

Diplomarbeit

**Frequenzabhängige Regulation der Genexpression im
menschlichen Herzen**

eingereicht von

Jan Katzbeck

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt auf der

Klinik für Kardiologie

unter der Anleitung von

Priv. Doz. Dr. Egbert Bisping

Dr.med.univ. Dr.scient.med. Markus Wallner

Graz, 02.02.2016

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 02.02.2016

Jan Katzbeck eh

Vorwort

Für diese Diplomarbeit habe ich mich entschieden, um ein neues Feld der Medizin, die Grundlagenforschung, kennenzulernen und dennoch in einem Gebiet, der Kardiologie, zu bleiben, welches mich seit den Anfängen meines Medizinstudiums fasziniert hat.

Durch die Beschäftigung mit der Physiologie des Herzens und den Pathomechanismen der Frequenzbelastung konnte ich mein kardiologisches Wissen vertiefen und durch die Betreuung und Unterstützung von Priv. Doz. Dr. Bisping neues Wissen im Bereich der Forschung und des wissenschaftlichen Arbeitens aufbauen.

Jedoch nicht nur für die berufliche Karriere, sondern auch für das weitere Leben wurde mir bei der Entstehung dieser Arbeit klar, dass Fehler und Rückschläge immer dazugehören, man sich davon aber nicht entmutigen lassen darf.

Danksagungen

Mein Dank geht an alle Personen die mich entlang des Weges begleitet haben.

Ganz besonderer Dank gilt:

Meiner Familie die mich all die Jahre unterstützt und mir vieles ermöglicht hat.

Priv. Doz. Dr. Bisping für die Geduld und Hilfe bei der Erstellung meiner Diplomarbeit.

Dr.med.univ. Wallner, meinem Zweitbetreuer, der mir mit Rat und Tat zur Seite stand.

Zusammenfassung

Hintergrund:

Eine häufige Ursache für Umbauprozesse am Herzen ist die Frequenzbelastung. Die dadurch entstehenden langfristigen strukturellen Veränderungen auf Zell- und Organebene werden durch Fibrose, Hypertrophie und Entzündungen verursacht und seit über 50 Jahren untersucht. Diese Arbeit untersuchte gezielt Veränderungen, welche bereits nach wenigen Stunden eintreten und konzentriert sich hierbei auf 9 Gene, welche mit Hypertrophie, Fibrose, Entzündung und Signaltransduktion in Verbindung stehen.

Methode:

Für die Experimente wurden zum einen atriale Muskelstreifen aus dem Herzohr des rechten Vorhofs von PatientInnen, an welchen eine offene Herzoperation durchgeführt wurde, zum anderen ventrikuläre Muskelstreifen von OrganspenderInnen verwendet, deren Herzen aus technischen oder medizinischen Gründen nicht transplantationsfähig waren. In einem Organbad unter physiologischen Bedingungen wurden Muskelstreifen mit 2.5Hz und die Kontrollgruppe mit 0.5Hz für 6 Stunden oder 8 Stunden stimuliert und nach erfolgtem Experiment augenblicklich in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschliessend erfolgte eine RNA Isolation und quantitative Realtime-Polymerase Kettenreaktion.

Ergebnis:

Im menschlichen Vorhofmyokard lässt sich eine Steigerung der Genexpression in den 9 untersuchten Genen feststellen. Im Bereich der Hypertrophie-assoziierten Gene kam es nach 6 Stunden bei ANP zu einem 1.2-fachen Anstieg und nach 8 Stunden bei BNP zu einem 1.2-fachen, bei ACTA1 zu einem 2.1-fachen, bei MYH7 zu einem 2.2-fachen und bei FHL1 zu einem 1.6-fachen Anstieg der Expressionsrate.

Bei den Fibrose-assoziierten Genen kam es nach 8 Stunden bei TGFβ1 zu einem 2.8-fachen und bei TIMP3 zu einem 2.4-fachen Anstieg der Expressionsrate.

Das Entzündungs-assoziierte Gen ILR6 zeigte nach 6 Stunden eine 2.6-fache und das Signaltransduktions-assoziierte Gen RCAN1 nach 8 Stunden eine 4.5-fache Hochregulation. Im Ventrikelmyokard kam es hingegen zu keiner signifikanten Hochregulation bei allerdings auch geringerer Fallzahl.

Diskussion:

Diese Ergebnisse zeigen, dass bereits eine Frequenzbelastung von wenigen Stunden in humanem atrialen Myokard zu einer Expressionssteigerung von Hypertrophie-, Entzündungs-, Fibrose-, und Signaltransduktions-assoziierten Gene führt.

Die Ergebnisse im sich im Gegensatz dazu offensichtlich anders verhaltenden Ventrikelmyokard erfordern die Bestätigung durch weitere Studien.

Abstract

Background:

Tachycardia is a common trigger of structural alterations in the human myocardium. Changes on cellular level and on level of the organ cover the spectrum of hypertrophy, inflammation and fibrosis and have been studied for more than 50 years. This study investigates the alterations already occurring after a few hours and focuses on 9 genes that are associated with hypertrophy, inflammation, fibrosis and signal transduction.

Method:

On the one hand, human atrial muscle strips were dissected from the right auriculae from patients, who underwent open heart surgery. On the other hand, ventricular myocardium was obtained from organ donors, who were not suitable for transplantation due to technical or medical reasons.

The experiments were conducted in an organ bath at physiological conditions. The intervention group was stimulated at 2.5Hz and the control group at 0.5Hz during a time period of 6 or 8 hours and were immediately afterwards frozen in liquid nitrogen. The frozen muscle strips were stored at -82°C until used for RNA isolation and quantitative polymerase chain reaction, in which hypertrophy-, fibrosis-, inflammation- and signal transduction-associated genes were tested.

Results:

We observed an upregulation in gene expression in human atrial Myocardium in all tested genes. In the group of hypertrophy-associated genes there was an ANP 1.2 fold upregulation after 6 hours and a BNP 1.2 fold, ACTA1 2.1 fold, MYH7 2.2 fold and FHL1 1.6 fold upregulation after 8 hours.

In the group of fibrosis-associated genes there was a TGFβ1 2.8 fold, and TIMP3 2.4 fold upregulation after 8 hours.

The inflammation-associated gene IL6 had a 2.6 fold upregulation after 6 hours and The signal transduction-associated gene RCAN1 had a 4.5 fold upregulation after 8 hours.

In human ventricular myocardium no significant upregulation was observed, however a limitation was the smaller sample size of specimens in this group.

Conclusion:

Sustained tachycardia stimulation only requires 6 hours to 8 hours until an upregulation in gene expression in hypertrophy-, fibrosis-, inflammation- and signal transduction-associated genes is noticeable.

In contrast, this was not visible in ventricular myocardium, where further studies have to confirm these results.

Inhaltsverzeichnis

VORWORT	III
DANKSAGUNGEN.....	IV
ZUSAMMENFASSUNG.....	V
ABSTRACT.....	VII
INHALTSVERZEICHNIS.....	IX
GLOSSAR UND ABKÜRZUNGEN	XII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XIV
TABELLENVERZEICHNIS	XV
1 EINLEITUNG	1
1.1 TACHYKARDIEN UND MYOKARDIALE FREQUENZBELASTUNG	1
1.2 FREQUENZINDUZIERTES KARDIALES REMODELING.....	2
1.2.1 <i>Elektrisches Remodeling</i>	2
1.2.2 <i>Zelluläres Remodeling</i>	3
1.2.3 <i>Extrazelluläres Remodeling</i>	4
1.2.4 <i>Veränderung auf Organebene</i>	4
1.3 GENEXPRESSIONSÄNDERUNGEN	5
1.3.1 <i>Hypertrophie assoziierte Gene</i>	5
1.3.2 <i>Fibrose assoziierte Gene</i>	6
1.3.3 <i>Entzündungs-assoziierte Gene</i>	7
1.3.4 <i>Signaltransduktions-assoziierte Gene</i>	8
1.4 MECHANISMEN DER GENEXPRESSIONSVERÄNDERUNG.....	9
1.5 HYPOTHESEN / FRAGESTELLUNGEN DER VORLIEGENDEN ARBEIT	11
2 MATERIAL UND METHODEN	12
2.1 UNTERSUCHTES GEWEBE.....	12
2.1.1 <i>Dextro-aurikuläres Vorhofmyokard</i>	12
2.1.2 <i>Nicht-insuffizientes, ventrikuläres Myokard</i>	12
2.2 KLINISCHE PATIENTINNENDATEN.....	14
2.2.1 <i>Dextro-aurikuläres Vorhofmyokard</i>	14
2.2.2 <i>Ventrikuläres Myokard</i>	16
2.3 TRANSPORT UND PRÄPARATION.....	17
2.3.1 <i>Transport</i>	17
2.3.2 <i>Präparation</i>	17

2.4	VERWENDETE LÖSUNGEN FÜR DIE EXPERIMENTE.....	18
2.4.1	<i>Tyrodellösung</i>	18
2.4.2	<i>2,3-Butan-Dion-Monoxim (BDM) Lösung</i>	18
2.5	GERÄTE.....	19
2.5.1	<i>Messanlage</i>	19
2.5.2	<i>Stimulator und Thermostat</i>	20
2.5.3	<i>Zentrifuge</i>	20
2.5.4	<i>Biorad-MyCycle</i>	20
2.6	VERSUCHSPROTOKOLL.....	21
2.6.1	<i>Frequenzbelastung</i>	21
2.7	PROBENVERARBEITUNG.....	23
2.7.1	<i>Lyse und RNA Isolation</i>	23
2.7.2	<i>cDNA</i>	24
2.7.3	<i>PCR</i>	25
2.8	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	28
3	ERGEBNISSE - RESULTATE.....	29
3.1	B-MYOSIN-HEAVY-CHAIN (MYH7).....	29
3.2	A-SKELETAL ACTIN (ACTA1).....	30
3.3	ANP (NPPA).....	31
3.4	BNP (NPPB).....	32
3.5	FOUR-AND-A-HALF-LIM-DOMAIN (FHL1).....	33
3.6	TRANSFORMING GROWTH FACTOR β (TGF β).....	34
3.7	METALLOPROTEINASE (TIMP3).....	35
3.8	INTERLEUKIN 6 RECEPTOR (IL6R).....	36
3.9	REGULATOR OF CALCINEURIN (RCAN1).....	37
3.10	VENTRIKEL.....	38
4	DISKUSSION.....	39
4.1	B-MYOSIN-HEAVY-CHAIN (MYH7).....	39
4.2	A-SKELETAL ACTIN (ACTA1).....	40
4.3	ANP (NPPA).....	41
4.4	BNP (NPPB).....	41
4.5	FOUR-AND-A-HALF-LIM-DOMAIN (FHL1).....	42
4.6	TRANSFORMING GROWTH FACTOR β (TGF β).....	43
4.7	METALLOPROTEINASE INHIBITOR (TIMP3).....	43
4.8	INTERLEUKIN 6 RECEPTOR (IL6R).....	44
4.9	REGULATOR OF CALCINEURIN (RCAN1).....	45

4.10	LIMITATIONEN.....	45
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	47

Glossar und Abkürzungen

BDM	2,3-Butan-Dion-Monoxim
Bpm	Beats per minute
CABG	Koronararterielle Bypass Operation
CaMKII	Kalzium-Calmodulin Kinase II
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CTGF	Connective tissue growth factor
DGKP/S	Diplomierter Gesundheits- und Krankenpfleger/-schwester
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECMO	Extracorporale Membranoxygenierung
ET-Coupling	Excitation Transcription Coupling
HDAC	Histon-Deacetylasen
HLM	Herz-Lungen-Maschine
KHK	Koronare Herzkrankheit
LBI	Ludwig Boltzmann Institut
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
ANP	Natriuretische Peptid A
BNP	Natriuretische Peptid B
nt-proANP	Precursor natriuretisches Peptid Typ A
nt-proBNP	Precursor natriuretisches Peptid Typ B
paVHF	paroxysmales Vorhofflimmern
peVHF	permanentes Vorhofflimmern
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
RLT- Puffer	Guanidin-Thiocyanat-Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
RSB	Rechtsschenkelblock
TACE	TNF- α -Convertase Enzym
TNF	Tumornekrosefaktor
MYH7	β -Myosin Heavy Chain
ACTA1	α -Skeletal Actin
FHL1	Four-and-a-half-lim-domain
TGF β	Transforming growth factor β
TIMP3	Metalloproteinase Inhibitor
IL6R	Interleukin 6 receptor

RCAN1

Regulator of Calcineurin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wijffels et al. [8]	3
Abbildung 2: Signalübertragung mit Ca ²⁺ , Calcineurin und NFAT [40]	9
Abbildung 4: Stimulator und Thermostat	20
Abbildung 5: Intervention 2.5Hz vs Kontrolle 0.5Hz	22
Abbildung 6: MYH7 Gesamtansicht	29
Abbildung 7: MYH7 Detailansicht	29
Abbildung 8: ACTA1 Gesamtansicht	30
Abbildung 9: ACTA1 Detailansicht	30
Abbildung 10: NppA Gesamtansicht	31
Abbildung 11: NppA Detilansicht	31
Abbildung 12: NppB Gesamtansicht	32
Abbildung 13: NppB Detailansicht	32
Abbildung 14: FHL1 Gesamtansicht	33
Abbildung 15: FHL1 Detailansicht	33
Abbildung 16: TGFβ Gesamtansicht	34
Abbildung 17: TGFβ Detailansicht	34
Abbildung 18: TIMP3 Gesamtansicht	35
Abbildung 19: TIMP3 Detailansicht	35
Abbildung 20: ILR6 Gesamtansicht	36
Abbildung 21: ILR6 Detailansicht	36
Abbildung 22: RCAN1 Gesamtansicht	37
Abbildung 23: RCAN1 Detailansicht	37
Abbildung 24: Genexpressionsrate im Ventrikel nach 8h Intervention	38

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: atriales Myokard für 6h Experimente.....	14
Tabelle 2: atriales Myokard für 8h Experimente.....	15
Tabelle 3: ventrikuläres Myokard	16
Tabelle 4	26
Tabelle 5	27

1 Einleitung

1.1 Tachykardien und myokardiale Frequenzbelastung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Auswirkungen einer Frequenzbelastung auf das menschliche Herz. Bereits seit 1954 ist bekannt, dass persistierende supraventrikuläre Tachykardien zu Veränderungen des Herzens beitragen und 1962 wurde eine der ersten Studien von Whipple et al. zum Thema reversible Herzinsuffizienz bei Frequenzbelastung des normalen Herzens durchgeführt [1, 2].

Besonders interessant ist jedoch, dass diese Veränderungen nicht etwa ein persistierendes Herzrasen benötigen, sondern dass bereits kurzfristiges Herzrasen oder kurzfristige Herzrhythmusstörungen innerhalb weniger Stunden zur Modifikation im Herzen beitragen. Ursache hierfür sind zelluläre Signalwege, welche zu Beginn aktiviert werden und Grundlage für Veränderungen der Genexpression und die dadurch entstehenden Umbauprozesse auf Zell- und Organebene, das sogenannte „Remodeling“, sind [3, 4].

Die häufigsten vorkommenden Varianten einer Frequenzbelastung des Herzens sind Vorhofflimmern und supraventrikuläre Tachykardien. Auch ventrikuläre Tachykardien und Extraschläge (Extrasystolen) können bei häufigem Auftreten und schneller Ankoppelung an die vorhergehenden Schläge ähnliche Mechanismen induzieren.

Vorhofflimmern ist als häufigste Form der Arrhythmie der Grund für die meisten Arztbesuche und Tage im Krankenhaus [5]. Neben dem Risiko für Schlaganfälle, besteht die Gefahr einer Tachykardiomyopathie [6], Herzinsuffizienz und Sterblichkeit [7].

Sehr deutlich wurde das größte Problem jedoch durch den Titel einer Studie von Wijffels et al. „Atrial fibrillation begets atrial fibrillation“ ausgedrückt, was übersetzt heißt: Vorhofflimmern verursacht Vorhofflimmern [8]. Aufgrund der bereits oben genannten Umbauprozesse, welche nicht nur während des Vorhofflimmerns sondern jeglicher Tachykardien und Tachyarrhythmien auftreten, lässt sich vereinfachter ausdrücken: Tachykardie verursacht Umbauprozesse, die das erneute Auftreten einer Tachykardie begünstigen.

Aufgrund dieser Problematik und der steigenden Therapieresistenz gegenüber antiarrhythmogenen Therapien und Ablationen bei langfristig bestehender Frequenzbelastung ist es besonders wichtig die zugrunde liegenden Mechanismen des Remodeling zu verstehen, um neue, bessere und frühere Therapieziele und –wege zu identifizieren.

1.2 Frequenzinduziertes kardiales Remodeling

Das kardiale Remodeling durch eine Frequenzbelastung kann in mehrere Bereiche unterteilt werden.

1.2.1 Elektrisches Remodeling

Eine der möglicherweise wichtigsten Veränderungen, welche dem elektrischen Remodeling auf zellulärer Ebene zugrunde liegt, betrifft eine Verminderung der L-type Ca^{2+} -Kanäle, welche die Verkürzung des Aktionspotentials und den Verlust der Anpassung an die Herzrate erklärt. Die Herunterregulierung der L-type Ca^{2+} -Kanäle wird verursacht durch eine intrazelluläre Überladung von Ca^{2+} , welche durch das Ca^{2+} /Calmodulin System und die Aktivierung von Calcineurin und NFAT Einfluss auf die Transkription nimmt, wie es in Kapitel 1.4 genauer beschrieben wird [4] [9].

Obwohl in Experimenten an Hunden auch eine Reduktion der auswärtsgehenden kardialen Kalium-Ausgleichsströme bewiesen werden konnte [10], zeigte sich in einem Vergleichsexperiment an Ziegen, dass die L-type Ca^{2+} Ströme eine wesentlich wichtigere Rolle spielen. Dies konnte durch einen Ca^{2+} -Kanal Agonisten (BayK) dargestellt werden, durch welchen das elektrische Remodeling rückgängig gemacht werden konnte [9].

In einer Studie von Wijffels et al. wurden Ziegen automatische Fibrillatoren implantiert und mittels EKG die isoelektrische Zeit gemessen. Überschritt diese 300-400ms, welche einen Sinusrhythmus bei Ziegen bedeutet, wurden schnelle elektrische Stimuli, sogenanntes „burst pacing“, abgegeben um dauerhaftes Vorhofflimmern einzustellen [8]. Wie in Abbildung 2 gezeigt ließ sich dabei in den ersten 24 Stunden das Vorhofflimmern zunächst nur für wenige Sekunden induzieren, wurde jedoch im Verlauf länger, bis es nach 2 Wochen persistent auftrat. Dies kann auf ein elektrisches Remodeling zurückgeführt werden.

Es wurde gezeigt, dass es hierbei zu keiner Änderung der Überleitungsgeschwindigkeit in den ersten Tagen des Vorhofflimmerns kam, jedoch zu einer Verkürzung der atrialen Refraktärzeit und der Zykluslänge des atrialen Impulses in den ersten 24 Stunden. Zusätzlich zeigte sich, dass es zu einer Störung der physiologischen Anpassung der Refraktärzeit kommt. In gesunden, unbelasteten Herzen kommt es bei einer Steigerung der Frequenz zu einer Verkürzung der Refraktionszeit. Im Gegensatz dazu kommt es bei Herzen mit länger andauernder Tachykardie zu einer Umkehr dieses Vorgangs, sodass sich

die Refraktionszeit bei niedriger Frequenz verkürzt, was eine erneute Stimulation schneller möglich macht. Gleichwohl normalisiert sich dieser Mechanismus nach einigen Tagen mit Sinusrhythmus wieder [8].

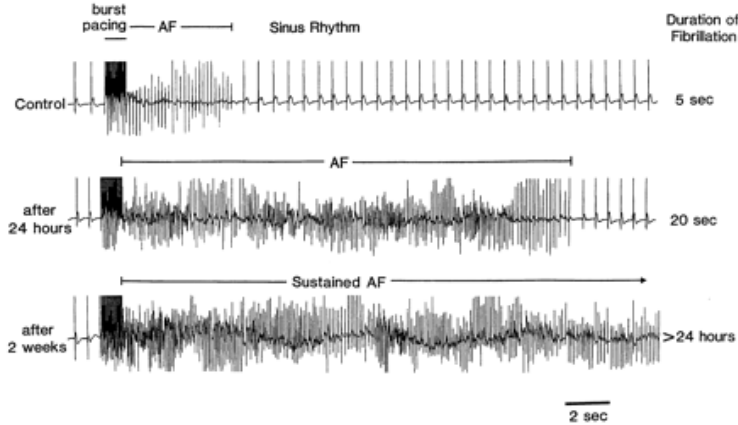


Abbildung 1: Wijffels et al. [8]

Originalregistrierung atrialer Elektrogramme in Ziegen: Durch häufige repetitive Stimulation (Burst mit 50 Hz für 1 sec.) lässt sich Vorhofflimmern mit zunehmender Dauer bis zum persistenten Verlauf induzieren.

Eine weitere Studie von Morillo et al. kam bei Experimenten mit Hunden, welche über 6 Wochen mittels eines Schrittmachers tachykard stimuliert wurden, zu ähnlichen Ergebnissen. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass sich die Refraktärzeit und dadurch die Länge eines Vorhofflimmerzykluses verkürzt [11].

1.2.2 Zelluläres Remodeling

Bei der zellulären Anpassung gehen die phänotypischen Veränderungen auf eine fetale Entwicklungsstufe zurück. Es kommt zu einer Zunahme der Zellgröße, perinukleäre Akkumulation von Glycogen, Verlust von Sarkomeren, eine homogene Verteilung des nukläeren Chromatin, Veränderungen der Connexinexpression, Veränderung der mitochondrialen Form, Fragmentierung des Sarkoplasmatischen Retikulum und Änderung von Menge und Lokalisation von zellulären Strukturproteinen. Dieser Wandel sollte jedoch nicht als degenerativ betrachtet werden, da irreversible Zeichen für Apoptose und Zelltod fehlen [9].

1.2.3 Extrazelluläres Remodeling

Neben den Intrazellulären und elektrophysiologischen Veränderungen kommt es auch zu einer extrazellulären Veränderung. Besonders auf der Fibrose liegt in diesem Bereich das Hauptaugenmerk. Diese trägt zu einer Störung der Überleitung bei und ist eine Grundlage für die Herzinsuffizienz. Die Studie von Polyakova et al. zeigt, dass es zu einem signifikanten Remodeling im Bereich des Vorhofes bei PatientInnen mit Vorhofflimmern kommt im Gegensatz zu PatientInnen mit Sinusrhythmus. Grundlage ist eine Störung im Bereich der Synthese und des Abbaus, welche zu einer vermehrten Ansammlung von Kollagen des Typ I, III und VI führt. Vor allem die Aktivierung von Smad Proteinen, welche die Transkription durch Bindung an Gene im Nukleus steuern, durch TGFβ1 spielt eine wichtige Rolle [12] [13].

1.2.4 Veränderung auf Organebene

Bereits 1990 wurden in einer Studie von Sanfilippo et al. die organbedingten Veränderungen untersucht. Bei PatientInnen, welche an Vorhofflimmern erkrankt waren, jedoch in Abwesenheit von zusätzlichen kardialen Erkrankungen wurden die beiden Vorhöfe am Anfang der Erkrankung und durchschnittlich 20 Monate später vermessen. Es konnte bei allen PatientInnen eine signifikante Dilatation der beiden Vorhöfe gezeigt werden. Als mögliche Gründe wurden der erhöhte Druck bei Verminderung der Wanddehnbarkeit und eine vermehrte Belastung der Wand genannt [14].

1.3 Genexpressionsänderungen

1.3.1 Hypertrophie assoziierte Gene

β-Myosin Heavy Chain (MYH7)

Herzmuskelzellen bestehen aus den zwei Isoformen α -Myosin Heavy Chain (MHC- α) und β -Myosin Heavy Chain (MHC- β), wobei MHC- α die schneller kontrahierende Form ist und vermehrt im atrialen und MHC- β vermehrt im ventrikulären Myokard vorkommt [15]. Bei chronischem Vorhofflimmern (VHF) kommt es zu einem Anstieg des relativen Anteils an MHC- β im Gegensatz zum Sinusrhythmus, der zu einer Reduktion der Aktivierung und Relaxation der Myofibrillen führt. Daraus ergibt sich eine atriale kontraktile Dysfunktion bei chronischem Vorhofflimmern, welche durch eine verminderte Auswurfkraft und –geschwindigkeit verursacht wird [16].

α-Skeletal Actin (ACTA1)

α -Skeletal Actin gehört zur Actin Gruppe, welche eine wichtige Rolle für die Zellmotilität, -struktur und –integrität spielt und besonders wichtig für den kontraktilen Apparat ist [17]. Bei Mutationen von ACTA1 kommt es zu Myopathien mit Einschränkungen der Beweglichkeit, der Atemmuskulatur und des Schluckens, was bei ca. 50% der PatientInnen innerhalb des ersten Jahres zum Tode führt[18]. Zusätzlich kann bei PatientInnen mit ACTA1 Myopathien eine linksventrikuläre Dysfunktion entstehen [19]. Im Gegensatz dazu kommt es bei chronischem Vorhofflimmern zu einer Steigerung der Expression von α -Skeletal Actin [20].

ANP (NppA)

ANP wird von Kardiomyozyten bei hohem Blutdruck und –volumen freigesetzt. In der Niere ist es für eine vermehrte Salz- und Wasserausscheidung verantwortlich und in Blutgefäßen führt es zu einer Vasodilatation. Bei einer gestörten Regulation von ANP unterstützt dies die Bildung von Bluthochdruck, kardialer Hypertrophy und Herzinsuffizienz [21]. Zusätzlich konnten 2 Studien eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Vorhofflimmern und einem erhöhten ANP feststellen [22] [23].

BNP (NppB)

B-type natriuretic peptide (BNP) ist ein Hormon, welches durch diuretische, natriuretische und vasodilatatorische Effekte als Regulator für kardiovaskuläre Funktionen dient und bei erhöhter Vorlast und Dehnung des Myokards aus den Kardiomyozyten freigesetzt wird. [24] Aufgrund der daraus folgenden Erhöhung bei Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz fungiert BNP als wichtiger Herzinsuffizienzmarker [25].

In einer prospektiven Studie mit 3346 Personen von Wang et. al konnte zusätzlich nachgewiesen werden, dass BNP nicht nur ein Marker für Herzinsuffizienz, sondern auch für Vorhofflimmern ist. [22]

Besonders das Abspaltprodukt NT-proBNP gilt als hoher Prädiktor für Vorhofflimmern bei Patienten ohne klinisch relevante atherosklerotische Erkrankungen besonders bei jungen PatientInnen und Frauen. [26, 27]

Four-and-a-half-lim-domain (FHL1)

FHL1 gehört zur Gruppe der Four-and-a-half LIM Proteine und ist die Hauptisoform von quergestreifter Muskulatur und trägt bei zur Myogenese und Sarcomersynthese. Es spielt auch eine wichtige Rolle bei der biomechanischen Stresserkennung, welche wiederum die FHL1 Expression steigert, wodurch es zu einer Verdickung der Muskelfasern und vermehrten Bildung von slow-twitch Fasern kommt. Diese Veränderungen tragen zu einer Zunahme der Ausdauer und Kraft bei, können jedoch auch im Verlauf zu einer kardialen Hypertrophie und dilatativen Kardiomyopathie führen. Mutationen von FHL1 können u.a. zu einer Granularkörpermyopathie oder Emery-Dreifus Muskeldystrophie führen [28] [29] [30].

1.3.2 Fibrose assoziierte Gene

Transforming growth factor β (TGFB)

TGFB ist ein profibrotisches Zytokin, dass die Bildung von extrazellulären Matrix Proteinen in verschiedenen Organen und die Synthese von connective tissue growth factor (CTGF) in Fibroblasten stimuliert. Überexpression führt zu einer Fibrose und Dysfunktion von Organen. Eine vermehrte Ansammlung von Proteinen in der extrazellulären Matrix verursacht eine systolische und diastolische Dysfunktion und eine Störung der elektrischen Überleitung, welche zur Entwicklung von Kardiomyopathien und Arrhythmien beiträgt [31].

Metalloproteinase Inhibitor (TIMP3)

Metalloproteasen sind ein wichtiger Teil von Fibrose- und Entzündungsreaktionen in der extrazellulären Matrix. TIMP3 gehört zur Gruppe der Metalloproteinase Inhibitoren, welche für den Abbau von Metalloproteasen verantwortlich sind [32].

Bei einem Verlust von TIMP3 kommt es zu einer erhöhten Anfälligkeit von Umbauprozessen bei gesteigerter mechanischer Belastung. Die Studie von Kassiri et al. hat gezeigt, dass sich bei *Timp3^{-/-}* Mäuse mit Aortenbanding eine frühe dilatative Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz ausbildet. Pathophysiologisch liegt diesem Prozess eine verminderte Hemmung von TNF- α -Convertase Enzym (TACE) zugrunde und führt folglich zu verstärkten entzündlichen Prozessen aufgrund einer erhöhten Aktivität von Tumornekrosefaktor (TNF), der zusammen mit TGF β , wie bereits oben erwähnt, für eine gesteigerte Fibrose verantwortlich ist. [33] [34]

1.3.3 Entzündungs-assoziierte Gene

Interleukin 6 receptor (ILR6)

Interleukin 6 (IL-6) ist ein pleiotropes Zytokin, welches eine Verbindung zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem darstellt. Bei einer akuten Freisetzung wirkt es protektiv und reguliert die Akute-Phase-Reaktion, die Entzündung und die Hämatopoese. Kommt es jedoch zu einer chronischen Freisetzung von IL-6 treten die positiven Aspekte in den Hintergrund und IL-6 beteiligt sich an der krankhaften Vermehrung von Bindegewebe und chronischen Entzündungen. Langzeitstudien haben gezeigt, dass Personen mit langfristig erhöhten Interleukin 6 Werten ein zweifach erhöhtes Risiko von koronaren Herzerkrankungen haben [35].

1.3.4 Signaltransduktions-assoziierte Gene

Regulator of Calcineurin (RCAN1)

Calcineurin Regulatoren (RCAN) spielen eine wichtige Rolle bei zellulären Prozessen und der Entstehung von Krankheiten. Besonders RCAN1 hat protektive Effekte auf Zellen während einer Überbeanspruchung. RCAN1 wird durch die transkriptionale Aktivität von Calcineurin, welche in Kapitel 1.4 näher beschrieben wird, aktiviert, dient aber gleichzeitig als negativer Feedback Mechanismus, um eine Überaktivität der Aktivität von Calcineurin zu verhindern [36].

Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass RCAN1 auch ein proatherosklerotischer Faktor ist und eine gestörte Regulation der RCAN1 Expression eine Störung der Herzklappenentwicklung und eine kardiale Hypertrophie verursachen kann [37, 38].

1.4 Mechanismen der Genexpressionsveränderung

Ca^{2+} ist eines der vielseitigsten Signalüberträger im menschlichen Körper, vor allem im Herzen spielt es eine besondere Rolle. Hier ist es nicht nur für die Muskelkontraktion, die elektrische Übertragung und Regulation von Zell-Zell Kommunikation, sondern auch für die Transkriptionsregulation verantwortlich. Das sogenannte „Excitation-Transcription Coupling“ (ET-Coupling) wird durch neurohumorale oder mechanische Reize angestoßen und beeinflusst dadurch u.a. Zellwachstum und Veränderungen der Ionenkanäle und Transporter Expression [39].

Der genaue Mechanismus wie ET-Coupling bei ständig oszillierendem Ca^{2+} funktioniert, ist dennoch nicht restlos geklärt.

Aufgrund des universellen Charakters von Ca^{2+} stellt sich jedoch vor allem die Frage nach den nachgeschalteten Mechanismen, welche die Genexpression beeinflussen. Besonders zwei der bekannten Mechanismen sollten genauer betrachtet werden.

Einer davon ist die Signalübertragung mittels Calcineurin, dargestellt in Abbildung 2. Durch die Bindung von Liganden an Zellmembranrezeptoren kommt es zu einer Steigerung des intrazellulären Kalziums, welches wiederum zu einer Aktivierung der Phosphatase Aktivität von Calcineurin beiträgt. Calcineurin ist verantwortlich für eine Dephosphorylierung des zyttoplasmatischen NF-AT, welches nun in den Nucleus eindringen kann und durch die Bindung an verschiedene Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP1 und GATA4 die Genexpression beeinflusst [40].

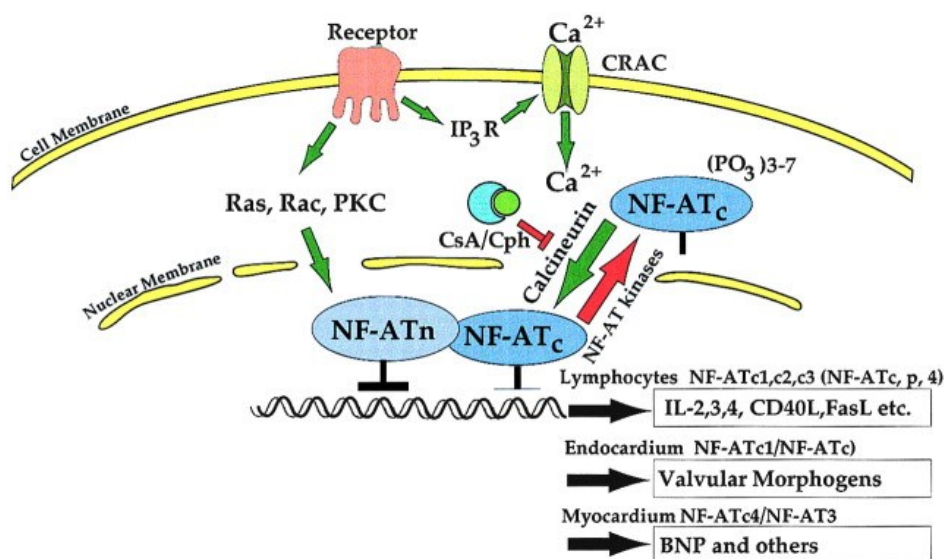


Abbildung 2: Signalübertragung mit Ca^{2+} , Calcineurin und NFAT [40]

Um die Auswirkung dieses intrazellulären Signalübertragungsmechanismus bei Tachykardien zu betrachten, wurden in einer Studie von Qi et al. Hundezellkulturen mittels erhöhter Frequenz stimuliert. Es wurde gezeigt, dass durch ein molekulares Feedbacksystem, welches die intrazelluläre Kalzium Überladung durch das Ca^{2+} -Calmodulinsystem erkennt, Calcineurin aktiviert und dadurch die Umverteilung von NFAT im Zellkern anstößt. Die daraus resultierenden Genexpressionsveränderungen tragen zu einer Verminderung von Kalziumkanälen bei und führen infolgedessen zu einer Verminderung des Kalziumeinstroms. Dieser verminderte Kalziumeinstrom dient als negatives Feedback und senkt auf diese Weise die Genexpressionsrate [4].

Zusätzlich sollte noch die Signalübertragung mittels Ca^{2+} -Calmodulin-abhängiger Protein kinase II (CaMKII) als zweiter wichtiger Signalweg beschrieben werden. Bei einer Erhöhung von intrazellulärem Ca^{2+} kommt es (zusätzlich zu einer Aktivierung von Calcineurin) zu einer Aktivierung der CaMKII. Diese interagiert mit der Histone Deacetylase 4 (HDAC4), phosphoryliert diese und kann somit Histone Deacetylase 5 (HDAC5) indirekt, da HDAC5 die CaMKII nicht direkt bindet, über HDAC4 phosphorylieren. Dadurch kommt es zu einem Export des HDAC4-HDAC5-Komplexes und einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren u.a. MEF2 [41, 42].

1.5 Hypothesen / Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

-) Welche Genexpressionen werden durch eine tachykarde Stimulation bereits innerhalb weniger Stunden verändert?
-) Kommt es nach kurzzeitiger Frequenzbelastung auf Vorhof und/oder Ventrikel zu einer Veränderung der Fibrose-assoziierten Gene?
-) Kommt es nach kurzzeitiger Frequenzbelastung auf Vorhof und/oder Ventrikel zu einer Veränderung der Hypertrophie-assoziierten Gene?
-) Kommt es nach kurzzeitiger Frequenzbelastung auf Vorhof und/oder Ventrikel zu einer Veränderung der Inflammation-assoziierten Gene?
-) Kommt es aufgrund von Frequenzbelastung zu unterschiedlichen gewebsspezifischen Veränderungen auf Ventrikel- und Vorhoffebene?
-) Welche Hinweise gibt es auf zugrunde liegende intrazelluläre Mechanismen?

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchtes Gewebe

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung von Frequenzbelastung im Rahmen von 2.5Hz auf die Expression von 9 in der Herzbelastung relevanten Gene des Myokards, auf welche in Kapitel 1.3 näher eingegangen wird, untersucht. Für diese Versuche wurden isolierte Herzmuskelstreifen aus humanem dextro-aurikulärem und ventrikulärem Myokard herangezogen.

2.1.1 Dextro-aurikuläres Vorhofmyokard

Das für die Versuchsreihen verwendete Myokard stammte von PatientInnen, welche sich einer Herzoperation (CABG oder Klappenersatzoperation) unterziehen mussten und für den Erhalt ihrer Kreislauffunktion an eine Herz-Lungen-Maschine (HLM) angeschlossen wurden. Um einen ausreichenden Anschluss der HLM im rechten Vorhof zu gewährleisten, musste ein Teil des rechten Herzhohls abgetrennt werden. Das entnommene Vorhofpräparat wurde von dem Chirurgen in eine präoxygenierter BDM-Lösung (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.4.2) gegeben und unverzüglich zur weiteren Bearbeitung ins Labor transportiert. Für die wissenschaftliche Verwendung bestand unter Ethikvotum 19-109 ex 07/08 ein Ethikantrag an der Universität Graz [43].

Eine genaue Auflistung der relevanten PatientInnendaten finden Sie in Tabelle 1 und Tabelle 2.

2.1.2 Nicht-insuffizientes, ventrikuläres Myokard

Das Probenmaterial für nicht-insuffizientes, ventrikuläres Myokard stammte von OrganspenderInnen, deren Herzen aus technischen oder medizinischen Gründen nicht transplantationsgeeignet war. Mögliche Ursachen könnten u.a. Schädigungen durch eine Reanimation oder eine vorbestehende KHK sein.

Die Klassifikation „nicht-insuffizientes Myokard“ ergibt sich dadurch, dass im Vorhinein keine klinisch-relevanten Beeinträchtigungen und eine normale Funktion des Herzens bestand und der/die PatientIn demnach herzgesund war. Hierauf wurde besonderen Wert

gelegt, um Faktoren, welche die Untersuchungsergebnisse verfälschen könnten, auszuschließen.

Für die wissenschaftliche Verwendung bestand unter Ethikvotum 19-109 ex 07/08 ein Ethikantrag an der Universität Graz. Die Koordination und Abholung der nicht-insuffizienten Herzen aus dem LKH Graz, LKH Klagenfurt und AKH Wien wurde durch das Koordinationsteam des LBI am ZMF durchgeführt. Die entnommenen Herzen wurden in gekühlter und vorbegaster kardiopleger Lösung (Custodiol®) nach Graz transportiert.

Es wurde darauf geachtet möglichst lange Trabekel mit einer Maximallänge von 2cm und einem Maximaldurchmesser von 0.9cm frei zu präparieren. Aufgrund der passiven Diffusion und der dadurch bestehenden Gefahr einer Minderversorgung durften diese Vorgaben nicht überschritten werden [43].

Eine genaue Auflistung der relevanten PatientInnendaten finden Sie in Tabelle 3.

2.2 Klinische PatientInnendaten

2.2.1 Dextro-aurikuläres Vorhofmyokard

6h Experimente

PatientIn	0606	1810	2210	1811
Alter	58	84	75	60
Geschlecht	M	W	M	M
OP-Art	CABG	AKE und CABG	CABG	CABG
KHK	III	II	III	III
Infarkte	-	-	-	-
Antihypertensiva	-	Art. Hypertonie	Art. Hypertonie	Art. Hypertonie
Rhythmus	SR	-	SR mit inkompletem RSB	SR
LA-Größe	-	-	-	-
MS	Keine	hochgradig	-	-
MI	Keine	-	Min	Minimal
TI	keine	-	-	-
sPAP	-	-	0-5mmHG	-
LVEDD	-	-	-	-
EF	50%	-	63%	-

Tabelle 1: atriales Myokard für 6h Experimente

8h Experimente

PatientIn	1204	2604	3004	0305
Alter	66	80	60	62
Geschlecht	W	M	M	M
OP-Art	Aorten- klappenersatz	CABG	Aorten- klappenersatz (bikuspide Aortenkl.)	CABG
KHK	-	III	ja	III
St. P. Myokardinfarkt	nein	nein	nein	nein
Hypertonie	Art. Hypertonie	Art. Hypertonie	Art. Hypertonie	-
Rhythmus	SR	SR, Bigeminus (erstem EKG)	Vorhofflattern	-
LA-Größe	grenzwertig	Geringgradig erhöht	-	-
MS	nein	nein	nein	-
MI	I	Leicht	leicht	-
TI	nein	Leicht	nein	-
sPAP	-	25	-	-
LVEDD	50mm	-	-	-
EF	60-65%	-	23%	-

Tabelle 2: atriales Myokard für 8h Experimente

2.2.2 Ventrikuläres Myokard

PatientIn	GNEU58	GNEU60	GNEU65	GNEU66	GNEU73
Alter	72	80	75	25	62
Geschlecht	W	W	M	W	M
Zusätzliche Erkrankungen	-	AST I	Aortenklappensklerose	-	Art. Hypertonie v.a. KHK
Vorgeschichte	z.n. CPR	-	-	-	-
Rhythmus	-	VHF	SR	-	-
LA-Größe	30mm	20x70cm 2	5cm ²	2,8cm ²	4mm
MS	o.B.	Sklerose	Sklerose	o.B.	o.B.
MI	o.B.	Geringgradig	-	o.B.	o.B.
TI	o.B.	Mittelgradig	-	o.B.	o.B.
sPAP	Nicht messbar	55	-	Nicht messbar	Nicht messbar
LVEDD	43	-	3.9mm	4mm	4.2mm
EF	32%	62%	70%	4.5%	60%
IVS und PW (diastol.) gemittelt	IVS:12mm	IVS:1.1mm PW:1.3mm	IVS:1.48mm PW:0.9mm	IVS:0.9mm PW:0.8mm	IVS:0.8mm PW:0.8mm

Tabelle 3: ventrikuläres Myokard

2.3 Transport und Präparation

2.3.1 Transport

Nach vorheriger telefonischer Vereinbarung mit den koordinierenden ÄrztInnen der Herzchirurgie, wurde ein Becher mit gekühlter Carbogen-oxygenierter BDM-Lösung in den OP gebracht. Dort wurde das Herzohr für die ECMO abgetrennt und durch den/die operierendeN ChirurgIn oder den/die beistehendeN DGKP/S in die Carbogen-oxygenierte Tyrodelösung übergeführt. Hierbei lag ein besonderes Augenmerk auf der Vermeidung von zusätzlichem Zug oder Dehnung auf das Myokard, um frühzeitige Adaptationsmechanismen zu vermeiden. Zur weiteren Bearbeitung wurde es in das Labor gebracht.

Nicht transplantationsfähige Herzen von OrganspenderInnen wurden vom Koordinationsteam des LBI aus dem LKH Graz oder per Autotransport, welcher bis zu 2 Stunden dauern konnte, aus dem LKH Klagenfurt und AKH Wien abgeholt. Hierzu diente eine Temperaturisolierte Transportbox, die mit Eis gekühlt wurde. Das Herz wurde darin in gekühlter und Carbogen-vorbegaster kardiopleger Lösung (Custodiol®) gelagert.

2.3.2 Präparation

Unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskop (VMT; Olympus) mit 10-facher Vergrößerung wurden für die Versuchsreihen der Frequenzbelastung geeignete Muskelstreifen (trabeculae carnae) gesucht. Diese sollten einen Durchmesser von 0.8 bis 1mm haben, um bei ausreichender Versorgung genügend Probenmaterial für die späteren Genexpressionsanalysen zu gewährleisten. Nach Auffindung geeigneter Trabekel wurden diese unter Vermeidung von Dehnung mit mikrochirurgischen Scheren herausgeschnitten. Nicht geeignete Trabekel wurden für einen besseren Zugang entfernt.

Aus dem nicht-insuffizienten Ventrikel Myokard wurden bevorzugt linksventrikuläre Trabekel frei präpariert. Nur in Ausnahmefällen wurden Trabekel des rechten Ventrikels verwendet.

Referenzproben wurden innerhalb der ersten 2 Stunden nach der Präparation in beschriftete und vorgekühlte Eppendorf Röhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um diese danach bei -85°C aufbewahren zu können.

2.4 Verwendete Lösungen für die Experimente

2.4.1 Tyrodelösung

Um ein ideales Setting für die Präparate gewährleisten zu können, wurde das Organbad mit Tyrodelösung gefüllt. Zusätzlich wurde durch die Oxygenierung der pH-Wert in einem physiologischen Rahmen gehalten. Die benötigte Kalziumkonzentration wurde durch mehrere Einzelgaben aufgebaut.

Für alle Versuche wurde die nachstehende Zusammensetzung der Tyrodelösung verwendet:

Stoff	Konzentration
Na ⁺	152mM
Cl ⁻	135mM
NaHCO ₃ ⁻	25mM
Mg ²⁺	0,6mM
H ₂ PO ₄ ⁻	1,3mM
SO ₄ ²⁻	0,6mM
Ca ²⁺	2,5mM
Glukose	11,2mM
Altinsulin (H-Insulin, hoechst)	10 IE/L

2.4.2 2,3-Butan-Dion-Monoxim (BDM) Lösung

Für den Transport der Trabekel aus dem OP und der Präparation, sowie dem Einbringen in die Messanlage wurde der Tyrodelösung zusätzlich 30 mM 2,3-Butandion-Monoxim beigegeben.

Da während der Zeit zwischen OP und Einhängen des Präparates eine Gewebeschädigung mit einer Kalziumausscheidung und einer dadurch verursachten Kontraktur nicht ausgeschlossen werden kann, ist BDM, ein Cholinesterase Aktivator, als kardioplege Substanz mit vollständig reversiblen Eigenschaften notwendig. Diese kardioprotektiven Eigenschaften kommen durch eine Hemmung der Querbrückeninteraktion, einer

Reduzierung der Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente und einer Verminderung der intrazellulären Kalziumströme zustande [44].

2.5 Geräte

2.5.1 Messanlage

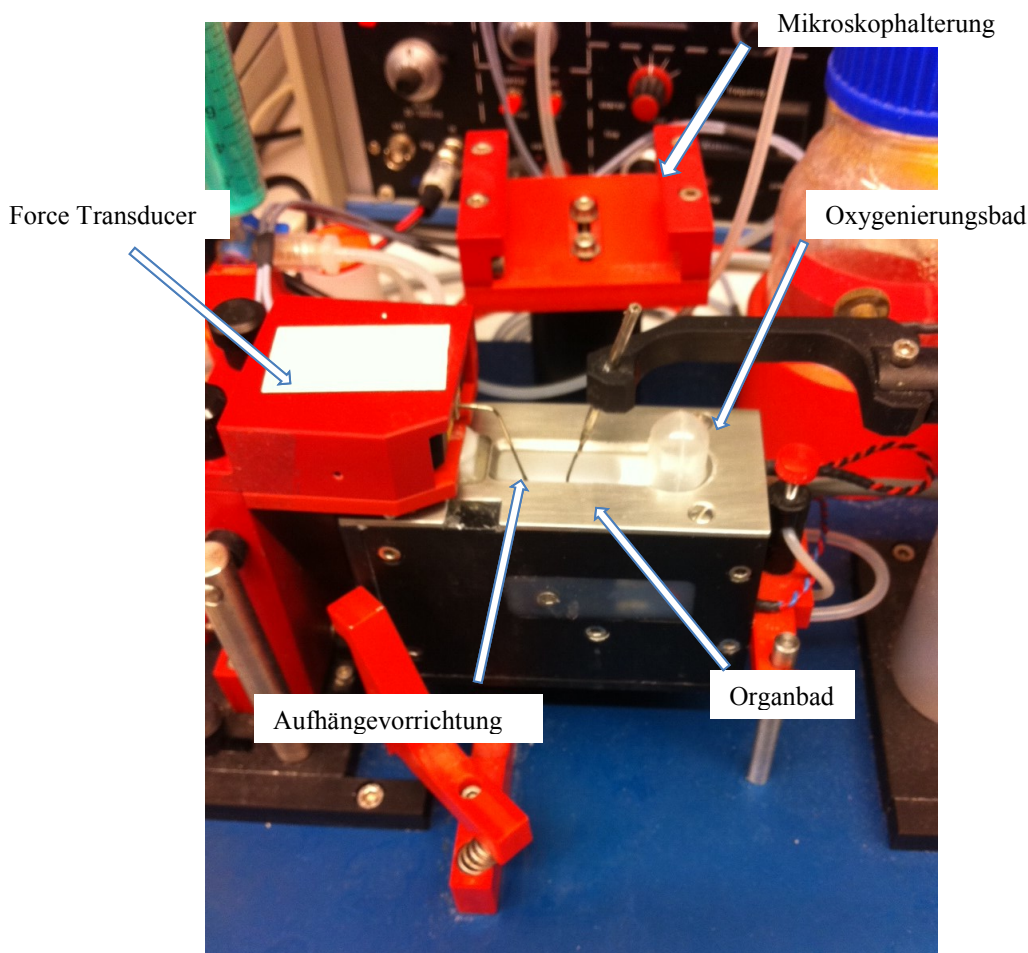


Abbildung 3: Organbad

Mit Hilfe der Anlage (Abbildung 3) von Scientific Instruments Heidelberg wurden alle Experimente durchgeführt. Zentrales Element dieser Anlage ist das Organbad, in welchem die Muskelstreifen aufgehängt und stimuliert werden. Dieses kann 7ml Flüssigkeit fassen und ermöglicht äußere Störfaktoren zu minimieren. An dieses angeschlossen ist ein Oxygenierungsbecken. Zusätzlich wird mit Hilfe einer Heizanlage die Temperatur konstant auf 36°C gehalten. Auf beiden Seiten des Organbades befinden sich Aufhängevorrichtungen mit Nadeln, welche vollständig in das Organbad eintauchen, für die Trabekel, welche ohne Zug, auch „slack“ genannt, eingehängt werden. Die linke Nadel ist mit einem Force Transducer verbunden. Hiermit kann die vom Trabekel aufgebrachte

Kraft aufgezeichnet werden. Der elektrische Reiz wird durch einen Stimulator über die rechte Nadel übertragen.

Die Muskelstreifen können mit Hilfe eines Mikroskops, dessen Halterung hinter dem Organbad zu sehen ist, angebracht werden.

2.5.2 Stimulator und Thermostat



Abbildung 4: Stimulator und Thermostat

Durch den externen Stimulator, dessen Impuls auf eine Dauer von 5ms eingestellt wurde, werden die Muskelstreifen gereizt. Zusätzlich ist die Einstellung der Frequenz möglich. Auf dem Stimulator befindet sich das Thermostat, mit welchem die Organbadtemperatur konstant auf 36°C gehalten wird.

2.5.3 Zentrifuge

Für die RNA-Isolation (2.7.1) wurde mit der Zentrifuge Fresco 21 von der Firma Thermo scientific gearbeitet, in welcher Microtubes verwendet werden können und eine Einstellung bis 28.000RPM möglich ist. Zusätzlich kann die Temperatur voreingestellt werden.

2.5.4 Biorad-MyCycle

Biorad MyCycle wird für die Inkubation während der Synthese von cDNA aus RNA benötigt. Es besteht die Möglichkeit verschiedene Protokolle in den Biorad MyCycle

einzuspeichern um mögliche Latenzzeiten während der Inkubation und der Erhitzung zu vermeiden. Die Erhitzungsrate beträgt 2,5°C/Sekunde und die Kühlungsrate beträgt 1,5°C/Sekunde.

2.6 Versuchsprotokoll

2.6.1 Frequenzbelastung

Einspannen:

Zu Beginn des Experiments wurde das Organbad mit 7ml BDM-Tyrodelösung befüllt um jegliche Kalzium Freisetzung der Präparate während der Anfangsphase zu vermeiden. Zusätzlich wurde die Lösung auf 36°C vorgeheizt.

Durch Hinunterziehen und Fixieren des Organbads wurden die Aufhängnadeln der Anlage freigelegt und eine Aufhängunterlage wurde unter den Aufhängnadeln befestigt um ein sicheres Einhängen zu gewährleisten. 1ml präoxygenierte BDM-Tyrodelösung wurde auf die Aufhängunterlage getropft, um die Versorgung der Muskelstreifen sicherzustellen. Die Trabekel wurden danach mittels Pipette auf die Aufhängunterlage transferiert und mit Hilfe einer mikrochirurgischen Pinzette und einem Mikroskop unter Vermeidung jeglichen Zuges auf die Nadel aufgehängt. Nach einer Minute Wartezeit wurde die Aufhängunterlage vorsichtig entfernt und das Präparat langsam in das Organbad geführt. Nach 5 Minuten Wartezeit wurde die BDM-Tyrodelösung durch Tyrodelösung ersetzt. Zur vollständigen Garantie, dass die gesamte BDM-Tyrodelösung ausgeschwemmt wurde, musste nach fünfminütiger Wartezeit die Tyrodelösung erneut durch Tyrodelösung ersetzt werden. Während der einzelnen Wartezeiten wurde das PowerLab und LabChart (Version 7.1.7) hochgefahren und die Dokumentation begonnen.

Kalziumaufbau:

Nach fünfminütiger Wartezeit wurde mit dem Aufbau der zur Durchführung des Experiments benötigten Kalziumkonzentration begonnen.

Die Tyrodelösung wurde auf 2,5mMol Ca^{2++} angereichert. Um die Stabilisierung des Muskelstreifens zu garantieren wurde der Vorgang auf vier Schritte aufgeteilt, welche im Abstand von 5 Minuten stattfanden. Im ersten Durchgang wurde in das Organbad von 7ml eine 2,1ml 1Mol Ca^{2++} Lösung zugeführt. Danach folgten zwei Schritte mit je 2,5ml 1Mol Ca^{2++} Lösung. Zwischen dem dritten und vierten Ca^{2++} Schritt wurde mit der Stimulation der Trabekel begonnen. Beim letzten Schritt wurden 9ml 1Mol Ca^{2++} Lösung

hinzugegeben. Durch Zugabe von zusätzlich vorbereiteter Tyrodelösung incl. 2,5mMol Ca^{2++} wurden der Verdampfungsverlust ausgeglichen und die Tyrodelösung im Organbad bei 7ml gehalten.

Elektrische Stimulation:

Nun wurde das Kontrollpräparat bei einer Impulsdauer von 5ms mit 0,5Hz und das Interventionspräparat bei derselben Impulsdauer mit 2,5Hz stimuliert (Rechteckimpulse; End-zu-End;) (Abbildung 5). Eine stetige Steigerung der Impulsspannung bis zu den ersten Kontraktionen wurde durchgeführt. Als endgültige Spannung wurde die Schwellenspannung +30% genommen.

Nach Stabilisierung der Muskelstreifen wurde die Messung für 8h bzw. 6h begonnen.

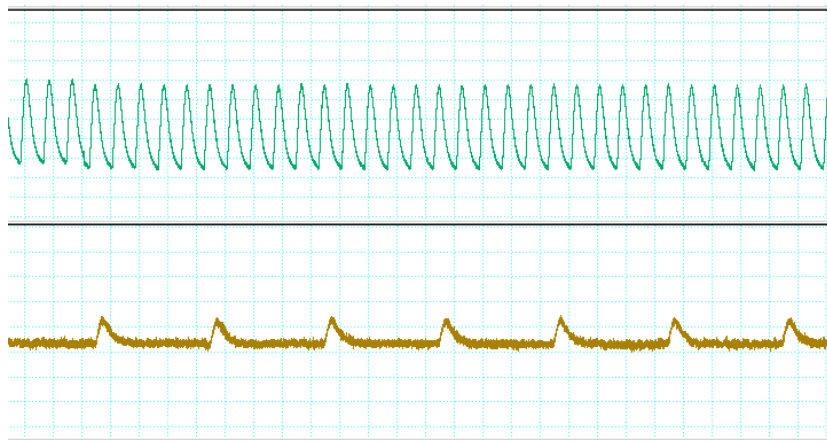


Abbildung 5: Intervention 2.5Hz vs Kontrolle 0.5Hz

Entnahme und Einfrieren:

Nach erfolgreichem 8h- bzw. 6h-Experiment wurden die Präparate in beschriftete Eppendorf Cryotubes überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Wegen der bereits in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Eppendorf Cryotubes gefroren die Präparate bereits an der Röhrchenwand. Dadurch wurde die Zeit zwischen Experiment und Einfrieren minimiert. Die Cryotubes wurden sofort wieder zurück in den Behälter mit flüssigem Stickstoff gelegt. Für die weitere Verarbeitung wurden die Röhrchen in dem Behälter mit flüssigem Stickstoff zu einem Gefrierschrank mit -85°C transportiert und gelagert.

2.7 Probenverarbeitung

2.7.1 Lyse und RNA Isolation

Um die RNA aus den Zellkernen herauszuholen und dadurch in einer Lösung binden zu können, war es notwendig diese mit Hilfe von Keramikugeln in einem MagNA Lyser zu zerreiben. Dafür wurde initial ein mit 1% Mercaptoethanol versetzter Guanidin-Thiocyanat-Puffer (RLT-Puffer) hergestellt. Dieser Puffer diente zur Inaktivierung jeglicher noch vorhandener RNase Aktivität. Es wurden nun Magnatubes mit je 430µl Puffer gefüllt und die Probe beigemischt.

Der MagNA Lyser gehörte zur Kategorie der Rotor-Stator Homogenisierer, welcher durch Schwing- und Rüttelbewegung die Keramikugeln in Bewegung setzte. Durch diese Bewegungen und durch Flüssigkeitsturbulenzen wurden die Muskelstreifenproben zermahlt. Der MagNA Lyser wurde auf 6500rpm und 20sec voreingestellt. Dieser Vorgang wurde viermal durchgeführt und bei noch immer makroskopisch sichtbaren Muskelstücken für zusätzliche 10 sec wiederholt. Um eine Überhitzung der Präparate zu vermeiden, wurde ein Kühlring, welcher bei -20°C gelagert, bereitgestellt, um die Magnatubes wieder auf Raumtemperatur runterzukühlen.

Nach Abschluss der Lyse wurden 350µl Lysat in ein 2ml Eppendorf Röhrchen überführt. Hierbei wurde aufgrund der Adhäsionskräfte an den Keramikugeln von einem Verlust von 80µl Volumen ausgegangen. Das Lysat wurde mit 70% Ethanol und vorsichtigem Auf- und Abpipetieren vermischt, was zu einem Ausfällen der RNA und DNA führte.

Für das weitere Vorgehen wurde das RNEasy-Mini-Kit von Qiagen herangezogen, welches die Isolation von RNA aus kleinen Probenmengen mit Hilfe von Säulenmembranen bis zu einer Bindungskapazität von 100µg ermöglichte. Es wurden die 350µl Lysat auf die im RNEasy-Mini-Kit enthaltenen Spin columns aufpipetiert und mit 10000rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Dadurch wurde die RNA fixiert und von der Flüssigkeit gelöst. Die dabei extrahierte Flüssigkeit wurde verworfen. Nachfolgend wurde auf die isolierte DNA 350µl RW1-Puffer aufgetragen und für 15sec bei 10000rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal wiederholt und die jeweils im Röhrchen aufgefangene Flüssigkeit wurde verworfen.

Für den folgenden Waschschrift wurde erneut ein neues 2ml Eppendorf Röhrchen unter die Spin columns platziert. Es wurden 700µl RPE1 Puffer auf die Membran getropft und nach einer 2-minütigen Wartezeit für 15sec bei 10000rpm zentrifugiert. Die Röhrchen mit der extrahierten Flüssigkeit wurden verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt.

Um die Membran der spin columns zu trocknen wurde wieder ein neues 2ml Eppendorf Röhrchen unter diese platziert und für eine Dauer von 2 Minuten mit der höchsten Geschwindigkeit zentrifugiert.

Um die RNA Isolation abzuschließen, wurde als Letztes die Eluierung durchgeführt. Hierbei wurde die RNA aus der Membran mit Hilfe von 30µl Rnase freiem Wasser herausgewaschen. Die nun im Rnase freien Wasser gelöste RNA wurde zur Verhinderung einer Zersetzung auf Eis gelagert und in einem Nano-Drop 2000c vermessen um die Konzentration der einzelnen Proben festzustellen [43].

Die fertigen Proben wurden danach wieder bei -80°C gelagert.

Die Qualität einzelner Proben wurde mit Hilfe eines Bioanalyser festgestellt.

2.7.2 cDNA

Für die Herstellung der cDNA wurde das Qiagen Quantiscript Kit verwendet, welches einen gDNA Wipeout Buffer, Quantiscript Reverse Transcriptase, Quantiscript RT-Buffer, RT Primer mix und Rnase-freies Wasser inkludiert und bei -20°C gelagert wird. Das Qiagen Quantiscript Kit und die Proben wurden vorsichtig aufgetaut und durch Bewegen und Zentrifugieren in eine homogene Lösung gebracht.

Initial wurde ein Genomic DNA Wipeout Mastermix benötigt, welcher durch die Vermischung von 2µl gDNA Wipeout Buffer und 1µl Rnase freiem Wasser hergestellt wurde. Danach wurde 13µl des Mastermix 1µl der RNA beigemischt, was zu einem Gesamtvolumen von 14µl führte. Diese Mischung wurde bei 42°C für 2 Minuten inkubiert und anschließend auf Eis gelegt. Durch diesen Schritt wurde genomische Rest-DNA entfernt.

Um nun aus der in den vorhergehenden Schritten extrahierten RNA eine cDNA synthetisieren zu können, wurde für die folgenden Schritte ein Reverse-Transkriptase Mastermix benötigt, welcher untenstehende Substanzen beinhaltet:

Komponenten	Volumen
Quantiscript Reverse Transcriptase	1µl
Qunatiscript RT Buffer	4µl
RT Primer Mix	1µl
gDNA bereinigte RNA	14µl
Gesamtvolumen	20µl

Für die nun folgenden Schritte wurde der Biorad Zyklus verwendet. Nachdem der Reverse-Transkriptase Mastermix hergestellt wurde, wurde dieser für 15min bei 42°C inkubiert, wobei darauf folgend die Temperatur automatisch auf 95°C angehoben wurde, wodurch die Reverse Transkriptase inaktiviert wurde.

Die somit gewonnene cDNA wurde erneut bei -84°C gelagert.

2.7.3 PCR

Zur weiteren Bearbeitung folgte eine quantitative Polymerase chain reaction (qPCR), welche zu einer Vermehrung der DNA führte. Die Startpunkte wurden mit Hilfe von Primern, welche bei der Firma Microsynt aus Wolfurt bestellt wurden, ausgesucht.

Anbei folgt eine Liste der verwendeten Primer.

Tabelle 4

Name des Oligonukelotids	Sequenz
h-AGTR-for	GGCTATTGTTCCACCCAATGAAGT
h-AGTR-rev	TGGGACTCATAATGGAAAGCAC
h-MYH7-for	CTTTGCTGTTATTGCAGCCATT
h-MYH7-rev	AGATGCCAACTTTCCTGTTGC
h-ACTA1-for	GGCATTTCACGAGACCACCTAC
h-ACTA1-rev	CGACATGACGTTGTTGGCATACT
h-FHL1-for	TGCTGCCTGAAATGCTTTGAC
h-FHL1-rev	GCCAGAAGCGGTTCTTATAGTG
h-TGFb1-for	GGCCAGATCCTGTCCAAGC
h-TGFb1-rev	GTGGGTTTCCACCATTAGCAC
h-TIMP3-for	TGGGTTGTAAGTCAAGATCAAG
h-TIMP3-rev	GGTCCAGAGACACTCGTTCT
h-IL6R-for	CCCCTCAGCAATGTTGTTGT
h-IL6R-rev	CTCCGGGACTGCTAACTGG
h-NppA-for	CAACGCAGACCTGATGGATTT
h-NppA-rev	AGCCCCGCTTCTTCATTC
h-NppB-for	TGGAAACGTCCGGGTTACAG
h-NppB-rev	CTGATCCGGTCCATCTTCCT
h-GAPDH-for	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
h-GAPDH-rev	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
h-B2M-for	GAGGCTATCCAGCGTACTCCA
h-B2M-rev	CGGCAGGCATACTCATCTTTT
RCAN1-rev.(human)	TGAGGTGGATCGGCGTGTA
RCAN1-forw.(human)	GCGTGGTGGTCCATGTATGT

2.7.3.1 Primertest

Vor Beginn der PCR wurde ein Testlauf durchgeführt, welcher die Spezifität der Primer überprüfen sollte. Hierfür wurde eine 100µM Stocklösung aus den jeweiligen gelieferten Primern hergestellt und diese mit einem Nuclease-freiem Wasser der Firma Ambion auf 10µM verdünnt. Für die weiteren Schritte wurden die 6 höchstkonzentrierten Proben zu einem Pool-Homogenat zusammengemischt und mit einem Mastermix (Tabelle 5) aus Nuclease-freiem Wasser und SYBR Green (SSO Advanced SYBR Green Super Mix der Firma Biorad) verdünnt, um die minimal mögliche Konzentration für die Primer herauszufinden.

Die Primer wurden mit 4µl des Pool-Homogenats jeweils als Triplikat getestet.

Tabelle 5

Mastermix	Volume
Nuclease-freies Wasser	0,48µl
SYBR Green Mastermix	5µl
Primer 1 (10µM) -> 260nM	0,26µl
Primer 2 (10µM) -> 260nM	0,26µl
cDNA	4,0µl
Gesamt	10µl

Es wurde eine 96- Well Platte (LightCycler Multiwell Plate 96 der Firma Roche) benutzt. In die einzelnen Wells wurden hintereinander 6µl Mastermix und 4µl der Proben eingebracht. Danach wurde die Platte mit einer Folie bedeckt und 1 Minute bei 9000rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die qPCR durchgeführt.

2.7.3.2 Experimentlauf

Es wurden die in Tabelle 4 beschriebenen Primer und der Mastermix (Tabelle 5) verwendet.

Die cDNA Proben wurden auf 1ng/µl verdünnt. Anschließend wurden auf eine 384-Well Platte 6µl Mastermix und 4µl der Probe je Well mit Hilfe eines Pipettierroboters (Firma Hamilton(STARlet)) aufgetragen. Die Ergebnisse werden im Kapitel 3 beschrieben.

2.7.3.3 PCR Theorie

Die Polymerase Chain Reaction wird verwendet um DNA zu vervielfältigen und diese anschließend messen zu können.

Die PCR besteht aus 3 Phasen:

1) Denaturierung

Initial wird die DNA auf 95°C erhitzt, damit die Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen werden und die DNA in ihre Einzelstränge zerteilt wird.

2) Primerhybridisierung

Bei einer Temperatur von 55°C können sich nun die einzelnen Primer an die Zielsequenzen anlagern.

3) Elongation

Je nach Arbeitsoptimum der verwendeten DNA-Polymerase wird die Temperatur auf 68-72°C erhöht. Jetzt bindet die DNA-Polymerase an die Primer und beginnt in 3'-5'-Richtung die fehlenden Nucleotide zu ersetzen.

In dieser Arbeit wurde eine qPCR mit SYBR GREEN verwendet. SYBR Green ist ein inaktiver Fluoreszenzstoff, welcher sich an alle neugebildeten Basenpaare bindet und dadurch in die DNA eingebaut und aktiviert wird.

Nach jedem Zyklus wird die Menge an Fluoreszenz gemessen bis diese einen Schwellenwert erreicht und die Intensität des Fluoreszenzsignals den Hintergrundwert übersteigt. Dieser Wert wird CT-Wert genannt.

Dieser Vorgang wird durchschnittlich zwischen 30-40mal wiederholt.

2.8 Statistische Auswertung

Die Resultate in dieser Arbeit wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Die Testung auf Signifikanz erfolgte mittels T-Test (ungepaart). Das Signifikanzniveau wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angesetzt.

3 Ergebnisse - Resultate

3.1 β -Myosin-Heavy-Chain (MYH7)

Für das Gen MYH7 lässt sich bei Frequenzbelastung eine Genexpressionssteigerung darstellen. Jedoch ist diese, wie in Abbildung 6 dargestellt, nicht signifikant.

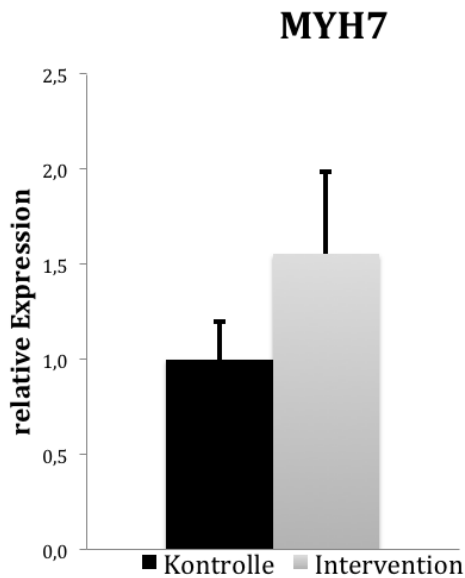


Abbildung 6: MYH7 Gesamtansicht

Auch bei Betrachtung der einzelnen Zeitpunkte von 6 Stunden und 8 Stunden, wie die Abbildung 7 darstellt, zeigt sich eine Expressionssteigerung als nicht-signifikanter Trend.

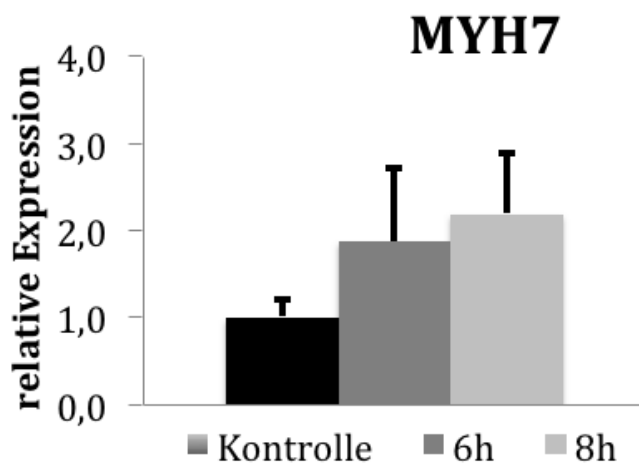


Abbildung 7: MYH7 Detailansicht

3.2 α -Skeletal Actin (ACTA1)

Für das Gen ACTA1 kann eine leichte Expressionssteigerung bei Frequenzbelastung nachgewiesen werden. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant, wie in Abbildung 8 dargestellt.

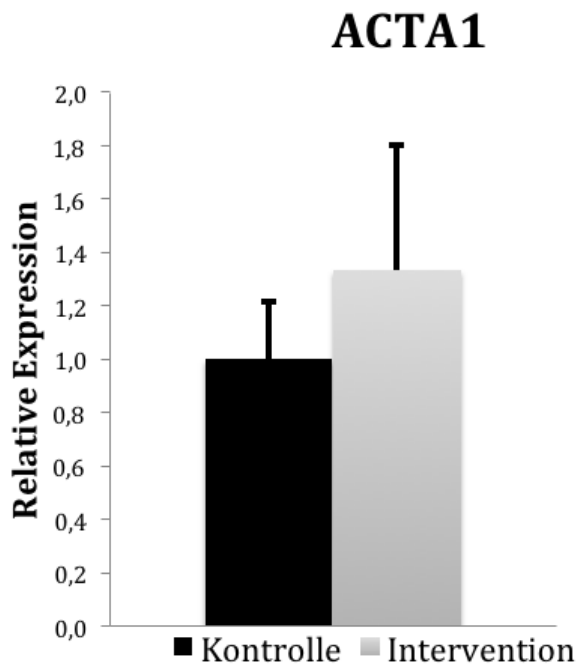


Abbildung 8: ACTA1 Gesamtansicht

Auch bei Betrachtung der Detailansicht in Abbildung 9 kann keine signifikante Genexpression festgestellt werden, man erkennt jedoch die zeitabhängige Tendenz.

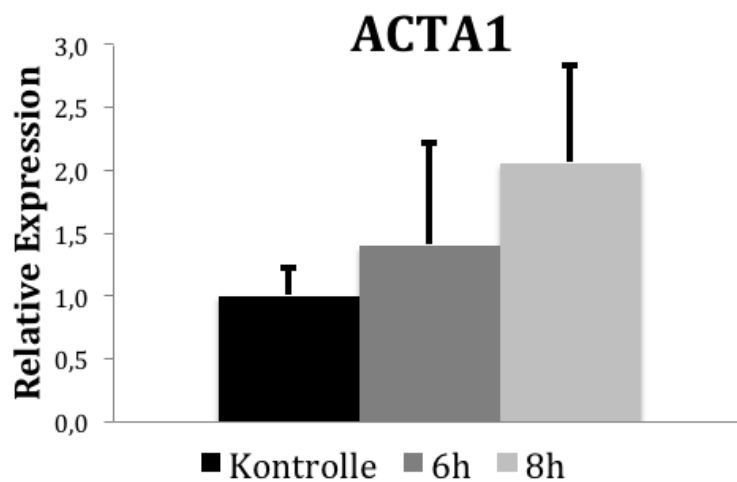


Abbildung 9: ACTA1 Detailansicht

3.3 ANP (*NppA*)

Anhand der Abbildung 10 lässt sich darstellen, dass es bei einem Vergleich zwischen Kontrolle und Intervention bei dem Gen *NppA* zu keiner signifikanten Genexpressionsveränderung bei Frequenzbelastung kommt.

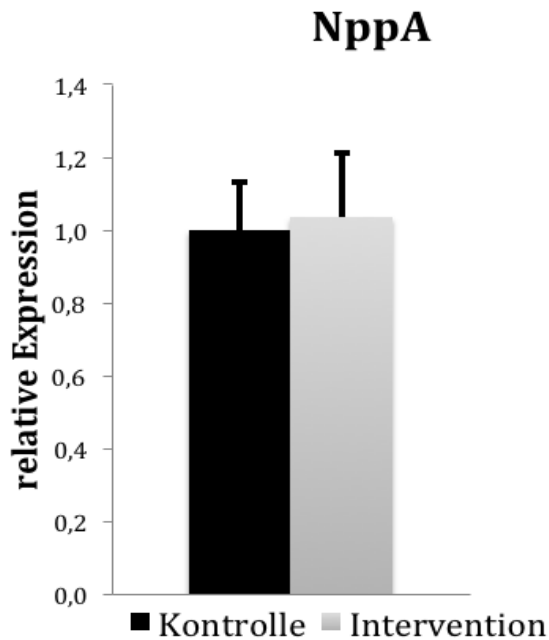


Abbildung 10: *NppA* Gesamtansicht

Bei näherer Betrachtung der Genexpressionsuntergruppen in der Detailansicht in der Abbildung 11 kann man eine nicht signifikante minimale Genexpressionssteigerung nach 6 Stunden erkennen, welche jedoch bereits nach 8 Stunden wieder rückläufig ist.

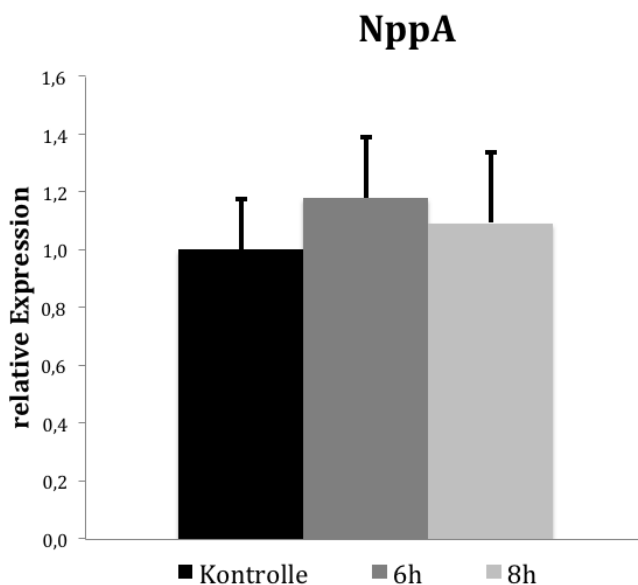


Abbildung 11: *NppA* Detailansicht

3.4 BNP (NppB)

Für NppB kommt es bei Frequenzbelastung ebenso zu keiner nachweisbaren Steigerung der Genexpression, wie die Abbildung 12 zeigt.

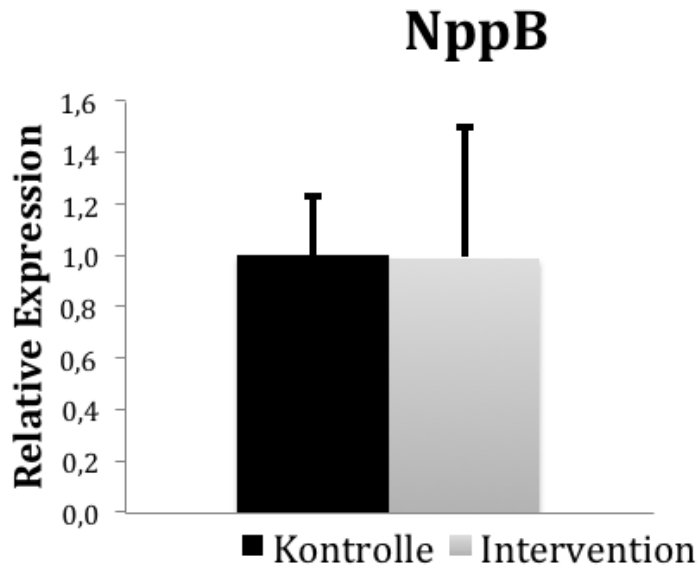


Abbildung 12: NppB Gesamtansicht

In der Detailansicht der Abbildung 13 mit Aufteilung der Untergruppen in 6 Stunden und 8 Stunden mit Frequenzbelastung zeigt sich, dass sich dies nach 6 Stunden und 8 Stunden gleich verhält.

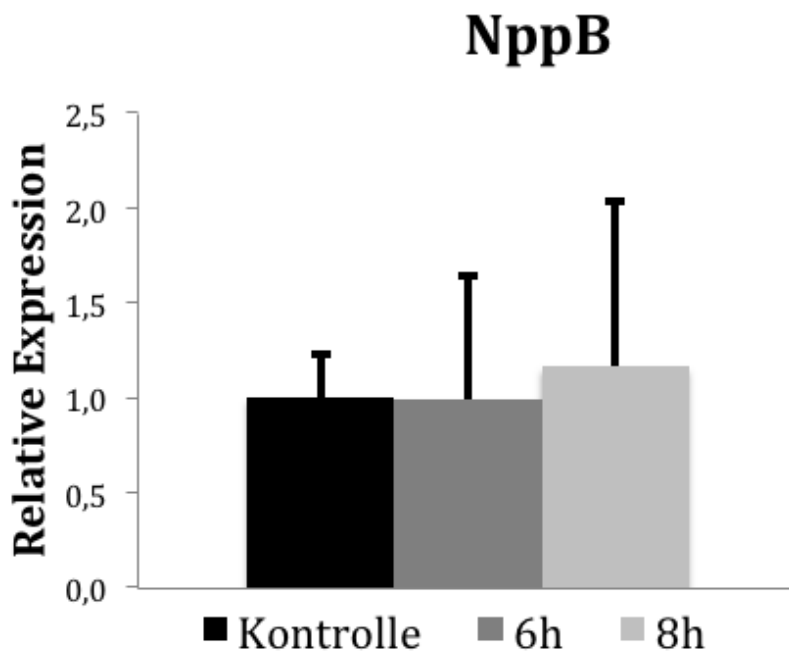


Abbildung 13: NppB Detailansicht

3.5 Four-and-a-half-lim-domain (FHL1)

Bei Betrachtung der gesamten Genexpression von FHL1, wie in Abbildung 14 zu sehen, kann eine gesteigerte Genexpression nachgewiesen werden. Die Genexpressionssteigerung ist hierbei jedoch nicht signifikant.

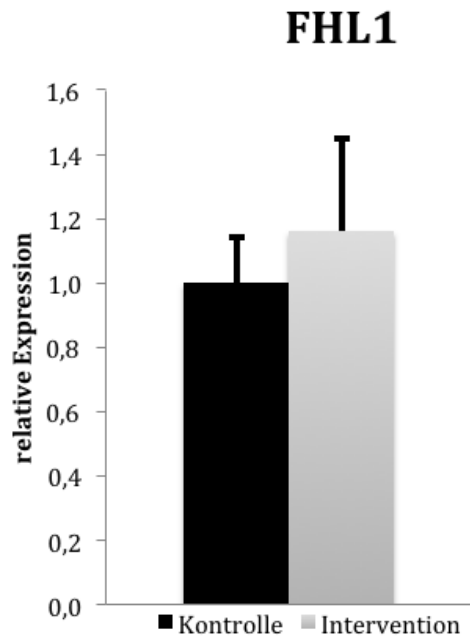


Abbildung 14: FHL1 Gesamtansicht

Bei genauerer Betrachtung erkennt man in Abbildung 15 aber, dass für FHL1 eine signifikante Expressionssteigerung nach 8 Stunden nachweisbar ist.

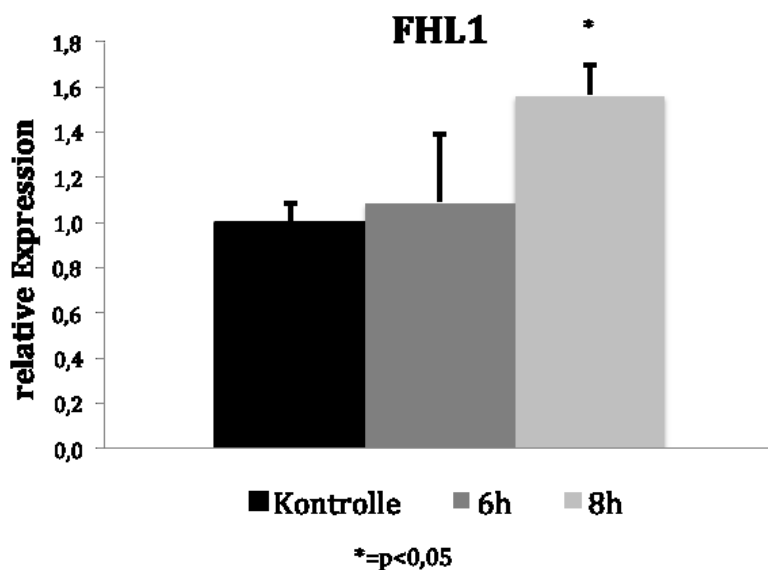


Abbildung 15: FHL1 Detailansicht

3.6 Transforming growth factor β (TGFB)

Bei dem Gen TGFB kommt es unter Frequenzbelastung bei einer knappen Verfehlung des Signifikanzniveaus ($p=0,05$) zu einer Steigerung der Genexpression um mehr als den Faktor 2, dies wird in der Abbildung 16 dargestellt.

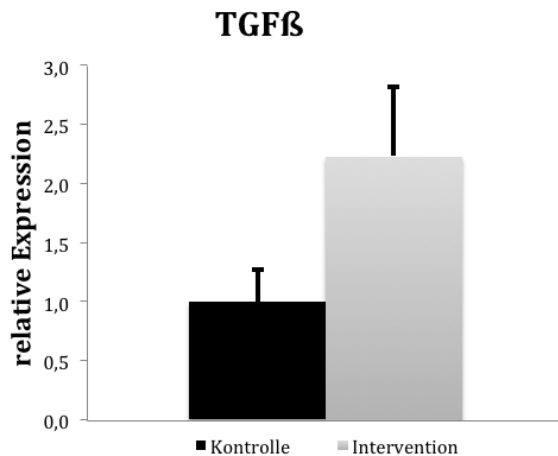


Abbildung 16: TGFB Gesamtansicht

In der Abbildung 17 zeigt sich, dass sowohl nach 6h, sowie nach 8h eine Genexpressionssteigerung feststellbar ist, wobei nach 8h die Irrtumswahrscheinlichkeit sehr nahe dem kritischen Cut-off lag ($p= 0,09$).

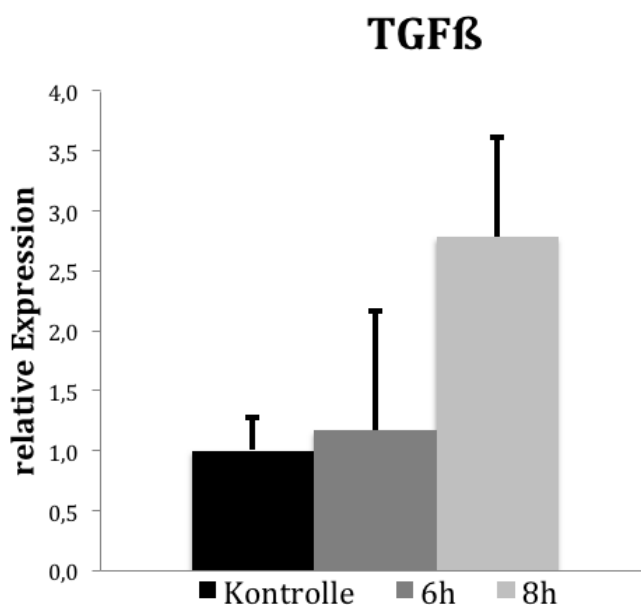


Abbildung 17: TGFB Detailansicht

3.7 Metalloproteinase (TIMP3)

Bei einer groben Betrachtung des Gen TIMP3 bei Frequenzbelastung lässt sich eine Genexpressionssteigerung um den Faktor 1.6 zeigen, welche jedoch nicht signifikant ist.

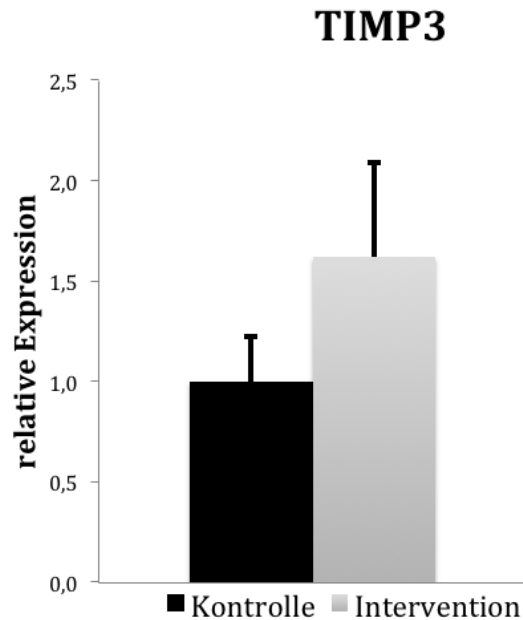


Abbildung 18: TIMP3 Gesamtansicht

Bei genauerer Untersuchung der einzelnen Untergruppen in Abbildung 19 lässt sich erkennen, dass es zu einer signifikanten Genexpressionssteigerung nach 8h kommt. Die Genexpressionssteigerung nach 6h fällt im Middle ähnlich stark aus, erreicht aber aufgrund der Streuung nicht das Signifikanzniveau.

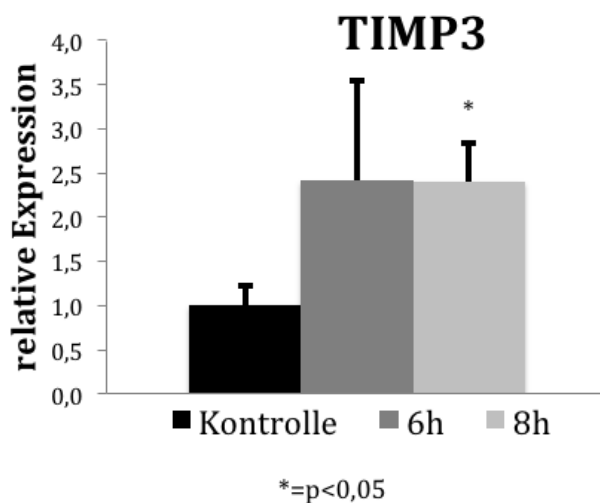


Abbildung 19: TIMP3 Detailansicht

3.8 Interleukin 6 receptor (ILR6)

Bei Betrachtung der Gesamtexpression des Gen ILR6 in Abbildung 20 zeigt sich bei Frequenzbelastung im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine klare Expressionssteigerung. Hierbei ist die Expressionsveränderung signifikant.

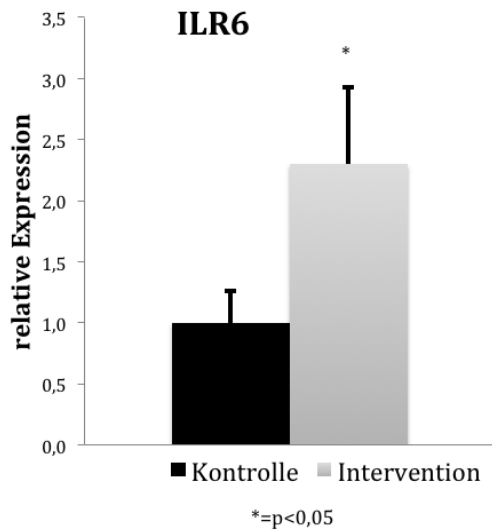


Abbildung 20: ILR6 Gesamtansicht

In der Detailansicht in Abbildung 21 zeigt sich bei 6-stündiger Frequenzbelastung ein fast signifikanter Trend ($p=0,07$) um den Faktor 2,6. Im Vergleich dazu wurde nach einer 8-stündigen Frequenzbelastung eine weitere Genexpressionssteigerung nachgewiesen, welche jedoch nicht signifikant ist.

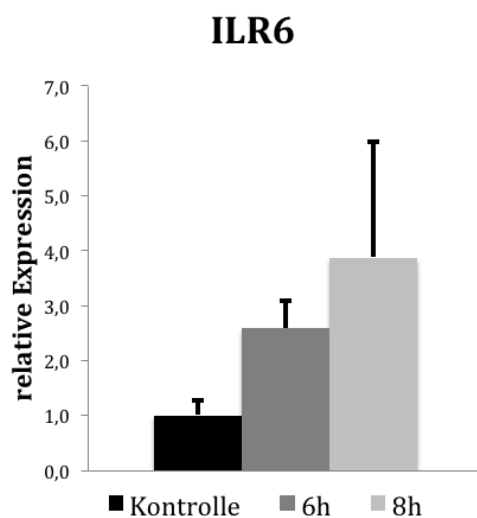


Abbildung 21: ILR6 Detailansicht

3.9 Regulator of Calcineurin (RCAN1)

Für die Genexpressionsänderung des Gen RCAN1 konnte bei Frequenzbelastung im Vergleich zur Kontrolle, wie in Abbildung 22 dargestellt, eine signifikante Steigerung nachgewiesen werden.

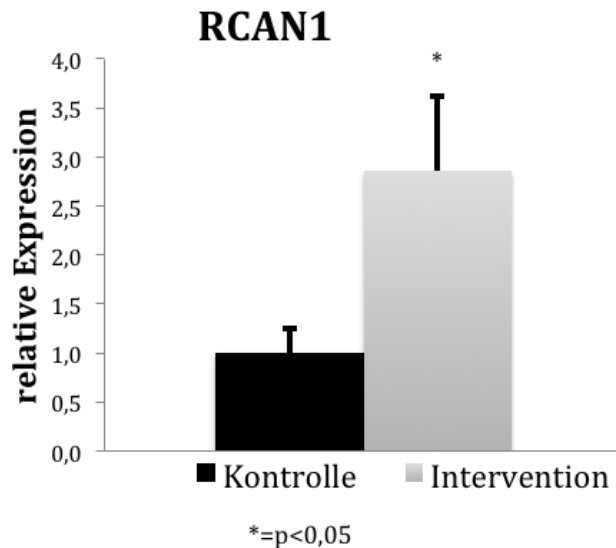


Abbildung 22: RCAN1 Gesamtansicht

Obwohl sich nach 6-stündiger Frequenzbelastung eine nicht relevante und nicht signifikante Genexpressionsveränderung zeigt, kommt es, wie in der Detailansicht in Abbildung 23 dargestellt, zu einer signifikanten und drastischen Steigerung der Genexpression nach 8 Stunden.

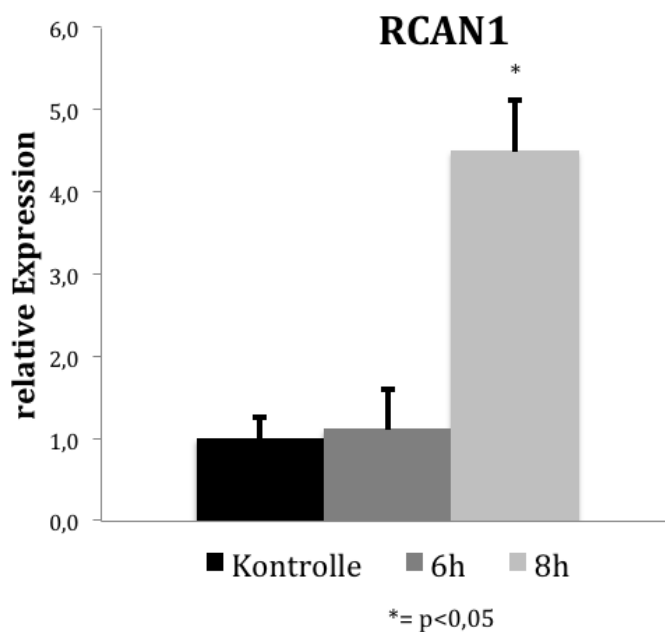


Abbildung 23: RCAN1 Detailansicht

3.10 Ventrikel

Die in Abbildung 24 dargestellte Genexpression zeigt die Expressionsrate bei Frequenzbelastung des nicht-insuffizienten ventrikulären Myokards über 8 Stunden. Aufgrund der geringen Fallzahl der zur Verfügung stehenden Präparate und nachfolgend noch weiteren Reduktion nach Ausschluss von Präparaten mit unzureichender RNA-Qualität und teilweise auch limitierter RNA-Gesamtmenge, die nicht für alle PCR-Messungen ausreichte, ergibt sich jeweils nur eine sehr geringe Gesamtfallzahl und relativ große Streuung. Dadurch können in diesem Bereich keine sicheren Aussagen angestellt werden. Herausstechend sind aber eine mögliche Expressionssteigerung für NppA und eine mögliche Herabregulation von IL6R als die Veränderungen mit dem größten Ausmaß. In geringerem Ausmaß scheinen sich auch FHL1 mit einer Expressionssteigerung und die Transkripte für ACTA1, MYH7 und TIMP3 mit einer Herabregulation zu verändern. Das Signifikanzniveau oder ein Signifikanz-naher Trend wird dabei nicht erreicht.

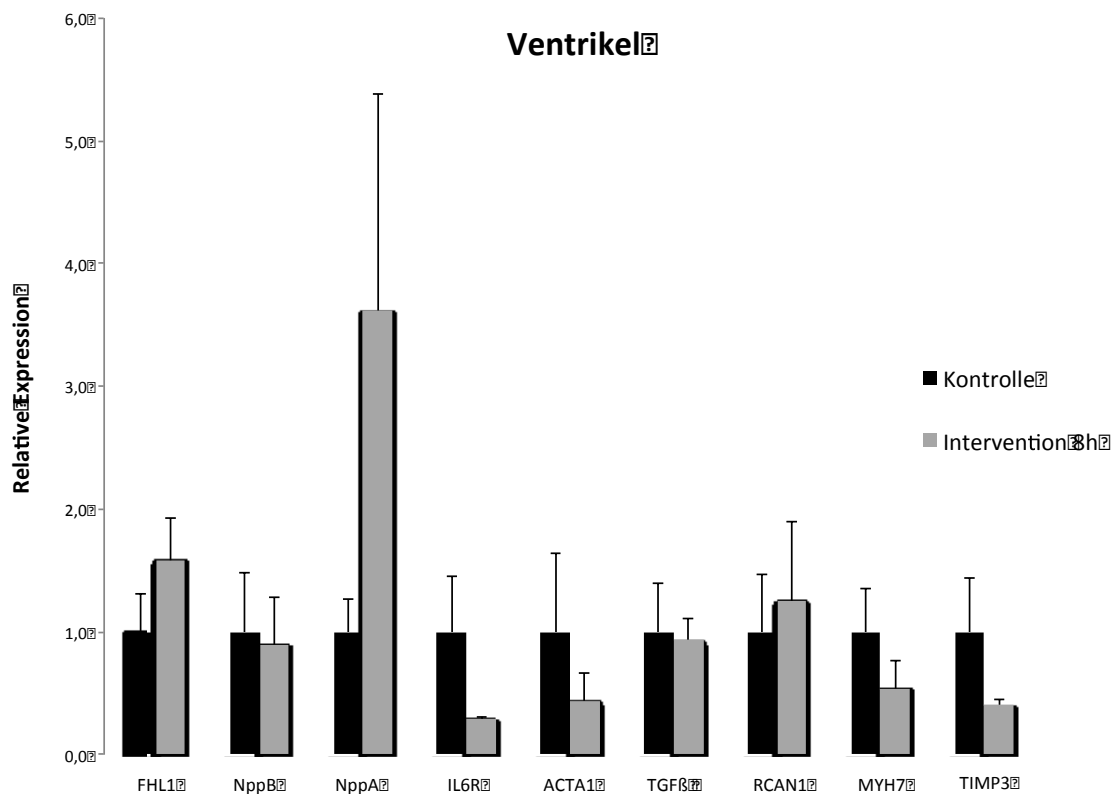


Abbildung 24: Genexpressionsrate im Ventrikel nach 8h Intervention

4 Diskussion

Durch die Betrachtung akuter Frequenzbelastung konnte in dieser Diplomarbeit gezeigt werden, dass die für relevante Umbauprozesse notwendigen Genexpressionsänderungen direkt durch die Belastung hervorgerufen werden und bereits nach wenigen Stunden eintreten.

Es ist hervorzuheben, dass erstmals für Versuche mit kurzzeitiger Frequenzbelastung humanes Myokard in Form von Muskelstreifen verwendet wurde. Durch die kontrollierten experimentellen Bedingungen konnten indirekte Einflussfaktoren (u.a. neurohumorale Faktoren oder sekundäre Veränderungen durch eine Veränderung der Myokardfunktion) ausgeschaltet werden. Dadurch werden direkte und kurzfristige Tachykardie-assoziierte Veränderungen wiedergespiegelt, welche nicht sekundär ausgelöst werden. Dies stellt das Alleinstellungsmerkmal der Versuche dieser Diplomarbeit dar und gibt einen relevanten Neuwert gegenüber den bisher publizierten Ergebnissen, welche bisher eher die chronischen Veränderungen im humanen Gewebe nachweisen. In den nächsten Seiten sollen daher die Befunde dieser Arbeit (zu den akuten und direkten Veränderungen) mit den Vorbefunden der Literatur (zu chronischen Veränderungen) für jedes der gemessenen Gene gegenüber gestellt werden.

4.1 β -Myosin-Heavy-Chain (MYH7)

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es bei Frequenzbelastung des atrialen Myokards zu einer tendenziellen Genexpressionssteigerung von MYH7 kommt.

Übereinstimmungen lassen sich mit Vorbefunden von Eiras et al. finden, in dessen Studie es bei Vorhofflimmern zu einer Steigerung von β -Myosin-Heavy-Chain kommt. In dieser Studie wurden Biopsien von rechten Herzohren von PatientInnen genommen, welche sich einer Bypass Operation unterzogen hatten. Hierbei wurde ein fast um das Doppelte gesteigerter β -Myosin-Heavy-Chain Anteil bei PatientInnen mit Vorhofflimmern nachgewiesen im Vergleich zu PatientInnen mit Sinusrhythmus [45]. Zusätzlich unterstützen die Ergebnisse dieser Diplomarbeit die Vermutung der Studie von Eiras et al., dass die Veränderungen durch eine erhöhte Frequenzbelastung anstelle von einer Dilatation zustande kommen [45].

Auch die Studie von Reiser & Kline et al., in welcher die gesteigerte Frequenzbelastung in verschiedenen Tiermodellen u.a. von Schweinen, Meerschweinen, Kaninchen, Ratten, Mäusen, Hunden und Pavianen betrachtet wurden, zeigt eine relative Verschiebung des

MHC- β -Anteil im Vergleich zum MHC- α -Anteil und trägt so zum oben genannten Erklärungsmodell bei [15].

Generell zählt MYH7 zu einer Gruppe von Genen, welche im fetalen Myokard, aber nur zu einem geringen Teil in gesundem adulten unbelasteten Myokard exprimiert werden. Diese Gruppe von Genen wird jedoch verstärkt bei pathologischen Reizen exprimiert und vermehrt in kardialen Pathologien nachgewiesen [46], was durch das Ergebnis dieser Arbeit Unterstützung findet.

Im ventrikulären Myokard ist aufgrund der geringen Fallzahl und großen Streuung, wie in Abbildung 24 dargestellt, eine genaue Aussage über die Genexpression von MYH7 nicht möglich.

4.2 α -Skeletal Actin (ACTA1)

Für ACTA1 konnte, wie in Abbildung 8 gezeigt, ebenso eine tendenzielle Expressionssteigerung bei Frequenzbelastung festgestellt werden.

Diese Ergebnisse werden bestärkt durch die Studie von Driesen et al., welcher ein Tiermodell mit Ziegen, welches bereits in Kapitel 1.2.1 beschrieben wurde, verwendete, um das strukturelle Remodeling bei Vorhofflimmern zu untersuchen. Es zeigte sich ein klarer Anstieg von α -Skeletal Actin von <1% zu Beginn des Experiments zu 15% nach einer Woche [20].

Untermauert werden diese Resultate bei Betrachtung von Missense Mutationen des ACTA1 Gen. Hier zeigte sich neben einer muskulären Schwäche, einer frontal lobulären Hypoplasie und anderen Symptomen eine laterale ventrikuläre Dilatation [19].

Ähnliches zeigte sich bei Case Report eines 9-jährigen Patienten mit einer Mutation im ACTA1 Gen. Dieser entwickelte in früher Kindheit eine Herzinsuffizienz aufgrund einer dilatativen Kardiomyopathie [47].

Aufgrund der geringen Fallzahl und großen Streuung, wie in Abbildung 24 dargestellt, ist eine genaue Aussage über die Genexpression von ACTA1 in ventrikulärem Myokard nicht möglich.

4.3 ANP (*NppA*)

In dieser Arbeit konnte für die Gesamtanalyse von *NppA* keine relevante Genexpressionssteigerung nachgewiesen werden. Jedoch bei genauerer Betrachtung konnte nach 6 Stunden eine vermehrte Genexpression gezeigt werden, welche sich nach 8 Stunden wieder auf den Ausgangswert der Kontrolle zurückbewegt.

Bestärkt werden die Ergebnisse durch eine Studie von Cao et al., in welcher die Aussagekraft von natriuretischen Peptiden als diagnostische und prognostische Marker bei Vorhofflimmern untersucht wurden. Ein spezielles Augenmerk wurde auf den Vergleich von paroxysmalem und permanentem Vorhofflimmern gelegt. Hierzu wurden die Vorhofohren von PatientInnen mit paVHF und PatientInnen mit peVHF bei Herzklappenoperationen für den Anschluss von HLM entfernt und als Probenmaterial für Untersuchungen verwendet. Hier konnte nachgewiesen werden, dass nt-proANP mRNA nur in paVHF vermehrt exprimiert wurde, jedoch nicht bei peVHF [48].

Eine mögliche Erklärung für diese Entwicklung mit Betrachtung der Resultate von Cao et al. ist, dass ANP vor allem in den ersten Stunden der Frequenzbelastung eine Rolle spielt.

Zusammen mit *MYH7* und *ACTA1* ist auch *NppA* Teil des fetalen Genexpressionsmusters, welches, wie in Kapitel 0 bereits erläutert, in verschiedenen myokardialen Pathologien exprimiert wird [46].

Aufgrund der geringen Fallzahl und großen Streuung, wie in Abbildung 24 dargestellt, ist eine genaue Aussage über die Genexpression von *NppA* in ventrikulärem Myokard nicht möglich. Es scheint jedoch am ehesten eine Hochregulation von *NppA* zu geben.

4.4 BNP (*NppB*)

Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, kommt es zu einer nicht signifikanten Genexpressionssteigerung bei Frequenzbelastung nach 8 Stunden, obwohl zuvor keine Veränderung der Expression von *NppB* nach 6 Stunden erkennbar ist.

Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass BNP generell als Marker für langfristige Veränderungen dient, was in einer Arbeit von Birner et al. gezeigt werden konnte.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die BNP Werte im Blutplasma von PatientInnen nach Myokardinfarkt und darauffolgender Herzinsuffizienz und einem herzgesundem Geschwisterteil verglichen. Im zweiten Teil wurden Kaninchen Schrittmacher implantiert

und durch eine 30-tägige Stimulation mit 330-380 bpm eine Herzinsuffizienz am Ende des Experiments herbeigeführt. Hierbei konnte in beiden Teilbereichen der Studie nachgewiesen werden, dass eine Herzinsuffizienz zu einer Erhöhung von NT-proBNP führt, welche mit der Schwere der linksventrikulären Dysfunktion korreliert [49].

Zusätzlich werden diese Ergebnisse durch die bereits oben genannte Studie von Cao et al. unterstützt. Diese beschäftigt sich ebenso mit nt-proBNP als diagnostischem und prognostischem Marker für VHF. Es ließ sich nachweisen, dass bereits bei paVHF, jedoch verstärkt bei peVHF eine erhöhte Expression von NT-proBNP besteht [48].

Aufgrund der geringen Fallzahl und großen Streuung, wie in Abbildung 24 dargestellt, ist eine Aussage über die Genexpression von NppB in ventrikulärem Myokard nicht möglich.

4.5 Four-and-a-half-lim-domain (FHL1)

Im atrialen Myokard konnte nach einer Frequenzbelastung von 8 Stunden, wie in Abbildung 15 dargestellt, eine signifikante Genexpressionssteigerung festgestellt werden. Aufgrund der Annahme, dass u.a. Four-and-a-half-lim-domain eine wichtige Rolle beim Remodeling des Herzens bei Frequenzbelastung spielt, wurde in einer Studie von Chen et al. Schweinen ein Schrittmacher implantiert und diese 4 Wochen lang mit 400-600bpm stimuliert. Am Ende des Experiments wurde den Schweinen das linke und rechte Herzohr entfernt und untersucht. Es konnten 31 Gene, welche in der Transkription, Signalübertragung oder strukturellen Prozessen eine Rolle spielen, nachgewiesen werden bei welchen es zu einer Genexpressionsveränderung kommt: U.a. FHL1, dessen Genexpression um mehr als das 3-fache erhöht war [50].

Ebenso konnte bei einer Untersuchung von PatientInnen mit hypertropher Kardiomyopathie gezeigt werden, dass auch hier die Expression von FHL1 gesteigert ist [51].

Aufgrund der geringen Fallzahl und großen Streuung, wie in Abbildung 24 dargestellt, ist eine Aussage über die Genexpression von FHL1 in ventrikulärem Myokard nicht möglich.

4.6 Transforming growth factor β (TGFB)

Wie in Abbildung 17 dargestellt, konnte eine signifikante Genexpressionssteigerung des TGFB in atrialem Myokard nach 8 Stunden nachgewiesen werden.

Unterstützt wird dieses Ergebnis durch eine Studie von Yeh et al., in welcher in einer HL-1 atrialen Myozyten Zelllinie die Auswirkung von Frequenzbelastung bis zu 4Hz gemessen wurde. Durch eine gesteigerte Expression von TGFB kam es zu einem vermehrten Zerfall von Myofibrillen [52].

In einer weiteren Studie wurden genetisch veränderte Mäuse mit einer Überexpression von TGFB1 untersucht. Diese verursachte eine vermehrte Fibrose im Vorhof, jedoch nicht im Ventrikel. Durch die vermehrte Fibrose bei diesen Mäusen kam es zu einer erleichterten Induzierbarkeit eines Vorhofflimmerns [53].

Die Studie von He et al. konnte bei einer erhöhten Frequenzbelastung von 1000ppm bei Kaninchen zusätzlich einen möglichen Mechanismus für die Steigerung von TGFB ausfindig machen. Im Myokard der frequenzbelasteten Kaninchen kam es zu einer Steigerung von Angiotensin II, welches den Abbau von Smad7 aktiviert. Smad 7, eine Untergruppe der Smad Komplexe, welche die Transkription durch Bindung an Gene im Nukleus steuern, dient als Inhibitor für TGFB. Durch die Reduktion von Smad7 kam es infolgedessen zu einer Expressionssteigerung von TGFB [13].

Aufgrund der geringen Fallzahl und großen Streuung, wie in Abbildung 24 dargestellt, ist eine genaue Aussage über die Genexpression von TGFB in ventrikulärem Myokard nicht möglich.

4.7 Metalloproteinase Inhibitor (TIMP3)

Es zeigte sich eine generelle Steigerung der Genexpression bei TIMP3 nach Frequenzbelastung. Speziell bei der Betrachtung der Detailansicht ist eine signifikante Hochregulation nach 8 Stunden zu erkennen.

Bestätigt werden diese Ergebnisse von Fedak et al. in einem Experiment an Hamstern mit genetischer Kardiomyopathie. Hierbei wurden die verschiedenen Werte von Metalloproteinasen (MMPs) und TIMPs im Myokard im Vergleich zu gesunden Hamstern betrachtet. Es konnten normale Levels an MMPs nachgewiesen werden, jedoch zeigt sich

eine Reduktion an TIMP1 und TIMP3. Ebenso zeigt sich eine Korrelation zwischen dem Grad der Herzinsuffizienz und der Reduktion von TIMP1 und TIMP3 [54].

Eine mögliche Erklärung hierfür ist die wichtige Rolle von TIMP3 in der Homeostase der inflammatorischen Aktivität und Antwort auf Überbeanspruchung. Hier dient es als Inhibitor der MMPs und der TACE [33, 55].

Auch konnte Fedak et al. in Experimenten mit Mäusen, welche einen Mangel an TIMP3 aufweisen, zeigen, dass ein Verlust an TIMP3 zu einer Kardiomyozytenhypertrophie, einer linksventrikulären Dilatation und einer kardialen Dysfunktion führt [56].

Aufgrund der geringen Fallzahl und großen Streuung, wie in Abbildung 24 dargestellt, ist eine genaue Aussage über die Genexpression von TIMP3 in ventrikulärem Myokard nicht möglich.

4.8 Interleukin 6 receptor (IL6R)

Bei einer Betrachtung der einzelnen Zeitpunkte des IL6R Gen ist eine signifikante Genexpressionssteigerung bereits nach 6 Stunden nachweisbar. Auch in der Gesamtauswertung konnte nachgewiesen werden, dass es zu einer signifikanten Genexpressionssteigerung von IL6R bei Frequenzbelastung kommt.

Vergleicht man dieses Expressionsmuster mit anderen Studien, weisen diese ähnliche Ergebnisse auf. Die Gruppe um Guillermo Torre-Amionea unternahm eine Subgruppenanalyse der SOLVD Studie mit PatientInnen mit NYHA I-III. Es wurde die Korrelation zwischen Herzinsuffizienz und proinflammatorischen Zytokinen untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass erhöhte Werte von proinflammatorischen Zytokinen u.a. Interleukin 6 mit steigender Herzinsuffizienz einhergehen [57].

In einer Studie von Birner et al. konnten die Ergebnisse mithilfe von Untersuchungen an PatientInnen mit Myokardinfarkt und durch experimentelle Herzinsuffizienz aufgrund von Frequenzbelastung bei Kaninchen ebenso repliziert werden [49].

Aufgrund der geringen Fallzahl und großen Streuung, wie in Abbildung 24 dargestellt, ist eine genaue Aussage über die Genexpression von IL6R in ventrikulärem Myokard nicht möglich.

4.9 Regulator of Calcineurin (RCAN1)

In den Experimenten zeigte sich bei der Gesamtbetrachtung der Frequenzbelastung, sowie in der Detailansicht nach 8h, dass es zu einer signifikanten Genexpressionssteigerung von RCAN1 kommt.

Die gesteigerte Genexpression kann erklärt werden durch die protektive Aktivität von RCAN1. In einer Studie von Yang und Bassel-Duby et al. wurde gezeigt, dass die Expression von RCAN1 durch die transkriptionsfördernde Aktivität von Calcineurin, welche in Kapitel 1.4 erklärt wurde, gesteigert wird. Hierbei dient RCAN1 durch negatives Feedback als Kontrollmechanismus für Calcineurin und verursacht hierdurch eine Reduktion der Calcineurin Aktivität [36].

Bestärkt werden diese Ergebnisse durch Experimente von Rothermel et al. mit genetisch veränderten Mäusen, welche RCAN1 überexprimieren. In diesen konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte Expression von RCAN1 in gesunden unbelasteten Herzen keine pathologischen Ereignisse aufweist. Jedoch bei genetisch veränderten Mäusen, welche speziell im Myokard eine Überexpression von RCAN1 hatten, entwickelte sich keine myokardiale Hypertrophie bei Belastung durch β -adrenerger Rezeptor Stimulation oder Sport im Vergleich zur Kontrollgruppe[58].

Aufgrund der geringen Fallzahl und großen Streuung, wie in Abbildung 24 dargestellt, ist eine genaue Aussage über die Genexpression von RCAN1 in ventrikulärem Myokard nicht möglich.

4.10 Limitationen

Die durchgeführten Mengen im isolierten humanen Myokard stellten methodisch hohe Ansprüche bei einer Vielzahl konsekutiver Schritte und zugleich naturgegeben hoher Varianz zwischen den Präparaten.

Aufgrund teilweise großer Streuung zwischen den einzelnen Gruppen (Kontrolle vs. Intervention) und innerhalb der einzelnen Gruppe (Kontrolle vs Kontrolle und Intervention vs Intervention) konnten teilweise nur Trends nachgewiesen werden, aber keine signifikanten Aussagen getätigt werden.

Ein Folgeprojekt dieser Diplomarbeit ist daher auf noch größere Fallzahlen ausgelegt und auf eine Bioanalyser-Validierung jeder einzelnen Probe statt der in der vorliegenden Arbeit angewendeten stichprobenartigen Testung. Dies bedeutet aber einen noch höheren

Aufwand und Dauer des Projektes, so dass dieses als 3-jährige PhD-Dissertation vergeben wurde.

5 Literaturverzeichnis

1. Shachnow, N., S. Spellman, and I. Rubin, *Persistent Supraventricular Tachycardia: Case Report with Review of Literature*. *Circulation*, 1954. **10**(2): p. 232-236.
2. Whipple GH, S.L., Woodman EG, Theophilus C, Friedman C., *Reversible congestive heart failure due to rapid stimulation of the normal heart*. *Proc New Engl Cardiovasc Soc.*, 1962(20): p. 39-40.
3. Monigatti-Tenkorang, J., et al., *Intermittent atrial tachycardia promotes repolarization alternans and conduction slowing during rapid rates, and increases susceptibility to atrial fibrillation in a free-behaving sheep model*. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2014. **25**(4): p. 418-27.
4. Qi, X.Y., et al., *Cellular signaling underlying atrial tachycardia remodeling of L-type calcium current*. *Circ Res*, 2008. **103**(8): p. 845-54.
5. David Dang, R., MD, and L.JulianHaywood, MD, *A Review of Atrial Fibrillation*. *JOURNAL OF THE NATIONAL MEDICAL ASSOCIATION*, 2002. **94**(12): p. 1036-1048.
6. Mohamed, H.A., *Tachycardia-induced Cardiomyopathy (Tachycardiomyopathy)*. *The Libyan Journal of Medicine*, 2007. **2**(1): p. 26-29.
7. A. John Camm , G.Y.H.L., Raffaele De Caterina, Irene Savelieva, and S.H.H. Dan Atar, Gerhard Hindricks, Paulus Kirchhof, *2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation*. 2012.
8. Wijffels, M.C., et al., *Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats*. *Circulation*, 1995. **92**(7): p. 1954-68.
9. Maurits Allesie, J.A., Ulrich Schotten, *Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation*. *Cardiovascular Research*, 2002. **54**: p. 230-246.
10. Yue, L., et al., *Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation*. *Circ Res*, 1997. **81**(4): p. 512-25.
11. Morillo, C.A., et al., *Chronic Rapid Atrial Pacing: Structural, Functional, and Electrophysiological Characteristics of a New Model of Sustained Atrial Fibrillation*. *Circulation*, 1995. **91**(5): p. 1588-1595.
12. Polyakova, V., et al., *Atrial extracellular matrix remodelling in patients with atrial fibrillation*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2008. **12**(1): p. 189-208.
13. He, X., et al., *Atrial fibrillation induces myocardial fibrosis through angiotensin II type I receptor-specific Arkadia-mediated downregulation of Smad7*. *Circ Res*, 2011. **108**(2): p. 164-75.
14. Sanfilippo, A.J., et al., *Atrial enlargement as a consequence of atrial fibrillation. A prospective echocardiographic study*. *Circulation*, 1990. **82**(3): p. 792-7.
15. Reiser, P.J. and W.O. Kline, *Electrophoretic separation and quantitation of cardiac myosin heavy chain isoforms in eight mammalian species*. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 1998. **274**(3): p. H1048-H1053.
16. Belus, A., et al., *Effects of Chronic Atrial Fibrillation on Active and Passive Force Generation in Human Atrial Myofibrils*. *Circulation Research*, 2010. **107**(1): p. 144-152.
17. Laing, N.G., et al., *Mutations and polymorphisms of the skeletal muscle alpha-actin gene (ACTA1)*. *Hum Mutat*, 2009. **30**(9): p. 1267-77.
18. Ravenscroft, G., et al., *Cardiac α -actin over-expression therapy in dominant ACTA1 disease*. *Human Molecular Genetics*, 2013. **22**(19): p. 3987-3997.

19. Saito, Y., et al., *Extramuscular manifestations in children with severe congenital myopathy due to ACTA1 gene mutations*. *Neuromuscul Disord*, 2011. **21**(7): p. 489-93.
20. Driesen, R.B., et al., *Re-expression of alpha skeletal actin as a marker for dedifferentiation in cardiac pathologies*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2009. **13**(5): p. 896-908.
21. Song, W., H. Wang, and Q. Wu, *Atrial natriuretic peptide in cardiovascular biology and disease (NPPA)*. *Gene*, 2015. **569**(1): p. 1-6.
22. Wang, T.J., et al., *Plasma Natriuretic Peptide Levels and the Risk of Cardiovascular Events and Death*. *New England Journal of Medicine*, 2004. **350**(7): p. 655-663.
23. Mandalenakis, Z., et al., *Atrial natriuretic peptide as a predictor of atrial fibrillation in a male population study. The Study of Men Born in 1913 and 1923*. *Int J Cardiol*, 2014. **171**(1): p. 44-8.
24. Yoshimura, M., et al., *Hemodynamic, renal, and hormonal responses to brain natriuretic peptide infusion in patients with congestive heart failure*. *Circulation*, 1991. **84**(4): p. 1581-8.
25. R.-R. Sun, L.L., M. Liu, Y. Cao, X.-C. Li, H. Liu, J. Wang, P.-Y. Zhang, *Biomarkers and heart disease*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014. **18**(19): p. 2927-2935.
26. Levine, Y.C., et al., *B-type natriuretic peptide is a major predictor of ventricular tachyarrhythmias*. *Heart Rhythm*, 2014. **11**(7): p. 1109-1116.
27. Patton, K.K., et al., *N-terminal pro-B-type natriuretic peptide as a predictor of incident atrial fibrillation in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis: the effects of age, sex and ethnicity*. *Heart*, 2013. **99**(24): p. 1832-6.
28. Pao-Hsien Chu, e.a., *The Novel Roles of Four and A Half LIM Proteins 1 and 2 in the Cardiovascular System*. *Chang Gung Med J*, 2011. **34**(2).
29. Friedrich, F.W., et al., *Evidence for FHL1 as a novel disease gene for isolated hypertrophic cardiomyopathy*. *Human Molecular Genetics*, 2012. **21**(14): p. 3237-3254.
30. Mohapatra, B., et al., *Mutations in the muscle LIM protein and α -actinin-2 genes in dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis*. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2003. **80**(1-2): p. 207-215.
31. Khan, R. and R. Sheppard, *Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor- β (1) in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia*. *Immunology*, 2006. **118**(1): p. 10-24.
32. Orbe, J., *Different expression of MMPs/TIMP-1 in human atherosclerotic lesions. Relation to plaque features and vascular bed*. *Atherosclerosis*, 2003. **170**(2): p. 269-276.
33. Spinale, F.G., *Myocardial Matrix Remodeling and the Matrix Metalloproteinases: Influence on Cardiac Form and Function*. *Physiological Reviews*, 2007. **87**(4): p. 1285-1342.
34. Kassiri, Z., et al., *Simultaneous Transforming Growth Factor β -Tumor Necrosis Factor Activation and Cross-talk Cause Aberrant Remodeling Response and Myocardial Fibrosis in Timp3-deficient Heart*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009. **284**(43): p. 29893-29904.
35. Fontes, J.A., N.R. Rose, and D. Čiháková, *The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure*. *Cytokine*, 2015. **74**(1): p. 62-68.
36. John Yang, B.R., Rick B. Vega, Norbert Frey, Timothy A. McKinsey, Eric N. Olson, and R.S.W. Rhonda Bassel-Duby, *Independent Signals Control Expression of the Calcineurin*

- Inhibitory Proteins MCIP1 and MCIP2 in Striated Muscles.* Circ Res, 2000. **87**: p. 61-68.
37. Torac, E., L. Gaman, and V. Atanasiu, *The regulator of calcineurin (RCAN1) an important factor involved in atherosclerosis and cardiovascular diseases development.* Journal of Medicine and Life, 2014. **7**(4): p. 481-487.
 38. Sun, L., et al., *Overexpression of Rcan1-1L Inhibits Hypoxia-Induced Cell Apoptosis through Induction of Mitophagy.* Molecules and Cells, 2014. **37**(11): p. 785-794.
 39. Dominguez-Rodriguez, A., et al., *The other side of cardiac Ca(2+) signaling: transcriptional control.* Front Physiol, 2012. **3**: p. 452.
 40. Crabtree, G.R., *Generic Signals Specific Outcomes: Signaling through Ca2+, Calcineurin, and NF-AT.* Cell, 1999. **96**: p. 611-614.
 41. Backs, J., et al., *CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy.* Journal of Clinical Investigation, 2006. **116**(7): p. 1853-1864.
 42. Backs, J., et al., *Histone Deacetylase 5 Acquires Calcium/Calmodulin-Dependent Kinase II Responsiveness by Oligomerization with Histone Deacetylase 4.* Molecular and Cellular Biology, 2008. **28**(10): p. 3437-3445.
 43. Calineata, M., *Dehnungsabhängige Genexpression am isolierten humanen Myokard.* Medizinische Universität Graz, 2015.
 44. Jayawant, A.M., E.R. Stephenson Jr, and R.J. Damiano Jr, *2,3-Butanedione monoxime cardioplegia: advantages over hyperkalemia in blood-perfused isolated hearts.* The Annals of Thoracic Surgery, 1999. **67**(3): p. 618-623.
 45. Eiras, S., et al., *Alterations in contractile protein composition and function in human atrial dilatation and atrial fibrillation.* J Mol Cell Cardiol, 2006. **41**(3): p. 467-77.
 46. Mikaelian, I., et al., *Temporal gene expression profiling indicates early up-regulation of interleukin-6 in isoproterenol-induced myocardial necrosis in rat.* Toxicol Pathol, 2008. **36**(2): p. 256-64.
 47. Gatayama, R., et al., *Nemaline myopathy with dilated cardiomyopathy in childhood.* Pediatrics, 2013. **131**(6): p. e1986-90.
 48. Cao, H., et al., *Natriuretic peptides and right atrial fibrosis in patients with paroxysmal versus persistent atrial fibrillation.* Peptides, 2010. **31**(8): p. 1531-9.
 49. Birner, C.M., et al., *Head-to-head comparison of BNP and IL-6 as markers of clinical and experimental heart failure: Superiority of BNP.* Cytokine, 2007. **40**(2): p. 89-97.
 50. Chen, C.L., et al., *Altered expression of FHL1, CARP, TSC-22 and P311 provide insights into complex transcriptional regulation in pacing-induced atrial fibrillation.* Biochim Biophys Acta, 2007. **1772**(3): p. 317-29.
 51. Do-Sun Lim, M., M. Robert Roberts, FACC, and M. Ali J. Marian, FACC, *Expression Profiling of Cardiac Genes in Human Hypertrophic Cardiomyopathy: Insight Into the Pathogenesis of Phenotypes.* J Am Coll Cardiol, 2001. **38**(4): p. 1175-1180.
 52. Yeh, Y.H., et al., *Transforming growth factor-beta and oxidative stress mediate tachycardia-induced cellular remodelling in cultured atrial-derived myocytes.* Cardiovasc Res, 2011. **91**(1): p. 62-70.
 53. Sander Verheule, et al., *Increased Vulnerability to Atrial Fibrillation in Transgenic Mice with Selective Atrial Fibrosis Caused by Overexpression of TGF-β1.* Circ Res, 2004. **94**(11): p. 1458-1465.
 54. Paul W. M. Fedak, S.M.A., Richard D. Weisel, Nafiseh Nili, Nobuhisa Ohno, Subodh Verma, Tsu-Yee J. Lee, Chris Kiani, Donald A. G. Mickle, Bradley H. Strauss, Ren-Ke Li, *Matrix remodeling in experimental and human heart failure: a*

- possible regulatory role for TIMP-3*. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 2003. **284**(2): p. H626-H634.
55. Amour, A., Patrick M. Slocombe, and M.B. Ailsa Webster, C. Graham Knight, Bryan J. Smith, Paul E. Stephens, Chris Shelley, Mike Hutton, Vera Knäuper, Andrew J.P. Docherty, Gillian Murphy, *TNF-alpha-converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3*. FEBS Letters, 1998. **435**: p. 39–44.
 56. Fedak, P.W., et al., *TIMP-3 deficiency leads to dilated cardiomyopathy*. Circulation, 2004. **110**(16): p. 2401-9.
 57. PhD Guillermo Torre-Amionea, M.S.K., PhD, FACC Claude Benedict, MD Hakan Oral, FACC James B. Younga, FACC Douglas L. Manna., *Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: A report from the studies of left ventricular dysfunction (SOLVD)* Journal of the American College of Cardiology, 1996. **27**(5): p. 1201-1206.
 58. Rothermel, B.A., et al., *Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3328-33.

