatoxylin) blau gefärbt, die Rotfärbung des Zytoplasmas erfolgt mit einem sauren Farbstoff (Eosin Y).

Lösungen

70% Isopropanol

90% Isopropanol

100% Isopropanol (Merck, Darmstadt, Deutschland; #1.09634.2511)

Xylol (VWR, #28975.325)

Hämatoxylin n. Ehrlich (Waldeck, Münster, Deutschland; #2C-163)

Aqua dest.

1%-ige Eosinlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland; #1.15935.0025)

Salzsäure-Alkohol (Morphisto, Frankfurt, Deutschland; #10372.00250)

Durchführung

Zuerst werden die Objektträger mit den unter 4.3.5 beschriebenen fixierten Gewebeschnitten für 3x 10min in Xylol unter den Abzug entparaffiniert. Anschließend werden die Objektträger einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 90%, 70%) für jeweils 5 min unterzogen, welche dann abschließend noch für 5min in Aqua dest. getaucht werden. Zur Kernfärbung werden die Schnitte für 12min in Hämatoxylin gestellt und danach jeweils zweimal mit destilliertem Wasser gespült. Zum Differenzieren wird nun HCL- Alkohol auf die Schnitte gegeben, mit destilliertem Wasser gespült und anschließend unter fließendem Wasser für 15min geblät. Danach wird wieder mit Aqua dest. gespült und die Schnitte kommen für 15s in Eosin welche anschließend wieder mit Aqua dest. gespült werden. Dann erfolgt die aufsteigende Alkoholreihe für jeweils 2min (70%, 90%, 100%) und danach kommen die Schnitte nochmals für 3x 3 min in Xylol und werden anschließend im Abzug kurz trocknen gelassen. Nachdem sie trocken sind, werden die Schnitte mit 1 Tropfen Entellan® (Merck, Darmstadt, Deutschland; #1.07961.0100) unter einem Deckglas luftblasenfrei eingedeckt.

Die Beurteilung erfolgte mit einem Lichtmikroskop (Objektiv: 5-40x + Okular 10x) nach morphologischen Gesichtspunkten bei welchen der Durchmesser der Zellen jeweils ausgemessen wird und von den verschiedenen Gruppen (Wildtyp und transgenem Tier) jeweils die Mittelwerte miteinander verglichen werden.

4.3.7 Pikro-Siriusrot Färbung

Prinzip

Bei dieser Färbung stellen sich Kollagenfasern rot dar, während Muskelfasern und Zytoplasma gelb erscheinen. Im polarisierten Licht ist das Verfahren eine sehr sensitive Methode zum Nachweis von Kollagen, dabei färben sich große Fibrillen gelb-orange, kleine hingegen grün.

Lösungen

Xylol

70% Isopropanol

90% Isopropanol

100% Isopropanol

Aqua dest

Pikro-Siriusrot Lösung 0,1% (Morphisto, Frankfurt, Deutschland; 13422.00500)

Durchführung

Die Schnitte werden für 3x 10min in Xylol entparaffiniert, dann einer absteigenden Alkoholreihe unterworfen (100%, 90%, 70%)), mit Aqua dest. für 2x 5min gespült, 60min mit Pikro Siriusrot gefärbt, kurz 2-mal in Aqua dest. gespült und dann mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) entwässert. Anschließend kommen die Schnitte nochmal für 3x 3min in ein Xylol-Bad. Nach Abschluss dieser Vorgänge werden die Schnitte mit 1 Tropfen Entellan unter einem Deckglas luftfrei eingedeckt.

Die Beurteilung erfolgte mit einem Lichtmikroskop (Objektiv: 10x + Okular 10x) nach morphologischen Gesichtspunkten indem der rotgefärbte Fibrosegehalt markiert und so berechnet wird.

Bestimmung der interstitiellen Fibrose

Unter Nutzung der mit der Sirius-Red-Färbung hergestellten Gewebeschnitte wurde der Anteil des Bindegewebes pro Schnitt mit einem Mikroskop ermittelt, welches eine Aussage über das interstitielle Bindegewebe ermöglicht. Der Fibrosegehalt wurde unter Verwendung der NIS-Elements analysis Software (NIS-Elements, BR 3.2, Nikon Instruments, USA) bestimmt.

4.3.8 TUNEL-Färbung

Prinzip

TUNEL steht für „terminal deoxyribonucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nickend labeling“. Diese Untersuchung erkennt Apoptose mittels lichtmikroskopischer Untersuchungen, indem sie die während der Apoptose entstehenden DNA-Strangbrüche markiert und so die Identifizierung apoptotischer Zellen ermöglicht. Einzelstrangbrüchen in der DNA des Genoms, die durch Nukleasen hervorgerufen werden, werden so nachgewiesen. Durch das Enzym TdT werden an die entstandenen freien Enden markierte dNTP-Nukleotide angehängt.

Lösungen

Xylol

70% Ethanol

96% Ethanol

100% Ethanol

1x Phosphat buffered saline (PBS)ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Merck, #S7100, Zusammensetzung von PBS: 137mmol/L NaCl; 2.7mmol/L KCl; 4.3mmol/L Na₂HPO₄; 1.47mmol/L KH₂PO₄, pH7.4)

Enthält:

- Proteinkinase K (20µg/ml)
- H₂O
- Equilibration Buffer Working Strength TdT Enzyme
- Stop/Wash Buffer
- Anti-Digoxygenin Peroxidase

- 3% H₂O₂ (Merck, Darmstadt, Deutschland; #8.22287.1000)
- AEC-chromogen (3-amino-9-ethylcarbazole; DAKO, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA; #K3464), Hämatoxylin n. Ehrlich (Waldeck, Münster, Deutschland; #2C-163)
- Aquatex® (Merck, Darmstadt, Deutschland; #108562)

Durchführung

Die Schnitte kommen für 30min auf eine 70 Grad Celsius warme Heizplatte und danach für 3x 10min in Xylol. Darauf folgt eine absteigende Alkoholreihe (100%, 96%, 70%) zur vollständigen Entparaffinierung. Anschließend kommen die Schnitte für 5min in 1xPBS, danach werden sie für 30min mit Proteinase K beträufelt und dann für jeweils 2x 2min mit bi-destilliertem H₂O (ddH₂O) versehen. Darauf folgt für 5min eine 3%ige H₂O₂ Lösung, welche mit 2x 5min 1xPBS wieder abgewaschen wird und nach dem Trocknen mit einem Fettstift (Dako Pen, Dako, Glostrup, Dänemark; #S2002) umrandet. In das markierte Feld kommt anschließend Equilibration Buffer für 10sec und danach die Working Strength TdT Enzyme für 1h bei 37 Grad Celsius im Wasserbad in der feuchten Kammer. Darauf folgt für 10min der Stop/Wash Buffer welcher dann mit 1xPBS für 3x 1min abgewaschen wird, mit dem Anti-Digoxigenin Conjugate Peroxidase für 30min in die feuchte Kammer kommt und anschließend nochmal mit 4x 2min PBS abgewaschen wird. Darauf folgt der AEC-Chromogen mit welchem unter Beobachtung für ca. 12min gefärbt wird. Danach kommt für 3x 1min H₂O_{dd}, für 5min H₂O_{dd}, 1min färben mit Hämatoxylin und anschließend für 15min unter Leitungswasser bläuen. Nach Abschluss dieser Vorgänge werden die Schnitte mit 1 Tropfen Aquatex unter einem Deckglas luftfrei eingedeckt und anschließend erfolgt die Analyse unter dem Fluoreszenz-Mikroskop: Extinktion: 450-500 nm; Detektion: 515-565 nm.

5. Ergebnisse

5.1 I/R-Rattenmodell

Das Modell der ventrikulären Ischämie/Reperfusion und die dazu geleisteten Vorarbeiten zur Charakterisierung der ventrikulären Funktion durch die Arbeitsgruppe Sadowski, wurden bereits in dem Kapitel 4.1 meiner Doktorarbeit beschrieben. Aufbauend auf diesen Daten sollte im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit die Ausbildung arrhythmogener Substrate im Vorhof und die Rolle der Carboxypeptidase CatA genauer untersucht werden.

5.2 Die atriale Cathepsin A-Expression im I/R-Ratten Modell

Mittels Real-Time PCR Analyse wurde die atriale CatA-Genexpression in allen vier Gruppen bestimmt.

Abbildung 5 zeigt, dass die CatA-mRNA Level drei Monate nach I/R in den Placebo-therapierten I/R-Tieren signifikant erhöht waren im Vergleich zu den Sham-operierten Tieren. Diese erhöhte Genexpression blieb sowohl in den mit dem ACE-Hemmer Ramipril-therapierten I/R-Tieren, als auch in den mit dem Cathepsin A-Hemmer SAR-therapierten I/R-Tieren weiterhin bestehen.

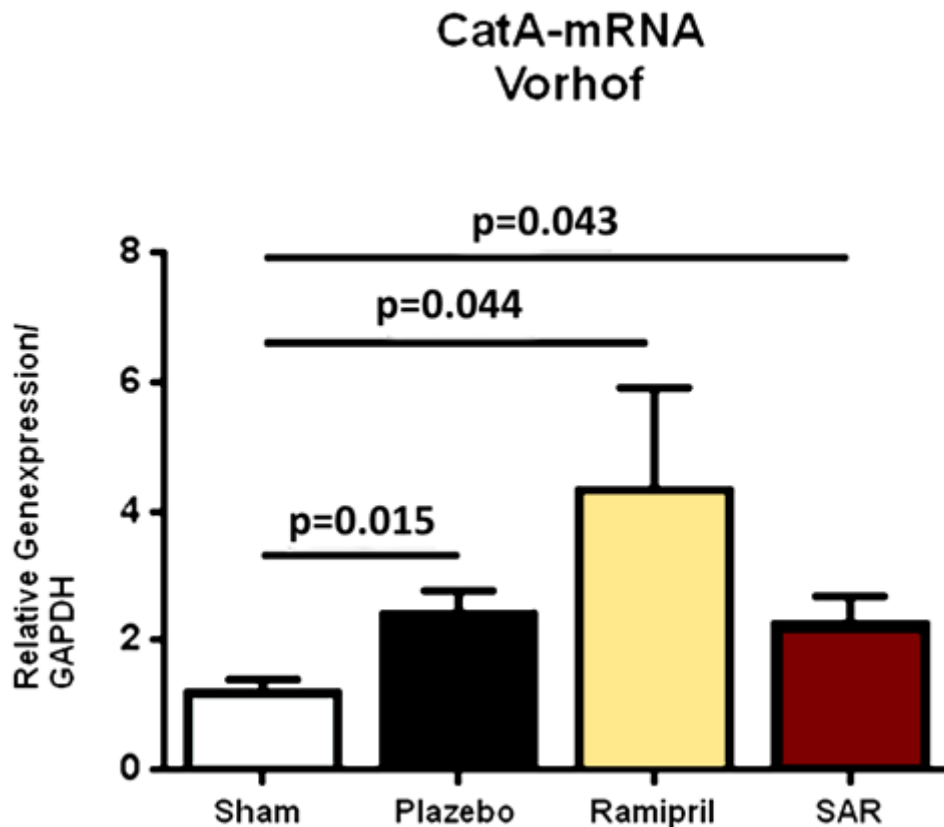


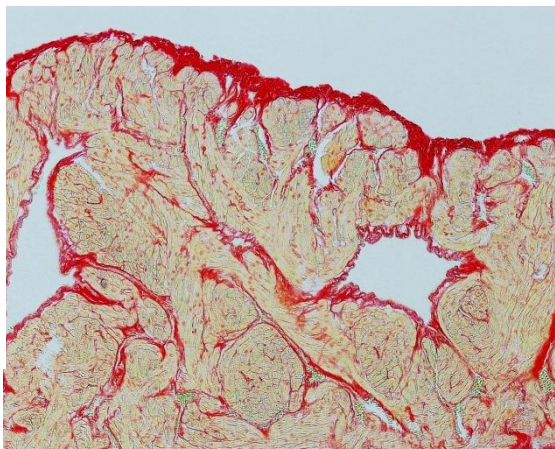
Abb. 5: Atriale Cathepsin A Genexpression in den verschiedenen Gruppen (Sham: Sham-operierte Ratten (n=9), Plazebo: Plazebo-therapierte I/R-Ratten (n=13), Ramipril: Ramipril-therapierte I/R-Ratten (n=12), SAR: SAR-therapierte I/R-Ratten (n=12)). Die Werte sind hier als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

5.3 Atriales strukturelles Remodeling in I/R-Ratten

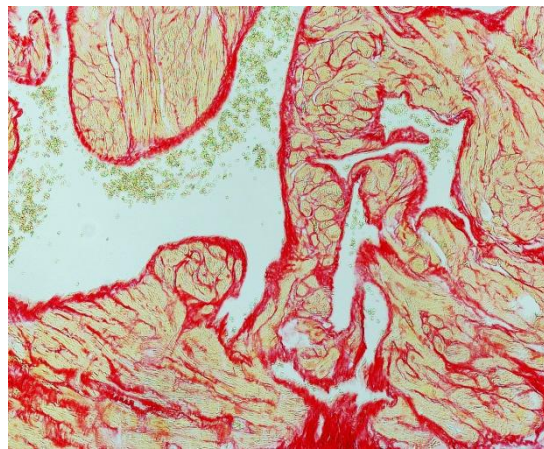
Eine zunehmende kardiale Kollagenakkumulation führte zum einen zu einer Einschränkung der myokardialen Pumpfunktion und zum anderen zu lokalen Fortleitungsstörungen im Vorhof, wodurch Vorhofflimmern unterhalten werden konnte.^{16,17,41} Daher wurde der Fibrosegehalt in den Vorhöfen der I/R-Ratten histologisch mittels Piko Siriusrot gefärbten Gewebeschnitten quantifiziert (**Abb. 6A, 6B**). Zusätzlich wurde die Genexpression verschiedener Kollagene (Kollagen 1a, 3a und 4a) mittels Real-Time PCR (**Abb. 7**) und die Hypertrophie der Kardiomyozyten durch die HE-Färbung und Ausmessung bestimmt (**Abb. 8**).

5.3.1 Linksatraler Fibrosegehalt

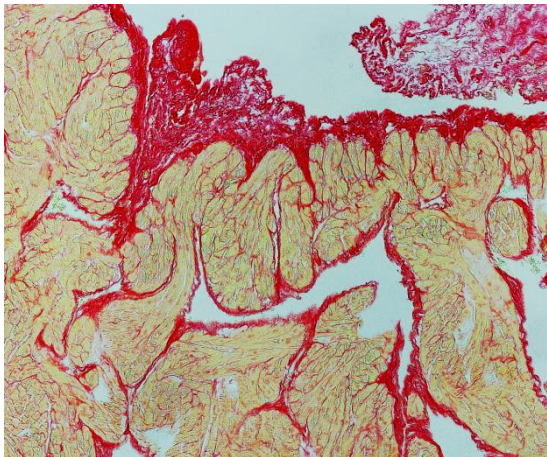
Die histologische Auswertung der Vorhöfe ergab einen signifikant erhöhten Fibrosegehalt in den Plazebo-therapierten I/R-Tieren im Vergleich zu den Sham-operierten Tieren. Eine erhöhte Ausbildung der Fibrose konnte mit dem CatA-Inhibitor SAR signifikant verhindert werden, wohingegen der ACE-Inhibitor Ramipril keinen Effekt zeigte (**Abb. 6B**).



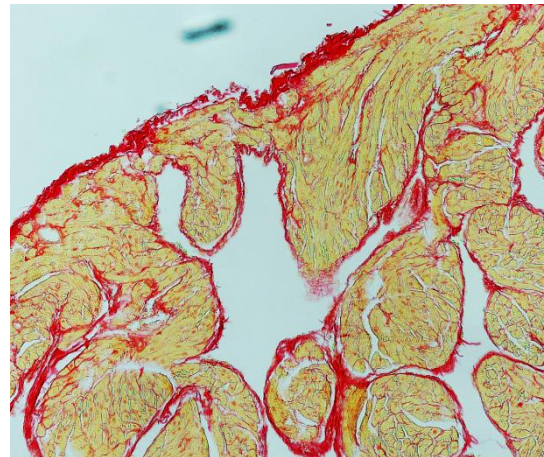
Sham



Plazebo



Ramipril



SAR

Abb. 6A: Repräsentative Picro Siriusrot Färbung des linken Vorhofs in verschiedenen Gruppen (Sham: Sham-operierte Ratten, Plazebo: Plazebo-therapierte I/R-Ratten, Ramipril: Ramipril-therapierte I/R-Ratten. SAR: SAR-therapierte I/R-Ratten)

Linksatrialer Fibrosegehalt

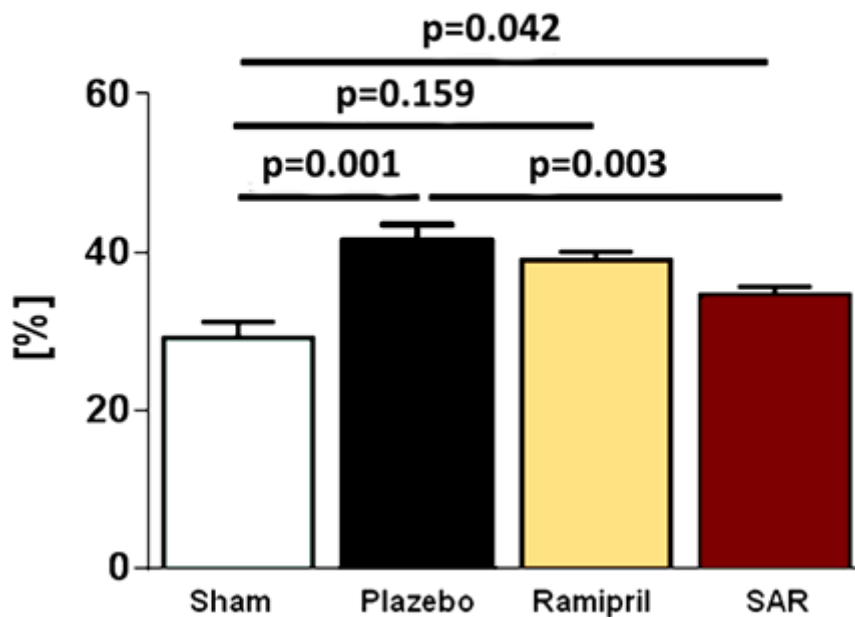


Abb. 6B: Prozentualer linksatrialer Fibrosegehalt 3 Monate nach Ischämie und Reperfusion. (Sham: Sham-operierte Ratten (n=9), Placebo: Placebo-therapierte I/R-Ratten (n=13), Ramipril: Ramipril-therapierte I/R-Ratten (n=12), SAR: SAR-therapierte I/R-Ratten (n=12)). Die Werte sind hier als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Die Placebo-therapierten I/R-Tiere zeigten eine signifikant erhöhte atriale Genexpression der Kollagene 1a, 3a und 4a im Vergleich zu den Sham-operierten Tieren.

Die Behandlung der Tiere mit dem CatA-Inhibitor SAR führte zu einer tendenziellen Verminderung der Genexpression aller drei Kollagentypen, wobei nur Kollagen 1a das Signifikanzniveau erreichte. Diese Daten unterstützten die histologische Auswertung des linksatrialen Fibrosegehaltes. Die Gabe von Ramipril konnte die Genexpression von Kollagen 1a zwar um 30% senken, hatte auf die Genexpression von Kollagen 3a allerdings keinen supprimierenden Effekt. Interessanterweise stieg die Expression von Kollagen 4a unter Ramipril, im Vergleich zu den Placebo-therapierten I/R-Tieren, sogar um 30% an (**Abb. 7A, B und C**).

Kollagen 1a

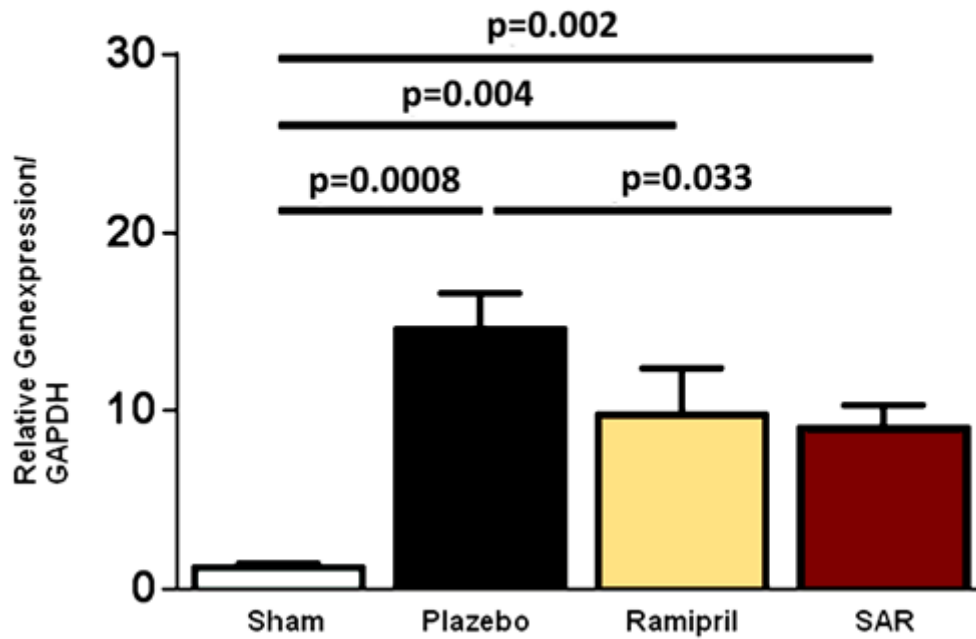


Abb. 7A: Darstellung der relativen Genexpression der Kollagene 1a in den verschiedenen Gruppen. (Sham: Sham-operierte Ratten (n=9), Plazebo: Plazebo-therapierte I/R-Ratten (n=13), Ramipril: Ramipril-therapierte I/R-Ratten (n=12), SAR: SAR-therapierte I/R-Ratten (n=12)). Die Werte sind hier als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Kollagen 3a

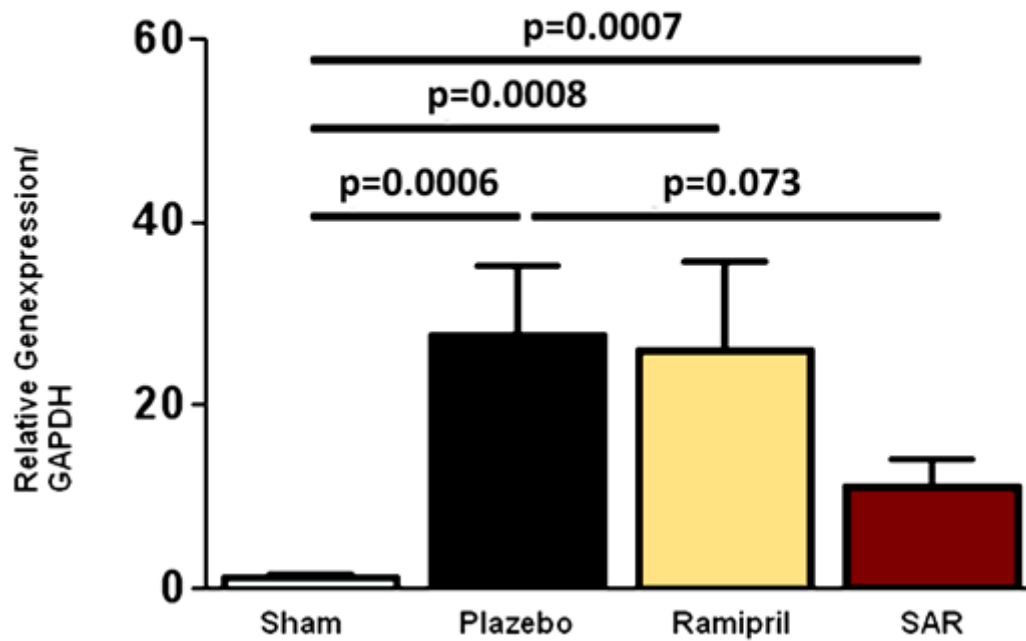


Abb. 7B: Darstellung der relativen Genexpression der Kollagene 3a in den verschiedenen Gruppen.

(Sham: Sham-operierte Ratten (n=9), Plazebo: Plazebo-therapierte I/R-Ratten (n=13), Ramipril: Ramipril-therapierte I/R-Ratten (n=12), SAR: SAR-therapierte I/R-Ratten (n=12)). Die Werte sind hier als Mittelwert ± SEM dargestellt.

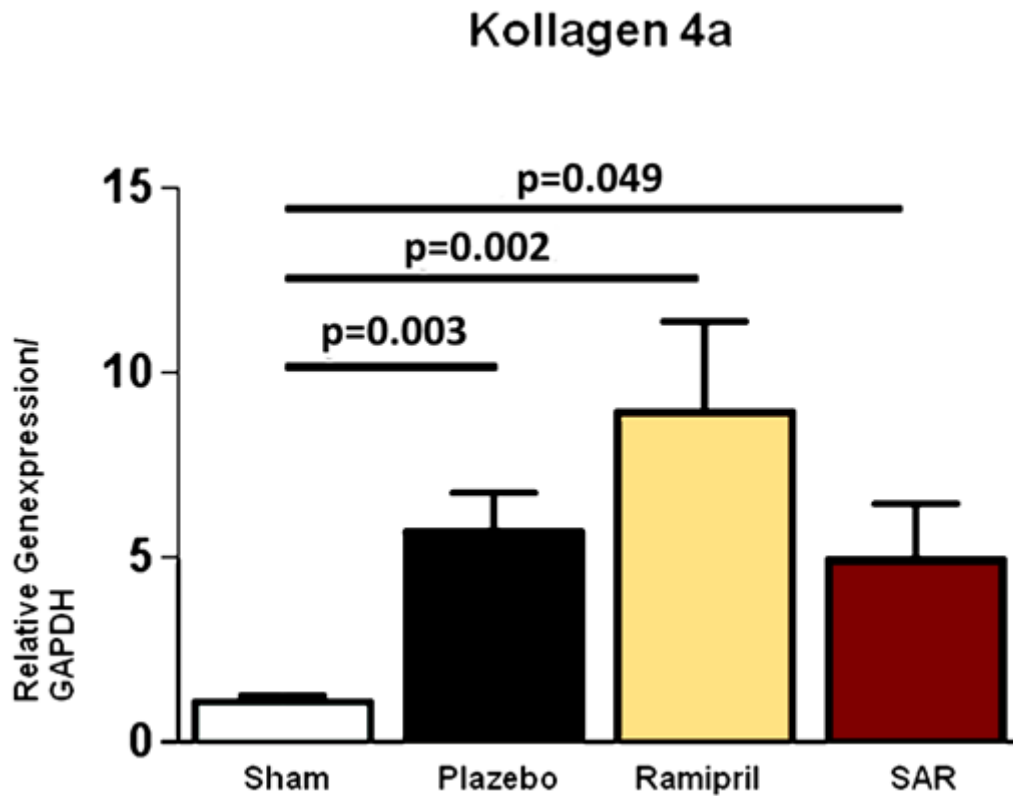


Abb.7C: Darstellung der relativen Genexpression der Kollagene 4a in den verschiedenen Gruppen. (Sham: Sham-operierte Ratten (n=9), Plazebo: Plazebo-therapierte I/R-Ratten (n=13), Ramipril: Ramipril-therapierte I/R-Ratten (n=12), SAR: SAR-therapierte I/R-Ratten (n=12)). Die Werte sind hier als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

5.3.2 Atriale kardiomyozytäre Hypertrophie

Mittels der HE-Färbung und anschließender Auswertung konnte die Hypertrophie der Kardiomyozyten im linken Vorhof bestimmt werden. Eine signifikante Zunahme des Kardiomyozytendurchmessers fand sich sowohl in den Ramipril-therapierten I/R-Tieren, als auch in den SAR-therapierten I/R-Tieren (Abb. 8).

LA- Kardiomyozytendurchmesser

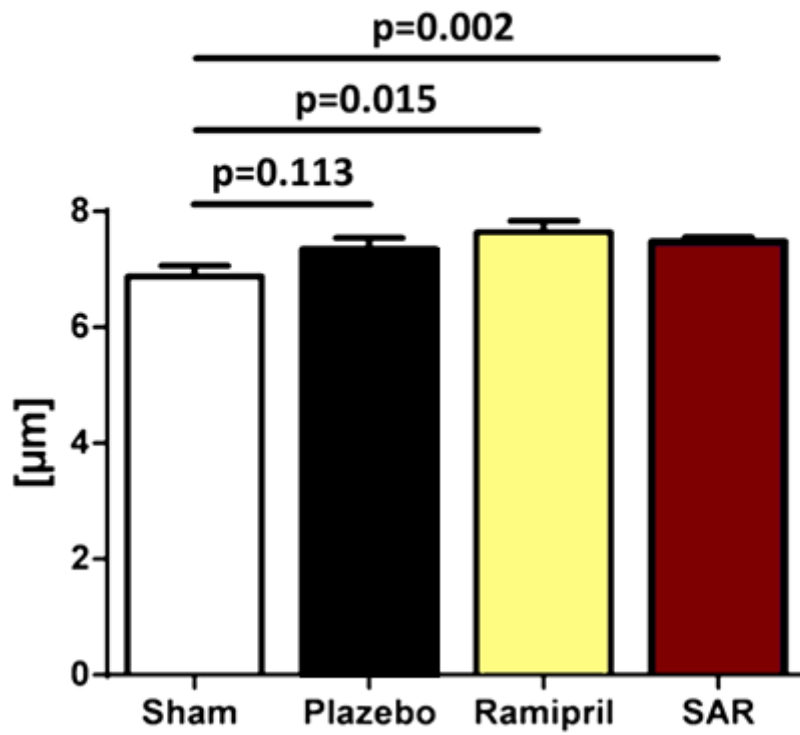


Abb. 8: Kardiomyozytendurchmesser in den verschiedenen Gruppen.

(Sham: Sham-operierte Ratten (n=9), Plazebo: Plazebo-therapierte I/R-Ratten (n=13), Ramipril: Ramipril-therapierte I/R-Ratten (n=12), SAR: SAR-therapierte I/R-Ratten (n=12)). Die Werte sind hier als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

5.4 Lateralisation des Connexins 43

In Plazebo-therapierten I/R-Tieren kann eine Verlagerung der Connexine von der polaren zur lateralen Zellmembran beobachtet werden (siehe **Abb. 9**).

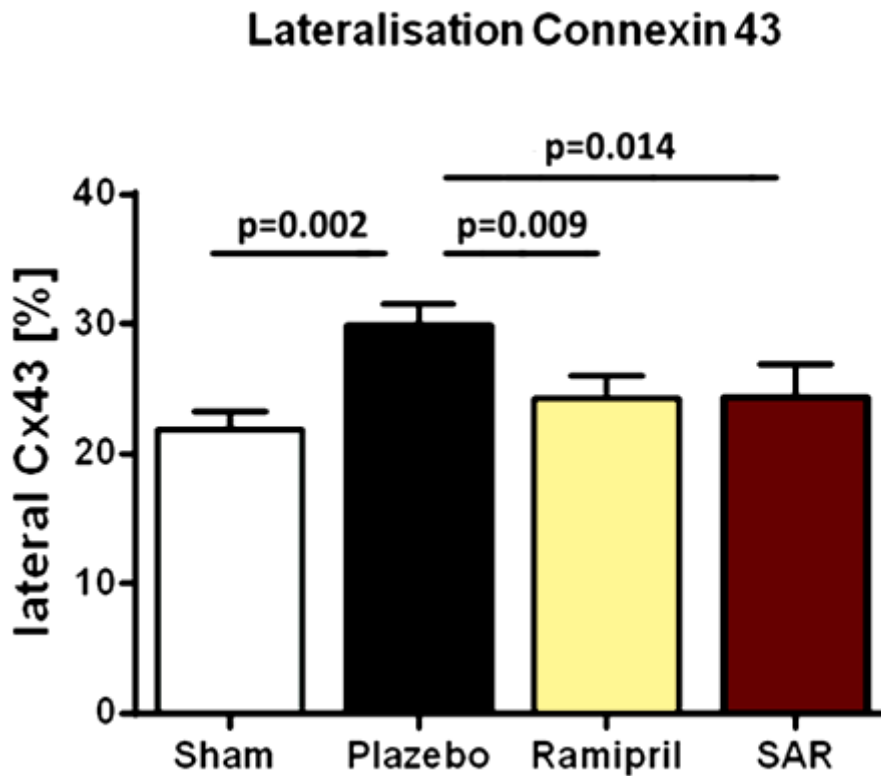


Abb. 9: Lateralisierung des Connexin 43. (Sham: Sham-operierter Ratten, Plazebo: Plazebo-therapierte I/R-Ratten, Ramipril: Ramipril-therapierte I/R-Ratten, SAR: SAR-therapierte I/R-Ratten). Die Werte sind hier als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Die Immunhistochemische Färbung zeigt die Anordnung der Connexine in den verschiedenen Tiergruppen (grün gefärbte Areale). Zu sehen ist eine vermehrte Lateralisierung besonders in Plazebo-therapierten I/R-Tieren (siehe **Abb. 10**).

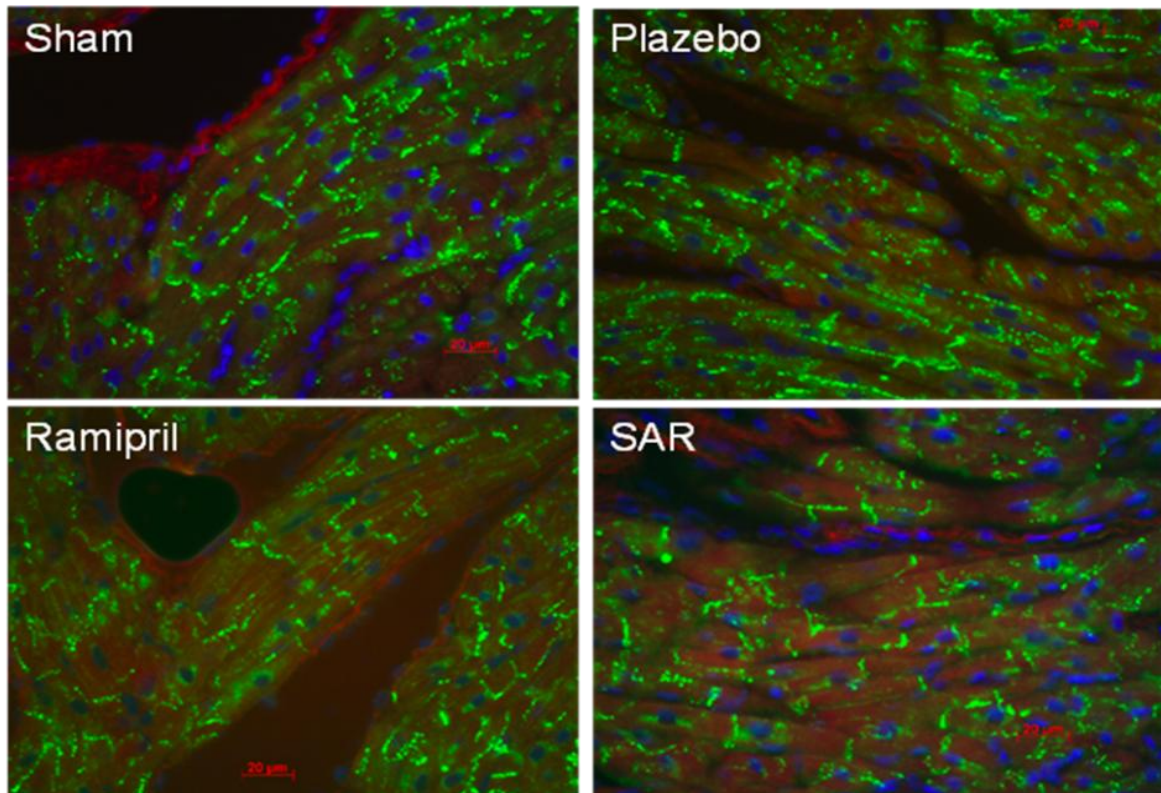


Abb.10: Immunhistochemische Färbung mit Darstellung der Connexine im Atrium. (Sham: Sham-operierter Ratten, Plazebo: Plazebo-therapierte I/R-Ratten, Ramipril: Plazebo-therapierte I/R-Ratten, SAR: SAR-therapierte I/R-Ratten)

5.5 Elektrophysiologische Studien in I/R-Ratten

Um den funktionellen Einfluss des atrialen strukturellen Remodelingprozesses auf die Elektrophysiologie des Vorhofes zu bestimmen, wurde eine elektrophysiologische Studie durchgeführt, um lokale Fortleitungsstörungen und die Induzierbarkeit von Vorhofflimmern zu untersuchen (**Abb.11**). Hierzu wurde eine Mapping-Elektrode mit 16 unipolaren Elektroden auf den linken Vorhof gelegt um die lokalen Aktivierungszeiten während einer regelmäßigen atrialen elektrischen Stimulation zu bestimmen.

Im Vergleich zu den Sham-operierten Tieren zeigten Placebo-therapierte I/R-Tiere vermehrt Areale mit langsamer Fortleitungsgeschwindigkeit. In den SAR- und Ramipril-therapierten I/R-Tieren konnte das Auftreten von lokalen

Fortleitungsstörungen reduziert werden, erreichte aber nur in den SAR-Tieren das Signifikanz Niveau (**Abb. 11**).

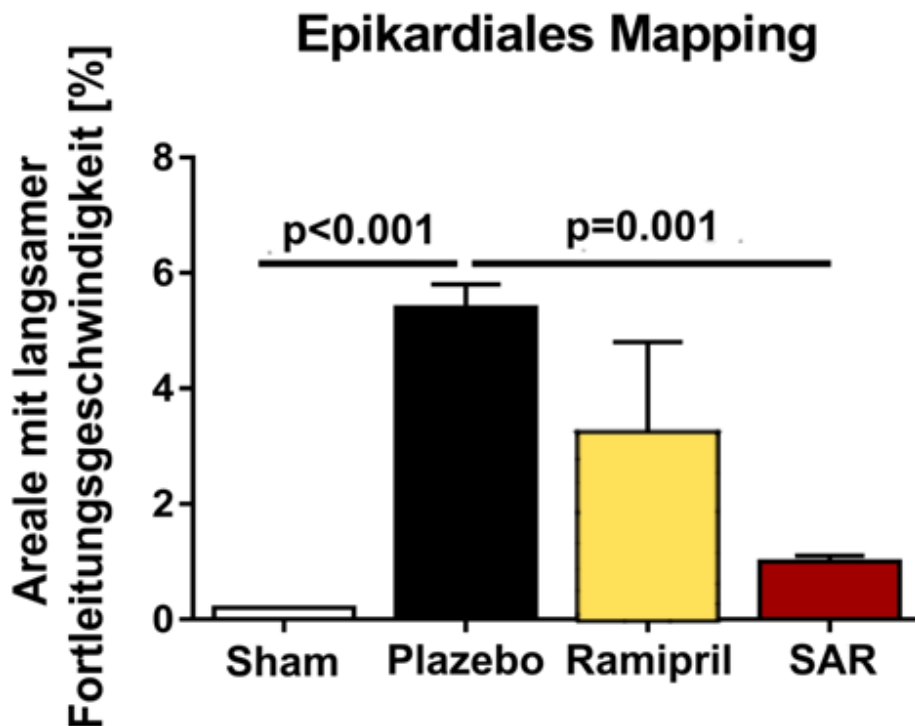


Abb. 11: Epikardiales Mapping zeigt Areale mit langsamer Fortleitungsgeschwindigkeit. (Sham: Sham-operierter Ratten, Plazebo: Plazebo-therapierte I/R-Ratten, Ramipril: Ramipril-therapierte I/R-Ratten, SAR: SAR-therapierte I/R-Ratten). Die Werte sind hier als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Eine atriale Burststimulation resultierte bei Plazebo-therapierten I/R-Tieren in eine deutlich längere induzierbare Vorhofflimmerdauer im Vergleich zu den Sham operierten Tieren. Sowohl Ramipril als auch SAR konnten die induzierbare Vorhofflimmerdauer signifikant reduzieren (**Abb. 12**).

Die mediane Dauer des induzierten Vorhofflimmerns war deutlich verringert in I/R-Ratten im Vergleich zu Sham-operierten Tieren ($25.00 \pm 19.31s$ vs. $1.25 \pm 0.93s$, $p=0.004$). Im Vergleich zu Plazebo-therapierten I/R-Ratten reduzierten sowohl SAR als auch Ramipril die mediane Vorhofflimmer-Dauer auf $1.00 \pm 3.11s$ ($p=0.028$) und $0.69 \pm 2.61s$ ($p=0.028$).

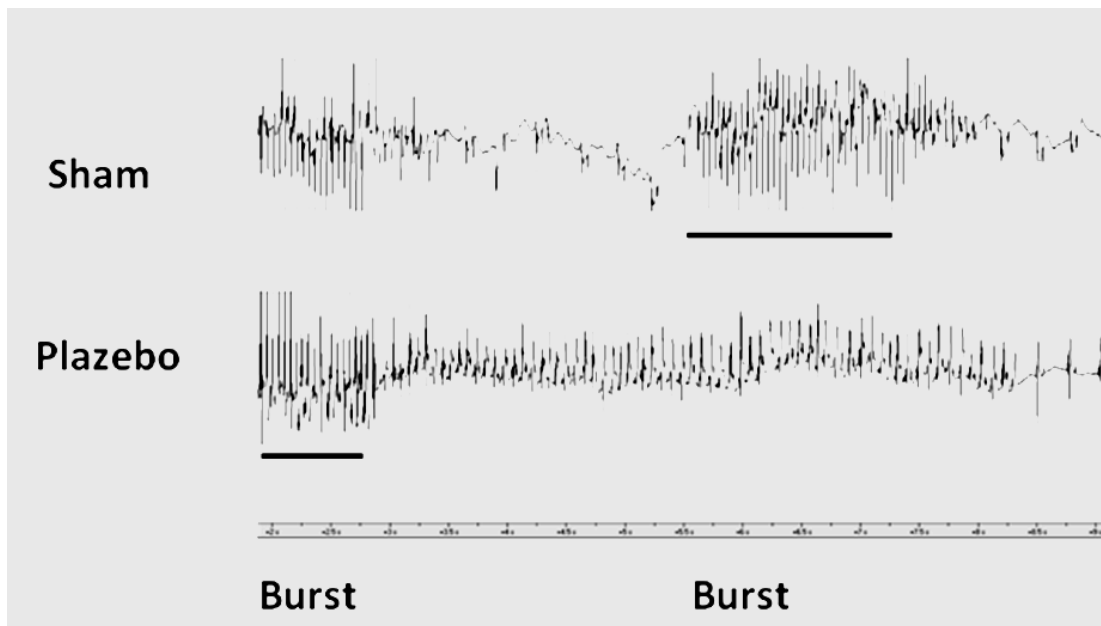


Abb. 12: Induzierbares Vorhofflimmern nach elektrischer „Burststimulation“ in Sham und Plazebo. Hier gezeigt sind repräsentative Originalregistrierungen epikardialer unipolarer Elektrogramme des linken Vorhofs in Sham-operierten I/R-Tieren und in Plazebo-therapierten I/R-Tieren.

5.6 Cathepsin A Überexpression im transgenen Mausmodell

Um die Rolle von Cathepsin A bei der Entstehung atrialer arrhythmogener Substrate genauer untersuchen zu können wurden Versuche in einem transgenen Mausmodell mit Kardiomyozyten-spezifischer CatA Überexpression durchgeführt.

Dazu wurde zunächst die CatA Expression im Vorhof der transgenen Tiere und der Tiere der gleichaltrigen Wildtyp (WT) Kontrollgruppe mittels einer Real-Time PCR Analyse bestimmt. Die Ergebnisse der Real-Time PCR sind in **Abb. 13** dargestellt.

Cathepsin A mRNA

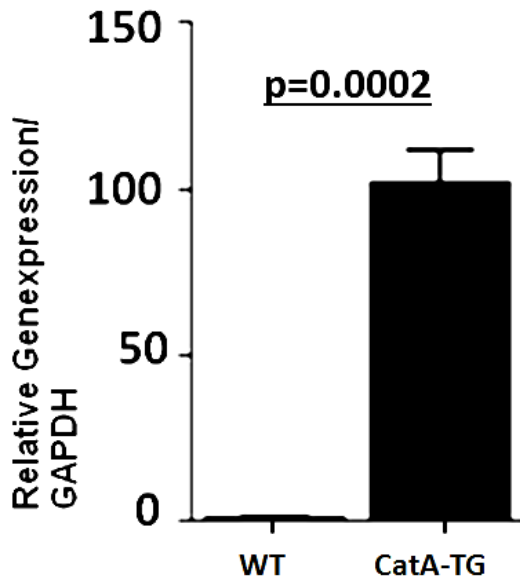


Abb. 13: Die Abbildung zeigt die relative Genexpression von Cathepsin A im Atrium transgener Tiere (CatA-TG; n=6) im Vergleich zu Wildtyp Tieren (WT; n=5). Die Werte sind hier als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Die PCR-Analyse zeigte, dass die Genexpression von CatA im Vorhof der transgenen Tiere um etwa das 100-fache erhöht war im Vergleich zu den WT Tieren.

Ob sich dies auch auf der Protein-Ebene widerspiegelt sollte nun im Rahmen von immunhistologischer Färbungen untersucht werden. Transgene Tiere zeigten eine deutliche Anreicherung des CatA-Proteins (braune Punkte) in den Vorhofmyozyten (**Abb. 14**).

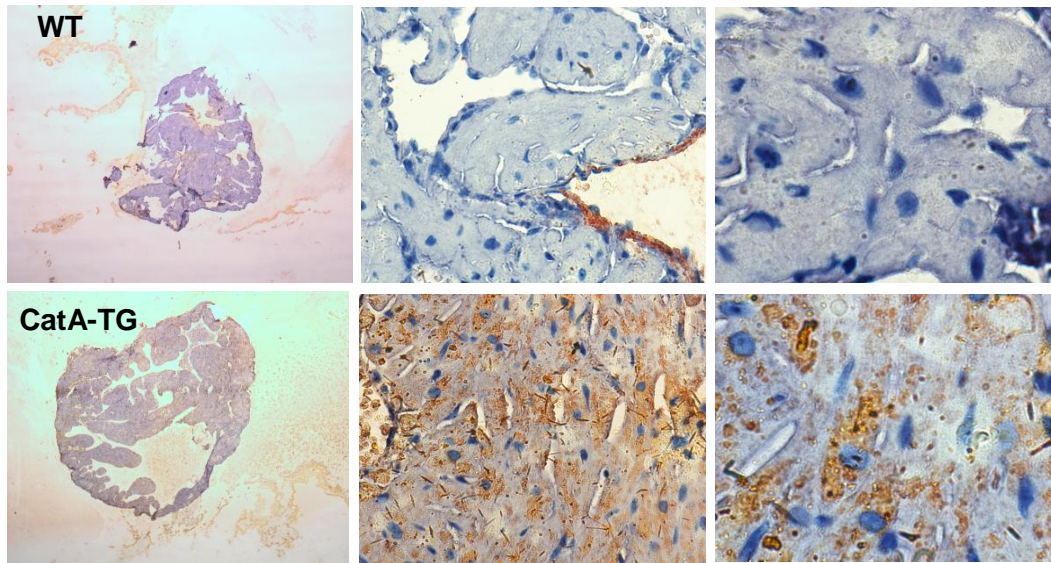


Abb.14: Aufnahmen immunhistologischer Färbungen des Vorhofes unter dem Mikroskop: Der CatA-Protein-Gehalt (braune Punkte) ist deutlich erhöht im transgenen Tier (CatA-TG) im Vergleich zum Wildtyp (WT). Linke Aufnahmen 40-fache Vergrößerung, Aufnahmen in der Mitte 100-fache Vergrößerung. Aufnahmen rechts 400-fache Vergrößerung.

5.7 Atriales strukturelles Remodeling in CatA-transgenen Mäusen

5.7.1 Atriale Fibrose

Welche Auswirkungen eine Überexpression auf die Ausbildung von Fibrose hatte, sollte in weiteren histologischen Untersuchungen untersucht werden. Der interstitielle Fibrosegehalt im linken Vorhof der CatA-TG Tiere lag um etwa das Doppelte höher im Vergleich zum WT (4.74 ± 0.9 Vs. 2.45 ± 0.4 %; $p=0.09$). Die Zunahme des Fibrosegehaltes im rechten Vorhof der transgenen Tiere war allerdings weniger stark ausgeprägt. Hier lag er bei CatA-TG bei knapp 4%, beim WT hingegen etwa bei 3% (3.88 ± 0.4 Vs. 3.03 ± 0.5 %; $p=0.28$) (siehe **Abb. 15A + B**).

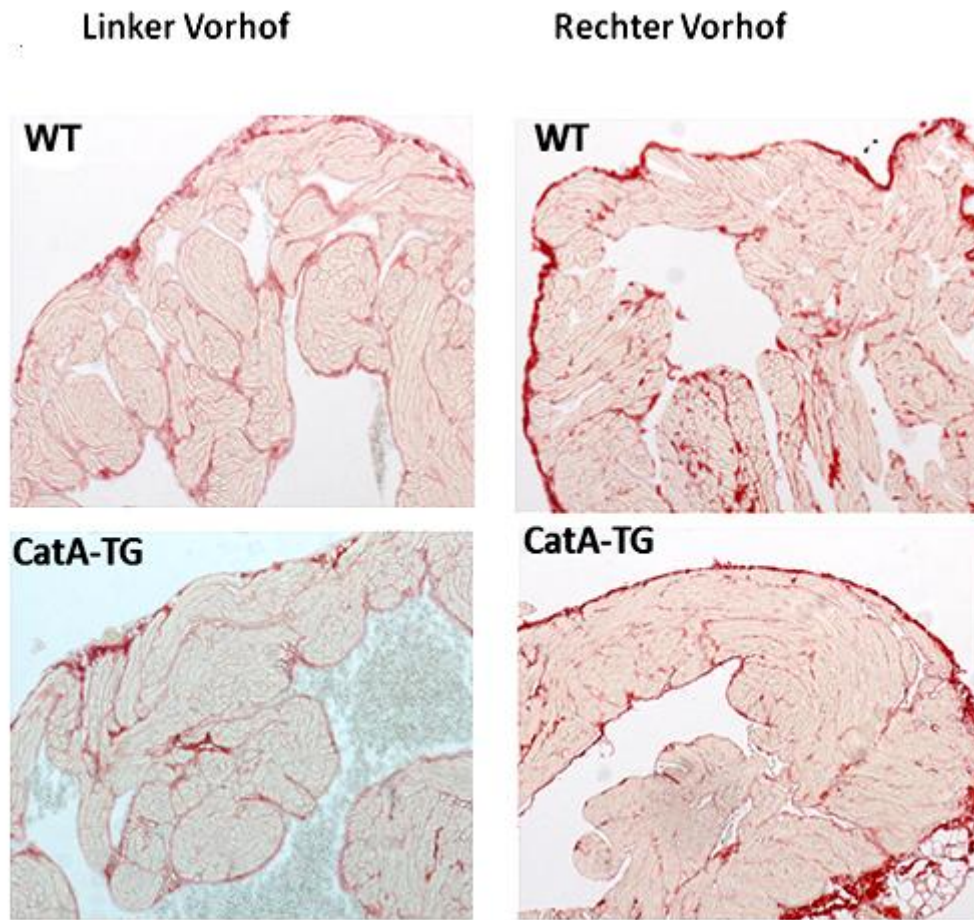


Abb.15A: Repräsentative Bilder der Picro SiriusrotFärbung zur Visualisierung der interstitiellen Fibrose im rechten und linken Atrium: Mikroskopische Darstellung (100-fache Vergrößerung) der interstitiellen Fibrose im linken und rechten Atrium. Sirius red Färbung (WT vs. CatA-TG).

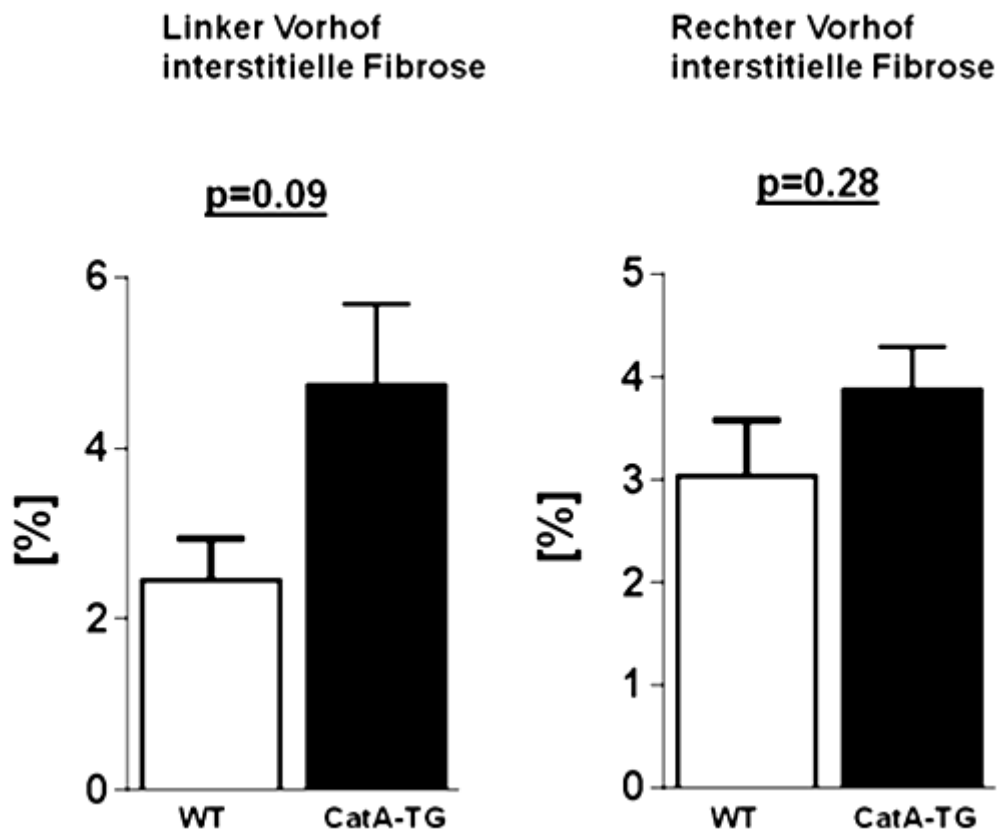


Abb. 15B: Prozentualer interstitieller Fibrosegehalt im linken und rechten Atrium (WT vs. CatA-TG). Links: Linker Vorhof (n=3); rechts: Rechter Vorhof (n=3). Die Werte sind hier als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

5.7.2 Atriale Hypertrophie

Neben der Fibrose sollte auch die Auswirkung einer myozyten-spezifischen CatA-Überexpression auf die Hypertrophie der Vorhofmyozyten untersucht werden. Kennzeichen einer entstehenden Hypertrophie und einer eingeschränkten atrialen Funktion ist eine Dysregulation myokardialer Gene, charakterisiert durch eine Heraufregulation des „brain natriuretic Peptide“ BNP und eine Herabregulation der adulten myozytären Gene (zum Beispiel: sarkoplasmatisches Retikulum Calcium ATPase 2a (SERCA2a) und Ryanodin Rezeptor 2 (RyR2)). Das Vorhofgewebe der transgenen Tiere sollte deshalb auf die Transkriptionslevel dieser Gene überprüft werden und mit dem der Wildtyp-Kontrollen verglichen werden.

Die Real-Time PCR Analysen machten deutlich, dass es im Vorhofmyokard der CatA-TG Tiere bereits zu einer signifikant erhöhten Expression des Hypertrophie-Markers BNP kam (WT: 1.04 ± 0.1 Vs. CatA-TG: 1.96 ± 0.3 ; $p=0.03$). Dies war mit einer gleichzeitigen Herabregulation von Serca2A (WT: 1.008 ± 0.07 Vs. CatA-TG: 0.70 ± 0.1 ; $p=0.03$) und RyR2 (WT: 1.01 ± 0.07 Vs. CatA-TG: 0.53 ± 0.1 ; $p=0.01$) assoziiert (**Abb. 16A, B und C**).

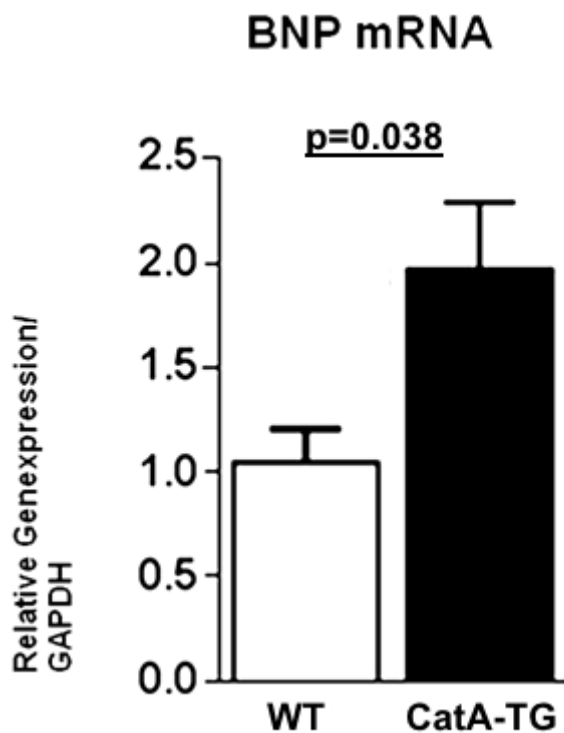


Abb. 16A: Quantifizierung der atrialen relativen mRNA-Expression des Hypertrophie-Markergens BNP in WT (n=5) und CatA-TG (n=6). Die Werte sind hier als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Serca2a mRNA

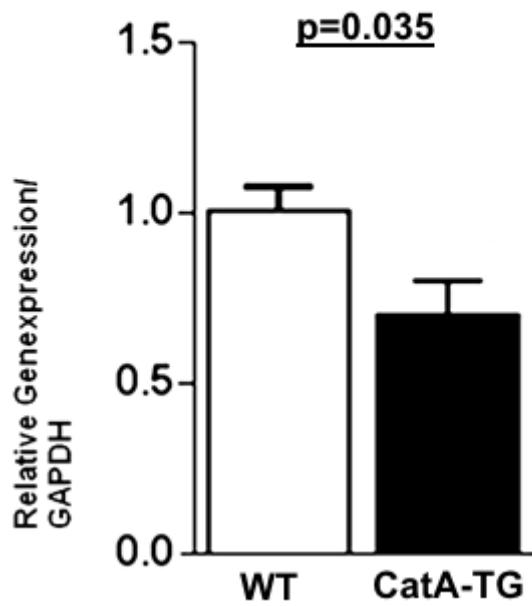


Abb. 16B: Quantifizierung der atrialen relativen mRNA-Expression der sarkoplasmatisches Retikulum Calcium ATPase 2a (Serca2A) in WT (n=5) und CatA-TG (n=6). Die Werte sind hier als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

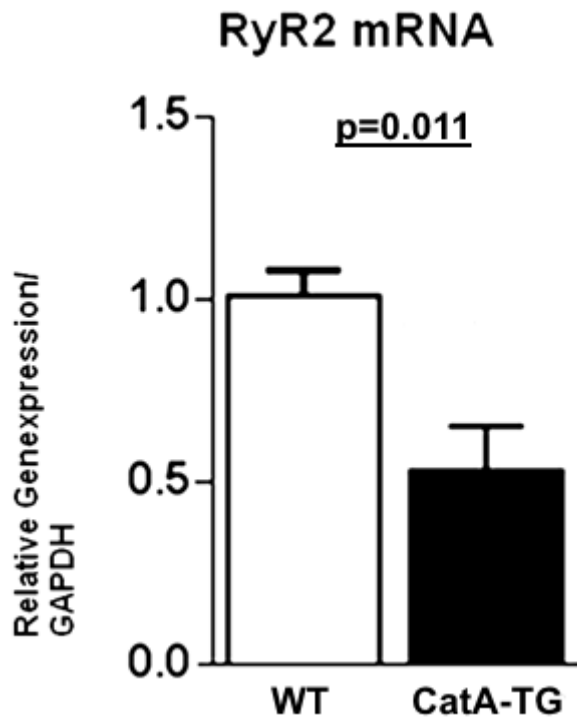


Abb. 16C: Quantifizierung der atrialen relativen mRNA-Expression des Ryanodin Rezeptors 2 (RyR2) in WT (n=5) und CatA-TG (n=6). Die Werte sind hier als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Um den Befund der myokardialen Hypertrophie histologisch zu untermauern, wurde der Durchmesser der Vorhofkardiomyozyten bestimmt (**Abb. 17A + B**). Die durch die HE Färbung dargestellte Kardiomyozytendurchmesser der Vorhöfe der CatA transgenen Tier war, im Vergleich zum WT, nicht signifikant vergrößert (linker Vorhof: WT: 7.48 ± 0.1 Vs. CatA-TG: 7.83 ± 0.2 μm ; $p=0.27$) (rechter Vorhof: WT: 7.71 ± 0.1 Vs. CatA-TG: 7.73 ± 0.3 μm , $p=0.96$) (**Abb. 17 B**).

Linker Vorhof

Rechter Vorhof

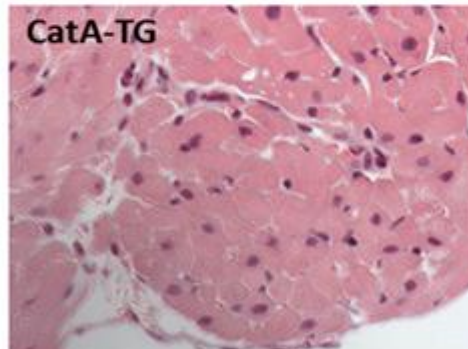
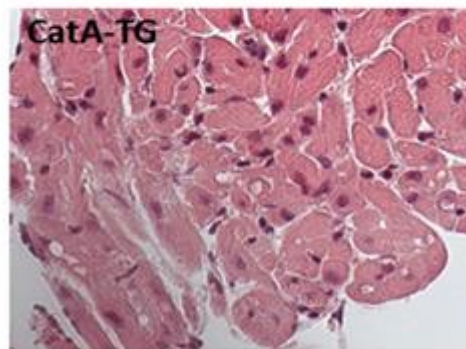
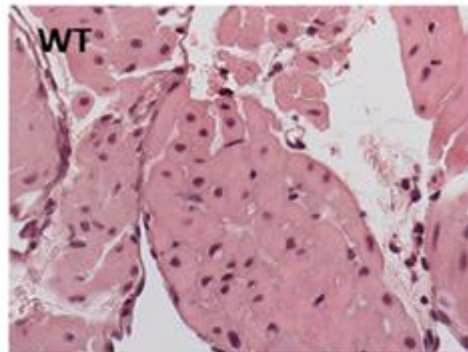
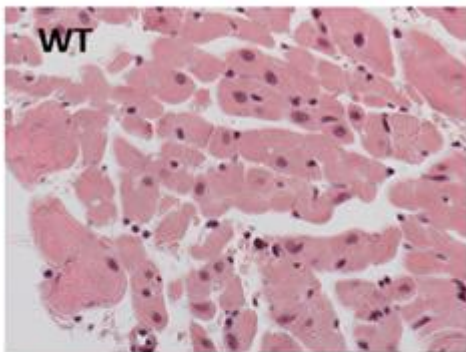


Abb. 17A: Repräsentative Bilder der H.E.-Färbung der Vorhöfe von CatA transgenen Tieren und des Wildtyps (WT) bei 400-facher Vergrößerung.

Kardiomyozytendurchmesser

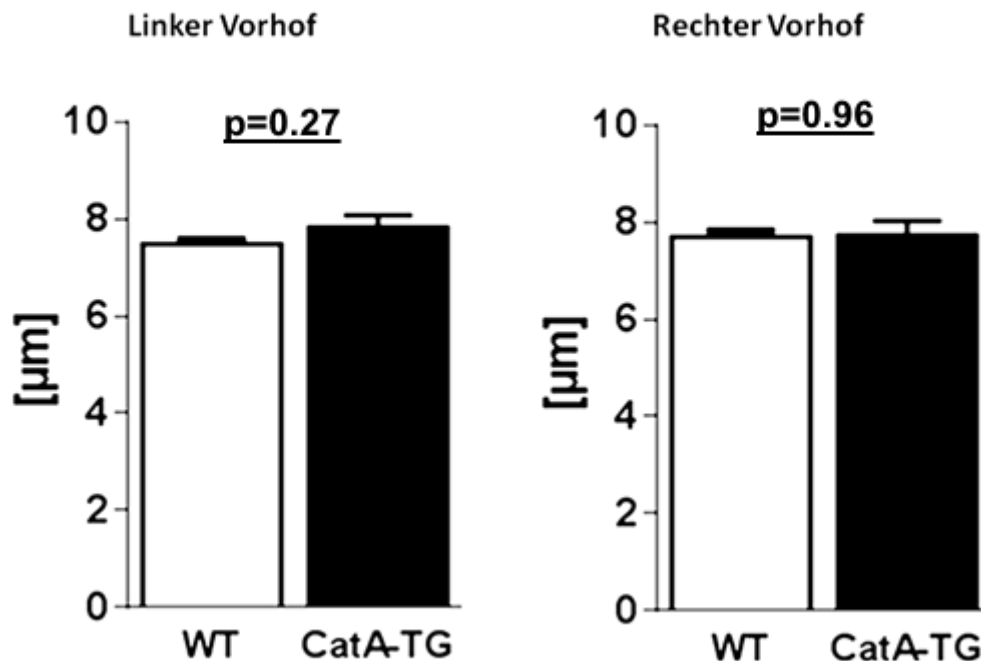


Abb. 17B: Quantifizierung des Kardiomyozytendurchmessers im linken und rechten Vorhof in WT (n=3) und CatA-TG (n=3). Die Werte sind hier als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

5.8 Atriale Apoptose

Der programmierte Zelltod (Apoptose) ist ein weiterer Mechanismus, der bei der Entstehung struktureller arrhythmogener Substrate für Vorhofflimmern beteiligt sein kann. Der Niedergang von Myozyten kann einen Einfluss auf die kontraktile und elektrophysiologischen Eigenschaften des Vorhofes haben⁵³. Die TUNEL-Methode diente der Untersuchung von apoptotischen Zellkernen und ermöglichte so eine Quantifizierung von Apoptose der Kardiomyozyten. Dabei wurden im Blickfeld des Mikroskops zunächst alle Zellen gezählt und danach der Anteil der TUNEL-positiv angefärbten Zellen bestimmt (**Abb. 18**).

Tunel-positive Zellen

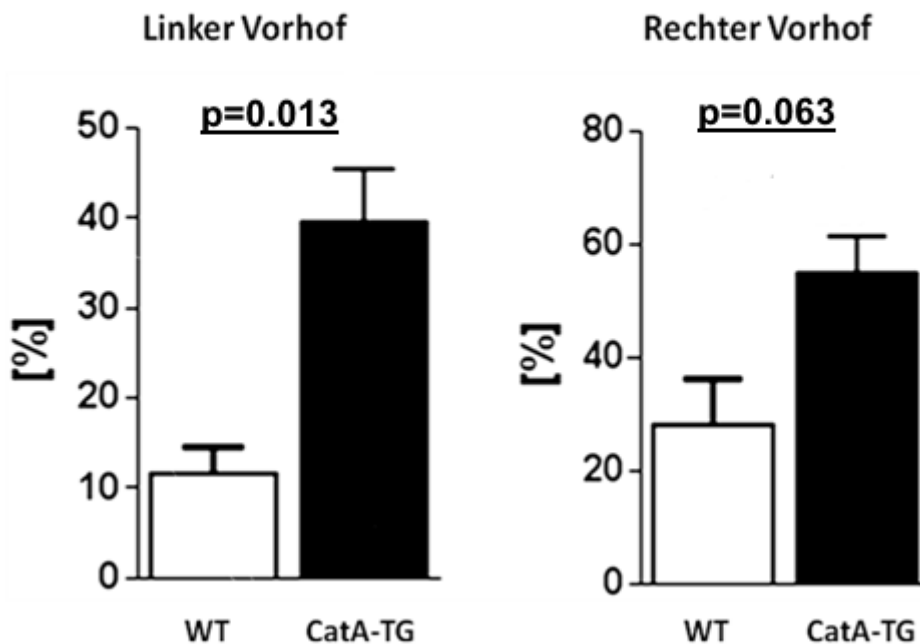


Abb. 18: Prozentualer Anteil TUNEL-positiver Zellen. Der Apoptosegehalt im Vorhof der CatA-transgenen Tiere (n=3) im Vergleich zum Wildtyp (n=3). Die Werte sind hier als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Die Auswertung der TUNEL-positiv gefärbten Zellen ergab, dass der Anteil apoptotischer Zellen in beiden Vorhöfen der CatA-transgenen Tiere im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist, wobei nur für den linken Vorhof eine Signifikanz erreicht wurde.

5.9 Induzierbare Vorhofflimmerdauer

Unsere bisherigen Daten konnten zeigen, dass die reine Überexpression von CatA im Vorhof zur Bildung potentieller arrhythmogener struktureller Substrate führte. Nun sollte mittels elektrischer „Burst-Stimulation“ über den Ösophagus die Induzierbarkeit und die Dauer von Vorhofflimmern analysiert werden (**Abb. 19**).

Vorhofflimmerdauer

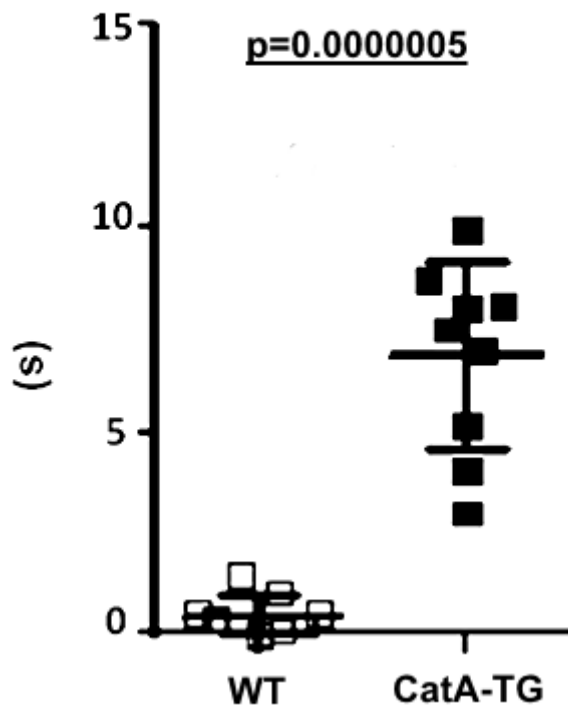


Abb. 19: Induzierbare Vorhofflimmerdauer in CatA-TG (n=9) und WT (n=9). Die Werte sind hier als Mittelwert \pm SD dargestellt.

In allen WT und CatA-TG Tieren ließen sich kurze Episoden von Vorhofflimmern induzieren. Die induzierbare Vorhofflimmerdauer war in den CatA-TG Tieren mit bis zu 10 Sekunden signifikant länger im Vergleich zu den Wildtyp Tieren, in welchen die induzierbare Vorhofflimmerdauer nur maximal 2 Sekunden anhielt (WT: 0.46 ± 0.1 Vs. CatA-TG: 6.82 ± 0.7 sec; $p < 0.001$).

6. Diskussion

6.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In unserem Rattenmodell für ventrikuläre Ischämie/Reperfusion wurde mittels einer Ligatur der linken anterioren deszendierenden Koronararterie eine 30-minütige Ischämie durchgeführt, gefolgt von einer 3-monatigen Reperfusion (sog. I/R-Modell). Es entstanden arrhythmogene atriale Substrate, welche insbesondere durch eine Zunahme des atrialen Fibrosegehaltes, einer reduzierten linksatrialen Entleerungsfunktion und einer deutlichen Verlängerung der induzierbaren Vorhofflimmerdauer gekennzeichnet waren.

Diese arrhythmogenen und strukturellen Veränderungen des Vorhofmyokards waren mit einer erhöhten Expression der Serin Carboxypeptidase Cathepsin A vergesellschaftet. Anhand des I/R-Modells sollte eine pharmakologische Inhibition der CatA-Aktivität durch den selektiven Inhibitor SAR durchgeführt werden, um die Rolle von CatA bei der Entstehung arrhythmogener Substrate genauer zu untersuchen. Unsere Daten zeigten, dass eine Inhibierung von CatA nicht nur die arrhythmogenen strukturellen Umbau-Prozesse im linken Vorhof verminderte, sondern auch die induzierbare Vorhofflimmerdauer, ein Marker für die Stabilität von Vorhofflimmern und die Verminderung der linksatrialen Entleerungsfunktion deutlich reduzierte. Auch in einem transgenen Mausmodell mit Kardiomyozyten-spezifischer CatA Überexpression konnte die Entstehung eines arrhythmogenen strukturellen Remodelings und arrhythmogener Substrate beobachtet werden.

6.2 Atriales Remodeling

Strukturelle und elektrophysiologische Umbauprozessen des Vorhofmyokards (sog. atriales Remodeling) können zu einem Auftreten und Aufrechterhalten von Vorhofflimmern führen. Strukturelle Veränderungen entstehen durch eine Zunahme des fibrotischen Gewebes und einer Hypertrophie der atrialen Kardiomyozyten, welche zu lokalen Fortleitungsstörungen im Vorhofmyokard führen (strukturelles

Remodeling). Vorhofflimmern selbst führt zu elektrophysiologischen Veränderungen, wie die Verkürzung des Aktionspotentials und somit der atrialen Refraktärzeit (elektrisches Remodeling)⁵⁴ und somit wird die Entstehung von Vorhofflimmern begünstigt.

In mehreren Studien wurde bereits das arrhythmogene Substrat im Vorhof von Ratten nach permanenter Koronarligatur untersucht. Untersucht wurde unter anderem auch die potentielle Rolle von MicroRNA-21 (miR-21), ein wichtiger Mediator in vielen kardialen Remodeling Prozessen besonders im kardialen fibrotischen Remodeling durch Herabregulation von Sprouty1, ein Protein welches die Fibroblastenproliferation unterdrückt. Atriales miR-21 knockdown unterdrückte die atriale Fibrosebildung und das Auftreten von Vorhofflimmern.⁵⁵

In der Klinik wird nach einem akuten Myokardinfarkt eine möglichst rasche Reperfusion mittels Herzkatheter angestrebt. Daher eignet sich das I/R Rattenmodell als Vergleich, da hier das abgeklemmte (nicht perfundierte) Gefäß nach einer gewissen Zeit wiedereröffnet wurde (durch öffnen der Klammer). Die atrialen strukturellen und arrhythmogenen Veränderungen des I/R Rattenmodells wurden bislang nicht genauer untersucht. Die Induktion einer Herzinsuffizienz durch eine ventrikuläre I/R führt zu einer Volumen- und Druckbelastung und schließlich zu strukturellen und funktionellen Umbauprozessen im Vorhof. Wir zeigten, dass sich das I/R-Modell in der Ratte zur Untersuchung der Entstehung arrhythmogener, struktureller Substrate von Vorhofflimmern eignet. Diese sind durch eine Zunahme des interstitiellen Fibrosegehaltes, durch eine Lateralisierung der Connexine und durch eine myokardiale Hypertrophie charakterisiert. Eine Erhöhung des atrialen interstitiellen Fibrosegehaltes und die Lateralisierung der Connexine führen zu einer zunehmenden Inhomogenität der lokalen Erregungsleitung und zu intra-atrialen Leitungsstörungen. Zusätzlich kann auch eine Zunahme der Zellgröße die Leitungsfähigkeit des Myokards beeinflussen, was zu einer Anisotropie der Erregungsleitung führt.⁵⁴ Entsprechend konnten wir durch elektrophysiologische Untersuchungen mittels epikardialer Mappingelektroden zeigen, dass die oben beschriebenen strukturellen Veränderungen mit einer verlängerten atrialen Aktivierungszeit und einem erhöhten Auftreten von lokalen Erregungsstörungen vergesellschaftet sind. Diese Fortleitungsstörungen bilden ein arrhythmogenes

Substrat für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Reentry-Kreisen und sind für die beobachtete Verlängerung der induzierbaren Vorhofflimmerepisoden verantwortlich.

Vergleichbare strukturelle atriale Veränderungen und atriale Fortleitungsstörungen konnten auch in verschiedenen Herzinsuffizienzmodellen beschrieben werden. Beispielsweise zeigte diese Veränderungen ein Hundeherzinsuffizienzmodell. In diesem Modell wurde durch eine 5-wöchige tachykarde Stimulation des Ventrikels eine Tachykardiomyopathie induziert. Dies führte zu strukturellen und funktionalen Veränderungen des Ventrikels. Zusätzlich konnte auch eine vermehrte Bildung von interstitieller Fibrose im Vorhof nachgewiesen werden, die zu einer Heterogenität der elektrischen Fortleitung führte und induziertes Vorhofflimmern stabilisieren konnte.¹³ Durch eine Aktivierung der Fibroblasten bei Herzinsuffizienz kommt es zu einer vermehrten atrialen Fibrosebildung, was bei der Aufrechterhaltung des Vorhofflimmerns beteiligt ist.⁵⁶

In I/R-Ratten konnten wir zum einen ein vermehrtes Auftreten von lokalen Fortleitungsstörungen und zum anderen eine Verlängerung der atrialen Refraktärzeit dokumentieren. Das durch Herzinsuffizienz induzierte atriale elektrische Remodeling unterscheidet sich grundsätzlich vom elektrischen Remodeling während des Vorhofflimmerns. Wohingegen das durch Herzinsuffizienz induzierte atriale Remodeling vor allem durch strukturelle Veränderungen charakterisiert ist, führt alleiniges Vorhofflimmern („lone-AF“) selbst zu einer rasch auftretenden und akut reversiblen Verkürzung der Refraktärzeit im Vorhof. Bei Ziegen, in welchen Vorhofflimmern durch einen implantierten Schrittmacher über mehrere Wochen aufrechterhalten wurde, konnten keine vergleichbar ausgeprägten fibrotischen Veränderungen im Vorhof erkannt werden.⁵⁷ Neben den ausgeprägten lokalen Fortleitungsstörungen ergab sich in den I/R-Ratten kein Hinweis auf ein klassisches elektrisches Remodeling im Sinne einer Verkürzung der Refraktärzeit.

6.3 Atriales kontraktiles Remodeling in I/R-Ratten

Ein erhöhter atrialer Fibrosegehalt bei I/R-Ratten war nicht nur mit der Entstehung arrhythmogener linksatrialer Substrate, sondern auch mit einer Beeinträchtigung der aktiven linksatrialen Entleerungsfunktion vergesellschaftet. Vergleichbare Ergebnisse wurden in einem Hundemodell mit fraktionierter Flächenbegrenzung (fractional area shortening) durch Echokardiographie festgestellt.⁵⁸ Die Funktion des Vorhofs ist wichtig für das optimale Herzvolumen und spielt eine Rolle in der Füllungs- und Dehnungsphase des Ventrikels in der Frühsystole, außerdem bestimmt es die Belastungstoleranz.

Die Veränderung der Entleerungsfunktion kann durch die Beeinträchtigung der systolischen und diastolischen Ventrikelpumpfunktion und den erhöhten enddiastolischen linksventrikulären Füllungsdruck bei Herzinsuffizienz zustande kommen. Zusätzlich gibt es experimentelle Hinweise, dass die Vorhoffdilataion und Herzinsuffizienz genauso wie das durch atriales Remodeling induzierte Vorhofflimmern mit einer existentiellen Veränderung des Calciumstromes im Vorhof assoziiert ist. Während kürzere Aktionspotentiale die Kontraktilität unter Vorhofflimmern vermindert, reduziert die Phosphorylierung der Myofilamente vermutlich die Kontraktilität des dilatierten herzinsuffizienten Vorhofs.^{59,60,61} Auch Veränderungen der Calcium-Homöostase könnten eine Rolle bei der reduzierten Entleerungsfunktion des Vorhofes spielen. Eine Reduktion des Serca2a (sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase type 2a) Protein Levels und Funktion wurde in Patienten mit Herzinsuffizienz mit einer reduzierten kardialen Kontraktilität in Zusammenhang gebracht.⁶² Die Herzmuskelzelle benötigt zur Aktivierung extrazelluläres Ca^{2+} . Dies strömt über spannungsgesteuerte Ca-Kanäle in die T-Tubuli ein. Der Großteil ($\approx 3/4$) des zytoplasmatischen Calciums des aktiven Myozyten stammt aus intrazellulären Speichern (dem sarkoplasmatischen Retikulum). Ca^{2+} -Ionen aktivieren die in der Wand des sarkoplasmatischen Retikulums sitzende RyR2 (ryanodine receptor 2) und setzen Ca^{2+} -Ionen frei. Die Wiederaufnahme von Ca^{2+} -Ionen in das sarkoplasmatische Retikulum erfolgt über die Ca^{2+} -Pumpe SERCA2a. In atrialen Myozyten sind die Ryanodinrezeptoren hauptsächlich longitudinal des sarkoplasmatischen Retikulums angeordnet. Allerdings können diese in insuffizienten Myozyten herunterreguliert und nach

junktional relokalisiert werden und liegen so näher an den L-Typ Calciumkanälen der Sarcolemma. Diese Umstrukturierung hat wichtige funktionelle Konsequenzen. Durch diese Anordnung erhöht sich die Frequenz der Calciumfreigabe aus den L-Typ Calciumkanälen. Hierdurch ist nicht nur die Kontraktilität im Vorhof beeinträchtigt, sondern es erhöht sich auch die Wahrscheinlichkeit proarrhythmischer Mechanismen, welche Vorhofflimmern auslösen können.^{6,63}

6.4 Regulation von Cathepsin A im Vorhof

Die Entstehung eines arrhythmogenen und funktionellen Remodelings im Vorhof von I/R-Ratten war mit einer erhöhten Expression von CatA vergesellschaftet. Interessanterweise führte die Hemmung der CatA Aktivität durch den selektiven CatA-Inhibitor SAR zu einer Verminderung des atrialen Fibrosegehaltes und der atrialen Hypertrophie der Myozyten. Die Verminderung der strukturellen Veränderungen in den SAR-therapierten I/R-Ratten war mit einer Reduzierung der lokalen Fortleitungsstörung im Vorhof, einer reduzierten induzierbaren Vorhofflimmerdauer und einer verbesserten atrialen Entleerungsfunktion assoziiert. Ähnliche rhythmisierende Effekte ließen sich durch den ACE-Hemmer Ramipril im gleichen Modell erreichen.

Wir konnten in unserem Labor eine vergleichbare erhöhte CatA-Expression einhergehend mit einer Heraufregulation des prohypertrophen Markers ANP "atrial natriuretic peptide" oder BNP "brain natriuretic peptide" bereits an anderen Schadensmodellen nachweisen. So ergab die explorative Analyse von humanem linksventrikulären Myokard von Patienten mit schwerer chronischer Herzinsuffizienz eine erhöhte Expression von CatA und ANP im Vergleich zu Myokard, welches von gesunden Spenderherzen stammte (unpubliziert). Ebenso konnten in einem Ratten Modell für Typ 2 Diabetes erhöhte Level von CatA nachgewiesen werden. Dies war ebenfalls vergesellschaftet mit einer erhöhten Induzierbarkeit von Vorhofflimmern.⁶⁴

Um den Einfluss einer selektiven kardialen Überexpression von CatA auf das atriale Remodeling und die Induzierbarkeit von Vorhofflimmern zu untersuchen, wurde ein transgenes Mausmodell zur Hilfe genommen. Eine Kardiomyozyten-spezifische Überexpression von CatA, in unserem transgenen Mausmodell führte zu einer

tendenziellen Erhöhung des atrialen Fibrosegehaltes aber zu keiner Größenzunahme der atrialen Kardiomyozyten. Die Heraufregulation des Hypertrophiemarkers BNP und die Herabregulation von Serca2a und des Ryanodin-Rezeptors deuten jedoch auf ein beginnendes atriales Remodeling hin. Trotz der nur schwach ausgeprägten strukturellen Veränderungen konnten wir eine deutliche Zunahme der induzierbaren Vorhofflimmerdauer feststellen.

Diese Daten unterstützen die Rolle von CatA bei der Entstehung eines arrhythmogenen und funktionellen Remodelings im Vorhof.

6.5 Mögliche Mechanismen

Cathepsine allgemein sind an der Degradation verschiedener intra- und extrazellulärer bioaktiver Peptide beteiligt und können so kardiale Remodeling Prozesse im Herzen steuern. Es wird diskutiert, dass CatA an der Spaltung des Vasodilatators und antihypertroph wirkende Bradikinin und der Produktion von Angiotensin II beteiligt ist. Angiotensin II trägt maßgeblich zur Bildung interstitieller Fibrose bei und fördert die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies.^{33,65} Das Renin Angiotensin Aldosteron System existiert zum einen als globales zirkulierendes System und zum anderen als lokales Gewebe gebundenes System. Wichtig ist, dass die lokale Angiotensin II Synthese einer ACE abhängigen und einer unabhängigen Regulation unterliegt. Andere Enzyme, die Angiotensinogen im Herzen spalten können, sind zum Beispiel die neutrale Gewebschymase, Endopeptidase oder verschiedene Cathepsine.⁶⁶ Es konnte gezeigt werden, dass CatA Angiotensinogen, im Gegensatz zu Renin, in einem sauren pH Bereich spaltet⁴⁸ und so Angiotensin II in einem zweistufigen Prozess mit Angiotensin I als Zwischenprodukt generiert. Bradikinin wird als ein weiteres Substrat von CatA beschrieben. Bradykinin zeigt einen positiv inotropen Effekt auf das Meerschweinchenherz⁶⁷ und eine Erhöhung von Bradykinin, welches hauptsächlich über den Bradykinin-B2-Rezeptor wirkt⁶⁸, zeigte eine vorteilhafte Neovaskulierung im ischämischen Gewebe, Verminderung der kardialen Hypertrophie und der Fibrose. Eine Reduzierung des Bradykinin Abbaus und der Angiotensin II Bildung durch eine pharmakologische Hemmung der CatA Aktivität durch den CatA-Inhibitor SAR könnte bei der Verminderung

arrhythmogener Substrate im Vorhof und der Erhaltung der linksatrialen Entleerungsfunktion in den SAR therapierten I/R Ratten beitragen.

6.6 Schlussfolgerung

Die Induktion einer Herzinsuffizienz in dem I/R-Rattenmodell führte zur Bildung arrhythmogener Substrate im Vorhof, welche durch eine Zunahme des atrialen Fibrosegehaltes, der atrialen Hypertrophie und Lateralisierung der Connexine, charakterisiert ist. Dies führte zu einer Zunahme der atrialen Fortleitungsstörungen, Verlängerung der atrialen Aktivierungszeit und einer längeren induzierbaren Vorhofflimmerdauer, verglichen mit Sham-operierten Tieren. Elektrisches Remodeling mit kurzen atrialen Refraktärzeiten spielt in diesem Rattenmodell keine entscheidende Rolle. Des Weiteren zeigte sich eine Reduktion der linksatrialen Entleerungsfunktion.

Dies ist die erste Studie, die experimentelle Beweise für den protektiven Effekt eines Cathepsin A Inhibitors SAR auf das atriale strukturelle und mechanische Vorhofremodeling und die atriale Arrhythmogenität in einem Herzinsuffizienz-Rattenmodell zeigt. Der Cathepsin A Inhibitor zeigte vergleichbare Effekte wie Ramipril konnte aber zusätzlich die linksatriale Fibrose reduzieren. Eine kardiale Überexpression von Cathepsin A in einem transgenen Mäusemodell führte zu einem strukturellen arrhythmogenen Substrat für Vorhofflimmern.

6.7 Klinische Relevanz

Bei Patienten mit einem hohen Risiko Vorhofflimmern zu entwickeln nimmt insbesondere die Prävention von Remodelingprozessen und die Behandlung der kardialen Grunderkrankung im Sinne einer "Upstream"-Therapie einen wichtigen Stellenwert ein. Unsere Studie weist auf eine vielversprechende Rolle einer pharmakologischen Inhibition von Cathepsin A bei Herzinsuffizienz hin. Die antiarrhythmischen Effekte und die Erhaltung der linksatrialen Auswurf Funktion ist vergleichbar mit Ramipril. Die Erhaltung der linksatrialen Funktionsparameter und die Reduktion der Anfälligkeit für das Auslösen von Vorhofflimmern bei I/R Ratten könnte

zu einer Verbesserung der Belastungstoleranz und zu einer Reduktion des thrombembolischen Risikos bei Herzinsuffizienz führen. Die Inhibition von Cathepsin A ist ein vielversprechendes Prinzip, um das globale kardiale Remodeling bei Herzinsuffizienz zu vermindern.

7. Literaturverzeichnis

1. Kannel WB, Wolf PA, Benjamin EJ, Levy D. Prevalence, incidence, prognosis, and predisposing conditions for atrial fibrillation: population-based estimates. *Am J Cardiol.* 1998; 82:2N-9N.
2. Go AS, Hylek EM, Phillips KA, Chang Y, Henault LE, Selby JV, Singer DE. Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the Anticoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *JAMA.* 2001; 285:2370-2375.
3. Feinberg WM, Blackshear JL, Laupacis A, Kronmal R, Hart RG. Prevalence, age distribution, and gender of patients with atrial fibrillation. Analysis and implications. *Arch Intern Med.* 1995; 155:469-473.
4. Genovesi S, Vincenti A, Rossi E, Pogliani D, Acquistapace I, Stella A, Valsecchi MG. Atrial fibrillation and morbidity and mortality in a cohort of long-term hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 2008; 51:255-262.
5. Miyasaka Y, Barnes ME, Gersh BJ, Cha SS, Seward JB, Bailey KR, Iwasaka T, Tsang TS. Time trends of ischemic stroke incidence and mortality in patients diagnosed with first atrial fibrillation in 1980 to 2000: report of a community-based study. *Stroke.* 2005; 36:2362–2366.
6. Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal. *Physiol Rev.* 2011; 91:265-325.
7. Peters KG, Kienzle MG. Severe cardiomyopathy due to chronic rapidly conducted atrial fibrillation: complete recovery after restoration of sinus rhythm. *Am J Med.* 1988; 85: 242-244.
8. Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, Garrigue S, Le Mouroux A, Le Métayer P, Clémenty J. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med.* 1998; 339:659-666.
9. Seccia TM, Belloni AS, Kreutz R, Paul M, Nussdorfer GG, Pessina AC, Rossi GP. Cardiac fibrosis occurs early and involves endothelin and AT-1 receptors in hypertension due to endogenous angiotensin II. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 41:666–673.
10. Purnomo Y, Piccart Y, Coenen T, Prihadi JS, Lijnen PJ. Oxidative stress and transforming growth factor- β 1-induced cardiac fibrosis. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2013; 13:165-172.
11. Polontchouk L, Haefliger JA, Ebelt B, Schaefer T, Stuhlmann D, Mehlhorn U, Kuhn-Regnier F, De Vivie ER, Dhein S. Effects of chronic atrial fibrillation on gap junction distribution in human and rat atria. *J Am Coll Cardiol.* 2001; 38:883-891.

12. Cardin S, Libby E, Pelletier P, Le Bouter S, Shiroshita-Takeshita A, Le Meur N, Léger J, Demolombe S, Ponton A, Glass L, Nattel S. Contrasting gene expression profiles in two canine models of atrial fibrillation. *Circ Res.* 2007; 100:425-433.
13. Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort, *Circulation.* 1999; 100:87-95.
14. Wijffels MCEF, Kirchhof CJHJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation, a study in awake chronically instrumented goats. *Circulation.* 1995; 92:1954-1968.
15. Lu Z, Scherlag BJ, Lin J, Niu G, Fung KM, Zhao L, Ghias M, Jackman WM, Lazzara R, Jiang H, Po SS. Autonomic Mechanism for Atrial Electrical Remodeling Induced by Short-Term Rapid Atrial Pacing. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2008; 1:184–192.
16. Yamashita T, Murakawa Y, Hayami N, Fukui Ei, Kasaoka Y, Inoue M, Omata M. Short-term effects of rapid pacing on mRNA level of voltage-dependent K(+) channels in rat atrium: electrical remodeling in paroxysmal atrial tachycardia. *Circulation.* 2000; 101: 2007-2014.
17. Ausma J, van der Velden HM, Lenders MH, van Ankeren EP, Jongsma HJ, Ramaekers FC, Borgers M, Allessie MA. Reverse structural and gap-junctional remodeling after prolonged atrial fibrillation in the goat. *Circulation.* 2003; 107:2051-2058.
18. Wu TJ, Yashima M, Xie F, Athill CA, Kim YH, Fishbein MC, Qu Z, Garfinkel A, Weiss JN, Karagueuzian HS, Chen PS. Role of pectinate muscle bundles in the generation and maintenance of intra-atrial reentry: potential implications for the mechanism of conversion between atrial fibrillation and atrial flutter. *Circ Res.* 1998; 83:448-462.
19. Fareh S, Villemaire C, Nattel S. Importance of refractoriness heterogeneity in the enhanced vulnerability to atrial fibrillation induction caused by tachycardia-induced atrial electrical remodeling. *Circulation.* 1998; 98:2202-2209.
20. Weber KT, Pick R, Jalil JE, Janicki JS, Carroll EP. Patterns of myocardial fibrosis. *J Mol Cell Cardiol.* 1989; 21:121-131.
21. Verheule S, Tuyls E, Gharaviri A, Hulsmans S, van Hunnik A, Kuiper M, Serroyen J, Zeemering S, Kuijpers NH, Schotten U. Loss of continuity in the thin epicardial layer because of endomysial fibrosis increases the complexity of atrial fibrillatory conduction. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2013; 6:202-211.
22. Spach MS, Heidlage JF, Barr RC, Dolber PC. Cell size and communication: role in structural and electrical development and remodeling of the heart. *Heart Rhythm.* 2004; 1:500-515.
23. Burnstein BLE, Calderone A, Nattel S. Differential behaviors of atrial versus ventricular fibroblasts: a potential role for platelet-derived growth factor in atrial-ventricular remodeling differences. *Circulation.* 2008; 117:1630-1641.

24. Frustaci A, Chimenti C, Bellocci F, Morgante E, Russo MA, Maseri A. Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. *Circulation*. 1997; 96:1180-1184.
25. Cavalera M, Wang J, Frangogiannis NG. Obesity, metabolic dysfunction, and cardiac fibrosis: pathophysiological pathways, molecular mechanisms, and therapeutic opportunities. *Transl Res*. 2014; 164:323-335.
26. Ambale-Venkatesh B, Lima JA. Cardiac MRI: a central prognostic tool in myocardial fibrosis. *Nat Rev Cardiol*. 2014; 12:18-29.
27. Yasue H, Yoshimura M, Sumida H, Kikuta K, Kugiyama K, Jougasaki M, Ogawa H, Okumura K, Mukoyama M, Nakao K. Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation*. 1994; 90:195-203.
28. Söhl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res*. 2004; 62:228–232.
29. Rucker-Martin C, Milliez P, Tan S, Decrouy X, Recouvreur M, Vranckx R, Delcayre C, Renaud JF, Dunia I, Segretain D, Hatem SN. Chronic hemodynamic overload of the atria is an important factor for gap junction remodeling in human and rat hearts. *Cardiovasc Res*. 2006; 72:69-79.
30. Aumailley M, Gayraud B. Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med (Berl)*. 1998; 76:253-265.
31. Borg TK, Caulfield JB. The collagen matrix of the heart. *Fed Proc*. 1981; 40:2037-2041.
32. Gómez-Garre D, Ruiz-Ortega M, Ortego M, Largo R, López-Armada MJ, Plaza JJ, González E, Egido J. Effects and interactions of endothelin-1 and angiotensin II on matrix protein expression and synthesis and mesangial cell growth. *Hypertension*. 1996; 27:885-892.
33. Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev*. 2000; 52:11-34.
34. van Kats JP, Duncker DJ, Haitsma DB, Schuijt MP, Niebuur R, Stubenitsky R, Boomsma F, Schalekamp MA, Verdouw PD, Danser AH. Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade prevent cardiac remodeling in pigs after myocardial infarction: role of tissue angiotensin II. *Circulation*. 2000; 102:1556-1563.
35. Pérez-Girón JV, Palacios R, Martín A, Hernanz R, Aguado A, Martínez-Revelles S, Barrús MT, Salices M, Alonso MJ. Pioglitazone reduces angiotensin II-induced COX-2 expression through inhibition of ROS production and ET-1 transcription in vascular cells from spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014; 11:1582-1593.

36. Matés JM, Sánchez-Jiménez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci.* 1999; 4:339-345.
37. Loscalzo J. Oxidant stress: a key determinant of atherothrombosis. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31:1059-1061.
38. Cheng XW, Shi GP, Kuzuya M, Sasaki T, Okumura K, Murohara T. Role for cysteine protease cathepsins in heart disease: focus on biology and mechanisms with clinical implication. *Circulation.* 2012; 125:1551-1562.
39. Stypmann J, Gläser K, Roth W, Tobin DJ, Petermann I, Matthias R, Mönnig G, Haverkamp W, Breithardt G, Schmahl W, Peters C, Reinheckel T. Dilated cardiomyopathy in mice deficient for the lysosomal cysteine peptidase cathepsin L. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99:6234-6239.
40. Cheng XW, Obata K, Kuzuya M, Izawa H, Nakamura K, Asai E, Nagasaka T, Saka M, Kimata T, Noda A, Nagata K, Jin H, Shi GP, Iguchi A, Murohara T, Yokota M. Elastolytic cathepsin induction/activation system exists in myocardium and is upregulated in hypertensive heart failure. *Hypertension.* 2006; 48:979-987.
41. Ruf S, Buning C, Schreuder H, Linz W, Hübschle T, Linz D, Ruetten H, Wirth K, Sadowski T. Inhibition of CatA: an emerging strategy for the treatment of heart failure. *Future Med Chem.* 2013; 5:399-409.
42. Zhou XY, Morreau H, Rottier R, Davis D, Bonten E, Gillemans N, Wenger D, Grosveld FG, Doherty P, Suzuki K, Grosveld GV, d'Azzo A. Mouse model for the lysosomal disorder galactosialidosis and correction of the phenotype with overexpressing erythroid precursor cells. *Genes Dev.* 1995; 9:2623-2634.
43. Skidgel RA, Erdös EG. Cellular carboxypeptidases. *Immunol Rev.* 1998; 161:129-141.
44. Hiraiwa M. Cathepsin A/protective protein: an unusual lysosomal multifunctional protein. *Cell Mol Life Sci.* 1999; 56:894-907.
45. Sadoshima J, Izuma S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of AT1 receptor subtype. *Circ Res.* 1993; 73:413-423.
46. Johar S, Cave AC, Narayanapanicker A, Grieve DJ, Shah AM. Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. *FASEB J.* 2006; 20:1546-1548.
47. Jackman HL, Massad MG, Sekosan M, Tan F, Brovkovich V, Marcic BM, Erdös EG. Angiotensin 1-9 and 1-7 release in human heart: role of cathepsin A. *Hypertension.* 2002; 39:976-981.
48. Linz W, Schölkens BA. A specific B2-bradykinin receptor antagonist HOE 140 abolishes the antihypertrophic effect of ramipril. *Br J Pharmacol.* 1992; 105:771-772.

49. Nolly HL, Saed G, Scicli G, Carretero OA, Scicli AG. The kallikrein-kinin system in cardiac tissue. *Agents Actions Suppl.* 1992; 38:62-72.
50. Tschöpe C, Westermann D. Development of diabetic cardiomyopathy and the kallikrein-kinin system—new insights from B1 and B2 receptor signaling. *Biol Chem.* 2008; 389:707-711.
51. Ruf S, Buning C, Schreuder H, Horstick G, Linz W, Olpp T, Pernerstorfer J, Hiss K, Kroll K, Kannt A, Kohlmann M, Linz D, Hübschle T, Rütten H, Wirth K, Schmidt T, Sadowski T. Novel beta-amino acid derivatives as inhibitors of Cathepsin A. *J Med Chem.* 2012; 55:736-749.
52. Vollmann D, Blaauw Y, Neuberger HR, Schotten U, Allessie M. Long-term changes in sequence of atrial activation and refractory periods: no evidence for "atrial memory". *Heart Rhythm.* 2005; 2:155-161.
53. Allessie MA, Boyden PA, Camm AJ, Kléber AG, Lab MJ, Legato MJ, Rosen MR, Schwartz PJ, Spooner PM, Van Wagoner DR, Waldo AL. Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation. *Circulation* 2001; 103:769-777.
54. Allessie M, Ausma J, Schotten U. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 2002; 54:230-246.
55. Cardin S, Guasch E, Luo X, Naud P, Le Quang K, Shi Y, Tardif JC, Comtois P, Nattel S. Role for microRNA-21 in atrial profibrillatory fibrotic remodeling associated with experimental postinfarction heart failure. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2012; 5:1027-1035.
56. Aguilar M, Qi XY, Huang H, Comtois P, Nattel S. Fibroblast electrical remodeling in heart failure and potential effects on atrial fibrillation. *Biophys J.* 2014; 107:2444-2455.
57. Ausma J, Wijffels M, Thone F, Wouters L, Allessie M, Borgers M. Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat. *Circulation.* 1997; 96:3157-3163.
58. Shi Y, Li D, Tardif JC, Nattel S. Enalapril effects on atrial remodeling and atrial fibrillation in experimental congestive heart failure. *Cardiovasc Res.* 2002; 54:456-461.
59. Greiser M, Neuberger HR, Harks E, El-Armouche A, Boknik P, de Haan S, Verheyen F, Verheule S, Schmitz W, Ravens U, Nattel S, Allessie MA, Dobrev D, Schotten U. Distinct contractile and molecular differences between two goat models of atrial dysfunction: AV block-induced atrial dilatation and atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol.* 2009; 46:385-394.
60. Yeh YH, Wakili R, Qi XY, Chartier D, Boknik P, Kaab S, Ravens U, Coutu P, Dobrev D, Nattel S. Calcium-handling abnormalities underlying atrial arrhythmogenesis and contractile dysfunction in dogs with congestive heart failure. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2008; 1:93-102.

61. Schotten U, Duytschaever M, Ausma J, Eijbouts S, Neuberger HR, Allessie M. Electrical and contractile remodeling during the first days of atrial fibrillation go hand in hand. *Circulation*. 2003; 107:1433-1439.
62. Lipskaia L, Chemaly ER, Hadri L, Lompre AM, Hajjar RJ. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase as a therapeutic target for heart failure. *Expert Opin Biol Ther*. 2010; 10:29-41.
63. Carnes CA, Janssen PM, Ruehr ML, Nakayama H, Nakayama T, Haase H, Bauer JA, Chung MK, Fearon IM, Gillinov AM, Hamlin RL, Van Wagoner DR. Atrial glutathione content, calcium current, and contractility. *J Biol Chem*. 2007; 282:28063–28073.
64. Linz D, Hohl M, Dhein S, Ruf S, Verheule S, Böhm M, Sadowski T, Schotten U. Cathepsin A inhibition reduces susceptibility to atrial tachyarrhythmia and protects atrial emptying function in Zucker diabetic fatty rats. *Cardiovasc Res*. 2016; 110:371-380.
65. Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res*. 1993; 73:413-23.
66. Steckelings UM, Rompe F, Kaschina E, Unger T. The evolving story of the RAAS in hypertension, diabetes and CV disease: moving from macrovascular to microvascular targets. *Fundam Clin Pharmacol*. 2009; 693-703.
67. Manzini S, Perretti F, De Benedetti L, Pradelles P, Maggi CA, Geppetti P. A comparison of bradykinin- and capsaicin-induced myocardial and coronary effects in isolated perfused heart of guinea-pig: involvement of substance P and calcitonin gene-related peptide release. *Br. J. Pharmacol*. 1989; 97: 303-312.
68. Prado GN, Taylor L, Zhou X, Ricupero D, Mierke DF, Polgar P. Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B2 and B1 receptors. *J Cell Physiol*. 2002;193:275-286.

8. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb	Abbildung
ACE	Angiotensin Converting Enzym
AF	Atrial fibrillation/ Vorhofflimmern
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
ANP	Atrial natriuretic peptide
Aqua dest	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
Aquatex	Eindeckmittel
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	Brain natriuretic peptide
°C	Grad Celsius
ca	Circa
Ca	Calcium
CatA	Cathepsin A
CHF	Congestive heart failure
Ct	Cycle Threshold
Cyt	Cytosol
Cx40,Cx43, Cx45	Connexin 40,43,45
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosid-triphosphate
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FRET	Fluorescence resonance energy

GAPDH	Glycerinaldehyd-3`Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes Wasser
HTS	High throughput screen
kg, g, mg, µg	Kilogramm, Gramm, Milligramm, Mikrogramm
I/R	Ischämie und Reperfusion
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LA	linksatrial
LAD	linke anteriore descendierende Koronararterie
LV	linksventrikulär
LVedP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
M, mM, µM	Molar, Millimolar, Mikromolar
MAP	monophasische Aktionspotential
min	Minute
mm, µm, nm	Millimeter, Mikrometer, Nanometer
miR	micro RNA
n	Anzahl
PBS	Phosphat buffered saline
RNA	Ribonukleinsäure
RyR2	Ryanodin Rezeptor 2
PCR	Real-Time-Polymerase Chain Reaction
SAR	Sanofi Aventis Research. Chemische Formel: (S)-3-{{1-(2-Fluorophenyl)-5-methoxy-1H-pyrazole-3-carbonyl}amino}-3-(2-ethylphenyl)propionic Acid

Serca2A	Calciumpumpe des sarcoplasmatischen und endoplasmatischen Reticulums 2A
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
TGF β	Transforming growth factor beta

9. Präsentationen/ Abstracts/ Publikation

Abstract/Präsentation

1. **Erb K**, Hohl M, Neuberger HR, Huebschle T, Sadowski T, Böhm M, Schotten U, Linz D. (2014)
Cathepsin A-inhibitor reduces susceptibility to atrial tachyarrhythmias and attenuates impairment of left atrial emptying function parameters in rats with myocardial ischemia/reperfusion.
Clinical Research in Cardiology 103, Suppl 1, April 2014, P434.
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie: Poster Präsentation.
2. Linz D, Hohl M, **Erb K**, Hübschle T, Sadowski T, Neuberger HR, Dhein S, Böhm M, Schotten U. (2014)
Cathepsin A-inhibitor reduces susceptibility to atrial tachyarrhythmias and attenuates impairment of left atrial emptying function parameters in rats with myocardial ischemia/reperfusion.
European Heart Journal 2014, 35 (Abstract Supplement), 258
Jahrestagung der European Society of Cardiology: Poster Präsentation.
3. Hohl M, **Erb K**, Neuberger HR, Sadowski T, Hübschle T, Dhein S, Böhm M, Schotten U, Linz D. (2014)
Cathepsin A-inhibitor attenuates development of an atrial arrhythmogenic substrate and preserves left atrial emptying function parameters in rats with myocardial ischemia/reperfusion.
Clinical Research in Cardiology 103 Suppl 2, Oktober 2014. BS21.
Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie: Poster Präsentation.
4. Linz D, Hohl M, Nickel A, **Erb K**, Linz W, Ruf S, Maack C, Sadowski T, Schotten U, Böhm M. (2015)
Role of the serine carboxypeptidase cathepsin a in the heart.
HFA Winter Meeting on Translational Heart Failure Research 2015. Les Diablerets, Switzerland, P18. Poster Präsentation.
5. Hohl M, Nickel A, Ruf S, **Erb K**, Maack C, Böhm M, Sadowski T, Linz D. (2015)
The serine carboxypeptidase cathepsin a increases atrial fibrillation susceptibility.
Clinical Research in Cardiology 104, Suppl 2, Oktober 2015. BS57.
Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie: Poster Präsentation.

Publikation

1. Hohl M, Mayr M, Lang L, Nickel A, Mueller A, Reil J, Speer T, **Erb K**, Barallobre-Barreiro J, Yin X, Ruf S, Fries P, Wagner M, Huebschle T, Böhm M, Maack C, Sadowski T, Linz D. (2017) Serine carboxypeptidase cathepsin A is upregulated in cardiac disease and cleaves the extracellular superoxide dismutase.
Manuskript submitted und under review.
2. Hohl M, **Erb K**, Lang L, Ruf S, Hübschle T, Sadowski T, Dhein S, Böhm M, Sanders P, Schotten U, Linz D. Pharmacological Cathepsin A inhibition reduced susceptibility to atrial tachyarrhythmia and impairment of atrial emptying function in rats with myocardial ischemia/reperfusion.
Manuskript submitted und under review.

11. Danksagung

Zum Abschluss meiner Arbeit bedanke ich mich sehr bei meinem Doktorvater Professor Dr. med. Michael Böhm für die Überlassung dieses interessanten Themas. Außerdem möchte ich mich besonders bei meinen zwei Betreuern Dr. Dr. Dominik Linz und Dr. Mathias Hohl bedanken für das Ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit. Beide haben mich tatkräftig unterstützt und standen mir zu jederzeit als Ansprechpartner zur Verfügung.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des kardiologischen Forschungslabors, insbesondere der medizinisch-technischen Assistentin Kathrin Gaspard und Jeannette Zimolong für ihren jederzeit tatkräftigen Beistand und der freundlichen Zusammenarbeit.

Zudem danke ich meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht und somit den Weg für diese Arbeit geebnet haben.

12. Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, welche ich in der Arbeit angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Arbeiten entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.