

Innere Medizin – Experimentelle Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes  
Prof. Dr. med. U. Laufs

Die Bedeutung der Rac1-GTPase und des  
Mineralocorticoid-Rezeptors für strukturelles  
Remodeling bei Vorhofflimmern

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*  
**der Medizinischen Fakultät**  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2018.

vorgelegt von: Pia Rebekka Schuster  
geboren am 11.09.1989 in Stuttgart - Bad Cannstatt



# Inhaltsverzeichnis:

<b>1. Zusammenfassung</b> .....	8
1.1 Rolle des Mineralocorticoid-Rezeptors und Rac1 für strukturelles Remodeling bei Vorhofflimmern .....	8
1.2 The role of the mineralocorticoid-receptor and Rac1 for structural remodeling in atrial fibrillation.....	10
<b>2. Einleitung und eigene Fragestellung</b> .....	<b>12</b>
2.1 Definition, Ätiologie und Epidemiologie von Vorhofflimmern .....	12
2.2 Diagnostik und Therapie von Vorhofflimmern.....	12
2.3 Erregung des Vorhofmyokards .....	14
2.4 Remodeling bei Vorhofflimmern .....	15
2.5 Aufbau des Vorhofs und molekularbiologische Vorgänge .....	15
2.6 Rolle des Mineralocorticoid-Rezeptors und des Renin-Angiotensin-Aldosteron Kreislaufs bei Vorhofflimmern.....	16
2.7 Rolle der 11- $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Typ-2 bei Vorhofflimmern.....	17
2.8 Rac1-GTPase und NADPH Oxidase.....	17
2.9 Eigene Fragestellung .....	18
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
3.1 Isolation von neonatalen Kardiomyozyten von Ratten sowie Gewinnung von Fibroblasten.....	19
3.2 Kultivierung neonataler kardialer Rattenfibroblasten .....	20
3.3 Färbung von Fibroblasten.....	21

3.4 Transgenes Tiermodell RacET .....	22
3.5 Sirius Red Färbung.....	22
3.6 Western Blot.....	22
3.6.1 Proteinbestimmung nach Lowry.....	23
3.6.2 Gelelektrophorese.....	23
3.6.3 Blotten .....	24
3.6.4 Inkubation des Antikörpers .....	24
3.6.5 Inkubation des Sekundärantikörpers .....	25
3.6.6 Entwickeln der Membranen .....	25
3.6.7 Auswertung.....	25
3.7 RNA Isolation aus Gewebe und Zellen.....	25
3.7.1 Umwandlung von RNA in cDNA .....	26
3.7.2 PCR.....	27
3.7.3 DNA Gel.....	28
3.7.4 Auswertung.....	28
3.8 Hydroxyprolin Assay .....	29
3.9 Erstellung eines EKG von RacET und Wildtyp Mäusen .....	29
3.10 Material .....	30
3.10.1 Geräte/Materialien.....	30
3.10.2 Software.....	31
3.10.3 Enzyme und Kits .....	31
3.10.4 Puffer und Lösungen .....	31
3.10.5 Antikörper.....	32
3.10.6 Verbrauchsmaterial.....	33
3.10.7 Chemikalien.....	33

<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
4.1 Phänotyp der RacET Mäuse .....	35
4.2 Fibrose bei RacET Mäusen .....	37
4.3 Prävalenz von Vorhofflimmern bei RacET Mäusen .....	38
4.4 Expression des Mineralocorticoid-Rezeptors bei RacET Mäusen .....	40
4.5 Expression von 11- $\beta$ -HSD-Typ-2 bei RacET Mäusen.....	43
4.6 Expression von CTGF bei RacET Mäusen .....	46
4.7 Aldosteron-abhängige CTGF-Expression in kardialen Fibroblasten .....	49
4.8 Regulation der CTGF-Proteinexpression und des Hydroxyprolin-Gehaltes durch Aldosteron .....	51
4.9 Regulation der CTGF-Expression in kardialen Fibroblasten .....	54
4.10 Mineralocorticoid-Rezeptor-Translokation in kardialen Fibroblasten.....	57
4.11 Aldosteron-Angiotensin II-Interaktionen .....	59
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>62</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>67</b>
<b>7. Publikationen.....</b>	<b>75</b>
7.1 Publikationen.....	75
7.2 Abstracts .....	75
7.3 Danksagung .....	76
<b>8. Lebenslauf.....</b>	<b>77</b>

## Abkürzungsverzeichnis

11- $\beta$ -HSD-Typ-2	11- $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Typ-2
ACE	Angiotensin-converting enzyme
Aldo	Aldosteron
Ang II	Angiotensin II
AT1 Rezeptor	Angiotensin II Rezeptor Typ A1
AT2 Rezeptor	Angiotensin II Rezeptor Typ A2
Aqua dest.	destilliertes Wasser
$^{\circ}$ C	Grad Celcius
CMC	Kardiomyozyten
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FVBN	Wildtyp Mäuse
g, mg, $\mu$ g, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
l, ml, $\mu$ l	Liter, Milliliter, Mikroliter
LA	linkes Atrium
LV	linker Ventrikel
M, mM, $\mu$ M, nM	Molar, Millimolar, Mikromolar, Nanomolar
min	Minute
MR	Mineralocorticoid-Rezeptor
mRNA	messenger ribonucleic acid
NCF	neonatale cardiale Fibroblasten
NSC23766	Rac1 small molecular inhibitor
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion

RacET	transgene Mäuse mit Überexpression von konstitutiv aktivem Rac1
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
mean+/-SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
VHF	Vorhofflimmern
WT	Wildtyp

# 1. Zusammenfassung

## 1.1 Rolle des Mineralocorticoid-Rezeptors und Rac1 für strukturelles Remodeling bei Vorhofflimmern

Vorhofflimmern ist eine Erkrankung mit hoher Prävalenz in der Bevölkerung. Die Hintergründe des Remodelings bei Vorhofflimmern sind jedoch bisher nur unzureichend erforscht. In dieser Arbeit wurde die Rolle des Mineralocorticoid-Rezeptors und von Rac1 bezüglich dem strukturellen Remodeling bei Vorhofflimmern untersucht.

Bei transgenen Mäusen mit einer herzspezifischen Überexpression von konstitutiv aktivem Rac1 (RacET) zeigte sich eine altersabhängige Gewichtszunahme der linken Vorhöfe im Vergleich zum linken Ventrikel (5,4 +/- 0,5% beim Wildtyp im Vergleich zu RacET 12, 8,3 +/- 0,8% ( $p < 0,05$ )) sowie im Vergleich zur Tibialänge (0,3 +/- 0,02mg/mm beim Wildtyp im Vergleich zu RacET 12, 0,43 +/- 0,02mg/mm ( $p < 0,05$ )). 43% der 6 Monate alten RacET Mäuse (RacET 6) und 77% der 12 Monate alten RacET Mäuse (RacET 12) entwickelten supraventrikuläre Arrhythmien. Dies zeigt eine altersabhängige Prävalenz. Die RacET Mäuse wiesen vermehrte Fibrose in den Vorhöfen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollmäusen auf (CTGF-Expression: 142 +/- 6,4%,  $p < 0,01$  im Vergleich zum Wildtyp). Ebenso zeigte sich eine erhöhte CTGF-Expression auf RNA Ebene im linken Atrium bei RacET im Vergleich zum Wildtyp (RacET 12, 149 +/- 14%,  $p < 0,05$ ). Der Mineralocorticoid-Rezeptor wurde weder im Ventrikel noch im Atrium im Vergleich zum Wildtyp vermehrt exprimiert. Es zeigte sich jedoch eine Überexpression der 11- $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Typ-2 im Atrium und Ventrikel (Atrium: RacET 12, 665 +/- 189%,  $p < 0,05$ , im Vergleich zum Wildtyp; Ventrikel: RacET 12, 452 +/- 120%,  $p < 0,05$ , im Vergleich zum Wildtyp).

In Zellkulturexperimenten mit kardialen Fibroblasten kam es zu einer Aldosteron-abhängigen CTGF-Überexpression (1nM Aldosteron: 144 +/- 11% ( $p < 0,05$ ), 10nM: 165 +/- 23% ( $p < 0,01$ ) und 100nM: 183 +/- 10% ( $p < 0,001$ )). Durch Zugabe von Cortisol konnte die Aldosteron-induzierte CTGF-Überexpression bei Kardiomyozyten verhindert werden (Aldosteron: 141 +/- 12% vs. Aldosteron und Cortisol 72 +/- 8%,  $p < 0,01$ ).

Um die molekulare Interaktion zwischen Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten zu untersuchen, wurden die Fibroblasten mit dem Medium der Kardiomyozyten behandelt. Auch hier induzierte Aldosteron die Kollagenproduktion, welche durch Hydroxyprolin gemessen wurde (154 +/- 12%,  $p < 0,001$ ). Der Effekt ließ sich durch die Vorbehandlung mit Cortisol aufheben (114 +/- 12%,  $p < 0,05$ ).

Die bei kardialen Fibroblasten erhöhte CTGF-Expression durch Aldosteron war auf Proteinebene durch die Behandlung mit dem Rac1-Inhibitor NSC23766 (39 +/- 2,8%,  $p < 0,05$ ), den MR-Antagonisten Spironolacton und BR-4628 (Spironolacton: 51 +/- 15%,  $p < 0,05$ ; BR-4628: 59 +/- 17%,  $p < 0,05$ ) sowie durch den AT1-Rezeptorblocker Telmisartan veränderbar (97 +/- 11%;  $p < 0,05$ ).

Aldosteron und Angiotensin II zeigten eine synergistische Wirkung auf die CTGF-Proteinexpression (175 +/- 21%,  $p < 0,001$ ).

In einer immunhistochemischen Färbung von Fibroblasten konnte durch die Behandlung mit Aldosteron eine Translokation des Mineralocorticoid-Rezeptors in den Zellkern gezeigt werden (Verhältnis Zellkern/Zellplasma: MR 0,84 +/- 19,  $p < 0,05$  im Vergleich ohne Behandlung 0,07 +/- 0,02). Dies entspricht einer Aktivierung des Rezeptors. Dieser Effekt war durch Vorbehandlung mit Spironolacton oder NSC23766 veränderbar (Aldosteron mit Spironolacton: 0,25 +/- 0,08,  $p < 0,05$ ; Aldosteron mit NSC23766: 0,21 +/- 0,05,  $p < 0,05$ ).

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Überexpression von Rac1 das Auftreten supraventrikulärer Arrhythmien prädisponiert und mit einer Überexpression von 11- $\beta$ -HSD-Typ-2 sowie einer CTGF-Expression assoziiert ist. Die Aktivierung des Mineralocorticoid-Rezeptors führt Rac1-abhängig in kultivierten kardialen Fibroblasten zu strukturellem Remodeling. Die pharmakologische Inhibition von Rac1 und des Mineralocorticoid-Rezeptors stellen daher mögliche therapeutische Ansatzpunkte dar, um die Entstehung von strukturellem Remodeling, als Prädisposition für das Auftreten von Vorhofflimmern, zu verhindern.

## 1.2. Role of the mineralocorticoid-receptor and Rac1 for structural remodeling in atrial fibrillation

Atrial fibrillation has a high prevalence in the population. The backgrounds of structural remodeling in atrial fibrillation are still not completely understood. The aim of this study was to analyse the role of the mineralocorticoid-receptor and of Rac1 concerning the structural remodeling in atrial fibrillation.

In transgenic mice with a cardiac overexpression of constitutive active Rac1 (RacET) there was an age-dependant weight gain of the left atria compared to the left ventricle (5.4 +/- 0.5% wild type versus RacET 12, 8.3 +/- 0.8% ( $p < 0.05$ )) and to the length of the tibia (0.3 +/- 0.02 mg/mm wild type versus RacET 12, 0.43 +/- 0.02 mg/mm ( $p < 0.05$ )). 43% of the 6 month old RacET mice (RacET 6) and 77% of the twelve month old RacET mice (RacET 12) developed supraventricular arrhythmia. This shows an age-dependant prevalence. The RacET mice had an increase of fibrosis in the atria compared to the wild type mice (CTGF expression: 142 +/- 6.4%,  $p < 0.01$  versus wild type mice). Also an elevated CTGF gene expression was detected in the left atria of the RacET mice (RacET 12, 149 +/- 14%,  $p < 0.05$  versus wild type). There was no higher expression of the mineralocorticoid-receptor, neither in the ventricle nor in the atria compared to the wild type. An upregulation of 11- $\beta$ -HSD-type-2 could be shown in the ventricle and in the atria (Atria: RacET 12, 665 +/- 189%,  $p < 0.05$  versus wild type; ventricle: RacET 12, 452 +/- 120%,  $p < 0.05$ ).

In cell culture experiments with cardiac fibroblasts an aldosterone dependent CTGF expression could be detected (aldosterone dependent CTGF expression: 1nM aldosterone: 144 +/- 11%,  $p < 0.05$ , 10nM: 165 +/- 23%,  $p < 0.01$ , 100nM: 183 +/- 10%,  $p < 0.001$ ). The overexpression of CTGF through aldosterone in cardiomyocytes was diminished by cortisol (Aldosterone: 141 +/- 12% versus aldosterone and cortisol 72 +/- 8%,  $p < 0.01$ ).

To analyse the molecular interaction between cardiomyocytes and cardiac fibroblasts, the fibroblasts were treated with the medium of the cardiomyocytes. Also here a higher production of collagen in form of hydroxyproline was shown in the presence of aldosterone (154 +/- 12%,  $p < 0.001$ ). The effect was diminished through the preincubation with cortisol (114 +/- 12%,  $p < 0.05$ ).

Cardiac fibroblasts showed an increased CTGF protein expression when they were stimulated with aldosterone. This effect could be inhibited with the Rac1 inhibitor NSC23766 (39 +/-

2.8%,  $p < 0.05$ ), with the MR antagonists spironolactone und BR-4628 (spironolactone: 51 +/- 15%  $p < 0.05$ ; BR-4628: 59 +/- 17%,  $p < 0.05$ ) or with the AT1- receptor blocker telmisartan (97 +/- 11 %,  $p < 0.05$ ).

Aldosterone and angiotensin II showed a synergistic effect concerning the CTGF protein expression (175 +/- 21%,  $p < 0.001$ ).

In the immunofluorescence staining of fibroblasts a translocation of the MR into the core of the cell occurred in the presence of aldosterone (relation core/plasma: MR 0.84 +/- 19,  $p < 0.05$  versus no treatment: 0.07 +/- 0.02). This equals the activation of the receptor. This effect could be avoided through preincubation with spironolactone or NSC23766 (aldosterone with spironolactone: 0.25 +/- 0.08,  $p < 0.05$ ; aldosterone with NSC23766: 0.21 +/- 0.05,  $p < 0.05$ ).

These results show that an overexpression of Rac1 promotes supraventricular arrhythmia and is associated with an upregulation of 11- $\beta$ -HSD-type-2 and a higher CTGF expression. The activation of the mineralocorticoid-receptor leads to structural remodeling in cardiac fibroblasts via Rac1. The pharmacological inhibition of Rac1 and the mineralocorticoid-receptor may represent potential therapeutic targets to prevent structural remodeling as a predisposition of artrial fibrillation.

## **2. Einleitung und eigene Fragestellung**

### **2.1 Definition, Ätiologie und Epidemiologie von Vorhofflimmern**

Vorhofflimmern ist eine supraventrikuläre Tachyarrhythmie mit unkoordinierter Vorhofaktivierung und infolge dessen ineffektiver Vorhofkontraktion (January et al., 2014).

Es ist ein Zustand, bei dem der Herzrhythmus nicht mehr vom Sinus-Knoten, sondern von anderen aktiven Arealen im Vorhof bestimmt wird. Daraus folgt eine schnelle, unkoordinierte und unregelmäßige Vorhofkontraktion (Nattel, 2002).

Bei Vorhofflimmern sind im EKG schnelle oszillierende oder fibrillierende und amplitudenmodulierende Wellen ableitbar. Durch die unkoordinierte Vorhoffunktion sind keine P-Wellen sichtbar. Es kommt zu einer ungleichmäßigen Überleitung auf die Herzkammer (Fuster et al., 2011).

Vorhofflimmern ist die häufigste Herzrhythmusstörung und nimmt an Prävalenz und Inzidenz zu. Eine Studie in England (SAFE: Screening for Atrial Fibrillation in the Elderly) zeigte eine Prävalenz von 7,2% bei Patienten über 65 Jahren. Zudem zeigte sich eine erhöhte Prävalenz bei Männern (7,8%) und bei Patienten über 75 Jahren (10,3%) (Lip et al., 2012). Die Prävalenz nimmt mit zunehmendem Alter zu, ausgehend von unter 0,5% in der Population unter 40 Jahren, ca. 5% bei 65 Jahren und mehr als 10% bei über 80-jährigen (Stepanyan et al., 2013). Die jährliche Inzidenz von neu aufgetretenem Vorhofflimmern beträgt ca. 1,6% (Lip et al., 2012).

Es ist bekannt, dass die ethnische Herkunft eine Rolle in der Prävalenz spielt. So ist Vorhofflimmern bei der nicht weißen Bevölkerung deutlich seltener als in der weißen Bevölkerung (Lip et al., 2012).

### **2.2 Diagnostik und Therapie von Vorhofflimmern**

Viele Patienten sind asymptomatisch (silent atrial fibrillation) und fallen erst durch Komplikationen, wie z.B. durch einen Schlaganfall, auf (Lip et al., 2012). Vorhofflimmern geht mit einem fünffach erhöhtem Schlaganfallrisiko einher und ist für mindestens 25% aller

Schlaganfälle bei älteren Erwachsenen verantwortlich (Senoo et al., 2014). Vorhofflimmern kann sich mit unterschiedlichen Symptomen darstellen, zum Beispiel Palpitationen, Schwindel, verminderte körperliche Belastbarkeit oder Kurzatmigkeit (Gronefeld et al., 2003; Nattel, 2002).

Vorhofflimmern ist durch die Stase im Vorhof eine der häufigsten Ursachen für thromboembolische Ereignisse. Zur Prophylaxe stehen hierfür sowohl Vitamin-K-Antagonisten sowie neue, Nicht-Vitamin-K-abhängige orale Antikoagulantien zur Verfügung. Die European Society of Cardiology Leitlinie von 2016 empfiehlt eine Antikoagulation, um das Schlaganfallrisiko zu senken, bei einem CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc-Wert von 1 oder höher (Berechnung des CHADS-2-Vasc-Score erfolgt anhand der Summation der Risikofaktoren: congestive heart failure (Herzinsuffizienz, 1 Punkt), hypertension (Bluthochdruck, 1 Punkt), age > 75 (Alter > 75, 2 Punkte), diabetes mellitus (Diabetes Mellitus, 1 Punkt), history of stroke (stattgehabter Schlaganfall, 2 Punkte), vascular disease (Erkrankung der Gefäße, 1 Punkt), age 65-74 (Alter 65-74, 1 Punkt), female (weibliches Geschlecht, 1 Punkt) (Kirchhof et al., 2016). Ein hohes Alter geht jedoch auch mit einem erhöhten Blutungsrisiko einher, wie zum Beispiel intrakranielle Blutung, gastrointestinale Blutung oder traumatische Blutung. Verschiedene Scores, die ein Blutungsgeschehen vorhersagen, wurden entwickelt, um das Blutungsrisiko zu eruieren, wie zum Beispiel HAS-BLED (hypertension, renal dysfunction, liver dysfunction, age > 65, history of bleeding, labile international normalized ratio (INR), concomitant use of medications associated with bleeding, alcohol abuse) (Pisters et al., 2010). Ältere Patienten haben ein erhöhtes Blutungsrisiko unter Antikoagulation, jedoch auch ein erhöhtes thromboembolisches Risiko, wenn diese nicht eingenommen werden (Hylek et al., 2007). Ob eine Antikoagulation erfolgt, ist eine individuelle Entscheidung anhand des Blutungs- und Thromboembolie-Risikos des einzelnen Patienten.

Zur Therapie der Arrhythmie kann eine Frequenzkontrolle oder eine Rhythmuskontrolle durchgeführt werden. Bei der Frequenzkontrolle wird eine Senkung der Herzfrequenz durch Betablocker, Calciumantagonisten oder Digitalis angestrebt und damit eine Verlängerung der Atrioventrikularknoten-Überleitungszeit bewirkt. Diese Therapie kommt in erster Linie für asymptotische Patienten in Betracht. Eine Rhythmuskontrolle zielt auf den Erhalt des Sinusrhythmus ab und kann durch elektische Kardioversion oder medikamentös durch Klasse-I- und Klasse-III-Antiarrhythmika erreicht werden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit einer Rhythmuskontrolle mittels Katheterablation. Hierbei werden die Trigger-Areale im Bereich der Lungenveneneinmündung durch Hochfrequenzstrom oder Kryoballontechnik

verödet (Lewalter et al., 2016; Nattel 2002). In einer aktuellen Metaanalyse scheint die Katheterablation der medikamentösen Rhythmuskontrolle bei persistierendem Vorhofflimmern in Bezug auf Rediziv, erneuter Kardioversion und Hospitalisierung überlegen zu sein (Chen et al., 2018).

Typischerweise entwickelt sich Vorhofflimmern ausgehend von kurzen, gelegentlich auftretenden Episoden, zu längeren und häufigeren Episoden. Vorhofflimmern wird als paroxysmal bezeichnet, wenn es innerhalb von 7 Tagen von selbst sistiert. Wenn es länger als 7 Tage besteht oder nach dieser Zeit durch Kardioversion beendet wird, so wird dies als persistierendes Vorhofflimmern bezeichnet. Bei permanentem Vorhofflimmern handelt es sich um einen dauerhaften und therapieresistenten Zustand. Eine Beendigung der Arrhythmie wird hierbei nicht mehr angestrebt (Kirchhof et al., 2016).

Vorhofflimmern tritt häufig nach kardiochirurgischen Eingriffen auf und geht mit einem erhöhten postoperativen Risiko für Mortalität, Nierenversagen und Myokardinfarkt einher. Zudem führt dies häufig zu einem verlängertem Krankenhausaufenthalt (Kaireviciute et al., 2009).

### **2.3 Erregung des Vorhofmyokards**

Die normale Vorhofkontraktion wird durch den Sinus-Knoten initiiert. Nach Depolarisation der Herzmuskelzellen als Reaktion auf ein Aktionspotential sind die Natrium-Kanäle inaktiviert und es kann bis zum Erreichen eines bestimmten Potentials keine erneute Aktion der Muskelzelle gestartet werden. Diese Zeit wird als Refraktärzeit bezeichnet. In diesem Zeitraum ist die Herzmuskelzelle nicht erregbar. Abnormale Impulse von ektopen Arealen, die nicht aus dem Sinus-Knoten stammen, können Herzmuskelzellen erregen, die zu diesem Zeitpunkt nicht refraktär sind. Die beiden Ausbreitungswege können sich gegenseitig fortleiten und zu kreisenden Erregungen führen, wenn die Zeit zwischen den Erregungen groß genug ist, um erneut eine Aktivierung der Herzmuskelzelle zu ermöglichen (Nattel, 2002).

## **2.4 Remodeling bei Vorhofflimmern**

Eine Vergrößerung des Vorhofes (Dilatation) und Fibrose sind prädisponierende Faktoren für die Entwicklung von Vorhofflimmern. Auf der anderen Seite führt Vorhofflimmern selbst zu strukturellen Veränderungen und Fibrose im linken Vorhof. Fibrose ist eines der Kennzeichen von strukturellen Umbauvorgängen im linken Vorhof bei Vorhofflimmern. Interstitielle Fibrose beeinflusst die Elektrophysiologie des Herzens und begünstigt damit Reentry-Kreisläufe, die wiederum Vorhofflimmern begünstigen (Burstein et al., 2008). Neben den elektrophysiologischen und strukturellen Vorgängen der Umbauvorgänge und Fibroseentstehung ist es wichtig, die molekularen Signalwege und pharmakologischen Targets zu identifizieren, um Vorhofflimmern verhindern zu können (Nattel et al., 2008; Dobrev et al., 2012).

## **2.5 Aufbau des Vorhofs und molekularbiologische Vorgänge**

Die Vorhöfe bestehen zu circa 45% aus Kardiomyozyten. Der restliche Teil besteht aus extrazellulärer Matrix, Endothelzellen und kardialen Fibroblasten (Hinescu et al., 2006). Der größte Anteil extrazellulärer Matrix besteht aus Kollagen. Kollagenfasern bestehen aus Bündeln von Fibrillen. Es gibt verschiedene Kollagentypen, wobei im Herz vor allem der Kollagen Typ I und Typ III vorkommt. Die Kollagenfibrillen bilden ein Netzwerk, welches für die Zugfestigkeit des Herzens notwendig ist und ebenso für die Zellverbindung zwischen den Myozyten wichtig ist. Bei den meisten Herzerkrankungen kommt es zu einer Zunahme von Kollagen (de Jong et al., 2012). Zudem nimmt die Kollagenkonzentration mit fortschreitendem Lebensalter aufgrund von Akkumulation zu (Horn et al., 2016). Ein erhöhter Anteil an extrazellulärer Matrix führt zu Abnormalitäten des kardialen Kontraktionsablaufs und der Relaxation (Dzeshka et al., 2015). Der Mechanismus, der zur Zunahme der Fibrose führt, ist nicht komplett geklärt. Es werden hierfür vor allem autokrine, parakrine und endokrine Faktoren sowie Transforming-Growth-Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Angiotensin II, Aldosteron und Endothelin-1 verantwortlich gemacht (Dzeshka et al., 2015; Leask A 2007; Lijnen et al., 2000; Koitabashi et al., 2007). TGF- $\beta$  aus Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten aktiviert Connective Tissue Growth Factor (CTGF). CTGF induziert zelluläre Prozesse wie Zellproliferation, Adhäsion und Synthese extrazellulärer Matrix (Chen et al., 2000). Eine Überexpression an CTGF und im Folgenden entstehendes strukturelles

Remodeling wurde unter anderem bei Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt und Myokarditis nachgewiesen (Travers et al. 2016; Koitabashi et al., 2007; Dean et al., 2005; Lang et al., 2008).

## **2.6 Rolle des Mineralocorticoid-Rezeptors und des Renin-Angiotensin-Aldosteron Kreislaufs bei Vorhofflimmern**

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System spielt im Organismus in mehreren Bereichen eine Rolle. So trägt es zum Beispiel zur Blutdruckregulierung und Beeinflussung des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes bei. Angiotensinogen wird in der Leber gebildet und durch Renin in Angiotensin I umgewandelt. Das Angiotensin-converting-Enzym wandelt anschließend Angiotensin I in das physiologisch aktive Angiotensin II um (Ehrlich et al., 2006).

Die Aktivierung des Mineralocorticoid-Rezeptors durch Aldosteron führt zum Remodeling des linken Ventrikels. In Tiermodellen zeigte sich nach Aldosterongabe eine Zunahme der linksventrikulären Hypertrophie (Zhou et al., 1996; Briet et al., 2010; Young et al., 1994; Lothar et al., 2011; Weber et al., 2001). Klinische Studien zeigen einen prognostisch günstigen Einfluss von Mineralocorticoid-Rezeptor-Antagonisten bei Patienten mit systolischer Herzinsuffizienz (Pitt et al., 2003; Pitt et al., 1999; Zannad et al., 2011; Ehrlich et al., 2006). Prognostisch relevante Effekte auf Mortalität und Morbidität durch die Anwendung von ACE-Hemmern und MR-Antagonisten konnten in klinischen Studien bei Patienten mit systolischer Herzinsuffizienz nachgewiesen werden (Ehrlich et al., 2006). Es gibt darüber hinaus Hinweise, dass Mineralocorticoid-Rezeptor-Antagonisten die Inzidenz von Vorhofflimmern bei Patienten mit systolischer Herzinsuffizienz reduzieren können (Swedberg et al., 2012).

Reil et al zeigte im Mausmodell, dass Aldosteron Vorhofflimmern und atriale Fibrose induziert (Reil et al., 2012). In einer kürzlich durchgeführten Metaanalyse wurde ein positiver Effekt von Mineralocorticoid-Rezeptor-Antagonisten bei Patienten mit Vorhofflimmern gezeigt, wobei diese neu auftretendes und paroxysmales Vorhofflimmern verminderten (Neefs et al., 2017).

## **2.7 Rolle der 11- $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Typ-2 bei Vorhofflimmern**

Aldosteron als lipophile Substanz überschreitet die Zellmembran und bindet und aktiviert den intrazellulär gelegenen Mineralocorticoid-Rezeptor (Briet et al., 2010). Die Konzentration des Cortisols ist im menschlichen Serum circa 100-1000-fach höher als die von Aldosteron. Jedoch ist die Bindungsaffinität zum Mineralocorticoid-Rezeptor ähnlich wie bei Aldosteron. Die Aktivierung des Mineralocorticoid-Rezeptors wird durch die Expression des Enzyms 11- $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Typ-2 (11- $\beta$ -HSD-Typ-2) reguliert. Sie oxidiert das Glukocorticoid Cortisol und überführt es damit in die inaktive Form des Cortisols, welches nicht an den Mineralocorticoid-Rezeptor binden kann. Somit wird die Besetzung und Aktivierung des Mineralocorticoid-Rezeptors mit Cortisol verhindert und die Bindungsstelle frei für Aldosteron (Odermatt et al., 2012).

## **2.8 Rac1-GTPase und NADPH Oxidase**

In Vorhöfen von Patienten mit Vorhofflimmern besteht eine erhöhte Aktivität von Rac1 und der NADPH Oxidase (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) (Adam et al. 2007). Die Rho Guanosintriphosphatase (GTPase) Rac1 reguliert die NADPH Oxidase Aktivität und ist verantwortlich für oxidativen Stress und kann unter pathophysiologischen Bedingungen zur Entwicklung von Hypertrophie im linken Ventrikel führen (Custodis et al., 2006; Satoh et al., 2006). Die Hemmung von Rac1 durch Statine senkt die NADPH Oxidase-abhängige Produktion von Sauerstoffradikalen in kardialen Myocyten und reduziert die Hypertrophie des Herzens (Takemoto et al., 2001; Laufs et al., 2002; Maack et al., 2003). Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass Angiotensin II über eine Aktivierung der Rac1-GTPase und der NADPH Oxidase CTGF aktiviert und zu einer Überexpression von Connexin 43, N-Cadherin und interstitieller Fibrose führt (Adam et al., 2010).

## 2.9 Eigene Fragestellung

Die Mechanismen der Signaltransduktion sind trotz der hohen Prävalenz von Vorhofflimmern und dessen Risiken noch nicht vollständig geklärt. Eine weitere Untersuchung der Signalwege ist notwendig, um pharmakologische Ansätze zu erweitern und der Entstehung von strukturellem Remodeling vorzubeugen.

In dieser Arbeit werden Signalwege untersucht, die zu strukturellem Remodeling führen. Da sowohl die Signaltransduktion über den Mineralocorticoid-Rezeptor aber auch über Rac1 an der Entstehung von strukturellem Remodeling beteiligt sind, liegt eine Interaktion von Rac1 und dem MR nahe. Dies wurde bisher im Kontext von Vorhofflimmern nicht untersucht und ist daher Gegenstand dieser Arbeit. Eine pharmakologische Inhibierung dieser Signalwege könnte potenziell eine therapeutische Möglichkeit darstellen, um die Entstehung von Fibrose, als strukturelles Korrelat für das Auftreten von Vorhofflimmern, zu verhindern.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Isolation von neonatalen Kardiomyozyten von Ratten sowie Gewinnung von Fibroblasten**

Für die Isolation wurden ca. 3-5 Tage alte Sprague-Dawley Ratten verwendet (Charles River, Deutschland). Diese wurden enthauptet und anschließend wurde der Körper kurz mit 70% Ethanol gespült. Der Thorax wurde mit einer Schere eröffnet, das Herz unter vorsichtigem Druck auf die Brust entnommen und anschließend in eine Zellkulturschale mit 10ml ADS-Puffer gelegt. Nach Entfernen von restlichem Gewebe, Vorhöfen und Gefäßen wurden die Ventrikel mit ca. 15 Schnitten zerteilt und einer neuen Zellkulturschale, mit 10ml ADS-Puffer versehen, zugeführt. Der Puffer wurde vorsichtig abpipettiert und 10ml Enzym-Mix, bestehend aus ADS-Puffer, Pankreatin und Collagenase, hinzugefügt. Nach kurzem Resuspendieren wurde das Gemisch in eine sterile Flasche gegeben und für 5min im Schüttelwasserbad bei 37°C und 80 U/min inkubiert. Der Verdau (erster Überstand) wurde verworfen. Anschließend wurde erneut 10ml Enzym Mix hinzugefügt und für 20min inkubiert. Der Überstand wurde in einen 50ml Falcon pipettiert und die Enzymreaktion mit 2ml NCS (neonatal calf serum) gestoppt. Dann wurde der Falcon bei Raumtemperatur bei 700 U/min für 5min zentrifugiert, danach der Überstand verworfen und das Pellet unter Zugabe von 4ml NCS vorsichtig gelöst. Anschließend wurde der Falcon im Brutschrank inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Dieser Vorgang wurde fünf weitere Male mit unterschiedlich langen Verdaureiten durchgeführt und die Falcons entsprechend fortlaufend gekennzeichnet. Die unterschiedlichen Zeiten betragen 25min, 25min, 15min, 10min und 10min. Nach Beendigung des Vorganges wurde der Überstand verworfen, 7ml Medium hinzugefügt und das Pellet unter vorsichtigem Schütteln gelöst. Die Lösung wurde dann in einen neuen 50ml Falcon filtriert, unter vorherigem und anschließendem kurzen Spülen des Filters mit 1ml Medium. Die gewonnene 9ml Zellsuspension wurde auf 6cm Schalen verteilt und für eine Stunde im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Während dieser Zeit konnten die Fibroblasten am Boden der Zellkulturschale adhären. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abpipettiert, in ein 50ml Falcon überführt und die Zellen gezählt. Die Zellen wurden in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Hierfür wurde 10µl Zellsuspension mit 10µl Trypanblau gemischt, 4 große Eckquadrate ausgezählt und der Mittelwert berechnet (Vol. je

Quadrat: 1  $\mu$ l). Die Gesamtzellzahl ergab sich durch folgende Berechnung: 2 x Mittelwert x  $10^4$  x Volumen der Zellsuspension. Die Zellsuspension wurde mit Medium auf das gewünschte Volumen gebracht und ausgesät. Hierbei enthielten 4ml Medium  $1,6-1,8 \times 10^6$  Zellen je P6 Primaria Schale. Die Zellen wurden anschließend für 48h im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Die Kardiomyozyten wurden für 16h in serumfreiem Medium inkubiert und konnten anschließend pharmakologisch behandelt werden.

### **3.2 Kultivierung neonataler kardialer Rattenfibroblasten**

Fibroblasten von 3-5 Tage alten neonatalen Sprague-Dawley Ratten (Charles River, Germany) wurden durch Adhäsion von Kardiomyozyten getrennt. Inkubiert wurden diese in 6cm Petrischalen in einem Inkubator bei 37°C und 5,0% CO<sub>2</sub>. Nach ca. 2-3 Tagen hatten sich die Fibroblasten zu 80-90% auf den Schalen ausgebreitet und konnten subkultiviert werden. Ab dieser Passage (p1) wurde DMEM als Nährsubstanz für die Zellen verwendet und alle zwei Tage gewechselt. Nach ca. 4-5 Tagen, wenn die Fibroblasten wieder zu 90% die 6cm Schalen besiedelt hatten, konnten diese durch Zugabe von Trypsin vom Schalenboden abgelöst und erneut subkultiviert werden. Auf diese Art und Weise konnten die Zellen bis zur gewünschten Anzahl passagiert werden.

Wenn die gewünschte Anzahl an Schalen erreicht wurde und die Fibroblasten dann zu ca. 90% den Schalenboden besiedelten, wurde das Nährmedium durch je 2ml DMEM-Hungermedium pro Schale ersetzt. Der Unterschied zwischen den beiden Medien ist die Zugabe von Rinderserum im Nährmedium. Das Hungermedium blieb dann für 24h auf den Fibroblasten, wodurch diese für die Aufnahme von Substanzen sensibilisiert wurden. Die Stimulationszeit und Konzentration variierten je nach Substanz. Für die Zellkulturexperimente wurde stets die Anzahl n = 3 verwendet.

Um anschließend die Proteinmenge und Proteinexpression bestimmen zu können, wurde das Medium verworfen und die Zellen durch Zugabe eines Lysepuffers bestehend aus Leupeptin, PMSF und Aprotinin von der 6cm Schale mit Hilfe eines ‚cell scrapers‘ abgeschabt. Anschließend wurde das Lysat bei 95°C für 4 Minuten gekocht.

Folgende Substanzen und Konzentrationen wurden für die Stimulation verwendet:

Aldosteron: 10nM für 24h

BR4628: 500nM für 25h

Spironolacton: 500nM für 25h

NSC 23766: 10 $\mu$ M für 25h

Telmisartan: 20 $\mu$ M für 25h

Cortisol: 127ng/ml für 24h

Angiotensin II: 10 $\mu$ M für 3h

### **3.3 Färbung von Fibroblasten**

Für die Färbung von Fibroblasten wurden diese zuerst in 6 well plates auf runden Deckgläsern für ca. 2-3 Tage kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt bedeckten die Fibroblasten ca. 90% der Oberfläche. Die Fibroblasten wurden mit verschiedenen Substanzen, wie bereits oben erwähnt, stimuliert. Für die Färbung wurde zunächst das Medium abgesaugt und anschließend die Schalen kurz mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen verblieben für die gesamte Färbung in den 6 well plates. Es erfolgte die Fixierung mit 2% PFA (Paraformaldehyd) für 10 Minuten bei 4°C. Nach dieser Zeit wurden die Deckgläschen erneut mit PBS gewaschen. Der Primärantikörper wurde nach Abpipettieren einer 1,5% Blocklösung (BSA) in der gewünschten Konzentration aufgetragen. In der Versuchsreihe wurde als Primärantikörper MR in der Verdünnung von 1:100 mit PBS verwendet. Der Antikörper wurde für 2 Stunden auf den Zellen belassen, um binden zu können. Nach dieser Zeit wurde erneut mit PBS gewaschen, um nicht gebundene Antikörper aus dem Überstand zu entfernen. Als Sekundärantikörper wurde TRITC (Tetramethylrhodamin Isothiocyanat) mit PBS im Verhältnis 1:100 ebenfalls bei Raumtemperatur für 1 Stunde verwendet. Nach diesem Färbvorgang wurde erneut der überschüssige Antikörper abgewaschen und es erfolgte die Eindeckung der Deckgläschen. Diese wurden hierfür auf einen Objektträger überführt und mit Dapi (zur Anfärbung der Zellkerne) gefärbt und mit Mounting Medium fixiert. Es wurde mit einem Deckglas bedeckt und die Färbung getrocknet. Anschließend konnte die Färbung unter dem Mikroskop mit 1000-facher Vergrößerung und der Zuhilfenahme von Immersionsöl begutachtet werden. Für die Auswertung wurden mit der Kamera (CANON) Bilder erstellt,

die dann ausgewertet werden konnten. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ. Das Verhältnis vom Rezeptor im Zellkern zum Rezeptor im Zellplasma wurde ausgewertet.

### **3.4. Transgenes Tiermodell RacET**

Die transgenen Mäuse wurden freundlicherweise von Mark A. Sussmann zur Verfügung gestellt (San Diego State University, SDSU Heart Institute and Department of Biology, San Diego, CA, USA). Diese Mäuse haben eine kardiale Überexpression von konstitutiv aktivem Rac1 spezifisch im Myokard unter Kontrolle eines  $\alpha$ -myosin heavy chain promoters (RacET) (Sussmann et al., 2000). Als Kontrollgruppe wurden FVBN-Mäuse verwendet (Charles River Laboratories, Sulzfeld).

### **3.5 Sirius Red Färbung**

Für die Sirius Red Färbung wurde der Objektträger mit den Paraffinschnitten von RacET und Wildtyp Mäusen bei 67°C für 20 Minuten erwärmt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten mit Xylol. Es erfolgte danach eine Ethanolreihe mit 100%, 90% und 70% für je 3 Minuten. Anschließend wurde der Objektträger mit Aqua destillata für eine Minute gewaschen. Die Inkubation mit Sirius Red betrug 60 Minuten. Danach erfolgten Waschschriffe mit 0,01N HCL für 2 Minuten, 90% Ethanol für 2 Minuten, 100% Ethanol und zuletzt mit Xylol für je 2 Minuten. Anschließend erfolgte das Eindecken und Trocknen des Objektträgers.

### **3.6 Western Blot**

Proteinanalysen wurden mittels Western Blot durchgeführt. Zuerst wurde das Gesamtprotein der Probe durch die Proteinbestimmung nach Lowry quantifiziert. Das Lysat wurde gelelektrophoretisch nach seinem Molekulargewicht aufgetrennt und die Proteine anschließend von dem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Diese Membran wurde nun mit einem Antikörper gegen das gesuchte Protein inkubiert. Nach der

Bindung des Antikörpers wurde die Membran gewaschen und ein Sekundärantikörper hinzugefügt. Dieser konnte an den Primärantikörper binden und katalysierte eine Farbreaktion. Auch nach diesem Schritt wurde die Membran gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Im Anschluss erfolgte durch Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes eine Farbreaktion und konnte anschließend mit einem Röntgenfilm detektiert werden. Das Signal wurde danach durch Densitometrie quantifiziert.

### **3.6.1 Proteinbestimmung nach Lowry**

Um Proteine aus Zelllysaten von Fibroblasten oder RacET/Wildtyp Mäusen quantifizieren zu können wurde die kolorimetrische Messung nach Lowry durchgeführt.

Das Verfahren besteht aus zwei Reaktionen, einer Biuretreaktion und einer Kupferreduktionsreaktion. Im ersten Schritt kommt es zu einer Komplexbildung zwischen der Peptidbindung und Cu(II)-Ionen in alkalischer Lösung (Bio-Rad, Dc Protein Assay Reagent A). Anschließend führt eine Kupferreduktionsreaktion zu einer Reduktion von Folin-Ciocalteu-Reagenz (Bio-Rad, Dc Protein Assay Reagent B) und damit zu einem Farbumschlag von gelb nach blau. Die Proteinkonzentration konnte nun durch Photometrie bei 540nm gemessen werden.

### **3.6.2 Gelelektrophorese**

Um die Proteine quantifizieren zu können, wurde ein 10% SDS-Polyacrylamidgel hergestellt und mit 30µl Gesamtlysate beladen. Es wurde die gleiche Menge an Ladepuffer hinzugefügt, welches zu 5% aus DTT bestand. Nach Erhitzen der Probenmenge bei 70°C für 5min und anschließender Zentrifugation für 10 Sekunden konnte das Gel beladen werden und die Elektrophorese zum Auftrennen der Proteine gestartet werden. Zusätzlich zu den Proben wurde ein Marker mit definierten Molekulargewichten geladen.

### 3.6.3 Blotten

Um die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran zu übertragen, wurde das Gel auf eine mit Transferpuffer eingeweichte Membran und zwei Filtern gelegt. In der Blotkammer (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell von Biorad) erfolgte anschließend die Übertragung bei 200mA für 45 min.

Nach dem Blotvorgang wurde die Membran zugeschnitten und in einer Blocklösung, bestehend aus 5% Trockenmilch in PBS-Tween, für 30 Minuten inkubiert, um die freien Bindungsstellen zu blockieren.

### 3.6.4 Inkubation des Antikörpers

Nach dem Blocken wurde der Antikörper in gewünschter Konzentration in einer Lösung, bestehend aus 1% Trockenmilch und PBS Tween, verdünnt. Die Membran wurde anhand des Markers auf Höhe der zu erwarteten Banden geteilt und separat in der jeweiligen Antikörperlösung über Nacht bei 4°C inkubiert.

Verdünnungen der einzelnen Antikörper:

Tubulin:	1:500
MR:	1:500
CTGF:	1:250
11-β-HSD-Typ-2:	1:250
GAPDH:	1:10000

Nach der Inkubation wurde die Membran in mehreren Schritten in PBS Tween und PBS gewaschen, um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen.

### **3.6.5 Inkubation des Sekundärantikörpers**

Im Anschluss an die Waschschritte wurde der Sekundärantikörper für 30 Minuten (rabbit) bzw. 20 Minuten (mouse und goat) inkubiert.

Verdünnungskonzentrationen:

Goat – Verdünnung: 1:6000

Mouse – Verdünnung: 1:5000

Rabbit – Verdünnung: 1:4000

Nach der Inkubation wurde die Membran erneut gewaschen.

### **3.6.6 Entwickeln der Membran**

Zum Darstellen der Banden wurde die Membran mit ECL (enhanced chemiluminescence) inkubiert und anschließend auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

### **3.6.7 Auswertung**

Die Quantifizierung der Western Blot Banden erfolgte mittels Densitometrie. Die Daten wurden als mean +/- SEM angegeben. Für mehrfache Vergleiche wurden Unpaired Student's t tests, Mann-Whitney U test und ANOVA verwendet. Die statistische Signifikanz wurde für  $p < 0,05$  festgelegt.

## **3.7 RNA-Isolation aus Gewebe und Zellen**

Für die RNA-Isolation wurde vom Gewebe der Proben (RacET und Wildtyp Mäuse) möglichst je ein gleich großes Stück mit einem Skalpell abgeschnitten und anschließend in ein

Eppendorf-Gefäß gegeben. Das Gewebe wurde in 1ml RNA Pure gepottert und anschließend 300µl Chloroform hinzugefügt.

Für die RNA-Isolation aus Fibroblasten wurde 1ml RNA Pure auf eine 6cm Schale gegeben und anschließend mit einem ‚cell scraper‘ abgeschabt. Das Lysat wurde in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und 300µl Chloroform hinzugefügt.

Das Lysat wurde 10 Minuten inkubiert und anschließend bei 4°C für 30 Minuten bei 14000U/min zentrifugiert. Hierbei kam es zu einer Auftrennung des Lysats. Ganz unten im dem Eppendorf-Gefäß zeigte sich eine gelbe Phase. In der Mitte war eine weiße Schicht. Diese enthält Proteine und andere Gewebebestandteile. Oben befand sich eine farblose, wässrige Phase, die abpipettiert wurde. Diese Phase, die die RNA beinhaltet, wurde in ein Eppendorf-Gefäß mit 400µl Isopropanol hinzugefügt und über Nacht bei -20°C gelagert, damit die RNA gefällt werden konnte. Am nächsten Tag wurde das Lysat zentrifugiert und das Isopropanol abpipettiert. 800µl eisgekühltes 70%iges Ethanol wurde hinzugegeben und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet getrocknet und anschließend mit Aqua ad injectabiliae resuspendiert. Nach Erhitzen der Proben bei 65°C für 5 Minuten konnte die RNA mittels NanoDrop gemessen und quantifiziert werden.

### **3.7.1 Umwandlung von RNA in cDNA**

Um anschließend die RNA in cDNA umwandeln zu können, wurde ein high capacity cDNA reverse transcription kit von applied biosciences verwendet. Dieses enthält RT Buffer, dNTP Mix, RT Random Primers, Multiscribe reverse transcriptase, RNase inhibitor und Nucleasase-freies Wasser. Es bildet gemeinsam den Master Mix.

Master Mix Ansatz:

10x RT Buffer	2,0µl
25x dNTP Mix (100mM)	0,8µl
10x RT Random Primers	2,0µl
Multiscribe Reverse Transcriptase	1,0µl
RNase Inhibitor	1,0µl
Nuclease-freies Wasser	3,2µl

Vom Master Mix wurden nun 10µl in ein Eppendorf-Gefäß gemeinsam mit 10µl RNA pipettiert. Nach kurzem Mischen und Zentrifugieren wurden die Proben in den Thermocycler eingebracht. Anschließend wurden 4 Stufen durchlaufen. Zuerst betrug die Temperatur 25°C für 10 Minuten, im weiteren Schritt 37°C für 120 Minuten und am Ende 85°C für 5 Minuten. Bei 4°C konnten die Proben gelagert werden.

### **3.7.2 Polymerase – Ketten – Reaktion (PCR)**

Die PCR dient der Vervielfältigung der cDNA. Zuerst wurde ein Master Mix Ansatz hergestellt.

Master Mix:

39,8µl PCR H<sub>2</sub>O

1µl Primer forward

1µl Primer reverse

1µl dNTP Mix

5µl 10x PCR Buffer

0,2µl Taq Polymerase

Dieser Ansatz wurde für alle Proben, einschließlich einer Wasserprobe, angesetzt. Es wurden je 48µl MasterMix in PCR-Eppendorf-Gefäßen vorgelegt und anschließend 2µl cDNA hinzugefügt. In die Wasserprobe kam statt cDNA 2µl PCR H<sub>2</sub>O (Negativkontrolle). Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren wurde die Probe in den bereits vorgeheizten Thermocycler eingebracht.

Ablauf des Thermocyclers:

- Denaturierung/Initialisierung: Erhitzen der Proben für 45sec bei 95°C. Die Denaturierung diente dem Auftrennen der Doppelstränge der DNA. Hierbei wurden die Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen. Anschließend lagen nur noch Einzelstränge vor.

- Primerhybridisierung (Annealing): 55°C Ratte CTGF, 63°C Ratte GAPDH für 1min

Bei der Hybridisierung kam es zur Anlagerung der Primer an die DNA.

- Amplifikation/Elongation: 72°C für 1min

In diesem Schritt setzte die DNA-Polymerase Nukleotide in die fehlenden Stränge ein. Der Beginn ist am 3'-Ende, wo auch der Primer bindet, und folgt dem DNA Strang in Richtung 5'-Ende.

- Dieses Prozedere wurde 30x (GAPDH) beziehungsweise 35x (CTGF) repetitiv durchgeführt.
- Am Ende wurde die Temperatur auf 8°C gesenkt.

Folgende Primer wurden verwendet:

m GAPDH forward: 5'AGA CAG CCG CAT CTT CTT GT-3'

m GAPDH reverse: 5' CTT GCC GTG GGT AGA GTC AT-3'

m CTGF forward: 5'AGA GTG GAG ATG CCA GGA GA-3'

m CTGF reverse: 5'CAC ACA CCC AGC TCT TGC TA-3'

### **3.7.3 DNA Gel**

Das PCR-Produkt wurde auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Hierfür wurde ein 1,5% Gel gegossen. 1,5g Agarose wurde in 100ml TAE in einem Erlenmayer Kolben durch Erhitzen gelöst. Es wurden 10µl Ethidiumbromid hinzugefügt und anschließend das Gel gegossen. Währenddessen wurde 20µl PCR Produkt mit 5µl DNA-Ladepuffer vermengt. Sobald das Gel fest war konnte es mit dem PCR Produkt beladen werden. Außerdem wurde ein Marker geladen, um später die Größe der DNA feststellen zu können. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und lief bei 70V für 45min.

### **3.7.4 Auswertung**

Das Gel wurde in das GENE GENIUS Bio Imaging System eingebracht und photographiert. Anschließend folgte die Auswertung mittels Densitometrie (siehe 3.6.7).

### **3.8 Hydroxyprolin Assay**

Die Hydroxyprolinbestimmung von kardialen Fibroblasten wurde mittels ELISA und nach Herstellerangaben (Quickzyme, The Netherlands) durchgeführt. Hydroxyprolin stabilisiert das Kollagen. Da Hydroxyprolin spezifisch für Kollagen ist, eignen sich Hydroxyprolinmessungen um die Menge an Kollagen in Gewebe zu quantifizieren. Kollagen besteht aus 14% Hydroxyprolin, wodurch auf die Gesamtmenge an Kollagen geschlossen werden kann (de Joung et al., 2012; Berg et al., 1973).

### **3.9 Erstellung eines EKG von RacET und Wildtyp Mäusen**

Um das EKG der Mäuse abzuleiten, wurden diese mit 0,1ml Ketamin sediert. Anschließend wurden die Elektroden an den Extremitäten befestigt und ein 3-Kanal EKG geschrieben. Der Vorschub betrug 50mm/s. Die Auswertung des zugrunde liegenden Herzrhythmus erfolgte gemeinsam mit Dr. Daniel Lavall (Oberarzt Kardiologie, Universität Leipzig) und wurde kategorisiert in Sinus-Rhythmus und supraventrikuläre Arrhythmie, wozu Vorhofflimmern, Vorhofflattern und sonstige Formen atrialer Tachykardien gezählt wurden.

## 3.10. Material

### 3.10.1 Geräte/Materialien:

Autoklaviergerät Tuttnauer 3850 EL	Tuttnauer Europe B.V., Breda, Niederlande
Eismaschine Ziegla	Ziegla Eismaschinen GmbH, Isernhagen
Electrophoresis power supply Consort E831	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
ELISA Reader Model 550	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Entwicklungsautomat Curix 60	AGFA, Mortsel, Belgien
Gelständer PCR	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Gelelektrophoresekammer PCR	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
GENE GENIUS Bio Imaging System	Syngene, Cambridge, England
Magnetrührer Typ RCT	IKA Labortechnik, Staufen i. Br.
<u>Mikroskope</u>	
Nikon Eclipse E600	Nikon GmbH, Düsseldorf
Nikon Digital Camera DXM1200F	Nikon Digital Sight, Nikon GmbH, Düsseldorf
Olympus CK 2	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Mini-Protean Gelgießstand	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Nanodrop 2000 Spectrophotometer	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
pH-Meter 526	WTW GmbH, Weilheim
Spectrophotometer DU 730	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Pipetterhilfe PIPETBOY	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Power Pac 200 Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Rotilabo Magnetstäbchen Set	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Röntgenkassette	Carl Roth, Laborbedarf, Karlsruhe
Scanner CanoScan LiDE 90	Canon Deutschland, Krefeld
Schüttel- und Mischgerät Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach
Schüttelwasserbad Typ 1083	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwendel
Stickstoffbehälter GT 140	Air Liquide, Düsseldorf
Stickstofftank Apollo 50	Messer Griesheim, Krefeld
<u>Thermocycler</u>	
Px2 Thermal Cycler	Thermo Elektron Corporation, Karlsruhe
peqSTAR Thermocycler 96 Universal	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Ultraschallpotterer Branson Sonifier 250	G. Heinemann, Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch Gmünd
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., NY, USA

Waagen

Feinwaage	ACCULAB, Sartorius group, Göttingen
Waage	OHAUS CS Series, Greifensee, Schweiz

Zellkulturgeräte

Heracell 150 Cell Culture Incubator	Heraeus Holding, Hanau
Sicherheitswerkbank Hera Safe	Heraeus Holding, Hanau

Zentrifugen

Megafuge 1,0	Heraeus Holding, Hanau
Zentrifuge 5415C	Merck, Darmstadt
Zentrifuge	Function line, Labofuge 400R, Heraeus Holding, Hanau
Kühlzentrifuge	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
Kühlzentrifuge NAPCO 2019R	Thermo Electron GmbH, Karlsruhe

### 3.10.2 Software

GraphPad Prism 6	GraphPad Software, USA
Gene Snap 7.09	Syngene, Cambridge, England
Image Studio Lite Version 4.0	Biosciences, Lincoln, USA
NIS Elements	Imaging Software, Nikon, Düsseldorf

### 3.10.3 Enzyme und Kits

DC Protein Assay Reagent A	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
DC Protein Assay Reagent B	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, München
Hydroxyprolinassay	QuickZyme BioSciences, Leiden, Niederlande

### 3.10.4 Puffer und Lösungen

1 % Blocking Solution	1 ml Blocking Solution in 100 ml PBS-Puffer
ADS-Puffer	Aqua dest., 6,78 g/l NaCl, 4,76 g/l HEPES, 8 ml/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1 g/l Glucose, 0,4 g/l KCl, 8 ml/l MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
DMEM-Nährmedium	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (+ Glukose 4,5 g/l; + L-Glutamin; – Pyruvat), FKS (10 % [v/v]), Penicillin-Streptomycin (20 U/ml Penicillin G; 20 µg/ml), Gentamycinsulfat (0,08 mg/ml)

DMEM-Hungermedium	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (+ Glukose 4,5 g/l; + L-Glutamin; – Pyruvat), FKS (10 % [v/v]), Penicillin-Streptomycin (20 U/ml Penicillin G; 20 µg/ml), Gentamycinsulfat (0,08 mg/ml)
Elektrophoresepuffer (Western Blot)	Aqua dest., 144 mg/ml Glycin, 30,3 mg/ml Tris, 10 mg/ml SDS
Enzym-Mix	ADS-Puffer, 0,6 mg/l Pankreatin, 0,5 mg/l Kollagenase
F 10 Medium	F 10 Medium (Ham + Glutamin), Horse Serum (10 % [v/v]), FKS (5 % [v/v]), Penicillin/Streptomycin (1 % [v/v])
Ladepuffer (Western Blot)	Aqua dest., 5 ml 50 % Glycerol, 1,25 g 10 % SDS, 2,5 ml 0,625 M Tris, 125 µl/ml 1 M DTT
Ladepuffer (DNA-Ladepuffer)	7ml Aqua dest., 3ml Glycerol, Xylen Cyanol F
Lysepuffer	100 mM Tris pH 6,8, 4 % SDS, 20 % Glycerol, 1 µg/ml 100 mM PMSF, 1 µg/ml Leupeptin, 0,72 µg/ml Aprotinin
5 % (1 %) Trockenmilch Puffer	5 g Trockenmilchpulver (1 g) in 100 ml PBS-Tween-Puffer
PBS-Puffer	Aqua dest., 80 g/l NaCl, 2 g/l KCl, 14,4 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2,4 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4
PBS-Tween-Puffer	Aqua dest., 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 0,24 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1,44 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1 ml/l Tween 20
Transferpuffer (Western Blot)	Aqua dest., 200 ml/l Methanol, 14,5 mg/ml Glycin, 2,9 mg/ml Tris; pH 8,3
TAE	Aqua dest., 242g/l Tris Base, 57,1ml/l Eisessig, 100ml/l 0,5M EDTA (pH 8,0)

### 3.10.5 Antikörper

#### Primärantikörper:

CTGF	sc-14939, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
MCR	sc-11412, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
11-beta-HSD-2	sc-365529, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA

#### Sekundärantikörper:

Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Konjugat	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Goat Anti-Rabbit IgG-Peroxidase	Sigma-Aldrich Chemie, München
Rabbit Anti-Goat IgG-Peroxidase	Sigma-Aldrich Chemie, München
Rhodamine (TRITC)-conjugated Anti-rabbit IgG	dianova, Jackson Immuno Research Laboratories, Germany

### **3.10.6 Verbrauchsmaterial**

Cell cultur coverslip, sterile	Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA
Cell scraper 25cm	Sarstedt, USA
Cover Glasses	VWR International, Darmstadt
Eppendorf Tube 1,5ml/2ml	Sarstedt, USA
Extra thick blot paper filter paper	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Falcons 15ml/50ml	Greiner, Frickenhausen
High Performance chemiluminescence film	GE Healthcare, München
Microscope slides	VWR International, Darmstadt
Nitrocellulose Membranes 0,2µm	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
PCR Eppendorf Tube	VWR International, Darmstadt
Pipetten 5ml/10ml/25ml	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
Runde Deckgläser	Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA
Tissue culture plate, 24 well	Becton Dickinson, Labware, Heidelberg
Zellkulturschale 60	VWR, TPP, Schweiz
Zellkulturtestplatte 6 well	VWR, TPP, Schweiz

### **3.10.7 Chemikalien**

Acrylamid Electrophoresis Purity Reagent 30%	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Agarose	Lonza, Rockland, ME, USA
Albumin bovin Fraction V (BSA) pH 7,0	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Aldosteron	Sigma-Aldrich Chemie, München
Angiotensin II	Sigma-Aldrich Chemie, München
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Aqua ad inj.	Braun Melsungen AG, Melsungen
Blocking Solution	Roche, Mannheim
BR4628	Bayer, Deutschland
cDNA reverse transcription set (mit RNase Inhibitor)	Applied Biosystems, Foster city, USA
Chloroform	Braun Melsungen AG, Melsungen
Cortison	Rotexmedica GmbH, Germany

di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie, München
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)	Merck, Darmstadt
Dublecco's modifiziertes Eagle Medium	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Ethanol absolut	VWR, Darmstadt
Ethanol denaturated	Sigma-Aldrich Chemie, München
Ethidiumbromid	VWR, Darmstadt
F 10-Medium	Fisher Scientific
Fötales Kälberserum (FKS)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Futtermittel	ssniff, Soest, Germany
Gentamycinsulfat	Merck, Darmstadt
Glukose	Sigma-Aldrich Chemie, München
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie, München
HEPES	Merck, Darmstadt
Horse Serum	Sigma-Aldrich Chemie, München
Immersion Oil	Cargille Laboratories, Inc., Cedar Grove, NJ, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenkarbonat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Methanol	VWR, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Neonatal Calf Serum (NCS)	Invitrogen, Karlsruhe
NSC-2766 Rac 1 Inhibitor	VWR, Darmstadt
Paraffin	Leica Microsystems, Nussloch
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie, München
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Primer for/rev CTGF	Eurofins MWG GmbH, Ebersberg
Primer for/rev GAPDH	Eurofins MWG GmbH, Ebersberg
RNA pure	peqlab, VWR, Erlangen
Simvastatin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Sirius Red F3BA	Polysciences Europe GmbH, Eppelheim
Spironolacton	Sigma-Aldrich Chemie, München
Telmisartan	Böhringer Iggelheim, Deutschland
Trockenmilchpulver	Edeka Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie, München
Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris)	VWR International, Darmstadt
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie, München
Trypsin-EDTA	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie, München
Vectashield Mounting Medium with Dapi	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Wasser, vollentsalzt und destilliert (Aqua. dest.)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Xylol	Merck, Darmstadt

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Phänotyp der RacET Mäuse

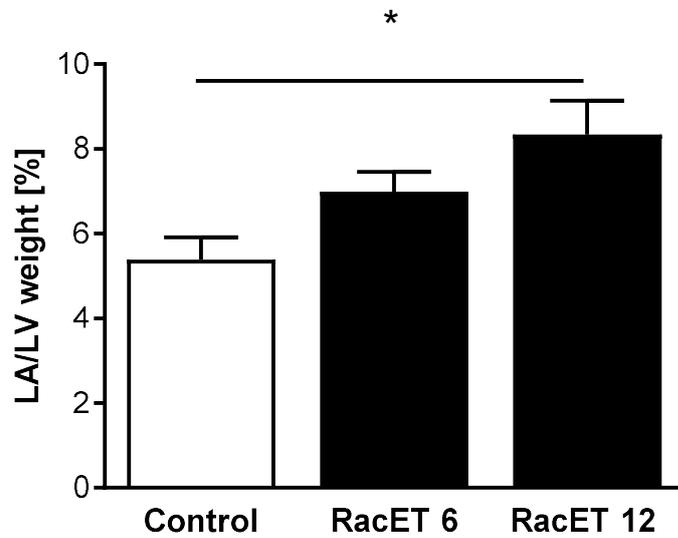
Für die folgenden Versuche wurden transgene Mäuse mit kardialer Überexpression von Rac1 verwendet (RacET). Diese entwickeln altersabhängig spontan Vorhofflimmern (Adam et al., 2007).

Um den Phänotyp mit strukturellen und altersabhängigen Veränderungen bei den transgenen Mäusen aufzuzeigen, wurden sowohl die Größe als auch das Gewicht der RacET und der Wildtyp Mäuse gemessen. Das Verhältnis des Gewichtes zwischen dem linken Atrium und dem linken Ventrikel zeigte einen signifikanten Unterschied von 5,4 +/- 0,5% beim Wildtyp im Vergleich zu RacET (12 Monate alt) 8,3 +/- 0,8% ( $p < 0,05$ , Abbildung 1A). Bei sechs Monate alten RacET bestand kein signifikanter Unterschied. Diese Daten zeigen eine altersabhängige Dilatation der Vorhöfe von transgenen RacET Mäusen.

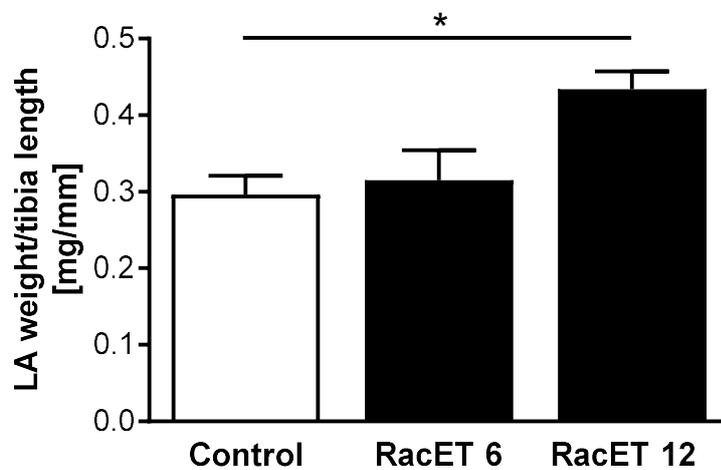
Um festzustellen, ob es sich um eine isolierte Vergrößerung des Herzens handelte, oder ob sich auch insgesamt die Gesamtkörpergröße verändert hatte, wurde das Gewicht des linken Vorhofs mit der Tibialänge verglichen. Hierbei konnte ein erhöhtes Verhältnis zwischen dem Gewicht des linken Vorhofes und der Tibialänge bei den 12 Monate alten RacET-Mäusen gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden. Der Unterschied lag bei 0,43 +/- 0,02 mg/mm (RacET) gegenüber 0,3 +/- 0,02 mg/mm (Wildtyp) ( $p < 0,05$ , Abbildung 1B). Bei sechs Monate alten RacET bestand kein signifikanter Unterschied.

Es zeigte sich also bei den 12 Monate alten transgenen Mäusen ein vergrößerter linker Vorhof überproportional zum linken Ventrikel als auch zur Tibialänge.

A



B

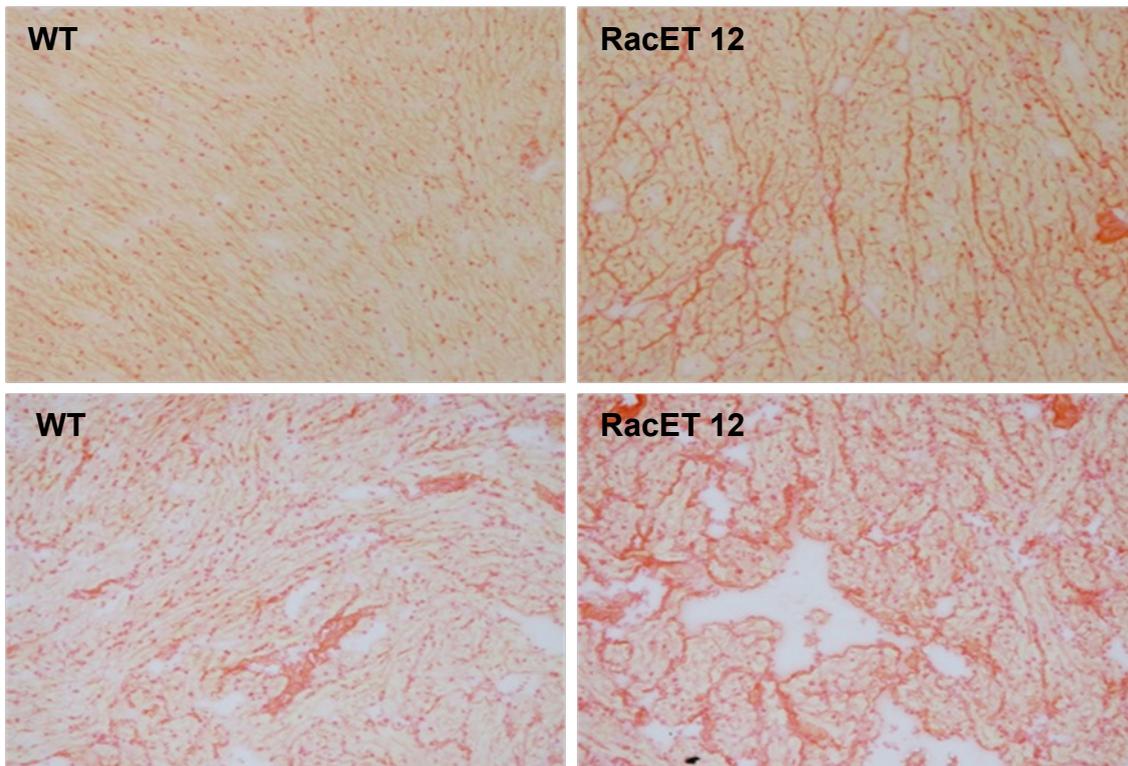


**Abbildung 1: Dilatierte Vorhöfe bei transgenen Mäusen mit aktivem Rac1 im Vergleich zum Wildtyp.**

Transgenen Mäusen wurden Herz und Tibia entnommen und gewogen bzw. die Länge gemessen. Abb 1. A und B stellen das Gewicht linker Vorhöfe im Verhältnis zum linken Ventrikel (A) und der Tibialänge (B) bei transgenen Mäusen mit einer herzspezifischen Überexpression von Rac1 im Alter von 6 (RacET 6) und 12 (RacET 12) Monaten im Vergleich zum Wildtyp dar (Control) (\*  $p < 0,05$ ).

## 4.2 Fibrose bei RacET Mäusen

Die Fibrose der linken Vorhöfe von RacET und Wildtyp (WT) wurde mittels Sirius Red Färbung untersucht. Abbildung 2 zeigt die Gewebeschnitte mit vermehrter Fibrose bei 12 Monate alten RacET im Vorhof im Vergleich zu Wildtyp Mäusen.

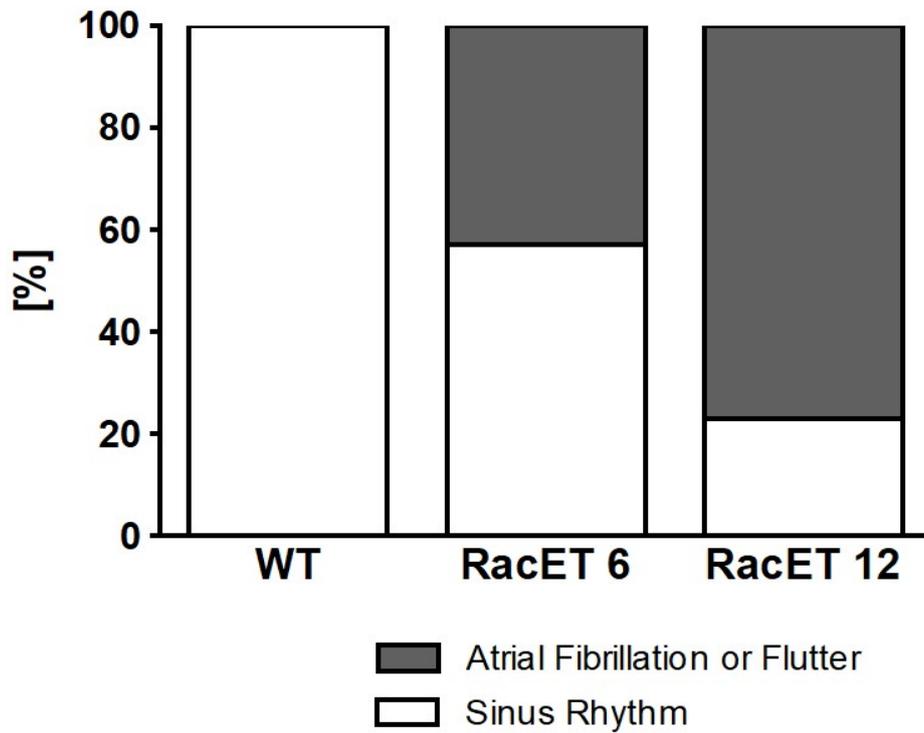


### **Abbildung 2: Vermehrte Fibrose bei RacET gegenüber dem Wildtyp**

Gewebeschnitte von RacET und Wildtyp wurden mit Sirius Red gefärbt. Zu sehen ist eine Zunahme von Fibrose im linken Atrium der 12 Monate alten RacET Mäuse im Vergleich zum Wildtyp (WT). Oben: 100-fache Vergrößerung. Unten: 1000-fache Vergrößerung.

### **4.3 Prävalenz von Vorhofflimmern bei RacET Mäusen**

Insgesamt zeigten 17 der RacET Mäuse einen Sinusrhythmus, 10 Mäuse ein Vorhofflimmern oder Vorhofflattern. Aufgeteilt nach Alter zeigte sich, dass 43% der 6 Monate alten Tiere Vorhofflimmern oder Vorhofflattern aufwiesen. Bei den 12 Monate alten Tieren lag der Anteil bei 77%. Dies zeigt eine altersabhängige Prävalenz von Vorhofflimmern/Vorhofflattern bei den RacET Mäusen (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Prävalenz von Vorhofflimmern/Vorhofflattern bei transgenen RacET Mäusen.**

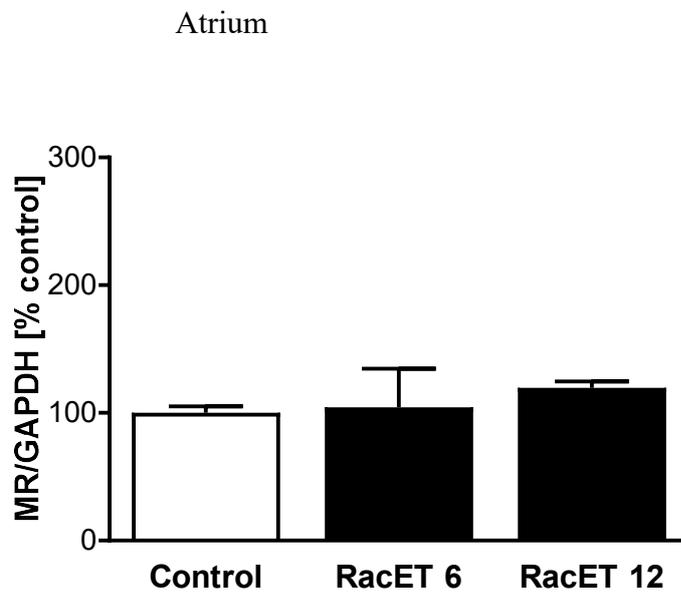
Von transgenen RacET Mäusen und Mäusen vom Wildtyp wurde anhand eines 3-Kanal-EKG zwischen Sinusrhythmus und Vorhofflimmern/Vorhofflattern differenziert. Die Angaben sind in Prozent im Alter von 6 und 12 Monaten.

#### **4.4 Expression des Mineralocorticoid-Rezeptors bei RacET Mäusen**

Die Mineralocorticoid-Rezeptor-Expression wurde bei Wildtyp Mäusen, 6 Monate alten RacET und 12 Monate alten RacET Mäusen sowohl im Atrium als auch im Ventrikel untersucht.

Im Western Blot zeigte sich im Atrium und im Ventrikel eine gleiche Mineralocorticoid-Rezeptor-Expression bei RacET und beim Wildtyp (siehe Abbildung 4; Atrium: 100 +/- 5% (Wildtyp) vs. 105 +/- 30% (6 Monate alte RacET) vs. 120 +/- 5% (12 Monate alte RacET), p = ns; Ventrikel: 100 +/- 3,2% (Wildtyp) vs. 156 +/- 24,3% (6 Monate alte RacET) vs. 125 +/- 13,4% (12 Monate alte RacET) p = ns).

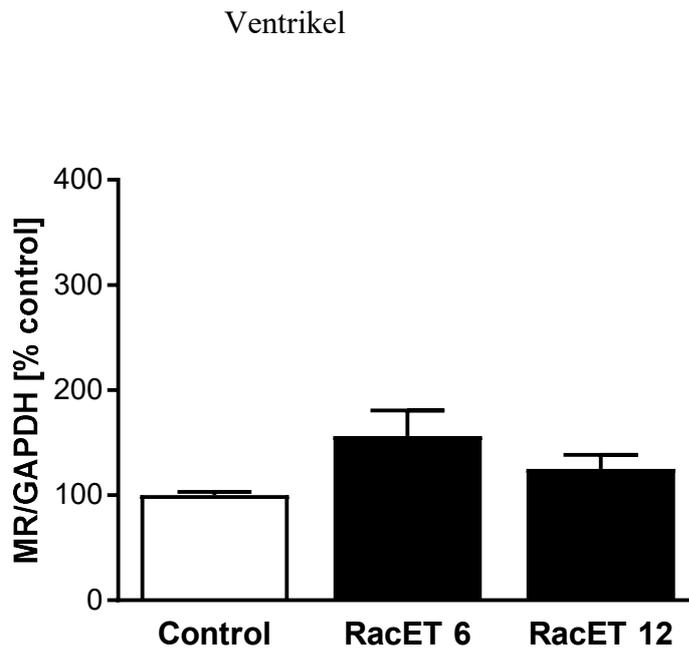
**A**



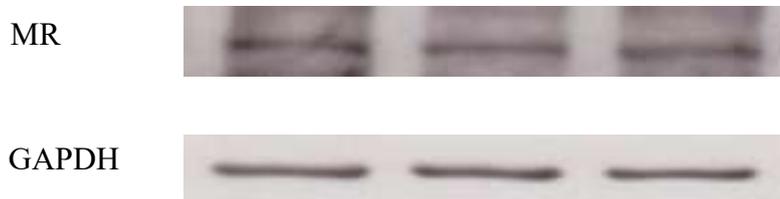
**B**



**C**



**D**



**Abbildung 4: MR-Proteinexpression bei RacET im linken Atrium und Ventrikel im Vergleich zum Wildtyp**

**A** 6 und 12 Monate alte transgene Mäuse zeigten eine vergleichbare MR-Expression auf Proteinebene im linken Atrium im Vergleich zum Wildtyp. **B** repräsentativer Western Blot mit GAPDH als Ladekontrolle.

**C** Die densitometrische Quantifizierung des Western Blots zeigte keine Erhöhung der MR-Proteinexpression bei den 6 Monate alten und 12 Monate alten RacET im linken Ventrikel im Vergleich zum Wildtyp.

**D** repräsentativer Western Blot, GAPDH als Proteinladekontrolle.

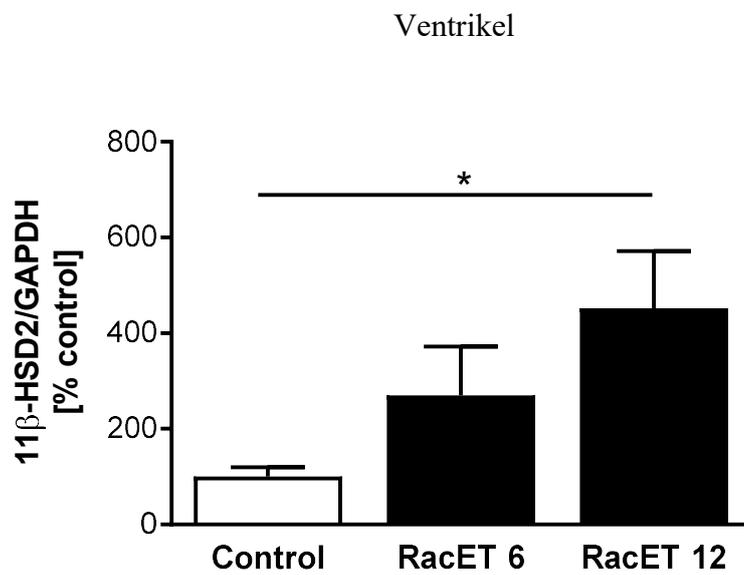
## 4.5 Expression von 11- $\beta$ -HSD-Typ-2 bei RacET Mäusen

Die Expression von 11- $\beta$ -HSD-Typ-2 wurde im linken Ventrikel bei 6 und 12 Monate alten RacET Mäusen mit dem Wildtyp verglichen. Wie Abbildung 5A zeigt, konnte eine erhöhte 11- $\beta$ -HSD-Typ-2 Konzentration bei den 12 Monate alten RacET Mäusen im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden. Die Western Blot-Analyse zeigte bei den 12 Monate alten RacET im linken Ventrikel eine vierfach erhöhte Expression von 11- $\beta$ -HSD-Typ-2 (RacET 12, 452 +/- 120%,  $p < 0,05$  im Vergleich zum Wildtyp 100 +/- 20%). Die Expression bei den 6 Monate alten RacET war nicht signifikant gegenüber dem Wildtyp erhöht.

Auch die Vorhöfe von 6 und 12 Monate alten RacET und Wildtyp Mäusen wurden untersucht. Hierbei zeigte sich eine erhöhte Expression von 11- $\beta$ -HSD-Typ-2 bei den 12 Monate alten RacET gegenüber dem Wildtyp. Eine beinahe 7-fach erhöhte Expression zeigte sich hierbei (RacET 12, 665 +/- 189%,  $p < 0,05$  im Vergleich zum Wildtyp 100 +/- 44%). Die Expression bei den 6 Monate alten RacET war nicht signifikant gegenüber dem Wildtyp erhöht.

Insgesamt zeigte sich eine altersabhängige 11- $\beta$ -HSD-Typ-2-Überexpression im Vorhof und Ventrikel bei RacET im Vergleich zum Wildtyp.

**A**



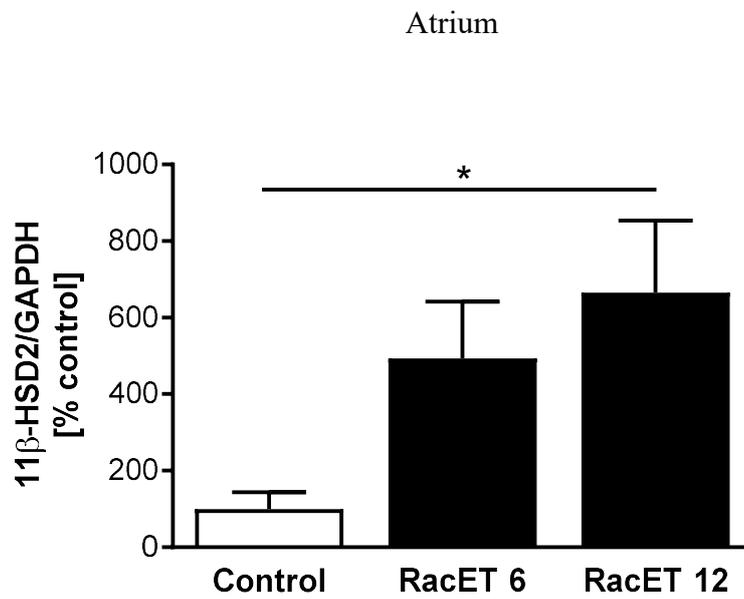
**B**



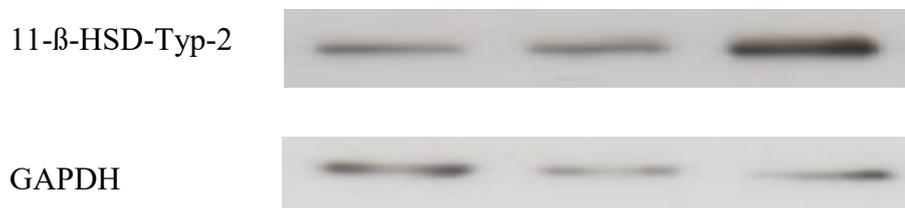
**Abbildung 5a: Vermehrte Proteinexpression von 11-β-HSD-Typ-2 bei 12 Monate alten RacET im Vergleich zur Kontrollgruppe**

**A** Es zeigte sich eine vermehrte 11-β-HSD-Typ-2 Expression im linken Ventrikel bei den 12 Monate alten RacET im Vergleich zum Wildtyp (\* p < 0,05). **B** repräsentativer Western Blot mit GAPDH als Ladekontrolle.

C



D



**Abbildung 5b: Erhöhte Expression von 11-β-HSD-Typ-2 im Atrium bei 12 Monate alten RacET im Vergleich zur Kontrollgruppe**

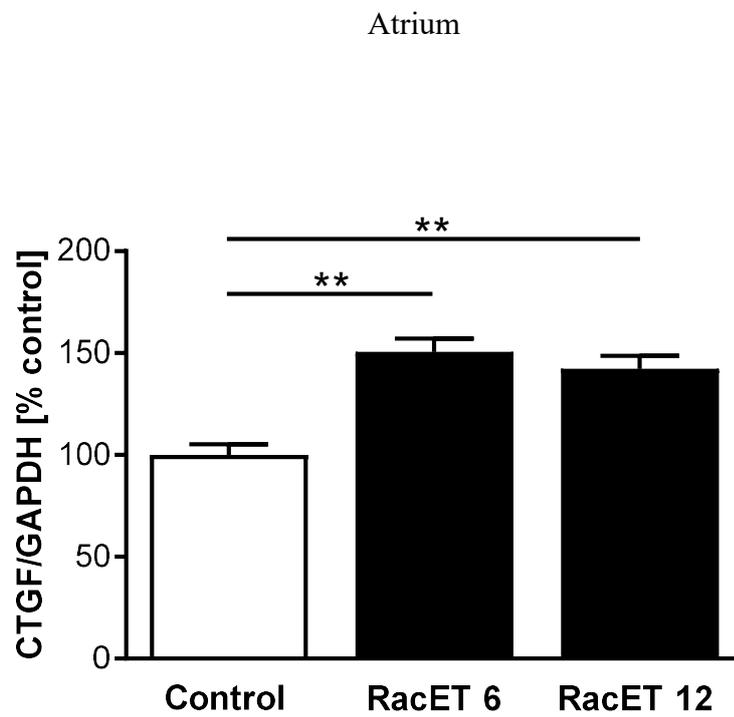
C Es zeigte sich eine vermehrte 11-β-HSD-Typ-2-Expression im Atrium bei den 12 Monate alten RacET im Vergleich zum Wildtyp (\*  $p < 0,05$ ). D repräsentativer Western Blot mit GAPDH als Ladekontrolle.

## 4.6 Expression von CTGF bei RacET Mäusen

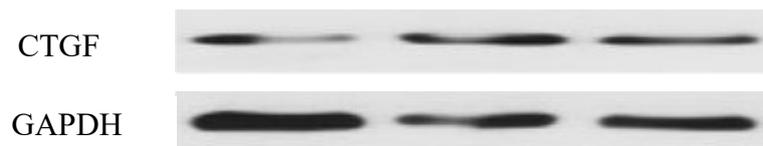
Sowohl 6 als auch 12 Monate alte RacET Mäuse zeigten im linken Atrium eine erhöhte CTGF-Proteinexpression im Vergleich zum Wildtyp (RacET 12 Monate, 142 +/- 6,4%, RacET 6 Monate, 151 +/- 6,4%,  $p < 0,01$ , im Vergleich zum Wildtyp 100 +/- 5,3%, Abbildung 6a).

Eine erhöhte CTGF-Genexpression zeigte sich im linken Atrium bei den 6 Monate alten RacET Mäusen (153 +/- 12%,  $p < 0,05$ ) und den 12 Monate alten RacET Mäusen (149 +/- 14%,  $p < 0,05$ ) im Vergleich zum Wildtyp (100 +/- 11%, Abbildung 6b).

**A**



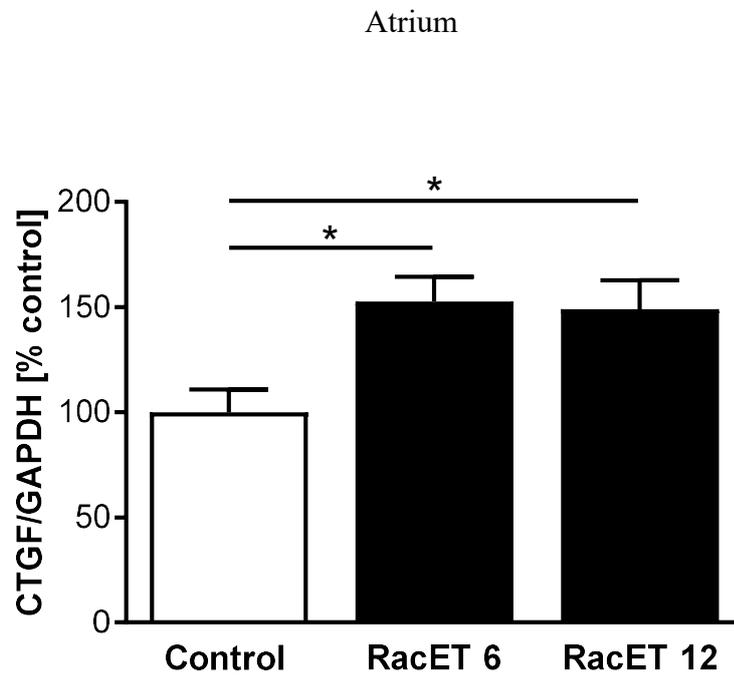
**B**



**Abbildung 6a: Erhöhte CTGF-Proteinexpression im linken Atrium bei RacET Mäusen**

**A** Erhöhte CTGF-Proteinexpression im linken Atrium bei RacET Mäusen im Vergleich zum Wildtyp (\*\*  $p < 0,01$ ). **B** repräsentativer Western Blot mit GAPDH als Ladekontrolle.

**A**



**B**



**Abbildung 6b: Erhöhte CTGF-Genexpression im linken Atrium bei RacET Mäusen**

**A** Erhöhte CTGF-Genexpression im linken Atrium bei RacET im Vergleich zum Wildtyp (\*  $p < 0,05$ ).

**B** repräsentative RT-PCR mit GAPDH als Ladekontrolle.

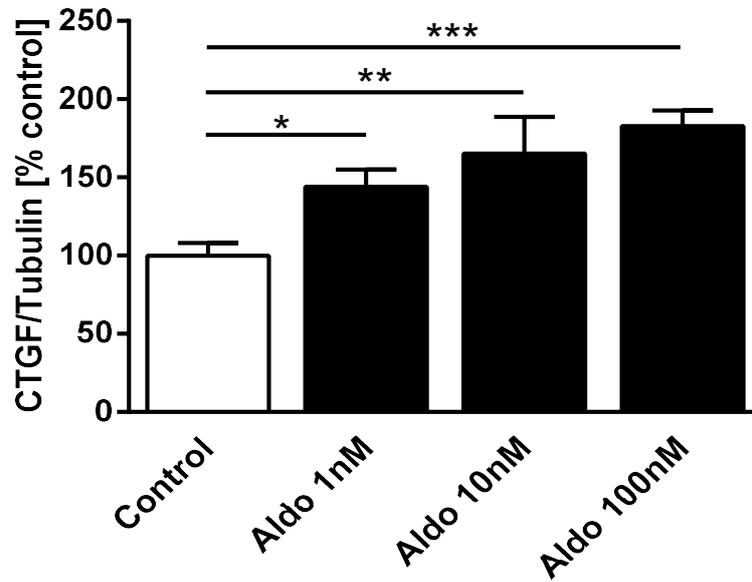
## **4.7 Aldosteron-abhängige CTGF-Expression in kardialen Fibroblasten**

Um eine effektive Induktion profibrotischer Mediatoren durch Aldosteron in Fibroblasten zu charakterisieren, wurde ein Aldosteron-Konzentrationsverlauf durchgeführt. Hierfür wurden die Fibroblasten mit unterschiedlichen Aldosteronkonzentrationen (1nM, 10nM und 100nM) für 24h behandelt und anschließend die CTGF-Expression mittels Western Blot bestimmt.

Wie Abbildung 7 zeigt erfolgte durch jede der getesteten Konzentrationen eine signifikante Erhöhung der CTGF-Proteinexpression. Dabei lag die Erhöhung der CTGF-Expression durch 1nM Aldosteron bei 144 +/- 11% ( $p < 0,05$ ), durch 10nM bei 165 +/- 23% ( $p < 0,01$ ) und durch 100nM bei 183 +/- 10% ( $p < 0,001$ ).

In allen folgenden Versuchen wurden 10nM Aldosteron verwendet, da diese unmittelbar oberhalb der IC50 von Aldosteron liegt (2nM). (Grillo et al., 1990)

**A**



**B**



### **Abbildung 7: Aldosteron-Konzentrationsverlauf**

**A** Kardiale Fibroblasten wurden mit 1nM, 10nM und 100nM Aldosteron für 24h behandelt und anschließend die CTGF-Proteinexpression im Western Blot bestimmt. Hierbei zeigten alle Konzentrationen eine Erhöhung der CTGF-Expression (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). **B** repräsentativer Western Blot, Tubulin als Proteinladekontrolle.

## **4.8 Regulation der CTGF-Proteinexpression und des Hydroxyprolin-Gehaltes durch Aldosteron**

Um die direkte Bedeutung des Mineralocorticoids Aldosteron und des Glucocorticoids Cortisol darzustellen wurden kardiale Myozyten mit beiden Substanzen behandelt und die CTGF-abhängige Proteinkonzentration durch den Western Blot bestimmt. Hierfür wurden Kardiomyozyten mit Aldosteron und/oder Cortisol behandelt.

Ziel dieses Versuchs war, unter experimentellen Bedingungen zu testen, ob die Anwesenheit von Cortisol, welches den Mineralocorticoid-Rezeptor bindet und blockiert, jedoch nicht aktiviert, die Aldosteron-induzierte profibrotische Signaltransduktion beeinflusst.

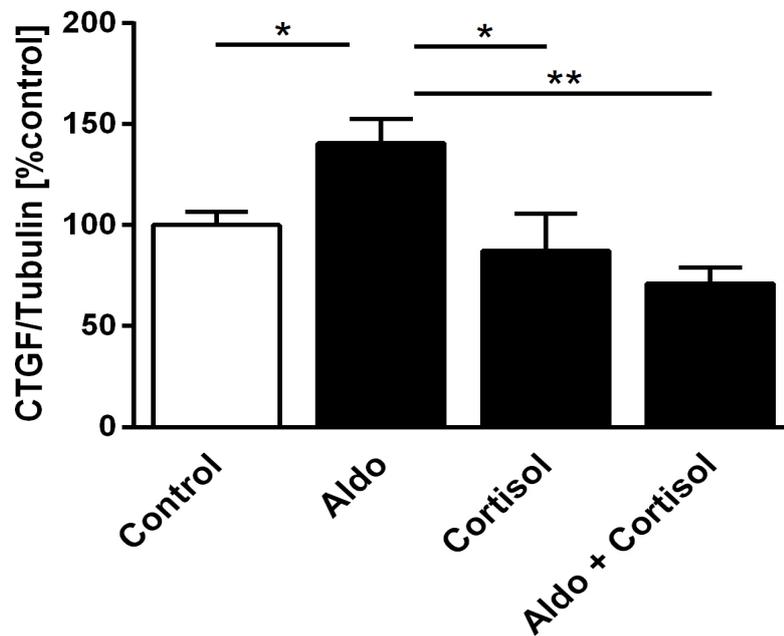
Die Ergebnisse zeigen, dass Aldosteron im Vergleich zu unbehandelten Kardiomyozyten eine signifikante CTGF-Überexpression bewirkt (141 +/- 12% ( $p < 0,05$ ), Abbildung 8a). In Anwesenheit von Cortisol war die CTGF-Expression im Vergleich zu den unbehandelten Kardiomyozyten unverändert. Im Vergleich zu den mit Aldosteron behandelten Kardiomyozyten war die CTGF-Expression unter Cortisol vermindert (CTGF-Expression: 87,5 +/- 18,1% ( $p < 0,05$ ) Aldosteron vs. Cortisol, Abbildung 8a). In der Kombination von Aldosteron- und Cortisolbehandlung war die CTGF-Expression im Vergleich zu den allein mit Aldosteron behandelten Kardiomyozyten reduziert (72 +/- 8% ( $p < 0,01$ ), Abbildung 8a).

Um die molekulare Interaktion zwischen Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten zu untersuchen, wurden die Fibroblasten mit dem Medium der Kardiomyozyten behandelt.

Dazu wurde ein Hydroxyprolinassay verwendet, der den Anteil an Hydroxyprolin im Verhältnis zum Gesamtprotein darstellt. Hierfür wurde Hydroxyprolin im Medium der kardialen Fibroblasten bestimmt.

Aldosteron führte zu einer signifikanten Erhöhung von Hydroxyprolin im Vergleich zu den Kontrollen (154 +/- 12% ( $p < 0,001$ ), Abbildung 8b). Die alleinige Behandlung mit Cortisol brachte im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Veränderung. In der Kombination von Aldosteron mit Cortisol konnte der vorherige Aldosteroneffekt komplett aufgehoben werden (114 +/- 12% ( $p < 0,05$  im Vergleich zur Behandlung mit Aldosteron), Abbildung 8b).

A

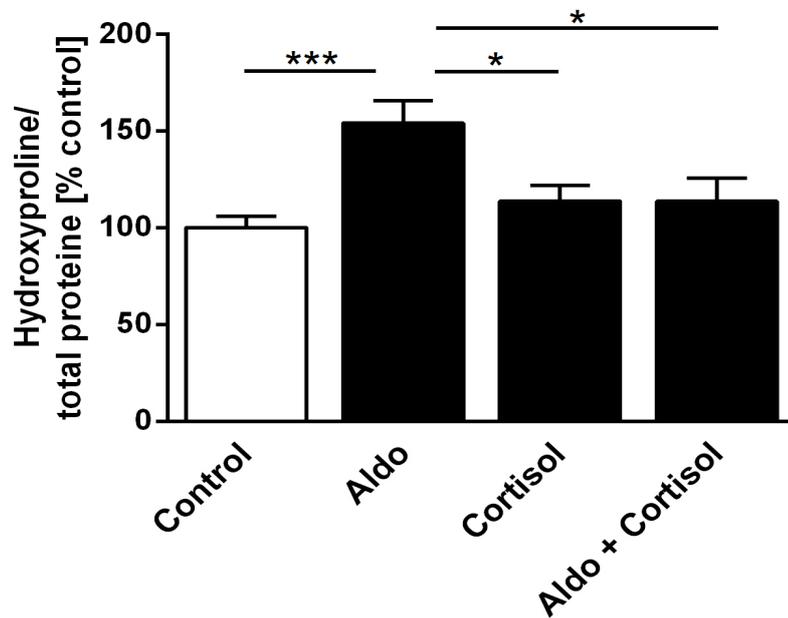


B



### Abbildung 8a: Cortisol führt zu einer Blockade des Mineralocorticoid-Rezeptors

A Kardiomyozyten wurden mit und ohne Aldosteron (10nM, 24h) behandelt. Ebenso erfolgte die Behandlung mit und ohne Cortisol (127ng/ml, 24h) und in der Kombination von Aldosteron und Cortisol. Die densitometrische Quantifizierung zeigte eine erhöhte CTGF-Proteinexpression durch Aldosteron und eine Verhinderung des Effektes durch Zugabe von Cortisol (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ). B repräsentativer Western Blot, Tubulin als Ladekontrolle.



**Abbildung 8b: Erhöhte Kollagenproduktion in kardialen Fibroblasten durch Kardiomyozyteninteraktion**

Kardiale Fibroblasten wurden mit Medium von Kardiomyozyten behandelt, die zuvor mit Aldosteron behandelt wurden. Dies führte zu einer erhöhten Kollagenproduktion. Die gemeinsame Inkubation von Aldosteron mit Cortisol verhinderte diesen Effekt (\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

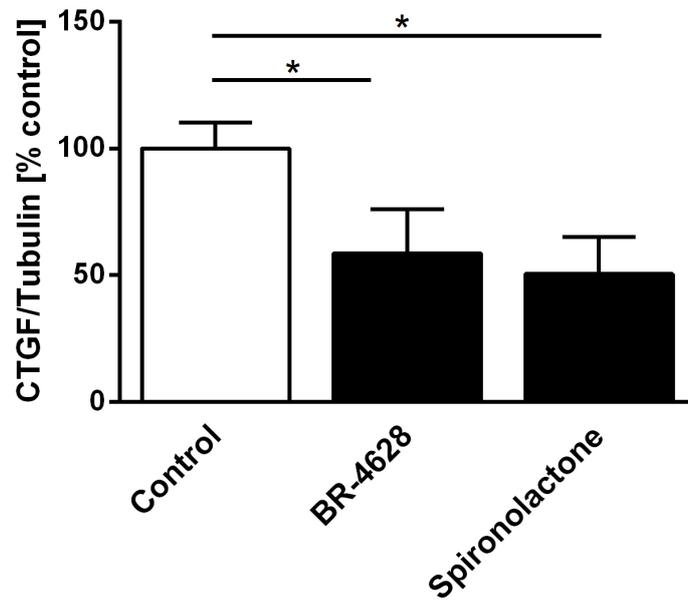
## 4.9 Regulation der CTGF-Expression in kardialen Fibroblasten

Im Folgenden galt es die Rolle der MR-Antagonisten Spironolacton und BR-4628 bezüglich der CTGF-Expression zu untersuchen. Für diesen Versuch wurden kardiale Fibroblasten mit BR-4628 (500nM, 25h) und Spironolacton (500nM, 25h) behandelt. Es zeigte sich bei beiden Substanzen eine Reduktion der basalen CTGF-Proteinexpression unter Kontrollniveau (BR-4628: 59 +/- 17%  $p < 0,05$  und Spironolacton: 51 +/- 15%,  $p < 0,05$ ).

Der Rac Inhibitor NSC23766 verhindert spezifisch die Aktivierung von Rac1 (Gao et al 2004). Kardiale Fibroblasten wurden mit und ohne Aldosteron und in der Kombination mit NSC23766 behandelt. Die Behandlung mit NSC23766 erfolgte für 25h (100 $\mu$ M).

Wie Abbildung 9b zeigt, induzierte Aldosteron die Proteinexpression von CTGF (183 +/- 39 %,  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe). Eine Präinkubation mit NSC23766 inhibierte diesen Effekt vollständig (39 +/- 2,8%,  $p < 0,01$  im Vergleich zu Aldosteron).

**A**



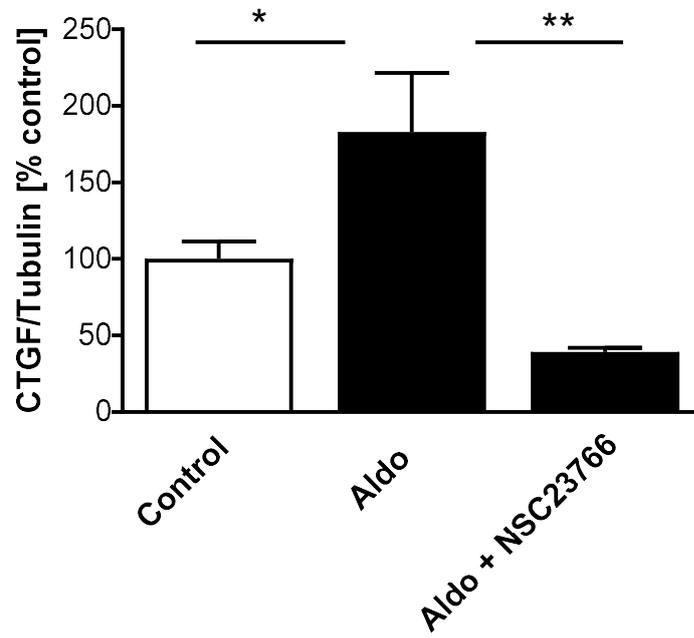
**B**



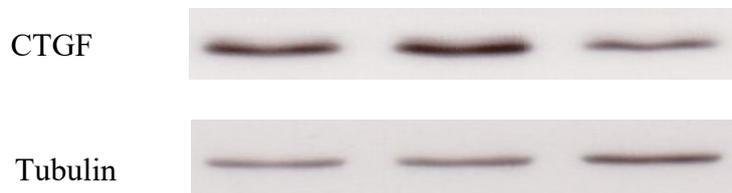
**Abbildung 9a: Hemmung der CTGF-Proteinexpression durch Spironolacton und BR-4628**

**A** Die Behandlung von kardialen Fibroblasten mit BR-4628 (500nM, 25h) und Spironolacton (500nM, 25h) führte zu einer verminderten CTGF-Proteinexpression (\*  $p < 0,05$ ). **B** repräsentativer Western Blot, Tubulin als Proteinladekontrolle.

A



B



**Abbildung 9b: Aldosteron induziert eine Rac1-abhängige CTGF-Proteinexpression in kardialen Fibroblasten.**

A Kardiale Fibroblasten wurden mit und ohne Aldosteron (10nM, 24h) und mit der Kombination von Aldosteron und NSC23766 (100µM, 25h) behandelt. Die Abbildung zeigt einen Rac1-abhängigen Aldostereffekt auf die CTGF-Expression, der durch den Rac1 Inhibitor NSC23766 vollständig reversibel ist (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

B repräsentativer Western Blot, Tubulin als Ladekontrolle.

## 4.10 Mineralocorticoid-Rezeptor-Translokation in kardialen Fibroblasten

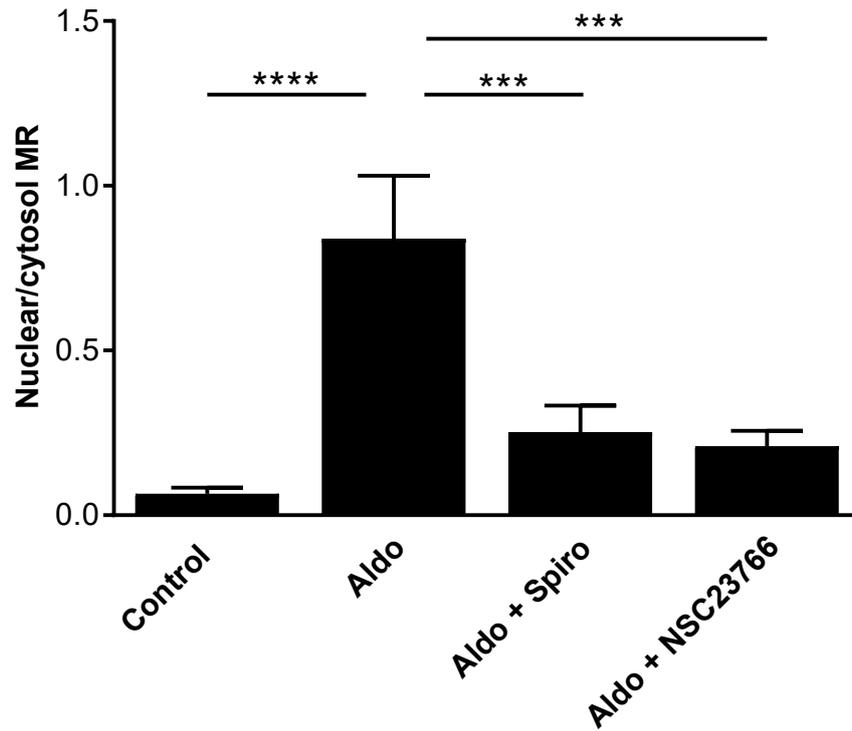
Die Translokation des Mineralocorticoid-Rezeptors in den Zellkern bedeutet eine Aktivierung des Rezeptors. Die Mineralocorticoid-Rezeptor-Translokation in den Zellkern von kardialen Fibroblasten wurde immunhistochemisch analysiert. In der Auswertung wurde das Verhältnis der MR-Lokalisation im Zellkern und Zytoplasma bewertet.

Für die Färbung wurden die Fibroblasten mit und ohne Aldosteron und in der Kombination von Aldosteron und Spironolacton bzw. NSC23766 behandelt (Aldosteron: 10nM für 24h, Spironolacton: 500nM für 25h, NSC23766: 100nM für 25h).

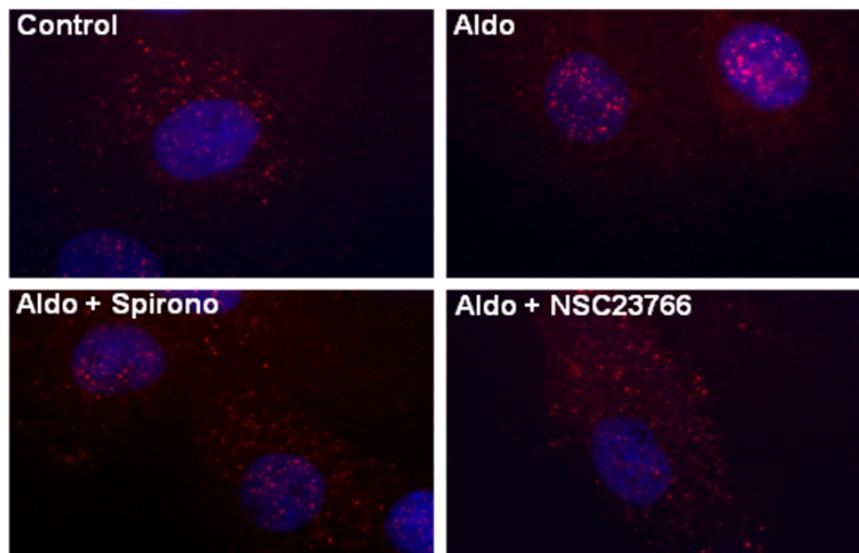
Abbildung 10 zeigt ein erhöhtes Zellkern/Zytoplasma-Verhältnis des Mineralocorticoid-Rezeptors mit  $0,84 \pm 0,19$  unter Aldosteron im Vergleich zur Kontrollgruppe mit  $0,07 \pm 0,02$ , ( $p < 0,0001$ ). Dieser Effekt konnte durch Zugabe von Spironolacton als auch durch NSC23766 vollständig aufgehoben werden. (Kern-/Plasma Relation: Aldosteron mit Spironolacton:  $0,25 \pm 0,08$ , ( $p < 0,001$ ) und Aldosteron mit NSC23766:  $0,21 \pm 0,05$ , ( $p < 0,001$ )).

Diese Daten zeigen, dass Aldosteron eine Translokation des Mineralocorticoid-Rezeptors in den Zellkern bei kardialen Fibroblasten bewirkt, was einer Aktivierung des Rezeptors entspricht. Dieser Effekt konnte durch Inhibition des Mineralocorticoid-Rezeptors und Rac1 verhindert werden.

A



B



**Abbildung 10: Aldosteron bewirkt eine Mineralocorticoid-Rezeptor-Translokation in den Zellkern**

**A** Aldosteron bewirkt eine Translokation des Mineralocorticoid-Rezeptors in den Zellkern bei kardialen Fibroblasten. Dieser Vorgang kann durch Inhibition des Rezeptors durch Spironolacton und NSC23766 verhindert werden (\*\*\*)  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ). **B** MR immunhistochemische Färbung (TRITC), 1000-fache Vergrößerung.

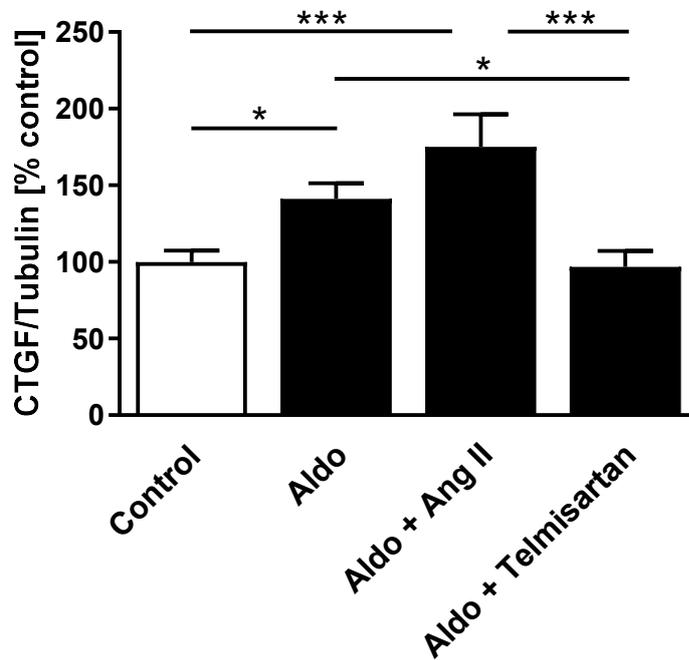
## 4.11 Aldosteron-Angiotensin II-Interaktionen

Sowohl mit Aldosteron (10nM, 24h) als auch mit Angiotensin II (10 $\mu$ M, 3h) behandelte kardiale Fibroblasten zeigten gegenüber den unbehandelten Fibroblasten eine erhöhte CTGF-Proteinexpression. In Abbildung 11a zeigten die mit Aldosteron behandelten Zellen eine Erhöhung der CTGF-Expression um 141 +/- 10% ( $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe 100 +/- 7,4%). In der Kombination von Aldosteron mit Angiotensin II zeigte sich eine CTGF-Expression von 175 +/- 21% ( $p < 0,001$  im Vergleich zur Kontrollgruppe). Eine Behandlung der Fibroblasten mit Aldosteron und Telmisartan zeigte eine Aufhebung des Aldosteroneffektes 97 +/- 11% ( $p < 0,05$ ).

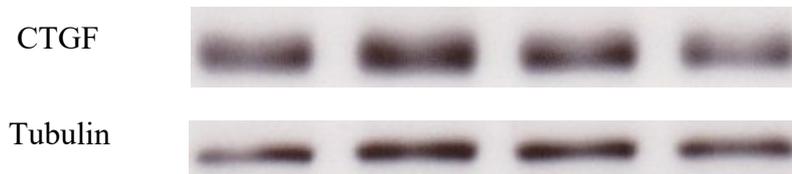
Abbildung 11b zeigt eine alleinige CTGF-Expression durch Angiotensin II 157 +/- 11% ( $p < 0,05$ ) und eine CTGF-Expression von 226 +/- 24% in der Kombination mit Aldosteron ( $p < 0,001$ ). Die durch Angiotensin II induzierte CTGF-Überexpression wurde durch die Behandlung mit Spironolacton nicht beeinflusst (Spironolacton mit Angiotensin II: 152 +/- 26%,  $p = ns$  gegenüber Angiotensin II).

Diese Daten zeigen, dass Angiotensin II und Aldosteron synergistisch wirken. MR-Antagonisten scheinen die durch Angiotensin II induzierten profibrotischen Veränderungen nicht zu beeinflussen.

A



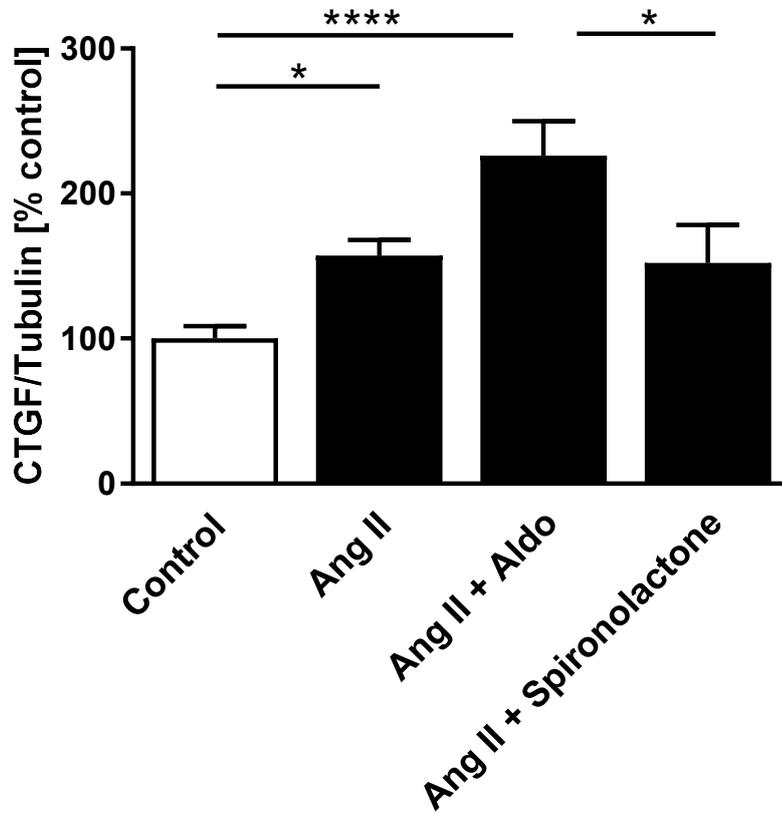
B



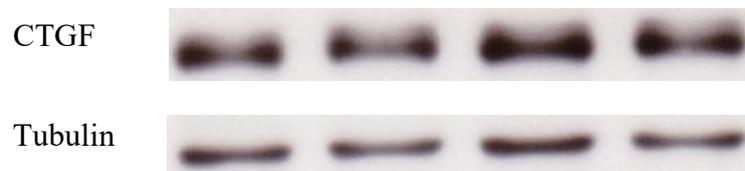
**Abbildung 11a: Aldosteron-Angiotensin II-Interaktion in kardialen Fibroblasten.**

A Aldosteron und Angiotensin II führten zu einer additiven CTGF-Überexpression. Durch Telmisartan konnte dieser Effekt vollständig aufgehoben werden (\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). B repräsentativer Western Blot mit Tubulin als Ladekontrolle.

C



D



**Abbildung 11b: Aldosteron-Angiotensin II-Interaktion in kardialen Fibroblasten.**

**A** Aldosteron und Angiotensin II führten zu einer additiven CTGF –Überexpression. Durch die Behandlung mit Spironolacton wurde die Angiotensin II induzierte CTGF-Überexpression nicht beeinflusst (\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). **B** repräsentativer Western Blot mit Tubulin als Ladekontrolle.

## 5. Diskussion

Die Daten dieser Arbeit zeigen eine altersabhängige linksatriale Dilatation und eine vermehrte Fibroseentstehung und CTGF-Expression bei transgenen Mäusen mit herzspezifischer Rac1-Überexpression (RacET Mäuse). RacET Mäuse entwickeln altersabhängig Vorhofflimmern und Vorhofflattern. Eine vermehrte MR-Expression konnte bei den transgenen Mäusen nicht nachgewiesen werden. Es wurde jedoch aufgezeigt, dass der Mineralocorticoid-Rezeptor und dessen Regulierung durch die 11- $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Typ-2 einen wichtigen Beitrag im fibrotischen Umbau des Herzens spielen, was durch eine Beeinflussung der CTGF-Expression dargestellt wurde.

In kardialen Fibroblasten regulierte Aldosteron den profibrotischen Mediator CTGF. Des Weiteren wurde eine Rac1-abhängige Translokation, d.h. Aktivierung des Mineralocorticoid-Rezeptors in den Zellkern dargestellt. Die Aldosteron induzierte CTGF-Überexpression in Kardiomyozyten wurde durch die Anwesenheit von Cortisol vollständig aufgehoben, womit direkt auch die durch Aldosteron induzierte Kollagenbildung in Fibroblasten reduziert wurde. Aldosteron und Angiotensin II zeigten eine synergistische Wirkung auf die CTGF-Expression bei kardialen Fibroblasten. Durch Mineralocorticoid-Rezeptor-Antagonisten, Angiotensin II-Rezeptorblocker und Rac1 Inhibitoren konnte die Expression von CTGF vermindert werden.

Bei den 12 Monate alten RacET Mäusen zeigte sich eine altersabhängige Dilatation des Herzens (Abbildung 1) sowie eine vermehrte Fibroseentstehung (Abbildung 2), was mit dem Auftreten von Vorhofflimmern/Vorhofflattern assoziiert ist (Abbildung 3). Eine Zunahme der CTGF-Expression der RacET Mäuse im Vergleich zum Wildtyp konnte in unseren Versuchen nachgewiesen werden. CTGF wurde als Fibrosemarker verwendet, da dies ein etablierter profibrotischer Marker ist und sowohl in Kardiomyozyten, als auch in kardialen Fibroblasten exprimiert wird (Adam et al., 2010, Koitabashi et al., 2007).

Die Expression des Mineralocorticoid-Rezeptors war im Mausmodell bei Tieren mit und ohne Rac1-Überexpression gleich. Auch linke Vorhöfe von Patienten mit und ohne Vorhofflimmern zeigten eine ähnliche Expression des Rezeptors (Lavall et al. 2014). Andere Studien zeigen jedoch eine erhöhte Expression des Rezeptors bei Patienten mit

Vorhofflimmern (Tsai et al. 2010; De-An et al. 2010). Eine potentielle Erklärung hierfür könnten die ausgeprägteren Herzerkrankungen in den anderen Studien sein. In der Studie von De-An et al. (2010) lag bei den Patienten eine rheumatische Erkrankung der Herzklappen vor. Zudem bestand eine Herzinsuffizienz (NYHA II-III). In anderen Studien wurden rechte Vorhöfe verwendet (Tsai et al. 2010). Studien mit linken Vorhöfen sind eine Seltenheit. Die Verwendung von linken Vorhöfen in den Versuchen mit transgenen Tieren stellt somit eine Stärke dieser Untersuchungen dar.

Der Mineralocorticoid-Rezeptor besitzt ähnliche Bindungsaffinitäten für Aldosteron und Cortisol. Er wird jedoch unter physiologischen Bedingungen nahezu vollständig von Cortisol besetzt, da dieses eine circa tausendfach erhöhte Konzentration im humanen Serum hat. Das Enzym 11- $\beta$ -HSD-Typ-2 inaktiviert Cortisol zu Cortison. Die hohen Expressionslevel von 11- $\beta$ -HSD-Typ-2 sorgen dafür, dass die Glucocorticoide inaktiviert werden, nicht mehr an den Mineralocorticoid-Rezeptor binden und somit Bindungsstellen für Aldosteron frei sind (Odermatt et al 2012; Odermatt et al. 2009).

Unsere Daten zeigen, dass 11- $\beta$ -HSD-Typ-2 im RacET Mausmodell vermehrt exprimiert wird, was mit einer hohen Inzidenz von Vorhofflimmern sowie strukturellem Remodeling in diesen Tieren assoziiert ist. Eine Überexpression von 11- $\beta$ -HSD-Typ-2 zeigte sich ebenfalls in linken Vorhöfen bei Patienten mit Vorhofflimmern im Vergleich zum Patienten mit Sinusrhythmus (Lavall et al. 2014). Desweiteren zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Hydroxyprolin- und der 11- $\beta$ -HSD-Typ-2 Konzentration (Lavall et al. 2014). Diese Erkenntnisse zeigen, dass die alleinige Expressionsanalyse des Mineralocorticoid-Rezeptors nicht ausreicht, sondern 11- $\beta$ -HSD-Typ-2 als funktionelles Enzym mitbeurteilt werden muss.

Kardiale Fibroblasten exprimieren kein 11- $\beta$ -HSD-Typ-2 (Odermatt et al. 2009). Um herauszufinden, inwieweit 11- $\beta$ -HSD-Typ-2 eine Rolle bezüglich der profibrotischen Signalwege des MR spielt, wurden Experimente an Kardiomyozyten durchgeführt.

Die Daten unserer Studie zeigen, dass Kardiomyozyten unter Aldosteroneinfluss vermehrt CTGF exprimieren. Werden Fibroblasten mit dem Medium der mit Aldosteron behandelten Kardiomyozyten inkubiert, überträgt sich die profibrotische Reaktion auf Fibroblasten mit vermehrter Kollagenbildung. Dieser Effekt war in Anwesenheit von Cortisol nicht vorhanden, da dadurch die Bindung von Aldosteron am Rezeptor und seine Aktivierung verhindert wurden. Wenn unter pathophysiologischen Bedingungen und bei RacET Mäusen 11- $\beta$ -HSD-Typ-2 vermehrt exprimiert wird, kann dadurch eine vermehrte MR-abhängige

Signaltransduktion ermöglicht werden, was zur Entstehung von strukturellem Remodeling und Vorhofflimmern führt. Somit unterstreichen diese Daten die pathophysiologische Bedeutung von 11- $\beta$ -HSD-Typ-2 im Kontext von MR-vermittelter Fibroseentstehung.

Auch Koitabashi et al. zeigten 2007 eine Kardiomyozyten-Fibroblasten-Interaktion. Sie zeigten, dass die CTGF-Produktion durch Kardiomyozyten die Kollagenproduktion in kardialen Fibroblasten beeinflusst. Sie zeigten, dass CTGF in das Medium von Kardiomyozyten sezerniert wurde und dieses konditionierte Medium einen Anstieg von COL1A1 mRNA in kardialen Fibroblasten bewirkt. Eine Neutralisierung des konditionierten Mediums mit CTGF-Antikörpern verminderte die fibrotischen Signale der Kardiomyozyten gegenüber den kardialen Fibroblasten.

Die Daten von Koitabashi sowie unsere Daten weisen auf eine molekulare parakrine Kommunikation zwischen Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten hin und zeigen, dass dieser Prozess eine Rolle bei der Kollagenproduktion spielt.

Des Weiteren zeigen unsere Daten, dass es durch die Anwesenheit von Aldosteron zu einer Translokation des Mineralocorticoid-Rezeptors in den Zellkern bei kardialen Fibroblasten kommt. Dieser Effekt konnte durch den Mineralocorticoid-Rezeptor-Antagonist Spironolacton sowie durch den Rac1 Inhibitor NSC23766 verhindert werden. Die Zellkern-Translokation des MR stellt die Aktivierung des Rezeptors dar (Odermatt et al., 2001). Odermatt et al. zeigten, dass 11- $\beta$ -HSD-Typ-2 die intrazelluläre Lokalisation des MR reguliert und vermuteten daher eine direkte molekulare Interaktion zwischen 11- $\beta$ -HSD-Typ-2 und dem MR. Sie gehen davon aus, dass die Interaktion eher von strukturellen Komponenten von 11- $\beta$ -HSD-Typ-2 ausgeht, statt durch die Cortisolmetabolisierung.

Ob die strukturelle Beziehung oder die Cortisolmetabolisierung verantwortlich ist, wird Gegenstand künftiger Forschung sein.

Mäuse mit einer herzspezifischen Überexpression von Rac1 (RacET) entwickelten in unseren Versuchen altersabhängig Vorhofflimmern. Auch bei der Hochregulation von 11- $\beta$ -HSD-Typ-2 zeigte sich eine Altersabhängigkeit. Trotz der Limitation eines transgenen Mausmodells zeigt der Phänotyp mit Dilatation des Vorhofs, Fibrose und Vorhofflimmern Parallelen zum Vorhofflimmern beim Menschen (Dzeshka et al., 2015). Die Überexpression von Rac1 ist assoziiert mit strukturellem Remodeling mit Fibrose, was durch die Sirius Red Färbungen verdeutlicht werden konnte. Rac1 reguliert die NADPH Oxidase Aktivität, welche zu freien Sauerstoffradikalen und einer Hypertrophie des Herzens führt (Takemoto 2001;

Custodis et al 2006; Laufs et al. 2002; Satoh et al. 2006). Freie Sauerstoffradikale sorgen für verstärkte Myokardfibrose (Johar et al. 2006; Murdoch et al. 2006).

In der Literatur wurde bisher kein Zusammenhang zwischen Rac1 und 11- $\beta$ -HSD-Typ-2 beschrieben. Einige Studien berichten über Assoziationen zwischen Rac1 und dem Mineralocorticoid-Rezeptor in Bezug auf Pathologien der Niere oder des Herzens (Kawarazaki et al., 2012; Shibata et al., 2011). Nagase et al. (2012) zeigte, dass Rac1 die transcriptionelle Aktivität von MR durch oxidativen Stress in Kardiomyozyten beeinflusst. Kimura et al. (2011) studierte atriale Fibrose und Vorhofflimmern in Ratten mit Hypertension, welche mit dem MR-Antagonisten Eplerenon verhindert wurde. Trotz dieser Interaktionen bleibt der präzise Mechanismus zwischen Rac1 und dem MR unbekannt.

Unsere Daten zeigen eine Verhinderung der CTGF-Überexpression durch den Rac1-Inhibitor NSC23766 in kardialen Fibroblasten. Zudem konnte die Zellkern-Translokation des MR durch NSC23766 verhindert werden. Diese Inhibition scheint ein probates Mittel zur Verhinderung von Fibrose zu sein. Die Daten zeigen die Bedeutung von Rac1 für die MR-Signaltransduktion und belegen eine Interaktion dieser Signalwege in vitro.

In kardialen Fibroblasten führte eine Stimulation mit Aldosteron zu einer CTGF-Überexpression. Ebenso zeigte sich eine verstärkte CTGF-Expression durch Angiotensin II und ein noch stärkerer Effekt ließ sich durch die Kombination von Aldosteron und Angiotensin II zeigen. Dies zeigt die synergistische Wirkung von Aldosteron und Angiotensin II.

BR-4628 ist ein dihydropyridin abhängiger, nicht steroidaler und selektiver Mineralocorticoid-Rezeptor-Antagonist. BR-4628 und Spironolacton binden an den MR mit einer ähnlichen Affinität. Eplerenon zeigt im Vergleich nur eine niedrige Affinität zum Mineralocorticoid-Rezeptor. BR-4628 und Spironolacton unterscheiden sich bezüglich ihrer Affinität zu anderen Steroidrezeptoren. Die Verwendung von BR-4628 besitzt hierdurch Vorteile und zeigt im Vergleich keine unerwünschten steroidalen Nebenwirkungen. Des Weiteren hat BR-4628 die höchste Spezifität für den Mineralocorticoid-Rezeptor (Fagart et al., 2010, Garthwaite et al. 2004).

Die Hemmung des Mineralocorticoid-Rezeptors und Verminderung der CTGF-Expression deuten darauf hin, dass die durch Aldosteron-induzierten fibrotische Umbauprozesse MR-abhängig sind und dass die Blockade des MR ein potentielles Ziel darstellt um strukturelle Umbauprozesse und Fibrose zu verhindern.

Andere Studien zeigen ebenfalls, dass MR-Antagonisten kardiale Fibrose auf molekularer Ebene sowie auf Organebene vermindern können (Bauersachs et al. 2015; Lavall et al. 2014). In einer Herzinsuffizienzstudie (RALES) konnte eine Behandlung mit Spironolacton das Level an zirkulierenden Biomarkern für Fibrose senken (Zannad et al. 2000).

In unserer Studie konnte der Aldostereffekt durch den Rac1 Inhibitor NCS23766 als auch durch die MR-Antagonisten verhindert werden. Eine Inhibierung des Angiotensin II-Effekts war durch Spironolacton nicht möglich. Insgesamt zeigt sich jedoch, dass es sinnvoll ist die synergistische Wirkung von Aldosteron und Angiotensin II durch eine doppelte Inhibition zu verhindern, da eine einzelne Blockade nicht ausreichend scheint.

Als Limitation der Arbeit ist die ausschließliche Verwendung von neonatalen kardialen Fibroblasten und Myozyten von Ratten sowie Gewebe von Mäusen zu nennen. Der Phänotyp bezüglich atrialer Dilatation, Fibrose und Vorhofflimmern zeigt jedoch deutliche Parallelen zur Pathophysiologie von Vorhofflimmern beim Menschen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der Mineralocorticoid-Rezeptor eine wichtige Rolle in strukturellem Remodeling bei Vorhofflimmern spielt. Aldosteron aktiviert den MR, welcher über Rac1 zu einer Erhöhung der CTGF-Expression führt. Dies und die Rac1-abhängige MR-Translokation belegt eine Interaktion des MR-Signalwegs und der Rac1 GTPase. Eine vermehrte 11- $\beta$ -HSD-Typ-2-Expression ist mit Remodeling im Vorhof und Fibroseentstehung assoziiert. Unter physiologischen Bedingungen kann Aldosteron in vitro nur eine profibrotische Reaktion in Abwesenheit von Cortisol, welches die Aldosteronbindung am MR blockiert, entfalten. Durch Mineralocorticoid-Rezeptor-Antagonisten, aber auch durch Angiotensin II-Rezeptorblocker und Rac1 Inhibitoren konnte die Expression von CTGF vermindert werden. Dies könnten medikamentöse Möglichkeiten sein die Prävention und Therapie von Vorhofflimmern voranzubringen. Des Weiteren gilt es in Zukunft die Interaktion zwischen 11- $\beta$ -HSD-Typ-2 und dem Mineralocorticoid-Rezeptor genauer zu untersuchen, da sich gegebenenfalls auch hier heraus weitere Therapiemöglichkeiten ergeben.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Adam O, Frost G, Custodis F, Sussman MA, Schäfers HJ, Böhm M, Laufs U (2007) Role of Rac1 GTPase activation in atrial fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 50: 359–367
2. Adam O, Lavall D, Theobald K, Hohl M, Grube M, Ameling S, Sussman MA, Rosenkranz S, Kroemer HK, Schäfers HJ, Böhm M, Laufs U (2010) Rac1-induced connective tissue growth factor regulates connexin 43 and N-cadherin expression in atrial fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 55: 469-480
3. Bauersachs J, Jaissner F, Toto R (2015) Mineralocorticoid receptor activation and mineralocorticoid receptor antagonist treatment in cardiac and renal diseases. *Hypertension.* 65: 257–263
4. Berg RA, Prockop DJ (1973) The thermal transition of a non-hydroxylated form of collagen. Evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple-helix of collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52(1): 115–120
5. Briet M, Schiffrin EL (2010) Aldosterone. Effects on the kidney and cardiovascular system. *Nat. Rev. Nephrol.* 6: 261–273
6. Burstein B, Nattel S (2008) Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 51: 802-809
7. Chen C, Zhou X, Zhu M, Chen S, Chen J, Cai H, Dai J, Xu X, Mao W (2018) Catheter ablation versus medical therapy for patients with persistent atrial fibrillation: a systematic review and meta-analysis of evidence from randomized controlled trials. *J. Interv. Card. Electrophysiol.* 52(1): 9-18
8. Chen MM, Lam A, Abraham JA, Schreiner GF, Joly AH (2000) CTGF expression is induced by TGF- $\beta$  in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32: 1805-1819

9. Custodis F, Eberl M, Kilter H, Böhm M, and Laufs U (2006) Association of RhoGDI $\alpha$  with Rac1 GTPase mediates free radical production during myocardial hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 71: 342–35
10. de Jong S, van Veen TA, de Bakker JM, van Rijen HV (2012) Monitoring cardiac fibrosis: a technical challenge. *Neth. Heart J.* 20(1): 44–48
11. Dean RG, Balding LC, Candido R, Burns WC, Cao Z, Twigg SM, Burrell LM (2005) Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis after myocardial infarction. *J. Histochem. Cytochem.* 53: 1245-1256
12. De-An P, Li L, Zhi-Yun X, Jin-Yu H, Zheng-Ming X, Min W, Qiang Y, Shi-Eng H (2010) Increased expression of mineralocorticoid receptor and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human atria during atrial fibrillation. *Clin. Cardiol.* 33: 23–29
13. Dobrev D, Carlsson L, Nattel S (2012) Novel molecular targets for atrial fibrillation therapy. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 11: 275–291
14. Dzeshka MS, Lip GY, Snezhitskiy V, Shantsila E (2015) Cardiac fibrosis in patients with atrial fibrillation: mechanisms and clinical implications. *J. Am. Coll. Cardiol.* 66: 943–959
15. Ehrlich JR, Hohnloser SH, Nattel S (2006) Role of angiotensin system and effects of its inhibition in atrial fibrillation: clinical and experimental evidence. *Eur. Heart J.* 27(5): 512–8
16. Fagart J, Hillisch A, Huyet J, Bärfacker L, Fay M, Pleiss U, Pook E, Schäfer S, Rafestin-Oblin ME, Kolkhof P (2010) A new mode of mineralocorticoid receptor antagonism by a potent and selective nonsteroidal molecule. *J. Biol. Chem.* 285: 29932–29940
17. Fuster V, Rydén LE, Cannon DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, Halperin JL, Kay GN, Le Huezey JY, Lowe JE, Olsson SB, Prystowsky EN, Tamargo JL, Wann LS (2011) ACCF/AHA/HRS focused updates incorporated into the ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for

the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines developed in partnership with the European Society of Cardiology and in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *J. Am. Coll. Cardiol.* 57: e101-98

18. Gao Y, Dickerson JB, Guo F, Zheng J, Zheng Y (2004) Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 7618-7623

19. Garthwaite SM, McMahon EG (2004) The evolution of aldosterone antagonists. *Mol. Cell. Endocrinol.* 217: 27–31

20. Grillo C, Vallee S, McEwen BS, De Nicola AF (1990) Properties and distribution of binding sites for the mineralocorticoid receptor antagonist [3H]ZK 91587 in brain. *J. Steroid Biochem.* 35: 11–15

21. Gronefeld GC, Hohnloser SH (2003) Quality of life in atrial fibrillation: an increasingly important issue. *Eur. Heart J. Suppl.* 5: H25-H33

22. Hinescu ME, Gherghiceanu M, Mandache E, Ciontea SM, Popescu LM (2006) Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in atrial myocardium: ultrastructural and immunohistochemical characterization. *J. Cell. Mol. Med.* 10: 243-257

23. Horn MA, Trafford AW (2016) Aging and the cardiac collagen matrix: Novel mediators of fibrotic remodelling *J. Mol. Cell. Cardiol.* 93: 175–185

24. Hylek EM, Evans-Molina C, Shea C (2007) Major hemorrhage and tolerability of warfarin in the first year of therapy among elderly patients with atrial fibrillation. *Circulation.* 115: 2689–2696.

25. January CT, Wann LS, Alpert JS (2014) AHA/ACC/HRS guideline for the management of patients with atrial fibrillation: A report of the American College of

Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society. *J. Am. Coll. Cardiol.* 64: e1–e76.

26. Johar S, Cave AC, Narayanapanicker A, Grieve DJ, Shah AM (2006) Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. *FASEB J.* 20: 1546-1548

27. Kaireviciute D, Aidietis A, Lip GY (2009) Atrial fibrillation following cardiac surgery: clinical features and preventative strategies. *Eur. Heart J.* 30: 410-425

28. Kawarazaki H, Ando K, Shibata S, Muraoka K, Fujita M, Kawarasaki C, Fujita T (2012) Mineralocorticoid receptor–Rac1 activation and oxidative stress play major roles in salt-induced hypertension and kidney injury in prepubertal rats. *J. Hypertens.* 30: 1977–1985

29. Kimura S, Ito M, Tomita M, Hoyan M, Obata H, Ding L, Chinushi M, Hanawa H, Kodama M, Aizawa Y (2011) Role of mineralocorticoid receptor on atrial structural remodeling and inducibility of atrial fibrillation in hypertensive rats. *Hypertens. Res.* 34: 584–591

30. Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, Ahlsson A, Atar D, Casadei B, Castellá M, Diener HC, Heidbuchel H, Hendriks J, Hindricks G, Manolis AS, Oldgren J, Alexandru Popescu B, Schotten U, Van Putte B, Vardas P, ESC Scientific Document Group (2016) ESC Guidelines for the Management of Atrial Fibrillation Developed in Collaboration with EACTS. *European Heart Journal* 37: 2893-2962

31. Koitabashi N, Arai M, Kogure S, Niwano K, Watanabe A, Aoki Y, Maeno T, Nishida T, Kubota S, Takigawa M, Kurabayashi M (2007) Increased connective tissue growth factor relative to brain natriuretic peptide as a determinant of myocardial fibrosis. *Hypertension.* 49: 1120-1127

32. Lang C, Sauter M, Szalay G, Racchi G, Grassi G, Rainaldi G, Mercatanti A, Lang F, Kandolf R, Klingel K (2008) Connective tissue growth factor: a crucial cytokinemediating cardiac fibrosis in ongoing enterovirus myocarditis. *J. Mol. Med.* 86: 49-60

33. Laufs U, Kilter H, Konkol C, Wassmann S, Böhm M, Nickenig G (2002) Impact of HMG CoA reductase inhibition on small GTPases in the heart. *Cardiovasc. Res.* 53: 911–920
34. Lavall D, Selzer C, Schuster P, Lenski M, Adam O, Schäfers HJ, Böhm M, Laufs U (2014) The mineralocorticoid receptor promotes fibrotic remodeling in atrial fibrillation. *J. Biol. Chem.* 289: 6656-68
35. Leask A (2007) TGFbeta, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovasc. Res.* 74: 207-212
36. Lewalter T (2016) Atrial fibrillation-Update *MMW Fortschr. Med.* 158: 20-28
37. Lother A, Berger S, Gilsbach R, Rösner S, Ecke A, Barreto F, Bauersachs J, Schütz G, Hein L (2011) Ablation of mineralocorticoid receptors in myocytes but not in fibroblasts preserves cardiac function. *Hypertension.* 57: 746–754
38. Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH (2000) Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta. *Mol. Genet. Metab.* 71: 418-435
39. Lip G, Tse HF, Lane DA (2012) Atrial fibrillation. *Lancet.* 379: 648–661
40. Maack C, Kartes T, Kilter H, Schäfers HJ, Nickenig G, Böhm M, Laufs U (2003) Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of rac1-GTPase and represents a target for statin treatment. *Circulation.* 108: 1567-1574
41. Murdoch CE, Grieve DJ, Cave AC, Looi YH, Shah AM (2006) NADPH oxidase and heart failure. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6: 148-53
42. Nagase M, Ayuzawa N, Kawarazaki W, Ishizawa K, Ueda K, Yoshida S, Fujita T (2012) Oxidative stress causes mineralocorticoid receptor activation in rat cardiomyocytes: role of small GTPase Rac1. *Hypertension.* 59: 500–506
43. Nattel S (2002) New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature.* 415: 219-226

44. Nattel S, Burstein B, Dobrev D (2008) Atrial remodeling and atrial fibrillation. Mechanisms and implications. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 1: 62–73
45. Neefs J, van den Berg NW, Limpens J, Berger WR, Boekholdt SM, Sanders P, de Groot JR (2017) Aldosterone Pathway Blockade to Prevent Atrial Fibrillation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int. J. Cardiol.* 231: 155-16
46. Odermatt A, Arnold P, Frey FJ (2001) The intracellular localization of the mineralocorticoid receptor is regulated by 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *J. Biol. Chem.* 276: 28484–28492
47. Odermatt A, Atanasov AG (2009) Mineralocorticoid receptors. Emerging complexity and functional diversity. *Steroids.* 74: 163–171
48. Odermatt A, Kratschmar DV (2012) Tissue-specific modulation of mineralocorticoid receptor function by 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases. An overview. *Mol. Cell. Endocrinol.* 350: 168–186
49. Pisters R, Lane DA, Nieuwlaat R, de Vos CB, Crijns HJ, Lip GY (2010) A novel user-friendly score (HAS-BLED) to assess 1-year risk of major bleeding in patients with atrial fibrillation: the Euro Heart Survey. *Chest.* 138: 1093-100
50. Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M (2003) Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 34: 1309–1321
51. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J (1999) The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *N. Engl. J. Med.* 341: 709–7174
52. Reil JC, Hohl M, Selejan S, Lipp P, Drautz F, Kazakow A, Münz BM, Müller P, Steendijk P, Reil GH, Allessie MA, Böhm M, Neuberger HR (2012) Aldosterone promotes atrial fibrillation. *Eur. Heart J.* 33: 2098–2108

53. Satoh M, Ogita H, Takeshita K, Mukai Y, Kwiatkowski DJ, Liao JK (2006) Requirement of Rac1 in the development of cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 7432-7437
54. Senoo K, Lane D, Lip GY (2014) Stroke and bleeding risk in atrial fibrillation. *Korean Circ. J.* 44: 281–290.
55. Shibata S, Mu S, Kawarazaki H, Muraoka K, Ishizawa K, Yoshida S, Kawarazaki W, Takeuchi M, Ayuzawa N, Miyoshi J, Takai Y, Ishikawa A, Shimosawa T, Ando K, Nagase M, Fujita T (2011) Rac1 GTPase in rodent kidneys is essential for salt-sensitive hypertension via a mineralocorticoid receptor-dependent pathway. *J. Clin. Invest.* 121: 3233–3243
56. Stepanyan G, Gerstenfeld EP (2013) Atrial fibrillation ablation in octogenarians: Where do we stand? *Curr. Cardiol. Rep.* 15: 406.
57. Sussman MA, Welch S, Walker A, Klevitsky R, Hewett TE, Price RL, Schaefer E, Yager K (2000) Altered focal adhesion regulation correlates with cardiomyopathy in mice expressing constitutively active rac1. *J. Clin. Invest.* 105: 875-886
58. Swedberg K, Zannad F, McMurray JJ, Krum H, van Veldhuisen DJ, Shi H, Vincent J, Pitt B (2012) Eplerenone and atrial fibrillation in mild systolic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 59: 1598–1603
59. Takemoto M, Node K, Nakagami H, Liao Y, Grimm M, Takemoto Y, Kitakaze M, Liao JK (2001) Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy. *J. Clin. Invest.* 108: 1429-1437
60. Travers JG, Kamal FA, Robbins J, Yutzey KE, Blaxall BC (2016) Cardiac fibrosis: the fibroblast awakens. *Circ. Res.* 118: 1021–1040
61. Tsai CT, Chiang FT, Tseng CD, Hwang JJ, Kuo KT, Wu CK, Yu CC, Wang YC, Lai LP, Lin JL (2010) Increased expression of mineralocorticoid receptor in human atrial fibrillation and a cellular model of atrial fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 55: 758–770

62. Weber KT (2001) Aldosterone in congestive heart failure. *N. Engl. J. Med.* 345: 1689–1697
63. Young M, Fullerton M, Dilley R, Funder J (1994) Mineralocorticoids, hypertension, and cardiac fibrosis. *J. Clin. Invest.* 93: 2578–2583
64. Zannad F, Alla F, Dousset B, Perez A, Pitt B (2000) Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure. Insights from the Randomized Aldactone Evaluation Study (RALES). *Circulation.* 102: 2700–2706
65. Zannad F, McMurray JJ, Krum H, van Veldhuisen DJ, Swedberg K, Shi H, Vincent J, Pocock SJ, Pitt B (2011) Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N. Engl. J. Med.* 364: 11–21
66. Zhou G, Kandala JC, Tyagi SC, Katwa LC, Weber KT (1996) Effects of angiotensin II and aldosterone on collagen gene expression and protein turnover in cardiac fibroblasts. *Mol. Cell. Biochem.* 154: 171–178

## 7. Publikationen

### 7.1. Publikationen

Lavall D, Selzer C, Schuster P, Lenski M, Adam O, Schäfers HJ, Böhm M, Laufs U (2014)  
The mineralocorticoid receptor promotes fibrotic remodeling in atrial fibrillation. *J. Biol. Chem.* 289: 6656-68

Lavall D, Schuster P, Jacobs N, Kazakov A, Böhm M, Laufs U (2017) Rac1 GTPase regulates 11 $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and fibrotic remodeling. *J. Biol. Chem.* 292: 7542-7553

### 7.2 Abstracts

DGK Jahrestagung 2013:

The mineralocorticoid receptor promotes structural remodeling in atrial fibrillation

Lavall D, Selzer C, Schuster P, Adam O, Schäfers HJ, Böhm M, Laufs U

ESC Congress 2013:

The mineralocorticoid receptor promotes pro-fibrotic remodeling in atrial fibrillation

Lavall D, Selzer C, Schuster P, Adam O, Schäfers HJ, Böhm M, Laufs U

DGK Jahrestagung 2014:

The aldosterone-mineralocorticoid receptor pathway promotes fibrotic remodeling in atrial fibrillation

Lavall D, Schuster P, Lenski M, Adam O, Schäfers HJ, Böhm M, Laufs U

DGIM Jahrestagung 2014:

Activation of mineralocorticoid receptor promotes fibrotic remodeling in atrial fibrillation

Lavall D, Selzer C, Schuster P, Lenski M, Adam O, Schäfers HJ, Böhm M, Laufs U

ESC Congress 2015:

Role of Rac1 GTPase for the mineralocorticoid receptor mediated structural remodeling in atrial fibrillation

Lavall D, Jacobs N, Schuster P, Böhm M, Laufs U

### **7.3 Danksagung**

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Laufs für die freundliche Überlassung des Themas sowie die stetige Unterstützung und konstruktive Kritik.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Michael Böhm für die Möglichkeit die wissenschaftliche Arbeit im kardiologischen Labor der Medizinischen Klinik kennenzulernen und durchzuführen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Daniel Lavall für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung, konstruktive Kritik und hervorragende Unterstützung bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei den Medizinisch-Technischen Assistentinnen für die gute Zusammenarbeit, Einweisung in die Methoden und Unterstützung bei Durchführung der Experimente bedanken.

Zudem danke ich allen Ärzten, Mitdoktoranden und Biologen für die tolle Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Ganz besonders danken möchte ich auch meiner Familie und Tobias für die stetige Unterstützung während der Doktorarbeit.

## **8. Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist aus datenschutzrechtlichen Gründen in dieser elektronischen Version nicht enthalten.