

Chirurgische Therapie des Vorhofflimmerns –
Einfluss von microRNA-133a Signalwegen auf den therapeutischen Erfolg

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Hannah-Lena Wißbrock
aus Bielefeld

Gießen (2020)

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Klinik für Herz- Kinderherz- und Gefäßchirurgie

Gutachter: PD Dr. med. Bernd Niemann
Gutachter: PD Dr. med. Damir Erkapic

Tag der Disputation: 29.03.2021

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Vorhofflimmern.....	1
1.1.1.	Definition, Hämodynamik, Klinik, Klassifikation	1
1.1.2.	Epidemiologie	3
1.1.3.	Ätiologie und Risikofaktoren	3
1.1.4.	Prognose und Komplikationen.....	4
1.1.5.	Therapiestrategien.....	5
Medikamentöse Therapie	6	
Elektrische Kardioversion	7	
Interventionelle und chirurgische Therapie.....	7	
1.1.6.	Pathophysiologie des Vorhofflimmerns	8
Atriales Remodeling.....	8	
Extrazellulärmatrix	12	
Transdifferenzierung zu Myofibroblasten.....	13	
1.1.7.	Signalgebung beim strukturellen Remodeling des Vorhofs.....	14
Transforming growth factor - β	14	
Connective tissue growth factor.....	14	
1.2.	MicroRNAs	15
1.2.1.	Definition.....	15
1.2.2.	Biogenese.....	16
1.2.3.	microRNAs bei kardialen Erkrankungen.....	17
1.2.4.	miR-133a	18
1.3.	Fragestellung der Arbeit	20
2.	Materialien	21
2.1.	Geräte	21
2.2.	Software und Onlinedatenbanken	22
2.3.	Verbrauchsmaterialien.....	22
2.4.	Reagenzien.....	23
2.5.	Kits	25
2.6.	Escherichia coli (E. coli)	25
2.7.	Zelllinien	25
2.8.	Primer	26
2.9.	Zusammensetzung von Puffern und Medien	27
Puffer	27	
Histologie	28	

Inhaltsverzeichnis

Medien	28
3. Methoden	30
3.1. Zellkultur und Transfektion	30
3.1.1. Transfektion mit PEI	30
3.1.2. Transfektion mit JetPrime®	30
3.1.3. Zellzahlanalyse	31
3.2. RNA/DNA-Analytik	31
3.2.1. Aufarbeitung von humanen rechtsatrialen Appendices	31
3.2.2. RNA-Isolation mit TriReagent®	32
3.2.3. Poly-A-Tailing	32
3.2.4. Reverse Transkription	33
3.2.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)	34
3.2.6. Gelelektrophorese	36
3.2.7. Klonierung (Generierung und Isolation von pre-microRNA-Plasmiden)	37
3.2.8. Transformation	39
3.2.9. Plasmidpräparation (Mini)	39
3.2.10. Restriktionsanalyse isolierter Plasmide	40
3.2.11. Sequenzierung	41
3.2.12. Plasmidpräparation (Midi)	41
3.3. Virusexperimente	41
3.3.1. Generierung lentiviraler Vektoren	42
3.3.2. Virusherstellung	46
3.3.3. Anwendung lentiviraler Vektoren in humanen Fibroblasten	47
3.4. Histologie	48
3.4.1. Gewebeaufbereitung, Kryofixierung und Kryo-Schnitte	48
3.4.2. Kollagenfärbung mit Sirius-Red	48
3.4.3. Auswertung der Gewebsschnitte	49
3.5. Statistische Auswertung	49
4. Ergebnisse	51
4.1. Histologie	51
4.2. Einfluss der miR-133a-Überexpression auf Zielgene mit Bedeutung für die Extrazellulärmatrix	53
4.2.1. Transfektions- und Transduktionseffizienz	54
4.2.2. Expression von COL1A1-mRNA nach microRNA-133a-Überexpression ..	55
4.2.3. Expression von COL3A1-mRNA nach microRNA-133a-Überexpression ..	56
4.2.4. Expression von CTGF-mRNA nach microRNA-133a-Überexpression	57

Inhaltsverzeichnis

4.2.5.	Korrelationsanalyse	58
4.2.6.	Expression von TGF- β -mRNA nach microRNA-133a-Überexpression	59
4.2.7.	Expression von Fibronectin1-mRNA nach microRNA-133a-Überexpression	60
4.3.1.	Einfluss der miR-133a-Überexpression auf die Transdifferenzierung kardialer Fibroblasten	61
4.4.	Einfluss der miR-133a-Überexpression auf die Zelldichte kardialer Fibroblasten.....	62
4.5.	miR-133a-Expression in rechtsatrialen Gewebeproben	63
4.6.	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	64
5.	Diskussion.....	65
5.1.	Fibrosierung rechtsatrialen Gewebes bei Vorhofflimmern	65
5.2.	Funktionelle Auswirkungen bei miR-133a-Überexpression	67
5.3.	miR-133a Expressionsmuster bei paroxysmalem und persistierendem Vorhofflimmern.....	70
5.3.1.	miR-133a als potentieller Biomarker	72
5.3.2.	miR-133a als potentielles therapeutisches Target	73
5.4.	Schlussfolgerung und Perspektiven	74
5.5.	Limitationen	74
6.	Zusammenfassung	76
7.	Summary.....	77
8.	Abkürzungsverzeichnis.....	78
9.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	80
10.	Anhang.....	82
10.1.	Vektorkarte pcDNA TM 6.2-GW/EmGFP-miR-133a	82
10.2.	Vektorkarte pLenti6.4/CMV/V5/MSGW-EmGFP-miR-133a.....	83
11.	Literaturverzeichnis.....	84
12.	Ehrenwörtliche Erklärung	106
13.	Danksagung	107

1. Einleitung

1.1. Vorhofflimmern

1.1.1. Definition, Hämodynamik, Klinik, Klassifikation

Vorhofflimmern ist die häufigste atriale Herzrhythmusstörung.

Beim Vorhofflimmern handelt es sich um eine supraventrikuläre Tachyarrhythmie, die durch unkoordinierte, atriale Erregungen gekennzeichnet ist (January et al., 2014).

Durch die unkoordinierte Kontraktion der Vorhöfe reduziert sich die diastolische, atrial unterstützte Füllung der Ventrikel und es kommt zu einer Reduktion der mechanischen Effektivität der kardialen Funktion um bis zu 20%. Im Elektrokardiogramm (EKG) wird das Vorhofflimmern durch schnelle Oszillationen oder fibrillierende Wellen, die in ihrer Amplitude, ihrer Form und ihrem Takt variieren und häufig mit irregulären, ventrikulären Erregungen assoziiert sind, charakterisiert (Bellet, 1971; Falk, 2001).

Im Gegensatz zum bisherigen Verständnis einer die Lebensqualität und Lebenszeit nicht signifikant beeinflussenden Erkrankung, kann man aktuell davon ausgehen, dass Vorhofflimmern einen deutlichen Einfluss auf die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität hat (Andrade et al., 2014; Khairy and Nattel, 2002).

Vor allem in den Industrienationen ist die Prävalenz in den letzten Jahrzehnten merklich gestiegen (Ryder and Benjamin, 1999). Durch die zunehmende Alterung der Gesellschaft steigt die Prävalenz des Vorhofflimmerns in der Gesamtbevölkerung, aber insbesondere auch in der Subpopulation der kardiovaskulär Kranken. Das Lebenszeitrisko ein Vorhofflimmern zu entwickeln, wurde für 40–55-jährige Personen auf 22–26% geschätzt, ab dem 55. Lebensjahr auf 37% (Go et al., 2001; Heeringa et al., 2006; Staerk et al., 2018).

Das Vorhofflimmern hat einen negativen Einfluss auf den myokardialen Perfusionsdruck, den koronararteriellen Widerstand und die Dauer der Diastole. Gemeinsam beeinflussen diese Faktoren wiederum den myokardialen Blutfluss (van den Berg et al., 1998).

Über den Verlust der synchronen atrialen mechanischen Aktivität und irreguläre ventrikuläre Erregungen kommt es zu unkoordinierten Phasen bradykarder und tachykarder arrhythmischer Herzfrequenz. Neben diesen primär als „elektrisches Remodeling“ begriffenen Mechanismen kommt es weiter zu einem „strukturellen Remodeling“ (Kirchhof et al., 2016).

Tachykardien reduzieren hierbei die Phasen diastolischer Koronardurchblutung und können somit eine erniedrigte myokardiale Kontraktionskraft mit der Folge einer verminderten kardialen Auswurfraction nach sich ziehen (Tachykardiomyopathie) (Fuster et

Einleitung

al., 2011; January et al., 2014). Die kardiale Dysfunktion geht einher mit einer Dilatation der kardialen Kavitäten und einem gesteigerten fibrotischen Umbau (strukturelles Remodeling) (Sanfilippo et al., 1990).

Neben hoch symptomatischen Patienten, die über Palpitationen, Belastungsintoleranz und Leistungsminderung vor allem in den Frühphasen der Erkrankung klagen, gibt es vor allem Patienten mit einem langfristigen Verlauf des Vorhofflimmerns und fortgeschrittenem Remodeling, die asymptomatisch sind (Falk, 2001). Die Symptome treten häufiger bei jungen Patienten, dem weiblichen Geschlecht, und bei der Existenz von kardiovaskulären Begleiterkrankungen auf. Laut einer Follow-up Studie des Canadian Registry of Atrial Fibrillation mit 967 Patienten reichen sie bei Erstdiagnose von unspezifischen Symptomen, wie Palpitationen und Fatigue, bis hin zur Entwicklung eines akuten Lungenödems (Calkins et al., 2012; Kerr et al., 1996). Vorhofflimmern wird nach der Dauer der Erkrankung, der spontanen Termination von Episoden sowie nach den Behandlungsoptionen in fünf Typen klassifiziert: Erstdiagnostiziertes Vorhofflimmern, paroxysmales Vorhofflimmern, persistierendes Vorhofflimmern, lang-persistierendes Vorhofflimmern sowie permanentes Vorhofflimmern (Tabelle 1) (Kirchhof et al., 2016).

Tabelle 1: Klassifizierung Vorhofflimmern

Typ	Definition
Erstdiagnostiziertes Vorhofflimmern	Erstdiagnostiziertes Vorhofflimmern unabhängig von der Dauer oder bestehenden Symptomen
Paroxysmales Vorhofflimmern	Sich innerhalb von 7 Tagen selbstlimitierendes oder innerhalb von 7 Tagen erfolgreich kardiovertiertes Vorhofflimmern
Persistierendes Vorhofflimmern	Länger als 7 Tage bestehendes oder nach 7 Tagen erfolgreich kardiovertiertes bzw. medikamentös terminiertes Vorhofflimmern
Lang-persistierendes Vorhofflimmern	Vor Beginn einer Rhythmuskontrolle über 1 Jahr bestehendes Vorhofflimmern
Permanentes Vorhofflimmern	Als permanent akzeptiertes Vorhofflimmern ohne Rhythmuskontrolle, bei Beginn einer Behandlung Re-Klassifizierung zu lang-persistierendem Vorhofflimmern

1.1.2. Epidemiologie

In Studien zur epidemiologischen Ausbreitung des Vorhofflimmerns zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der ansteigenden Prävalenz und Inzidenz des Vorhofflimmerns und dem zunehmenden Alter der Bevölkerung (Feinberg et al., 1995; January et al., 2014; Kannel et al., 1998; Ryder and Benjamin, 1999). Ab dem fünfzigsten Lebensjahr verdoppeln sich sowohl die Prävalenz als auch die Inzidenz in jeder Lebensdekade um bis zu 9% bei 80-jährigen Patienten (Falk, 2001; Kannel et al., 1998). Eine auf Daten von 8,3 Millionen Patienten basierende deutsche Studie zeigte eine Gesamtprävalenz von 2,3% bei einem durchschnittlichen Patientenalter von 73,1 Jahren, wobei 55% der Betroffenen Männer waren. Die besondere Bedeutung der Erkrankung ergibt sich medizinisch, wissenschaftlich und wirtschaftlich aus dem erwarteten Anstieg der Prävalenz (Wilke et al., 2013). Europäische Schätzungen erwarten bis 2030 bis zu 17 Mio Betroffene. Daten aus den USA gehen von einem Anstieg der Prävalenz von 5,2 Millionen im Jahre 2010 auf 12,1 Millionen im Jahr 2030 aus (Colilla et al., 2013; Go et al., 2001; Krijthe et al., 2013; Miyasaka et al., 2006). Weiter belegen umfangreiche Studien, dass Männer etwa 1,5 mal häufiger betroffen sind als Frauen (Go et al., 2001; Kannel et al., 1998; Kirchhof et al., 2016; Ryder and Benjamin, 1999; Wilke et al., 2013). Im Rahmen des demographischen Wandels ist die steigende Prävalenz des Vorhofflimmerns mit sozioökonomischen Konsequenzen verbunden (Freedman et al., 2016; Go et al., 2001; Le Heuzey et al., 2004). Schon heute verursacht das Vorhofflimmern immense Kosten für das Gesundheitssystem. Bei etwa einem Drittel der Hospitalisierungen, aufgrund von Herzrhythmusstörungen, ist Vorhofflimmern die Ursache (Fuster et al., 2011), die jährlichen Kosten pro Patient liegen bei über 3000 Euro. Die Anzahl an Krankenhausaufenthalten, embolischen Komplikationen und Todesfällen ist bei permanentem Vorhofflimmern signifikant höher als bei der paroxysmalen Form (Le Heuzey et al., 2004; Steinberg et al., 2015). Die epidemiologischen Fakten verdeutlichen die Notwendigkeit einer Optimierung der Prävention und Therapie des Vorhofflimmerns, um sowohl die Komplikationen und Sterblichkeit als auch die Kosten für das Gesundheitssystem zu minimieren.

1.1.3. Ätiologie und Risikofaktoren

Genese und Erhalt des Vorhofflimmerns werden durch eine Vielzahl von kardialen und nicht-kardialen Erkrankungen und Risikofaktoren begünstigt. Unabhängige Risikofaktoren sind zunehmendes Alter und männliches Geschlecht. Als bedeutsamste kardiale Risikofaktoren gelten: Arterielle Hypertonie, Linksherzinsuffizienz, Koronare Herzerkrankungen (KHK) und Herzklappenvitien (Andrade et al., 2014; Benjamin et al., 1998;

Kannel et al., 1998; Kirchhof et al., 2016; Sanoski, 2009). Diese kardiovaskulären Erkrankungen fördern eine sich progredient entwickelnde atriale Dilatation, die eine elektrische Instabilität und strukturelle Veränderungen („Atriales Remodeling“) und somit die Entstehung von Vorhofflimmern begünstigt (Ausma et al., 1997; Sanoski, 2009).

Zu den nicht-kardialen Risikofaktoren zählen unter anderem Zustände, die mit sympathischer Überstimulation einhergehen, wie Hyperthyreose (Selmer et al., 2012), das Schlafapnoesyndrom (Mehra et al., 2006), aber auch übermäßiger Alkoholkonsum (Djoussé et al., 2004; Frost L and Vestergaard P, 2004), Diabetes mellitus (Benjamin et al., 1994), Übergewicht (Umetani et al., 2007; Wang TJ et al., 2004), (January et al., 2014) sowie operative Eingriffe.

Neben den zuvor beschriebenen Formen des Vorhofflimmerns treten Episoden von Vorhofflimmern im postoperativen Umfeld als sogenannte „new-onset-atrial-fibrillation“ auf. Bei 7,6% der nicht-kardialen Eingriffe und bei 33% der koronararteriellen Bypass-Operationen tritt ein Vorhofflimmern als Komplikation auf (Aranki et al., 1996; Polanczyk et al., 1998). Pathogenese und pathophysiologische Bedeutung sind hierbei weitestgehend unklar, jedoch gibt es Anhalt, dass elektrisches Remodeling eine Rolle spielen könnte. Die Persistenz des Vorhofflimmerns über die direkte postoperative Phase hinaus beträgt jedoch weniger als 1% und ist somit selten. Andererseits geht jene Komplikation mit einem zweifach erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität sowie einem achtfach erhöhten Risiko für wiederkehrendes Vorhofflimmern einher (Ahlssohn et al., 2010).

Die Evaluation des Vorhofflimmerns erfolgt derzeit über EKG-Veränderungen im 12-Kanal-EKG, Langzeit-Holter-EKG und mittels Eventrekorderanalysen. Pathophysiologische, strukturelle Veränderungen werden echokardiografisch anhand der Bestimmung der linksatrialen und linksventrikulären Dimension, der linksventrikulären Ejektionsfraktion und dem Nachweis von Herzvitien wie Mitralklappeninsuffizienzen nachvollzogen (January et al., 2014). Reliable Biomarker, die die Risikoabschätzung oder Prävention des Vorhofflimmerns verbessern könnten, existieren bisher nicht.

1.1.4. Prognose und Komplikationen

Männer und Frauen der Framingham-Herz-Studie mit Vorhofflimmern zeigten ein 1,5-1,9-fach erhöhtes Mortalitätsrisiko im Vergleich zu Gesunden (Benjamin et al., 1998).

Durch Vorhofflimmern verursachte myokardiale und hämodynamische Veränderungen begünstigen das atriale Remodeling und darüber hinaus die Genese einer kardialen Insuffizienz. Mögliche Gründe dafür sind eine erniedrigte kardiale Auswurfraction durch

einen Verlust der atrialen Kontraktionskraft und ein erniedrigter koronararterieller Blutfluss durch eine verkürzte Diastole bei asynchroner und irregulärer ventrikulärer Erregung (Fuster et al., 2011; January et al., 2014; van den Berg et al., 1998). Zudem fördert die erhöhte Herzfrequenz während des Vorhofflimmerns die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie (Tachykardiomyopathie). Damit einhergehend ist die Genese einer Mitralklappeninsuffizienz möglich, die einerseits die Pathogenese des Vorhofflimmerns fördern, andererseits aber auch den Erhalt des Vorhofflimmerns begünstigen kann (Fuster et al., 2011; January et al., 2014; Packer et al., 1986).

Schwerwiegende Komplikationen des Vorhofflimmerns sind Thromboembolien, die durch die Ischämie abhängiger Organe Organdysfunktionen bis hin zu tödlichen Verläufen eines Apoplex oder einer gastrointestinalen Ischämie führen können.

95% aller Thromben entstehen im linken Herzohr. Das Auftreten von Thromben und embolischen Ereignissen ist bei Vorhofflimmern eng mit einem erniedrigten Blutfluss assoziiert (Black et al., 1994; Fatkin et al., 1994; Pop et al., 1994). Das Vorhofflimmern stellt somit einen unabhängigen Risikofaktor für die Entstehung ischämischer Hirninsulte dar, die verglichen mit Schlaganfällen anderer Genese signifikant häufiger einen schweren bzw. letalen Verlauf nehmen (Freedman et al., 2016; Lin et al., 1996). Das Risiko für einen Hirninfarkt ist bei Patienten mit Vorhofflimmern um das 4-5fache erhöht. Damit ist das Vorhofflimmern ursächlich für bis zu einem Drittel der embolischen Ereignisse (Bogousslavsky et al., 1990; Cotter et al., 2013; Freedman et al., 2016; Wolf et al., 1987). Die Häufigkeit von Schlaganfällen bei Vorhofflimmern steigt mit zunehmendem Alter stark an (1,5% bei 50-59-Jährigen vs. 23,5% bei 80-89-Jährigen) (Benjamin et al., 1998; Kannel et al., 1998; Ryder and Benjamin, 1999; Wolf et al., 1991). Frauen haben dabei mit steigendem Alter ein höheres Risiko einen ischämischen Insult zu erleiden (Akoum et al., 2018).

1.1.5. Therapiestrategien

Die Therapie des Vorhofflimmerns kann der Kontrolle des Rhythmus oder der Kontrolle der Frequenz folgen. Während die Zielsetzung der Rhythmuskontrolle die Wiederherstellung und der Erhalt eines Sinusrhythmus ist, wird in der Frequenzkontrolle das Vorhofflimmern als permanent akzeptiert und nur eine Prävention hinsichtlich einer Tachykardiomyopathie und thromboembolischer Ereignisse betrieben. Grundlage dieser Therapiekonzepte können medikamentöse, elektrorhythmologische, interventionelle oder operative Verfahren sein.

Medikamentöse Therapie

Die medikamentöse Therapie des Vorhofflimmerns wird sowohl zur Rhythmus- als auch Frequenzkontrolle eingesetzt (mittels β -Blockern, Digoxin, den Calciumkanalblockern Diltiazem und Verapamil sowie Amiodaron zur Frequenzkontrolle und Flecainid, Amiodaron, Propafenon, Ibutil und Vernakalant zur Rhythmuskontrolle). Eine therapeutische Antikoagulation zur Thromboembolie-Prophylaxe kann mit Vitamin-K-Antagonisten oder neuen oralen Antikoagulantien wie Faktor-Xa-Inhibitoren oder Thrombinantagonisten erfolgen (January et al., 2014; Kirchhof et al., 2016).

Die Rhythmuskontrolle strebt die Wiedererlangung eines Sinusrhythmus an und hat gegenüber der Frequenzkontrolle den Vorteil, Remodeling zu unterbrechen und ein Re-Remodeling zu ermöglichen. Hierdurch kann die Progression in ein dauerhaftes Vorhofflimmern verzögert oder sogar verhindert werden (De Vos et al., 2012).

Die Effektivität der Thromboembolie-Prophylaxe muss gegenüber dem erhöhten Risiko für fatale, intrazerebrale Hämorrhagien abgewogen werden. Daher wird das Risiko einen Schlaganfall zu erleiden anhand des CHA₂DS₂-VASc-Score abgeschätzt (Tabelle 2) (Gy et al., 2010). Ab einem Punktwert von >2 ist eine Antikoagulation anzustreben (siehe Tabelle 2) (Camm et al., 2012; Ferrari et al., 2016). Die Blutungsrate wird mit 0,3–0,6% pro Jahr abgeschätzt und steigt ab einem Alter von 85 Jahren (Fang et al., 2004; Hart et al., 2005). Die Suche nach neuen, komplikationsärmeren Therapietargets steht im Fokus der aktuellen Forschung. Vor dem Bild möglicher Komplikationen scheint der Erhalt eines Sinusrhythmus wertvoll, um eine Antikoagulation vermeiden zu können. Additive therapeutische Targets, welche die klassische medikamentöse Therapie hierbei unterstützen können, könnten den therapeutischen Erfolg erhöhen.

Tabelle 2: CHA₂DS₂-VASc-Score

	Merkmal	Punkte
C	Herzinsuffizienz	1
H	Hypertension	1
A ₂	Alter \geq 75 Jahre	2
D	Diabetes mellitus	1
S ₂	Z.n. Schlaganfall, TIA oder Thromboembolie	2
V	Vaskuläre Erkrankungen	1
A	Alter 65-74 Jahre	1
Sc	weibliches Geschlecht	1

Elektrische Kardioversion

Ziel der elektrischen Kardioversion ist die Wiederherstellung eines Sinusrhythmus durch eine EKG-synchrone Abgabe eines Gleichstromimpulses mittels eines zumeist biphasischen Defibrillators am sedierten Patienten. Sie gilt als Methode der Wahl bei hämodynamisch instabilen Patienten mit neu aufgetretenem Vorhofflimmern (Kirchhof et al., 2016).

Aufgrund des erhöhten Risikos durch elektrische Kardioversion getriggelter arterieller Embolien muss bei über 48 Stunden persistierendem Vorhofflimmern eine orale Antikoagulation sowohl 3 Wochen vor, als auch 4 Wochen nach dem Eingriff erfolgen (Airaksinen et al., 2013; Hansen et al., 2015; Kirchhof et al., 2016; Schmidt-Lucke et al., 2007).

Interventionelle und chirurgische Therapie

Medikamentöse Therapie und elektrische Kardioversion zeigen einen reduzierten Langzeiterfolg. Demgegenüber können interventionelle, offen-chirurgische und minimalinvasiv-chirurgische Verfahren eine höhere Rate an einer langfristigen Freiheit von Vorhofflimmern erreichen (Kyprianou et al., 2016).

Insbesondere Patienten mit persistierender Symptomatik und Patienten mit unzureichendem therapeutischen Erfolg durch Kardioversion und medikamentöse Therapie profitieren von diesen Methoden. Für die Anwendung bestehen nach aktuellen Leitlinien Klasse I und IIa Empfehlungen (Dunning et al., 2013; Kirchhof et al., 2016).

Zur Ablation bei symptomatischem Vorhofflimmern werden zum einen die Katheterablation, zum anderen die chirurgische Ablation, die im Rahmen von chirurgischen Eingriffen (z.B. bei Mitralklappenoperationen) oder minimalinvasiv über Mini-Sternotomien, Mini-Thorakotomien oder über Video-assisted thoracoscopic surgery (VATS) eingesetzt wird, angewendet (Kyprianou et al., 2016).

Die Ablation eines nach Intervention persistierenden Vorhofflimmerns kann chirurgisch erfolgen und ebenso als operationsbegleitende Ablation bei paroxysmalem und persistierendem Vorhofflimmern mit vergleichsweise höheren Erfolgsraten im Langzeitverlauf, jedoch auch höherer Invasivität im Vergleich zu interventionellen Verfahren (Camm et al., 2012).

Grundlage ablativer Verfahren heutzutage ist es, kontrollierte Vernarbungen über Hitzeapplikation (uni-/bipolare Radiofrequenz) oder Kälte (Kryoablation) zu setzen, um Entry-mechanismen unkontrollierter Erregungen zu unterbinden oder kreisende Erregungen (Rotoren) zu unterbrechen oder zu verhindern (Kyprianou et al., 2016). Höchste Erfolgsraten erzielte die Arbeitsgruppe Cox, die eine chirurgische Durchtrennung und Narbenbildung zur Generierung eines elektrophysiologischen, biaxialen Labyrinthes nutzte, die

„MAZE“-Prozedur, mit jedoch höherem chirurgischem Aufwand und Risikoprofil im Vergleich zu aktuellen Methoden (Cox, 2004; Cox et al., 1996, 1991; Gaynor et al., 2004)(Cox, 1987).

In der Folge entwickelte die Arbeitsgruppe unterschiedliche Narbenmuster am Vorhof, deren aktuelle Strategie als Cox-MAZE-IV-Prozedur mit exzellenten Ergebnissen beschrieben ist und eine Erfolgsrate von bis zu 95% über 2 Jahre erzielt (Damiano Jr et al., 2003; Gaynor et al., 2004; Gillinov and McCarthy, 2004).

Neben diesen etablierten Linienkonzepten bestehen eine Vielzahl unterschiedlicher Linienführungen, bi- oder monoatriale Behandlungskonzepte, Radio- Kryo- oder Kombinationsanwendungen und peritherapeutische Therapieregime, sodass Ergebnisse unterschiedlicher Zentren wenig einheitlich und vergleichbar, jedoch stets höher sind, wenn ein rhythmologisch interventionelles und rhythmuschirurgisches Hybrid-Stufenschema gewählt wird (Kyprianou et al., 2016).

Die Effektivität eines interventionellen Vorhofverschlusses oder einer chirurgischen Vorhofresektion zur Thromboembolie-Prophylaxe ist aktuell Gegenstand klinischer Untersuchungen und nicht abschließend geklärt, sodass eine dahingehende generelle Therapieempfehlung nicht gegeben wird (Kirchhof et al., 2016).

Vor dem Hintergrund der pathophysiologischen und prognostischen Bedeutung des symptomatischen Vorhofflimmerns als eigenständige Indikation, werden so erkrankte Patienten zunehmend auch alleinständig minimalinvasiv mit günstigem Risikoprofil therapiert (Cox, 2004; Gaynor et al., 2004; Matsutani et al., 2008; van Laar et al., 2017).

Prädiktoren des therapeutischen Erfolges sind die Transmuralität und Kontinuität der Ablationslinien und eine klinische Nachsorge der Patienten, die das atriale und kardiale Re-Remodeling unterstützen soll. Hierzu können additive therapeutische Targets die auf eine Reduktion des fibrotischen Umbaus und eine metabolische Rebalancierung des Myokards fokussieren eine wertvolle Ergänzung der bisherigen standardisierten antiarrhythmischen Therapie sein.

1.1.6. Pathophysiologie des Vorhofflimmerns

Atriales Remodeling

In der Literatur werden zwei elektrophysiologische Mechanismen beschrieben, die Vorhofflimmern auslösen: zum einen die fokale Aktivierung von Flimmerwellen, meist ausgehend von atrialem Gewebe im Bereich der Pulmonalvenen (Jais et al., 1997), zum anderen kreisende Erregungen (Reentry-Erregungen), die multifokal im Atrium entstehen und sich gegenseitig erhalten (Moe and Abildskov, 1959).

Das atriale Myokard reagiert auf das Flimmern mit verschiedenen Anpassungsmechanismen, die unter dem Begriff „Atriales Remodeling“ zusammengefasst werden. Diese Mechanismen verstärken sich wechselseitig im Sinne eines Circulus vitiosus: „Vorhofflimmern unterhält Vorhofflimmern“ (Wijffels et al., 1995). Remodeling Mechanismen greifen hierbei auf elektrischer, kontraktile und struktureller Ebene an (Allessie et al., 2002a).

Elektrisches Remodeling

Erste pathologische Veränderungen im Rahmen des Vorhofflimmerns während der Stunden bis Tage dauernden Initialphase der Erkrankung zeigen erniedrigte Aktionspotentiale mit verkürzter Refraktärzeit und daraus resultierender Tachykardie. Grundlage ist die Reduktion von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen (Heijman et al., 2016). Die Rekonstruktion in eine normale Refraktärzeit korreliert hierbei negativ mit der Dauer vorhergehender arrhythmischer Phasen (Hobbs et al., 2000). Diese als elektrisches Remodeling bezeichneten Veränderungen zeigen eine Progression im Laufe der Erkrankung. (Allessie et al., 2002a).

Während elektrisches Remodeling die Neogenese, nicht jedoch unbedingt den Erhalt des Vorhofflimmerns begünstigt, unterstützt die persistierende Reduktion der Refraktärzeit weitere Mechanismen des kontraktile und strukturellen Remodelings (Wijffels et al., 1995).

Kontraktiler Remodeling

Elektrisches und kontraktile Remodeling unterhalten sich gegenseitig durch die Reduktion von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen und dem daraus folgenden verminderten Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle (Leistad et al., 1996; Nattel, 1999). Die genauen Mechanismen des kontraktile Remodelings sind noch nicht vollständig geklärt.

Während elektrisches Remodeling auch nach lang anhaltendem Vorhofflimmern rasch reversibel zu sein scheint, verläuft die Erholung des kontraktile Apparates verzögert. Grund dafür ist am ehesten die durch Vorhofflimmern induzierte Myolyse und der nur langsame Wiederaufbau von Sarkomeren (Allessie et al., 2002a; Schotten et al., 2001). Die Reduktion der atrialen Kontraktionskraft kann zu einer Zunahme der myokardialen Compliance und folgend zunehmender Dilatation der Vorhöfe führen. Diese wiederum korreliert positiv mit der Persistenz von Flimmerwellen was wiederum als Stimulus für strukturelles Remodeling über eine Zunahme der Extrazellulärmatrix (ECM) fungiert (Allessie et al., 2002b; Heijman et al., 2016; Shi et al., 2001).

Strukturelles Remodeling und Atriale Fibrose

Der persistierende Dehnungsstimulus als hypertropher Reiz begünstigt die Bildung von ECM mit dem Resultat der atrialen Fibrose (Allessie et al., 2002b; Ausma et al., 1997). Das strukturelle Remodeling ist ein langsamer, sich über Monate hinziehender Prozess (Manning et al., 1994). Beim strukturellen atrialen Remodeling kommt es, neben den bereits beschriebenen fibrotischen Umbauprozessen mit Zunahme der ECM und atrialer Vergrößerung, auch zu Veränderungen der zellulären Ultrastruktur (z.B. Myolyse, Glykogen-Akkumulation) und zur Entstehung von Myofibroblasten (Chaldoupi et al., 2009; Gollob, 2008). In der vorliegenden Arbeit werden insbesondere Mechanismen analysiert, die über eine Akkumulation der ECM zur atrialen Fibrose führen.

Die Fibrose ist histologische Grundlage des strukturellen atrialen Remodelings (Yue et al., 2011a). Hämodynamisch kommt es bei Patienten mit ausgeprägter atrialer Fibrose, aufgrund der mechanischen Steifigkeit, des Vorhofes im Verlauf zu einer diastolischen und systolischen Herzinsuffizienz (Daniels et al., 2009).

Es gilt als gesichert, dass Vorhofflimmern eine Ursache für die Entstehung einer atrialen Fibrose sein kann. Umgekehrt ist die Fibrose an der Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern und dessen Progression von einem paroxysmalen zu einem permanenten Verlauf beteiligt und verschlechtert dessen Outcome (Burstein and Nattel, 2008; Hansen et al., 2017; Nattel, 2017; Nattel et al., 2008; Poudel et al., 2015). Bei Patienten mit Vorhofflimmern wurde im Vergleich zu Patienten mit Sinusrhythmus häufiger eine atriale Fibrose festgestellt (Boldt et al., 2004; Kostin et al., 2002). In Vorversuchen zu der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die rechtsatriale Fibrosierung bei Patienten mit permanentem oder paroxysmalen Vorhofflimmern nach erfolgreicher MAZE-Prozedur wesentlich geringer ist als bei Patienten, bei denen die Operation nicht erfolgreich war (Niemann et al., 2016) (Abbildung 1). Aus diesen Befunden leitet sich die Hypothese ab, dass die Ausprägung der rechtsatrialen Fibrose einen Einfluss auf den Erfolg von MAZE-Prozeduren haben könnte. Damit stellen Fibrose-assoziierte Faktoren, Signalkaskaden und Regulatoren potentielle Targets für eine Behandlungsoptimierung bei Vorhofflimmern dar.

Einleitung

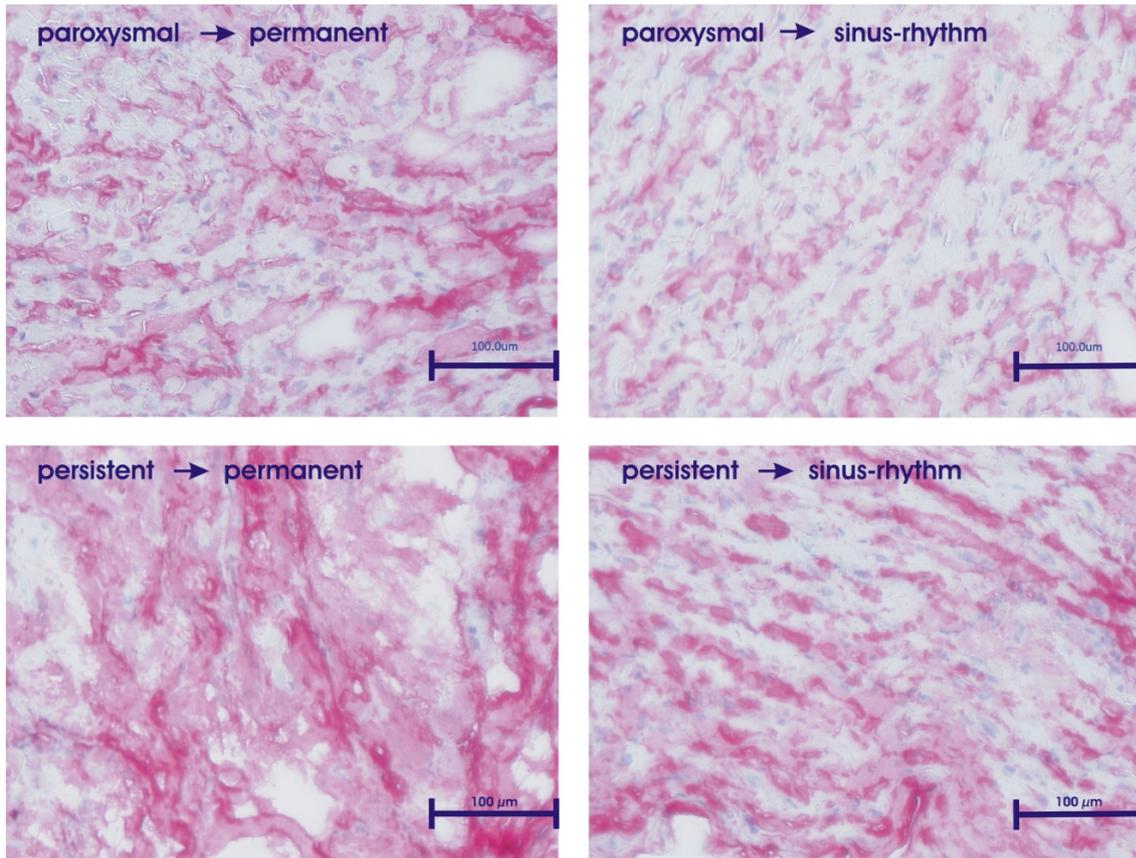


Abbildung 1: Fibrosierung von rechtsatrialem Gewebe nach Maze-Prozedur. Skalierung 100 μm . (Niemann et al., 2016)

Fibroblasten machen einen Anteil von etwa 75% aller kardialen Zellen aus (Camelliti et al., 2005; Carver et al., 1991). Es handelt sich um phänotypisch heterogene Zellen, die sich in Abhängigkeit vom Gewebetyp und von physiologischen Umständen unterscheiden (Souders et al., 2009).

In den letzten Jahren rückte die aktive Rolle kardialer Fibroblasten, für die kardiale Entwicklung und für pathologische Prozesse beim strukturellen kardialen Remodeling, in den Fokus der Forschung (Souders et al., 2009). Fibroblasten steuern die Proliferation, Migration, Myofibroblasten-Differenzierung, Produktion von ECM und Sekretion verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren (Souders et al., 2009; Travers et al., 2016). Fibroblasten können die atriale Reizweiterleitung und somit das elektrische kardiale Remodeling durch die übermäßige Produktion von ECM-Proteinen, die bei strukturellen Umbauprozessen myokardiale Muskelfaserbündel voneinander isolieren, direkt beeinflussen. Dabei entstehen lokal physikalische Barrieren der Reizweiterleitung (Camelliti et al., 2005; Carver et al., 1991). Die elektrische Reizweiterleitung kann auch durch die direkte Kopplung von elektrisch nicht-erregbaren Fibroblasten an Kardiomyozyten gestört werden (Yue et al., 2011a). Somit wird sowohl auf elektrischer als auch auf struktureller Ebene die Entstehung und Erhaltung von Vorhofflimmern durch Fibroblasten

bzw. Myofibroblasten (siehe Abschnitt Transdifferenzierung zu Myofibroblasten) begünstigt.

Extrazellulärmatrix

Die ECM wird durch Fibroblasten produziert und füllt den interzellulären Spalt aus. Ihre Hauptbestandteile sind die Grundsubstanz einerseits und ein Fasernetzwerk andererseits. Das Netzwerk von hauptsächlich kollagenen Fasern unterstützt die strukturelle und mechanische Stabilität aber auch die Elastizität (elastische Fasern) und Compliance im Herzen (Souders et al., 2009), indem es Zellen des Myokards verbindet, mechanische Signale überträgt und ein Gerüst für Myozyten und andere Zellen bildet. Darüber hinaus ist die ECM ein Zytokinreservoir und an der Signaltransduktion innerhalb der Gewebe beteiligt. Zusätzlich reguliert sie die Flüssigkeitsbewegung des Extrazellulärtraumes und moduliert die Aktivität vieler Wachstumsfaktoren (Daniels et al., 2009). Die Kollagene machen den Großteil der strukturellen ECM-Proteine aus (Iraqi et al., 2009). Daneben sind in der ECM auch adhäsive Proteine wie Fibronectin und Laminin, verschiedene Wachstumsfaktoren, Proteoglykane und weitere Glykoproteine enthalten (Bowers et al., 2010; Corda et al., 2000).

Im Rahmen des kardialen Remodelings entsteht ein profibrotisches Milieu, das zu einer Hyperfibrosierung des Myokards beiträgt (Nattel, 2017).

Das unter physiologischen Bedingungen bestehende Gleichgewicht aus Kollagenabbau und -aufbau ist unter pathologischen Umständen gestört (Daniels et al., 2009). Kollagene sind die vorherrschende Proteingruppe der ECM. Es existieren mindestens 28 verschiedene Kollagentypen, allein sechs davon im Myokard, mit unterschiedlichen Eigenschaften und Regulationsmechanismen (Chapman et al., 1990; Iruela-Arispe and Sage, 1991; Kitamura et al., 2001). Die Akkumulation von Kollagen-I sowie die Quervernetzung von Kollagenfasern ist charakteristisch für das kardiale Remodeling und die Entwicklung kardialer Fibrose. Kollagen-I und -III bilden zusammen über 90% des kollagenen Netzwerkes im Herzen (Nattel, 2017, ; Weber, 1989). Kollagen-I zeichnet sich durch seine hohe Zugfestigkeit aus, die dem kollagenen Netzwerk die nötige Stabilität verleiht (Linke et al., 1994). Kollagen-III besteht aus feinen, dehnbaren Fibrillen, die das strukturelle Netzwerk erhalten (Weber, 1989). Die Kollagensynthese wird auto- und parakrin durch Transforming growth factor- β (TGF- β) und Komponenten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) reguliert (Weber, 2004).

Fibronectin ist ein weiteres multifunktionelles Glykoprotein der ECM verschiedener Gewebe, spielt eine maßgebliche Rolle bei Zell-Matrix Interaktionen (Stenman and Vaheri,

1978) und ist an Zell-Migration, Fibroblasten-Differenzierung und dem Erhalt des kardialen Remodelings beteiligt (Graham et al., 2008; Hynes, 1985). Fibronektin bildet zusammen mit Laminin eine Brücke für die Kopplung von Myozyten an das Kollagen-Netzwerk (Daniels et al., 2009). Fibronektin wird sowohl von Fibroblasten als auch von Endothelzellen und Keratinozyten gebildet (Uitto et al., 1989). Als Reaktion auf mechanischen Stress, erhöht sich zunächst die Fibronektin- und anschließend die Kollagen-Biosynthese (Swynghedauw, 1999). Verschiedene Isoformen des Fibronektins mit ED-A oder ED-B Domänen entstehen durch alternatives Spleißen und begründen die jeweilige Substratspezifität (Corda et al., 2000). ED-A-Fibronektin ist für die Myofibroblasten-Aktivierung durch TGF- β unverzichtbar und steigert somit indirekt die Expression von α -smooth muscle actin (α -SMA) und Kollagen-I (Serini et al., 1998).

Transdifferenzierung zu Myofibroblasten

Unter physiologischen Bedingungen kommen im Myokard keine Myofibroblasten vor (Sun and Weber, 2000). Unter pathologischen Bedingungen jedoch sind sie die Hauptproduzenten der ECM und als solche erheblich für die Gewebefibrosierung verantwortlich (Calderone et al., 2006; Gabbiani, 2003a; Travers et al., 2016). Myofibroblasten entstehen durch die Transdifferenzierung von Fibroblasten. Die drei Hauptstimuli dieses Prozesses sind mechanischer Stress, sowie die TGF- β - und ED-A-Fibronektin-Sekretion (Gabbiani, 2003a; Serini et al., 1998).

Myofibroblasten enthalten im Gegensatz zu Fibroblasten einen kontraktile Apparat und zeichnen sich durch die Expression von α -SMA aus (Gabbiani, 2003a; Travers et al., 2016). Durch die exzessive Produktion von ECM und Kontraktion von Granulationsgewebe sind sie maßgeblich an Wundheilungsprozessen und an der kardialen Fibrosierung beteiligt (Gabbiani et al., 1972; Travers et al., 2016). Außerdem produzieren sie Wachstumsfaktoren und Zytokine, die wiederum Fibroblasten aktivieren (Yue et al., 2011a).

α -SMA gilt als wichtigster Marker dieser Transdifferenzierung (Gabbiani, 2003a). Durch kontraktile Proteine wie α -SMA können Myofibroblasten während Wundheilungsprozessen und reparativem Remodeling mechanische Spannung halten und einen schnellen Wundverschluss gewährleisten (Gabbiani, 2003b; Sun and Weber, 2003).

1.1.7. Signalgebung beim strukturellen Remodeling des Vorhofs

Transforming growth factor - β

Die pleiotropen Proteine der TGF- β Superfamilie fungieren u.a. als Downstream-Mediatoren von Angiotensin II und werden sowohl in Kardiomyozyten als auch in Fibroblasten exprimiert (Rosenkranz, 2004) (Schiller et al., 2004).

TGF- β reguliert eine Vielzahl von Zellfunktionen, die bei einer Dysregulation zur atrialen Fibrose und zum Vorhofflimmern führen (Schiller et al., 2004; Travers et al., 2016; Verheule et al., 2004). Die atriale TGF- β -Expression bei persistierendem Vorhofflimmern ist signifikant erhöht und korreliert positiv mit dem Fibrosegrad des untersuchten Myokards (Li et al., 2013a). TGF- β induziert die Proliferation und Transdifferenzierung kardialer Fibroblasten zu Myofibroblasten (Souders et al., 2009; Tomasek et al., 2002a) und stimuliert diese zur Produktion von α -SMA (Desmoulière et al., 1993). Weiter ist es in die Regulation der Bildung von ECM-Proteinen (Kollagen-I und -III, Fibronectin und Proteoglykane) durch Fibroblasten eingebunden (Heimer et al., 1995; Verrecchia and Mauviel, 2002) und führt über die Reduktion der Kollagenase-Produktion und Stimulation von Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) zu einem erniedrigten ECM-Abbau und einer exzessiven ECM-Akkumulation (Khan and Sheppard, 2006; van Rooij and Olson, 2009). Darüber hinaus steigert TGF- β seine eigene Expression in Myofibroblasten (Rosenkranz, 2004) und reguliert die CTGF-Expression (Nattel, 2017).

Connective tissue growth factor

Matrixzelluläre Proteine sind eine Gruppe von ECM-Proteinen, die Zell-Matrix-Interaktionen und zelluläre Funktionen modulieren, ohne selbst ein strukturelles Element der ECM zu sein. Typische Vertreter dieser Gruppe sind CNN-Proteine, wozu auch connective tissue growth factor (CTGF oder CNN2) gehört (Chuva de Sousa Lopes et al., 2004). CTGF ist ein komplexes Molekül mit multiplen Domänen, die an verschiedene Zellrezeptoren und ECM-Proteine (u.a. TGF- β) binden (Brigstock, 2010). CTGF reguliert die ECM-Hämostase (Daniels et al., 2009). Über die Modulation verschiedener Signale beeinflusst es die Zelladhäsion, skelettale Entwicklung (Ivkovic et al., 2003) und Angiogenese (Hall-Glenn et al., 2012; Kubota and Takigawa, 2006). Im Rahmen von pathologischen Zuständen spielt CTGF eine wichtige Rolle bei der Wundheilung und Fibrosierung von Geweben (Ihn, 2002). Die CTGF-Expression korreliert mit einer Vielzahl kardialer Erkrankungen, wie Myokardinfarkt, arterielle Hypertonie oder Herzinsuffizienz (Ahmed et al., 2005; Blom et al., 2002; Daniels et al., 2009; Dean et al., 2005; Koitabashi et al., 2007). CTGF ist an der Aktivierung von Fibroblasten zur Proliferation, Differenzierung und ECM-Produktion beteiligt (Daniels et al., 2009; Dorn et al., 2018; Zhang et al., 2004), für die

Weitergabe von TGF- β -Signalen in Fibroblasten verantwortlich (Chen et al., 2000; Dorn et al., 2018) und fördert durch die direkte Bindung von Fibronectin die Adhäsion von Fibroblasten an Fibronectin (Chen et al., 2004). Die CTGF-Expression wird durch mechanischen Stress und inflammatorische Prozesse, beispielsweise im Rahmen von kardialen Erkrankungen, reguliert (Ahmed et al., 2004; Chen et al., 2000; Schild and Trueb, 2002).

Alleinige CTGF-Überexpression in Abwesenheit co-stimulierender Signale wie TGF- β oder Fibronectin kann jedoch keine persistierende hepatische oder pulmonale Fibrose bei Menschen und Mäusen induzieren (Bonniaud et al., 2003; Tong et al., 2009).

Im Rahmen myokardialer Fibrose (Chuva de Sousa Lopes et al., 2004; Dorn et al., 2018) und in rechtsatrialen Proben bei permanentem Vorhofflimmern ist die CTGF-Expression signifikant erhöht (Li et al., 2013a). Im atrialen Myokard von Patienten mit Vorhofflimmern besteht eine positive Korrelation zwischen der TGF- β - und CTGF-Expression und dem Fibrosegrad des rechtatrialen Gewebes (Li et al., 2013a).

Die Fibrose im Rahmen des Remodelings bei Patienten mit kardialer Dysfunktion korreliert mit der Steigerung der myokardialen Expression von CTGF-messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) und der fibroblastären Expression von Kollagen-I-mRNA dieser Patienten (Koitabashi et al., 2007).

1.2. MicroRNAs

1.2.1. Definition

MicroRNAs sind etwa 22 Nukleotid kurze, nicht-kodierende Einzelstrang-RNA-Moleküle, die für die Regulation der Genexpression auf post-transkriptioneller Ebene von Bedeutung sind (Bartel, 2004). Die Bindung von microRNAs an die 3' nicht-translatierte Region (UTR) ihrer Ziel-mRNA führt über eine Translationshemmung oder den Abbau der Target-mRNA zu einer reduzierten Proteinbiosynthese ganzer Protein-Netzwerke (Bartel, 2004). Eine einzelne microRNA kann hunderte von Genen regulieren und umgekehrt kann ein Gen durch multiple microRNAs kontrolliert werden (Akerman and Mukherjee, 2013). Die Datenbank miRBase listet über 2600 verschiedene humane microRNA-Sequenzen, die über 60% aller proteinkodierenden Gene regulieren (Kozomara et al., 2019).

In den letzten Jahren konnte die Bedeutung von microRNAs für die Regulation physiologischer Funktionen (z.B. Proliferation, Differenzierung, Apoptose) in vielen Zellen des Körpers nachgewiesen werden (Wang, 2010).

Andererseits begünstigen microRNA-Dysregulationen pathologische Prozesse (Latronico and Condorelli, 2009). Eine Fehlexpression von microRNAs korreliert mit einer Vielzahl von Erkrankungen wie Karzinomerkrankungen (z.B. Bronchial-, Mamma- Pankreas-, Kolorektale- und Hepatozelluläre Karzinome) (Blenkiron and Miska, 2007), Alzheimer (Hugon and Paquet, 2008), Diabetes und kardiovaskulären Erkrankungen (Rooij et al., 2008a) (Catalucci et al., 2009).

1.2.2. Biogenese

Die Synthese von microRNAs erfolgt in mehreren Schritten im Nukleus und im Zytoplasma der Zelle. Viele microRNA-Sequenzen sind innerhalb von Introns proteinkodierender oder nicht-proteinkodierender Gene lokalisiert, können aber auch innerhalb von Exons liegen (Rodriguez et al., 2004). Etwa die Hälfte der microRNAs bilden polycistronische Verbände, deren primäre Transkripte mehrere microRNAs enthalten (Lagos-Quintana et al., 2001). Einige microRNAs werden von mehreren Genabschnitten kodiert (Lagos-Quintana et al., 2001). MicroRNA-Gene werden zum Großteil von der RNA-Polymerase II zu einem mehrere Kilobasen langen Primärtranskript prozessiert (primary microRNA; pri-microRNA), das über einen 3'-Poly-A-Schwanz und eine 5'-Methylguanidin-Kappe verfügt (Cai et al., 2004; Lee et al., 2004). Die pri-microRNA bildet eine charakteristische Schleifen- oder Haarnadel-Struktur, die die reife microRNA-Sequenz enthält. Durch einen Komplex aus dem RNase-II-Enzym Drosha und dem RNA-bindenden Kofaktor DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8) wird die pri-microRNA zu der etwa 60–100 Nukleotid großen, schleifenförmigen precursor-microRNA (pre-microRNA) prozessiert (Gregory et al., 2004; Lee et al., 2003). Im Anschluss erfolgt der Transport der pre-microRNA ins Zytoplasma (Bohnsack et al., 2004; Yi et al., 2003), wo das RNaseIII-Enzym Dicer unter Interaktion mit den Faktoren TRBP (TAR-RNA binding protein) und PACT (PKR activation protein) (Chendrimada et al., 2005; Lee et al., 2006), die Schleife zu einem microRNA-Duplexmolekül, mit einer Länge von etwa 22 Nukleotiden, zerschneidet. Der stabilere 3'-microRNA-Einzelstrang wird von dem komplementären Strang gelöst und als reife microRNA (Hutvagner et al., 2001; Latronico and Condorelli, 2009) in den sogenannten miRISC (RNA-induced-silencing-complex) oder MiRNA-Effektorkomplex eingeführt, der das Gen-Silencing vermittelt (Gregory et al., 2005; Rana, 2007). Neben den Komponenten Dicer und TRBP bildet das Ago2-Protein (Argonaute 2-Protein) das katalytische Kernstück des miRISC-Komplexes, indem es die Bindung von microRNA und mRNA ermöglicht (Gregory et al., 2005). In Abhängigkeit vom Grad der Komplementarität von microRNA und Ziel-mRNA, können microRNAs eine partielle oder komplette Translationshemmung oder eine vollständige Destruktion

Einleitung

der mRNA initiieren (Latronico and Condorelli, 2009; van Rooij and Olson, 2007). Einen Überblick über die microRNA-Biogenese gibt Abbildung 2.

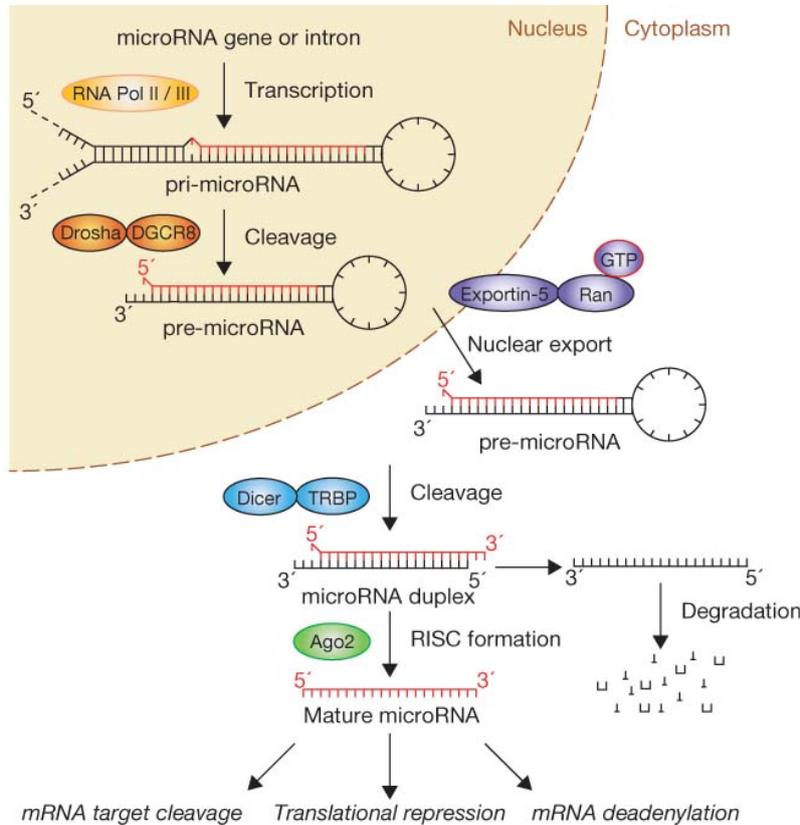


Abbildung 2: microRNA Biogenese (Mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group)

1.2.3. microRNAs bei kardialen Erkrankungen

Erste Daten zur Bedeutung von microRNAs im Herzen stammen aus dem Jahr 2006 (van Rooij et al., 2006). MicroRNAs sind in die Kontrolle von myokardialer Angiogenese, Metabolismus und Alterung involviert. Die microRNA Über- oder Unterexpression sowie die Blockade von microRNAs, bietet therapeutische Targets zur Beeinflussung kardialer und myokardialer Mechanismen und Pathologien (Boon et al., 2013; el Azzouzi et al., 2013; Wang et al., 2008). Einzelne microRNAs spielen eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung und Erhaltung der kardialen Hypertrophie (miR-208, miR-1 und miR-133a, miR-29a) (Carè et al., 2007; Roncarati et al., 2014; Rooij et al., 2007), der Herzinsuffizienz (miR-320a, miR-22, miR-423-5p und miR-92b) (Goren et al., 2012) sowie von Kardiomyopathien (miR-499) (Matkovich et al., 2012) und Myokardinfarkten (miR-133a, miR-1) (Liebtrau et al., 2013). Eine funktionelle Relevanz für die myokardiale Fibrose durch die Expression von microRNA-Clustern konnte nachgewiesen werden. Einige microRNAs können die Expression multipler Fibrose-assoziiierter Proteine direkt inhibieren

(Adam et al., 2012; Nattel, 2017; Rooij et al., 2008b; Thum et al., 2008). Andere induzieren die kardiale Fibrose sekundär über kardiale Dysfunktionen (Adam et al., 2012; Rooij et al., 2008b; Thum et al., 2008; Wijnen et al., 2013). MiR-21 und miR-29 gelten als profibrotische Schlüssel-microRNAs (Adam et al., 2012; Rooij et al., 2008b; Thum et al., 2008; Wijnen et al., 2013).

Im Rahmen der Pathogenese und des Erhaltes des Vorhofflimmerns sind profibrotische Signalwege unter der Regulation von microRNAs ebenfalls von Bedeutung (Nattel and Harada, 2014; Wakili et al., 2011).

In atrialem Gewebe von Patienten mit persistierendem Vorhofflimmern konnte eine deutliche Expressionssteigerung von miR-21, miR-23b und miR-199b detektiert werden (Nishi et al., 2013). Im Serum von Patienten mit persistierendem Vorhofflimmern zeigte sich ebenfalls eine Erhöhung von weiteren microRNAs (miR-99a-5p, miR-192-3p miR-214-3p und miR-342-5p, miR-21 und miR-150) (Galenko et al., 2019; Natsume et al., 2018). MicroRNAs können somit additive therapeutische Targets darstellen, um das peritherapeutische Re-Remodeling zu unterstützen und den therapeutischen Erfolg ablativer Maßnahmen zu sichern (Poudel et al., 2015; Thum, 2014).

1.2.4. miR-133a

Die muskelspezifische miR-133a gehört zu den am stärksten exprimierten microRNAs im Herzmuskelgewebe (Lagos-Quintana et al., 2002). Die Expression der miR-133a in Kardiomyozyten liegt um den Faktor 15 höher als in Fibroblasten, daher sprechen einige Autoren von einer Kardiomyozyten-spezifischen Expression (Duisters et al., 2009; Latronico and Condorelli, 2009). Während der Effekt der miR-133a in Kardiomyozyten gut untersucht ist, ist der Einfluss der miR-133a in kardialen Fibroblasten im Hinblick auf die Entstehung und Erhaltung der atrialen Fibrose und des Vorhofflimmerns weitgehend unbekannt.

Die Expression von miR-133a erfolgt als ein Teil eines bicistronischen Verbandes mit miR-1. Die beiden microRNAs werden gemeinsam zu einem primären Transkript umgeschrieben und anschließend zu unabhängigen, reifen microRNAs prozessiert (Chen et al., 2006). miR-1 und miR-133a gehören zu den verbreitetsten muskelspezifischen microRNAs. Sie erfüllen wichtige Funktionen bei der Modulation der skelettalen Muskelproliferation und Differenzierung in Myoblasten während der Kardiogenese. MiR-133a fördert die Myoblasten-Proliferation, indem es die mRNAs des Transkriptionsfaktors Serum-Response-Factor (SRF) und Cyclin D2 bindet (Chen et al., 2006).

miR-133a kommt in zwei Isoformen (miR-133a-1, miR-133a-2) vor. Beide spielen essentielle Rollen bei der Kardiogenese und kardialen Funktion (Li et al., 2018; Liu et al.,

Einleitung

2008). MiR-133a-1- und miR-133a-2 doppel-Knockouts führen bei Mäuseembryonen zu dünnwandigen Herzwänden und letalen Septumdefekten und bei überlebenden erwachsenen Mäusen zu dilatativen Kardiomyopathien mit exzessiver Fibrose. Dieses Phänomen konnte auf eine erhöhte Zellproliferation und ein hypertrophes Wachstum des Herzwes durch die fehlende Repression von miR-133a zurückgeführt werden (Liu et al., 2008).

Andererseits konnte die protektive Regulation durch eine Expressionssteigerung von miR-133a bei diversen Pathologien nachgewiesen werden (Matkovich et al., 2010). Die miR-133a Expression inhibiert kardiale Hypertrophie und reduziert hypertrophie- und infarktassoziierte kardiale Fibrose (Carè et al., 2007; Li et al., 2010; Xiao et al., 2019). Eine verminderte Expression wurde bei physiologischen und pathologischen Hypertrophien nachgewiesen. Im Serum von Patienten mit akutem Myokardinfarkt wurde eine erhöhte miR-133a-Expression detektiert, die als Marker für kardiomyozytäre Nekrose verstanden wird (Kuwabara et al., 2011). Die miR-133a-Überexpression führt bei oxydativem Stress zu einer CASP9 abhängigen Reduktion der Kardiomyozyten-Apoptose (Matkovich et al., 2010; Xu et al., 2007).

MicroRNA-133a scheint sowohl hinsichtlich der Regulation von elektrischem als auch strukturellem Remodelings von Bedeutung zu sein. Eine verminderte miR-133a-Expression verändert die Expression verschiedener Ionenkanäle (Chen et al., 2003; Luo et al., 2008, 2007; Xiao et al., 2008). Die dadurch entstehende Verkürzung des Aktionspotentials begünstigt das elektrische Remodeling und ist mit Arrhythmien assoziiert (Wang et al., 2011).

Einige Studien belegen den antifibrotischen Effekt von miR-133a durch die Regulation der Expression von CTGF, TGF- β und Kollagen Typ I (Duisters et al., 2009; Liu et al., 2008; Shan et al., 2009; Yu et al., 2019) und beschreiben eine funktionelle Relevanz für das atriale Remodeling (Shan et al., 2009; Yu et al., 2019).

Somit ergibt sich nicht nur eine Bedeutung von miR-133a als Biomarker, sondern darüber hinaus eine Bedeutung als therapeutisches Target für atrial-myokardiales Remodeling.

1.3. Fragestellung der Arbeit

Kardiovaskuläre Komplikationen von Vorhofflimmern gehen mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einher. Atriales Remodeling wird durch frühe elektrische Modulation und pro-fibrotische Signalkaskaden verstärkt. Die resultierende atriale Fibrose gilt als strukturelles Substrat für die Entwicklung und den Erhalt von Vorhofflimmern.

Die Rolle kardialer microRNAs, als wichtige Regulatoren der atrialen Fibrose, konnte in den vergangenen Jahren bestätigt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen die Expression der microRNA-133a und die von ihr regulierten, zu einer atrialen Fibrose führenden Signalwege in kardialen Fibroblasten identifiziert und hinsichtlich ihrer Nutzbarkeit als Biomarker sowie als therapeutisches Ziel bei Vorhofflimmern im Rahmen der chirurgischen Therapie untersucht werden.

Vor diesem Hintergrund liegt der Fokus der vorliegenden Arbeit auf folgenden Fragen:

1. Regulieren miR-133a-Signalwege die atriale Fibrose bei Vorhofflimmern?
2. Kann miR-133a als Biomarker genutzt werden?
3. Kann miR-133a als therapeutisches Target genutzt werden?

2. Materialien

2.1. Geräte

Gerät	Hersteller
Abzug Herasafe KS	Thermo Scientific, Langenselbold
Brutschrank BBD 6220 Heraeus	Thermo Scientific, Langenselbold
Brutschrank Sanyo CO2 Inkubator	Sanyo, Japan
Elektrophorese Netzgerät Consort EV261	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Elektrophoresekammern	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Feinwaage ALJ 160-4NM	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Feinwaage ScoutPro	Ohaus, Schweiz
Fusion Fx7 Detektionssystem	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Glasgeräte	Schott, Mainz
Inkubator	Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach
Kryotom Cryostat	SLEE, Mainz
Magnetrührer L-73	Kisker Biotech, Steinfurt
Micro Pulser	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mikroskop Keyence BZ 8000K	Keyence GmbH, Neu-Isenburg
Mikroskop Olympus CK2	Olympus, Hamburg
Mikroskop Olympus CKX41	Olympus, Hamburg
Mikroskop Olympus IX70	Olympus, Hamburg
Mikroskop TMS-F Typ 102	Nikon GmbH, Düsseldorf
Monitor Typ Observation Monitor	Philips Deutschland GmbH, Hamburg
Nano Drop® ND-1000	Peqlab Biotechnologie MgbH, Erlangen
Neubauer-Zählkammer	Fein-Optik, Bad Blankenburg
pH-Meter HI 223	Hannah Instruments GmbH, Hamburg
Präparationsbesteck	Aesculap, Tuttlingen
Precellys®24	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Rührer MR3001 Heidolph	Heidolph Instruments, Schwabach
Schüttler Termoshake	C. Gerhardt GmbH Co.KG, Königswinter
Thermoblock TRIO	Biometra GmbH, Göttingen
Thermocycler MX3000P	Stratagene Co., La Jolla, USA
Thermocycler T3	Biometra GmbH, Göttingen
Thermocycler T48	Biometra GmbH, Göttingen
Top-Mix 11118 Top-Mix 11118	Fisher Bioblock, Scientific, Schwerte
UV-Tisch	Schütt Labortechnik, Göttingen
Vortexer Heidolph REAX 2000	Heidolph Instruments, Schwabach
Vortexer MS1 Minishaker	IKA, Staufen im Breisgau
Wasserbad GFL®	Schütt Labortechnik, Göttingen
Zentrifuge 6-16K	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Zentrifuge Combi-Spin FVL-2400	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Scientific, Langenselbold
Zentrifuge Heraeus Pico 17	Thermo Scientific, Langenselbold
Zentrifuge Laborfuge 400	Thermo Scientific, Langenselbold
Zentrifuge Perfect Spin	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Zentrifuge Allegra25R	Beckman Coulter, Krefeld

2.2. Software und Onlinedatenbanken

Software / Website	Hersteller
analySIS	SIS Software GmbH, Leipzig
BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
CorelDraw Version 11.0	Corel GmbH, München
Diana	http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr
Fusion-CAPT™Software Version 15.0	Vilber Lourmat Deutschland GmbH
ImageJ 1.49	National Institutes of Health, Maryland, USA
Keyence BZ Analyzer Software	Keyence GmbH, Neu-Isenburg
miRBase	http://www.mirbase.org/
miRGate	http://mirgate.bioinfo.cnio.es/miRGate/
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Office2011/2016	Microsoft
Quantity One® Version 4.3.1	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thermocycler MX3000P Software 4.2	Agilent Tehnologies
SigmaPlot 10.0	Systat Software GmbH, Erkrath
SigmaStat 3.5	Systat Software GmbH, Erkrath
TargetScan	http://www.targetscan.org/vert_50/
Vector NTI Advance 9	Invitrogen Co., Carlsbach (USA)

2.3. Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
12-Well-Mikroplatten	Greiner, Frickenhausen
15 ml Röhrchen Typ Falcon	Becton Dickinson, Canaan, USA
50 ml Röhrchen Typ Cellstar®	Greiner, Frickenhausen
6-Well-Mikroplatten	Becton Dickinson, Canaan, USA
Antifect N Liquid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Deckgläser	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Königshofen
Handschuhe Vasco Nitril white	B. Braun, Melsungen
PCR Platten MultiRigit Ultra Plates	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen, diverse	Sarstedt AG & Co, Nürnbergrecht
Reaktionsgefäße (0,5-2 ml) Safe Seal Mikro Tube	Sarstedt AG & Co, Nürnbergrecht
Sterilium classic pure	Bode Chemie GmbH, Hamburg
SuperFrost® Plus	Thermo Fisher, Braunschweig
Tana Apesin AP100	Tana Chemie GmbH, Mainz
Zellkulturschalen Falcon	Becton Dickinson, Canaan, USA
Zellschaber	Greiner, Frickenhausen

2.4. Reagenzien

Substanz	Bezugsquelle
32% HCl	Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Aqua bidestillata	B. Braun, Melsungen
Azophloxin-Lösung	Merck, Darmstadt
Blasticidin S HCl	AG Scientific
Blasticidin solution	Invitrogen, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloroform, minimum 99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
D(+)-Glucose anhydrous	Fluka Chemie AG, Buchs (CH)
4',6'-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) (9 ng/ml)	Appllichem GmbH, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Direct Red 80 Sirius-Red	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Direkt Red 80	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium	GIBCO Invitrogen Corporation, Scotland (UK)
Desoxyribonukleinsäure-(DNA)-Ladder 50 bp	New England Biolabs, Ipswich, USA
Desoxyribonukleosidtriphosphate-(dNTP)-Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Austria)
Entellan®	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Riedel-deHaën, Seelze
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
FBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Austria)
First strand Reverse Transkriptase (RT)Puffer	Invitrogen
Formaldehyd 37%	Roth, Karlsruhe
Fungizone	GIBCO Invitrogen Corporation, Scotland (UK)
GelRed®	Biotinum
Gene Ruler® 1kb DNA Ladder	Fermentas
50bp Gene Ruler™ SM0371	Invitrogen, Karlsruhe
Glukose	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Glutamat	Merck, Darmstadt
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Hämalaun-Lösung	Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin nach Weigert Lösung A und B	Roth, Karlsruhe
Hefe-Extrakt	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
JetPrime®	Polyplus Transfection™
JetPrime® Buffer	Polyplus Transfection™
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Lichtgrün SF	Merck, Darmstadt
Luria-broth (LB) Agar	Roth, Karlsruhe
Luria-broth (LB) Medium	Roth, Karlsruhe

Materialien

Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
MnCl ₂	Invitrogen, Karlsruhe
MangoTaq™	Bioline
Natrium-Butyrat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natrium-Pyruvat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
OptiMem®	GIBCO Invitrogen Corporation, Scotland (UK)
Phosphate buffered Saline (PBS) Tablets	GIBCO Invitrogen Corporation, Scotland (UK)
Polyethylenamin (PEI)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	Biochrom KG, Berlin
Phosphowolframsäure-Orange G-Lösung	Merck, Darmstadt
Pikrinsäure	Fluka Chemie AG, Buchs (CH)
Poly-D-Lysin	Biochrom KG, Berlin
Polybrene	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Primer (diverse)	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsenzyme (diverse)	Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsenzyme (diverse)	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Roth, Karlsruhe
RNase Out	Invitrogen, Karlsruhe
RNase-Exitus Plus™	Applichem GmbH, Darmstadt
Salzsäure	Riedel-deHaën, Seelze
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Sodium-Pyruvat 100 nM	GIBCO Invitrogen Corporation, Scotland (UK)
Spectinomycin	Fluka Chemie AG, Buchs (CH)
Streptomycin	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Tissue-Tek O.C.T™ compound	Sakura
TRI-Reagent	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Universal qPCR Primer micro-RNA	Thermo Scientific, Langenselbold
Virusproduction Medium	Lonza
Xylol	Merck, Darmstadt

2.5. Kits

Produkt	Hersteller
BLOCK-iT™HiPerform™Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System with EmGFP	Invitrogen, Karlsruhe
BLOCK-iT™Pol II miR RNAi Expression Vector Kits	Invitrogen, Karlsruhe
Gel Extraktions Kit	Peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen
JetPrime®	Invitrogen, Karlsruhe
Ncode™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis and qRT-PCR Kits	Invitrogen, Karlsruhe
peqGold-Plasmid-Miniprep-Kit-I	Peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen
PlatinumSYBR®Green®qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen, Karlsruhe
Qiagen® Plasmid Midi Kit	QIAGEN, Hilden
TOPO® TA Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen, Karlsruhe
ViraPower™PackagingMix	Invitrogen, Karlsruhe

2.6. Escherichia coli (E. coli)

	Genotyp	Hersteller
Top 10	F-mcrAΔ(mrr-hs RMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen, Darmstadt
Stabl 3	F-mcrB mrr hsdS20 (rB-mB-) recA13 supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 (StrR) xyl5 λ-leu mtl1	Invitrogen, Darmstadt

2.7. Zelllinien

Zelllinie	Spezies
H9C2	human
HEK-293	human
HEK-293-FT	human
Kardiale Fibroblasten	human/Ratte

2.8. Primer
qPCR-Primer

Primername		Sequenz
Hsa-miR-133a	sense	TTT GGT CCC CTT CAA CCA GCT A
	antisense	Universal qPCR Primer micro-RNA (ThermoFisher)
COL1A1	sense	CCT GGT GAA TCT GGA CGT GA
	antisense	ACC CAC GAT CAC CAC TCT TG
COL3A1	sense	ACG GAA ACA CTG GTG GAC AG
	antisense	GAA GCT CGG CTG GAG AGA AG
CTGF	sense	GAC GAG CCC AAG GAC CAA AC
	antisense	CAC AGG TCT TGG AAC AGG CG
TGF- β	sense	ATT CCT GGC GTT ACC TTG G
	antisense	CCT GTA TTC CGT CTC CTT GG
Fibronectin-1	sense	CCT GGA ACT TCT ACC AGT GCG ACT CT
	antisense	CGT AGG CTG GTT CAG GCC TTC G
α -SMA	sense	CAG CTA TGT GGG GGA CGA AG
	antisense	CAA GGT CGG ATG CTC CTC TG
HPRT1	sense	TGA CCA GTC AAC AGG GGA CA
	antisense	TGC CTG ACC AAG GAA AGC AAA
U6 snRNA	sense	TGC TTC GGC AGC ACA TAT AC
	antisense	TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT
GAPDH	sense	CAT CAC CAT CTT CCA GGA GCG
	antisense	TGA CCT TGC CCA CAG CCT TG
18S	sense	GTT GGT GGA GCG ATT TGT CTG G
	antisense	AGG GCA GGG AGT TAA TCA ACG C

Klonierungsprimer

Primername		Sequenz
pre-miR-let-7a	sense	TGCTGTGGGATGAGGTAGTAGGTTGTATAGTTTTAGGGTCAC ACCCACCACTGGGAGATAACTATAACAATCTACTGTCTTTCTA
	antisense	CCTG TAGGAAAGACAGTAGATTGTATAGTTATCTCCAGTGG TGGGTGTGACCCTAAAACCTATAACAACCTACTACCTCATCCAC
miR-133a	sense	TGCTGTTTGGTCCCCTTCAACCAGCTGGTTTTGGCCACTGACTG ACCAGCTGGTAAGGGGACCAAA
	antisense	CCTG TTTGGTCCCCTT ACCAGCTG GTCAGTCAGTGCCAAAA C CAGCTGGTTGAAGGGGACCAAA C

2.9. Zusammensetzung von Puffern und Medien

Puffer

Tabelle 3: 1 x Tris-Borat-EDTA-(TBE)-Puffer

Substanz

89 mM Tris-HCl (pH=8)

89 mM Borsäure

2,5 mM EDTA (pH=8)

Tabelle 4: 1 x Tris-EDTA-(TE)-Puffer

Substanz

10 mM Tris-HCl (pH=8)

1 mM EDTA (pH=8)

Tabelle 5: Probenpuffer

Substanz

50% (v/v) 1 x TE-Puffer

50% (v/v) Glycerol

0,25% (w/v) Bromphenolblau

Tabelle 6: Mini-Präparation

Substanz

Puffer A

10 mM EDTA

50 mM Tris (pH=8)

10 mg/ml RNase A (10 mg/ml Stammlsg. = 1:100)

Puffer B

0,2 M NaOH

1% (w/v) SDS

H₂O steril

Puffer C

3 M Kaliumacetatlösung (pH=5,5)

H₂O steril

Materialien

Histologie

Tabelle 7: Bouin-Lösung

Substanz	Menge
Pikrinsäurelösung	750 ml
Formaldehyd (37%)	250 ml
Essigsäure 100%	50 ml

Tabelle 8: Sirius-Red-Lösung

Substanz	Menge
Sirius-Red	0,5 g
Pikrinsäurelösung	500 ml

Medien

Tabelle 9: LB-Medium

Substanz	Menge
Pepton	10 g
NaCl	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
Aqua bidest	ad 1000 ml
Ampicillin	1 ml

Tabelle 10: Low Salt LB Medium mit Blasticidin

Substanz	Menge
Trypton	2 g
NaCl	1 g
Hefe-Extrakt	1 g
Aqua bidest	ad 200 ml
Blasticidin	800 µl

Tabelle 11: DMEM komplettiert

Substanz
DMEM
Glucose 4,5 g/l
Natrium Pyruvat 1 mM
Glutamat 2 mM
Penicillin/Streptomycin 100 U/ml
Fungizone (bei Bedarf)

Materialien

Tabelle 12: DME-Medium für Fibroblasten

Substanz	Menge
DMEM komplett	25 ml
Ampicillin/Streptomycin	250 μ l
Fungizone	25 μ l

3. Methoden

3.1. Zellkultur und Transfektion

Die Kultivierung der Zelllinien H9C2 (human), HEK-293 (human), HEK-293-FT (human) und Kardiofibroblasten (human und Ratte) (American Type Culture Collection) erfolgte in komplettiertem DMEM.

Vor der Transfektion erfolgte eine Zellpassage in neue 60 x 15 mm Kulturschalen. Hierzu wurde das Kulturmedium aus der alten Kulturschale abgesaugt und die Zellen mit auf 37°C erwärmten PBS gewaschen. Der Zellrasen wurde mit einer 0,05% Trypsin-Lösung (5 min, 37 °C) vom Boden gelöst. Die gelösten Zellen wurden in ein 50 ml Röhrchen mit der doppelten Menge der zuvor eingesetzten Trypsin-Menge an erwärmtem Kulturmedium überführt, um die Trypsin-Reaktion zu stoppen. Anschließend wurde das Gemisch bei 1500 rpm 5 min zentrifugiert und das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert. Durch Inkubation mit Trypanblau wurde die Zellzahl und die Vitalität der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und in gewünschter Dichte in den neuen Schalen ausplattiert. Die Zellstimulation erfolgte 24 h nach dem Transfer. Zum Zeitpunkt der Transfektion waren die Kulturschalen zu 70–85% konfluent.

3.1.1. Transfektion mit PEI

H9C2- und HEK-293-Zellen wurden mit Hilfe des Polymers Polyethylenimin (PEI) transfiziert. Die Zellen wurden in serumfreiem Opti-MEM®-Medium inkubiert.

Der Transfektionsansatz bestand aus je 400 µl Opti-MEM®-Medium, 2 µg Plasmid-DNA und 8 µl PEI pro Vertiefung einer 6-Wellplatte. Entsprechende Kontrollen wurden mitgeführt.

Die Komplexe aus dem kationischen Polymer PEI und negativ geladener Plasmid-DNA werden durch Endozytose in die Zelle aufgenommen.

Nach 6 h Inkubation bei 37 °C wurde das serumfreie Medium durch komplettiertes DMEM ausgetauscht. Die folgende Transfektionszeit betrug 24 oder 48 h.

3.1.2. Transfektion mit JetPrime®

Die Transfektion von HEK-293-FT-Zellen und Fibroblasten erfolgte mit dem Transfektionsreagenz JetPrime® (Polyplus Transfection™) nach den Vorgaben des Herstellers.

Pro Vertiefung einer 6-Wellplatte wurden 150000–250000 Zellen in 200 µl komplettiertem DMEM aufgenommen. 200 µl JetPrime® Puffer wurde mit 2 µl Plasmid-DNA in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß versetzt, durch vortexen 10 sec gemischt und zentrifugiert. Anschließend wurden 4 µl JetPrime®-Reagenz hinzugefügt, der Ansatz 10 sec durch vortexen gemischt, zentrifugiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsmix wurde im Anschluss auf den Zellen verteilt und das DMEM nach 6 h im Brutschrank bei 37 °C ausgetauscht. Im Anschluss an die Zelltransfektion wurden die Zellen nach 24 bzw. 48 h geerntet.

Die Transfektionseffizienz (pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR-Plasmid) wurde 48 h nach Transfektion unter dem Fluoreszenzmikroskop quantifiziert. Transfizierte Zellen konnten durch die Fluoreszenz des EmGFP detektiert werden.

3.1.3. Zellzahlanalyse

Zur Untersuchung des Einflusses der miR-133a-Überexpression auf die Proliferation kardialer Fibroblasten wurde eine bekannte Anzahl (100.000 Zellen/well; n=12) kardialer Fibroblasten der Ratte kultiviert und 24 h nach einer Transfektion mit dem pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR-Plasmid mit dem Neubauer-Zellzähler quantifiziert. Die Zählungen wurden doppelt durchgeführt. Als Referenzwerte dienten die Zellzahlen von untransfizierten Zellen und mit Kontroll-Plasmiden transfizierten Zellen.

3.2. RNA/DNA-Analytik

3.2.1. Aufarbeitung von humanen rechtsatrialen Appendices

Rechtsatriale Vorhofohren, die routinemäßig unter Anschluss der Herz-Lungenmaschine an der Klinik für Herz- Kinderherz- und Gefäßchirurgie der Universitätsklinik Gießen abgesetzt wurden, konnten zu weiteren microRNA Analysen verwendet werden.

Hierzu wurden aus den Operationspräparaten unmittelbar nach der operativen Entnahme unter ständiger Kühlung (4 °C) myokardiale Trabekel ohne epikardiales Gewebe isoliert, in Röhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff eingelagert.

Je 30–50mg Herzgewebe wurden in gefrorenem Zustand zerkleinert und in 2 ml Schraubdeckelgefäße mit je einem Messlöffel Precellys®24 Keramikkügelchen der Stärke 1,4 mm (Peqlab) und 500µl TriFast® überführt. Anschließend wurde das Zellmaterial mit dem Homogenisator Precellys® 24 (Peqlab) lysiert und homogenisiert (6000 rpm– 2 x 20 Sekunden).

3.2.2. RNA-Isolation mit TriReagent®

Die RNA Isolation aus Zellen erfolgte mittels TriFast®. Hierzu wurde das Kulturmedium abgenommen und umgehend durch 500 µl TriFast® ersetzt. Die Zellysate wurden mit Hilfe von Zellschabern von den Platten abgelöst, in sterile 1,5 ml Röhrchen überführt und bei -80 °C eingefroren oder direkt für die RNA-Isolation eingesetzt.

Die Gesamt RNA-Isolierung wurde nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987) durchgeführt.

Es erfolgte die Phasentrennung mit 0,2 ml Chloroform je ml TriReagent und Zentrifugation bei 14000 rpm für 15 min bei 4 °C. Nach Überführung der die RNA enthaltende obere Phase in 1,5 ml Röhrchen wurde die RNA durch Zugabe von 250 µl Isopropanol präzipitiert. Nach erneutem Zentrifugieren für 30 min bei 14000 rpm und 4 °C wurde das RNA-Pellet mit 75%-igem Ethanol gewaschen, in 50-80µl DEPC-Wasser gelöst und bei -80 °C eingefroren. Zur Qualitätskontrolle wurde am folgenden Tag eine Gelelektrophorese in einem 1%-igen (w/v) Agarosegel durchgeführt. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (Nanodrop®) und die gewünschte Konzentration von 500 ng/8µl durch Verdünnung mit DEPC-Wasser eingestellt.

3.2.3. Poly-A-Tailing

Eine direkte Amplifikation von RNA über die Polymerase chain reaction (PCR) ist nicht möglich, da bei der Methode DNA-abhängige Polymerasen verwendet werden. Daher muss die RNA durch das Enzym Reverse Transkriptase zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden.

Die geringe Größe von microRNAs und das Fehlen eines Poly-A-Schwanzes macht es zudem notwendig, zuvor durch eine Polyadenylierungsreaktion eine Bindungsstelle für die Oligo-(Desoxythymidin)-Primer zu schaffen. Dieses „Poly-A-Tailing“ und die reverse Transkription wurde unter Verwendung des NCode™miRNA First-Strand cDNA Synthesis und quantitative Real-Time-(qRT)-PCR-Kits (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Zunächst wurde bei Raumtemperatur ein Mastermix hergestellt (Tabelle 13).

8 µl der RNA-Lösung wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und mit je 17 µl des Mastermix versetzt, kurz zentrifugiert und bei 37°C 15 min inkubiert.

Methoden

Tabelle 13: Zusammensetzung Poly-A-Tailing-Mastermix (1 x)

Substanz	Menge (μl)
RNA	8 (500 ng)
5 x microRNA Reaction Buffer	2,5
25 nM MnCl ₂	1,25
ATP (1:10 verdünnt mit 1 mM Tris)	0,5
Poly-A-Polymerase	0,25 ml
DEPC	ad 12,5

3.2.4. Reverse Transkription

Im Anschluss an die Polyadenylierung wurde die cDNA synthetisiert. Zunächst erfolgte die Aufschmelzung von Sekundärstrukturen der cDNA und das Primer-Annealing. Hierzu wurde von jeder Probe ein Reaktionsmix I hergestellt (Tabelle 14). Bei 65 °C wurde die cDNA zunächst 5 min inkubiert und anschließend für 1 min auf Eis gestellt.

Tabelle 14: Zusammensetzung RT Reaktionsmix I (1x)

Substanz	Menge (μl)
Polyadenylierte microRNA	4
Annealing Buffer	1
Universal RT Primer (25 mM)	3

Anschließend wurden die Ansätze mit Reaktionsansatz II versetzt (Tabelle 15), durch Pipettieren gut gemischt, bei 25 °C für 10 min zentrifugiert und bei 37°C für 60 min im Thermocycler inkubiert. Um die Enzymaktivität zu stoppen, folgte eine fünfminütige Inkubation bei 95 °C. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C gekühlt.

Tabelle 15: Zusammensetzung RT-Reaktionsmix II (1x)

Substanz	Menge (μl)
First Strand Puffer	5
dNTP-Mix (12,5 mM)	1
Random Primer (1:100)	3
DTT	2,5
RNase Inhibitor	0,25
M-MLV RT	0,25
DEPC H ₂ O	5

Die cDNA wurde als Template für die Amplifikation von Zielgenen mit der PCR eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

3.2.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Durch den Einsatz spezifischer Primer lassen sich durch die PCR definierte Genabschnitte amplifizieren.

Qualitätskontrolle durch PCR

Zur Qualitätskontrolle der cDNA wurde zunächst eine Amplifikation der 18S-ribosomalen-(r)-RNA, der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT1) durch semiquantitative PCR vorgenommen. Diese Housekeeping-Gene dienen aufgrund ihrer konstanten Expression als endogene Referenz (Jansohn et al., 2012, p. 163).

Nach Herstellung und Durchmischung des PCR-Ansatzes wurde er in einen Thermocycler überführt (Tabelle 16).

Tabelle 16: Zusammensetzung PCR-Mastermix (1 x)

Substanz	Menge (µl)
10 x Taq-Polymerase Puffer	5
dNTP Mix (100 mM)	2
MgCl ₂ (50 mM)	3
Sense Primer	0,5
Antisense Primer	0,5
cDNA	2
steriles H ₂ O	11,75
Mango-Taq-Polymerase	0,25

Die Reaktion im Thermocycler startete mit zwei Denaturierungsschritten zur Trennung der komplementären DNA-Stränge, gefolgt vom Annealing des Primers und der Elongation durch die Mango-Taq-Polymerase. Für die Amplifikation der 18S-rRNA wurden 11 Zyklen, für die GAPDH-Amplifikation 25 Zyklen und für die HPRT1-Amplifikation 30 Zyklen durchgeführt. Die genauen Reaktionsbedingungen sind Tabelle 17 zu entnehmen.

Tabelle 17: Reaktionsbedingungen PCR

Schritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	90 °C	2 min
Denaturierung	95 °C	30 sec
Annealing	60 °C	30 sec
Elongation	72 °C	2 sec
Kühlung	4 °C	

Je 25 µl PCR-Produkt wurden mit 5 µl Trypanblau-Puffer versetzt und mittels Gelelektrophorese analysiert. Ein gleichmäßiges Signal der DNA-Fragmente im Agarosegel gewährleistete eine gute Vergleichbarkeit und Qualität der cDNA. Diese wurde im Anschluss als Template in die qRT-PCR eingesetzt.

Quantitative Real-Time PCR

Die Quantifizierung der Zielsequenzen erfolgte durch die qRT-PCR. Mit dieser Methode ist sowohl eine Amplifikation als auch eine Bestimmung der Ausgangsmenge einzelner cDNAs möglich. Das Fluoreszenzsignal des DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffs (SYBR® Green) steigt direkt proportional zur Zunahme der zu amplifizierenden cDNA. Das Signal wird nach jedem Zyklus gemessen und graphisch als Amplifikationskurve dargestellt (Jansohn et al., 2012, p. 161).

Da der Fluoreszenzfarbstoff nicht zwischen verschiedenen PCR-Produkten unterscheiden kann, und so auch beispielsweise Primer-Dimere markiert, erfolgte nach der qRT-PCR eine Schmelzkurvenanalyse mit dem Referenz-Farbstoff ROX™.

Verwendet wurde der qPCR-Mastermix Platinum®SYBR®Green qPCR SuperMIX (Invitrogen) und der Real-Time ThermoCycler MX3000P Multiplex Quantitative PCR-System (Stratagene) mit der zugehörigen MxPro-qPCR-Software Version 4.2.

Für den qPCR-Reaktionsmix wurden 24 µl Mix zu 1 µl cDNA, Plasmid-Negativkontrolle oder Aqua bidest (no template control, NTC) in eine 96-well Platte pipettiert. Der komplette Reaktionsansatz ist Tabelle 18 zu entnehmen.

Parallel wurde für jede Probe die Menge an U6snRNA, GAPDH, oder HPRT1 als endogene Referenz quantifiziert, deren Expression konstant sein sollte. Das Verhältnis aus den Cycle-threshold-(Ct)-Werten der microRNA- bzw. Zielgene und den Ct-Werten der Housekeeping-Gene ermöglichte eine relative Quantifizierung der microRNA (Jansohn et al., 2012, p. 161).

Die genauen Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 19 aufgeführt. Die durchschnittliche Zyklenzahl betrug 40 Zyklen.

Tabelle 18: Zusammensetzung qPCR-Mastermix

Substanz	Menge (µl)
Mastermix	12,5
DEPC-H ₂ O	9
Sense Primer (10 mM)	1
Universal qPCR Primer (10 mM)	1
ROX™	0,5
cDNA	1

Tabelle 19: Reaktionsbedingungen qPCR

Schritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	95 °C	10 min
Denaturierung	95 °C	30 sec
Annealing	60 °C	30 sec
Elongation	72 °C	30 sec
Kühlung	4 °C	

3.2.6. Gelelektrophorese

Zur Detektion von DNA- und RNA-Fragmenten wurden diese elektrophoretisch entsprechend ihrer Größe in einem 1% (w/v) Agarosegel mit GelRed™ (Biotinum) aufgetrennt. GelRed™ fluoresziert nach Anregung mit Ultraviolettem-(UV)-Licht. Die Agarose wurde in 1% w/v 1 x Tris-Borat-EDTA-(TBE)-Puffer durch Erhitzen gelöst. Nach Abkühlung auf etwa 55 °C wurde das GelRed™ (1:50000) hinzugefügt. Das in einem Gelträger erstarrte Agarosegel wurde in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die Geltaschen wurden mit den mit Probenpuffer versetzten Proben und einem Marker beladen. Je nach Größe des Gelträgers wurde eine Gleichspannung von 80-160 Volt angelegt. Als Marker für die Bestimmung von DNA-Fragmenten bis 1000bp diente die Gene Ruler™ 1 kb DNA-Leiter (Fermentas) für kleinere Fragmente wurde die 50bp Gene Ruler™ SM0371 DNA-Leiter (Invitrogen) genutzt. Die Analyse der Banden erfolgte mit dem Detektionssystem Fusion Fx7 (PepqLab) und der zugehörigen Fusion-Capt™ Software (Vilber Lourmat).

3.2.7. Klonierung (Generierung und Isolation von pre-microRNA-Plasmiden)

Für die Testung des Expressionsniveaus spezifischer microRNAs wurde das BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit (Invitrogen) zur Generierung spezifischer pre-miR-Plasmide verwendet.

Einzelsträngige Oligonukleotide (ss-Oligos) mit der pre-miR-133a-Zielsequenz wurden zu doppelsträngigen Oligonukleotiden (ds-Oligos) annealt und in den pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR-Vektor (Invitrogen) kloniert.

Das pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR-133a-Plasmid enthält den humanen Cytomegalie-Virus-(CMV)-Promotor, der in den meisten Säugetierzellen aktiv ist und von der RNA-Polymerase II erkannt wird. Außerdem verfügt er über ein Spectinomycin- und Blasticidin-Resistenzgen (Vektorkarte siehe Abbildung 3). Die pre-microRNA-Sequenz (zwischen Base 1519 und 1578), zwei beidseits angrenzende miR-155-flanking Regionen (5' miR flanking Region zwischen Base 1492 und Base 1518 und 3' miR flanking Region zwischen Base 1579 und 1623), zwei Rekombinationsverbindungsstellen, sowie eine Emerald Green Fluorescent Protein-(EmGFP)-kodierende Sequenz als Reporter gen werden als pre-microRNA-Expressionskassette bezeichnet.

Als Negativ-Kontrolle wurde das vom Hersteller mitgelieferte pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR-neg-control-Plasmid verwendet, dessen Insert in reife microRNA prozessiert werden kann, die keine Zielgene besitzt.

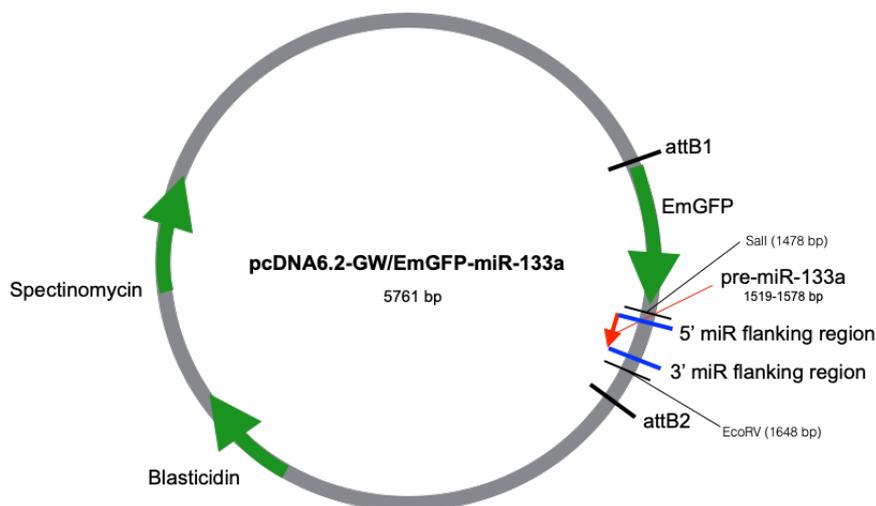


Abbildung 3: Vektorkarte pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR-133a

Design komplementärer Einzelstrang-Oligonukleotide

Zunächst wurden zwei komplementäre ss-Oligos nach Herstellervorgaben hergestellt.

Die Top-Oligo-Sequenzen enthielten folgende Elemente (5' → 3')

1. 5' TGCT-Überhang komplementär zum vier Nukleotidüberhang des Vektors
2. Reife microRNA-Sequenz der Ziel-microRNA (etwa 21 Nukleotide)
3. GTTTTGGCCACTGACTGAC Spacer Sequenz, die den Terminal-Loop formt
4. Nucleotide 1–8 (5' → 3') der Sense-Zielsequenz
5. Nucleotide 11–21 (5' → 3') der Sense-Zielsequenz

Die Bottom-Oligo-Sequenz wurde wie folgt generiert

1. 5' CCTG-Überhang anstelle des 5' TGCT-Überhangs des Top-Stranges
2. reverse komplementäre Sequenz des Top-Stranges, jedoch ohne den 5' TGCT-Überhang

Generierung von Doppelstrang-Oligonukleotiden

Zur Generierung ds-Oligos durch Annealing der Einzelstränge wurde bei Raumtemperatur ein Reaktionsansatz hergestellt (Tabelle 20).

Tabelle 20: Reaktionsmix zur Generierung doppelsträngiger Oligonukleotide

Substanz	Menge (µl)
200 mM Top-Strang-Oligo	5
200 mM Bottom-Strang-Oligo	5
10 x Oligo Annealing Puffer	2
DEPC H ₂ O	8

Der Reaktionsmix wurde bei 95 °C 4 min inkubiert, im Anschluss 5–10 min auf Raumtemperatur abgekühlt und 5 sec zentrifugiert. 1 µl der 50 µM ds-Oligo-Lösung wurde mit DEPC-Wasser auf 500 nM verdünnt. Anschließend folgte ein zweiter Verdünnungsschritt auf die Endkonzentration von 10 nM in 1 x Oligo-Annealing Puffer.

Klonierung

Die generierten ds-Oligos wurden in den linearisierten pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR-Vektor mit Hilfe des Enzyms Ligase kloniert. Die Zusammensetzung des Ligationsansatzes ist in Tabelle 21 aufgeführt.

Tabelle 21: Zusammensetzung Ligationsansatz

Substanz	Menge (µl)
5 x Ligationspuffer	2
pcDNA®6.2-GW/EmGFP-miR (5 ng/ml) linearisiert	1
ds-Oligos (10 nM)	2
DEPC H ₂ O	4,5
T4 DNA Ligase	0,5

Der Ligationsmix wurde 5 min bei Raumtemperatur und anschließend 1 h bei 22°C und 20 min bei 65°C (Inaktivierung der Ligase) inkubiert.

3.2.8. Transformation

Die Transformation der Plasmide in elektrokompetente Top 10 E.coli Bakterien wurde durch Elektroporation vorgenommen. Die Negative-Control-Plasmide wurden im Verhältnis 1:10 mit LB-Medium verdünnt; Plasmide mit pre-microRNA-Insert wurden unverdünnt verwendet.

Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. 30-60 µl der Bakterien wurden mit 1 µl Ligationsansatz in einem 0,5 ml Röhrchen gemischt und für 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert und der Impuls ausgelöst (1,85 kV bei 200 Ω und 25 µF), wodurch einige Bakterien die Plasmide aufnahmen. Die Suspension wurde direkt im Anschluss mit 250 µl LB-Medium aufgefüllt, resuspendiert, in ein Reaktionsgefäß überführt und eine Stunde bei 37 °C im Zellschüttler inkubiert.

100–150 µl der transformierten Zellen wurden auf LB-Agarplatten oder Low Salt Agarplatten, die mit einem Selektionsantibiotikum versetzt waren (Blasticidin (1:250), Kanamycin (1:1000) oder Ampicillin (1:1000) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

3.2.9. Plasmidpräparation (Mini)

Abhängig vom verwendeten Plasmid wurde am Tag nach der Transformation je 4 ml Low Salt-Medium mit Blasticidin (1:250) bzw. 5 ml LB-Medium mit Kanamycin (1:1000) in einem 15 ml Röhrchen versetzt. Das vorbereitete Medium wurde mit einer über Nacht auf einer Agarplatte gewachsenen Bakterienkolonie beimpft und bei 37 °C über Nacht im Rotationsschüttler inkubiert.

2 ml der Übernachtskultur wurden zunächst bei 13000 rpm 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Pellets wurden durch Vortexen in 200 µl Puffer A (Tabelle 6) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit 200 µl Puffer B (Tabelle 6) lysiert. Zur

Methoden

Neutralisation der Reaktion wurde das Lysat mit 200 µl Puffer C (Tabelle 6) gemischt und im Anschluss 10 min bei 14000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue 1,5 ml Röhren überführt und im Verhältnis von 1:1 mit Isopropanol gemischt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 30 min bei 14000 rpm wurden die Pellets mit 70% Ethanol unter Zentrifugieren für 1 min gewaschen. Nach dem Trockenzentrifugieren der Pellets wurden sie in einer geeigneten Menge auf 50 °C erwärmtem, sterilem Wasser aufgenommen.

Konnte das gewünschte DNA-Fragment in den präparierten Plasmiden im Restriktionsverdau nachgewiesen werden, erfolgte eine erneute Plasmidpräparation unter Verwendung der Zentrifugationssäulentechnik mit Silikatmembran nach dem Protokoll des Plasmid Mini-Kits der Firma Peqlab unter Elimination der bakteriellen Endotoxine.

Je 2 ml der Übernachtskulturen wurden in 2 ml Eppendorfgefäßen eine min lang bei 13000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde in 200 µl Lösung I/RNase A resuspendiert und mit 200 µl Lösung II/Lysepuffer versetzt, bis ein klares Lysat entstand. Dann wurden 280 µl Lösung III/Neutralisationspuffer hinzu pipettiert, was zur Ausflockung der Lösung führte. Nach 10 min Zentrifugation, bei der Proteine, Zelltrümmer und bakterielle genomische DNA abzentrifugiert wurden, wurde der Überstand mit der Plasmid-DNA auf die Präparationssäule mit Silikatmembran in 2 ml Röhren überführt und 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 500 µl HB-Puffer erneut für 1 min zentrifugiert. Zum Schluss wurde das Pellet 2 x mit 600 µl Waschpuffer gewaschen, trocken zentrifugiert und in einer geeigneten Menge auf 50 °C aufgewärmtem, sterilem Wasser eluiert.

3.2.10. Restriktionsanalyse isolierter Plasmide

Die Überprüfung der Integration des Inserts in den Vektor erfolgte durch eine Restriktionsanalyse der isolierten Plasmid-DNA aus den Mini-Präparationen. Die Zusammensetzung des Restriktionsansatzes zeigt Tabelle 22.

Als Negativ-Kontrolle diente ein Ansatz ohne Restriktionsenzym.

Tabelle 22: Zusammensetzung Restriktionsansatz

Substanz	Menge (µl)
Plasmid DNA	2
Restriktionsenzym	0,1
Restriktionspuffer	5
steriles H ₂ O	ad 20

Der Ansatz wurde bei 37 °C 1 h inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl Trypanblau-Puffer wurde eine Agarosegel-Analyse (1%-iges Agarosegel mit GelRed™) durchgeführt, um die Bakterienklone mit den erfolgreich in das Plasmid integrierten Inserts anhand der Fragmentgröße der DNA-Fragmente über einen Vergleich mit einem DNA-Größenmarker zu identifizieren. Zur Auswertung der Gele wurde das Detektionssystem Fusion Fx7 (Peqlab) und die Fusion-Capt™ Software (Vilber Lourmat) verwendet.

3.2.11. Sequenzierung

Konnte das gewünschte pre-micro-RNA-Insert im Restriktionsverdau nachgewiesen werden, erfolgte zur Kontrolle die Sequenzierung der Plasmid-DNA. 5 µl verdünnte Plasmid-DNA mit einer Konzentration von 80 ng/µl Plasmid-DNA wurden mit 5 µl microRNA-Reverse Primer (Invitrogen) versetzt. Die Sequenzierungsreaktion wurde extern von dem Sequenzierungslabor GATC-Biotech, Konstanz, mit der Methode nach Sanger durchgeführt. Die ermittelten DNA-Sequenzen wurden mit bekannten microRNA-Zielsequenzen über Onlinedatenbanken abgeglichen (BLAST®).

3.2.12. Plasmidpräparation (Midi)

Auf der Basis der Sequenzdaten wurden Bakterienklone, die das gewünschte Insert ohne Mutationen enthielten, verwendet, um eine größere Menge Plasmid-DNA zu gewinnen. Dazu wurde eine alkalische Lyse mit anschließender chromatographischer Aufreinigung über Anionenaustauscher-Säulen (Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen) benutzt. Ein Zellklon (bzw. 20 µl der Übernachtskultur aus der Mini-Präparation) wurde in 200 ml LB oder LB-Low-Salt Medium mit 200 µl Selektionsantibiotikum 16 h auf dem Rotationschüttler bei 37 °C inkubiert. 100 ml dieser Übernachtskultur wurden für die Midi-Präparation nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Das Verfahren hat laut Hersteller einen hohen Reinigungseffekt in Bezug auf Endotoxine.

Die isolierte Plasmid-DNA wurde in einem angemessenen Volumen sterilem Wasser gelöst (200–400 µl, je nach Pelletgröße), die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (NanoDrop®) und die Plasmide bei -20 °C gelagert.

3.3. Virusexperimente

Die Virusexperimente wurden unter den geltenden Richtlinien und Sicherheitsmaßnahmen beim Umgang mit Organismen der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt.

3.3.1. Generierung lentiviraler Vektoren

Zur Herstellung lentiviraler Vektoren wurde die Gateway®-Technologie unter Verwendung des BLOCK-iT™HiPerform™Lentiviral-Pol-II-miR-RNAi-Expression-System with EmGFP-Kits (Invitrogen) genutzt. Im Vorfeld wurden die gewünschten pre-microRNA-Sequenzen unter Verwendung des iT™Pol-II-miR-RNAi-Expression-Vector-Kits (Invitrogen) in den pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR-Vektor (Invitrogen) kloniert.

Linearisierung des pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR-Plasmids

Zunächst wurde das pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR-Plasmid durch das Restriktionsenzym Eag I linearisiert (Tabelle 23).

Tabelle 23: Zusammensetzung des Restriktionsansatzes zur Vektorlinearisierung

Substanz	Menge (µl)
Plasmid-DNA	2
Restriktionsenzym	je 1
Restriktionspuffer	4
steriles H ₂ O	ad 40

Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Zugabe des Restriktionsenzym. Der Ansatz wurde bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden die Proben mit Blaupuffer versetzt, auf ein Agarosegel aufgetragen und die DNA-Fragmente gelelektrophoretisch getrennt. Die linearisierten Plasmide, die durch das GelRed™ (Biotinum) im Agarosegel unter einer UV-Lampe sichtbar waren, wurden sauber mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Röhrchen überführt. Die Aufreinigung und Elution der DNA-Fragmente erfolgte mit einem PeqGOLD-Gel-Extraction-Kit (Peqlab) nach Herstellerangaben. Die einzelnen Schritte sind Tabelle 24 zu entnehmen.

Methoden

Tabelle 24: Protokoll PeqGOLD-Gel-Extraction-Kit, Gel-Extraktion linearisierter Plasmide

Arbeitsschritt	
1. Aufreinigung	Gelstück wiegen und das gleiche Volumen XP2-Puffer hinzufügen Inkubation bei 55–65 °C für ca. 7 min Alle 2-3 min schütteln und vortexen bis sich das Agarosegel gelöst hat
2. Bindung der DNA	10 ml 5 M Na-Acetat-Lösung hinzugeben, Pufferfarbe muss hellgelb sein Gesamte Probe auf Hi Band® DNA-Säule laden
3. Waschen	1 min bei 10000 x g zentrifugieren Einmal Waschen mit 600 µl SPW-Puffer 2-3 min inkubieren 1 min bei 10000 x g zentrifugieren
4. Trockenzentrifugieren	1 min bei 10000 x g
5. Elution	10–20 ml warmes H ₂ O direkt auf die Matrix geben 1 min bei 5000 x g zentrifugieren
6. Messung der DNA	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

BP-Rekombination

Das pre-microRNA-Insert kann nicht direkt vom pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR-Vektor auf den pLenti6.4/R4R2/V5-DEST-Vektor übertragen werden. Der Grund sind speziell konstruierte, unterschiedliche, att-Rekombinationssequenzen an beiden Enden des Inserts. Diese Sequenzen sichern eine seitenspezifische Rekombination und somit den korrekten Leserahmen der Vektoren.

Zunächst wurde durch das Enzym BP-Clonase-II die pre-microRNA-Expressionskassette (bestehend aus der pre-microRNA-Zielsequenz, zwei flankierenden Regionen, sowie der EmGFP-kodierende Sequenz) des pcDNA6.2™-GW-EmGFP-miR-Vektors (attB-Substrat) durch das im pDONR™221-Vektor (attP-Substrat) enthaltene ccdB-Gen ausgetauscht (Abbildung 4).

Das Genprodukt des ccdB-Gens wirkt toxisch auf die verwendeten Bakterienstämme und sorgt nach der Transformation dafür, dass nur die Bakterien überleben, die das erfolgreich rekombinierte Plasmid enthalten. Der pDONR™221-Vektor enthält außerdem eine Kanamycin-Resistenzgen für eine Selektion in E.coli Zellen.

Der aus der Rekombination hervorgehende pENTR™221-Eingangsklon (attL-Substrat), fortan als pENTR™221/Em-GFP-miR bezeichnet, enthält die pre-microRNA-Expressionskassette, das Kanamycin-Resistenzgen und die EmGFP-Sequenz.



Die eluierte Plasmid-DNA wurde mit 9 μl TE-Puffer, 0,5 μl pDONRTM221 und 1 μl Enzymmix versetzt und über Nacht bei 25 °C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 1 μl Protein K, zur Erhöhung der Rekombinationseffizienz und die Inkubation für 20 min.

Transformation und Plasmidisolierung von pENTRTM221

Im Anschluss an die BP-Rekombination folgte die Transformation von pENTRTM221/EmGFP-miR in kompetente Top 10 E. coli Zellen mittels Elektroporation.

Zur Plasmidisolierung schloss sich eine Mini-Präparation mit anschließender Restriktionsanalyse an. Genutzt wurde das MINI-Präparationskit (Peqlab) nach Herstellerangaben. Als Selektionsantibiotikum diente Kanamycin (1:1000 verdünnt mit LB-Medium).

LR-Rekombination

Nach der Herstellung des pENTRTM221/EmGFP-miR-Eingangsvektors, wurde die LR-Rekombination zwischen pENTRTM221/EmGFP-miR (attL-Substrat), pENTRTM5'/CMV (attL- und attR-Substrat) und dem pLenti6.4/R4R2/V5-DEST-Vektor (attR-Substrat) vollzogen. Der Reaktionsansatz ist Tabelle 25 zu entnehmen.

Ziel dieses Schrittes ist:

1. die Übertragung der EmGFP-pre-microRNA-Expressionskassette aus pENTRTM221/EmGFP und
2. die Übertragung des CMV-Promotors aus pENTRTM5'/CMV auf den pLenti6.4/R4R2/V5-DEST-Vektor.

Der Expressions-Klon pLenti6.4/CMV/V5/MSGW-EmGFP-miR-133a ist das Ergebnis dieser Reaktion (Abbildung 5).

Der Ansatz wurde 5 h bei 25 °C und nach der Zugabe von 0,5 μl Proteinase K bei 37°C nochmals für 20 min inkubiert.

Methoden

Tabelle 25: Zusammensetzung LR-Rekombinationsansatz

Substanz	Menge (µl)
gereinigte Plasmid DNA	75
pENTR TM 5'/CMV	0,5
pLenti6.4/R4R2/V5-DEST	0,5
TE-Puffer	ad 4
LR Clonase [®] II Mix	1



Das ccdB-Gen bleibt sowohl bei der BP- als auch bei der LR-Rekombination erhalten. pLenti6.4/R4R2/V5-DEST beinhaltet anders als der Eingangsvektor ein Ampicillin-Resistenzgen. Dies sorgt abermals für eine doppelte Selektionsmöglichkeit nach der Transformationsreaktion. Zusätzlich zeichnet sich der Vektor durch Elemente aus, die das Verpacken der pre-microRNA-Expressionskassette in Viruspartikel ermöglichen. Abbildung 4 fasst die BP- und LR-Rekombination graphisch zusammen.

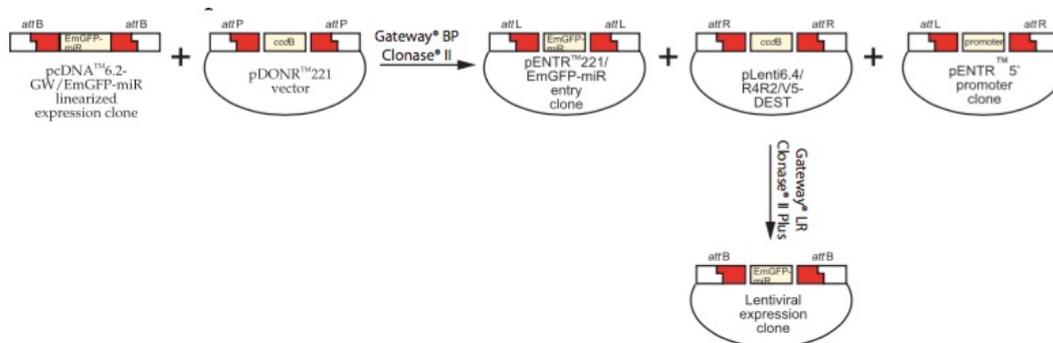


Abbildung 4: BP- und LR-Rekombinationen 221 (aus User Guide BLOCK-iTTMHiPerformTMLentiviral Pol II miR RNAi Expression System with EmGFP Kits (Invitrogen), Publikationsnummer: A10294, 9. Februar 2012)

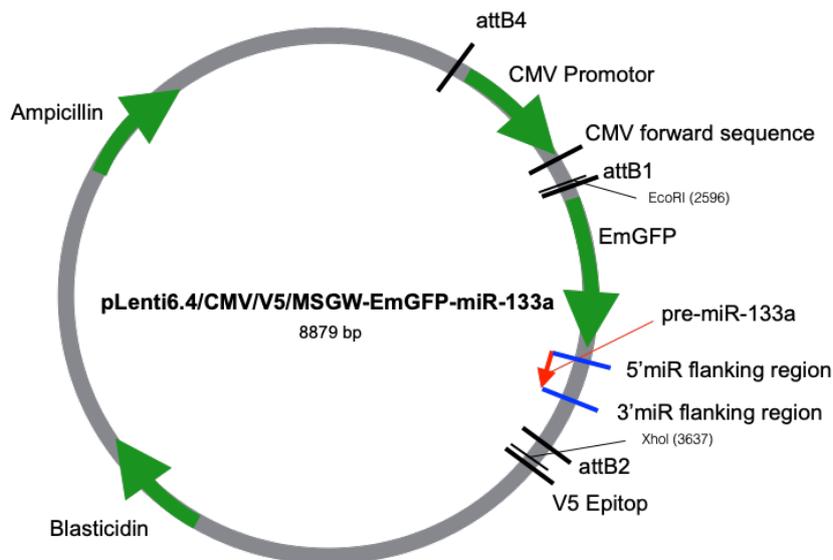


Abbildung 5: Vektorkarte pLenti6.4/CMV/V5/MSGW-EmGFP-miR-133a

Transformation und Plasmidisolierung von pLenti6.4/CMV

Nach Abschluss der LR-Rekombination folgte die Transformation des Zielvektors pLenti6.4/CMV/V5/MSGW-EmGFP-miR in kompetente Stbl3™ E. coli Zellen. Zur Plasmidisolierung schloss sich eine Mini-Präparation mit anschließender Restriktionsanalyse an. Genutzt wurde das Mini-Präparationskit (Peqlab) nach Herstellerangaben. Größere Menge an Plasmid-DNA wurden unter Verwendung des Plasmid Midi Kits (Qiagen) gewonnen. Als Selektionsantibiotikum diente bei den Reaktionen Ampicillin (1:1000 verdünnt mit LB-Medium).

3.3.2. Virusherstellung

Zur Produktion lentiviraler Partikel wurden HEK-293-FT-Zellen eingesetzt. 4 Millionen Zellen wurden in 100 x 20 mm, mit Poly-D-Lysin beschichteten Kulturschalen mit je 5 ml antibiotikafreiem komplettiertem DMEM ausgesät und am Folgetag mit pLenti6.4/CMV/V5/MSGW-EmGFP-miR-133a transfiziert. Am Tag vor der Zellpassage wurden die Platten zur Optimierung der Zellhaftung mit 3 ml Poly-D-Lysin-Lösung (1:20 mit sterilem H₂O verdünnt) 8 h bei 37°C inkubiert.

Der Transfektionsansatz mit 9 µg ViraPower™ Packaging Mix (je 3 µg pLP1-, pLP2- und pLP/VSVG-Plasmide) (Invitrogen) und 3 µl des Expressionsvektors wurde in einem 1 ml Tube mit 500 µl JetPrime®-Puffer versetzt und 10 sec geschüttelt. Dann wurde 20 µl Jetprime® hinzugefügt, 10 sec gevortext und der Ansatz 10 min bei Raumtemperatur

Methoden

inkubiert. Der Transfektionsmix wurde auf die HEK-293-FT-Zellen pipettiert. Nach 6 h wurde das Medium durch 10 ml Virusproduktionsmedium mit 5 nM Natrium-Pyruvat ersetzt. Die Virusernte erfolgte durch Überführung des virushaltigen Mediums in sterile 10 ml Röhrchen 48 h nach der Transfektion und sofortiger Zentrifugation bei 1500rpm für 10 min. Die Überstände wurden filtriert und zu je 1 ml aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Titerbestimmung

Für die Titerbestimmung wurden HEK-293-FT-Zellen verwendet. 300.000 Zellen pro 6-Lochplatte wurden mit je 1 ml 1:10 bzw. 1:100 verdünnten Viruspartikeln direkt nach der Aussaat transduziert. Dazu wurde das komplettierte DMEM 1:1000 mit Polybrene (6ng/ml) versetzt, um eine effektivere Transduktion zu erreichen. Nach 48 h wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit jeweils 2 ml PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit je 1 ml 37% Formaldehyd für 10 min bei 37 °C fixiert.

Zum Anfärben der Zellkerne wurde 1:5000 in PBS-Puffer verdünntes DAPI (9 ng/ml) auf die fixierten Zellen pipettiert. Anschließend wurden die infizierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop quantifiziert. Für die Auswertung wurde die Software analySIS (SIS Software) verwendet.

Infizierte Zellen konnten durch die Fluoreszenz des EmGFP detektiert werden. Durch die parallele Färbung der Zellkerne mit DAPI wurden die Zellgrenzen deutlich. Der Titer wurde mit folgender Formel berechnet:

$$TU/ml = [F \times C/V] \times DF$$

F= EmGFP-positive Zellen in %

C= Zellzahl am Tag der Transduktion

V= Volumen der Viruspartikel in μ l

DF= Virusverdünnungsfaktor

3.3.3. Anwendung lentiviraler Vektoren in humanen Fibroblasten

Die lentiviralen Vektoren wurden zunächst an HEK-293-Zellen getestet. Später wurden sie dazu verwendet, das Expressionslevel der miR-133a in humanen kardialen Fibroblasten zu steigern.

Je 40000 humane, aus rechtsatrialem Herzgewebe isolierte Fibroblasten (3. Passage) wurden in 12-Lochplatten kultiviert. Vor der Transduktion wurde das komplettierte DMEM mit Fungizone versetzt. Die Transduktion mit den lentiviralen Partikeln erfolgte bei einer 80%-igen Konfluenz der Zellen.

Die Viruspartikellösung wurde mit Medium auf 1 ml aufgefüllt. Der Virustiter wurde dem Wert des Negativ-Kontroll-Vektors angepasst. Zum Schluss wurden den Ansätzen 6 µg Polybrene pro ml DMEM zugefügt. Anschließend wurde die Lösung auf die Zellen pipetiert.

Nach 72 h im CO₂-Inkubator bei 37 °C wurde der Anteil an infizierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop geschätzt oder mit der Software AnalySIS (DAPI-Färbung/Em-GFP) quantifiziert. Dann wurden die Zellen in PBS gewaschen, geerntet und für Expressionsanalysen von miR-133a und weiterer Zielgene weiterverwendet.

3.4. Histologie

3.4.1. Gewebeaufbereitung, Kryofixierung und Kryo-Schnitte

Zur Herstellung histologischer Präparate wurde humanes Myokard aus rechtsatrialen Herzohren verwendet.

Das Trabekelgewebe wurde innerhalb der ersten Stunde nach Entnahme unter ständiger Kühlung bei 4 °C gewonnen. Das Gewebe wurde auf Korkplatten mit TissueTek O.C.T™ compound (Sakura) fixiert und auf Trockeneis für einige Minuten tiefgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Die Gewebsschnitte wurden mit Hilfe eines Kryotoms mit einer Innenraumtemperatur von -25 °C und einer Schnittplattentemperatur von -18 °C angefertigt. Die Schnittdicke betrug 12 µm. Nach Trocknung auf SuperFrost®Plus Objektträgern (Menzel) wurden die Kryoschnitte entweder direkt gefärbt oder bei -80 °C gelagert.

3.4.2. Kollagenfärbung mit Sirius-Red

Zur Bestimmung des Fibrosierungsgrades des Herzmuskelgewebes wurde die Picro-Sirius-Red-Färbung angewandt. Diese Färbemethode erlaubt die selektive Darstellung kollagener und retikulärer Fasern im extrazellulären Raum. Zur Visualisierung zellulärer Anteile diente die Hämalaun-Färbung. Die einzelnen Schritte der Färbung sind Tabelle 26 zu entnehmen (Mollnau, 2003).

Tabelle 26: Sirius-Red-Färbeprotokoll

Arbeitsschritte	
1	Objektträger mit den Präparaten werden für 30 min getrocknet
2	Fixierung der Schnitte für mindestens 24 h in Bouin-Lösung zur Kontrasterhöhung der einzelnen Gewebekomponenten (Herstellung siehe Material)
3	Schnitte für eine Stunde in 0,1% Sirius-Red-Lösung legen (Herstellung siehe Material)
4	Überführung für 30 sec in 0,01 N HCl
5	Kurze Reinigung in destilliertem Wasser
6	Kernfärbung in Hämalaun-Lösung für 10 min
7	Abspülen der Schnitte unter fließendem Wasser für 5 min
8	Dehydrierung in Alkoholreihe von 70%, 96% und 100% Alkohol für je 3 min
9	Überführung in Xylol für 5 min zur Klärung
10	Einbetten der Schnitte in Entellan® und Abdeckung mit Deckgläsern
11	Trocknung über Nacht und Lagerung bei Raumtemperatur

3.4.3. Auswertung der Gewebsschnitte

Die Bestimmung des Kollagen-Gehaltes der Präparate erfolgte mit Hilfe des Bildanalyseprogrammes ImageJ 1.49 des National Institutes of Health, Maryland, USA. Im Vorfeld wurden lichtmikroskopische Fotografien der Präparate angefertigt. Verwendet wurde ein Lichtmikroskop mit integrierter, digitaler Kamera (Keyence BZ 8000K). Diese wurde durch die Kopplung an einen Computer über die Keyence BZ Analyzer Software bedient. Pro Gewebeschnitt wurden zufällig 4-5 Gesichtsfelder in zehnfacher Vergrößerung ausgewählt und abfotografiert. Pro Patient wurden jeweils vier Gewebeschnitte verwendet, sodass pro Patient 16-20 Bilder erstellt wurden. Die Auswertung der Bilddaten erfolgte verblindet. Mit dem Bildanalyseprogramm Image J wurde das Verhältnis zwischen rot gefärbten, kollagenen Flächen und der Gesamtfläche der Gewebssektion in Prozent durch folgende Formel ermittelt:

$$\% \text{ Fibrose} = \text{Fläche Fibrose} / \text{Totale Gewebefläche} \times 100$$

3.5. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Versuche wurde das Programm SigmaStat Version 3.5 (Systat Software Inc.) verwendet. Die Auswertung erfolgte durch die Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen. Signifikanzanalysen wurden für den Vergleich von zwei numerischen Variablen mit dem t-Test bzw. für den Vergleich mehrerer Gruppen numerischer Variablen mit dem One-Way-Anova-Test durchgeführt. Wenn nötig

Methoden

wurde ein Korrekturverfahren nach Tukey oder Fisher's LSD angewendet. Für alle Tests wurde eine Power von 0,8 als notwendig festgelegt. Ein p-Wert $< 0,05$ galt dabei als statistisch signifikant. Mittels Pearson-Korrelationsanalysen wurden Korrelationskoeffizienten ermittelt.

4. Ergebnisse

4.1. Histologie

Die Evaluation rechtsatrialer Fibrosierungsprozesse bei Sinusrhythmus und persistierendem Vorhofflimmern in humanen rechtsatrialen Gewebeproben erfolgte durch histologische Analysen mittels Kollagen-spezifischer Picro-Sirius-Red-Färbung.

In den histologischen Analysen der Patientenproben (siehe Abbildung 6 und 7) zeigten die Patienten mit persistierendem Vorhofflimmern (3 männlich, 1 weiblich, Durchschnittsalter 73 Jahre) ($62,1\% \pm 5,9\%$, $p < 0,05$), verglichen mit der Kontrollgruppe mit Sinusrhythmus (1 männlich, 3 weiblich, Durchschnittsalter 77 Jahre) ($51,8\% \pm 1,7\%$), eine signifikante Erhöhung des Kollagen-Anteils. Dieser vermehrte Kollagenanteil lässt auf eine Erhöhung einer atrialen Fibrosierung schließen.

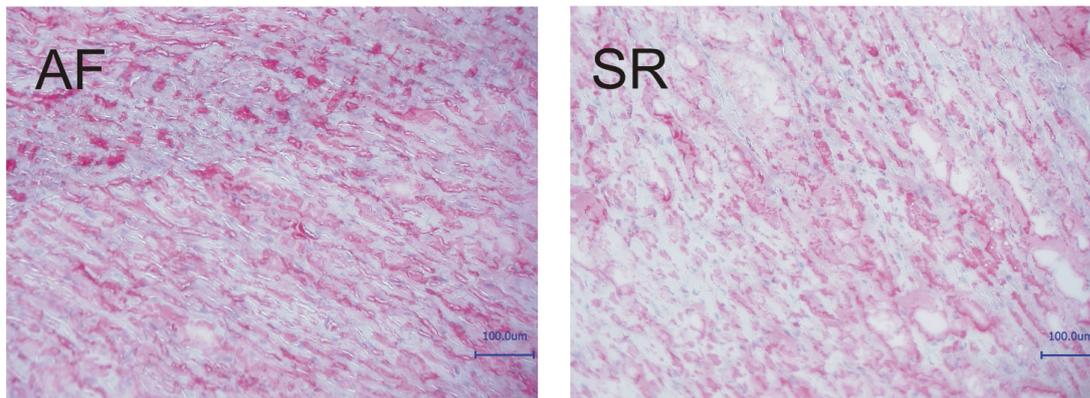


Abbildung 6: Histologische Analyse von humanem rechtsatrialem Gewebe bei persistierendem Vorhofflimmern (AF) und Sinusrhythmus (SR).

Picro-Sirius-Red-Färbung zur Darstellung kollagener Fasern. Skalierung 100 µm. Zu erkennen ist ein erhöhter Kollagen-Anteil bei persistierendem Vorhofflimmern (rote Färbung).

Ergebnisse

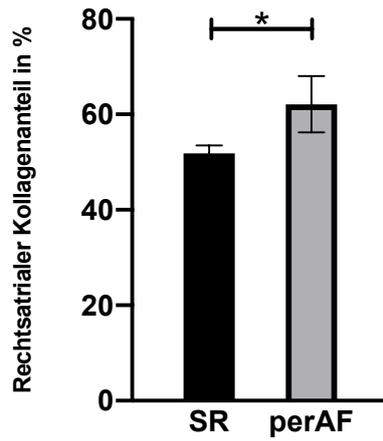


Abbildung 7 Rechtsatrialer Kollagen-Anteil bei Patienten mit Sinusrhythmus (SR, schwarzer Balken) und persistierendem Vorhofflimmern (perAF, grauer Balken)

Darstellung des Kollagenanteils in % der Gesamtfläche des untersuchten rechtsatrialen Gewebes. *= $p < 0,05$

4.2. Einfluss der miR-133a-Überexpression auf Zielgene mit Bedeutung für die Extrazellulärmatrix

Die funktionelle Bedeutung einer miR-133a-Überexpression in kardialen Fibroblasten wurde durch mRNA-Expressionsveränderungen der miR-133a-Zielgene COL1A1, COL3A1, TGF- β , CTGF, α -SMA und FN-1 mittels qRT-PCR analysiert (Tabelle 27). Ausgewählt wurden bekannte Zielgene, die im Zusammenhang mit Fibrosierungsprozessen und somit der Entstehung und dem Erhalt von Vorhofflimmern stehen, durch ihren Einfluss in die Fibroblastenproliferation, der Produktion von ECM-Bestandteilen und der Transdifferenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten. Die Identifizierung der Zielgene erfolgte über die Onlinedatenbanken Targetscan und miRGate.

Tabelle 27: Fibrose-assoziierte Zielgene von miR-133a

Gen	Protein/Funktion
COL1A1	Kollagen Typ I alpha 1 , verleiht durch hohe Zugfestigkeit Stabilität
COL3A1	Kollagen Typ III alpha 1 , erhält durch dehbare Fibrillen strukturelle Unversehrtheit
TGF- β	Transforming growth factor-β , Aktivierung von CTGF Stimulation der Proliferation, Migration und Transdifferenzierung von Myofibroblasten Stimulation der Kollagen-I- und -III-Produktion Stimulation der Fibronectin-1-Produktion
CTGF	Connective tissue growth factor , indirekte Aktivierung von Fibroblasten zur Proliferation, Transdifferenzierung und Produktion von ECM
FN-1	Fibronectin-1 , Fibroblasten-Differenzierung Kopplung von Myozyten an das kollagene Netzwerk Indirekte Aktivierung von Myofibroblasten
α -SMA	α-smooth muscle actin , erhöht Myofibroblasten-Kontraktilität

4.2.1. Transfektions- und Transduktionseffizienz

Die Expressionsanalysen wurden in zwei verschiedenen Systemen (humane Fibroblasten/ Rattenfibroblasten; Plasmid/ Lentiviraler Vektor) durchgeführt.

Durch die Transfektion des Plasmids (pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR-133a-Plasmid) bzw. Transduktion des lentiviralen Vektors (pLenti6.4/CMV/V5/MSGW-EmGFP-miR-133a-Vektor) lassen sich die transfizierten bzw. transduzierten Zellen als EmGFP-positiv unter dem Fluoreszenzmikroskop von nicht-transfizierten bzw. nicht-transduzierten Zellen unterscheiden.

Die mittels pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR-133a-Plasmid transfizierten Fibroblasten der Ratte zeigten in den Analysen eine Transfektionseffizienz von maximal 30%.

Zur weiteren Evaluation bei relativ niedriger Transfektionseffizienz erfolgten Experimente mit dem pLenti6.4/CMV/V5/MSGW-EmGFP-miR-133a-Vektor.

Abbildung 8 zeigt die Analyse der Transduktionseffizienz durch die Quantifizierung infizierter humaner kardialer Fibroblasten. Für die Quantifizierung wurden zusätzlich alle Zellen mit DAPI markiert. Als DNA spezifischer Fluoreszenzfarbstoff färbt DAPI die Zellkerne an. Dies erlaubt eine bessere Zuordnung der Flächen zwischen Zytosol und Zellkern. In den Versuchen zeigte sich eine Transduktionseffizienz von 95%.

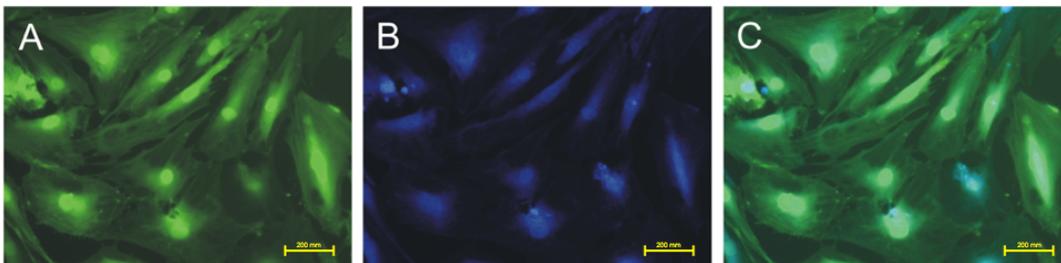


Abbildung 8: Nachweis der Transduktion von humanen kardialen Fibroblasten mit dem pLenti6.4/CMV/V5/MSGW-EmGFP-miR-133a-Vektor unter dem Fluoreszenzmikroskop. Skalierung 200 µm.

A. EmGFP-positive Zellen, B. mit DAPI angefärbte Zellkerne, C. Übereinanderlagerung der EmGFP- und DAPI-Signale. 20-fache Vergrößerung; Transduktionseffizienz von 95%

4.2.2. Expression von COL1A1-mRNA nach microRNA-133a-Überexpression

Die im Durchschnitt 103-fache lentivirale Überexpression von miR-133a führte zur einer signifikant verminderten mRNA-Expression des fibroseassoziierten Gens COL1A1 ($63,6\% \pm 34\%$, $p < 0,05$) in humanen kardialen Fibroblasten.

Abbildung 9 zeigt das über qRT-PCR-Analyse ermittelte Expressionsniveau im Vergleich zur Negativ-Kontrolle.

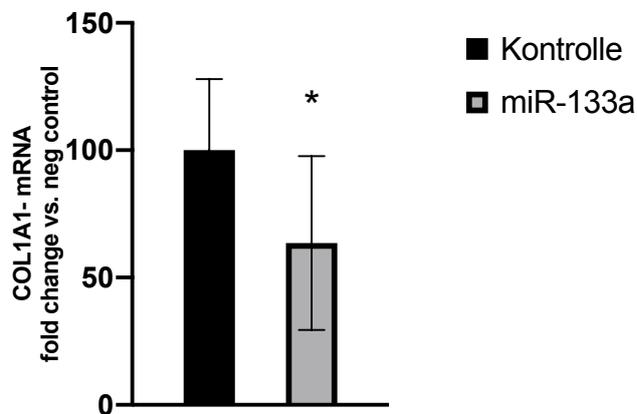


Abbildung 9: Expressionsanalyse (qRT-PCR) von COL1A1-mRNA bei 103-facher miR-133a-Überexpression (pLenti6.4/R4R2/V5-DEST-Vektor) in humanen kardialen Fibroblasten

Werte stellen Mittelwerte \pm SD dar. Daten von drei unabhängigen Experimenten mit $n=3$ pro Gruppe. $*$ = $p < 0,05$. Kontrolle = Fibroblasten, die mit Vektor für funktionslose microRNAs transduziert wurden

4.2.3. Expression von COL3A1-mRNA nach microRNA-133a-Überexpression

Nach im Durchschnitt 103-facher lentiviraler Überexpression von miR-133a in humanen kardialen Fibroblasten konnte eine signifikant reduzierte mRNA-Expression des fibrose-assoziierten Gens COL3A1 ($34,6\% \pm 22,1\%$, $p = <0,001$) im Vergleich zur Negativ-Kontrolle nachgewiesen werden (Abbildung 10).

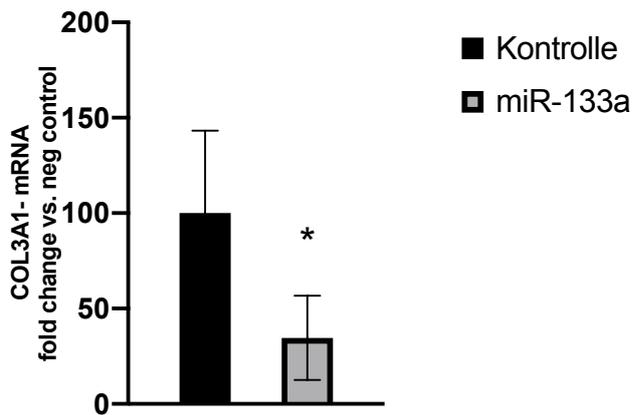


Abbildung 10: Expressionsanalyse (qRT-PCR) von COL3A1-mRNA bei 103-facher miR-133a-Überexpression (pLenti6.4/R4R2/V5-DEST-Vektor) in humanen kardialen Fibroblasten

Werte stellen Mittelwerte \pm SD dar. Daten von drei unabhängigen Experimenten mit $n=3$ pro Gruppe. $*$ = $p < 0,001$. Kontrolle = Fibroblasten, die mit Vektor für funktionslose microRNAs transduziert wurden

4.2.4. Expression von CTGF-mRNA nach microRNA-133a-Überexpression

Die im Durchschnitt 103-fache lentivirale Überexpression von miR-133a führte zur einer signifikant verminderten mRNA-Expression des fibroseassoziierten Gens CTGF ($47,9\% \pm 24,7\%$, $p < 0,05$) in humanen kardialen Fibroblasten.

Dieses Ergebnis stützt unsere Hypothese der antifibrotischen Rolle von miR-133a durch Inhibierung von CTGF-Signalwegen.

Abbildung 11 zeigt das über qRT-PCR-Analyse ermittelte Expressionsniveau im Vergleich zur Negativ-Kontrolle.

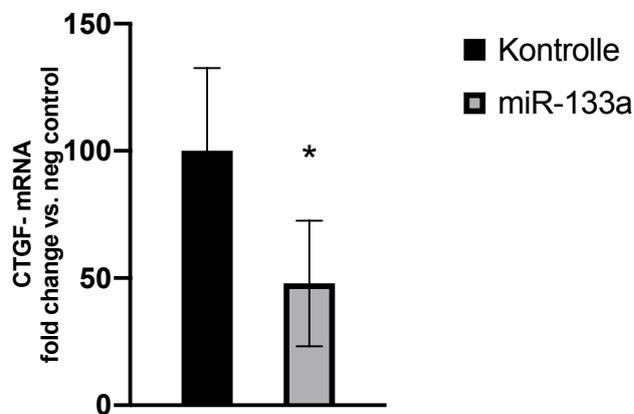


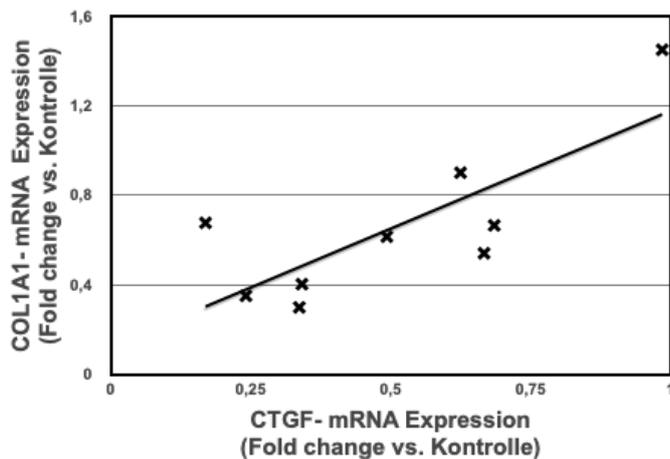
Abbildung 11: Expressionsanalyse (qRT-PCR) von CTGF-mRNA bei 103-facher miR-133a-Überexpression (pLenti6.4/R4R2/V5-DEST-Vektor) in humanen kardialen Fibroblasten

Werte stellen Mittelwerte \pm SD dar. Daten von drei unabhängigen Experimenten mit $n=3$ pro Gruppe. $*$ = $p < 0,05$. Kontrolle = humane kardiale Fibroblasten, die mit Vektor für funktionslose microRNAs transduziert wurden

4.2.5. Korrelationsanalyse

Die CTGF-mRNA-Expression korreliert in humanen kardialen Fibroblasten mit lentivira-
ler miR-133a-Überexpression positiv mit der COL1A1-mRNA ($r=0,8$) und der COL3A1-
mRNA-Expression ($r=0,9$) (Abbildung 12).

A



B

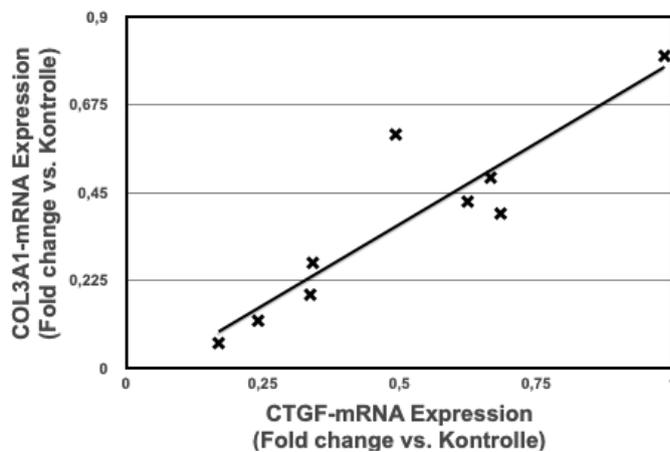


Abbildung 12: A) Pearson-Korrelationsanalyse der COL1A1-mRNA und CTGF-mRNA-Expression ($r=0,8$) B) Pearson-Korrelationsanalyse der COL3A1-mRNA und CTGF-mRNA-Expression ($r=0,9$) Aufge-
tragen sind die mRNA-Expressionsänderungen in humanen kardialen Fibroblasten mit lentivira-
ler miR-133a-Überexpression. Formel: $r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$

4.2.6. Expression von TGF- β -mRNA nach microRNA-133a-Überexpression

Bei einer im Durchschnitt 63-fachen miR-133a-Überexpression in kardialen Fibroblasten der Ratte (pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR-133a-Plasmid transfizierte Zellen) konnten keine signifikanten Expressionsänderungen von TGF- β -mRNA detektiert werden (87,7% \pm 68,3%, p=0,734) (Abbildung 13).

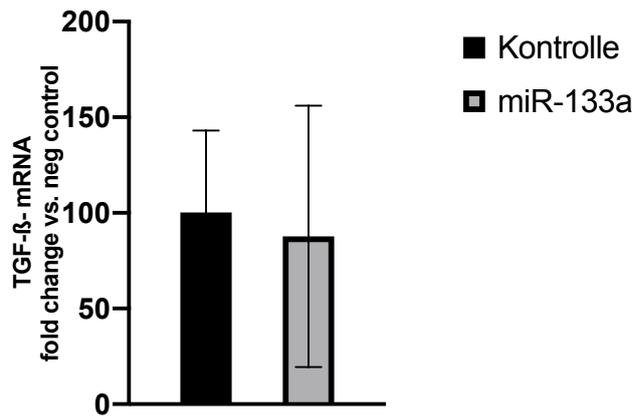


Abbildung 13: Expressionsanalyse (qRT-PCR) von TGF- β -mRNA bei 63-facher miR-133a-Überexpression (pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR-Plasmids) in kardialen Fibroblasten der Ratte

Werte stellen Mittelwerte \pm SD dar. $n_{(\text{neg. con})} = 6$, $n_{(\text{TGF-}\beta)} = 4$. p=0,734. Kontrolle = Fibroblasten, die mit Vektor für funktionslose microRNAs transfiziert wurden

4.2.7. Expression von Fibronectin-1-mRNA nach microRNA-133a-Überexpression

Die im Durchschnitt 63-fache Überexpression von miR-133a führte zu einer verminderten mRNA-Expression des fibroseassoziierten Gens Fibronectin-1 in kardialen Fibroblasten der Ratte (pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR-133a-Plasmid transfizierte Zellen). Dieser Effekt blieb jedoch unterhalb des Signifikanzniveaus ($40,3\% \pm 14,2$, $p=0,165$) (Abbildung 14).

Die Tendenz stützt den vermuteten antifibrotischen Effekt der Fibronectin-1 Herabregulation durch miR-133a-Überexpression in kardialen Fibroblasten.

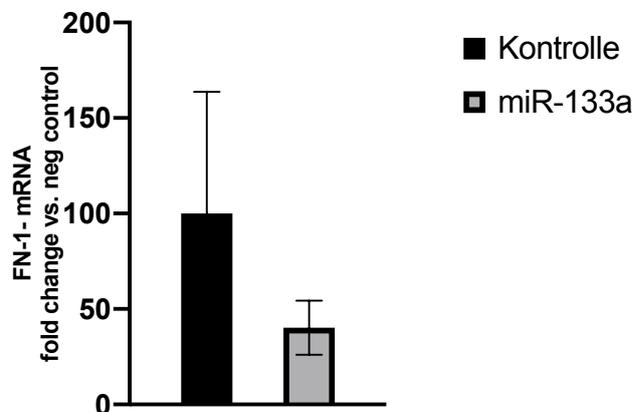


Abbildung 14: Expressionsanalyse (qRT-PCR) von FN-1-mRNA bei 63-facher miR-133a-Überexpression (pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR-Plasmids) in kardialen Fibroblasten der Ratte

Werte stellen Mittelwerte \pm SD dar. $n_{(neg.con)}=6$, $n_{(Fibronectin)}=3$. $p=0,165$. Kontrolle = Fibroblasten, die mit Vektor für funktionslose microRNAs transfiziert wurden

4.3.1. Einfluss der miR-133a-Überexpression auf die Transdifferenzierung kardialer Fibroblasten

Die Transdifferenzierung von kardialen Fibroblasten zu Myofibroblasten wurde über die mRNA-Expression von α -SMA analysiert. Bei einer im Durchschnitt 63-fachen miR-133a-Überexpression in kardialen Fibroblasten der Ratte (pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR-133a-Plasmid transfizierte Zellen) kam es zu einer verminderten α -SMA-Expression (37,4% \pm 11,8, p= 0,4) (Abbildung 15).

Die Tendenz weist darauf hin, dass eine miR-133a-Überexpression einen inhibitorischen Effekt auf die Transdifferenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten und somit auf die Entwicklung atrialer Fibrose haben könnte.

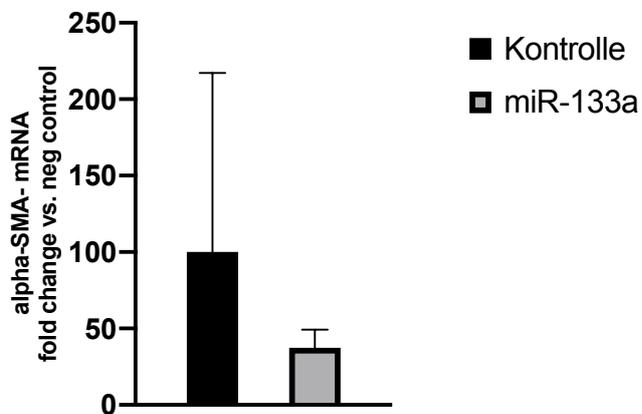


Abbildung 15: Expressionsanalyse (qRT-PCR) von α -SMA- mRNA bei 63-facher miR-133a-Überexpression (pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR-Plasmids) in kardialen Fibroblasten der Ratte

Werte stellen Mittelwerte \pm SD dar. $n_{(neg.con)}=5$, $n_{(\alpha-SMA)}=3$. p= 0,4. Kontrolle = Fibroblasten, die mit Vektor für funktionslose microRNAs transfiziert wurden

4.4. Einfluss der miR-133a-Überexpression auf die Zelldichte kardialer Fibroblasten

Post-transfektionelle Zellzahlanalysen wurden an kardialen Fibroblasten der Ratte, welche miR-133a 63-fach überexprimierten (pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR-133a-Plasmid transfizierte Zellen) durchgeführt. Die Fibroblasten zeigten nach 24 h Wachstum eine signifikant geringere Zelldichte als die Zellen ohne miR-133a-Überexpression ($67,3\% \pm 13,8\%$, $p = <0,001$) (Abbildung 16).

Dieses Ergebnis deutet auf einen hemmenden Einfluss einer miR-133a-Überexpression auf die Fibroblastenproliferation in atrialen Fibroblasten hin.

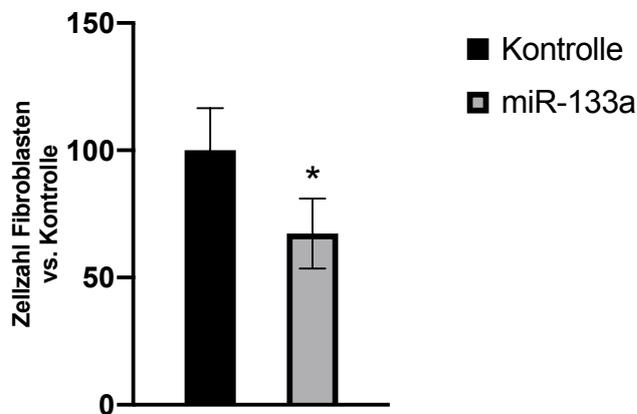


Abbildung 16: Zellzahlanalyse bei 63-facher miR-133a-Überexpression (pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR-Plasmid) in kardialen Fibroblasten der Ratte

Werte stellen Mittelwerte \pm SD dar. Daten von vier unabhängigen Experimenten mit $n=3$ pro Gruppe. $*= p <0,001$. Kontrolle = Fibroblasten, die mit Vektor für funktionslose microRNAs transfiziert wurden

4.5. miR-133a-Expression in rechtsatrialen Gewebeproben

Chip-array Analysen zur differentiellen Expression von microRNAs in Proben mit Sinusrhythmus, persistierendem und paroxysmalem Vorhofflimmern (n=3 pro Gruppe) konnten im Vorfeld der vorliegenden Studie eine reduzierte Expression von miR-133a nachweisen, die mit der Dauer des Vorhofflimmerns korrelierte ($p < 0,05$) (Niemann et al., 2016). Aufbauend auf diesen Daten wurden in der vorliegenden Studie qRT-PCR-Analysen zur differentiellen miR-133a-Expression an rechtsatrialem Gewebe von 64 Patienten (Sinusrhythmus n=11, persistierendes Vorhofflimmern n=27, paroxysmales Vorhofflimmern n=26) durchgeführt.

Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der qRT-PCR-Analysen. Eine statistisch signifikant verminderte miR-133a-Expression ist sowohl bei paroxysmalem (parAF) als auch bei persistierendem Vorhofflimmern (perAF) im Vergleich zur Kontrollgruppe (SR) zu erkennen. Dabei ist der Expressionsabfall bei persistierendem Vorhofflimmern ($27,3\% \pm 9,2\%$ (SEM), $p < 0,01$) deutlicher als bei paroxysmalen Vorhofflimmern ($49\% \pm 11\%$ (SEM), $p < 0,05$).

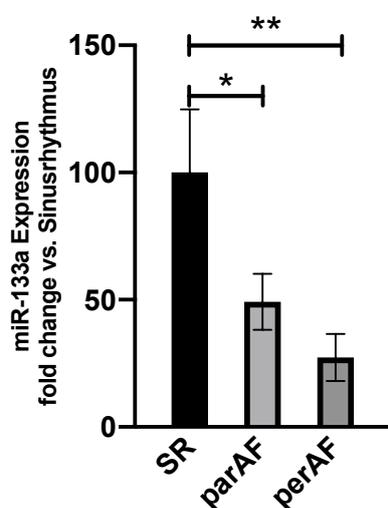


Abbildung 17: Expressionsanalyse (qRT-PCR) von miR-133a im rechtsatrialen Gewebe von Patienten mit Sinusrhythmus (SR), paroxysmalem Vorhofflimmern (parAF) und persistierendem Vorhofflimmern (perAF)

Werte stellen Mittelwerte \pm SEM dar. $n_{(SR)} = 11$, $n_{(parAF)} = 26$, $n_{(perAF)} = 27$. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$

4.6. Zusammenfassung der Ergebnisse

Patienten im Vorhofflimmern zeigen eine vermehrte atriale Fibrose. Die in-vitro-Versuche mit miR-133a-überexprimierenden kardialen Fibroblasten zeigten eine mRNA-Suppression der Fibrose-assoziierten Gene CTGF, COL1A1, COL3A1 und FN1 sowie eine verminderte Fibroblasten-Differenzierung und Zellzahl/Proliferation. Damit kann ein Einfluss von miR-133a auf die Expression von Zielgenen des Remodelings als Substrat des Vorhofflimmerns angenommen werden. Darüber hinaus zeigen atriale Proben im Vorhofflimmern eine reduzierte Expression von miR-133a.

Diese Befunde lassen die Vermutung zu, dass das miR-133a-Expressionsmuster den Grad der atrialen Fibrose beeinflusst und eine Einschätzung zur Prognose des Vorhofflimmerns erlauben könnte.

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die regulatorische Funktion der miR-133a bei der Entwicklung und Erhaltung von Vorhofflimmern untersucht. Dabei wurde ein Zusammenhang zwischen der Entwicklung des Vorhofflimmerns (paroxysmal oder persistierend) und dem miR-133a-Expressionsmuster beschrieben. Die angenommene Verwendbarkeit von miR-133a als Biomarker und möglicherweise therapeutischem Ziel bei Vorhofflimmern, bestätigt sich schon bei geringer Probenzahl und macht die spätere Überprüfung an einem größeren Patientenkollektiv sinnvoll.

5.1. Fibrosierung rechtsatrialen Gewebes bei Vorhofflimmern

Der Zusammenhang zwischen rechtsatrialer Fibrose und Vorhofflimmern wurde durch die Bestimmung des Fibrosierungsgrades von humanem Vorhofgewebe von Patienten mit persistierendem Vorhofflimmern und Sinusrhythmus mittels Sirius-Red-Färbung der kollagenen Fasern untersucht. Das atriale Gewebe von Patienten mit persistierendem Vorhofflimmern zeigte im Vergleich zu den Sinusrhythmus-Präparaten einen signifikant größeren Kollagen-Anteil. Dieser Befund deckt sich mit Angaben aus der Literatur. Kostin et al. (2002) fanden in konfokalmikroskopischen Untersuchungen bei Gewebe aus rechtsatrialen Appendices von Patienten mit persistierendem Vorhofflimmern, die sich einer Maze-Operation unterzogen, einen um 48% erhöhten Anteil von Kollagen-I im Vergleich zu Geweben von Patienten mit Sinusrhythmus. Die Autoren interpretierten den erhöhten Kollagen-Gehalt als strukturelles Korrelat von Vorhofflimmern. Auch Nishi et al. (2013) detektierten eine signifikant erhöhte prozentuale Fibrosefläche von durchschnittlich $29,6\% \pm 14,1\%$ im rechtsatrialen Gewebe von Patienten mit Vorhofflimmern, die sich Herzoperationen unterzogen.

Obgleich die zitierten Arbeiten und die vorliegende Analyse eine signifikante Steigerung der atrialen Fibrose bei Vorhofflimmern belegen, weichen die prozentualen Kollagen-Anteile in den verschiedenen Untersuchungen voneinander ab.

Als mögliche Ursachen für diese Unterschiede kommen unterschiedliche Patientenzahlen oder methodische Unterschiede in Frage. Als histologische Präparate dienten Nishi et al. (2013) Paraffinschnitte, die mit Hämatoxylin & Eosin und Masson-Trichrom gefärbt wurden. In der vorliegenden Studie erfolgte die Analyse mit Kryoschnitten und Sirius-Red-Kollagenfärbung. Die von Nishi et al. (2013) verwendete Planimetry Methode mit der Windowa MetaMorph Software ist untersucherunabhängig. Die Autoren verwendeten eine 100-fache Vergrößerung und werteten lediglich durchschnittlich zehn Felder aus. In der vorliegenden Arbeit wurde mit einer 10-fachen Vergrößerung und 16-20

Feldern gearbeitet, wodurch vermutlich ein besserer Überblick über den Gesamtgehalt an Kollagen gewährleistet werden konnte.

Zahlreiche Literaturdaten belegen, dass sich atriale Fibrose und Vorhofflimmern gegenseitig bedingen und stützen. Als ein charakterisierender Prozess des strukturellen atrialen Remodelings gilt die atriale Fibrose als ein anatomisches Substrat für die Erhaltung und Progression von Vorhofflimmern und als wichtiger Prognosefaktor. Gleichzeitig ist das Vorhofflimmern auch eine Ursache für die Entstehung einer atrialen Fibrose (Burstein and Nattel, 2008; Heijman et al., 2016; Nattel et al., 2008; Poudel et al., 2015). Dieser Zusammenhang zwischen der atrialen Fibrose und dem Vorhofflimmern steht mit den histologischen Ergebnissen dieser Arbeit im Einklang.

Platonov et al. beschrieben eine 2-3fach höheren Fibroseanteil in rechts- und linksatrialem Gewebe bei Patienten mit Vorhofflimmern unabhängig vom Lebensalter. Dabei zeigte sich im Vergleich eine stärkere Fibrosierung bei Patienten mit permanentem Vorhofflimmern zu der Gruppe mit paroxysmalem Vorhofflimmern (Platonov et al., 2011).

Boldt et al. (2004) entdeckten eine Verbindung zwischen dem Vorhofflimmern und der ECM-Expression von Kollagen-I, -III und Fibronectin-1 in linksatrialem humanem Gewebe. Dabei zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied der Kollagen-I-Proteinkonzentration zwischen paroxysmalem und persistierendem Vorhofflimmern.

Die Bedeutung des ECM-Metabolismus für die Entwicklung von Vorhofflimmern wird auch durch den erhöhten ECM-Anteil in den Atrien von Schweinen mit induziertem Vorhofflimmern und der erhöhten Fibronectin-1-Expression unterstützt (Lin et al., 2007).

Kainuma et al. konnten zeigen, dass die Kombination aus Vorhofflimmern und Mitralklappendefekten zu einem strukturellen Remodeling im rechten Atrium führt. Mitralklappendefekte allein zeigen diesen Effekt jedoch nicht. Diese Befunde bekräftigen die kausale Beziehung von Vorhofflimmern und atrialer Fibrose (Kainuma et al., 2011). Auch Xu et al. (2004) zeigten an explantierten Herzen von Patienten mit Herzinsuffizienz und Kardiomyopathie, dass das ECM-Volumen mit der Entstehung von Vorhofflimmern korreliert. Die ECM-Akkumulation durch Komponenten wie Kollagen-I und die damit einhergehenden Fibrosierungs-Prozesse führen über die Separierung longitudinaler myokardialer Muskelfaserbündel zu Reizweiterleitungsstörungen und Vorhofflimmern. Einige Autoren folgerten aus diesen Resultaten, dass die Beeinflussung der Entwicklung der atrialen Fibrose einen vielversprechenden Ansatz zur Prävention von Vorhofflimmern darstellt (Burstein et al., 2009; Kostin et al., 2002; Nattel, 2017).

Weiter scheint die atriale Fibrose einen Einfluss auf den Erfolg von Maze-Operationen zu haben, unabhängig davon, ob ein paroxysmales oder permanentes Vorhofflimmern vorliegt. Patienten mit postoperativ permanentem Vorhofflimmern zeigten präoperativ eine stärkere atriale Fibrosierung als Patienten, bei denen sich nach dem Eingriff ein

Sinusrhythmus einstellte (Niemann et al., 2016). Im Widerspruch zu diesen Befunden stehen die Ergebnisse von Kainuma et al. (2011), die in ihrer Analyse zum Zusammenhang zwischen dem strukturellen Remodeling beider Atrien und dem Erfolg von Maze-Operationen bei Patienten mit valvulärem, persistierendem Vorhofflimmern lediglich einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer vermehrten Fibrose im linken (nicht im rechten) Vorhof und einem Misserfolg des Eingriffs fanden. Nakai et al. (2007) fanden dagegen einen Zusammenhang zwischen dem Grad der rechtsatrialen Fibrose und dem Auftreten von postoperativem Vorhofflimmern nach Bypass-Operationen und bekräftigten somit die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe.

Diese Befunde unterstreichen die Möglichkeit durch eine therapeutische Einflussnahme auf die atriale Fibrose die Aggravation von Vorhofflimmern zu verhindern bzw. zu verlangsamen und den Behandlungserfolg von Maze-Prozeduren zu erhöhen.

In diesem Kontext stellt sich die Frage nach den therapeutischen Möglichkeiten der Regulierung der atrialen Fibrose. Laut einer Reihe von Studien spielen microRNAs eine Schlüsselrolle bei der Entstehung und Erhaltung von Vorhofflimmern sowie beim atrialem Remodeling (Nishi et al., 2013; Poudel et al., 2015; Shen et al., 2019). Darüber hinaus zeigten die im Vorfeld der vorliegenden Arbeit durchgeführten Array-Analysen an rechtsatrialem Gewebe von Patienten mit Vorhofflimmern Expressionsveränderungen bei einer Reihe von microRNAs. Auf der Basis dieser Befunde wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der herzmuskelspezifischen miR-133a auf die kardiale Fibrosierung untersucht.

5.2. Funktionelle Auswirkungen bei miR-133a-Überexpression

Kardiale Fibroblasten spielen als Hauptproduzenten von Komponenten und Regulatoren der ECM eine fundamentale Rolle bei Fibrosierungsprozessen des Herzens (Dostal et al., 2015; Kanekar et al., 1998; Souders et al., 2009; Travers et al., 2016). Daher sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der miR-133a-Expression in kardialen Fibroblasten auf das ECM-Remodeling untersucht werden. Dazu wurden die mRNA-Expressionsmuster der Fibrose-assoziierten Gene COL1A1, COL3A1, FN-1, CTGF und TGF- β , die Fibroblasten-Transdifferenzierung zu Myofibroblasten und die Fibroblasten-Zelldichte bei einer miR-133a-Überexpression untersucht.

Obgleich die miR-133a als Kardiomyozyten-spezifisch gilt (Duisters et al., 2009; Latronico and Condorelli, 2009), konnten in der vorliegenden Arbeit zahlreiche antifibrotische Effekte der miRNA-133a-Überexpression in kardialen Fibroblasten nachgewiesen werden.

Die miR-133a inhibiert in kardialen Fibroblasten die mRNA-Expression der Gene der ECM-assoziierten Proteine Kollagen-I und -III und CTGF, deren Überexpression in engem Zusammenhang mit einer atrialen Fibrose steht.

In einer Studie an Patienten mit persistierendem Vorhofflimmern, die einen Mitralklappenersatz erhielten, zeigte sich, dass die vermehrte Expression von CTGF in rechtsatrialem Gewebe bei Vorhofflimmern mit dem Fibrosegrad korreliert (Li et al., 2013b).

Untersuchungen an Gewebe aus Ratten und Mäusen spiegeln die Resultate der Versuche an miR-133a-überexprimierenden kardialen Fibroblasten der vorliegenden Arbeit wider (Duisters et al., 2009). Damit bestätigt sich der inverse Zusammenhang zwischen der CTGF- und miR-133a-Expression spezieübergreifend. Ein miR-133a-Knockdown führte in kultivierten Kardiomyozyten und Fibroblasten zu einer Überexpression von CTGF, eine miR-133a-Überexpression dagegen zu einer Abnahme der CTGF- und Kollagen-Produktion. Die Autoren schlussfolgerten, dass miR-133a durch die direkte Inhibition der Expression des profibrotischen Proteins CTGF ein wichtiger Regulator für strukturelle Veränderungen der ECM ist (Duisters et al., 2009).

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Yu et al. die zeigten, dass die mRNA- und Proteinexpression von COL1A1, COL3A1, CTGF, TGF- β und α -SMA bei miR133a-Überexpression in Ratten nach Myokardinfarkt signifikant herabreguliert war (Yu et al., 2019).

In Angiotensin II-behandelten Ratten korrelierte die miR-133a-Expression negativ mit der COL1A1-Expression und dem Ausmaß der kardialen Fibrose. Eine verminderte miR-133a-Expression erhöhte in diesem Modell die ECM-Produktion in kardialen Fibroblasten (Castoldi et al., 2012). Kambis et al. zeigten in ihrer Studie an transgenen diabetischen Mäusen eine signifikant verminderte kardiale Kollagenexpression bei miR-133a-Überexpression (Kambis et al., 2019).

Im Hundemodell zeigten Tiere mit Nikotin-induziertem Vorhofflimmern und atrialer Fibrose eine signifikante Überexpression von TGF- β . Durch eine miR-133a-Transfektion in atriale Fibroblasten sank die TGF- β - und parallel dazu die Kollagen- und CTGF-Expression (Shan et al., 2009).

In den vorliegenden Versuchen führte die miR-133a-Überexpression nicht zu signifikanten Veränderungen der TGF- β -Expression. Dieser Befund überrascht angesichts der Datenlage in der Literatur (Shan et al., 2009; Yu et al., 2019), aber auch aufgrund der Abnahme der CTGF- und FN-1-mRNA-Expression bei miR-133a-Überexpression in der vorliegenden Arbeit. Die Expression beider Proteine und damit die Akkumulation von ECM-Proteinen wird von TGF- β gesteuert. Weiter moduliert TGF- β die Fibroblasten-Proliferation, die Transdifferenzierung in Myofibroblasten und steigert die α -SMA-, Kollagen-I- und -III-Produktion (Desmoulière et al., 1993; Dorn et al., 2018; Heimer et al., 1995; Schiller et al., 2004; Souders et al., 2009; Tomasek et al., 2002b; Travers et al.,

2016; Verrecchia and Mauviel, 2002). Du et al konnten zeigen, dass eine TGF- β Hemmung in Mäusen zu einer Reduktion atrialer Fibrose führt (Du et al., 2017).

Als Grund für die beschriebenen Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit sind methodische Ursachen wahrscheinlich. Die Expressionsanalysen wurden in zwei verschiedenen Systemen (humane Fibroblasten/Rattenfibroblasten; Plasmid/Lentiviraler Vektor) durchgeführt. Für die Expressionsanalysen des TGF- β -Gens wurde das pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR-133a-Plasmid (Invitrogen) verwendet. Die Transfektionseffizienz dieser Methode war dauerhaft niedrig (d. h. die Mehrzahl der Zellen zeigte keine Überexpression von miR-133a). Lentivirale Vorgehensweisen zeichneten sich dahingegen durch eine hohe Effizienz aus.

Zu diskutieren ist ebenfalls, ob die Regulation auf anderer Ebene zu inkonsistenten Ergebnissen führt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Überexpression einer einzelnen microRNA im artifiziellen Model untersucht. Denkbar ist, dass Gegenregulationen der Zelle zu „Störsignalen“ führen bzw. Mechanismen, die unter physiologischen Bedingungen eine Rolle spielen in ihrer Konsequenz unterdrückt werden.

Aufgrund der niedrigen Transfektionseffizienz wurden zur Evaluation der CTGF-, COL1A1- und COL3A1-Expression Experimente mit lentiviralen Vektoren (Transduktionseffizienzen von bis zu 95%) durchgeführt. In diesem System konnte ein signifikanter Einfluss einer miR-133a-Überexpression auf die Expression der Gene festgestellt werden. Die Überprüfung der Versuche zur TGF- β -Expression mit transduzierten Zellen ist in Folgeversuchen notwendig.

In diabetischen Mäusen mit einer miR-133a-Überexpression wurde eine verminderte Expression von FN-1 und anderen Fibrosemarkern (z.B. CTGF, TGF- β) sowie eine Verminderung der kardialen Fibrose beobachtet (S. Chen et al., 2014).

Der Einfluss von miR-133a auf die COL3A1-Expression wurde bisher nur in wenigen Arbeiten untersucht (Y. Chen et al., 2014; Yu et al., 2019). Die hier gezeigte signifikante Inhibition der COL3A1-mRNA-Expression bei miR-133a-Überexpression unterstützt, dass es sich bei COL3A1 um ein Zielgen dieser microRNA handelt.

Der hemmende Einfluss einer miR-133a-Überexpression auf die Fibroblasten-Proliferation unterstreicht den Zusammenhang zwischen der miR-133a-Expression und dem zellulären Wachstum (Li et al., 2018; Souders et al., 2009). Eine Fibroblasten-Proliferation führt über eine exzessive ECM-Produktion zur Trennung myokardialer Faserbündel und über die vermehrten Fibroblasten-Kardiomyozyten Interaktionen zu Veränderungen in der Erregungsweiterleitung (Burstein et al., 2009; Yue et al., 2011b).

In diesem Kontext deuten die vorliegenden Ergebnisse an, dass die Hemmung der Fibroblasten-Proliferation durch miR-133a einen Schutz vor arrhythmogenen Störungen, wie Vorhofflimmern und atrialem Remodeling, bieten könnte.

Das Wachstum der miR-133a-überexprimierenden kardialen Fibroblasten der Ratte wurde anhand der Zellzahl 24 h post-transfektionell bestimmt und mit der Kontrollgruppe verglichen. Ein Nachteil dieser Methode ist ein mögliches Bias durch den Untersucher bei der Zählung. Zur Minimierung untersucherabhängiger Effekte wurden vier parallele Ansätze (n=3 für beide Gruppen) jeweils doppelt ausgezählt. Eine verblindete Zählung durch eine unabhängige Person kann eine weitere Objektivitätssteigerung ermöglichen. α -SMA-produzierende Myofibroblasten sind unter pathologischen Umständen die Hauptproduzenten von ECM-Komponenten und somit verantwortlich für die Gewebefibrose. Die Transdifferenzierung wird unter anderem durch Fibronectin getriggert, das wiederum, von miR-133a gesteuert wird (Gabbiani, 2003b; Serini et al., 1998; Travers et al., 2016; Yu et al., 2019).

Zusammenfassend lassen die vorliegenden Ergebnisse vermuten, dass miR-133a durch die Suppression von Genen, welche für die übermäßige Produktion von ECM in kardialen Fibroblasten verantwortlich sein können, durch die Hemmung der Fibroblasten-Proliferation und Transdifferenzierung zu Myofibroblasten, einer kardialen Fibrose entgegenwirkt.

Die Folgeversuche zielten darauf ab, die belegten Zusammenhänge zwischen „atrialer Fibrose und Vorhofflimmern“ und zwischen „atrialer Fibrose und miR-133a-Expression“ zu verknüpfen. Dazu wurde die miR-133a-Expression in Gewebeproben von Patienten mit paroxysmalem und permanentem Vorhofflimmern analysiert.

5.3. miR-133a Expressionsmuster bei paroxysmalem und persistierendem Vorhofflimmern

Zum Zeitpunkt der Durchführung der vorliegenden Studie fehlten vergleichende Untersuchungen der miR-133a-Expression in atrialem Gewebe von Patienten mit paroxysmalem oder persistierendem Vorhofflimmern und Sinusrhythmus.

Um diese Frage zu beantworten, wurde in der vorliegenden Studie Gewebe aus humanem rechtsatrialem Myokard untersucht.

Im Vorfeld durchgeführte Array-Analysen mit kleineren Fallzahlen hatten ergeben, dass die miR-133a bei Patienten mit Vorhofflimmern in rechtsatrialen Proben stark unterexprimiert zu sein scheint. Zusätzlich hatten andere Arbeiten die Herz- und Skelettmuskel-spezifische Expression von miR-133a beschrieben (Lagos-Quintana et al., 2002; Li et al., 2018). Diese Befunde qualifizierten die miR-133a als potentiellen Biomarker und Therapieansatz bei Vorhofflimmern.

Die in der vorliegenden Arbeit detektierte signifikant erniedrigte miR-133a-Expression in humanen rechtsatrialen Gewebeproben von Patienten mit Vorhofflimmern im Vergleich zu Proben von Patienten mit Sinusrhythmus, könnte das Auftreten von atrialer Fibrose und Vorhofflimmern sowie die miR-133a-Expression miteinander verknüpfen. Interessant war, dass die miR-133a-Expression bei persistierendem Vorhofflimmern stärker beeinträchtigt war als bei paroxysmalem Vorhofflimmern. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Entwicklung des Vorhofflimmerns mit dem Grad der miR-133a-Expressionsminderung im Zusammenhang steht.

Diese Ergebnisse lassen sich wie folgt interpretieren:

1. Die ausgeprägte Inhibition der miR-133a-Expression bei länger bestehendem Vorhofflimmern lässt eine Progredienz des strukturellen atrialen Remodelings durch pathophysiologische Stimuli vermuten. Zusammen mit den Ergebnissen der funktionellen Analyse bei miR-133a-Überexpression deuten diese Befunde darauf hin, dass das Ausmaß atrialer fibrotischer Umbauprozesse durch ECM-Akkumulation bei paroxysmalem Vorhofflimmern, im Vergleich zu permanentem Vorhofflimmern, weniger fortgeschritten ist. Bekräftigt wird diese Vermutung durch die Arbeit von Platonov et al., in der gezeigt wurde, dass die Fibrosierung in Atrien von Patienten mit permanentem Vorhofflimmern signifikant höher ist, als bei Patienten mit paroxysmalem Vorhofflimmern (Platonov et al., 2011).
2. Laut Literatur ist die atriale Fibrose nicht nur die Konsequenz, sondern auch ein wichtiges Substrat für die Erhaltung von Vorhofflimmern (Burstein and Nattel, 2008; Daccarett et al., 2011; Nattel, 2017). Der Zusammenhang zwischen einer erniedrigten miR-133a-Expression, der Induktion einer atrialen Fibrose und der Progredienz des Vorhofflimmerns könnte auch das bei persistierendem Vorhofflimmern im Vergleich zu paroxysmalem Vorhofflimmern signifikant erhöhte Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen erklären (Le Heuzey et al., 2004; Steinberg et al., 2015).

Diese Zusammenhänge unterstützen den Ansatz der diagnostischen und therapeutischen Fokussierung auf Progressionsvermeidung des Vorhofflimmerns.

Atriale Fibrose und Vorhofflimmern bewegen sich in einem *Circulus vitiosus*, in dem sie sich selbst erhalten und gegenseitig unterhalten. Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass sowohl die Entwicklung und Aggravation der atrialen Fibrose durch das Vorhofflimmern als auch die Erhaltung und Progression des Vorhofflimmerns durch die atriale Fibrose über die miR-133a-Expression reguliert wird.

Nishi et al. (2013) zeigten in ihren Experimenten an rechtsatrialem Gewebe von Maze-Patienten mit persistierendem Vorhofflimmern eine deutliche miR-21-, miR-23b- und miR199b-Expressionssteigerung und einen Zusammenhang zwischen der miR-21-Expression, der atrialen Fibrose und dem operativen Outcome von Maze-Prozeduren. Im

Gegensatz zu den Resultaten der vorliegenden Arbeit, ergaben sich jedoch keine signifikanten miR-133a-Expressionsunterschiede. Dagegen fanden Shan et al. (2009) in Hunden, bei denen das Vorhofflimmern durch Nikotin induziert wurde und in rechtsatrialem Gewebe von rauchenden Patienten mit Vorhofflimmern ebenfalls eine verminderte miR-133a-Expression und in Folge ein erhöhtes atriales Remodeling. Xiao et al. (2011) konnte die signifikant verringerte miR-133a-Expression in atrialem Gewebe von Patienten mit Vorhofflimmern und Mitralstenose bestätigen.

5.3.1. miR-133a als potentieller Biomarker

Die Diagnostik bei Vorhofflimmern stützt sich derzeit auf die klinische und apparative Diagnostik mittels 12-Kanal-EKG, Langzeit-Holter-EKG und Eventrekorderanalysen. Die teilweise aufwändige Routinediagnostik kann nur sinnvoll bei symptomatischen Patienten angewendet werden, sodass asymptomatisches Vorhofflimmern oftmals unentdeckt bleibt. Zur Minimierung kardiovaskulärer (vor allem thromboembolischer) und hämorrhagischer Komplikationen durch orale Antikoagulation, sozioökonomischer Konsequenzen sowie zur Steigerung der Erfolgsraten chirurgischer, interventioneller und rhythmologischer Therapien wäre ein verlässlicher Biomarker zur Identifikation eines Risikoprofils für Vorhofflimmern von großem Wert. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit könnte sich miR-133a als ein solcher Biomarker eignen. Die meisten in die atriale Fibrose involvierten microRNAs werden in einer Vielzahl von Zellen und Geweben exprimiert. Die herz- und skelettmuskelspezifische Expression, von miR-133a minimiert die Wahrscheinlichkeit von off-target-Phänomenen (Lagos-Quintana et al., 2002).

Die Messung von miR-133a im atrialen Gewebe ist aufgrund der Invasivität der erforderlichen Probenentnahme für die Nutzung als Biomarker eher ungeeignet. Sinnvoll und nutzbar zur weiteren Therapieplanung kann die intraoperative Probeentnahme z.B. im Rahmen von MAZE-Prozeduren sein.

Daher sollten zukünftige Studien mit dem Ziel der Etablierung von miR-133a als diagnostischer Marker auch auf die Analyse zirkulierender miR-133a fokussieren. MicroRNAs im Plasma sind stabil und widerstandsfähig gegenüber pH-Veränderungen, der Lagerung bei Raumtemperatur und wiederholtem Einfrieren und Auftauen (Chen et al., 2008; Mitchell et al., 2005) und daher potentiell als diagnostische Parameter geeignet (Halushka et al., 2019; Shen et al., 2019).

Bauters et al. (2013) konnten ein Jahr nach einem Myokardinfarkt, keine Assoziation der miR-133a-Konzentration im Plasma und der linksventrikulären Dysfunktion oder dem Remodeling nachweisen und kamen daher zu dem Schluss, dass zirkulierende miR-133a-Levels als Biomarker für linksventrikuläres Remodeling ungeeignet sind. Diese

Befunde müssen aber in detaillierteren Studien mit größeren Patientenkohorten evaluiert werden. Eine signifikante Konzentrationsminderung der mit atrialer Fibrose und Vorhofflimmern assoziierten miR-21 und miR-150 konnte bereits im Plasma von Patienten mit Vorhofflimmern nachgewiesen werden (Galenko et al., 2019; Liu et al., 2012; McManus et al., 2015).

Im Hinblick auf eine potentielle diagnostische Nutzbarkeit der miR-133a wäre in Folgeversuchen interessant, ob verminderte Expressionslevel ggf. bereits vor makroskopisch sichtbaren fibrotischen Umbauprozessen detektierbar sind.

Denkbare Einsatzmöglichkeiten von miR-133a wären:

1. miR-133a als Vorsorgeparameter
 - von atrialer Fibrose zur Prävention von Vorhofflimmern und Verringerung thromboembolischer Komplikationen und Mortalität
2. miR-133a als Diagnoseparameter
 - von symptomlosem oder paroxysmalem Vorhofflimmern z.B. bei Risikopersonen, erlaubt eine frühzeitige konservative oder chirurgische Intervention
3. miR-133a als Prognose- und Verlaufsparemeter im Rahmen des Therapiemanagements bei bekanntem Vorhofflimmern
 - a. zur Einschätzung der Behandlungsbedürftigkeit von Vorhofflimmern, erlaubt eine Minimierung bzw. Erfolgssteigerung chirurgischer Eingriffe
 - b. zur Entwicklung individueller Therapieschemata zur Behandlungsoptimierung
4. miR-133a als intraoperativer Marker
 - a. zur Einschätzung der Entwicklung des Vorhofflimmerns intra- und postoperativ, erlaubt den Einsatz von präventiven Maßnahmen bei zu erwartenden Komplikationen
 - b. zur weiteren Therapieplanung
5. miR-133a als Nachsorgeparameter
 - a. für Verlaufskontrollen operativer Eingriffe, beispielsweise nach MAZE-Prozeduren

5.3.2. miR-133a als potentielles therapeutisches Target

Als wichtiger Modulator der atrialen Fibrose könnte die miR-133a als Zielmolekül im Rahmen einer Upstream-Therapie von Vorhofflimmern geeignet sein. Eine Upstream-Therapie zielt darauf ab in krankheitsauslösende und -fördernde Mechanismen einzugreifen (Savelieva et al., 2011).

Eine denkbare Möglichkeit der therapeutischen Einflussnahme wäre der Einsatz von miR-133a-Mimetika. Mimetika sind synthetische doppelsträngige RNAs, die wie endogene microRNAs prozessiert werden und somit ihren Effekt imitieren (R and Fj, 2017; Shen et al., 2019; Wang, 2011). Die auf den Herz- und Skelettmuskel beschränkte miR-133a-Expression minimiert das Risiko von off-target-Effekten bei dem Einsatz von miR-133a-Mimetika. Diese Eigenschaft der miR-133a ist daher ein großer Vorteil gegenüber anderen microRNAs im Hinblick auf die Nutzung als therapeutisches Target.

Bei der therapeutischen Nutzung von miR-133a wäre auch der Einsatz von Adeno-assoziierten Virusvektoren (AAV-Vektoren), die die gewebespezifische Aufnahme von microRNA-Sequenzen bei geringer Immunogenität ermöglichen, sinnvoll (Bish et al., 2008; Wang et al., 2016). Aktuell befinden sich bereits einige microRNA-basierte Therapieverfahren (z.B. miR-122) unter Nutzung von miR-Antimimetika, miR-Mimetika und AAV-Vektoren in der präklinischen Entwicklung und klinischen Anwendung im Rahmen von Phase II Untersuchungen (R and Fj, 2017; Trang et al., 2010).

Der Einsatz von microRNAs im Rahmen der Therapie von Vorhofflimmern könnte helfen das Risiko von Behandlungsstrategien (z.B. intrazerebrale Hämorrhagien durch orale Antikoagulation) zu senken, ihre Effektivität zu erhöhen und die Anzahl der notwendigen invasiven und technisch komplexen Operationen zu minimieren bzw. ihren Erfolg zu steigern.

5.4. Schlussfolgerung und Perspektiven

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ergeben sich folgende Schlussfolgerungen:

1. miR-133a-Signalwege regulieren Gene von Strukturproteinen atrialer Fibrose bei Vorhofflimmern
2. miR-133a kann ein potentieller Biomarker bei Vorhofflimmern sein
3. miR-133a könnte ein potentielles therapeutisches Target bei Vorhofflimmern sein

5.5. Limitationen

Zur weiteren Evaluation der vorliegenden Ergebnisse sind Folgeversuche mit größeren Fallzahlen nötig.

In dieser Versuchsreihe wurden für die miR-133a-Expressionsanalysen und die Anfertigung der histologischen Präparate Gewebeproben unterschiedlicher Patienten verwendet. In Folgeversuchen wäre die Nutzung der gleichen Gewebeproben zur Überprüfung

Diskussion

der Korrelation zwischen dem miR-133a-Expressionsprofil und dem Fibrosierungszustand bei paroxysmalem und permanentem Vorhofflimmern sinnvoll.

Die Ergebnisse zum Einfluss einer miR-133a-Überexpression wurden in vitro an kardialen Fibroblasten gewonnen. Die Auswirkungen einer miR-133a-Überexpression in vivo wurden nicht analysiert.

Es wurde ausschließlich rechtsatriales Gewebe untersucht, daher sollten weiterführende Analysen links- und rechtsatriales humanes Myokard im Vergleich berücksichtigen. An Tiermodellen wurde festgestellt, dass fibrotische Umbauprozesse im Zuge von atrialem Remodeling in beiden Atrien im vergleichbaren Ausmaß stattfinden (Bauer et al., 2004; Kumagai et al., 2003).

Die bereits in der Diskussion erläuterten methodischen Limitationen durch die Nutzung von Zellen unterschiedlicher Spezies (Ratte/Human) und unterschiedlicher Transportsysteme (Plasmide/virale Vektoren) im Verlauf der Studie sollte in Folgeexperimenten für eine bessere Vergleichbarkeit und Konsistenz der Ergebnisse vermieden werden.

Ein mögliches Bias durch den Untersucher bei der Zellzählung im Rahmen der Proliferationsanalyse ist als ein methodischer Nachteil zu sehen und sollte durch eine verblindete Zählung durch eine unabhängige Person zur Erhöhung der Objektivität in Folgeversuchen limitiert werden.

6. Zusammenfassung

Vorhofflimmern ist die häufigste Herzrhythmusstörung. Die Erkrankung geht mit einer erhöhten Mortalität durch kardiovaskuläre Komplikationen einher. Die Prävention thromboembolischer Komplikationen mit oralen Antikoagulationen birgt ein erhöhtes Risiko für intrazerebrale Hämorrhagien. Die Diagnostik bei Vorhofflimmern stützt sich derzeit auf apparative Methoden (12-Kanal-EKG, Langzeit-Holter-EKG und Eventrekorderanalysen). Reliable Biomarker zur frühzeitigen Demaskierung von symptomlosem Vorhofflimmern stehen nicht zur Verfügung. Die beim symptomatischen Vorhofflimmern zum Einsatz kommende konventionelle chirurgische Therapie ist teilweise technisch komplex und hochinvasiv.

Bei der miR-133a handelt es sich um eine skelett- und herzmuskelspezifische microRNA, die an der Regulation von atrialem Remodeling beteiligt ist. Das atriale Remodeling induziert die zu einer Fibrose führenden Signalkaskaden. Die atriale Fibrose ist wiederum ein strukturelles Substrat für die Entstehung und den Erhalt von Vorhofflimmern. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse des Zusammenhangs zwischen der miR-133a-Expression, der atrialen Fibrose und dem Auftreten von Vorhofflimmern. Durch histologische Untersuchungen konnte das gemeinsame Auftreten von rechtsatrialer Fibrose und Vorhofflimmern bestätigt werden. Eine miR-133a-Überexpression in kardialen Fibroblasten inhibierte die mRNA-Expression der Fibrose-assoziierten Gene für Connective tissue growth factor (CTGF) und Kollagen-I und-III, die Proliferation der Zellen sowie ihre Differenzierung in Myofibroblasten. Damit konnte ein direkter Zusammenhang zwischen miR-133a und der atrialen Fibrose nachgewiesen werden. Weiter bestand ein Zusammenhang zwischen der miR-133a-Expression und dem Auftreten von Vorhofflimmern in humanem atrialen Gewebe von Patienten mit Vorhofflimmern. Dabei wurde gezeigt, dass die miR-133a-Expression im Verlauf der Entwicklung des Vorhofflimmerns (paroxysmal » persistierend) abnimmt.

Daher scheint es möglich, anhand des miR-133a-Expressionsmodells den Grad der atrialen Fibrose sowie die aktuelle Ausprägung und zukünftige Entwicklung des Vorhofflimmerns einzuschätzen. Möglicherweise eignet sich daher miR-133a sowohl als diagnostischer Marker als auch als therapeutisches Target. Eine frühzeitige Demaskierung von symptomlosem Vorhofflimmern könnte die kardiovaskulären Komplikationen, die Mortalität, die sozioökonomischen Konsequenzen sowie die Notwendigkeit invasiver Operationen minimieren bzw. die Erfolgsquoten chirurgischer Eingriffe steigern und gleichzeitig den langfristigen Therapieerfolg optimieren.

7. Summary

Atrial fibrillation is the most common arrhythmia in clinical practice and is associated with a high mortality and cardiovascular complications. Oral anticoagulant therapy for the prevention of thromboembolism is accompanied by a higher risk of intracerebral hemorrhage. Diagnosis of atrial fibrillation is based on instrumental methods (electrocardiogram, holter monitor and eventrecorder). Reliable biomarkers for early diagnosis of non-symptomatic atrial fibrillation are not available. The conventional surgical therapy, which is used for symptomatic atrial fibrillation is mostly complex and highly invasive.

miR-133a is a specific microRNA of the heart- and skeletal muscle, which is associated with the regulation of atrial remodeling. Atrial remodeling induces signaling cascades leading to atrial fibrosis. In turn, atrial fibrosis is a structural substrate of the development and maintenance of atrial fibrillation. The aim of this study was the analysis of the correlation between miR-133a-expression, atrial fibrosis and the occurrence of atrial fibrillation.

Histological examinations confirmed the relationship between fibrosis of the right atrium and atrial fibrillation. Overexpression of miR-133a in cardiac fibroblasts inhibited the mRNA-expression of fibrosis-associated genes for connective tissue growth factor (CTGF) and collagene I and III, cell proliferation and their differentiation into myofibroblasts. Thus, a direct relationship between miR-133a an atrial fibrosis was demonstrated. Furthermore, a direct connection between miR-133a-expression and atrial fibrillation was observed in atrial tissue of patients with atrial fibrillation. For the first time it was shown, that the miR-133a-expression decreases during the development of atrial fibrillation (paroxysmal » persistent).

In conclusion, it seems possible to use the miR-133a-expression pattern for the evaluation of the extent of atrial fibrosis and of the extent as well as future development of atrial fibrillation. Therefore, we see a potential role of miR-133a as a diagnostic marker and therapeutic target. The early discovery of asymptomatic atrial fibrillation may minimize cardiovascular complications, mortality, socio-economic consequences, the need for invasive surgery interventions as well as maximize the success of performed surgeries and at the same time may optimize long-term therapeutic success.

8. Abkürzungsverzeichnis

AF	Atrial fibrillation
Aqua bidest	Aqua bidestillata
Argo2	Argonaute 2 Protein
ATP	Adenosintriphosphat
att	attachment
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalievirus
COL1A1	Kollagen Typ 1 alpha 1
COL3A1	Kollagen Typ 3 alpha 1
Ct	cycle threshold
CTGF	connective tissue growth factor
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region 8
DME-Medium	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ds-Oligos	doppelsträngige Oligonukleotide
dT	deoxythymine
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogram
EmGFP	Emerald Green Fluorescent Protein
FN1	Fibronectin 1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O	Wasser
LB-Medium	Luria-Broth-Medium
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
miR	microRNA
miRISC	RNA-induced-silencing-complex
MnCl ₂	Manganchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NTC	No template control
Oligo	Oligonukleotid
PACT	PKR activation protein
PACT	PKR activation protein

Abkürzungsverzeichnis

parAF	paroxysmales Vorhofflimmern
PBS	Phosphate buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEI	Polyethylenimin
perAF	permanentes Vorhofflimmern
pre-miR	precursor microRNA
pri-miR	primary microRNA
qPCR	quantitative PCR
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RA	rechtes Atrium
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Ran	RAs-related Nuclear protein
RISC Komplex	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
SD	Standardabweichung
SEM	standard error of the mean
SR	Sinusrhythmus
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris Borat EDTA
TE-Puffer	TRIS EDTA-Puffer
TGF- β	Transforming growth factor- β
TRBP	TAR RNA binding protein
TRBP	RNA binding protein
UV	ultraviolett
VHF	Vorhofflimmern
α -SMA	α -smooth muscle actin

9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifizierung Vorhofflimmern

Tabelle 2: CHA₂DS₂-VASc-Score

Tabelle 3: 1x Tris-EDTA (TBE)-Puffer

Tabelle 4: 1x Tris-EDTA (TE)-Puffer

Tabelle 5: Probenpuffer

Tabelle 6: MINI Präparation

Tabelle 7: Bouin-Lösung

Tabelle 8: Sirius-Red-Lösung

Tabelle 9: LB-Medium

Tabelle 10: Low Salt LB Medium mit Blasticidin

Tabelle 11: DME-Medium komplettiert

Tabelle 12: DME-Medium für Fibroblasten

Tabelle 13: Zusammensetzung Poly-A-Tailing-Mastermix (1x)

Tabelle 14: Zusammensetzung RT-Reaktionsmix I (1x)

Tabelle 15: Zusammensetzung RT-Reaktionsmix II (1x)

Tabelle 16: Zusammensetzung PCR-Mastermix (1x)

Tabelle 17: Reaktionsbedingungen PCR

Tabelle 18: Zusammensetzung qPCR-Mastermix

Tabelle 19: Reaktionsbedingungen qPCR

Tabelle 20: Reaktionsmix zur Generierung doppelsträngiger Oligonukleotide

Tabelle 21: Zusammensetzung Ligationsansatz

Tabelle 22: Zusammensetzung Restriktionsansatz

Tabelle 23: Zusammensetzung des Restriktionsansatzes zur Vektorlinealisierung

Tabelle 24: Protokoll PeqGOLD-Gel-Extraction-Kit, Gel-Extraktion linealisierter
Plasmide

Tabelle 25: Zusammensetzung LR-Rekombinationsansatz

Tabelle 26: Sirius-Red-Färbeprotokoll

Tabelle 27: Fibrose-assoziierte Zielgene von miR-133a

Abbildung 1: Fibrosierung von rechtsatrialem Gewebe nach Maze-Prozedur

Abbildung 2: microRNA Biogenese

Abbildung 3: Vektorkarte pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR-133a

Abbildung 4: BP- und LR-Rekombinationen 221

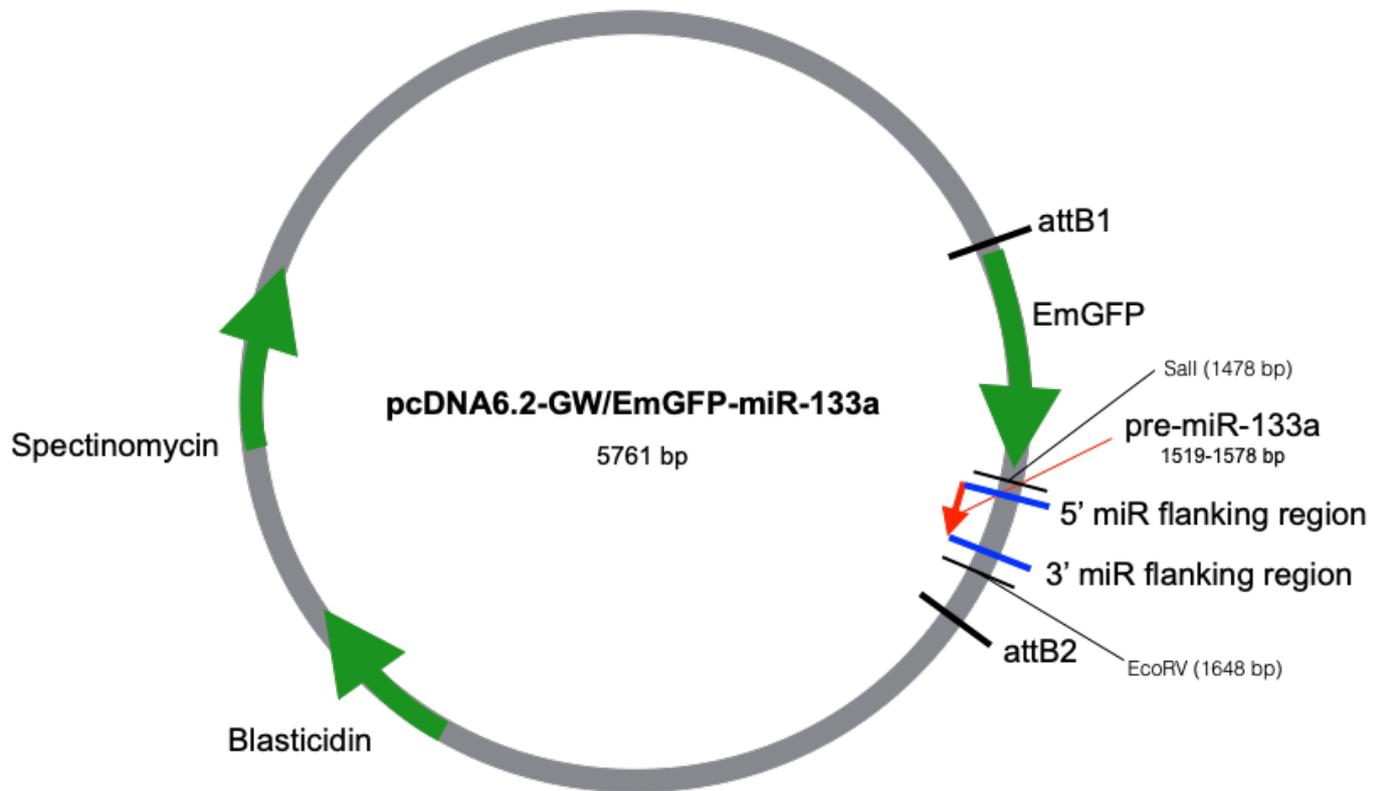
Abbildung 5: Vektorkarte pLenti6.4/CMV/V5/MSGW-EmGFP-miR-133a

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

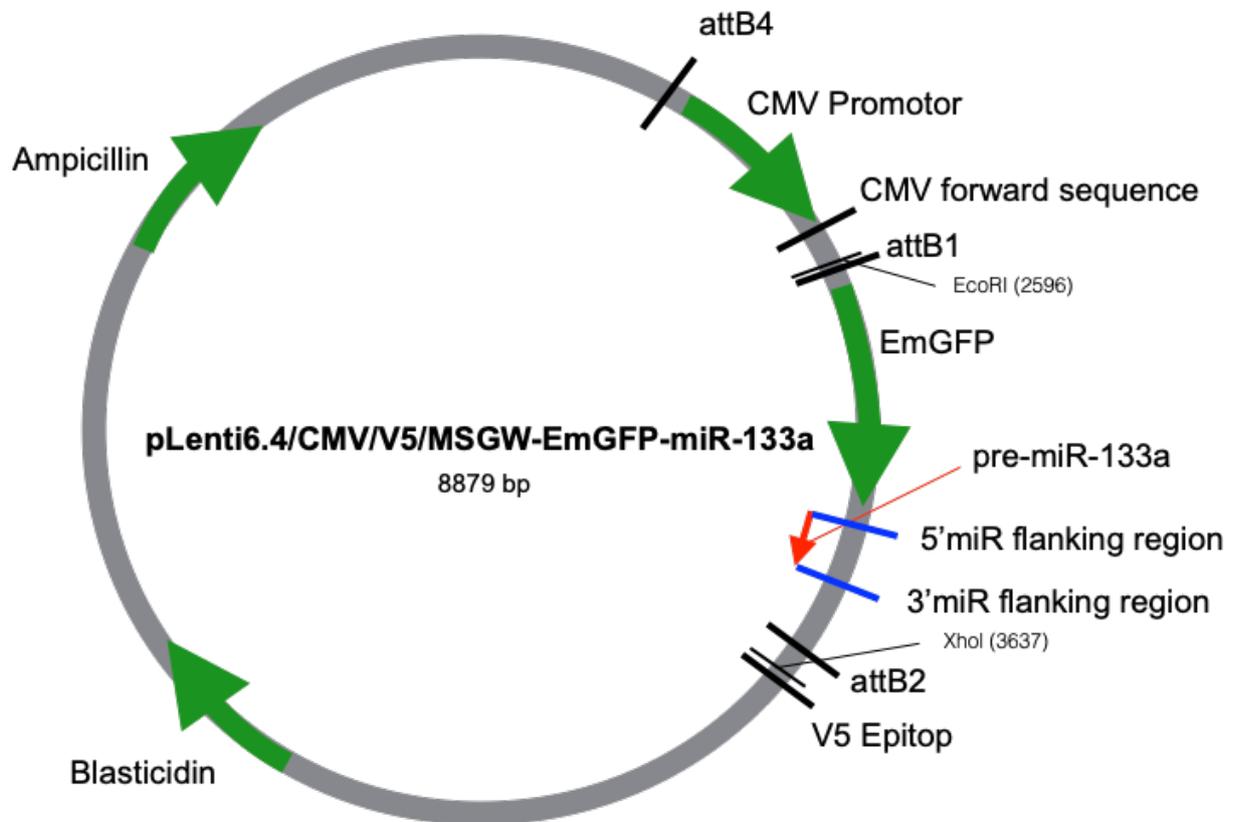
- Abbildung 6: Histologische Analyse von humanem rechtsatrialem Gewebe bei persistierendem Vorhofflimmern und Sinusrhythmus. Picro-Sirius-Red-Färbung zur Darstellung kollagener Fasern
- Abbildung 7: Rechtsatrialer Kollagen-Gehalt bei Patienten mit persistierendem Vorhofflimmern und Sinusrhythmus
- Abbildung 8: Nachweis der Transduktion von humanen kardialen Fibroblasten mit dem pLenti6.4/CMV/V5/MSGW-EmGFP-miR-133a Vektor unter dem Fluoreszenzmikroskop
- Abbildung 9: Expressionsanalyse (qRT-PCR) von COL1A1-mRNA bei miR-133a-Überexpression (pLenti6.4/R4R2/V5-DEST-Vektor) in humanen kardialen Fibroblasten
- Abbildung 10: Expressionsanalyse (qRT-PCR) von COL3A1-mRNA bei miR-133a-Überexpression (pLenti6.4/R4R2/V5-DEST-Vektor) in humanen kardialen Fibroblasten
- Abbildung 11: Expressionsanalyse (qRT-PCR) von CTGF-mRNA bei miR-133a-Überexpression (pLenti6.4/R4R2/V5-DEST-Vektor) in humanen kardialen Fibroblasten
- Abbildung 12: A) Pearson Korrelation der COL1A-mRNA1 und CTGF-mRNA Expression ($r = 0,8$) B) Pearson Korrelation der COL3A1-mRNA und CTGF-mRNA Expression ($r = 0,9$)
- Abbildung 13: Expressionsanalyse (qRT-PCR) von TGF- β -mRNA bei miR-133a-Überexpression (pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR-Plasmid) in kardialen Fibroblasten der Ratte
- Abbildung 14: Expressionsanalyse (qRT-PCR) von FN-1-mRNA bei miR-133a-Überexpression (pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR-Plasmid) in kardialen Fibroblasten der Ratte
- Abbildung 15: Expressionsanalyse (qRT-PCR) von α -SMA bei miR-133a-Überexpression (pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR-Plasmid) in kardialen Fibroblasten der Ratte
- Abbildung 16: Zellzahlanalyse bei miR-133a Überexpression (pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR-Plasmid) in kardialen Fibroblasten der Ratte
- Abbildung 17: Expressionsanalyse (qRT-PCR) von miR-133a in rechtsatrialem Gewebe von Patienten mit Sinusrhythmus, persistierendem- und paroxysmalem Vorhofflimmern

10. Anhang

10.1. Vektorkarte pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR-133a



10.2. Vektorkarte pLenti6.4/CMV/V5/MSGW-EmGFP-miR-133a



11. Literaturverzeichnis

- Adam, O., Löhlfelm, B., Thum, T., Gupta, S.K., Puhl, S.-L., Schäfers, H.-J., Böhm, M., Laufs, U., 2012. Role of miR-21 in the pathogenesis of atrial fibrosis. *Basic Res. Cardiol.* 107, 278. <https://doi.org/10.1007/s00395-012-0278-0>
- Ahlsson, A., Fengsrud, E., Bodin, L., Englund, A., 2010. Postoperative atrial fibrillation in patients undergoing aortocoronary bypass surgery carries an eightfold risk of future atrial fibrillation and a doubled cardiovascular mortality. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 37, 1353–1359. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2009.12.033>
- Ahmed, M.S., Øie, E., Vinge, L.E., Yndestad, A., Øystein Andersen, G., Andersson, Y., Attramadal, T., Attramadal, H., 2004. Connective tissue growth factor--a novel mediator of angiotensin II-stimulated cardiac fibroblast activation in heart failure in rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 36, 393–404. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2003.12.004>
- Ahmed, M.S., von Lueder, T.G., Øie, E., Kjekshus, H., Attramadal, H., 2005. Induction of myocardial connective tissue growth factor in pacing-induced heart failure in pigs. *Acta Physiol. Scand.* 184, 27–36. <https://doi.org/10.1111/j.1365-201X.2005.01416.x>
- Airaksinen, K.E.J., Grönberg, T., Nuotio, I., Nikkinen, M., Ylitalo, A., Biancari, F., Hartikainen, J.E.K., 2013. Thromboembolic complications after cardioversion of acute atrial fibrillation: the FinCV (Finnish CardioVersion) study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 62, 1187–1192. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.04.089>
- Akerman, A.W., Mukherjee, R., 2013. MicroRNAs emerging as mediators of remodeling with atrial fibrillation. *Heart Rhythm Off. J. Heart Rhythm Soc.* 10, 1010–1011. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2013.03.021>
- Akoum, N., Mahnkopf, C., Kholmovski, E.G., Brachmann, J., Marrouche, N.F., 2018. Age and sex differences in atrial fibrosis among patients with atrial fibrillation. *Eur. Eur. Pacing Arrhythm. Card. Electrophysiol. J. Work. Groups Card. Pacing Arrhythm. Card. Cell. Electrophysiol. Eur. Soc. Cardiol.* 20, 1086–1092. <https://doi.org/10.1093/europace/eux260>
- Allessie, M., Ausma, J., Schotten, U., 2002a. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc. Res.* 54, 230–246. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(02\)00258-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00258-4)
- Allessie, M., Ausma, J., Schotten, U., 2002b. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc. Res.* 54, 230–246. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(02\)00258-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00258-4)
- Andrade, J., Khairy, P., Dobrev, D., Nattel, S., 2014. The Clinical Profile and Pathophysiology

- of Atrial Fibrillation Relationships Among Clinical Features, Epidemiology, and Mechanisms. *Circ. Res.* 114, 1453–1468. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.303211>
- Aranki, S.F., Shaw, D.P., Adams, D.H., Rizzo, R.J., Couper, G.S., VanderVliet, M., Collins, J.J., Cohn, L.H., Burstin, H.R., 1996. Predictors of Atrial Fibrillation After Coronary Artery Surgery Current Trends and Impact on Hospital Resources. *Circulation* 94, 390–397. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.94.3.390>
- Ausma, J., Wijffels, M., Thoné, F., Wouters, L., Allessie, M., Borgers, M., 1997. Structural Changes of Atrial Myocardium due to Sustained Atrial Fibrillation in the Goat. *Circulation* 96, 3157–3163. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.96.9.3157>
- Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116, 281–297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- Bauer, A., McDonald, A.D., Donahue, J.K., 2004. Pathophysiological findings in a model of persistent atrial fibrillation and severe congestive heart failure. *Cardiovasc. Res.* 61, 764–770. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.12.013>
- Bellet, S., 1971. *Clinical Disorders of the Heart Beat*, 3rd ed.). ed. Lea &Febiger, Philadelphia.
- Benjamin, E.J., Levy, D., Vaziri, S.M., D'Agostino, R.B., Belanger, A.J., Wolf, P.A., 1994. Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort. The Framingham Heart Study. *JAMA* 271, 840–844.
- Benjamin, E.J., Wolf, P.A., D'Agostino, R.B., Silbershatz, H., Kannel, W.B., Levy, D., 1998. Impact of Atrial Fibrillation on the Risk of Death The Framingham Heart Study. *Circulation* 98, 946–952. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.98.10.946>
- Bish, L.T., Morine, K., Sleeper, M.M., Sanmiguel, J., Wu, D., Gao, G., Wilson, J.M., Sweeney, H.L., 2008. Adeno-associated virus (AAV) serotype 9 provides global cardiac gene transfer superior to AAV1, AAV6, AAV7, and AAV8 in the mouse and rat. *Hum. Gene Ther.* 19, 1359–1368. <https://doi.org/10.1089/hum.2008.123>
- Black, I.W., Fatkin, D., Sagar, K.B., Khandheria, B.K., Leung, D.Y., Galloway, J.M., Feneley, M.P., Walsh, W.F., Grimm, R.A., Stollberger, C., 1994. Exclusion of atrial thrombus by transesophageal echocardiography does not preclude embolism after cardioversion of atrial fibrillation. A multicenter study. *Circulation* 89, 2509–2513. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.89.6.2509>
- Blenkiron, C., Miska, E.A., 2007. miRNAs in cancer: approaches, aetiology, diagnostics and therapy. *Hum. Mol. Genet.* 16, R106–R113. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm056>
- Blom, I.E., Goldschmeding, R., Leask, A., 2002. Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy? *Matrix Biol.* 21, 473–482. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(02\)00055-0](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(02)00055-0)
- Bogousslavsky, J., Van Melle, G., Regli, F., Kappenberger, L., 1990. Pathogenesis of anterior circulation stroke in patients with nonvalvular atrial fibrillation: the Lausanne Stroke

- Registry. *Neurology* 40, 1046–1050.
- Bohnsack, M.T., Czaplinski, K., Gorlich, D., 2004. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA N. Y. N* 10, 185–191.
- Boldt, A., Wetzel, U., Lauschke, J., Weigl, J., Gummert, J., Hindricks, G., Kottkamp, H., Dhein, S., 2004. Fibrosis in left atrial tissue of patients with atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease. *Heart* 90, 400–405. <https://doi.org/10.1136/hrt.2003.015347>
- Bonnaud, P., Margetts, P.J., Kolb, M., Haberberger, T., Kelly, M., Robertson, J., Gauldie, J., 2003. Adenoviral Gene Transfer of Connective Tissue Growth Factor in the Lung Induces Transient Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168, 770–778. <https://doi.org/10.1164/rccm.200210-1254OC>
- Boon, R.A., Iekushi, K., Lechner, S., Seeger, T., Fischer, A., Heydt, S., Kaluza, D., Tréguer, K., Carmona, G., Bonauer, A., Horrevoets, A.J.G., Didier, N., Girmatsion, Z., Biliczki, P., Ehrlich, J.R., Katus, H.A., Müller, O.J., Potente, M., Zeiher, A.M., Hermeking, H., Dimmeler, S., 2013. MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function. *Nature* 495, 107–110. <https://doi.org/10.1038/nature11919>
- Bowers, S.L.K., Banerjee, I., Baudino, T.A., 2010. The extracellular matrix: At the center of it all. *J. Mol. Cell. Cardiol., Special Issue: Extracellular Matrix* 48, 474–482. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.08.024>
- Brigstock, D.R., 2010. Connective tissue growth factor (CCN2, CTGF) and organ fibrosis: lessons from transgenic animals. *J. Cell Commun. Signal.* 4, 1–4. <https://doi.org/10.1007/s12079-009-0071-5>
- Burstein, B., Comtois, P., Michael, G., Nishida, K., Villeneuve, L., Yeh, Y.-H., Nattel, S., 2009. Changes in Connexin Expression and the Atrial Fibrillation Substrate in Congestive Heart Failure. *Circ. Res.* 105, 1213–1222. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.183400>
- Burstein, B., Nattel, S., 2008. Atrial Fibrosis: Mechanisms and Clinical Relevance in Atrial Fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 51, 802–809. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.09.064>
- Cai, X., Hagedorn, C.H., Cullen, B.R., 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA N. Y. N* 10, 1957–1966. <https://doi.org/10.1261/rna.7135204>
- Calderone, A., Bel-Hadj, S., Drapeau, J., El-Helou, V., Gosselin, H., Clement, R., Villeneuve, L., 2006. Scar myofibroblasts of the infarcted rat heart express natriuretic peptides. *J. Cell. Physiol.* 207, 165–173. <https://doi.org/10.1002/jcp.20548>
- Calkins, H., Kuck, K.H., Cappato, R., Brugada, J., Camm, A.J., Chen, S.-A., Crijns, H.J.G., Damiano, R.J., Davies, D.W., DiMarco, J., Edgerton, J., Ellenbogen, K., Ezekowitz, M.D., Haines, D.E., Haissaguerre, M., Hindricks, G., Iesaka, Y., Jackman, W., Jalife, J., Jais,

- P., Kalman, J., Keane, D., Kim, Y.-H., Kirchhof, P., Klein, G., Kottkamp, H., Kumagai, K., Lindsay, B.D., Mansour, M., Marchlinski, F.E., McCarthy, P.M., Mont, J.L., Morady, F., Nademanee, K., Nakagawa, H., Natale, A., Nattel, S., Packer, D.L., Pappone, C., Prystowsky, E., Raviele, A., Reddy, V., Ruskin, J.N., Shemin, R.J., Tsao, H.-M., Wilber, D., 2012. 2012 HRS/EHRA/ECAS expert consensus statement on catheter and surgical ablation of atrial fibrillation: recommendations for patient selection, procedural techniques, patient management and follow-up, definitions, endpoints, and research trial design. *J. Interv. Card. Electrophysiol. Int. J. Arrhythm. Pacing* 33, 171–257. <https://doi.org/10.1007/s10840-012-9672-7>
- Camelliti, P., Borg, T.K., Kohl, P., 2005. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* 65, 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.08.020>
- Camm, A.J., Lip, G.Y.H., De Caterina, R., Savelieva, I., Atar, D., Hohnloser, S.H., Hindricks, G., Kirchhof, P., ESC Committee for Practice Guidelines-CPG, Document Reviewers, 2012. 2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation: an update of the 2010 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation—developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association. *Eur. Eur. Pacing Arrhythm. Card. Electrophysiol. J. Work. Groups Card. Pacing Arrhythm. Card. Cell. Electrophysiol. Eur. Soc. Cardiol.* 14, 1385–1413. <https://doi.org/10.1093/euro-pace/eus305>
- Carè, A., Catalucci, D., Felicetti, F., Bonci, D., Addario, A., Gallo, P., Bang, M.-L., Segnalini, P., Gu, Y., Dalton, N.D., Elia, L., Latronico, M.V.G., Høydal, M., Autore, C., Russo, M.A., Dorn, G.W., Ellingsen, O., Ruiz-Lozano, P., Peterson, K.L., Croce, C.M., Peschle, C., Condorelli, G., 2007. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat. Med.* 13, 613–618. <https://doi.org/10.1038/nm1582>
- Carver, W., Nagpal, M.L., Nachtigal, M., Borg, T.K., Terracio, L., 1991. Collagen expression in mechanically stimulated cardiac fibroblasts. *Circ. Res.* 69, 116–122. <https://doi.org/10.1161/01.RES.69.1.116>
- Castoldi, G., di Gioia, C.R.T., Bombardi, C., Catalucci, D., Corradi, B., Gualazzi, M.G., Leopizzi, M., Mancini, M., Zerbini, G., Condorelli, G., Stella, A., 2012. MiR-133a regulates collagen 1A1: Potential role of miR-133a in myocardial fibrosis in angiotensin II-dependent hypertension. *J. Cell. Physiol.* 227, 850–856. <https://doi.org/10.1002/jcp.22939>
- Catalucci, D., Gallo, P., Condorelli, G., 2009. MicroRNAs in Cardiovascular Biology and Heart Disease. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2, 402–408. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENET-ICS.109.857425>
- Chaldoupi, S.-M., Loh, P., Hauer, R.N.W., de Bakker, J.M.T., van Rijen, H.V.M., 2009. The role of connexin40 in atrial fibrillation. *Cardiovasc. Res.* 84, 15–23. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp203>

- Chapman, D., Weber, K.T., Eghbali, M., 1990. Regulation of fibrillar collagen types I and III and basement membrane type IV collagen gene expression in pressure overloaded rat myocardium. *Circ. Res.* 67, 787–794. <https://doi.org/10.1161/01.RES.67.4.787>
- Chen, J.-F., Mandel, E.M., Thomson, J.M., Wu, Q., Callis, T.E., Hammond, S.M., Conlon, F.L., Wang, D.-Z., 2006. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat. Genet.* 38, 228–233. <https://doi.org/10.1038/ng1725>
- Chen, M.M., Lam, A., Abraham, J.A., Schreiner, G.F., Joly, A.H., 2000. CTGF Expression is Induced by TGF- β in Cardiac Fibroblasts and Cardiac Myocytes: a Potential Role in Heart Fibrosis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32, 1805–1819. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2000.1215>
- Chen, S., Puthanveetil, P., Feng, B., Matkovich, S.J., Dorn II, G.W., Chakrabarti, S., 2014. Cardiac miR-133a overexpression prevents early cardiac fibrosis in diabetes. *J. Cell. Mol. Med.* 18, 415–421. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12218>
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Yujing, Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Zhang, Yan, Wang, Jin, Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., Zhang, Juanbin, Li, R., Zhang, H., Shang, X., Gong, T., Ning, G., Wang, Jun, Zen, K., Zhang, Junfeng, Zhang, C.-Y., 2008. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 18, 997–1006. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.282>
- Chen, Y., Abraham, D.J., Shi-Wen, X., Pearson, J.D., Black, C.M., Lyons, K.M., Leask, A., 2004. CCN2 (connective tissue growth factor) promotes fibroblast adhesion to fibronectin. *Mol. Biol. Cell* 15, 5635–5646. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04-06-0490>
- Chen, Y., Wakili, R., Xiao, J., Wu, C.-T., Luo, X., Clauss, S., Dawson, K., Qi, X., Naud, P., Shi, Y.-F., Tardif, J.-C., Kääb, S., Dobrev, D., Nattel, S., 2014. Detailed characterization of microRNA changes in a canine heart failure model: Relationship to arrhythmogenic structural remodeling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 77, 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.10.001>
- Chen, Y.-H., Xu, S.-J., Bendahhou, S., Wang, X.-L., Wang, Y., Xu, W.-Y., Jin, H.-W., Sun, H., Su, X.-Y., Zhuang, Q.-N., Yang, Y.-Q., Li, Y.-B., Liu, Y., Xu, H.-J., Li, X.-F., Ma, N., Mou, C.-P., Chen, Z., Barhanin, J., Huang, W., 2003. KCNQ1 Gain-of-Function Mutation in Familial Atrial Fibrillation. *Science* 299, 251–254. <https://doi.org/10.1126/science.1077771>
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., Shiekhattar, R., 2005. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436, 740–744. <https://doi.org/10.1038/nature03868>
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.

[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)

- Chuva de Sousa Lopes, S.M., Feijen, A., Korving, J., Korchynskyi, O., Larsson, J., Karlsson, S., ten Dijke, P., Lyons, K.M., Goldschmeding, R., Doevendans, P., Mummery, C.L., 2004. Connective tissue growth factor expression and Smad signaling during mouse heart development and myocardial infarction. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 231, 542–550. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20162>
- Colilla, S., Crow, A., Petkun, W., Singer, D.E., Simon, T., Liu, X., 2013. Estimates of current and future incidence and prevalence of atrial fibrillation in the U.S. adult population. *Am. J. Cardiol.* 112, 1142–1147. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2013.05.063>
- Corda, S., Samuel, J.L., Rappaport, L., 2000. Extracellular matrix and growth factors during heart growth. *Heart Fail. Rev.* 5, 119–130. <https://doi.org/10.1023/A:1009806403194>
- Cotter, P.E., Martin, P.J., Ring, L., Warburton, E.A., Belham, M., Pugh, P.J., 2013. Incidence of atrial fibrillation detected by implantable loop recorders in unexplained stroke. *Neurology* 80, 1546–1550. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31828f1828>
- Cox, J.L., 2004. Cardiac surgery for arrhythmias. *Heart Rhythm Off. J. Heart Rhythm Soc.* 1, 85C-101C.
- Cox, J.L., Schuessler, R.B., D'Agostino, H.J., Stone, C.M., Chang, B.C., Cain, M.E., Corr, P.B., Boineau, J.P., 1991. The surgical treatment of atrial fibrillation. III. Development of a definitive surgical procedure. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 101, 569–583.
- Cox, J.L., Schuessler, R.B., Lappas, D.G., Boineau, J.P., 1996. An 8 1/2-year clinical experience with surgery for atrial fibrillation. *Ann. Surg.* 224, 267–275.
- Daccarett, M., Badger, T.J., Akoum, N., Burgon, N.S., Mahnkopf, C., Vergara, G., Kholmovski, E., McGann, C.J., Parker, D., Brachmann, J., MacLeod, R.S., Marrouche, N.F., 2011. Association of Left Atrial Fibrosis Detected by Delayed-Enhancement Magnetic Resonance Imaging and the Risk of Stroke in Patients With Atrial Fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 57, 831–838. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.09.049>
- Damiano Jr, R.J., Gaynor, S.L., Bailey, M., Prasad, S., Cox, J.L., Boineau, J.P., Schuessler, R.P., 2003. The long-term outcome of patients with coronary disease and atrial fibrillation undergoing the cox maze procedure. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 126, 2016–2021. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2003.07.006>
- Daniels, A., Van Bilsen, M., Goldschmeding, R., Van Der Vusse, G.J., Van Nieuwenhoven, F.A., 2009. Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis. *Acta Physiol.* 195, 321–338. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2008.01936.x>
- De Vos, C.B., Breithardt, G., Camm, A.J., Dorian, P., Kowey, P.R., Le Heuzey, J.-Y., Naditch-Brûlé, L., Prystowsky, E.N., Schwartz, P.J., Torp-Pedersen, C., Weintraub, W.S., Crijns, H.J., 2012. Progression of atrial fibrillation in the REgistry on Cardiac rhythm disORDers assessing the control of Atrial Fibrillation cohort: clinical correlates and the effect of

- rhythm-control therapy. *Am. Heart J.* 163, 887–893.
<https://doi.org/10.1016/j.ahj.2012.02.015>
- Dean, R.G., Balding, L.C., Candido, R., Burns, W.C., Cao, Z., Twigg, S.M., Burrell, L.M., 2005. Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis after myocardial infarction. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 53, 1245–1256.
<https://doi.org/10.1369/jhc.4A6560.2005>
- Desmoulière, A., Geinoz, A., Gabbiani, F., Gabbiani, G., 1993. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J. Cell Biol.* 122, 103–111.
- Djoussé, L., Levy, D., Benjamin, E.J., Blease, S.J., Russ, A., Larson, M.G., Massaro, J.M., D'Agostino, R.B., Wolf, P.A., Ellison, R.C., 2004. Long-term alcohol consumption and the risk of atrial fibrillation in the Framingham Study. *Am. J. Cardiol.* 93, 710–713.
<https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2003.12.004>
- Dorn, L.E., Petrosino, J.M., Wright, P., Accornero, F., 2018. CTGF/CCN2 is an autocrine regulator of cardiac fibrosis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 121, 205–211.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.07.130>
- Dostal, D., Glaser, S., Baudino, T.A., 2015. Cardiac fibroblast physiology and pathology. *Compr. Physiol.* 5, 887–909. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140053>
- Du, L., Qin, M., Yi, Y., Chen, X., Jiang, W., Zhou, L., Zhang, D., Xu, K., Yang, Y., Li, C., Liu, Y., Liu, X., Duan, S.-Z., 2017. Eplerenone Prevents Atrial Fibrosis via the TGF- β Signaling Pathway. *Cardiology* 138, 55–62. <https://doi.org/10.1159/000471918>
- Duisters, R.F., Tijssen, A.J., Schroen, B., Leenders, J.J., Lentink, V., Made, I. van der, Herias, V., Leeuwen, R.E. van, Schellings, M.W., Barenbrug, P., Maessen, J.G., Heymans, S., Pinto, Y.M., Creemers, E.E., 2009. miR-133 and miR-30 Regulate Connective Tissue Growth Factor Implications for a Role of MicroRNAs in Myocardial Matrix Remodeling. *Circ. Res.* 104, 170–178. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.182535>
- Dunning, J., Nagendran, M., Alfieri, O.R., Elia, S., Kappetein, A.P., Lockowandt, U., Sarris, G.E., Kolh, P.H., Committee, on behalf of the E.C.G., Mahiben, M., Nicholas, S., Christian, C., Phillip, X., Robert, G., Yang, C., David, M., Sumoyee, B., 2013. Guideline for the surgical treatment of atrial fibrillation. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 44, 777–791.
<https://doi.org/10.1093/ejcts/ezt413>
- el Azzouzi, H., Leptidis, S., Dirx, E., Hoeks, J., van Bree, B., Brand, K., McClellan, E.A., Poels, E., Sluimer, J.C., van den Hoogenhof, M.M.G., Armand, A.-S., Yin, X., Langley, S., Bourajaj, M., Olieslagers, S., Krishnan, J., Vooijs, M., Kurihara, H., Stubbs, A., Pinto, Y.M., Krek, W., Mayr, M., Martins, P.A. da Costa, Schrauwen, P., De Windt, L.J., 2013. The Hypoxia-Inducible MicroRNA Cluster miR-199a~214 Targets Myocardial PPAR δ and Impairs Mitochondrial Fatty Acid Oxidation. *Cell Metab.* 18, 341–354.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.08.009>

- Falk, R.H., 2001. Atrial Fibrillation. *N. Engl. J. Med.* 344, 1067–1078.
<https://doi.org/10.1056/NEJM200104053441407>
- Fang, M.C., Chang, Y., Hylek, E.M., Rosand, J., Greenberg, S.M., Go, A.S., Singer, D.E., 2004. Advanced age, anticoagulation intensity, and risk for intracranial hemorrhage among patients taking warfarin for atrial fibrillation. *Ann. Intern. Med.* 141, 745–752.
- Fatkin, D., Kelly, R.P., Feneley, M.P., 1994. Relations between left atrial appendage blood flow velocity, spontaneous echocardiographic contrast and thromboembolic risk in vivo. *J. Am. Coll. Cardiol.* 23, 961–969.
- Feinberg, W.M., Blackshear, J.L., Laupacis, A., Kronmal, R., Hart, R.G., 1995. Prevalence, age distribution, and gender of patients with atrial fibrillation. Analysis and implications. *Arch. Intern. Med.* 155, 469–473.
- Ferrari, R., Bertini, M., Blomstrom-Lundqvist, C., Dobrev, D., Kirchhof, P., Pappone, C., Ravens, U., Tamargo, J., Tavazzi, L., Vicedomini, G.G., 2016. An update on atrial fibrillation in 2014: From pathophysiology to treatment. *Int. J. Cardiol.* 203, 22–29.
<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.10.089>
- Freedman, B., Potpara, T.S., Lip, G.Y.H., 2016. Stroke prevention in atrial fibrillation. *Lancet Lond. Engl.* 388, 806–817. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31257-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31257-0)
- Frost L, Vestergaard P, 2004. Alcohol and risk of atrial fibrillation or flutter: A cohort study. *Arch. Intern. Med.* 164, 1993–1998. <https://doi.org/10.1001/archinte.164.18.1993>
- Fuster, V., Rydén, L.E., Cannom, D.S., Crijns, H.J., Curtis, A.B., Ellenbogen, K.A., Halperin, J.L., Kay, G.N., Le Huez, J.-Y., Lowe, J.E., Olsson, S.B., Prystowsky, E.N., Tamargo, J.L., Wann, L.S., 2011. 2011 ACCF/AHA/HRS Focused Updates Incorporated Into the ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation: A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines Developed in partnership with the European Society of Cardiology and in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *J. Am. Coll. Cardiol.* 57, e101–e198.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.09.013>
- Gabbiani, G., 2003a. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J. Pathol.* 200, 500–503. <https://doi.org/10.1002/path.1427>
- Gabbiani, G., 2003b. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J. Pathol.* 200, 500–503. <https://doi.org/10.1002/path.1427>
- Gabbiani, G., Hirschel, B.J., Ryan, G.B., Statkov, P.R., Majno, G., 1972. Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function. *J. Exp. Med.* 135, 719–734.
- Galenko, O., Jacobs, V., Knight, S., Taylor, M., Cutler, M.J., Muhlestein, J.B., Carlquist, J.L., Knowlton, K.U., Jared Bunch, T., 2019. The role of microRNAs in the development,

- regulation, and treatment of atrial fibrillation. *J. Interv. Card. Electrophysiol. Int. J. Arrhythm. Pacing* 55, 297–305. <https://doi.org/10.1007/s10840-018-0495-z>
- Gaynor, S.L., Diodato, M.D., Prasad, S.M., Ishii, Y., Schuessler, R.B., Bailey, M.S., Damiano, N.R., Bloch, J.B., Moon, M.R., Damiano, R.J., 2004. A prospective, single-center clinical trial of a modified Cox maze procedure with bipolar radiofrequency ablation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 128, 535–542. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2004.02.044>
- Gillinov, A.M., McCarthy, P.M., 2004. Advances in the surgical treatment of atrial fibrillation. *Cardiol. Clin.* 22, 147–157.
- Go, A.S., Hylek, E.M., Phillips, K.A., Chang, Y., Henault, L.E., Selby, J.V., Singer, D.E., 2001. Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *JAMA* 285, 2370–2375.
- Gollob, M.H., 2008. Begetting atrial fibrillation: Connexins and arrhythmogenesis. *Heart Rhythm Off. J. Heart Rhythm Soc.* 5, 888–891. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2007.11.023>
- Goren, Y., Kushnir, M., Zafir, B., Tabak, S., Lewis, B.S., Amir, O., 2012. Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 14, 147–154. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hfr155>
- Graham, H.K., Horn, M., Trafford, A.W., 2008. Extracellular matrix profiles in the progression to heart failure. *Acta Physiol.* 194, 3–21. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2008.01881.x>
- Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N., Shiekhattar, R., 2005. Human RISC Couples MicroRNA Biogenesis and Posttranscriptional Gene Silencing. *Cell* 123, 631–640. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.022>
- Gregory, R.I., Yan, K.-P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., Shiekhattar, R., 2004. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432, 235–240. <https://doi.org/10.1038/nature03120>
- Gy, L., R, N., R, P., Da, L., Hj, C., 2010. Refining Clinical Risk Stratification for Predicting Stroke and Thromboembolism in Atrial Fibrillation Using a Novel Risk Factor-Based Approach: The Euro Heart Survey on Atrial Fibrillation [WWW Document]. *Chest*. <https://doi.org/10.1378/chest.09-1584>
- Hall-Glenn, F., De Young, R.A., Huang, B.-L., van Handel, B., Hofmann, J.J., Chen, T.T., Choi, A., Ong, J.R., Benya, P.D., Mikkola, H., Iruela-Arispe, M.L., Lyons, K.M., 2012. CCN2/Connective Tissue Growth Factor Is Essential for Pericyte Adhesion and Endothelial Basement Membrane Formation during Angiogenesis. *PLoS ONE* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030562>
- Halushka, P.V., Goodwin, A.J., Halushka, M.K., 2019. Opportunities for microRNAs in the Crowded Field of Cardiovascular Biomarkers. *Annu. Rev. Pathol.* 14, 211–238. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012827>

- Hansen, B.J., Zhao, J., Fedorov, V.V., 2017. Fibrosis and Atrial Fibrillation: Computerized and Optical Mapping; A View into the Human Atria at Submillimeter Resolution. *JACC Clin. Electrophysiol.* 3, 531–546. <https://doi.org/10.1016/j.jacep.2017.05.002>
- Hansen, M.L., Jepsen, R.M.H.G., Olesen, J.B., Ruwald, M.H., Karasoy, D., Gislason, G.H., Hansen, J., Køber, L., Husted, S., Torp-Pedersen, C., 2015. Thromboembolic risk in 16 274 atrial fibrillation patients undergoing direct current cardioversion with and without oral anticoagulant therapy. *Eur. Eur. Pacing Arrhythm. Card. Electrophysiol. J. Work. Groups Card. Pacing Arrhythm. Card. Cell. Electrophysiol. Eur. Soc. Cardiol.* 17, 18–23. <https://doi.org/10.1093/europace/euu189>
- Hart, R.G., Tonarelli, S.B., Pearce, L.A., 2005. Avoiding central nervous system bleeding during antithrombotic therapy: recent data and ideas. *Stroke J. Cereb. Circ.* 36, 1588–1593. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000170642.39876.f2>
- Heeringa, J., van der Kuip, D.A.M., Hofman, A., Kors, J.A., van Herpen, G., Stricker, B.H.C., Stijnen, T., Lip, G.Y.H., Witteman, J.C.M., 2006. Prevalence, incidence and lifetime risk of atrial fibrillation: the Rotterdam study. *Eur. Heart J.* 27, 949–953. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehi825>
- Heijman, J., Algalarrondo, V., Voigt, N., Melka, J., Wehrens, X.H.T., Dobrev, D., Nattel, S., 2016. The value of basic research insights into atrial fibrillation mechanisms as a guide to therapeutic innovation: a critical analysis. *Cardiovasc. Res.* 109, 467–479. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv275>
- Heimer, R., Bashey, R.I., Kyle, J., Jimenez, S.A., 1995. TGF- β modulates the synthesis of proteoglycans by myocardial fibroblasts in culture. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27, 2191–2198. [https://doi.org/10.1016/S0022-2828\(95\)91479-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2828(95)91479-X)
- Hobbs, W.J.C., Fynn, S., Todd, D.M., Wolfson, P., Galloway, M., Garratt, C.J., 2000. Reversal of Atrial Electrical Remodeling After Cardioversion of Persistent Atrial Fibrillation in Humans. *Circulation* 101, 1145–1151. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.10.1145>
- Hugon, J., Paquet, C., 2008. Targeting miRNAs in Alzheimer's disease. *Expert Rev. Neurother.* 8, 1615–1616. <https://doi.org/10.1586/14737175.8.11.1615>
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Bálint, E., Tuschl, T., Zamore, P.D., 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293, 834–838. <https://doi.org/10.1126/science.1062961>
- Hynes, R., 1985. Molecular Biology of Fibronectin. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1, 67–90. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.01.110185.000435>
- Ihn, H., 2002. Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF. *Curr. Opin. Rheumatol.* 14, 681–685.
- Iraqi, W., Rossignol, P., Angioi, M., Fay, R., Nuée, J., Ketelslegers, J.M., Vincent, J., Pitt, B., Zannad, F., 2009. Extracellular Cardiac Matrix Biomarkers in Patients With Acute

- Myocardial Infarction Complicated by Left Ventricular Dysfunction and Heart Failure Insights From the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) Study. *Circulation* 119, 2471–2479. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.809194>
- Iruela-Arispe, M.L., Sage, E.H., 1991. Expression of type VIII collagen during morphogenesis of the chicken and mouse heart. *Dev. Biol.* 144, 107–118. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(91\)90483-J](https://doi.org/10.1016/0012-1606(91)90483-J)
- Ivkovic, S., Yoon, B.S., Popoff, S.N., Safadi, F.F., Libuda, D.E., Stephenson, R.C., Daluiski, A., Lyons, K.M., 2003. Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Dev. Camb. Engl.* 130, 2779–2791.
- Jai's, P., Hai'ssaguerre, M., Shah, D.C., Chouairi, S., Gencel, L., Hocini, M., Cle'menty, J., 1997. A Focal Source of Atrial Fibrillation Treated by Discrete Radiofrequency Ablation. *Circulation* 95, 572–576. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.95.3.572>
- Jansohn, M., Rothhämel, S., Aigner, A. (Eds.), 2012. *Gentechnische Methoden: eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, 5. Aufl. ed. Spektrum Akad. Verl, Heidelberg.
- January, C.T., Wann, L.S., Alpert, J.S., Calkins, H., Cigarroa, J.E., Cleveland, J.C., Conti, J.B., Ellinor, P.T., Ezekowitz, M.D., Field, M.E., Murray, K.T., Sacco, R.L., Stevenson, W.G., Tchou, P.J., Tracy, C.M., Yancy, C.W., 2014. 2014 AHA/ACC/HRS Guideline for the Management of Patients With Atrial Fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 64, e1–e76. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.03.022>
- Kainuma, S., Masai, T., Yoshitatsu, M., Miyagawa, S., Yamauchi, T., Takeda, K., Morii, E., Sawa, Y., 2011. Advanced left-atrial fibrosis is associated with unsuccessful maze operation for valvular atrial fibrillation. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 40, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2010.11.008>
- Kambis, T.N., Shahshahan, H.R., Kar, S., Yadav, S.K., Mishra, P.K., 2019. Transgenic Expression of miR-133a in the Diabetic Akita Heart Prevents Cardiac Remodeling and Cardiomyopathy. *Front. Cardiovasc. Med.* 6. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00045>
- Kanekar, S., Hirozanne, T., Terracio, L., Borg, T.K., 1998. Cardiac Fibroblasts: Form and Function. *Cardiovasc. Pathol.* 7, 127–133. [https://doi.org/10.1016/S1054-8807\(97\)00119-1](https://doi.org/10.1016/S1054-8807(97)00119-1)
- Kannel, W.B., Wolf, P.A., Benjamin, E.J., Levy, D., 1998. Prevalence, incidence, prognosis, and predisposing conditions for atrial fibrillation: population-based estimates. *Am. J. Cardiol.* 82, 2N–9N.
- Kerr, C., Boone, J., Connolly, S., Greene, M., Klein, G., Sheldon, R., Talajic, M., 1996. Follow-up of atrial fibrillation: The initial experience of the Canadian Registry of Atrial Fibrillation. *Eur. Heart J.* 17 Suppl C, 48–51.
- Khairy, P., Nattel, S., 2002. New insights into the mechanisms and management of atrial

- fibrillation. *CMAJ Can. Med. Assoc. J. J. Assoc. Medicale Can.* 167, 1012–1020.
- Khan, R., Sheppard, R., 2006. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor- β 1 in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology* 118, 10–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02336.x>
- Kirchhof, P., Benussi, S., Kotecha, D., Ahlsson, A., Atar, D., Casadei, B., Castella, M., Diener, H.-C., Heidbuchel, H., Hendriks, J., Hindricks, G., Manolis, A.S., Oldgren, J., Popescu, B.A., Schotten, U., Van Putte, B., Vardas, P., Agewall, S., Camm, J., Baron Esquivias, G., Budts, W., Carerj, S., Casselman, F., Coca, A., De Caterina, R., Deffereos, S., Dobrev, D., Ferro, J.M., Filippatos, G., Fitzsimons, D., Gorenek, B., Guenoun, M., Hohnloser, S.H., Kolh, P., Lip, G.Y.H., Manolis, A., McMurray, J., Ponikowski, P., Rosenhek, R., Ruschitzka, F., Savelieva, I., Sharma, S., Suwalski, P., Tamargo, J.L., Taylor, C.J., Gelder, V., C, I., Voors, A.A., Windecker, S., Zamorano, J.L., Zeppenfeld, K., 2016. 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. *EP Eur.* 18, 1609–1678. <https://doi.org/10.1093/europace/euw295>
- Kitamura, M., Shimizu, M., Ino, H., Okeie, K., Yamaguchi, M., Fujino, N., Mabuchi, H., Nakanishi, I., 2001. Collagen remodeling and cardiac dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy: The significance of type III and VI collagens. *Clin. Cardiol.* 24, 325–329. <https://doi.org/10.1002/clc.4960240413>
- 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. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.106.077537>
- Kostin, S., Klein, G., Szalay, Z., Hein, S., Bauer, E.P., Schaper, J., 2002. Structural correlate of atrial fibrillation in human patients. *Cardiovasc. Res.* 54, 361–379. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(02\)00273-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00273-0)
- Kozomara, A., Birgaoanu, M., Griffiths-Jones, S., 2019. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* 47, D155–D162. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>
- Krijthe, B.P., Kunst, A., Benjamin, E.J., Lip, G.Y.H., Franco, O.H., Hofman, A., Witteman, J.C.M., Stricker, B.H., Heeringa, J., 2013. Projections on the number of individuals with atrial fibrillation in the European Union, from 2000 to 2060. *Eur. Heart J.* 34, 2746–2751. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh280>
- Kubota, S., Takigawa, M., 2006. CCN family proteins and angiogenesis: from embryo to adulthood. *Angiogenesis* 10, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10456-006-9058-5>
- Kumagai, K., Nakashima, H., Urata, H., Gondo, N., Arakawa, K., Saku, K., 2003. Effects of angiotensin II type 1 receptor antagonist on electrical and structural remodeling in atrial fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 41, 2197–2204. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(03\)00464-9](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(03)00464-9)

- Kuwabara, Y., Ono, K., Horie, T., Nishi, H., Nagao, K., Kinoshita, M., Watanabe, S., Baba, O., Kojima, Y., Shizuta, S., Imai, M., Tamura, T., Kita, T., Kimura, T., 2011. Increased MicroRNA-1 and MicroRNA-133a Levels in Serum of Patients With Cardiovascular Disease Indicate Myocardial Damage. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 4, 446–454. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.110.958975>
- Kyprianou, K., Pericleous, A., Stavrou, A., Dimitrakaki, I.A., Challoumas, D., Dimitrakakis, G., 2016. Surgical perspectives in the management of atrial fibrillation. *World J. Cardiol.* 8, 41–56. <https://doi.org/10.4330/wjc.v8.i1.41>
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853–858. <https://doi.org/10.1126/science.1064921>
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2002. Identification of Tissue-Specific MicroRNAs from Mouse. *Curr. Biol.* 12, 735–739. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00809-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00809-6)
- Latronico, M.V.G., Condorelli, G., 2009. MicroRNAs and cardiac pathology. *Nat. Rev. Cardiol.* 6, 419–429. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2009.56>
- Le Heuzey, J.-Y., Pazioud, O., Piot, O., Said, M.A., Copie, X., Lavergne, T., Guize, L., 2004. Cost of care distribution in atrial fibrillation patients: the COCAF study. *Am. Heart J.* 147, 121–126.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., Kim, V.N., 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415–419. <https://doi.org/10.1038/nature01957>
- Lee, Y., Hur, I., Park, S.-Y., Kim, Y.-K., Suh, M.R., Kim, V.N., 2006. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J.* 25, 522–532. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600942>
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., Kim, V.N., 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23, 4051–4060. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>
- Leistad, E., Aksnes, G., Verburg, E., Christensen, G., 1996. Atrial Contractile Dysfunction After Short-term Atrial Fibrillation Is Reduced by Verapamil but Increased by BAY K8644. *Circulation* 93, 1747–1754. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.93.9.1747>
- Li, N., Zhou, H., Tang, Q., 2018. miR-133: A Suppressor of Cardiac Remodeling? *Front. Pharmacol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00903>
- Li, Q., Lin, X., Yang, X., Chang, J., 2010. NFATc4 is negatively regulated in miR-133a-mediated cardiomyocyte hypertrophic repression. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 298, H1340–H1347. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00592.2009>
- Li, Y., Jian, Z., Yang, Z.Y., Chen, L., Wang, X.F., Ma, R.Y., Xiao, Y.B., 2013a. Increased

- expression of connective tissue growth factor and transforming growth factor-beta-1 in atrial myocardium of patients with chronic atrial fibrillation. *Cardiology* 124, 233–240. <https://doi.org/10.1159/000347126>
- Li, Y., Jian, Z., Yang, Z.Y., Chen, L., Wang, X.F., Ma, R.Y., Xiao, Y.B., 2013b. Increased expression of connective tissue growth factor and transforming growth factor-beta-1 in atrial myocardium of patients with chronic atrial fibrillation. *Cardiology* 124, 233–240. <https://doi.org/10.1159/000347126>
- Liebetrau, C., Möllmann, H., Dörr, O., Szardien, S., Troidl, C., Willmer, M., Voss, S., Gaede, L., Rixe, J., Rolf, A., Hamm, C., Nef, H., 2013. Release Kinetics of Circulating Muscle-Enriched MicroRNAs in Patients Undergoing Transcatheter Ablation of Septal Hypertrophy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 62, 992–998. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.025>
- Lin, C.-S., Lai, L.-P., Lin, J.-L., Sun, Y.-L., Hsu, C.-W., Chen, C.-L., Mao, S.J.T., Huang, S.K.S., 2007. Increased expression of extracellular matrix proteins in rapid atrial pacing-induced atrial fibrillation. *Heart Rhythm Off. J. Heart Rhythm Soc.* 4, 938–949. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2007.03.034>
- Lin, H.J., Wolf, P.A., Kelly-Hayes, M., Beiser, A.S., Kase, C.S., Benjamin, E.J., D'Agostino, R.B., 1996. Stroke severity in atrial fibrillation. The Framingham Study. *Stroke J. Cereb. Circ.* 27, 1760–1764.
- Linke, W.A., Popov, V.I., Pollack, G.H., 1994. Passive and active tension in single cardiac myofibrils. *Biophys. J.* 67, 782–792. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(94\)80538-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(94)80538-7)
- Liu, N., Bezprozvannaya, S., Williams, A.H., Qi, X., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., 2008. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev.* 22, 3242–3254. <https://doi.org/10.1101/gad.1738708>
- Liu, Z., Zhou, C., Liu, Y., Wang, S., Ye, P., Miao, X., Xia, J., 2012. The Expression Levels of Plasma microRNAs in Atrial Fibrillation Patients. *PLOS ONE* 7, e44906. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044906>
- Luo, X., Lin, H., Pan, Z., Xiao, J., Zhang, Y., Lu, Y., Yang, B., Wang, Z., 2008. Down-regulation of miR-1/miR-133 Contributes to Re-expression of Pacemaker Channel Genes HCN2 and HCN4 in Hypertrophic Heart. *J. Biol. Chem.* 283, 20045–20052. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801035200>
- Luo, X., Xiao, J., Lin, H., Li, B., Lu, Y., Yang, B., Wang, Z., 2007. Transcriptional activation by stimulating protein 1 and post-transcriptional repression by muscle-specific microRNAs of IKs-encoding genes and potential implications in regional heterogeneity of their expressions. *J. Cell. Physiol.* 212, 358–367. <https://doi.org/10.1002/jcp.21030>
- Manning, W.J., Silverman, D.I., Katz, S.E., Riley, M.F., Come, P.C., Doherty, R.M., Munson, J.T., Douglas, P.S., 1994. Impaired left atrial mechanical function after cardioversion:

- Relation to the duration of atrial fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 23, 1535–1540. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(94\)90652-1](https://doi.org/10.1016/0735-1097(94)90652-1)
- Matkovich, S.J., Hu, Y., Eschenbacher, W.H., Dorn, L.E., Dorn, G.W., 2012. Direct and Indirect Involvement of MicroRNA-499 in Clinical and Experimental Cardiomyopathy. *Circ. Res.* 111, 521–531. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.265736>
- Matkovich, S.J., Wang, W., Tu, Y., Eschenbacher, W.H., Dorn, L.E., Condorelli, G., Diwan, A., Nerbonne, J.M., Dorn, G.W., 2010. MicroRNA-133a protects against myocardial fibrosis and modulates electrical repolarization without affecting hypertrophy in pressure overloaded adult hearts. *Circ. Res.* 106, 166–175. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.202176>
- Matsutani, N., Takase, B., Ozeki, Y., Maehara, T., Lee, R., 2008. Minimally Invasive Cardiothoracic Surgery for Atrial Fibrillation. *Circ. J.* 72, 434–436. <https://doi.org/10.1253/circj.72.434>
- McManus, D.D., Tanriverdi, K., Lin, H., Esa, N., Kinno, M., Mandapati, D., Tam, S., Okike, O.N., Ellinor, P.T., Keaney, J.F., Donahue, J.K., Benjamin, E.J., Freedman, J.E., 2015. Plasma microRNAs are associated with atrial fibrillation and change after catheter ablation (the miRhythm study). *Heart Rhythm* 12, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2014.09.050>
- Mehra, R., Benjamin, E.J., Shahar, E., Gottlieb, D.J., Nawabit, R., Kirchner, H.L., Sahadevan, J., Redline, S., 2006. Association of Nocturnal Arrhythmias with Sleep-disordered Breathing. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173, 910–916. <https://doi.org/10.1164/rccm.200509-1442OC>
- Mitchell, L.B., Crystal, E., Heilbron, B., Pagé, P., 2005. Atrial fibrillation following cardiac surgery. *Can. J. Cardiol.* 21 Suppl B, 45B-50B.
- Miyasaka, Y., Barnes, M.E., Gersh, B.J., Cha, S.S., Bailey, K.R., Abhayaratna, W.P., Seward, J.B., Tsang, T.S.M., 2006. Secular Trends in Incidence of Atrial Fibrillation in Olmsted County, Minnesota, 1980 to 2000, and Implications on the Projections for Future Prevalence. *Circulation* 114, 119–125. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.595140>
- Moe, G.K., Abildskov, J.A., 1959. Atrial fibrillation as a self-sustaining arrhythmia independent of focal discharge. *Am. Heart J.* 58, 59–70. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(59\)90274-1](https://doi.org/10.1016/0002-8703(59)90274-1)
- Mollnau, H., 2003. Strukturelle Umbauprozesse im Myokard als Ursache eines circulus vitiosus im Stadium des "endstage heart failure" bei dilatativer Kardiomyopathie. Universitätsbibliothek Giessen.
- Natsume, Y., Oaku, K., Takahashi, K., Nakamura, W., Oono, A., Hamada, S., Yamazoe, M., Ihara, K., Sasaki, T., Goya, M., Hirao, K., Furukawa, T., Sasano, T., 2018. Combined Analysis of Human and Experimental Murine Samples Identified Novel Circulating

- MicroRNAs as Biomarkers for Atrial Fibrillation. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* 82, 965–973. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-17-1194>
- Nattel, S., 2017. Molecular and Cellular Mechanisms of Atrial Fibrosis in Atrial Fibrillation. *JACC Clin. Electrophysiol.* 3, 425–435. <https://doi.org/10.1016/j.jacep.2017.03.002>
- Nattel, S., 1999. Atrial electrophysiological remodeling caused by rapid atrial activation: underlying mechanisms and clinical relevance to atrial fibrillation. *Cardiovasc. Res.* 42, 298–308. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00022-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00022-X)
- Nattel, S., Burstein, B., Dobrev, D., 2008. Atrial Remodeling and Atrial Fibrillation Mechanisms and Implications. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 1, 62–73. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.107.754564>
- Nattel, S., Harada, M., 2014. Atrial Remodeling and Atrial Fibrillation: Recent Advances and Translational Perspectives. *J. Am. Coll. Cardiol.* 63, 2335–2345. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.02.555>
- Niemann, B., Wissbrock, H.L., Schleichert, P., Dominik, E., Micoogullari, M., Schweizer, I., Grieshaber, P., Böning, A., Rohrbach, S., 2016. Functional Impact of miRNA Signaling on Atrial Remodeling during Atrial Fibrillation in Human Cardiofibroblasts. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 64, OP102. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1571555>
- Nishi, H., Sakaguchi, T., Miyagawa, S., Yoshikawa, Y., Fukushima, S., Saito, S., Ueno, T., Kuratani, T., Sawa, Y., 2013. Impact of microRNA expression in human atrial tissue in patients with atrial fibrillation undergoing cardiac surgery. *PloS One* 8, e73397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073397>
- Packer, D.L., Bardy, G.H., Worley, S.J., Smith, M.S., Cobb, F.R., Coleman, R.E., Gallagher, J.J., German, L.D., 1986. Tachycardia-induced cardiomyopathy: a reversible form of left ventricular dysfunction. *Am. J. Cardiol.* 57, 563–570.
- Page, R.L., Wilkinson, W.E., Clair, W.K., McCarthy, E.A., Pritchett, E.L., 1994. Asymptomatic arrhythmias in patients with symptomatic paroxysmal atrial fibrillation and paroxysmal supraventricular tachycardia. *Circulation* 89, 224–227.
- Platonov, P.G., Mitrofanova, L.B., Orshanskaya, V., Ho, S.Y., 2011. Structural Abnormalities in Atrial Walls Are Associated With Presence and Persistency of Atrial Fibrillation But Not With Age. *J. Am. Coll. Cardiol.* 58, 2225–2232. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.05.061>
- Polanczyk, C.A., Goldman, L., Marcantonio, E.R., Orav, E.J., Lee, T.H., 1998. Supraventricular Arrhythmia in Patients Having Noncardiac Surgery: Clinical Correlates and Effect on Length of Stay. *Ann. Intern. Med.* 129, 279–285. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-129-4-199808150-00003>
- Pop, G.A., Meeder, H.J., Roelandt, J.R., van Oudenaarden, W., Bulens, C., Verweij, W., Gijbers, C., van Domburg, R., Koudstaal, P.J., 1994. Transthoracic echo/Doppler in the

- identification of patients with chronic non-valvular atrial fibrillation at risk for thromboembolic events. *Eur. Heart J.* 15, 1545–1551.
- Poudel, P., Xu, Y., Cui, Z., Sharma, D., Tian, B., Paudel, S., 2015. Atrial Fibrillation: Recent Advances in Understanding the Role of MicroRNAs in Atrial Remodeling with an Electrophysiological Overview. *Cardiology* 131, 58–67. <https://doi.org/10.1159/000375403>
- R, R., Fj, S., 2017. MicroRNA Therapeutics: Towards a New Era for the Management of Cancer and Other Diseases [WWW Document]. *Nat. Rev. Drug Discov.* <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.246>
- Rana, T.M., 2007. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 23–36. <https://doi.org/10.1038/nrm2085>
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., Bradley, A., 2004. Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. *Genome Res.* 14, 1902–1910. <https://doi.org/10.1101/gr.2722704>
- Roncarati, R., Viviani Anselmi, C., Losi, M.A., Papa, L., Cavarretta, E., Da Costa Martins, P., Contaldi, C., Sacconi Jotti, G., Franzone, A., Galastri, L., Latronico, M.V.G., Imbriaco, M., Esposito, G., De Windt, L., Betocchi, S., Condorelli, G., 2014. Circulating miR-29a, among other up-regulated microRNAs, is the only biomarker for both hypertrophy and fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 63, 920–927. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.09.041>
- Rooij, E. van, Marshall, W.S., Olson, E.N., 2008a. Toward MicroRNA-Based Therapeutics for Heart Disease The Sense in Antisense. *Circ. Res.* 103, 919–928. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.183426>
- Rooij, E. van, Sutherland, L.B., Qi, X., Richardson, J.A., Hill, J., Olson, E.N., 2007. Control of Stress-Dependent Cardiac Growth and Gene Expression by a MicroRNA. *Science* 316, 575–579. <https://doi.org/10.1126/science.1139089>
- Rooij, E. van, Sutherland, L.B., Thatcher, J.E., DiMaio, J.M., Naseem, R.H., Marshall, W.S., Hill, J.A., Olson, E.N., 2008b. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 13027–13032. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805038105>
- Rosenkranz, S., 2004. TGF- β 1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc. Res.* 63, 423–432. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.04.030>
- Ryder, K.M., Benjamin, E.J., 1999. Epidemiology and significance of atrial fibrillation. *Am. J. Cardiol.* 84, 131–138.
- Sanfilippo, A.J., Abascal, V.M., Sheehan, M., Oertel, L.B., Harrigan, P., Hughes, R.A., Weyman, A.E., 1990. Atrial enlargement as a consequence of atrial fibrillation. A prospective echocardiographic study. *Circulation* 82, 792–797.
- Sanoski, C.A., 2009. Clinical, economic, and quality of life impact of atrial fibrillation. *J. Manag.*

- Care Pharm. JMCP 15, S4-9.
- Savelieva, I., Kakouros, N., Kourliouros, A., Camm, A.J., 2011. Upstream therapies for management of atrial fibrillation: review of clinical evidence and implications for European Society of Cardiology guidelines. Part I: primary prevention. *Europace* 13, 308–328. <https://doi.org/10.1093/europace/eur002>
- Schild, C., Trueb, B., 2002. Mechanical Stress Is Required for High-Level Expression of Connective Tissue Growth Factor. *Exp. Cell Res.* 274, 83–91. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5458>
- Schiller, M., Javelaud, D., Mauviel, A., 2004. TGF- β -induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J. Dermatol. Sci.* 35, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2003.12.006>
- Schmidt-Lucke, C., Paar, W.D., Stellbrink, C., Nixdorff, U., Hofmann, T., Meurer, J., Grewe, R., Daniel, W.G., Hanrath, P., Mügge, A., Klein, H.U., Schmidt-Lucke, J.A., 2007. Quality of anticoagulation with unfractionated heparin plus phenprocoumon for the prevention of thromboembolic complications in cardioversion for non-valvular atrial fibrillation. Subanalysis from the Anticoagulation in Cardioversion using Enoxaparin (ACE) trial. *Thromb. Res.* 119, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2005.11.016>
- Schotten, U., Ausma, J., Stellbrink, C., Sabatschus, I., Vogel, M., Frechen, D., Schoendube, F., Hanrath, P., Allessie, M.A., 2001. Cellular mechanisms of depressed atrial contractility in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 103, 691–698.
- Selmer, C., Olesen, J.B., Hansen, M.L., Lindhardsen, J., Olsen, A.-M.S., Madsen, J.C., Faber, J., Hansen, P.R., Pedersen, O.D., Torp-Pedersen, C., Gislason, G.H., 2012. The spectrum of thyroid disease and risk of new onset atrial fibrillation: a large population cohort study. *BMJ* 345. <https://doi.org/10.1136/bmj.e7895>
- Serini, G., Bochaton-Piallat, M.-L., Ropraz, P., Geinoz, A., Borsi, L., Zardi, L., Gabbiani, G., 1998. The Fibronectin Domain ED-A Is Crucial for Myofibroblastic Phenotype Induction by Transforming Growth Factor- β 1. *J. Cell Biol.* 142, 873–881.
- Shan, H., Zhang, Yong, Lu, Y., Zhang, Ying, Pan, Z., Cai, B., Wang, N., Li, X., Feng, T., Hong, Y., Yang, B., 2009. Downregulation of miR-133 and miR-590 contributes to nicotine-induced atrial remodelling in canines. *Cardiovasc. Res.* 83, 465–472. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp130>
- Shen, N.-N., Zhang, Z.-L., Li, Z., Zhang, C., Li, H., Wang, J.-L., Wang, J., Gu, Z.-C., 2019. Identification of microRNA biomarkers in atrial fibrillation: A protocol for systematic review and bioinformatics analysis. *Medicine (Baltimore)* 98, e16538. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000016538>
- Shi, Y., Ducharme, A., Li, D., Gaspo, R., Nattel, S., Tardif, J.C., 2001. Remodeling of atrial dimensions and emptying function in canine models of atrial fibrillation. *Cardiovasc. Res.*

52, 217–225.

- Souders, C.A., Bowers, S.L.K., Baudino, T.A., 2009. Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ. Res.* 105, 1164–1176. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.209809>
- Staerk, L., Wang, B., Preis, S.R., Larson, M.G., Lubitz, S.A., Ellinor, P.T., McManus, D.D., Ko, D., Weng, L.-C., Lunetta, K.L., Frost, L., Benjamin, E.J., Trinquart, L., 2018. Lifetime risk of atrial fibrillation according to optimal, borderline, or elevated levels of risk factors: cohort study based on longitudinal data from the Framingham Heart Study. *The BMJ* 361. <https://doi.org/10.1136/bmj.k1453>
- Steinberg, B.A., Hellkamp, A.S., Lokhnygina, Y., Patel, M.R., Breithardt, G., Hankey, G.J., Becker, R.C., Singer, D.E., Halperin, J.L., Hacke, W., Nessel, C.C., Berkowitz, S.D., Mahaffey, K.W., Fox, K.A.A., Califf, R.M., Piccini, J.P., 2015. Higher risk of death and stroke in patients with persistent vs. paroxysmal atrial fibrillation: results from the ROCKET-AF Trial. *Eur. Heart J.* 36, 288–296. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu359>
- Stenman, S., Vaheri, A., 1978. Distribution of a major connective tissue protein, fibronectin, in normal human tissues. *J. Exp. Med.* 147, 1054–1064. <https://doi.org/10.1084/jem.147.4.1054>
- Sun, Y., Weber, K.T., 2003. RAS and connective tissue in the heart. *Int. J. Biochem. Cell Biol., Renin-Angiotensin Systems: State of the Art* 35, 919–931. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00276-5](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00276-5)
- Sun, Y., Weber, K.T., 2000. Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc. Res.* 46, 250–256. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(00\)00032-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(00)00032-8)
- Swynghedauw, B., 1999. Molecular Mechanisms of Myocardial Remodeling. *Physiol. Rev.* 79, 215–262.
- Thum, T., 2014. Noncoding RNAs and myocardial fibrosis. *Nat. Rev. Cardiol.* 11, 655–663. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2014.125>
- Thum, T., Gross, C., Fiedler, J., Fischer, T., Kissler, S., Bussen, M., Galuppo, P., Just, S., Rottbauer, W., Frantz, S., Castoldi, M., Soutschek, J., Koteliansky, V., Rosenwald, A., Basson, M.A., Licht, J.D., Pena, J.T.R., Rouhanifard, S.H., Muckenthaler, M.U., Tuschl, T., Martin, G.R., Bauersachs, J., Engelhardt, S., 2008. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 456, 980–984. <https://doi.org/10.1038/nature07511>
- Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., Brown, R.A., 2002a. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 349–363. <https://doi.org/10.1038/nrm809>
- Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., Brown, R.A., 2002b. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 349–363. <https://doi.org/10.1038/nrm809>

- Tong, Z., Chen, R., Alt, D.S., Kemper, S., Perbal, B., Brigstock, D.R., 2009. Susceptibility to liver fibrosis in mice expressing a connective tissue growth factor transgene in hepatocytes. *Hepatology*. Baltimore, Md 50, 939–947. <https://doi.org/10.1002/hep.23102>
- Trang, P., Medina, P.P., Wiggins, J.F., Ruffino, L., Kelnar, K., Omotola, M., Homer, R., Brown, D., Bader, A.G., Weidhaas, J.B., Slack, F.J., 2010. Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA. *Oncogene* 29, 1580–1587. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.445>
- Travers, J.G., Kamal, F.A., Robbins, J., Yutzey, K.E., Blaxall, B.C., 2016. Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. *Circ. Res.* 118, 1021–1040. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306565>
- Uitto, J., Olsen, D.R., Fazio, M.J., 1989. Extracellular matrix of the skin: 50 years of progress. *J. Invest. Dermatol.* 92, 61S-77S.
- Umetani, K., Kodama, Y., Nakamura, T., Mende, A., Kitta, Y., Kawabata, K., Obata, J., Takano, H., Kugiyama, K., 2007. High prevalence of paroxysmal atrial fibrillation and/or atrial flutter in metabolic syndrome. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* 71, 252–255.
- van den Berg, M.P., Tuinenburg, A.E., van Veldhuisen, D.J., de Kam, P.J., Crijns, H.J.G.M., 1998. Cardioversion of atrial fibrillation in the setting of mild to moderate heart failure. *Int. J. Cardiol.* 63, 63–70. [https://doi.org/10.1016/S0167-5273\(97\)00273-8](https://doi.org/10.1016/S0167-5273(97)00273-8)
- van Laar, C., Kelder, J., van Putte, B.P., 2017. The totally thoracoscopic maze procedure for the treatment of atrial fibrillation. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 24, 102–111. <https://doi.org/10.1093/icvts/ivw311>
- van Rooij, E., Olson, E.N., 2009. Searching for MiR-acles in Cardiac Fibrosis. *Circ. Res.* 104, 138–140. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.192492>
- van Rooij, E., Olson, E.N., 2007. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J. Clin. Invest.* 117, 2369–2376. <https://doi.org/10.1172/JCI33099>
- van Rooij, E., Sutherland, L.B., Liu, N., Williams, A.H., McAnally, J., Gerard, R.D., Richardson, J.A., Olson, E.N., 2006. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 18255–18260. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608791103>
- Verheule, S., Sato, T., Everett, T., Engle, S.K., Otten, D., Lohe, M.R. der, Nakajima, H.O., Nakajima, H., Field, L.J., Olgin, J.E., 2004. Increased Vulnerability to Atrial Fibrillation in Transgenic Mice With Selective Atrial Fibrosis Caused by Overexpression of TGF- β 1. *Circ. Res.* 94, 1458–1465. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000129579.59664.9d>
- Verrecchia, F., Mauviel, A., 2002. Transforming Growth Factor- β Signaling Through the Smad Pathway: Role in Extracellular Matrix Gene Expression and Regulation. *J. Invest. Dermatol.* 118, 211–215. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.01641.x>
- Wakili, R., Voigt, N., Kääh, S., Dobrev, D., Nattel, S., 2011. Recent advances in the molecular

- pathophysiology of atrial fibrillation. *J. Clin. Invest.* 121, 2955–2968. <https://doi.org/10.1172/JCI46315>
- Wang, M., Liu, J., Xi, D., Luo, X., Ning, Q., 2016. Adenovirus-mediated artificial microRNA against human fibrinogen like protein 2 inhibits hepatocellular carcinoma growth. *J. Gene Med.* 18, 102–111. <https://doi.org/10.1002/jgm.2883>
- Wang, S., Aurora, A.B., Johnson, B.A., Qi, X., McAnally, J., Hill, J.A., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., 2008. The Endothelial-Specific MicroRNA miR-126 Governs Vascular Integrity and Angiogenesis. *Dev. Cell* 15, 261–271. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.07.002>
- Wang TJ, Parise H, Levy D, et al, 2004. Obesity and the risk of new-onset atrial fibrillation. *JAMA* 292, 2471–2477. <https://doi.org/10.1001/jama.292.20.2471>
- Wang, Z., 2011. The guideline of the design and validation of MiRNA mimics. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 676, 211–223. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-863-8_15
- Wang, Z., 2010. MicroRNA: A matter of life or death. *World J. Biol. Chem.* 1, 41–54. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v1.i4.41>
- Wang, Z., Lu, Y., Yang, B., 2011. MicroRNAs and atrial fibrillation: new fundamentals. *Cardiovasc. Res.* 89, 710–721. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq350>
- Weber, K.T., 2004. From inflammation to fibrosis: a stiff stretch of highway. *Hypertension* 43, 716–719. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000118586.38323.5b>
- Weber, K.T., 1989. Cardiac interstitium in health and disease: The fibrillar collagen network. *J. Am. Coll. Cardiol., ACC Anniversary Seminar* 13, 1637–1652. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(89\)90360-4](https://doi.org/10.1016/0735-1097(89)90360-4)
- Wijffels, M.C.E.F., Kirchhof, C.J.H.J., Dorland, R., Allessie, M.A., 1995. Atrial Fibrillation Begets Atrial Fibrillation A Study in Awake Chronically Instrumented Goats. *Circulation* 92, 1954–1968. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.92.7.1954>
- Wijnen, W.J., Pinto, Y.M., Creemers, E.E., 2013. The therapeutic potential of miRNAs in cardiac fibrosis: where do we stand? *J Cardiovasc. Transl. Res.* 6, 899–908. <https://doi.org/10.1007/s12265-013-9483-y>
- Wilke, T., Groth, A., Mueller, S., Pfannkuche, M., Verheyen, F., Linder, R., Maywald, U., Bauersachs, R., Breithardt, G., 2013. Incidence and prevalence of atrial fibrillation: an analysis based on 8.3 million patients. *Europace* 15, 486–493. <https://doi.org/10.1093/europace/eus333>
- Wolf, P.A., Abbott, R.D., Kannel, W.B., 1991. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. *Stroke* 22, 983–988. <https://doi.org/10.1161/01.STR.22.8.983>
- Wolf, P.A., Abbott, R.D., Kannel, W.B., 1987. Atrial fibrillation: a major contributor to stroke in the elderly. The Framingham Study. *Arch. Intern. Med.* 147, 1561–1564.

- Xiao, L., Xiao, J., Luo, X., Lin, H., Wang, Z., Nattel, S., 2008. Feedback Remodeling of Cardiac Potassium Current Expression A Novel Potential Mechanism for Control of Repolarization Reserve. *Circulation* 118, 983–992. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.758672>
- Xiao, Y., Zhao, J., Tuazon, J.P., Borlongan, C.V., Yu, G., 2019. MicroRNA-133a and Myocardial Infarction. *Cell Transplant.* 28, 831–838. <https://doi.org/10.1177/0963689719843806>
- Xu, C., Lu, Y., Pan, Z., Chu, W., Luo, X., Lin, H., Xiao, J., Shan, H., Wang, Z., Yang, B., 2007. The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes. *J. Cell Sci.* 120, 3045–3052. <https://doi.org/10.1242/jcs.010728>
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., Cullen, B.R., 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 17, 3011–3016. <https://doi.org/10.1101/gad.1158803>
- Yu, B.-T., Yu, N., Wang, Y., Zhang, H., Wan, K., Sun, X., Zhang, C.-S., 2019. Role of miR-133a in regulating TGF- β 1 signaling pathway in myocardial fibrosis after acute myocardial infarction in rats. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 23, 8588–8597. https://doi.org/10.26355/eurev_201910_19175
- Yue, L., Xie, J., Nattel, S., 2011a. Molecular determinants of cardiac fibroblast electrical function and therapeutic implications for atrial fibrillation. *Cardiovasc. Res.* 89, 744–753. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq329>
- Yue, L., Xie, J., Nattel, S., 2011b. Molecular determinants of cardiac fibroblast electrical function and therapeutic implications for atrial fibrillation. *Cardiovasc. Res.* 89, 744–753. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq329>
- Zhang, C., Meng, X., Zhu, Z., Yang, X., Deng, A., 2004. Role of connective tissue growth factor in renal tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation and extracellular matrix accumulation in vitro. *Life Sci.* 75, 367–379. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.02.005>

12. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

13. Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle all denen danken, die mich auf dem Weg zur Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Zunächst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Böning, ärztlicher Direktor der Klinik für Herz-, Kinderherz- und Gefäßchirurgie der Universitätsklinik Gießen, für die Überlassung des Promotionsthemas und die Bereitstellung der Gewebeproben.

Zu ganz besonderem Dank bin ich Herrn PD Dr. med. Niemann verpflichtet, für seine herausragende Betreuung, seine Unterstützung bei der Umsetzung dieses Projektes und den konstruktiven Austausch.

Ebenso gilt mein Dank Frau Prof. Dr. med. Rohrbach für die Möglichkeit, meine Forschungsarbeit in ihrer Arbeitsgruppe am Physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen durchzuführen, sowie für ihre fachkundige Unterstützung und ihren Rat.

Dr. Le möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen für die Einarbeitung in der Arbeitsgruppe, die tatkräftige Unterstützung und ihre unverzichtbare Hilfe und Betreuung im Labor.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für das freundschaftliche Miteinander und die gute Zusammenarbeit.

Zuletzt haben meine Familie und Freunde, die mich jahrelang unterstützt haben, ein großes Dankeschön verdient. Insbesondere Nora Fretschner danke ich für ihre motivierenden Worte.