

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I – Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. G. Steinbeck

**REGIONALE SPEZIALISIERUNG IM HUMANEN MYOKARD:
VERÄNDERUNGEN DES ATRIALEN TRANSKRIPTIONSPROFILS IM
SINNE EINES VENTRIKULÄREN GENEXPRESSIONSMUSTERS
BEI PERMANENTEM VORHOFFLIMMERN**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Elisabeth Marie Arnoldi
aus
München

2007

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. M. Näbauer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. A. W. Rupp
Prof. Dr. B. F. Becker

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. A. Barth

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 13. 12. 2007

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Strukturelle und funktionelle Unterschiede zwischen atrialem und ventrikulärem Myokard.....	1
1.2 Regionale Unterschiede der Genexpression im Myokard bei kardiovaskulären Erkrankungen	7
1.3 Pathophysiologische Veränderungen bei chronischem Vorhofflimmern: elektrophysiologische, strukturelle und kontraktile Umbauprozesse	9
1.4 Zielsetzung der Arbeit	12
2 MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 Auswahl und Aufbereitung des Myokardgewebes	13
2.1.1 Auswahl der Patienten	13
2.1.2 RNA-Isolation	15
2.2 Durchführung der Transkriptionsanalyse mittels Oligonukleotid-Genchips.....	17
2.2.1 Aufbau und Funktion der Affymetrix HG-U133A+B-Microarrays	17
2.2.2 Hybridisierung der Proben mit den Microarrays	18
2.3 Durchführung einer semiquantitativen real-time RT-PCR zur Validierung	20
2.3.1 Prinzip der semiquantitativen real-time RT-PCR.....	20
2.3.2 DNase-Verdau und reverse Transkription	21
2.3.3 Design der Primer für die semiquantitative real-time RT-PCR	21
2.3.4 PCR-Amplifikation	23

2.4	Reagenzien für die molekularbiologischen Untersuchungen	25
2.4.1	Reagenzien für Microarrays	25
2.4.2	Reagenzien für PCR	26
2.4.3	Enzyme und Oligonukleotide.....	26
2.5	Statistische Analyse und Datenauswertung	27
2.5.1	Analyse der Microarray-Daten.....	27
2.5.1.1	Qualitätskontrolle	27
2.5.1.2	Normalisierung.....	27
2.5.1.3	Statistische Analyse.....	27
2.5.1.4	Hierarchisches Clustering.....	28
2.5.1.5	Funktionelle Klassifikation mittels der Gene Ontology Datenbank	29
2.5.2	Analyse der PCR-Daten	30
3	ERGEBNISSE	32
3.1	Microarray-Experimente	32
3.1.1	Charakterisierung der differentiellen Genexpression zwischen Atrium und Ventrikel	32
3.1.1.1	Funktionelle Klassifizierung der regionalen Genexpressionsunterschiede zwischen Atrium und Ventrikel nach Gene Ontology.....	34
3.1.1.2	Vergleich der regionalen Expressionsunterschiede im humanen Myokard und Mäusemyokard	37
3.1.2	Veränderungen der atrialen Transkription bei chronischem Vorhofflimmern	40
3.1.2.1	Genomweit verminderte Transkriptionsaktivität.....	40
3.1.2.2	Transkriptionelle Herunterregulation kalziumabhängiger Signaltransduktionsprozesse.....	40
3.1.2.3	Elektrophysiologische, strukturelle, kontraktile und metabolische Remodelingprozesse	41
3.1.2.4	Vergleich des atrialen Genexpressionsmusters bei chronischem Vorhofflimmern mit dem ventrikulären Transkriptionsprofil.....	44
3.2	Validierung der Microarray-Daten mittels semiquantitativer real-time RT-PCR	46

4	DISKUSSION	48
4.1	Methodische Aspekte	48
4.1.1	Untersuchung von humanem Myokardgewebe	48
4.1.2	Besonderheiten bei der Analyse von mRNA	50
4.1.3	Genomweite Expressionsanalyse mittels Microarrays	50
4.2	Unterschiede des humanen myokardialen Transkriptionsprofils in Atrium und Ventrikel	52
4.2.1	Funktionelle Klassifizierung der atrialen und ventrikulären Genexpression unter Berücksichtigung ihrer physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung .	52
4.2.2	Vergleich der erzielten Ergebnisse mit einer Studie am Mäusemyokard	55
4.3	Charakterisierung des humanen myokardialen Transkriptionsprofils im Atrium bei chronischem Vorhofflimmern.....	57
4.3.1	Transkriptionelle Herunterregulation im Atrium bei Vorhofflimmern.....	57
4.3.2	Veränderungen in der atrialen Transkription als Grundlage für Remodelingprozesse.....	61
4.3.3	Entwicklung eines ventrikulären und fetalen Expressionsmusters im atrialen Myokard.....	65
4.4	Klinische Relevanz	66
5	ZUSAMMENFASSUNG	68
	LITERATURVERZEICHNIS	71
	DANK	81

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 3
Abbildung 2a 4
Abbildung 2b 4
Abbildung 3 6
Abbildung 4 7
Abbildung 5 8
Abbildung 6 17
Abbildung 7 30
Abbildung 8 32
Abbildung 9a 33
Abbildung 9b 34
Abbildung 10a und 10b 39
Abbildung 11a und 11b 43
Abbildung 12 44
Abbildung 13 60
Abbildung 14a und 14b 63

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.....	15
Tabelle 2a.....	22
Tabelle 2b.....	23
Tabelle 3a.....	46
Tabelle 3b.....	47

ONLINE TABELLEN

1) Online Tabellen, Barth et al., 2005b, electronic supplementary material

zugänglich über <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-005-1404-8> (Stand 01/2006)

- **Online Tab. 3:** Auflistung aller 11.740 myokardialer Transkripte.

Transkripte, die eine unterschiedliche Expression in Atrium und Ventrikel aufweisen, sind nach ihrer statistischen Signifikanz (Angabe als q-Wert oder *false discovery rate*) geordnet. Zusätzlich zu der Bezeichnung des Gens und des Affymetrix IDs des Sondensatzes sind für jedes Gen die NCBI *reference sequence* und die Unigene *accession number* angegeben. Durch Aktivierung der Funktion „Auto Filter“ des Programms Microsoft Excel lassen sich die Transkripte nach ihrer regionalen Verteilung in Transkripte mit vornehmlich atrialer, ventrikulärer und regional uniformer Verteilung gruppieren.

- **Online Tab. 5:** Klassifikation der differentiell exprimierten Gene in Atrium und Ventrikel nach Gene Ontology.

Es sind nur diejenigen funktionellen Klassen aufgelistet, die statistisch signifikante Unterschiede aufweisen oder mehr als ein Prozent der Transkripte der GO-Kategorien „zelluläre Lokalisation“, „biologischer Prozess“ und „molekulare Funktion“ für die Ebenen 3 bis 5 ausmachen. Die Gene jeder Kategorie finden sich für die einzelnen Ebenen in je einer Tabelle. Zum Vergleich zwischen den unterschiedlichen Regionen sind die entsprechenden p-Werte angegeben (p-Werte < 0,05 sind farblich durch gelben Hintergrund hervorgehoben). Die Bezeichnung „RA=LV“ gibt an, dass für diese Gene kein statistisch signifikanter Expressionsunterschied zwischen RA und LV besteht.

- **Online Tab. 6:** Myokardiale Transkripte der GO-Kategorien „zelluläre Lokalisation“, „biologischer Prozess“ und „molekulare Funktion“ (Ebene 5).

Diese Liste wurde mit Hilfe des Softwareprogramms FatiGO (www.fatigo.org) erstellt. Die Zuordnung zu den einzelnen Klassen erfolgte unter Verwendung der Unigene *accession numbers*. Vor dem Hintergrund des unvollständigen Annotationsstatus des humanen Genoms und neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse, kann sich die Unigene Bezeichnung einer

Genesequenz im Laufe der Zeit ändern. Zum einen geschieht dies, wenn sie einem anderen Gen-Cluster zugeteilt wird und dann dessen Bezeichnung übernimmt. Zum anderen kann es sein, dass aufgrund der Teilung eines Clusters mehrere Cluster und damit mehrere Unigene Bezeichnungen entstehen. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass ein Unigene Cluster aus der Datenbank entfernt wird. Dies erklärt, weshalb ein kleiner Teil der Genbezeichnungen in den Tabellen 3 und 6 nicht übereinstimmt.

2) Online Tabellen, Barth et al., 2005a, electronic supplementary material

zugänglich über <http://circres.ahajournals.org> (Stand 01/2006)

- **Online Tab. 3:** Auflistung aller 1.434 Transkripte, die bei SR und VhF differentiell exprimiert sind.

Die Gene sind nach ihrer statistischen Signifikanz (Angabe als q-Wert oder sog. false discovery rate) geordnet. Zusätzlich zu der Bezeichnung des Gens und des Affymetrix IDs des Sondensatzes sind für jedes Gen die Unigene *accession number* und die NCBI *reference sequence* angegeben. Durch Aktivierung der Funktion „Auto Filter“ des Programms Microsoft Excel lassen sich die Transkripte nach ihrer erhöhten oder verminderten Expression bei VhF oder ihrer regionalen Verteilung (Atrium und Ventrikel) gruppieren.

- **Online Tab. 4:** Klassifikation der differentiell exprimierten Gene bei SR und VhF nach GO (Ebenen 3-5).

Es sind nur diejenigen funktionellen Klassen aufgelistet, die statistisch signifikante Veränderungen ($p < 0,05$) aufweisen oder mehr als ein Prozent der Transkripte der GO Ebene 5 für die Kategorien „zelluläre Lokalisation“, „biologischer Prozess“ und „molekulare Funktion“ ausmachen. Die entsprechenden p-Werte für den Vergleich zwischen SR und VhF sind ebenfalls angegeben. p-Werte $< 0,05$ sind durch gelben Hintergrund hervorgehoben.

- **Online Tab. 5:** Myokardiale Transkripte der GO-Kategorien „zelluläre Lokalisation“, „biologischer Prozess“ und „molekulare Funktion“ (Ebene 5).

Die Liste wurde mit Hilfe des Softwareprogramms FatiGO erstellt. Die Zuordnung zu den einzelnen Klassen erfolgte unter Verwendung der Unigene *accession numbers*.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACE-	<i>Angiotensin Converting Enzyme-</i>
ACT	<i>actin</i>
ADAM 19	<i>ADAM metalloproteinase domain 19</i>
ADM	Adrenomedullin
AGTR1	<i>angiotensin II receptor, type 1</i>
AP	Aktionspotential
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
AT-II-	Angiotensin-II-
ATF-2	<i>activating transcription factor 2</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATP2A2	<i>ATPase, Ca⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2</i>
AV-	Atrioventikular-
B2M	<i>β2-Mikroglobulin</i>
BGN	<i>biglycan</i>
BNP	natriuretisches Peptid B
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CACNA1D	<i>calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit</i>
CACNA1G	<i>calcium channel, voltage-dependent, alpha 1G subunit</i>
CACNA2D2	<i>calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2</i>
CACNA2D3	<i>calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta 3 subunit</i>
CACNB2	<i>calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit</i>
CALR	<i>calreticulin</i>
CaMK	<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase</i>

CASQ2	<i>calsequestrin 2</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
c-fos	<i>v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
c-myc	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>
COL12A1	<i>collagen, type XII, alpha 1</i>
COL1A1	<i>collagen, type I, alpha 1</i>
COL4A2	<i>collagen, type IV, alpha 2</i>
COL5A3	<i>collagen, type V, alpha 3</i>
CREB1	<i>cAMP responsive element binding protein 1</i>
cRNA	<i>copy RNA</i>
C _t	<i>Threshold Cycle</i>
CTNNB	<i>beta-cadherin</i>
DAG1	<i>dystroglycan1</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DKK2	<i>dickkopf homolog 2</i>
DKK3	<i>dickkopf homolog 3</i>
DMD	<i>dystrophin</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSCR1	<i>Down syndrome critical region gene 1</i>
DVL1	<i>dishevelled 1</i>
EDNRA	<i>endothelin receptor type A</i>
EDNRB	<i>endothelin receptor type B</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
egr	<i>v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog (avian)</i>
EPHA7	<i>ephrin type-A receptor 7</i>

ErbB	<i>v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog</i>
FBN1	<i>fibrillin 1</i>
FDR	<i>false discovery rate</i>
FHL2	<i>four and a half LIM domains 2</i>
FRZB	<i>frizzled-related protein</i>
GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GATA4	<i>GATA binding protein 4</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
GSK3A	<i>glycogen synthase kinase 3 alpha</i>
GSK3B	<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>
HG	<i>Human Genome</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSPA9B	<i>mortalin</i>
IRX5	<i>iroquois homeobox 5</i>
ITPR1	<i>inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1</i>
KCNA5	<i>potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 5</i>
KCNIP2	<i>Kv channel interacting protein 2</i>
KCNJ1	<i>potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1</i>
KCNJ2	<i>potassium inwardly-rectifying channel J2</i>
KCNJ3	<i>potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3</i>
KCNJ5	<i>potassium inwardly-rectifying channel J5</i>
KCNK3	<i>potassium channel, subfamily K, member 3</i>
LMNA	<i>lamin A/C</i>
LRP5	<i>low density lipoprotein receptor-related protein 5</i>

LV	linker Ventrikel
MAPK1	<i>mitogen-activated protein kinase 1</i>
MCL3	<i>myosin light chain 3</i>
MCL4	<i>myosin light chain 4</i>
MES	<i>2-[N-Morpholino]-Ethansulfonsäure</i>
MGED	<i>Microarray Gene Expression Data</i> (http://www.mged.org): Die MGED-Kommission ist ein internationales Konsortium, das 1999 gegründet wurde, mit dem Ziel den Austausch von Microarray-Daten zu vereinfachen. Die von der MGED-Kommission formulierten Kriterien für die Strukturierung und Dokumentation von Microarray-Experimenten sind inzwischen umfassend akzeptiert und stellen oftmals die notwendige Voraussetzung für eine Publikation in namhaften wissenschaftlichen Zeitschriften dar (Brazma et al., 2000).
MM	<i>Mismatch</i>
MMP9	<i>matrix metalloproteinase 9</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MYH 7	<i>myosin heavy polypeptide 7</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (www.ncbi.nlm.nih.gov)
NFAT _c 3	<i>nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 3</i>
NF-KappaB	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1</i>
NFKB1	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1</i>
NPPA	<i>natriuretic peptide precursor A</i>
NPPB	<i>natriuretic peptide precursor B</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PLN	<i>phospholamban</i>

PM	<i>perfect match</i>
PPP3CA	<i>protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform</i>
pro-BNP	<i>natriuretic peptide precursor B</i>
PTGFRN	<i>platelet growth factor2 inhibitor</i>
PTPN3	<i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3</i>
RA	rechtes Atrium
Rab	Rab-Transkripte kodieren für eine Gruppe von Proteinen, die zur Familie der kleinen GTP-bindenden Proteine gehören und für das Anheften und für die Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran von Bedeutung sind.
RGS13	<i>regulator of G-protein signalling 13</i>
RGS3	<i>regulator of G-protein signalling 3</i>
RMA	<i>robust multiarray averaging</i>
R _n	normalisiertes Reportersignal
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK2	<i>Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2</i>
RPL41	<i>ribosomal protein L41</i>
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
RYR2	<i>ryanodine receptor 2</i>
RYR3	<i>ryanodine receptor 3</i>
SAPE	Streptavidin-Phycoerythrin
SCN1B	<i>sodium channel, voltage-gated, type I, beta</i>
Sec	Sec-Transkripte kodieren für eine Gruppe von Proteinen, die Komponenten eines Protein-Transport-Apparats des Endoplasmatischen Retikulums sind und für das Anheften und für die Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran von Bedeutung sind.
SERCA	<i>sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase</i>

SFRP	<i>secreted frizzled-related protein</i>
SGCE	<i>ε-sarkoglykan</i>
SLN	<i>sarcolipin</i>
SNTB2	<i>β2-syntrophin</i>
SR	Sinusrhythmus
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
STAT5A	<i>signal transducer and activator of transcription 5A</i>
STAT5B	<i>signal transducer and activator of transcription 5B</i>
TBX5	<i>T-box 5</i>
TCF	<i>transcription factor</i>
TGF-β	<i>transforming growth factor beta</i>
TGFBR2	<i>TGFβ-receptor 2</i>
TIEG1	<i>TGFB-induced early growth response 1</i>
TIEG2	<i>TGFB-induced early growth response 2</i>
TIMP3	<i>TIMP metalloproteinase inhibitor 3</i>
TNC	<i>tenascin C</i>
TNFAIP3	<i>tumor necrosis factor alpha-induced protein 3</i>
TNNT2	<i>troponine T2</i>
UBC	<i>ubiquitin C</i>
UDG	Uracil-DNA-Glycosylase
VANGL2	<i>vang-like 2</i>
VhF	Vorhofflimmern
VWF	<i>von Willebrand factor</i>
WNT	<i>wingless type MMTV integration site family member</i>

1 EINLEITUNG

1.1 Strukturelle und funktionelle Unterschiede zwischen atrialem und ventrikulärem Myokard

Das Säugetiermyokard ist durch eine regionale funktionelle Spezialisierung gekennzeichnet (Piper et al., 1989; Frick et al., 1992; [Abb. 1](#)).

Zellen des Reizleitungssystems sind speziell dazu befähigt, Erregungsimpulse zu bilden und weiterzuleiten (Silbernagel et al., 1998). Die Erregung wird vom Sinusknoten, dem Schrittmacher des Herzens, initiiert. Von dort breitet sie sich über das rechte Atrium zum Atrioventrikular (AV)-Knoten und über das His-Bündel mit seinen beiden Tawara-Schenkeln zu den Purkinjefasern aus, welche die Erregung auf das ventrikuläre Myokard übertragen.

Im Arbeitsmyokard lassen sich je nach Lokalisation zwei distinkte Zellpopulationen unterscheiden: Atriale und ventrikuläre Kardiomyozyten. Die Hauptaufgabe ventrikulärer Zellen besteht in einer effizienten Kontraktion. Diese wird u.a. durch ein gut entwickeltes transversales Tubulussystem gewährleistet, welches durch die kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum für den koordinierten Beginn der Kontraktion essentiell ist ([Abb. 2a](#)). Weiterhin ist für ventrikuläre Myozyten eine wesentlich höhere Dichte an Mitochondrien als in atrialen Myozyten charakteristisch, die sich durch den höheren Energieverbrauch aufgrund der größeren Kraftentwicklung im Ventrikel erklärt (Legato, 1973; Piper und Isenberg, 1989; Weiss, 1988).

Neben der kontraktile Funktion, ist ein Hauptcharakteristikum atrialer Myozyten die Spezialisierung hinsichtlich endokriner Funktionen (Legato, 1973; Piper und Isenberg, 1989). Die Vorhöfe stellen den Schnittpunkt zwischen Kreislaufsystem und Myokard dar und beeinflussen Volumenstatus und Gefäßtonus über eine Vielzahl von endokrinen Mediatoren, wie Adrenomedullin (ADM) oder natriuretisches Peptid B (BNP). Als endokrin spezialisierte Zellen weisen sie gut entwickelte Organellen zur Synthese (rauhes endoplasmatisches Retikulum), Prozessierung (Golgi Apparat) und Sekretion (sekretorische Vesikel) endokriner Mediatoren auf ([Abb. 2b](#)). Morphologisch sind atriale Kardiomyozyten im Vergleich zu ventrikulären Myozyten mit einem Durchmesser von etwa 6-8µm kleiner und weisen nur ein gering entwickeltes transversales Tubulussystem auf.

Weitere Unterschiede zwischen atrialen und ventrikulären Myozyten ergeben sich hinsichtlich elektrophysiologischer Eigenschaften: Aufgrund unterschiedlicher Expression von Ionenkanälen ist die Aktionspotentialdauer im Ventrikel etwa 100-150 ms länger als im Atrium. Das längere ventrikuläre Aktionspotential gewährleistet, dass ventrikuläre Myozyten eine längere Refraktärphase besitzen und somit das Entstehen eines Reentry erschwert wird

(Klinke und Silbernagel, 2001; [Abb. 3](#)). Zusätzlich zur unterschiedlichen Expression von Ionenkanälen ist der atriale Zellverband durch eine vergleichsweise geringe Anzahl von interzellulären Verbindungen charakterisiert, was eine verminderte Leitungsgeschwindigkeit im atrialen Myokard bedingt.

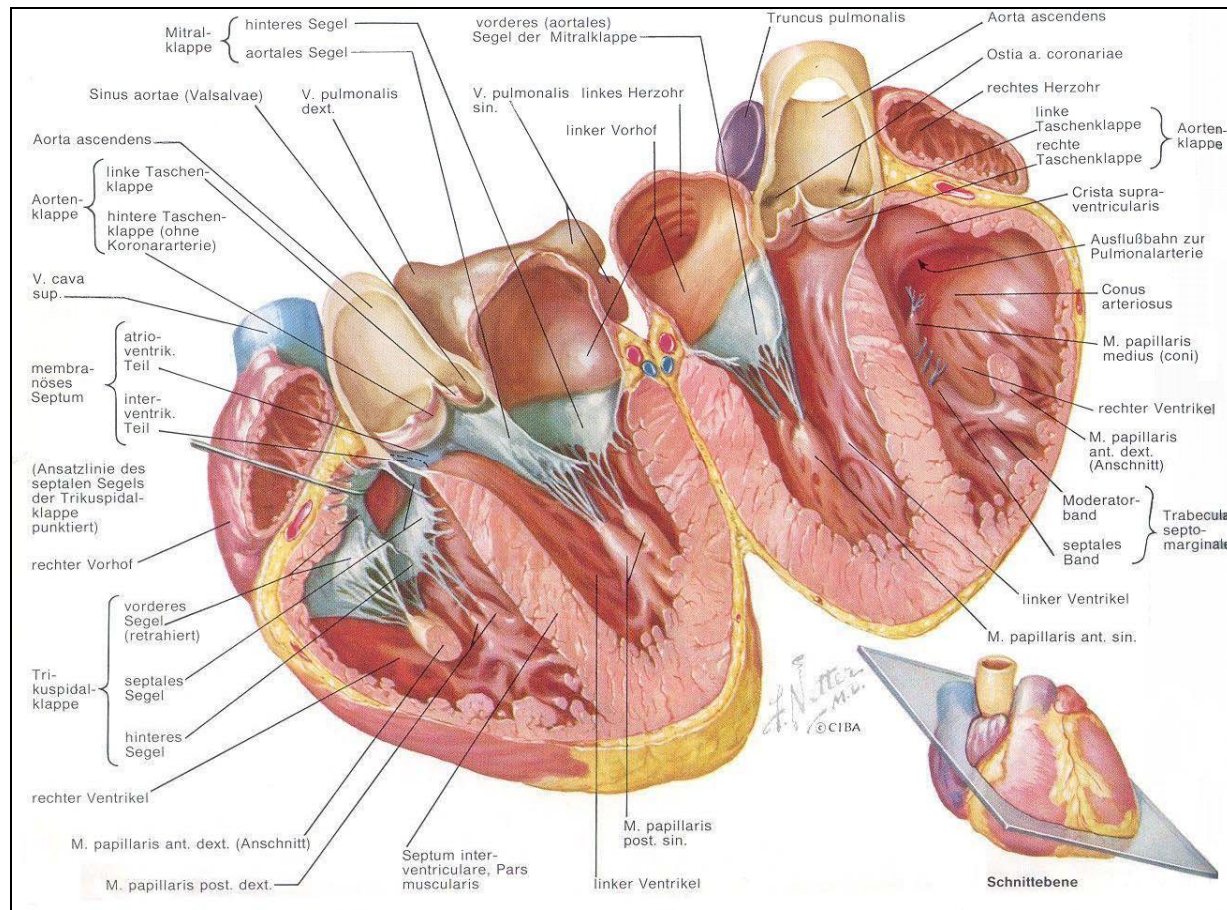


Abbildung 1

Ansicht des eröffneten Herzens von ventral (Netter et al., 1976).

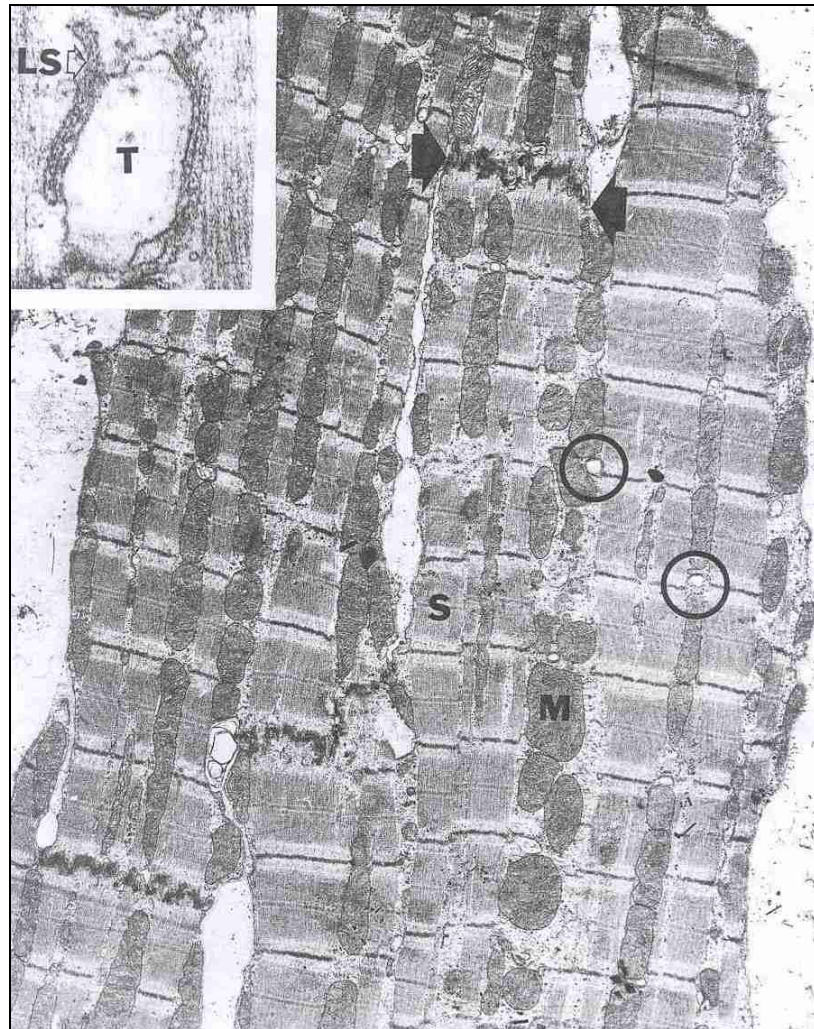


Abbildung 2a

Elektronenmikroskopische Darstellung einer ventrikulären Zelle (Legato, 1973).



Abbildung 2b

Elektronenmikroskopische Darstellung einer atrialen Zelle (Legato, 1973).

a) Großes Bild: Die ventrikuläre Zelle zeichnet sich durch Glanzstreifen (Pfeile) aus, über welche die Zellen miteinander in Kontakt stehen. Die häufige Verzweigung der Zellen ist charakteristisch für ventrikuläre Kardiomyozyten. Die Zellen beinhalten eine Vielzahl von Sarkomeren (S) und Mitochondrien (M). Das sarkoplasmatische Retikulum ist gut entwickelt und bildet charakteristischerweise ein sog. transversales Tubulussystem in Form von Diaden und Triaden (Kreise). *Vergrößerung 6900fach.*

Kleines Bild: Eine Triade besteht aus einem transversalem Tubulusvesikel und zwei manschettenähnlichen Ausstülpungen des sarkoplasmatischen Retikulums (*lateral sacs*, LS). *Vergrößerung 44300fach.*

b) Bei zwei der vier angeschnittenen atrialen Zellen lässt sich eine charakteristische Seit-zu-Seit-Verbindung (Pfeile) erkennen. Der Extrazellulärraum (ECS) enthält Kollagen (C). Die Zellen besitzen einen zentralen Kern (N), in dessen Umgebung sich atriale Granula (AG), Sarkomerreihen (S) und Mitochondrien (M) befinden. *Vergrößerung 5300fach.*

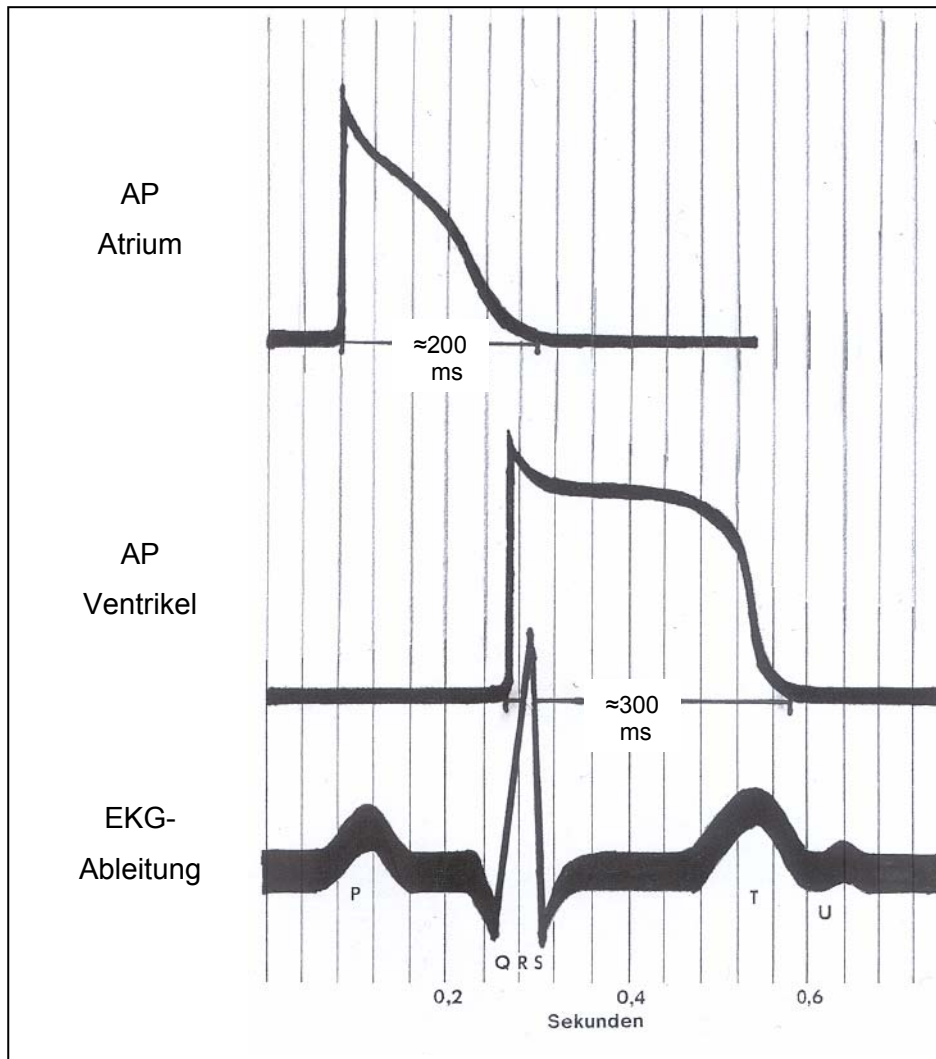


Abbildung 3

Aktionspotential (AP) einer ventrikulären und atrialen Zelle (Netter et al., 1976). Die ventrikuläre Aktionspotentialdauer ist ca. 100ms länger als im Atrium.

1.2 Regionale Unterschiede der Genexpression im Myokard bei kardiovaskulären Erkrankungen

Erste Hinweise auf die Bedeutung regionaler Unterschiede in der Genexpression bei kardiovaskulären Erkrankungen fanden sich mit dem Nachweis einer vermehrten Expression von ventrikulären Myosinisoformen im Atrium von Patienten mit Herzinsuffizienz (Wankerl et al., 1990). Kääb und Mitarbeiter verglichen in einer Microarray-Studie die atriale und ventrikuläre Genexpression von herzinsuffizienten Patienten mit der Expression von nicht-insuffizienten Spenderherzen. Es zeigte sich, dass die Adaptationsvorgänge bei Herzinsuffizienz ein regional spezifisches Muster aufweisen. Exemplarisch hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang die Genaktivität von BNP, das physiologisch vornehmlich im Atrium exprimiert wird. Bei Herzinsuffizienz kommt es zu einer deutlichen Hochregulation im Ventrikel, so dass schliesslich höhere Expressionswerte als im Vorhof erreicht werden (Kääb et al., 2004). In Zusammenschau aller 288 bei Herzinsuffizienz regulierten Transkripte war nur in 19 Fällen eine gleichsinnige Änderung im Atrium und Ventrikel festzustellen. Bei den restlichen 269 Transkripten kam es zu regional spezifischen Expressionsänderung bei Herzinsuffizienz, wobei im Atrium fast zweimal so viele Gene reguliert waren wie im Ventrikel ([Abb. 4](#)).

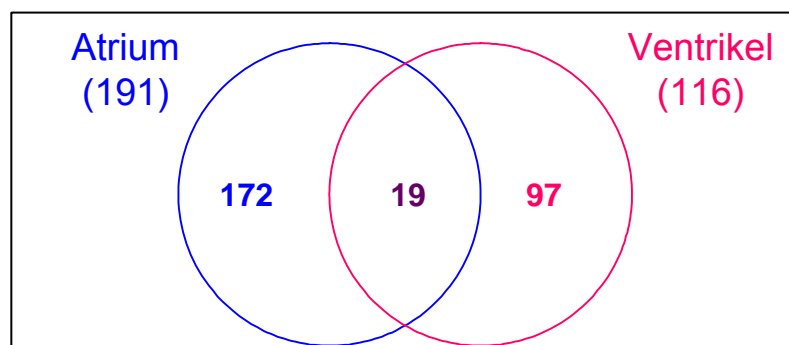


Abbildung 4

Anzahl der unterschiedlich exprimierten Gene zwischen nicht-insuffizienten und insuffizienten Herzen in Atrium und Ventrikel (Kääb et al., 2004). Nur 19 der 288 bei Herzinsuffizienz differentiell exprimierten Gene waren in Atrien und Ventrikel gleichzeitig reguliert.

Die Bedeutung eines unterschiedlichen molekularen Remodelings in Atrium und Ventrikel konnte auch durch tierexperimentelle Untersuchungen untermauert werden. In einem Hundemodell, in dem die Genaktivität hypertensiver Tiere mit der einer Kontrollgruppe untersucht wurde, wiesen nur 38 Transkripte eine Expressionsänderung auf. In Analogie zur Studie von Kääb et al. waren nur elf Transkripte in Atrium und Ventrikel gleichzeitig reguliert,

während sich für die verbleibenden 27 Gene ein regional spezifisches Expressionsmuster fand (Philip-Couderc et al., 2003).

Ferner konnte in einem Herzinsuffizienzmodell beim Hund durch tachykarde ventrikuläre Stimulation über vier Wochen gezeigt werden, dass im Atrium und Ventrikel qualitativ und quantitativ unterschiedliche Anpassungsreaktionen stattfinden (Hanna et al., 2004). Die histologische, immunhistochemische und molekularbiologische Analyse von atrialem und ventrikulärem Gewebe ergab, dass sich der zeitliche Verlauf von Leukozyteninfiltration, Apoptoseprozessen, Aktivierung von mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) und *transforming growth factor beta* (TGF β)-Stoffwechselwegen im Atrium signifikant zum Ventrikel unterscheidet. Nach vierwöchiger, schneller ventrikulärer Stimulation fand sich als wesentlicher Befund eine vermehrte Fibrose im Atrium, nicht jedoch im Ventrikel ([Abb. 5](#)).

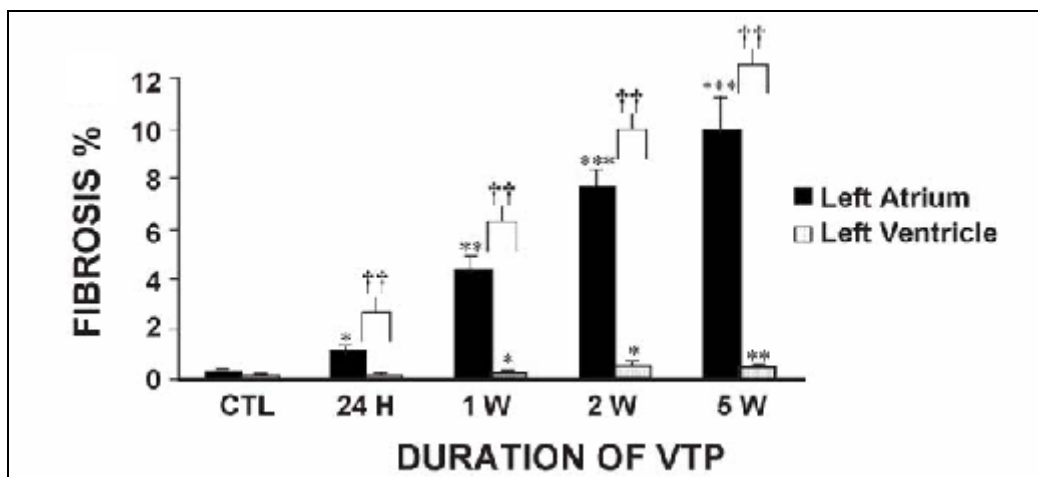


Abbildung 5

Mittlerer bindegewebiger Anteil \pm Standardabweichung im linken Atrium und linken Ventrikel bei Kontrolltieren (CTL) sowie nach 24h (24 H), einer Woche (1 W), zwei Wochen (2 W) und fünf Wochen (5 W) tachykarder ventrikulärer Stimulation (angegeben als Prozentangabe in der Schnittebene einer histologischen Untersuchung; $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe; † $p < 0,05$, †† $p < 0,01$ und ††† $p < 0,001$ für linksatriale versus linksventrikuläre Werte (Hanna et al., 2004)).

1.3 Pathophysiologische Veränderungen bei chronischem Vorhofflimmern: elektrophysiologische, strukturelle und kontraktile Umbauprozesse

Vorhofflimmern ist die häufigste Arrhythmie beim Menschen und weist einen altersabhängigen Anstieg der Inzidenz und Prävalenz auf. So sind bei den über 65-jährigen bis zu 4% der Bevölkerung betroffen, bei den 80-jährigen sind dies bereits über 10% (Braunwald et al., 2001; Herold et al., 2004). Häufig stellt Vorhofflimmern keine eigenständige Erkrankung dar, sondern ist das Symptom einer Grunderkrankung, wie Hyperthyreose, arterielle Hypertonie, Klappenvitien, koronare Herzerkrankung oder Herzinsuffizienz. Obwohl Vorhofflimmern im Einzelfall wenig Symptome verursachen kann, bleibt es stets mit zwei ernsthaften Komplikationen behaftet: Thrombembolien sowie akute Linksherzinsuffizienz durch Tachy- oder Bradyarrhythmie. Bei neu aufgetretenem Vorhofflimmern kann die Therapie der Grunderkrankung in bis zu 50% zu einer spontanen Rhythmisierung führen (Karow et al., 2004). Mit zunehmender Dauer der Arrhythmie gestaltet sich die Therapie jedoch schwierig und ist selbst nach erfolgreicher Konversion in den Sinusrhythmus durch eine hohe Rate an Rezidiven gekennzeichnet. Die beiden derzeitigen medikamentösen Behandlungsstrategien basieren auf der Rhythmuskontrolle einerseits und der Frequenzkontrolle andererseits. Beide Modalitäten scheinen hinsichtlich der Mortalität gleichwertig zu sein (Blackshear et al., 2003; Prasun et al., 2003). Da die fehlende Überlegenheit der medikamentösen Rhythmisierung gegenüber der Frequenzkontrolle vor allem aus einem ungünstigen Nebenwirkungsprofil der Antiarrhythmika (v.a. ventrikuläre Proarrhythmie) resultiert, lässt ein besseres molekulares Verständnis der zugrunde liegenden Remodelingvorgänge hoffen, dass sie zur Entwicklung neuartiger, rationaler Therapiekonzepte bei Vorhofflimmern beiträgt.

Hinsichtlich ihres Auftretens und ihrer Dauer wird die Erkrankung in drei Kategorien eingeteilt: Paroxysmales, persistierendes und permanentes Vorhofflimmern (Herold et al., 2004). Paroxysmales Vorhofflimmern ist selbstlimitierend und konvertiert spontan in den Sinusrhythmus, meist innerhalb von 48 Stunden. Bei persistierendem Vorhofflimmern tritt keine spontane Konversion in den Sinusrhythmus mehr auf; allerdings kann diese medikamentös oder elektrisch erreicht werden. Bei permanentem Vorhofflimmern ist schließlich eine Konversion in den Sinusrhythmus weder elektrisch noch medikamentös möglich.

Die Neigung zur Chronifizierung und Progression ist ein wesentliches Charakteristikum von Vorhofflimmern („*atrial fibrillation begets atrial fibrillation*“, Wijffels et al., 1995). In diesem Zusammenhang sind bestimmte Umbauprozesse des Myokards auf elektrophysiologischer, struktureller und kontraktile Ebene erkannt worden (Allessie et al.,

2002). Diese so genannten Remodelingvorgänge tragen entscheidend zur Begünstigung und Aufrechterhaltung der Rhythmusstörung bei.

Die starke Verkürzung der Aktionspotentialdauer als Ausdruck des elektrophysiologischen Remodelings trägt nach Initiierung von Vorhofflimmern entscheidend zur Stabilisierung der Arrhythmie in der frühen Phase bei. Im Tierexperiment wurde bei schneller atrialer Stimulation eine zunehmende Verkürzung der Refraktärzeit und ein Verlust der Frequenzadaptation festgestellt (Morillo et al., 1995; Wijffels et al., 1995). Die charakteristische Aktionspotentialverkürzung resultiert vor allem aus einer Verminderung des L-Typ Kalziumstroms (Allessie et al., 2002; Yue et al., 1997). Sie wird im Sinne eines Kompensationsmechanismus aufgefasst, der eine zelluläre Kalziumüberladung in Folge der stark erhöhten Depolarisationsfrequenz verhindern soll. Weiterhin kommt es im Rahmen des elektrischen Remodelings zu charakteristischen Veränderungen repolarisierender Kaliumströme mit Verminderung des transienten Auswärtsstromes (I_{to}) und des „ultraschnell“ aktivierenden Kaliumstromes (I_{Kur}) sowie zu einer Erhöhung des einwärtsgerichtenden Kaliumkanales I_{K1} und des azetylcholinabhängigen Kaliumkanales I_{KAch} (Yue et al., 1997; Bosch et al., 1999).

Diese Veränderungen sind aber nach einer Kardioversion in den Sinusrhythmus selbst bei über mehrere Monate persistierendem Vorhofflimmern potentiell noch reversibel (Allessie et al., 2002). Die Patienten weisen jedoch nach Abschluss dieses die Ionenkanäle betreffenden *reversen* Remodelings eine erhöhte Neigung zu Vorhofflimmerrezidiven auf. Dies lässt darauf schließen, dass es weitere Remodelingprozesse gibt, die zu einer lang anhaltenden Substratmodifikation führen und die Arrhythmie langfristig zu stabilisieren vermögen. Hierzu werden v.a. Veränderungen der strukturellen und kontraktile Eigenschaften des Atriums gezählt. In tierexperimentellen Studien konnten nach sechs Wochen schneller atrialer Stimulation licht- und elektronenmikroskopisch zahlreiche ultrastrukturelle Veränderungen nachgewiesen werden (Ausma et al., 1997; Ausma et al., 2001; Thijssen et al., 2001). Im Atrium fand sich eine zunehmende Fibrosierung und die atrialen Kardiomyozyten präsentierten sich im Zellverband ungeordnet und hypertroph. Zudem waren die Zellen durch veränderte Kernstrukturen, eine Umverteilung des Heterochromatins und eine perinukleäre Akkumulation von Glykogen gekennzeichnet. Der kontraktile Apparat war ebenfalls betroffen: Neben einer Myolyse sind eine Fragmentierung des sarkoplasmatischen Retikulums sowie Veränderungen der Mitochondrien und Zelladhäsionsmoleküle festgestellt worden (Ausma et al., 1997; Ausma et al., 2001; Thijssen et al., 2001).

Die Bedeutung dieser Umbauprozesse liegt in der Stabilisierung des Vorhofflimmerns. Durch den erhöhten Fibrosegrad und die verminderte interzelluläre

elektrische Kopplung werden Leitungsblock und Reentry im Vorhof begünstigt (Li et al., 1999; Allesie et al., 2002). Aufgrund der bisher vorliegenden Daten scheinen die oben beschriebenen Remodelingvorgänge zum Teil auf transkriptionellen Veränderungen zu basieren. Eine umfassende Charakterisierung der Genexpression bei Vorhofflimmern lag im humanen Myokard bisher nicht vor.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war eine Charakterisierung der transkriptionellen Veränderungen bei Vorhofflimmern unter besonderer Berücksichtigung regionaler Unterschiede zwischen Atrium und Ventrikel. Zu diesem Zweck wurde eine genomweite Analyse transkriptioneller Unterschiede der atrialen und ventrikulären Genexpression im nicht-insuffizienten Myokard ebenso wie ein Vergleich der atrialen Genexpression bei Vorhofflimmern mit dem ventrikulären Transkriptom durchgeführt. Eine funktionelle Klassifikation ermöglichte die Identifikation spezifischer Expressionsmuster und trug so dazu bei, die unterschiedliche Expression von Transkripten in ihrer biologischen Bedeutung zu erfassen. Mit Hilfe der semiquantitativen real-time RT-PCR konnten wesentliche Ergebnisse der Microarray-Analysen anhand einer unabhängigen Methode validiert werden.

Im Besonderen versuchte die Arbeit nachfolgende Fragen zu beantworten:

- 1) Können die bekannten ultrastrukturellen und funktionellen Unterschiede zwischen nicht-insuffizientem atrialem und ventrikulärem Myokard mit transkriptionellen Veränderungen korreliert werden?
- 2) Können die bekannten Remodelingvorgänge bei Vorhofflimmern bis zur Ebene der Genexpression zurückverfolgt werden?
- 3) Ist die vermehrte Expression von ventrikulären Myosinketten im Vorhofmyokard bei Vorhofflimmern isoliert zu betrachten oder ist sie integraler Bestandteil einer Verschiebung des atrialen Transkriptionsprogrammes in Richtung eines ventrikulären Genexpressionsmusters?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Auswahl und Aufbereitung des Myokardgewebes

2.1.1 Auswahl der Patienten

Das ventrikuläre Gewebe stammte von fünf Spenderherzen, die aufgrund einer beginnenden Koronarsklerose nicht zur Transplantation verwendet werden konnten. Bei keinem der Patienten war jedoch eine klinisch relevante kardiale Grunderkrankung bekannt. Echokardiographisch lag eine normwertige linksventrikuläre Pumpfunktion bei normal großem linkem Ventrikel vor. Für die vorliegenden Untersuchungen wurden transmurale Gewebestücke aus der freien linksventrikulären Herzwand exzidiert, anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Atriales Gewebe wurde von Patienten gewonnen, die sich im Rahmen einer offenen thoraxchirurgischen Operation einem Mitral- oder Aortenklappenersatz oder einer koronaren Bypassversorgung unterziehen mussten. Für den Anschluß an die Herz-Lungen-Maschine wurde der rechte Vorhof kanüliert, wobei hierfür ein kleiner Teil der rechten Herzohrspitze entfernt wird. Obwohl ein Teil dieser Patienten eine eingeschränkte linksventrikuläre Pumpfunktion aufwies, konnte mittels transthorakaler Echokardiographie eine signifikante Trikuspidalklappeninsuffizienz stets ausgeschlossen werden. Ebenso fehlten klinische Zeichen eines Rechtsherzversagens wie periphere Ödeme, Aszites oder erhöhte Leberenzyme als Hinweis auf eine mögliche Leberstauung. Bei zehn Patienten bestand chronisches Vorhofflimmern mit einer elektrokardiographisch nachgewiesenen Dauer von mindestens drei Monaten. Die verbleibenden 20 Patienten hatten kein Vorhofflimmern in der Vorgeschichte und befanden sich zum Zeitpunkt der Operation im Sinusrhythmus. Detaillierte Patientencharakteristika sind in [Tabelle 1](#) angegeben. Die Untersuchung wurde von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt.

Patienten- kennung	Gewebe	Geschlecht	Alter (J.)	EF (%)	Diagnose	Therapie
SR-1	RA	Männlich	55	45	AoR	T
SR-2	RA	Weiblich	54	74	MR	A
SR-3	RA	Weiblich	72	60	ACVB	A, B, T
SR-4	RA	Weiblich	61	55	ACVB	A, B, T
SR-5	RA	männlich	67	77	ACVB, MR, AoR	A, B, T
SR-6	RA	männlich	52	65	MR	-
SR-7	RA	männlich	46	60	ACVB	A, B, St
SR-8	RA	weiblich	65	61	AoS	T
SR-9	RA	weiblich	59	74	MR, Hyperthyreose	Carbimazol
SR-10	RA	männlich	59	73	MR, DM, ACVB	SD, D, St
SR-11	RA	männlich	68	57	ACVB	B, SD, St
SR-12	RA	weiblich	69	62	AoS, DM	B, St
SR-13	RA	männlich	36	65	AoR	L, Sp
SR-14	RA	männlich	60	75	MR	A, B, T
SR-15	RA	männlich	75	65	MR	A, B, St
SR-16	RA	weiblich	74	82	MR	A
SR-17	RA	männlich	60	47	AoS, AR	A, T
SR-18	RA	männlich	72	45	AoS	T
SR-19	RA	weiblich	76	65	AoS, ACVB	A, B, T, St
SR-20	RA	männlich	75	65	ACVB	B, St
VhF-1	RA	weiblich	17	n.v.	DCM, MR, Marfan	D, SD
VhF-2	RA	männlich	75	48	MR, AoR	A, T
VhF-3	RA	männlich	65	59	MR, AoR, DM	B, D, SD
VhF-4	RA	weiblich	71	47	MR	A, SD

VhF-5	RA	männlich	53	53	MS	B, D, T
VhF-6	RA	weiblich	58	52	AoS	AIIR, B
VhF-7	RA	männlich	70	38	MR	A, B, T
VhF-8	RA	männlich	75	52	MR, DM, KHK	A
VhF-9	RA	männlich	67	30	MR, DCM	A, C, SD
VhF-10	RA	männlich	78	73	MR	AIIR, SD
LV-1	LV	männlich	42	n.v.	NI	-
LV-2	LV	weiblich	53	n.v.	NI	-
LV-3	LV	weiblich	62	n.v.	NI	-
LV-4	LV	weiblich	38	n.v.	NI	-
LV-5	LV	weiblich	50	n.v.	NI	-

Tabelle 1

Patientencharakteristika

A= ACE-Hemmer; AIIR= Angiotensin-II-Rezeptorantagonist; AoR= Aortenklappeninsuffizienz; AoS= Aortenklappenstenose; B= beta-Blocker; ACVB = aorto-koronarvenöse Bypassplastik; D= Digitalis; DCM= dilatative Kardiomyopathie; DM= Diabetes mellitus; EF= linksventrikuläre Auswurffraktion (Ventrikulographie); KHK= koronare Herzkrankheit; LV= linker Ventrikel; MR= Mitralklappeninsuffizienz; MS= Mitralklappenstenose; NI= nicht-insuffiziente Spenderherzen; n.v.= nicht verfügbar; RA= rechtes Atrium; SD= Schleifendiuretikum; Sp= Spironolaktone; SR= Sinusrhythmus; St= Statin; T= Thiazid-Diuretikum; VhF= Vorhofflimmern.

2.1.2 RNA-Isolation

Aus dem gefrorenen Gewebe wurde Gesamt-RNA nach dem TRI REAGENT Standardprotokoll (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, Ohio, USA) unter Verwendung einer Guanidiumthiocyanat und Phenol/Chloroform-Fällung isoliert (Chomczynski et al., 1987).

Hierzu wurden die gefrorenen Gewebestücke mit einem RNase-freien Mörser zerkleinert und zu je maximal 100mg in 1,5ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Unter Zugabe von 1ml TRI REAGENT pro Reaktionsgefäß wurde das Gewebe homogenisiert und löste sich nach einer fünfminütigen Einwirkzeit bei Raumtemperatur in die Zellbestandteile auf. Zur Trennung der RNA von DNA und Proteinbestandteilen erfolgte eine Zugabe von je 200µl Chloroform. Nach erneutem Vortexen und anschließender dreiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Homogenat bei 12.000g für 15min bei vier Grad Celsius

zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA unter Zugabe von 500µl 100% Isopropanol gefällt. Nach einer zehnminütigen Lagerung bei Raumtemperatur wurden die Proben für weitere zehn Minuten (12.000g, 4°C) erneut zentrifugiert. Die präzipitierte RNA zeigte sich dabei als weißer Bodensatz. Es folgte ein Waschvorgang mit je 1ml 75% Ethanol und eine erneute Zentrifugation der RNA bei 7.500g für acht Minuten bei vier Grad Celsius. Nach dem Abpipettieren des Ethanols wurden die RNA Pellets im offenen Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur für zehn Minuten getrocknet, in 90µl RNase-freiem Wasser gelöst, mittels Photometrie über das 260nm/280nm Verhältnis quantifiziert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

Zur Qualitätskontrolle wurden schließlich 150ng RNA auf einen RNA 6000 Nano LabChip kit im Agilent Bioanalyzer 2100 aufgetragen (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) und das Verhältnis 18S zu 28S überprüft (Zielwert > 1,8).

2.2 Durchführung der Transkriptionsanalyse mittels Oligonukleotid-Genchips

2.2.1 Aufbau und Funktion der Affymetrix HG-U133A+B-Microarrays

Microarrays erlauben durch die miniaturisierte Anordnung tausender Gensonden genomweite Expressionsanalysen, die auf der Hybridisierung komplementärer Nucleinsäuren beruhen (Barrett et al., 2003). Spezifische Gensonden werden in definierter Anordnung auf einer festen Glas- oder Silikonoberfläche aufgebracht. Die zu untersuchende RNA-Probe wird fluoreszenzmarkiert und anschließend auf den Chip aufgetragen. Dabei korreliert das Fluoreszenzsignal mit der Menge der aufgetragenen RNA, so dass eine quantitative Aussage über die Expression bestimmter Transkripte möglich wird ([Abb. 6](#)).

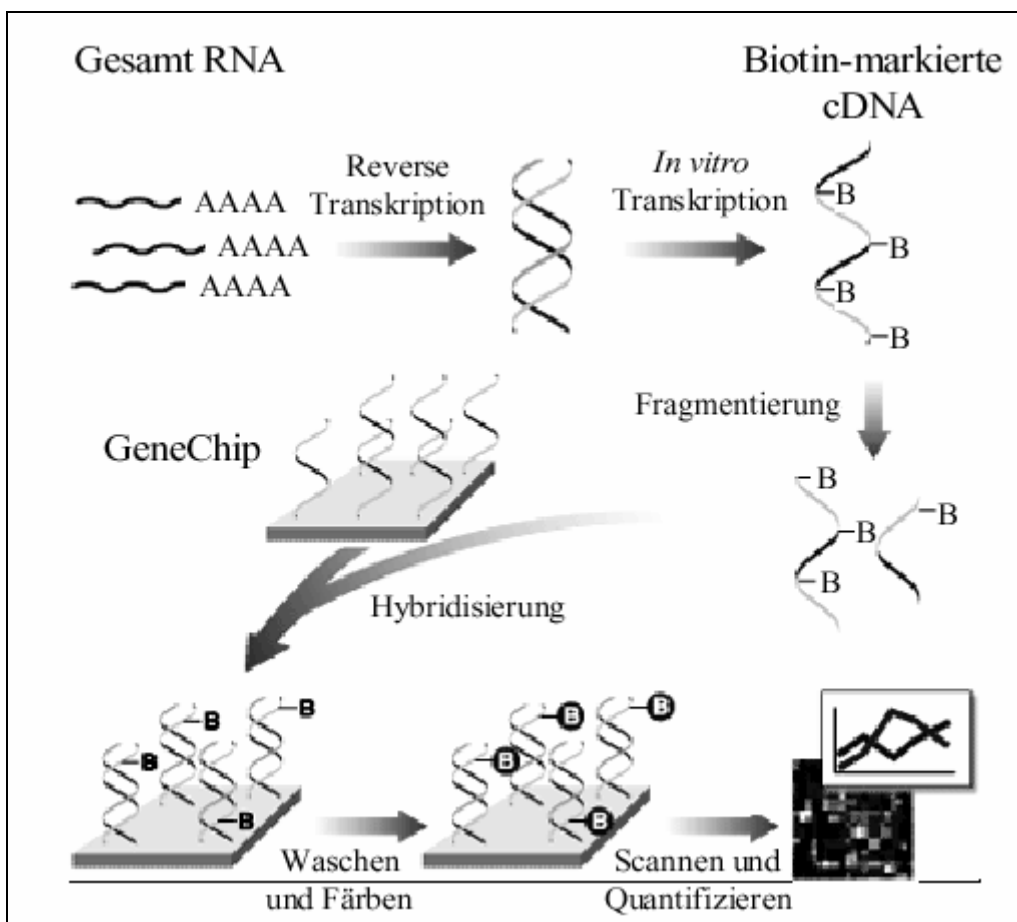


Abbildung 6

Arbeitsritte für ein Microarray-Experiment (Schema modifiziert nach Affymetrix)

Nach der reversen Transkription der Gesamt-RNA und anschließender in vitro-Transkription und Fluoreszenzmarkierung wird die cRNA auf dem Genchip hybridisiert. Nach dem Waschen, Färben und Scannen der Chips erfolgt das Quantifizieren der Fluoreszenzsignale. Diese korrelieren mit der aufgetragenen cRNA-Menge und erlauben somit eine Aussage über die Expression der untersuchten Transkripte.

In der vorliegenden Arbeit wurden HG-U133A+B Microarrays der Firma Affymetrix (Santa Clara, CA, USA; www.affymetrix.com) verwendet. Auf einer Glasoberfläche von 1,28 x 1,28cm² werden photolithographisch kurze Oligonukleotidsequenzen mit einer Länge von 20 Basenpaaren aufgetragen (Fodor et al., 1991; Fodor et al., 1993; McGall et al., 1996). Durch die in-situ Synthese der Oligonukleotide erreicht man eine Dichte von über 500.000 18 x 18µm kleiner, unterschiedlicher Sonden. Eine Besonderheit der Affymetrix-Plattform besteht darin, dass jedes zu detektierende Transkript durch 22 verschiedene Gensonden repräsentiert wird. Die Hälfte dieser Sonden ist dabei zu 100% der zu untersuchenden Gensequenz komplementär und wird als *perfect match* (PM) bezeichnet. Die verbleibenden elf Gensonden bilden die sog. *mismatch* Oligonukleotide (MM), bei denen im Vergleich zu den PM-Sonden in zentraler Position ein Basenaustausch vorgenommen wurde. Als Qualitätskriterium ist nun zu fordern, dass das Signal der PM-Oligonukleotide stets stärker ist als das MM-Signal. Somit erreicht man eine Reduktion von unspezifischen Kreuzhybridisierungen und Hintergrundrauschen (Lockhart et al., 1996; Wodicka et al., 1997).

Die verwendeten HG-U133A+B-Microarrays umfassen mit 44 928 Sondensätzen ca. 33 000 Transkripte. Die Sequenzinformationen stammen aus der UniGene Datenbank (Build 133, April 2001) und wurden zusätzlich ergänzt durch Daten aus zwei weiteren öffentlich zugänglichen Datenbanken (Washington University EST Trace Repository und University of California, Santa Cruz Golden Path Human Genome Database, April 2001).

Das Gene Chip Instrument System der Firma Affymetrix besteht aus vier Gerätekomponenten: Eine zentrale Computerplattform dient der Steuerung der übrigen Geräte sowie der Analyse der erhobenen Messdaten. In der Hybridisierungskammer werden die mit der Probe beladenen Microarrays unter Temperierung und Rotation hybridisiert. Der Argonlaser-Scanner (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) regt die auf dem Genchip gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe mit 488nm an und misst die Lichtemission bei einer Wellenlänge von 570nm. Jeder Chip wurde zweimal mit einer Auflösung von 3µm gescannt und die Fluoreszenzsignale aus beiden Messungen gemittelt.

2.2.2 Hybridisierung der Proben mit den Microarrays

Für die Hybridisierung der Proben mit den Microarrays wurde zunächst cDNA aus 10µg Gesamt-RNA mittels des „SuperScript double strand“ cDNA Synthese Kits (Invitrogen, Karlsruhe) und eines HPLC-gereinigten oligo(dT) primers ([vgl. Kap. 2.3.3](#)) hergestellt. Anschließend erfolgte eine in vitro-Transkription der doppelsträngigen cDNA zurück in cRNA (ENZO BioArray RNA transcript labeling kit, ENZO Diagnostics, Farmingdale, NY, USA).

Diese Reaktion stellt im Gegensatz zu den vorangegangenen Syntheseschritten, bei denen RNA-Moleküle 1:1 in cDNA umgeschrieben wurden, zugleich eine 30-100fache lineare Amplifikation dar. Nun wurde die synthetisierte RNA erneut gereinigt und einer Qualitätskontrolle mit Hilfe des Agilent Bioanalyzer unterzogen. Um eine optimale Sensitivität des Versuchs zu gewährleisten, erfolgte vor der Hybridisierung der Arrays eine Fragmentierung der cRNA in Stücke von 35-200 Basenlänge. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung unter Zugabe der fragmentierten cRNA hergestellt. Nachdem die Arrays auf Raumtemperatur erwärmt, mit 200µl des 1X Hybridisierungspuffers befüllt und für zehn Minuten bei 45°C unter Rotation von 50g in der Hybridisierungskammer präinkubiert worden waren, erfolgte eine Inkubation mit 200µl Hybridisierungslösung für 16h bei 45°C. Zuletzt wurden die hybridisierten Arrays in der Waschkammer des Systems (Fluidics-Station 450) zunächst mit 1,2ml SAPE-Lösung für 30min bei 25°C und schließlich mit je 200µl Non-Stringent-Wash A und Stringent-Wash B inkubiert.

Die Hybridisierung der in München gesammelten Proben erfolgte in Frankfurt am Main bei Aventis Pharma Deutschland GmbH. Die anschließende Analyse der Rohdaten und Validierung mittels real-time PCR wurden an der LMU München durchgeführt.

2.3 Durchführung einer semiquantitativen real-time RT-PCR zur Validierung

2.3.1 Prinzip der semiquantitativen real-time RT-PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine in vitro-Technik zur gezielten Vermehrung eines spezifischen DNA-Genomfragments, das zwischen zwei Regionen mit bekannter Nukleotidsequenz liegt (Mullies et al., 1987). Die PCR ermöglicht die Vervielfältigung sehr geringer Nukleinsäuremengen aus den unterschiedlichsten Materialien (Higuchi et al., 1992). Im Anschluß an eine konventionelle PCR werden die amplifizierten Fragmente meist mittels Ethidiumbromid fluoreszenzmarkiert, ihrer Größe nach in einem Agarose-Gel aufgetrennt und unter UV-Licht dargestellt.

Bei der real-time PCR handelt es sich um eine Variante der PCR, bei der in Echtzeit die Konzentration des PCR-Produktes gemessen werden kann. Dadurch ist es möglich, die Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA zu berechnen. Der PCR-Ansatz enthält hierbei den Fluoreszenz-Farbstoff SYBR® Green, der unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet. SYBR® Green sendet nach Anregung durch UV-Licht von 497nm Wellenlänge Licht im sichtbaren energieärmeren Wellenlängenbereich von 520nm aus. Erst durch die Interkalierung des Farbstoffes in die doppelsträngigen DNA wird die Lichtemission verstärkt, wobei die Fluoreszenz des gebundenen Farbstoffes ca. 200-fach höher als die des freien Farbstoffes ist.

Die Tatsache, dass dieser Anstieg der Fluoreszenz proportional zum Anstieg der Konzentration des Amplifikationsproduktes verläuft und die emittierte Fluoreszenz während jedes PCR-Zyklus gemessen wird, ermöglicht eine graphische Darstellung der Amplifikation in Echtzeit. Der Vorteil der real-time PCR liegt in der Möglichkeit einer Quantifizierung und einer höheren Sensitivität verglichen zur konventionellen PCR. Dabei dient SYBR® Green als interkalierender Farbstoff. Trotz zahlreicher Vorteile ist bei der Verwendung interkalierender Farbstoffe wie SYBR® Green problematisch, dass prinzipiell nicht zwischen korrektem Produkt und Artefakten (z.B. Primerdimeren) unterschieden werden kann. Letztere binden ebenfalls SYBR® Green und führen dadurch auch in negativen Proben zu einem unspezifischen Anstieg der Fluoreszenz. Diesem Umstand wird mit Hilfe der Schmelzpunktanalyse Rechnung getragen. Hier wird bei Erhitzung der Proben von 50°C auf 95°C kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen, die bei der dadurch erfolgenden Denaturierung und konsequenten Dissoziation der Sonde von der nun einzelsträngigen DNA stetig abnimmt. Da unterschiedliche Isoformen und Produkte anderer Sequenzen unterschiedliche Schmelzpunkte haben, zeigt die graphische Darstellung der Fluoreszenz über die Temperaturzunahme die Spezifität der Reaktion an.

2.3.2 DNase-Verdau und reverse Transkription

Kontaminierende DNA und zweiwertige Kationen, die am Abbau der RNA beteiligt sein können, wurden mit dem DNA-free™kit (Ambion Inc., Austin, Texas, USA) aus der Gesamt-RNA entfernt. Nach Verdünnung der Probe in 90µl Wasser ([vgl. Kap. 2.1.2](#)) und Zugabe von 0,1 Volumen 10x DNase I Puffer und 3µl DNase I folgte eine Inkubation für 1h bei 37°C. Als nächstes wurde den Proben je 25µl „DNase Inactivation Reagent“ hinzugefügt, und der Ansatz unter zwischenzeitlichem Mischen für 2min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation der Proben bei 10.000g für 1min wurde der Überstand, welcher der nun DNA-freien RNA-Lösung entspricht, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei –80°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Die reverse Transkription wurde mit jeweils 5µg Gesamt-RNA und 1µl random hexamer Primern durchgeführt (Gesamtvolumen 41µl durch Zugabe von DEPC-behandeltem Wasser). Nach einer fünfminütigen Präinkubationsphase bei 65°C wurden nach Abkühlen der Probe jeweils 5µl 10X StrataScript Buffer (Stratagene, La Jolla, CA, USA), 1µl RNase Block Ribonuclease Inhibitor (40U/µl), 2µl dNTP mix (100mM), 1µl StrataScript Reverse Transkriptase (50U/µl) in einem Gesamtvolumen von 50µl bei 42°C für 1h inkubiert. Die Inaktivierung der Reaktion erfolgte bei 90°C für 5min. Die gewonnene cDNA wurde schließlich bei –80°C gelagert.

2.3.3 Design der Primer für die semiquantitative real-time RT-PCR

Bezüglich der regionalen Unterschiede zwischen Atrium und Ventrikel wurden vier stichprobenartig gewählte Gene mittels RT-PCR validiert. Die Auswahl der bei Vorhofflimmern zu validierenden Gene erfolgte hingegen aufgrund ihrer zentralen pathophysiologischen Bedeutung ([vgl. Kap. 4.3.1](#)). So wurde die Expression von Transkripten gemessen, die eine wesentliche Rolle in intrazellulären Signalkaskaden und in der Transkriptionsregulation einnehmen (*calreticulin* (CALR), *cAMP responsive element binding protein 1* (CREB1), MAPK1, *nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 3* (NFAT_c 3), *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1* (NFKB1), *signal transducer and activator of transcription 5B* (STAT5B) und *Down syndrome critical region gene 1* (DSCR1)).

Spezifische Primer, die PCR-Fragmente von 100-250 Basenpaaren Länge amplifizieren, wurden mittels Primer 3 Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) hergestellt. Die Oligonukleotide (Thermo Hybaid, Ulm) und ihre Sequenzen sind in den Tabellen [2a](#) und [2b](#) aufgelistet.

Gen	Sequenzen der Primer	Annealing-Temperatur	Reference Sequence
EPHA7	Forward: 5' –CAA AGG GAA CGG ACC TAC TCA ACA G– 3' Reverse: 5' –CAG CAG CAG TAA AAG CCC GAA TC– 3'	62°C	NM_004440
IRX5	Forward: 5' – CTC AAC GAG CAC CGC AAG AAC C – 3' Reverse: 5' – CGG CGT CCA CGT CAT TTT ATT CTC – 3'	62°C	NM_005853
PTPN3	Forward: 5' – GGC ATC CTG GAG CAA TTG AGA CC – 3' Reverse: 5' – CTT AGC ATC AGG GCG GGT GAA TC – 3'	62°C	NM_002829
SCN1B	Forward: 5' – GGC CGT GTA TGG GAT GAC CTT C – 3' Reverse: 5' –CCT CCA GCT GCA ACA CCT CAT TC– 3'	62°C	NM_001037
GAPDH	Forward: 5' – AGC CAC ATC GCT CAG ACA CC – 3' Reverse: 5' – GTA CTC AGC GGC CAG CAT CG – 3'	60°C	M33197

Tabelle 2a

Oligonukleotid-Primer für die semiquantitative real-time RT-PCR für den Vergleich Atrium versus Ventrikel.

Gen	Sequenzen der Primer	Annealing-Temperatur	Reference Sequence
CALR	Forward: 5' – GAA GAG ATG GAC GGA GAG TGG – 3' Reverse: 5' – GGG TTG TCA ATT TCT GGG TG – 3'	60°C	BE251303
CREB	Forward: 5' – CGA GAA CCA GCA GAG TGG AGA TGC – 3' Reverse: 5' – TAG AGT TAC GGT GGG AGC AGA TGA TG–3'	63°C	NM_004379
DSCR1	Forward: 5' – AAC TTC AGC AAC CCC TTC TCC GC – 3' Reverse: 5' – GGG TCG CAT CTT CCA CTT GTT TCC – 3'	63°C	NM_004414
FBN1	Forward: 5' – ATG GGA TCT TAC CGC TGT CTG – 3' Reverse: 5' – TCA CAG GCT TTC CCG TCA G – 3'	60°C	NM_000138
GAPDH	Forward: 5' – AGC CAC ATC GCT CAG ACA CC – 3' Reverse: 5' – GTA CTC AGC GGC CAG CAT CG – 3'	60°C	NM_002046
GSK3A	Forward: 5' – CAG TGG CGA GAA GAA AGA CGA GC – 3'	61°C	L40027

	Reverse: 5' – GAT GTA GGC CAA GCT GCG GAA G – 3'		
ITPR1	Forward: 5' – CGG AGC AGG GTA TTG GAA C – 3' Reverse: 5' – CTT CAG GCA CAG AGA CCA GG – 3'	60°C	U23850
KCNK3	Forward: 5' – GGC TTC TTC TCG TGC ATC AG – 3' Reverse: 5' – AGG GTG ATG AAG CAG TAG TAG TAG G–3'	60°C	BF513479
MAPK1	Forward: 5' – AAG ACA CAA CAC CTC AGC AAT G – 3' Reverse: 5' – GTT GAG CAG CAG GTT GGA AG – 3'	60°C	NM_002745
NFATc3	Forward: 5' – TTC CAT CTT TGC CTG TGC C – 3' Reverse: 5' – GCA GAT GGG ATG AGG TCA CC – 3'	60°C	U85430
NFKB1	Forward: 5' – CAG GAG AGG ATG AAG GAG TTG TGC C–3' Reverse: 5' – GCC AGA GTA GCC CAG TTT TTG TCT G–3'	58°C	M55643
PPP3CA	Forward: 5' – AGG AGG GAA GGC TGG AAG AG – 3' Reverse: 5' – GAA GAG GTA GCG AGT GTT GGC – 3'	60°C	A1827550
STAT5B	Forward: 5' – CAT GGC TGT GTG GAT ACA AGC TCA G–3' Reverse: 5' – GAT CTA CTG AGT CCC ATG CTT GGC – 3'	61°C	NM_012448

Tabelle 2b

Oligonukleotid-Primer für die semiquantitative real-time RT-PCR für den Vergleich Sinusrhythmus versus Vorhofflimmern.

Die Spezifität der Primer konnte im Vorfeld der real-time PCR in einer gelelektrophoretischen Auftrennung mit Nachweis einer Einzelbande der entsprechenden Länge gezeigt werden. Zusätzlich wurde auch stets die Konfiguration der Schmelzkurve bei der real-time PCR analysiert ([vgl. Kap. 2.3.1](#)).

2.3.4 PCR-Amplifikation

Die real-time RT-PCR wurde für jede Probe in Dreifachbestimmung im Mx4000 real-time PCR-Gerät unter Verwendung von Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix entsprechend den Angaben von Stratagene (La Jolla, CA, USA) durchgeführt.

Hierzu wurde zu einer 10µl 1:5-fach verdünnter cDNA je 25µl Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG, 1µl ROX Reference Dye, 1µl Forward Primer (20µM), 1µl Reverse Primer (20µM) und 12µl H₂O (autoklaviert, destilliert) in einem 0,2ml

Reaktionsgefäß pipettiert. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt, kurz zentrifugiert und anschließend im Zwei-Schritt-Zyklus amplifiziert. Nach Inkubation der Proben bei 50°C und bei 95°C für je zwei Minuten folgten 50 Zyklen mit Denaturierung bei 95°C für 15s und Annealing bei 60°C für 30s (diese Temperatur wurde für das jeweilige Primerpaar entsprechend optimiert und schwankte zwischen 58 und 63°C; Tab. [2a](#) und [2b](#)).

2.4 Reagenzien für die molekularbiologischen Untersuchungen

2.4.1 Reagenzien für Microarrays

12X MES Lösung:

1,22M MES (2-[N-Morpholino]-Ethansulfonsäure), 0,89M MES-Natriumsalz, in Wasser, pH 6,5, sterilfiltriert

1X Hybridisierungspuffer:

100mM MES, 1M [Na⁺], 20mM EDTA, 0,01% Tween-10

Hybridisierungslösung (Gesamtvolumen 300µl):

15µg in H₂O gelöste, fragmentierte RNA (Endkonzentration 0,05µg/µl), 5µl Control Oligonucleotide B2 (3nM, Endkonzentration 50pM), 15µl Eukaryotic Hybridization Controls (Spike Controls, Endkonzentration 100pM, bei 65°C für 5min erwärmt), 3µl Hering Sperma DNA (10mg/ml, Endkonzentration 0,1mg/ml), 3µl acetyliertes Bovine Serum Albumin (BSA) (50mg/ml, Endkonzentration 0,5mg/ml), 150µl des 2X Hybridisierungspuffers.

Erhitzung für fünf Minuten auf 99°C, anschließend für fünf Minuten auf 45°C; Lagerung bei -80°C; vor Inkubation auf den Arrays Zentrifugation für fünf Minuten bei maximaler Drehzahl (14.000g) zur Sedimentation unlöslicher Partikel.

SAPE-Lösung (Streptavidin-Phycoerythrin):

600µl 2X Stain Buffer (200mM MES, 2M [Na⁺], 0,1% Tween-20, sterilfiltriert), 540µl H₂O, 48µl acetyliertes BSA-Lösung (50mg/ml) und 12µl Streptavidin-Phycoerythrin (10µg/ml).

Lichtgeschützte Lagerung bei vier Grad Celsius; Verwendung am Tag der Herstellung.

Non-Stringent-Wash A:

6X SSPE (0,9M NaCl, 0,06M NaH₂PO₄, 0,006M EDTA), 0,01% Tween-20, in Wasser, sterilfiltriert.

Stringent-Wash B:

100mM MES, 0,1M [Na⁺], 0,01% Tween-20, sterilfiltriert.

2.4.2 Reagenzien für PCR

10X StrataScript Buffer:

0,5M Tris-HCl (pH 8,3), 0,75M KCl, 0,03M MgCl₂

2.4.3 Enzyme und Oligonukleotide

StrataScript Reverse Transkriptase:

50U/μl; Lagerung in 20mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1mM EDTA, 1mM Dithiothreitol, 0,01% Igepal CA-630, 0,1M NaCl, 50%(v/v)Glycerol

Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG:

1,5 U Platinum® Taq DNA Polymerase, 20mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl, 3mM MgCl₂, 200μM dGTP, 200μM dATP, 200μM dCTP, 400μM dUTP, 1 U UDG

Oligonukleotide:

Tabellen [2a](#) und [2b](#).

2.5 Statistische Analyse und Datenauswertung

2.5.1 Analyse der Microarray-Daten

2.5.1.1 Qualitätskontrolle

Die eingescannten Messdaten wurden zunächst als Bilddateien gespeichert und einer stringenten Qualitätskontrolle unterzogen. Microarrays, die Kratzer oder eine inhomogene Anlagerung der Farbstoffe erkennen ließen, wurden ebenso eliminiert, wie Chips, die einen zu niedrigen oder zu hohen Fluoreszenzintensitätsbereich (z.B. aufgrund der Sättigung der PM-Oligonukleotide) oder ein zu kleines Signal-Rausch-Verhältnis aufwiesen. Die gewonnene cDNA wurde mittels der Bestimmung des 5'/3'-Verhältnisses von *actin* (ACT) und *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) (Zielwert >3) auf ihre Reinheit überprüft.

2.5.1.2 Normalisierung

Die Vergleichbarkeit verschiedener Microarrays in einer Experimentreihe setzt eine Normalisierung der Daten voraus. Die Zusammenfassung und Normalisierung der PM/MM-Signale erfolgte mittels RMA (*robust multiarray average*), das in der Bioconductor-Plattform implementiert ist (<http://www.bioconductor.org>). RMA beinhaltet eine Quantilnormalisierung, die auf der Annahme basiert, dass die Histogramme aller Arrays innerhalb einer Experimentreihe vergleichbar sind. Zusätzlich erfolgen auch die Korrektur des Hintergrundsignals und das Zusammenfassen der Intensität der elf PM-Oligonukleotide zu einem für das Gen charakteristischen Expressionswert.

2.5.1.3 Statistische Analyse

Differentiell exprimierte Gene wurden mittels Welch's t-Test ermittelt. Bei der Angabe des Signifikanzniveaus ist zu beachten, dass bei genomweiten Untersuchungen eine hohe Anzahl zu überprüfender Hypothesen in einer definierten Anzahl von Proben untersucht werden und somit viele falsch positive Ergebnisse entstehen können. Deshalb muss für multiples Testen korrigiert werden. Eine Möglichkeit hierfür bietet die Kontrolle der *false discovery rate* (FDR) (Storey et al., 2003). Die FDR ist der erwartete Anteil fälschlich abgelehnter Hypothesen an allen abgelehnten Hypothesen. In der vorliegenden Untersuchung wurde eine FDR<3% als statistisch signifikant gewertet.

In der Ergebnisliste wurden redundante Gensequenzen, die durch mehrere *probe sets* repräsentiert sind, mittels des Softwareprogrammes MatchMiner eliminiert (<http://discover.nci.nih.gov/gd/deploy/MatchMiner/html/index.jsp>).

Ebenso erfolgte eine Herausfilterung aller Gene, die als „*absent*“ erkannt worden sind. Der *absent / present call*-Status wurde dabei anhand des Bioconductor Softwarepakets bestimmt. Aus den Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Pixel für jede Zelle wurde eine durchschnittliche Fluoreszenzintensität ermittelt. Im Anschluss wurde von allen, einem Gen zugehörigen PM-MM-Paaren (2x11 Zellen) ein Vergleich aufgestellt. Durch das Verhältnis des PM-Signals zum MM-Signal wurde zunächst bestimmt, ob ein PM-MM-Paar als positiv oder negativ anzusehen ist. Anschließend folgte aus diesen Werten eine Berechnung des Verhältnisses positiver zu negativer Zelle. Die sog. *average difference* (avg diff) ist ein relatives Maß für den Expressionsgrad eines Gens und wird durch die durchschnittliche Differenz der *average intensities* von PM-MM-Paaren berechnet. Sie stellt somit die zusammenfassende Beurteilung aller Zellen eines Gens dar:

$$\text{avg diff} = \sum (\text{PM-MM}) / (\text{Anzahl der Paare})$$

Das Verhältnis der *average intensities* der PM-MM-Paare ist die Grundlage der Berechnung des *absolute call*, der über eine sog. Entscheidungsmatrix bestimmt wird. Dieser Wert gibt an, inwieweit ein bestimmtes Transkript auf dem Chip zuverlässig detektierbar ist und definiert somit ein Gen als *present* (P) (= detektierbar), *marginal* (M) (= grenzwertiges Signal) oder *absent* (A) (= nicht detektierbar).

Transkripte, die in über 50% der Gewebeproben als *absent* ermittelt worden waren, wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Für differentiell exprimierte Transkripte mussten mindestens 50% *present calls* in der Gruppe mit den höheren Expressionswerten vorliegen.

2.5.1.4 Hierarchisches Clustering

Die Cluster-Analyse dient dazu den Ähnlichkeitsgrad verschiedener Proben kondensiert zu präsentieren. Es wird versucht Proben anhand ähnlicher Expressionsprofile zu gruppieren (oder zu „clustern“). Die explorative Natur dieses Verfahrens zeigt sich dadurch, dass die Ergebnisse stark von den gewählten Eigenschaften der Cluster-Analyse abhängen. So ist die Wahl des Abstandsmaßes oder des Cluster-Verfahrens ausschlaggebend für die resultierende Gruppierung. So werden beim hierarchischen

Clustering zunächst die zwei nächsten Elemente zu einem Cluster zusammengefasst. Anschließend wird diesem andere Elemente hinzugefügt, sodass ein geschichtetes System von Clustern entsteht. Demgegenüber wird die Anzahl der Cluster beim k-means-Verfahren vorher festgelegt, danach werden die Proben bzw. Gene optimal zugeteilt.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein hierarchisches Clustering mit dem *average linkage* Algorithmus und der euklidischen Abstandsberechnung mit Hilfe des Softwareprogramms Genesis (<http://genome.tugraz.at>) durchgeführt. Das Einsortieren in Cluster geschieht nur unter Berücksichtigung der gemessenen und damit intrinsischen Probeneigenschaften, ohne dass *a priori* Informationen über die zu gruppierenden Proben vorliegen. Aus dieser Eigenschaft rührt der Name des *unsupervised* oder unüberwachten Clustering.

Am Ende entsteht eine tiefreichende baumartige Struktur, wobei die Wurzel des Baums den gesamten Datensatz umfasst, die einzelnen Knoten die verschiedenen Gruppen und die Blätter die einzelnen Proben repräsentieren. Einander ähnliche Proben liegen in gleichen Bereichen des Baumes und sind über kurze Äste miteinander verbunden. Je länger die Äste werden und je mehr Verzweigungen zwischen zwei Proben liegen, desto unähnlicher sind die Proben untereinander.

2.5.1.5 Funktionelle Klassifikation mittels der Gene Ontology Datenbank

Die differentiell exprimierten Gene wurden mit Hilfe der Gene Ontology (GO) Datenbank hinsichtlich ihrer biologischen Funktion klassifiziert (www.geneontology.org). Gene Ontology ordnet jedes eukaryotische Gen in drei Kategorien ein („biologischer Prozess“, „molekulare Funktion“ und „zelluläre Lokalisation“). Diese Kategorien lassen sich weiter unterteilen, wobei mit jeder Ebene mehr Detailinformationen erkennbar werden. So ist beispielsweise für ein Enzym der mitochondrialen Atmungskette in Ebene 2 der Kategorie „zelluläre Lokalisation“ lediglich ersichtlich, dass es sich um ein intrazelluläres Genprodukt handelt, während Ebene 3 bereits die Zuordnung zu den Mitochondrien erlaubt (online Tab. 6, „zelluläre Lokalisation“, Ebenen 2-5; Barth et al., 2005b, zugänglich über <http://circres.ahajournals.org>). Auf Ebene 5 wird schließlich erkennbar, dass das Genprodukt in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Zuordnung der einzelnen differentiell exprimierten Gene zu den biologischen Gruppen mit Hilfe des Softwareprogramms FatiGO (<http://www.fatigo.org>). Bei einem p-Wert < 0,05 (Fisher Exact Test) wurden die Unterschiede als statistisch signifikant erachtet.

2.5.2 Analyse der PCR-Daten

Die Bildung des Quotienten der Fluoreszenzemission von Reporter und passivem Referenzfarbstoff (ROX) ermöglichte die Berechnung des normalisierten Reportersignals (R_n -Wert). Durch die Bildung des Quotienten mit dem passiven Referenzfarbstoff können auch geringe Volumenschwankungen in den einzelnen Reaktionsansätzen rechnerisch ausgeglichen werden. Der ΔR_n -Wert wurde durch Subtraktion des R_n^- -Wertes (Hintergrundfluoreszenz) der ersten PCR-Zyklen vom R_n^+ -Wert (relatives Reportersignal) ermittelt. Durch Auftragen des logarithmierten ΔR_n -Wertes (Ordinate) gegen den jeweiligen PCR-Zyklus (Abszisse) in ein Koordinatensystem wurde eine Amplifikationsgrafik erstellt ([Abb. 7](#)).

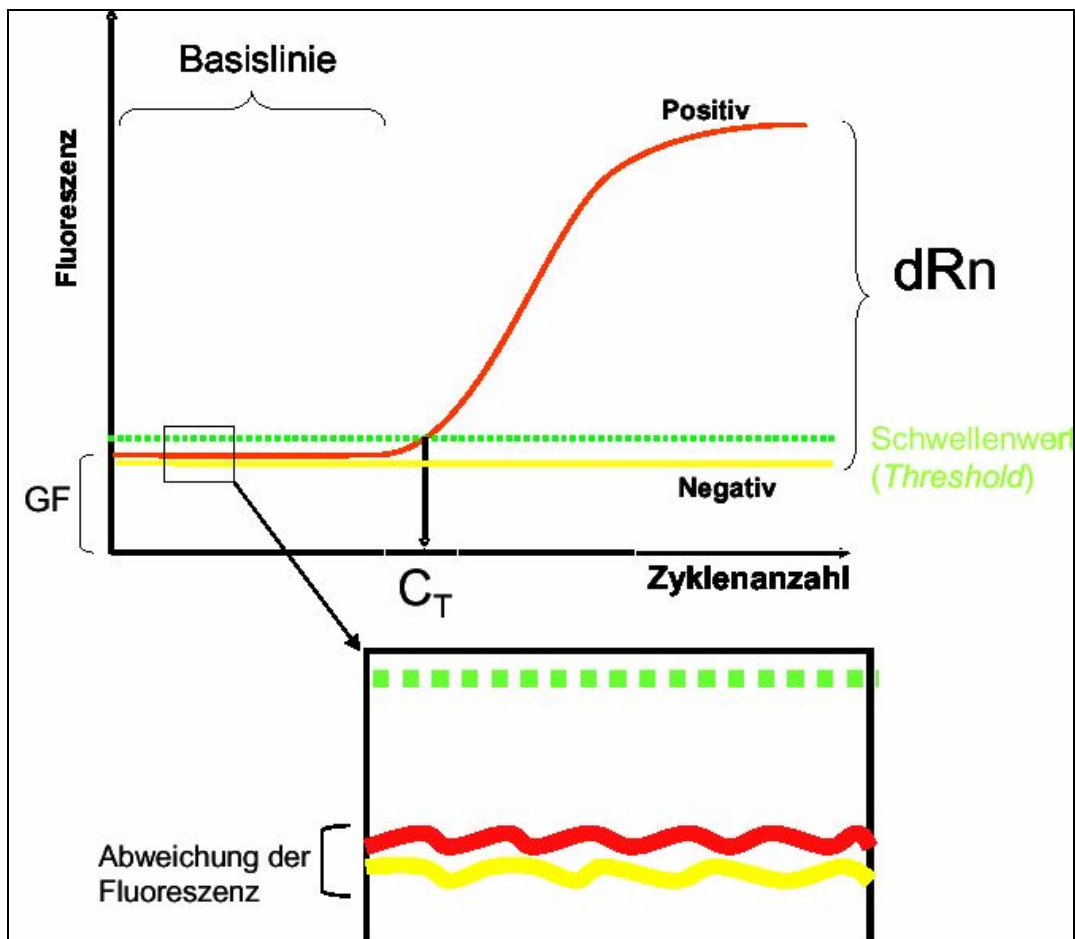


Abbildung 7

Amplifikationsgrafik

Die gemessene Fluoreszenz (Ordinate) wird gegen die Zyklanzahl (Abszisse) aufgetragen. Dabei zeigt der Reaktionsansatz noch vor Erreichen der logarithmischen Amplifikationsphase eine geringe Grundfluoreszenz

(GF). Aus der Standardabweichung der Fluoreszenz zwischen Zyklus 3 und 15 multipliziert mit dem Faktor zehn wird ein Fluoreszenzwert errechnet, der zur Grundfluoreszenz der Proben addiert wird. So ergibt sich der Schwellenwert (*Threshold*). Der Schnittpunkt zwischen Amplifikationskurve und Schwellenwert wird als *Threshold Cycle* (Ct) bezeichnet. Er markiert den Anstieg der Fluoreszenz über den Schwellenwert.

Die Basislinie wurde aus den Fluoreszenzdaten der ersten 12 PCR-Zyklen errechnet. Dabei wurde ein schwankungsarmer Bereich der Amplifikationsgrafik ausgewählt und ein maximaler Grenzwert (*Threshold*) von 0,015 angestrebt. Der *Threshold Cycle* (Ct-Wert) gab den errechneten, relativen PCR-Zyklus an, bei dem die Amplifikationsgrafik den *Threshold Cycle* kreuzt. Er verhält sich umgekehrt proportional zur Ausgangsmenge der DNA und bildet deshalb die Grundlage der Quantifizierung einer Reaktion.

In der vorliegenden Studie wurde eine relative Quantifizierung der cDNA vorgenommen. Dabei wurde das zu bestimmende Transkript zu einem nicht-regulierten, sog. *housekeeping* Gen in Verhältnis gesetzt. Zahlreiche etablierte *housekeeping* Gene, wie z.B. GAPDH, *ubiquitin C* (UBC) oder β -Mikroglobulin (B2M), wiesen bei Vorhofflimmern jedoch Expressionsänderungen auf, so dass sie als interne Kontrollen für eine relative Quantifizierung bei Vorhofflimmern nicht verwendet werden konnten. Für die mRNA des *ribosomal protein L41* (RPL41) zeigte sich in den Microarray-Untersuchungen eine konstante Expression über alle Gewebeproben, so dass dieses Transkript in der vorliegenden Untersuchung als *housekeeping* Gen Verwendung fand (online Tab. 3, Barth et al., 2005a&b). Die Durchführung der relativen Quantifizierung erfolgte mittels des Softwareprogramms REST-xl (Pfaffl et al., 2002).

3 ERGEBNISSE

3.1 Microarray-Experimente

Von 39.000 auf den Affymetrix HG-U133A+B-Microarrays repräsentierten Transkripten waren 11.740 im humanen Myokard exprimiert. Dies stellt bisher die umfassendste Übersicht myokardialer Transkripte dar (online Tab. 3, Barth et al., 2005a&b).

Die hohe Korrelation ($r = 0,97$) zwischen der chromosomalen Verteilung der 11.740 myokardial exprimierten Gene und des humanen Transkriptoms bestätigt (Barrans et al., 2003; [Abb. 8](#)), dass die verwendeten Affymetrix Microarrayplattform für genomweite Studien geeignet ist.

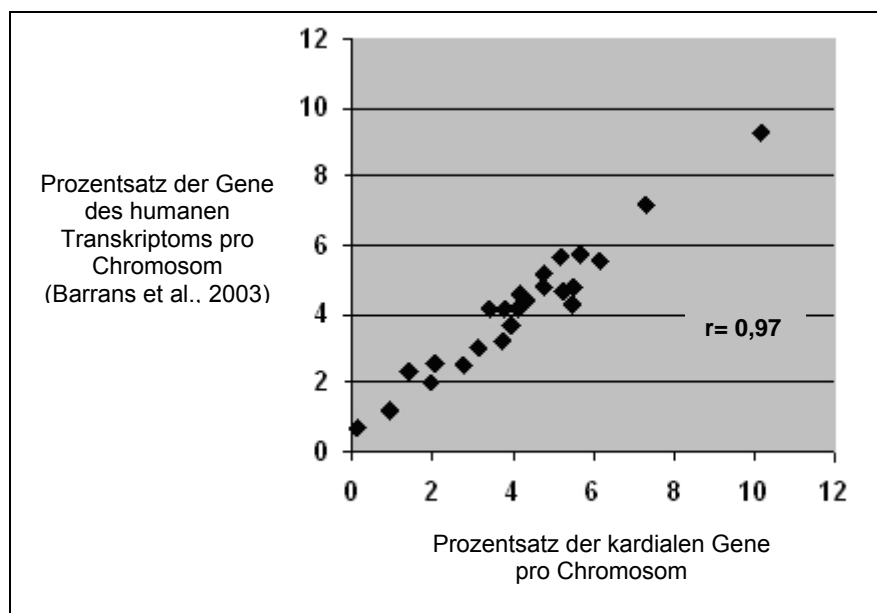


Abbildung 8

Vergleich der prozentualen chromosomalen Verteilung der myokardialen Gene auf den HG-U133A+B-Microarrays mit der des humanen Transkriptoms nach Barrans et al. (2003). Die hohe Korrelation (nach Pearson) zeigt, dass die Sonden auf den Genchips eine repräsentative Auswahl der kardialen Transkripte darstellen.

3.1.1 Charakterisierung der differentiellen Genexpression zwischen Atrium und Ventrikel

Ein hierarchisches Clustering aller 11.740 myokardial exprimierten Transkripte zeigte, dass die 20 atrialen und die fünf ventrikulären Gewebeproben separate Cluster bildeten ([Abb. 9a](#)).

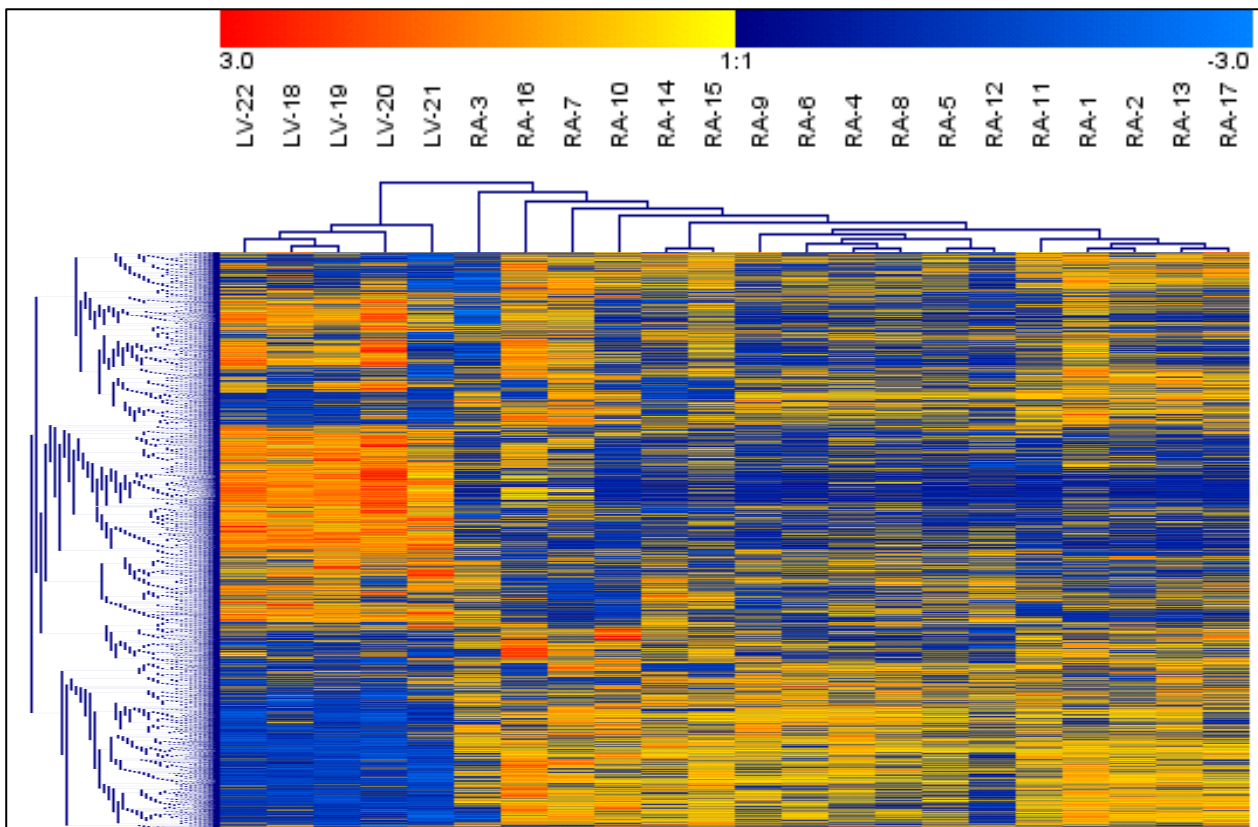


Abbildung 9a

Hierarchisches Clustering unter Verwendung der euklidischen Abstandsmessung und des *average linkage* Algorithmus für alle 11.740 myokardialen Transkripte. Zeilen repräsentieren die einzelnen Transkripte, Spalten die verschiedenen Gewebeproben. Transkripte mit erhöhter oder verminderter Expression sind gelb bzw. blau dargestellt. Atriale und ventrikuläre Proben bilden unterschiedliche Cluster.

Somit waren transkriptionelle Unterschiede zwischen Atrium und Ventrikel größer als alle anderen biologischen Unterschiede in diesem Datensatz, wie Alter, Geschlecht, Medikation sowie Unterschiede in der myokardiale Grunderkrankung der Patienten. 6.274 (53%) der 11.740 myokardial exprimierten Gene wiesen eine unterschiedliche Expression in Atrium und Ventrikel auf: 3.300 Gene waren präferentiell im Atrium und 2.974 Gene überwiegend im Ventrikel exprimiert (online Tab. 3, Barth et al., 2005b). Ein hierarchisches Clustering der zwischen Atrium und Ventrikel differentiell exprimierten Gene ist in [Abbildung 9b](#) dargestellt.

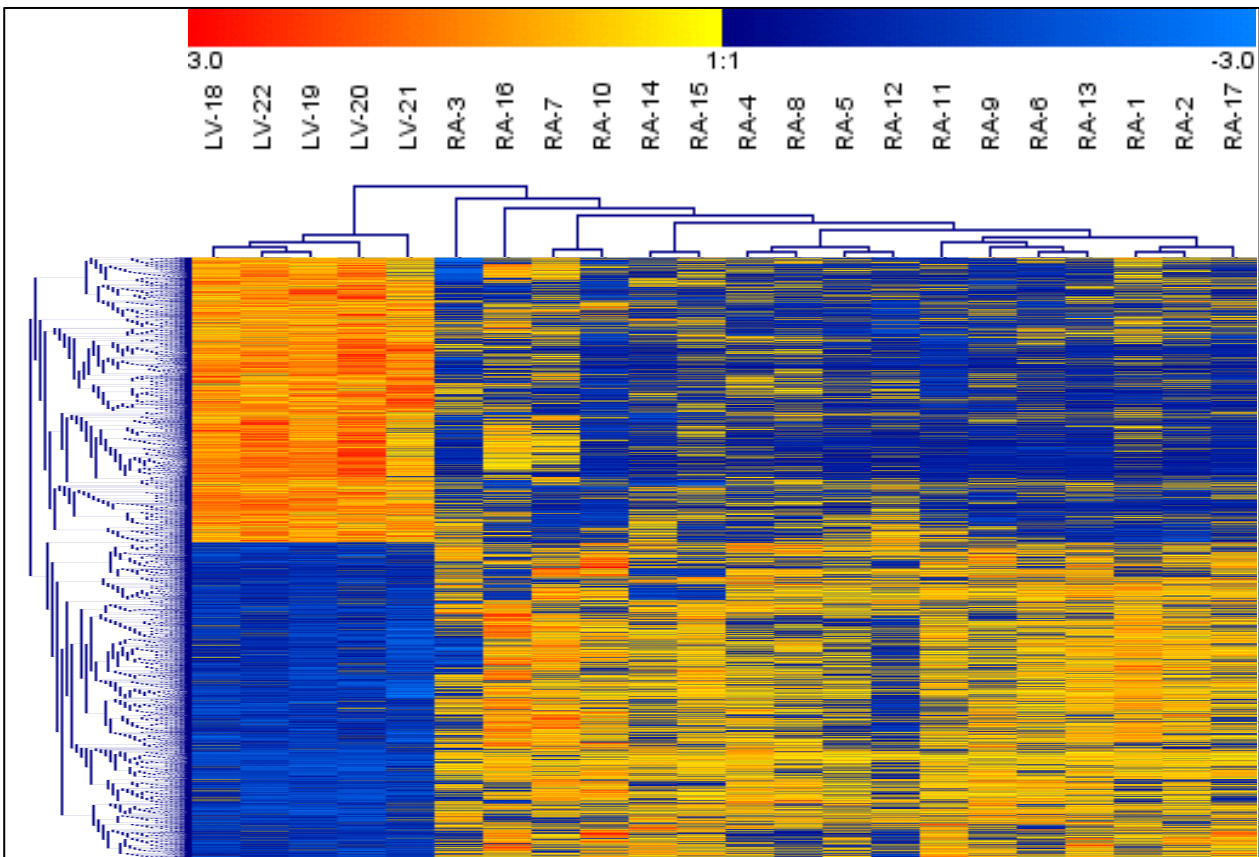


Abbildung 9b

Hierarchisches Clustering unter Verwendung der euklidischen Abstandsmessung und des *average linkage* Algorithmus für alle 6.274 differentiel exprimierten Transkripte (3.300 Transkripte zeigten höhere Expression im RA, 2.974 Transkripte höhere Expression im LV). Zeilen repräsentieren die einzelnen Transkripte, Spalten die verschiedenen Gewebeproben. Transkripte mit erhöhter oder verminderter Expression sind gelb bzw. blau dargestellt. Atriale und ventrikuläre Proben bilden unterschiedliche Cluster.

3.1.1.1 Funktionelle Klassifizierung der regionalen Genexpressionsunterschiede zwischen Atrium und Ventrikel nach Gene Ontology

Zur Erfassung übergeordneter biologischer Muster wurden die regional differentiel exprimierten Gene mit Hilfe von Gene Ontology hinsichtlich ihrer zellulären Lokalisation, ihres biologischen Prozesses und ihrer molekularen Funktion klassifiziert (online Tab. 5 und 6, Barth et al., 2005b). Dabei fanden sich sowohl quantitative als auch qualitative Expressionsunterschiede zwischen präferentiell atrial- und ventrikulär-exprimierten Genen.

In [Abbildung 10a](#) (s. S. 39) ist die relative Verteilung von 13 funktionellen Gengruppen innerhalb der Kategorie „zelluläre Lokalisation“ für Transkripte mit überwiegend atrialer und ventrikulärer Expression sowie für Transkripte dargestellt, die keine regionalen

Expressionunterschiede zwischen Vorhof und Kammer aufwiesen (online Tab. 5, „zelluläre Lokalisation“, Ebene 5; Barth et al., 2005b). Dabei wird ersichtlich, dass mitochondriale und ribosomale Transkripte im Ventrikel überrepräsentiert sind, während Transkripte, die für Plasmamembranproteine kodieren, präferentiell im Atrium exprimiert werden. Weiterhin zeigte sich, dass Transkripte, die mit dem endoplasmatischen Retikulum, mit dem Golgi-Apparat und mit Vakuolen assoziiert sind, im Atrium häufiger exprimiert werden als im Ventrikel. Die Unterschiede in der Expression funktioneller Genklassen der Kategorie „zelluläre Lokalisation“ lassen eine gute Korrelation zu ultrastrukturellen Charakteristika isolierter atrialer und ventrikulärer Kardiomyozyten erkennen. Ventrikuläre Kardiomyozyten weisen mehr Mitochondrien auf als atriale Zellen (Legato, 1973). Demgegenüber besitzen atriale Myozyten ein prominenteres endoplasmatisches Retikulum, einen besser ausgebildeten Golgi-Apparat und mehr sekretorische Vesikel als ventrikuläre Zellen. Vereinbar mit einem größerem Bindegewebsanteil im atrialen Myokard fand sich die Gene Ontology Gruppe „fibrilläres Kollagen“ präferentiell atrial exprimiert (online Tab. 6, „zelluläre Lokalisation“, Ebene 5; Barth et al., 2005b).

Neben diesen quantitativen Unterschieden waren jedoch auch qualitative Unterschiede zwischen funktionellen Gengruppen erkennbar. So zeigte sich, dass die höhere Expression ribosomaler Transkripte im Ventrikel durch die vergleichsweise höhere Expression mitochondrialer Gene bedingt war, während zytosolische ribosomale Transkripte im LV sogar relativ vermindert waren (online Tab. 6, „zelluläre Lokalisation“, Ebene 5; Barth et al., 2005b).

Aus online Tabelle 6, in der die myokardialen Transkripte für die einzelnen GO Klassen dargestellt sind, ist weiterhin ersichtlich, dass eine Vielzahl von Rab-, Sec- und Syntaxin-Transkripten zwischen Atrium und Ventrikel unterschiedlich exprimiert sind (online Tab. 6, „zelluläre Lokalisation“, Ebene 5; Barth et al., 2005b). Dies kann als Hinweis auf regionale Unterschiede intrazellulärer Transportmechanismen gelten.

Erwähnenswert sind ferner qualitative Unterschiede in der funktionellen Gruppe „Muskelfaser“, da fast alle Gene dieser Gruppe entweder im Ventrikel oder Atrium exprimiert werden und nur eine kleine Zahl von Transkripten gleichermaßen in Vorhof und Kammer vorhanden sind (online Tab. 5 und 6, „zelluläre Lokalisation“, Ebene 5, funktionelle Gruppe „Muskelfaser“, Barth et al., 2005b).

Entscheidende Unterschiede fanden sich auch für die zwei weiteren Gene Ontology Kategorien „biologischer Prozess“ und „molekulare Funktion“. Im Hinblick auf biologische Prozesse waren Transkripte, denen eine wesentliche Rolle bei der Zell-Zell-Kommunikation und der Signaltransduktion zugeschrieben wird, im Atrium überrepräsentiert, so z.B. die

energieliefernden Prozessen. Interessanterweise waren Gene, die für metabolische Prozesse kodieren, nicht nur im Ventrikel stärker exprimiert als im Atrium, sondern schienen im Atrium zusätzlich aktiv inhibiert zu werden. Dies wird durch die atriale Überrepräsentation der funktionellen Klasse „Hemmung des Metabolismus“ verdeutlicht (online Tab. 5, „biologischer Prozess“, Ebene 5; Barth et al., 2005b).

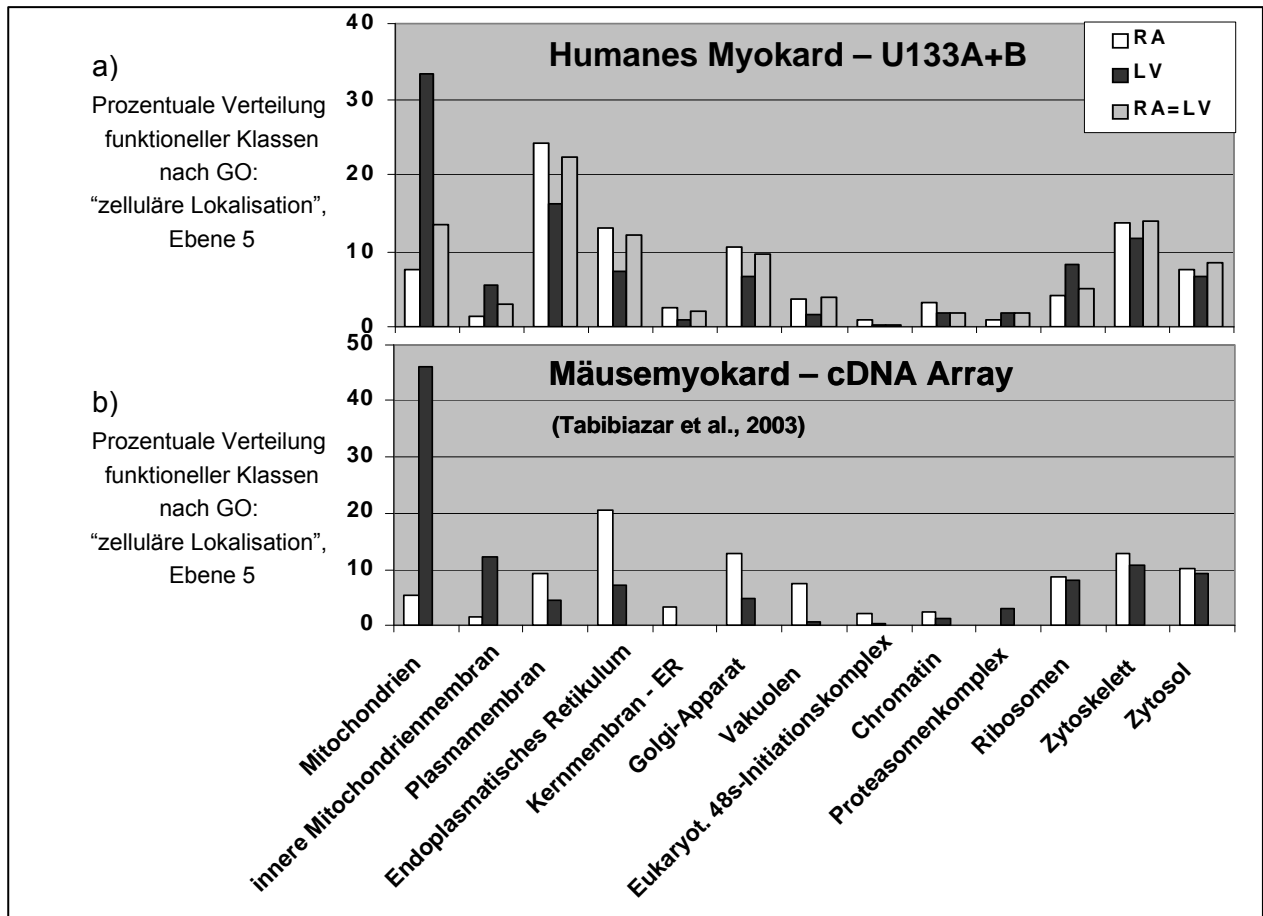
3.1.1.2 Vergleich der regionalen Expressionsunterschiede im humanen Myokard und Mäusemyokard

Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit wurden mit einer Studie verglichen, die das atriale und ventrikuläre Genexpressionsprofil im Mäuseherzen untersuchte (Tabibiazar et al., 2003). Hierzu wurden die im Mäusemyokard präferentiell als atrial und ventrikulär exprimierten Transkripte einer Gene Ontology Klassifikation unterzogen ([vgl. Kap. 2.5.1.5](#)) und mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie verglichen. Aus den [Abbildungen 10a und 10b](#) ist ersichtlich, dass trotz unterschiedlicher Repräsentation bestimmter Gengruppen auf beiden Arrays (z.B. sind Gene, die für Membranproteine kodieren, auf der Affymetrixplattform besser repräsentiert als auf dem Maus cDNA-Chip), eine gute Übereinstimmung im regionalen Expressionsmuster wesentlicher Gengruppen zwischen Mäuseherzen und humanem Myokard besteht. So fand sich eine präferentiell ventrikuläre Expression von mitochondrialen Transkripten, während Gene des endoplasmatischen Retikulums, Golgi-Apparates und sekretorischer Granula atrial lokalisiert waren. Diskrepanzen ergaben sich lediglich bei der Verteilung ribosomaler Gene: Während sich im humanen Myokard eine Überrepräsentation ribosomaler Gene im Ventrikel zeigte, war kein statistisch signifikanter Unterschied in der Verteilung zwischen Atrium und Ventrikel im Mäusemyokard festzustellen. Diese Unterschiede zwischen beiden Studien beruhen auf einem höheren Anteil mitochondrialer ribosomaler Gene auf den Affymetrix HG-U133A+B-Arrays.

WNT-Signaltransduktionswegen (= *wingless type MMTV integration site family member*) wird eine zentrale Bedeutung bei der embryonalen Entwicklung beigemessen. Tabibiazar et al. stellten für eine Vielzahl von Transkripten, die mit WNT-Signaltransduktionsprozessen assoziiert sind, ein regional-spezifisches Expressionsmuster fest. Diese Befunde legen eine Bedeutung von WNT-Signalen für den Erhalt regional-spezifischer Genexpression über die Embryogenese hinaus nahe (Tabibiazar et al., 2003). So zeigten die WNT-Schlüsselgene *four and a half LIM domains 2* (FHL2) und *dishevelled 1* (DVL1) eine überwiegend ventrikuläre Expression, während die WNT-hemmenden Transkripte *dickkopf homolog 2* (DKK2) und *dickkopf homolog 3* (DKK3) vor allem im Atrium exprimiert waren. Eine entsprechende Verteilung konnte auch in der vorliegenden Arbeit im

humanen Myokard nachgewiesen werden (online Tab. 3, Barth et al., 2005b). Ebenso waren weitere Komponenten der WNT-Signalwege *vang-like 2* (VANGL2), *Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2* (ROCK2), *frizzled-related protein* (FRZB), *frizzled homolog 1, 4, 6, 8* (*Drosophila*), Untereinheiten der Phospholipase C, *low density lipoprotein receptor-related protein 5* (LRP5), *secreted frizzled-related protein* (SFRP) 1, 4 und 5, *adenomatous polyposis coli* (APC), *beta-cadherin* (CTNNB) und *transcription factor* (TCF) 3 und 4 im humanen Myokard gleichermaßen wie im Mäuseherzen zwischen Atrium und Ventrikel unterschiedlich exprimiert (online Tab. 3, Barth et al., 2005b).

Abbildung 10a und 10b



- a) Funktionelle Klassifikation der differentiell exprimierten Transkripte in Atrium und Ventrikel für die Kategorie „zelluläre Lokalisation“ mittels des Softwareprogrammes „FatiGO“ (www.fatigo.org). 13 Hauptgruppen sind als prozentualer Anteil aller Transkripte der Gene Ontology Kategorie „zelluläre Lokalisation“ dargestellt (Ebene 5). Transkripte, die vermehrt im Atrium bzw. Ventrikel vorhanden sind, sind als weiße bzw. schwarze Säulen abgebildet, während Transkripte, die keine regional spezifische Verteilung aufweisen, durch graue Säulen repräsentiert sind. Gene, deren Proteine für die Bildung des sarkoplasmatischen Retikulums, Golgi-Apparates und der Vakuolen von Bedeutung sind, überwiegen im RA, während mitochondriale und ribosomale Gene vornehmlich im LV zu finden sind.
- b) Funktionelle Klassifikation der regional differentiell exprimierten Transkripte im Mäuseherzen (cDNA-Array der Maus) (Tabibiazar et al., 2003). Die Daten wurden von der Website <http://mousedevlopment.org> heruntergeladen und mit Hilfe des Softwareprogramms „FatiGO“ klassifiziert. Mit Ausnahme der ribosomalen Transkripte ist für alle funktionellen Kategorien eine gute Übereinstimmung zwischen humanem Myokard und Mäuseherzen erkennbar.

3.1.2 Veränderungen der atrialen Transkription bei chronischem Vorhofflimmern

3.1.2.1 Genomweit verminderte Transkriptionsaktivität

Ein Vergleich der atrialen Genexpression bei Sinusrhythmus und chronischem Vorhofflimmern ergab eine signifikante Expressionsänderung bei 1.434 Genen (online Tab. 3, Barth et al., 2005a). Bei chronischem Vorhofflimmern ließ sich eine höhere transkriptionelle Aktivität für 452 Gene nachweisen, während die Expression von 982 Genen vermindert war (online Tab. 3, Barth et al., 2005a). In Einklang mit einer verminderten Transkriptionsaktivität bei chronischem Vorhofflimmern findet sich auf funktioneller Ebene eine relative Unterrepräsentation der GO-Klassen „Transkription“, „Zinkionenbindung“, „Aktivität von Transkriptionsfaktoren“ und „Transkriptionskofaktoren“ (online Tab. 4, „biologischer Prozess“ und „molekulare Funktion“, Ebene 5; Barth et al., 2005a).

3.1.2.2 Transkriptionelle Herunterregulation kalziumabhängiger Signaltransduktionsprozesse

Vereinbar mit einer Verkleinerung des L-Typ Kalziumstromes bei permanentem Vorhofflimmern konnte auf Transkriptebene eine Herunterregulation von fünf Genen, die für Untereinheiten dieses Kalziumkanals kodieren, festgestellt werden (*calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit* (CACNA1D); *calcium channel, voltage-dependent, alpha 1G subunit* (CACNA1G); *calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2* (CACNA2D2); *calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta 3 subunit* (CACNA2D3); *calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit* (CACNB2); online Tab. 3, Barth et al., 2005a). Die Veränderungen im Kalziumhaushalt waren jedoch nicht nur auf den sarkolemmalen L-Typ Kalziumkanal beschränkt, sondern umfassten auch das sarkoplasmatische Retikulum, wie die Herunterregulation der sarkoplasmatischen Kalzium-ATPase (*ATPase, Ca⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2* (ATP2A2)) und von *calreticulin* (CALR) verdeutlichte (online Tab. 3, Barth et al., 2005a). CALR stellt eine Schlüsselkomponente im Kalzineurin-NFAT-Signalweg dar. Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Expressionsänderungen lassen auf eine verminderte Aktivität des gesamten Kalzineurin-NFAT-Signalwegs schließen, da neben CALR, auch *nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 3* (NFAT_{c3}) vermindert und die NFAT_{c-}inhibitorischen Transkripte *glycogen synthase kinase 3 beta* (GSK3B) und *Down syndrome critical region gene 1* (DSCR1) hochreguliert waren (online Tab. 3, Barth et al., 2005a). Die Herunterregulation weiterer kalziumabhängiger Signaltransduktionsprozesse wurde an den Expressionsänderungen von Schlüsselkomponenten der kalzium- und kalmodulinabhängigen Proteinkinasen sowie der MAP-Kinasen deutlich. So wiesen sieben

von neun bei Vorhofflimmern regulierte MAP-Kinasen eine verminderte Expression auf, während die Transkripte der MAPK-inhibitorischen G-Proteine *regulator of G-protein signalling 3* und *13* (RGS3 und RGS13) verstärkt exprimiert waren (online Tab. 3, Barth et al., 2005a).

3.1.2.3 Elektrophysiologische, strukturelle, kontraktile und metabolische Remodelingprozesse

Eine funktionelle GO-Klassifikation konnte Expressionsänderungen in mehreren Gengruppen identifizieren, die mit strukturellen, elektrophysiologischen und kontraktilem Remodelingprozessen in Verbindung gebracht werden. Hinsichtlich des elektrophysiologischen Remodelings zeigte sich neben der verminderten Expression von Untereinheiten des L-Typ Kalziumkanals und der sarkoplasmatischen Kalzium-ATPase auch eine vermehrte Expression von *ryanodine receptor 3* (RYR3), die eine inhibitorische Isoform des sarkoplasmatischen Kalziumfreisetzungskanals *ryanodine receptor 2* (RYR2) darstellt (online Tab. 3, Barth et al., 2005a). Expressionsänderungen von Kaliumkanälen legen zudem einen gestörten Repolarisationsprozess nahe (Herunterregulation von *Kv channel interacting protein 2* (KCNIP2), *potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3* (KCNJ3) und *potassium inwardly-rectifying channel J5* (KCNJ5); vermehrte Expression von *potassium inwardly-rectifying channel J2* (KCNJ2) und *potassium channel, subfamily K, member 3* (KCNK3); online Tab. 3 und 6, „molekulare Funktion“, Ebene 5; Barth et al., 2005a).

Das strukturelle Remodeling spiegelte sich in der Hochregulation von Transkripten extrazellulärer Matrixproteine wider (Kollagene COL5A3, COL12A1, COL1A1, COL4A2; *tenascin C* (TNC) und *biglycan* (BGN) (online Tab. 3, Barth et al., 2005a). Ferner waren Matrix-Proteasen wie *matrix metalloproteinase 9* (MMP9) und *ADAM metalloproteinase domain 19* (ADAM19) hochreguliert, bei simultaner verminderter Transkription der entsprechenden Inhibitoren (*TIMP metalloproteinase inhibitor 3* (TIMP3); online Tab. 5, „zelluläre Lokalisation“ und „molekulare Funktion“, Ebene 5; Barth et al., 2005a). Von allen bei Vorhofflimmern differentiell exprimierten Transkripten wies TIMP3 die signifikantesten Expressionsänderungen auf (online Tab. 3, Barth et al., 2005a). In Verbindung mit den prominenten strukturellen Remodelingvorgängen und der Fibrose im Atrium ist auch die vermehrte Expression des pro-fibrotischen Zytokins TGFβ1 zu werten (online Tab. 3, Barth et al., 2005a).

Vereinbar mit der histologisch nachweisbaren Myolyse und dem kontraktilem Remodeling fand sich bei permanentem Vorhofflimmern eine Herunterregulation der

funktionellen Klassen „Muskelkontraktion“, „Muskelentwicklung“ und „muskuloskeletale Bewegung“ (online Tab. 4, „biologischer Prozess“, Ebene 5; Barth et al., 2005a). Weiterhin zeigte sich bei chronischem Vorhofflimmern eine veränderte Expression von Genen, die mit kontraktilem und strukturellem Remodelingprozessen assoziiert sind: So waren Transkripte des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes (*dystrophin* (DMD), *dystroglycan1* (DAG1), ϵ -*sarkoglykan* (SGCE) und β 2-*syntrophin* (SNTB2), der Kernmembran (*lamin A/C* (LMNA) und *v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog* (ErbB) 2,3 und 4 bei Vorhofflimmern vermindert exprimiert (online Tab. 3, Barth et al., 2005a).

Schließlich wurden in Bezug auf den Stoffwechsel entscheidende Veränderungen festgestellt. Fünf von zwölf biologischen Prozessen, die bei Vorhofflimmern hochreguliert wurden, ließen sich metabolische Funktionen zuschreiben (online Tab. 4, „biologischer Prozess“, Ebene 5; Barth et al., 2005a). Insgesamt zeigte sich mit Ausnahme von Transkripten, die mit der funktionellen Gruppe des „Fettsäuremetabolismus“ assoziiert waren, eine Hochregulation der metabolischen Prozesse bei chronischem Vorhofflimmern ([Abb. 11](#)).

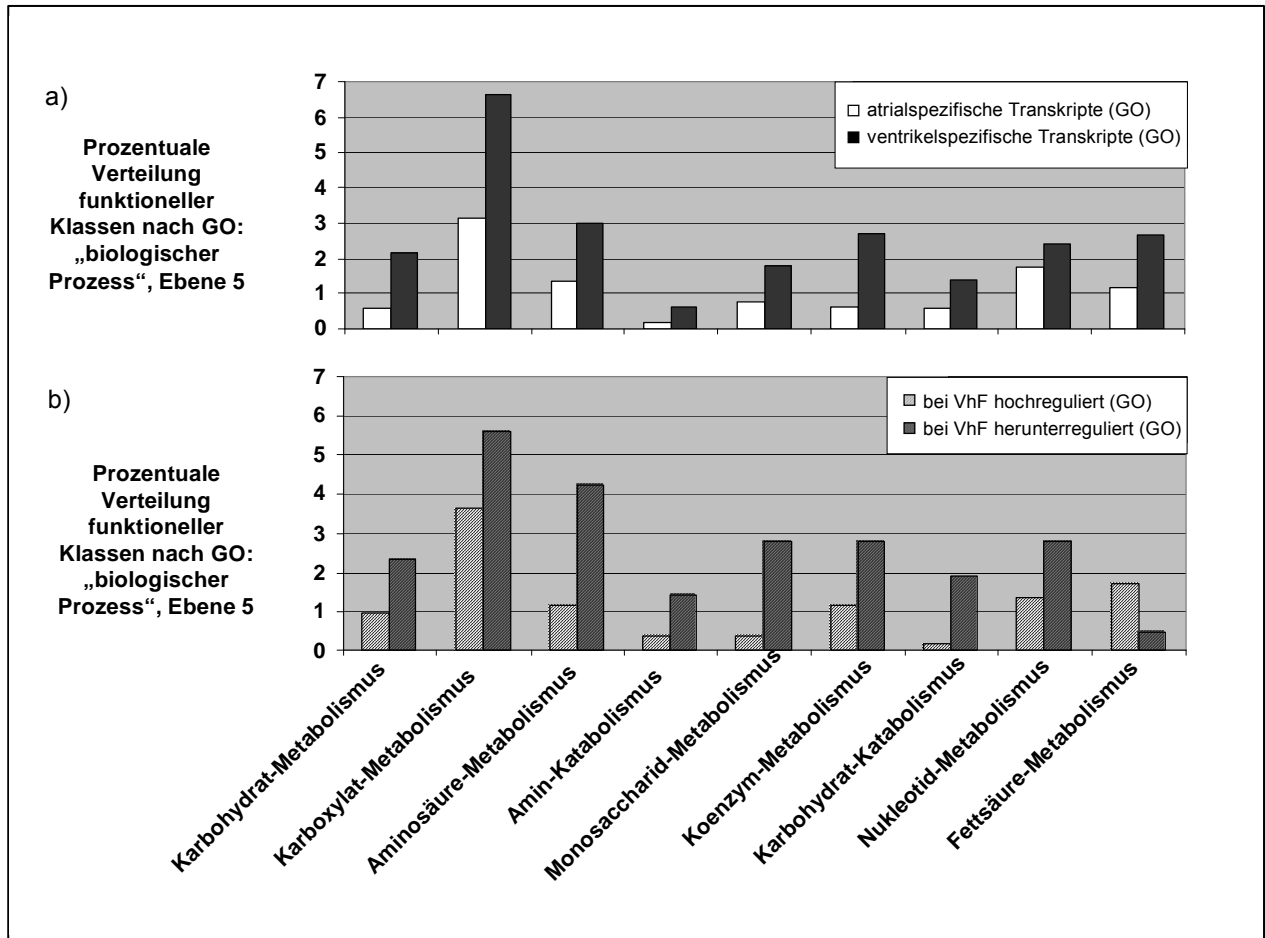


Abbildung 11a und 11b

Funktionelle Klassifikation der differentiell exprimierten Transkripte, die nach der GO-Einteilung an Stoffwechselprozessen beteiligt sind. Neun Hauptgruppen sind als prozentualer Anteil aller Transkripte der Gene Ontology Kategorie „biologischer Prozess“ (online Tab. 4, „biologischer Prozess“, Ebene 5; Barth et al., 2005a) dargestellt.

a) Unterschiedliche Expression von Transkripten der GO-Kategorie „biologischer Prozess“ im Atrium vs. Ventrikel:

Transkripte, die in den jeweiligen GO-Gruppen überwiegend im Atrium bzw. Ventrikel lokalisiert waren, sind durch weiße bzw. schwarze Säulen abgebildet.

b) Unterschiedliche Expression von Transkripten der GO-Kategorie „biologischer Prozess“ im atrialen Gewebe bei Sinusrhythmus vs. Vorhofflimmern:

Transkripte, die bei chronischem Vorhofflimmern vermehrt bzw. vermindert exprimiert waren, sind durch schraffierte weiße bzw. schraffierte schwarze Säulen dargestellt. Mit Ausnahme des Fettsäurestoffwechsels sind Transkripte, die für metabolische Prozesse von Bedeutung sind, bei chronischem Vorhofflimmern vermehrt exprimiert.

Dies lässt sich als Hinweis auf den vermehrten metabolischen Bedarf des Herzens bei dieser Erkrankung werten. Diese Annahme wird zudem von der Tatsache unterstützt,

dass die Transkription von Genen, die an der Bildung der inneren Mitochondrienmembran beteiligt sind, signifikant gesteigert war (online Tab. 4, „zelluläre Lokalisation“, Ebene 4; Barth et al., 2005a).

3.1.2.4 Vergleich des atrialen Genexpressionsmusters bei chronischem Vorhofflimmern mit dem ventrikulären Transkriptionsprofil

Ein hierarchisches Clustering aller bei Vorhofflimmern differentiell exprimierten Gene der 30 atrialen und fünf ventrikulären Gewebeproben zeigte, dass die atrialen Proben von Patienten mit Vorhofflimmern zu den ventrikulären Proben clustern und nicht – wie man aufgrund der grundlegenden transkriptionellen Unterschiede zwischen Atrium und Ventrikel erwarten würde (siehe 3.1.1) – zu den atrialen Proben mit Sinusrhythmus ([Abb. 12](#)).

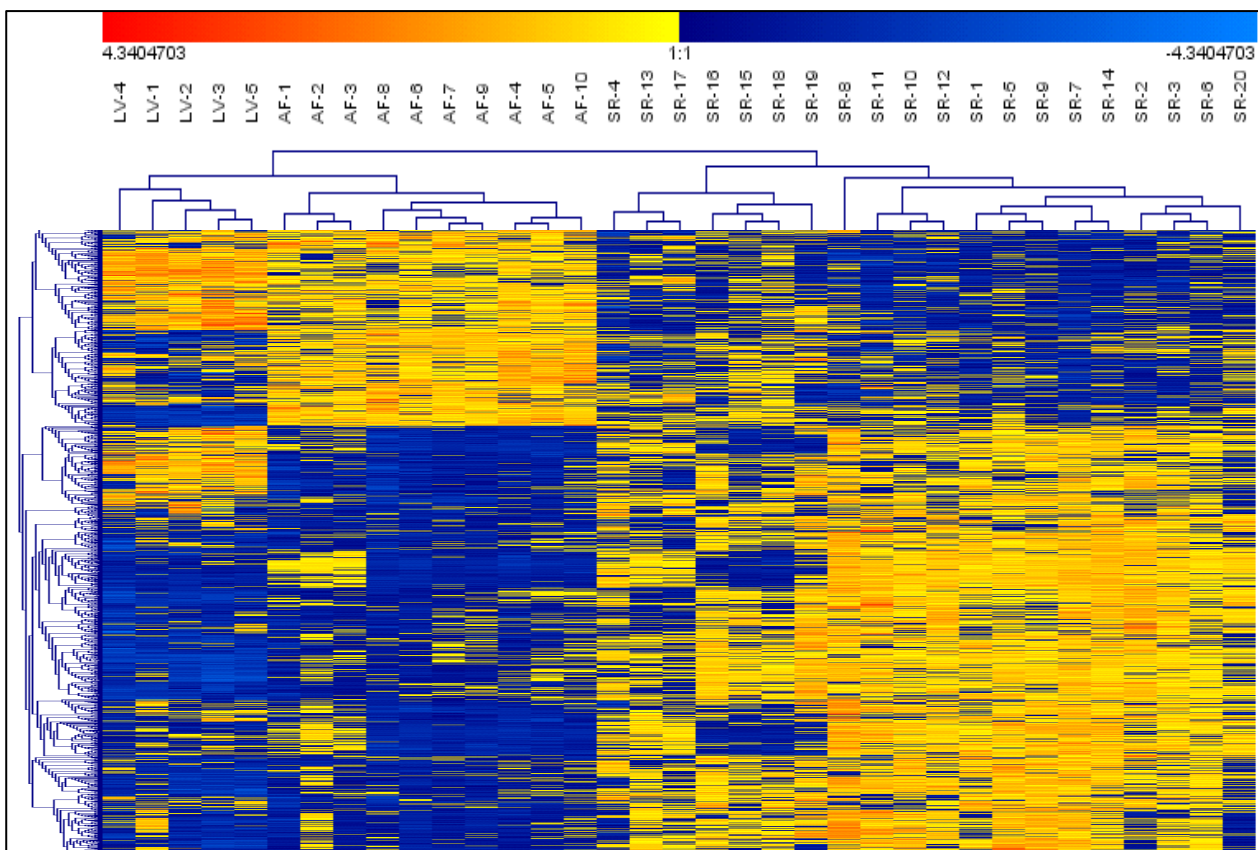


Abbildung 12

Hierarchisches Clustering unter Verwendung der euklidischen Abstandsmessung und des *average linkage* Algorithmus für alle 1.434 bei chronischem Vorhofflimmern differentiell exprimierten Transkripte. Zeilen repräsentieren die einzelnen Transkripte, Spalten die verschiedenen Gewebeproben. Transkripte mit erhöhter oder verminderter Expression sind gelb bzw. blau dargestellt. Atriale Proben von Patienten mit chronischem Vorhofflimmern clustern mit ventrikulären Proben.

Das ventrikuläre Muster entsteht im atrialen Myokard bei Vorhofflimmern vorwiegend durch eine Herunterregulation von präferentiell atrial exprimierten Transkripten und nur zu einem geringeren Teil durch eine Hochregulation ventrikulärer Gene. Diese Expressionsmuster spiegelten sich auf der Gene Ontology-Ebene wider. So konnte eine Verminderung der für das atriale Myokard charakteristischen funktionellen Genklassen „Signaltransduktion“, „Zellkommunikation“ und „Zelladhäsion“ bei Vorhofflimmern nachgewiesen werden, während Gengruppen, die für metabolische Prozesse kodieren, hochreguliert waren ([Abb. 11](#) und online Tab. 4, „biologischer Prozess“, Ebene 5; Barth et al., 2005a).

3.2 Validierung der Microarray-Daten mittels semiquantitativer real-time RT-PCR

Die Ergebnisse der Microarray-Experimente konnten stichprobenartig mit der semiquantitativen RT-PCR validiert werden. Eine differentielle Expression konnte nachgewiesen werden für alle vier Transkripte in der Gruppe der regionalen Genexpressionsunterschiede zwischen Atrium und Ventrikel und für zehn von 13 validierten Transkripten, die bei Vorhofflimmern im Atrium Expressionsänderungen aufwiesen ([Tab. 3a und 3b](#)). Die Struktur der verwendeten Primer ist in [Tabellen 2a und 2b](#) dargelegt.

Gen	qualitativer Expressionsunterschied (RA vs. LV) Microarrays	quantitativer Expressionsunterschied (RA vs. LV) Microarrays	quantitativer Expressionsunterschied (RA vs. LV) RT-PCR	Validierung
EPHA7	RA > LV	1.8	3.1	+
IRX5	LV > RA	4.3	12.4	+
PTPN3	LV > RA	4.9	4.6	+
SCN1B	RA > LV	1.5	1.8	+

Tabelle 3a

Validierung der Microarray-Ergebnisse zur regionalen Genexpression mittels real-time RT-PCR. Es wurden die Mittelwerte der Genexpression zwischen atrialen und ventrikulären Proben miteinander verglichen. Die Ergebnisse der Microarray-Experimente konnten in allen vier PCR-Experimenten bestätigt werden.

Gen	qualitativer Expressions- unterschied (VhF vs. SR) Microarrays	Quantitativer Expressions- unterschied (VhF vs. SR) Microarrays	quantitativer Expressions- unterschied (VhF vs. SR) RT-PCR	Validierung
CALR	VhF < SR	1.3	2.6	+
CREB1	VhF < SR	1.5	1.4	+
FBN1	VhF < SR	1.4	2.0	+
ITPR1	VhF < SR	1.3	1.0	-
MAPK1	VhF < SR	1.3	1.7	+
NFATc3	VhF < SR	1.4	2.1	+
NFKB1	VhF < SR	1.2	2.0	+
STAT5B	VhF < SR	1.2	1.7	+
PPP3CA	VhF < SR	1.5	1.0	-
DSCR1	VhF > SR	1.8	1.9	+
GAPDH	VhF > SR	1.2	1.2	+
GSK3A	VhF > SR	1.2	0.7	-
KCNK3	VhF > SR	1.2	2.6	+

Tabelle 3b

Validierung der Microarray-Ergebnisse mittels real-time RT-PCR. Es wurden die Mittelwerte der Genexpression zwischen den Proben von Patienten mit Sinusrhythmus und chronischem Vorhofflimmern miteinander verglichen. Die Ergebnisse der Microarray-Experimente konnten in zehn von 13 Fällen bestätigt werden.

4 DISKUSSION

4.1 Methodische Aspekte

4.1.1 Untersuchung von humanem Myokardgewebe

Aufgrund der sehr limitierten Verfügbarkeit menschlichen Myokards beruhen die meisten bisher publizierten Studien, die regionale Aspekte der myokardialen Genexpression und die Remodelingprozesse bei Vorhofflimmern untersuchen, auf Tiermodellen. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass speziesspezifische Unterschiede in Aufbau und Funktion des Herzens existieren. Besonders ausgeprägt sind diese Unterschiede auf dem Gebiet der Elektrophysiologie mit einer Vielzahl unterschiedlicher repolarisierender Kaliumkanäle (Dixon et al., 1994; Dixon et al., 1996; Näbauer et al., 1998). So ist z.B. die Übertragung elektrophysiologischer Befunde von der Maus, die eine Ruheherzfrequenz von 600/min aufweist, auf das menschliche Myokard nur eingeschränkt möglich. Dieser Umstand verdeutlicht die Notwendigkeit, Untersuchungen zu Arrhythmien an humanem Gewebe durchzuführen.

Bei der Analyse von humanem Myokardgewebe spielt jedoch die biologische Vielfalt eine weitaus größere Rolle als beim standardisierten Tiermodell und kann gerade im Hinblick auf die Genexpression zu großer Variabilität beitragen. Alter, Geschlecht, Medikation sowie unterschiedliche Ätiologie und individueller Verlauf der myokardialen Grunderkrankung können transkriptionelle Prozesse erheblich beeinflussen (Boheler et al., 2003; Kittleson et al., 2005; Steenman et al., 2003). Gerade vor dem Hintergrund dieser biologischen Variabilität humaner Gewebeproben ist es bemerkenswert, dass beim „unsupervised“ Clustering *aller* im Myokard exprimierten Transkripte atriale und ventrikuläre Proben separate Cluster bildeten. Somit liegt ein robustes regionales Muster vor, welches über die biologische Variabilität hinausgeht (Abb. [9a](#) und [9b](#)).

Zusätzlich konnte in der vorliegenden Untersuchung für viele atriale bzw. ventrikuläre Markergene eine Übereinstimmung mit Ergebnissen publizierter Studien festgestellt werden: *natriuretic peptide precursor A and B* (NPPA und NPPB; Kääb et al., 2004), ADM (Baumer et al., 2002), *T-box 5* (TBX5; Bruneau et al., 1999), *potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 5* (KCNA5; Feng et al., 1997), *angiotensin II receptor, type 1* (AGTR1; Holubarsch et al., 1994), *myosin light chain 3 und 4* (MCL3 und MCL4; Kurabayashi et al., 1988), *potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1 and 3* (KCNJ1 und KCNJ3; Lesage et al., 2000; Wang et al., 1998), *sarcolipin* (SLN; Minamisawa et al., 2003) und *phospholamban* (PLN; Jones et al., 1993) (online Tab. 3, Barth et al., 2005b). Die Validität der vorliegenden Ergebnisse wird außerdem durch den Vergleich mit

dem Mäusemyokard gestützt, bei dem sich eine gute Korrelation des Expressionsmusters zahlreicher regional differentiell exprimierter funktioneller Genklassen fand ([Abb. 10a und 10b](#); Tabibiazar et al., 2003).

Ebenso konnten zahlreiche publizierte Befunde bei Vorhofflimmern in der vorliegenden Untersuchung reproduziert werden, so z.B. für NPPB (Tuinenburg et al., 1999), CACNA1D, KCNJ2, KCNJ3 und KCNJ5 sowie KCNIP2, ATP2A2 (Dobrev et al., 2003), MMP 9 (Nakano et al., 2004), der *von Willebrand factor* (VWF; Kumagai et al., 2004), *mortalin* (HSPA9B; Kirmanoglou et al., 2004) und *endothelin receptor type A and B* (EDNRA und EDNRB; Brundel et al., 2001) (online Tab. 3, Barth et al., 2005a).

In der vorliegenden Studie warf die begrenzte Verfügbarkeit des humanen Myokardgewebes besondere methodische Probleme auf. Da es technisch nicht möglich war, atriales und ventrikuläres Gewebe vom gleichen Patienten zu verwenden, wurde auf nicht-insuffizientes atriales und ventrikuläres Myokard von verschiedenen Spendern zurückgegriffen. Aufgrund operationstechnischer Gegebenheiten (Kanülierung des rechten Vorhofohres beim Anschluss an die extrakorporale Zirkulation) stand nur rechtsatriales Myokard zur Verfügung, welches mit linksventrikulärem Gewebe aus Spenderherzen verglichen wurde, die für eine Transplantation abgelehnt worden waren. In diesem Zusammenhang gilt es zu bedenken, dass auch Unterschiede zwischen dem rechten und linken Herzen beschrieben sind (Sharma et al., 2003; Tabibiazar et al., 2003), wenngleich diese als verhältnismäßig gering eingeschätzt wurden: Tabibiazar et al. konnten für weniger als ein Prozent aller Transkripte auf dem Mäusemyokard-cDNA Array eine differentielle Expression zwischen rechtem und linkem Mäuseherzen erkennen, während die Unterschiede zwischen Atrium und Ventrikel für mehr als 23% der gesamten Transkriptionsaktivität verantwortlich waren (Tabibiazar et al., 2003).

Unterschiede zwischen rechtem und linkem Herzen sind überdies bei Vorhofflimmern relevant, da diese Arrhythmie in der Regel im linken Atrium initiiert wird. Entsprechend waren im Schweinmodell Veränderungen in der Genexpression bei Vorhofflimmern im linken Atrium ausgeprägter als im rechten Atrium (Lai et al., 2004). In der vorliegenden Studie wurden jedoch Veränderungen bei *chronischem* Vorhofflimmern untersucht, wobei es sich weniger um Veränderungen handelt, die zur Initiierung der Arrhythmie beitragen, als vielmehr um eine durch die Erkrankung verursachte Substratmodifikation. Somit ist anzunehmen, dass die Remodelingvorgänge im links- und rechtsatrialen Myokard prinzipiell vergleichbar sind.

4.1.2 Besonderheiten bei der Analyse von mRNA

Bei der Quantifizierung der mRNA aus Myokardgewebe ist zu berücksichtigen, dass Kardiomyozyten zwar 80-90% der Zellmasse, jedoch quantitativ nur etwa 50% aller im Myokard vorhandenen Zellen ausmachen (Piper et al., 1989). Somit stammt die Gesamt-RNA nicht ausschließlich aus dem myozytären, sondern z.T. auch dem vaskulären oder neuronalen Kompartiment. Die gute Korrelation ultrastruktureller Befunde isolierter Kardiomyozyten mit der Gene Ontology Klassifikation für zelluläre Lokalisation ([Abb. 10a](#)) legt jedoch nahe, dass der Grossteil der aus dem Myokard gewonnenen mRNA aus dem myozytären Kompartiment stammt.

Weiterhin ist bei mRNA-Analysen zu beachten, dass nicht zwingend eine lineare Korrelation zwischen der Menge an transkribierter mRNA und dem exprimierten, funktionellen Protein vorliegen muss. Tatsächlich existieren zahlreiche Regulationsmechanismen auf posttranskriptioneller Ebene, welche die Menge an funktionell wirksamem Genprodukt beeinflussen können. Anzuführen sind hierbei beispielsweise Veränderungen der mRNA-Stabilität, Translationseffizienz, intrazellulärer Transport und post-translationale Modifikationen.

4.1.3 Genomweite Expressionsanalyse mittels Microarrays

Die ersten Microarrays wurden bereits in den neunziger Jahren entwickelt, die Technologie fand aber erst mit der Sequenzierung des menschlichen Genoms im Jahr 2000 weitläufige Anwendung. Als miniaturisiertes System zur simultanen Untersuchung tausender Gene ermöglichen Microarrays genomweite Analysen auf kleinstem Raum. Zudem weisen sie gegenüber den zeit- und materialaufwendigen PCR-Experimenten zahlreiche Vorzüge auf. Die Bedeutung der Microarrays liegt insbesondere darin, dass man mit ihrer Hilfe komplexe regulatorische Zusammenhänge und Muster erkennen kann, die bei der Untersuchung einiger weniger Gene verborgen blieben.

Die Microarray-Technologie birgt derzeit jedoch noch methodische Probleme, die sich z.B. durch Kreuzhybridisierungen oder fehlendes Erkennen von Spleiß-spezifischen Isoformen ergeben. Außerdem gab es Bedenken hinsichtlich der Reproduzierbarkeit von Microarrays (Barrett et al., 2003; Marshall, 2004), die sich hauptsächlich auf die mangelnde Standardisierung der verschiedenen Hybridisierungsprotokolle, Microarray-Plattformen, Normalisierungs- und Analyseverfahren zurückführen lassen. Um dieser Problematik entgegenzuwirken, wurde 1999 die internationale MGED-Kommission gegründet (Microarray Gene Expression Data, <http://www.mged.org>; Brazma et al., 2000). Die vom MGED-Konsortium formulierten Kriterien für die Strukturierung und Dokumentation von Microarray-

Experimenten sind inzwischen umfassend akzeptiert und stellen oftmals die notwendige Voraussetzung für eine Publikation in namhaften wissenschaftlichen Zeitschriften dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Reproduzierbarkeit der verwendeten Microarrayplattform in Pilotexperimenten an vier ventrikulären Gewebeproben durch Doppel- bzw. Dreifachbestimmungen gesichert. Es fand sich eine ausgezeichnete Reproduzierbarkeit der U133A+B-Chiptechnologie mit Korrelationskoeffizienten bei Mehrfachbestimmungen von über 0.99. Aufgrund der immer noch hohen Kosten der Microarray-Analysen wurde deshalb auf die Erzeugung technischer Replikate zugunsten der Erhöhung der biologischen Fallzahl verzichtet.

Die Validität der Microarray-Daten wird durch die Ergebnisse der Experimente mittels real-time RT-PCR unterstützt, ebenso wie durch die hohe Übereinstimmung mit Ergebnissen publizierter Studien (siehe 4.1.1). Weiterhin fand sich eine sehr gute Übereinstimmung regionaler Genexpressionsmuster zwischen humanen und Mäusemyokard ([Abb. 10a und 10b](#), Tabibiazar et al., 2003). Dies ist umso bemerkenswerter, als zu dieser Studie Unterschiede im Bezug auf die Spezies (humanes vs. Mäusemyokard), Microarray-Technologie (Oligonukleotid- vs. cDNA-Arrays), Arraynormalisierung (*robust-multiarray-averaging* (RMA) vs. *dye bias normalization*) und Analysemethoden (t-Test vs. Signifikanzanalyse) bestanden.

4.2 Unterschiede des humanen myokardialen Transkriptionsprofils in Atrium und Ventrikel

In der vorliegenden Studie wurden erstmals genomweite Expressionsunterschiede im humanen Myokard zwischen Atrium und Ventrikel untersucht. Hierbei zeigte sich, dass über 53% der myokardial exprimierten Gene eine unterschiedliche transkriptionelle Aktivität zwischen Atrium und Ventrikel aufwiesen (online Tab. 3, Barth et al., 2005b). Dies ist als Hinweis auf eine komplexe Spezialisierung atrialer und ventrikulärer Kardiomyozyten zu werten.

4.2.1 Funktionelle Klassifizierung der atrialen und ventrikulären Genexpression unter Berücksichtigung ihrer physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung

In der vorliegenden Studie erfolgte erstmals für die gesamte atriale bzw. ventrikuläre Genexpression die Zuordnung unterschiedlich exprimierter Transkripte zu verschiedenen funktionellen Genklassen. Dadurch ließen sich die bekannte ultrastrukturelle und funktionelle Eigenschaften von Kardiomyozyten im Detail mit der Transkriptionsebene in Zusammenhang bringen.

Um der besonderen Funktion der Vorhöfe als Schnittstelle zwischen Kreislaufsystem und Myokard nachzukommen, sind atriale Herzzellen neben ihren kontraktile Eigenschaften auch besonders zur Signaltransduktion und Zell-Zell-Kommunikation befähigt. Dies spiegelt sich in der überwiegenden Expression entsprechender funktioneller Klassen wider (online Tab. 5, „biologischer Prozess“, Ebene 5; Barth et al., 2005b): Über die Produktion zahlreicher endokriner Mediatoren, wie beispielsweise ADM oder NPPB, besitzen atriale Kardiomyozyten eine zentrale Position in der Kontrolle des Volumenhaushalts und des Gefäßtonus. Für diese endokrine Spezialisierung sind die Zellen mit gut entwickelten Organellen zur Synthese (rauhes endoplasmatisches Retikulum), Prozessierung (Golgi-Apparat) und Sekretion (sekretorische Vesikel) von Hormonen und gefäßaktiven Substanzen ausgestattet (Piper et al., 1989). Entsprechend waren in der vorliegenden Studie Gene des rauhen endoplasmatischen Retikulums, des Golgi-Apparates und sekretorischer Granula im Atrium stärker exprimiert als im Ventrikel ([Abb. 10a](#)). Zudem ließ sich beispielsweise eine erhöhte Expression von ADM im Atrium nachweisen (online Tab. 3, Barth et al., 2005b). Als auto- und parakriner Signalstoff ist er für die Modulation von Zellwachstum und -entwicklung sowie die Regulation des Koronarflusses verantwortlich (Romppanen et al., 1997). Weiterhin wurde im Atrium eine erhöhte transkriptionelle Aktivität von NPPB festgestellt (online Tab. 3, Barth et al., 2005b), das als Peptidhormon unter hämodynamischer Belastung freigesetzt wird und der Regulation des Blutvolumens dient (Langenickel et al., 2000). Auch *early-*

response-Gene wie *c-myc*, *c-fos* und *egr*, deren vermehrte Expression eine erste Reaktion auf eine Überlastung des Herzens ist, waren im atrialen Gewebe stärker exprimiert als im linken Ventrikel (online Tab. 3, Barth et al., 2005b).

Diesen Unterschieden wird schließlich unter pathophysiologischen Bedingungen eine besondere Bedeutung zuteil. Kääb et al. konnten in einer Microarray-Studie, in der die atriale und ventrikuläre Genexpression im humanen Myokard untersucht wurde, zeigen, dass die Adaptationsvorgänge bei Herzinsuffizienz ein regional spezifisches Muster aufweisen (Kääb et al., 2004). So war die Expression von 288 bei Herzinsuffizienz regulierten Transkripten nur in 19 Fällen gleichsinnig im Atrium und Ventrikel verändert. Bei den restlichen 269 Transkripten war eine bei Herzinsuffizienz regional spezifische Expressionsänderung festzustellen ([Abb. 4](#)).

Die Bedeutung eines regional spezifischen molekularen Remodelings konnte ferner durch tierexperimentelle Untersuchungen untermauert werden. In einem Hundemodell konnten Expressionsunterschiede für 38 myokardiale Transkripte zwischen hypertensiven Tieren und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Philip-Couderc et al., 2003). In Analogie zur Studie von Kääb et al. waren nur elf Transkripte in Atrium und Ventrikel simultan reguliert, während sich für die verbleibenden 27 Gene ein regional spezifisches Expressionsmuster fand. Außerdem konnte in einem Herzinsuffizienzmodell beim Hund durch tachykarde ventrikuläre Stimulation mit 200 Schlägen/min über vier Wochen gezeigt werden, dass im Atrium und Ventrikel qualitativ und quantitativ unterschiedliche Anpassungsreaktionen stattfinden ([Abb. 5](#); Hanna et al., 2004). Die Messung von histologischen, immunhistochemischen und Expressionsdaten von atrialem und ventrikulärem Gewebe ergab, dass sich der zeitliche Verlauf von Leukozyteninfiltration, Apoptoseprozessen und Aktivierung von MAP-Kinasen und TGF β -Stoffwechselwegen im Atrium signifikant zum Ventrikel unterscheidet.

Entsprechend ist in der vorliegenden Arbeit die atriale Überrepräsentation der funktionellen Klassen „Immunzellaktivierung“ und „Zelltod“ ein Hinweis auf regional-spezifische Unterschiede (online Tab. 5, „biologischer Prozess“, Ebenen 4 und 5; Barth et al., 2005b). Diese Tatsache könnte die tierexperimentell nachgewiesene besondere Neigung des atrialen Myokards für Apoptose erklären (Hanna et al., 2004).

Als Hinweis auf ein regional unterschiedliches strukturelles Remodeling fand sich als führender Befund nach vierwöchiger tachykarder Stimulation im Hund eine vermehrte Fibrose im Atrium, nicht jedoch im Ventrikel (Hanna et al., 2004). Diese konnte mit einer im Atrium im Vergleich zum Ventrikel signifikanten Erhöhung des TGF β 1-Spiegels auf mRNA und Proteinebene korreliert werden. Eine Erhöhung von TGF β 1 ist ebenso wie die verstärkte

MAPK-Aktivierung mit einer vermehrter Fibrosierung im Atrium bei Herzinsuffizienz vergesellschaftet. Interessanterweise waren zahlreiche Kollagentranskripte, TGF β 1 und weitere profibrotische Signalwege (z.B. *endothelin*-, *platelet*- und *insulin-like* sowie *connective tissue-derived growth factor*) bereits im nicht-insuffizienten humanen Atrium stärker exprimiert als im Ventrikel (online Tab. 6, Barth et al., 2005b). Dies stellt eine mögliche Erklärung für die regional unterschiedlichen strukturellen Remodelingvorgänge mit führender Fibrose im Atrium dar.

Im Gegensatz zu den muskelschwachen Atrien besteht die vorrangige Aufgabe der Ventrikel darin, den pulmonal- bzw. systemarteriellen Blutdruck aufzubauen (Frick et al., 1992). Hierzu ist eine besondere Spezialisierung hinsichtlich der Beschaffenheit des kontraktiven Apparates erforderlich. Den unterschiedlichen kontraktiven Eigenschaften zwischen Atrium und Ventrikel entsprechend, konnten grundlegende Unterschiede auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden: Nur ein von 21 Genen der funktionellen Gruppe „Muskelfaser“ wies eine vergleichbare Genaktivität im atrialen und ventrikulären Myokard auf (online Tab. 6, „zelluläre Lokalisation“, Ebene 5; Barth et al., 2005b), während für die verbleibenden 20 Gene ein regional spezifisches Expressionmuster vorherrschte. Exemplarisch ist hierfür die differentielle Expression der Isoformen der schweren und leichten Myosinkette hervorzuheben. Es ist bekannt, dass die β -Isoform der schweren Myosinkette, die als Bindungsstelle für Aktin und ATP dient, im Ventrikel überwiegt, während im Atrium primär die α -Isoform - und nur zu einem geringen Teil die β -Isoform – exprimiert wird. Die physiologische Bedeutung dieses Befundes liegt in der engen Korrelation der unterschiedlichen Isoform und der Höhe des ATP-Verbrauchs. Die überwiegend im ventrikulären Myokard exprimierte β -Myosinisoform hat zwar eine langsamere Kraftentwicklung als die atriale α -Myosinisoform, sie zeichnet sich aber auch durch einen um bis zu fünffach geringeren Energieverbrauch aus (Narolska et al., 2005). Folglich wird diese energiesparendere Isoform vor allem im Ventrikel exprimiert, der einen Großteil der Energie für kontraktile Prozesse benötigt.

Der hohe Energiebedarf des ventrikulären Gewebes findet in der vermehrten Expression funktioneller Stoffwechselgruppen seine Entsprechung (online Tab. 5, „biologischer Prozess“, Ebene 4; Barth et al., 2005b). Ebenso waren in der Kategorie „zelluläre Lokalisation“ bei Gene Ontology mitochondriale Gene, die für die oxidative Phosphorylierung und damit für die Energiebereitstellung von Bedeutung sind, im Ventrikel überrepräsentiert (online Tab. 5, „zelluläre Lokalisation“, Ebene 5; Barth et al., 2005b). Interessanterweise waren metabolische Gengruppen nicht nur im Ventrikel stärker exprimiert als im Atrium, sondern schienen im Atrium zusätzlich aktiv inhibiert zu werden. Dies wird durch die atriale Überrepräsentation der funktionellen Klasse „Hemmung des Metabolismus“

verdeutlicht (online Tab. 5, „biologischer Prozess“, Ebene 5; Barth et al., 2005b). Diese funktionelle Gruppe beinhaltet zahlreiche Transkriptionsfaktoren, darunter Zinkfingerproteine und kruppel-like Faktoren sowie Komponenten zentraler Signalwege (*tumor necrosis factor alpha-induced protein 3* (TNFAIP3), *TGFB-induced early growth response 1 and 2* (TIEG1 und TIEG2) und *platelet growth factor2 inhibitor* (PTGFRN); online Tab. 6, „biologischer Prozess“, Ebene 5; Barth et al., 2005b), die möglicherweise eine Verbindung von TNF α -, TGF β - und Prostaglandin-Stoffwechselwegen zur aktiven Hemmung des Stoffwechsels im Atrium herstellen. Die einzigen beiden im Atrium überrepräsentierten metabolischen Prozesse waren Steroid- und Proteoglykanmetabolismus (online Tab. 5, „biologischer Prozess“, Ebene 5; Barth et al., 2005b). Bezeichnenderweise beinhalten diese beiden Klassen Transkripte, die für Membranphospholipide und Chondroitinsulfatproteoglykane kodieren und als solche nicht energetischen Prozessen dienen, sondern v.a. für die Signalfunktionen der Zelle von Bedeutung sind (online Tab. 6, „biologischer Prozess“, Ebene 5; Barth et al., 2005b).

4.2.2 Vergleich der erzielten Ergebnisse mit einer Studie am Mäusemyokard

Das Ziel der Studie von Tabibiazar et al. war die Charakterisierung der regional spezifischen Genexpression im Mäusemyokard (Tabibiazar et al., 2003). Die regionale Verteilung funktioneller Klassen, denen die Transkripte mit unterschiedlicher Expression zwischen Atrium und Ventrikel zugeordnet wurden, stimmte mit der Verteilung entsprechender Klassen im humanen Myokard in der vorliegenden Studie überein ([Abb. 10a und 10b](#)). Dies legt nahe, dass im Säugerherzen das regional spezifische Expressionsmuster im Laufe der Evolution konserviert worden ist.

Ein Schwerpunkt der Microarray-Studie von Tabibiazar et al. lag in der Identifizierung von Genen, die für die regionale Spezialisierung während der Morphogenese des Herzens von Bedeutung sind (Tabibiazar et al., 2003). Daraus wurde diesen Transkripten auch eine wesentliche Rolle für den Erhalt des atrialen bzw. ventrikulären Phänotyps im adulten Myokard zugesprochen. In diesem Sinne wurde das Schema eines regulatorischen Netzwerks für die kardiale Entwicklung und den Erhalt der kardialen regional spezifischen Genexpression im Myokard erstellt. Hierbei wurde der WNT-abhängigen Signaltransduktion eine besondere Bedeutung beigemessen. Über WNT-Signalwege ist bisher bekannt, dass sie zahlreiche zelluläre Vorgänge während der Embryogenese regulieren. Auf zellulärer Ebene werden über diesen Mechanismus Morphologie, Proliferation, Taxis und Überleben der Zellen kontrolliert. In Analogie zu den Ergebnisse in der Maus zeigten sich auch im humanen Myokard wichtige Komponenten der WNT-Signalwege, wie beispielsweise DVL1

und FHL2, vornehmlich ventrikulär exprimiert (online Tab. 3, Barth et al., 2005b). Dagegen waren WNT-inhibitorische Gene wie DKK2 und DKK3 verstärkt im Atrium nachweisbar (online Tab. 3, Barth et al., 2005b). Die regionalen Transkriptionsunterschiede im WNT-Signaltransduktionsweg könnten für die Entstehung und den Erhalt regionaler Spezialisierung von zentraler Bedeutung sein. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich darüber hinaus noch weitere Übereinstimmungen bezüglich der regional unterschiedlichen Expression von Komponenten der WNT-Signalwege, so z.B. von VANGL2 und ROCK2, die beide an der myokardialen Entwicklung beteiligt sind (Phillips et al., 2005; Zhao et al., 2004; online Tab. 3, Barth et al., 2005b). Allerdings ist dabei zu berücksichtigen, dass eine experimentelle Validierung dieser Signalwege für die Entstehung regionaler Expressionsmuster noch aussteht. Daneben scheint es nicht gerechtfertigt, die Spezialisierung von Atrium und Ventrikel einem einzigen regulatorischen Mechanismus zuschreiben zu wollen, nachdem einerseits unterschiedliche Transkriptionsfaktoren nur während bestimmter Entwicklungsphasen regional spezifisch exprimiert werden und andererseits Transkriptionsfaktoren mit wesentlicher Bedeutung für die Herzentwicklung wie *GATA binding protein 4* (GATA4) und *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1* (NF-KappaB) keine unterschiedliche Expression in Atrium und Ventrikel aufweisen (Franco et al., 1998; Small et al., 2004; online Tab. 3, Barth et al., 2005b).

Derzeit wird die detaillierte Identifizierung der beteiligten Transkriptionsfaktoren durch das spezifische Design der Affymetrixsonden im 3'-Bereich der Gene erschwert. Zusätzlich werden für bis zu 50% aller transkribierten Gene alternative Promotoren vermutet (www.genomatix.de). Aktuelle Entwicklungen wie etwa exon-spezifische Microarrays bzw. *whole genome tiling arrays* in Kombination mit der Technik der Chromatinimmunopräzipitation lassen jedoch eine Aufklärung transkriptioneller Regulationsmechanismen in Reichweite rücken.

4.3 Charakterisierung des humanen myokardialen Transkriptionsprofils im Atrium bei chronischem Vorhofflimmern

Die vorliegende Studie stellt die erste genomweite Untersuchung von Veränderungen der transkriptionellen Aktivität bei chronischem Vorhofflimmern im humanen Myokard dar. Durch den Vergleich der atrialen Genexpression bei Vorhofflimmern mit der Genaktivität bei Sinusrhythmus sowie der ventrikulären Genexpression konnten neue Transkriptionsmuster des Atriums bei Vorhofflimmern aufgedeckt werden.

4.3.1 Transkriptionelle Herunterregulation im Atrium bei Vorhofflimmern

Von 1.434 Transkripten, die bei Vorhofflimmern Expressionsänderungen aufwiesen, waren über zwei Drittel herunterreguliert (online Tab. 3, Barth et al., 2005a). Entsprechend waren funktionellen Genklassen, die mit transkriptionellen Prozessen in Verbindung stehen, vermindert (online Tab. 4, „biologischer Prozess“, Ebene 5; Barth et al., 2005a). Die generalisierte Repression transkriptioneller Prozesse bei Vorhofflimmern korreliert mit den Befunden von Microarray-Studien bei Vorhofflimmern in Schweinen (Lai et al., 2004) und im menschlichen Herzen (Ohki-Kaneda et al., 2004), bei denen ebenfalls eine Reduktion der transkriptionellen Aktivität festgestellt worden war.

Alternativ könnte die Verminderung der Genexpression auch auf einer generellen Reduktion des myozytären Kompartiments bei unveränderter transkriptioneller Aktivität der Einzelzellen beruhen, da Myolyse und zelluläre Hypertrophie charakteristische histologische Kennzeichen von Vorhofflimmern sind (Schotten et al., 2001). Allerdings ist das Ausmaß der bei Vorhofflimmern nachgewiesenen Myolyse zu gering (Schotten et al., 2001), um die in dieser Studie beobachtete Herunterregulation transkriptioneller Prozesse zu erklären. Für das Fehlen einer ausgeprägten Myolyse spricht auch der Befund, dass die Expression mehrerer myozytenspezifischer Markergene *myosin heavy polypeptide 7* (MYH 7), *troponine T2* (TNNT2) und *calsequestrin 2* (CASQ2) in Proben mit Sinusrhythmus und Vorhofflimmern keine signifikanten Unterschiede aufwiesen (online Tab. 3, Barth et al., 2005a).

Transkriptionelle Prozesse werden im Myokard über eine Vielzahl von Mechanismen reguliert, u.a. elektrische Erregung, kalziumabhängige Signaltransduktion und Dehnungsreize (McDonough et al., 1992; Kubisch et al., 1993). Bei Vorhofflimmern wird eine Änderung dieser Mechanismen beobachtet: Durch den zehnfachen Anstieg der Depolarisationsfrequenz kommt es zu einer veränderten Kalziumhomöostase im Vorhofmyokard. Ebenso führt der Verlust der atrialen Pumpfunktion zu einer Erhöhung der Wandspannung (Ausma et al., 2000b; Allesie et al., 2002; Kneller et al., 2002; Akar et al.,

2003). Aufgrund der erhöhten Wandspannung und der zur Aufrechterhaltung der Zellhomöostase erforderlichen, energieabhängigen Ionentransportprozesse resultiert bei Vorhofflimmern ein deutlich gesteigerter Energiebedarf. Es ist denkbar, dass die atriale Zelle in Zeiten erhöhten Energiebedarfs transkriptionelle Prozesse auf das zum Überleben notwendige Maß minimiert. Ein ähnlicher energiesparender Mechanismus mit Repression der Transkription und Translation findet sich auch beim *hibernating* Myokard (Elsasser et al., 2004).

Der veränderten Kalziumhomöostase bei Vorhofflimmern wird möglicherweise eine besondere Rolle als Ursache der Transkriptionsregulation zuteil. Kalzium besitzt als intrazelluläres Signalmolekül bei der Regulation vielfältiger Zellfunktionen eine herausragende Bedeutung (Berridge et al., 2000). Als Besonderheit im Myokard ist der Kalziumstoffwechsel zudem eng mit der elektromechanischen Kopplung verbunden (Ausma et al., 2000a; Berridge et al., 2003). Bei Vorhofflimmern sind Veränderungen im Kalziumhaushalt in zahlreichen Studien am Tiermodell und beim Menschen dokumentiert (Ausma et al., 2000a; Kneller et al., 2002; Akar et al., 2003). Mit Einsetzen der Arrhythmie kommt es durch den dramatischen Anstieg der Depolarisationsfrequenz zu einem Anstieg des Kalziumeinstroms über den L-Typ Kalziumkanal. Da dauerhaft erhöhte intrazelluläre Kalziumspiegel pro-apoptotisch wirken (Florea et al., 2005), werden Kompensationsmechanismen aktiviert, die eine Kalziumüberladung der Zellen verhindern. Kurzfristig erfolgt eine Reduktion des L-Typ Kalziumstroms über eine Beschleunigung der kalziumabhängigen Inaktivierung (Dobrev et al., 2003) und über einen verstärkten proteolytischen Abbau von $I_{Ca,L}$ -Kanalproteinen (Brundel et al., 1999). Eine transkriptionelle Herunterregulation von $I_{Ca,L}$ - Kanälen stellt einen mittel- bis langfristigen Kompensationsmechanismus dar (Bosch et al., 1999). Im Einklang mit diesen Befunden wurde in der vorliegenden Studie bei permanentem Vorhofflimmern eine Herunterregulation der fünf Untereinheiten des Kalziumkanals beobachtet (CACNA1D, CACNA1G, CACNA2D2, CACNA2D3 und CACNB2; online Tab. 3, Barth et al., 2005a).

Die Wirksamkeit dieser Kompensationsmechanismen ist durch Messung der freien intrazellulären Kalziumspiegel bei Vorhofflimmern gut belegt: Nach einer anfänglichen Zunahme des Kalziumspiegels beginnt dieser schon innerhalb der ersten 30 Minuten zu sinken und normalisiert sich sogar in den darauf folgenden 48 Stunden trotz weiter bestehender Arrhythmie (Akar et al., 2003). Eine histologische Untersuchung atrialer Zellen mit Vorhofflimmern konnte eine andauernde Überladung der Mitochondrien mit Kalzium, die ein Hinweis auf einen erhöhten Spiegel freien Kalziums wäre, ebenfalls nicht belegen (Ausma et al., 2000a). Bei länger bestehendem Vorhofflimmern wurden bei Ziegen sogar Hinweise auf verminderte „steady-state“ Kalziumspiegel gefunden (Ausma et al., 2000a).

Auch im Hundeherzen fanden sich nach einer vierwöchiger atrialer Tachykardie in atrialen Myozyten niedrigere Kalziumspiegel und kleinere Kalziumtransienten (Kneller et al., 2002). Unterstützt werden diese tierexperimentellen Befunde durch die klinische Beobachtung, dass Kalziumkanalblocker wie Verapamil zwar bei paroxysmalen Formen von Vorhofflimmern ein elektrisches Remodeling vorbeugen können, bei persistierendem oder permanentem Vorhofflimmern ist dieser Effekt aber nicht mehr nachweisbar (Lee et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich wesentliche Übereinstimmungen mit anderen Studien hinsichtlich der Genexpression von Transkripten, die an der Regulation des Kalziumhaushalts beteiligt sind: Neben fünf Untereinheiten von Kalziumkanälen vom L-Typ war auch die ATP2A2 vermindert (online Tab. 3, Barth et al., 2005a). Zusätzlich wurde eine transkriptionelle Herunterregulation wesentlicher Komponenten kalziumvermittelter Signalwege festgestellt, die mit der Kontrolle transkriptioneller Vorgänge im Myokard in Zusammenhang stehen. So waren Bestandteile der MAPK-, *calcium/calmodulin-dependent protein kinase* (CaMK)-Signalwege bei Vorhofflimmern vermindert exprimiert (online Tab. 3, Barth et al., 2005a). MAP-Kinasen können auf extrazelluläre Signale hin Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und dadurch Genexpressionsprogramme regulieren (Arai et al., 2002; Pesu et al., 2002; Berridge et al., 2003). Ebenso sind Kalzineurin- und CaMK-Signalwege für die Kontrolle der transkriptionellen Aktivität von Bedeutung (Berridge et al., 2003).

In Anbetracht der zentralen Bedeutung von Kalzium bei der Regulation der myokardialen Genexpression, der beobachteten Herunterregulation kalziumabhängiger Signaltransduktionskaskaden sowie der in der Literatur beschriebenen Veränderungen im Kalziumhaushalt bei Vorhofflimmern liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die verminderte transkriptionelle Aktivität bei Vorhofflimmern durch die charakteristischen Veränderungen im Kalziumhaushalt entscheidend mitbeeinflusst wird ([Abb. 13](#)).

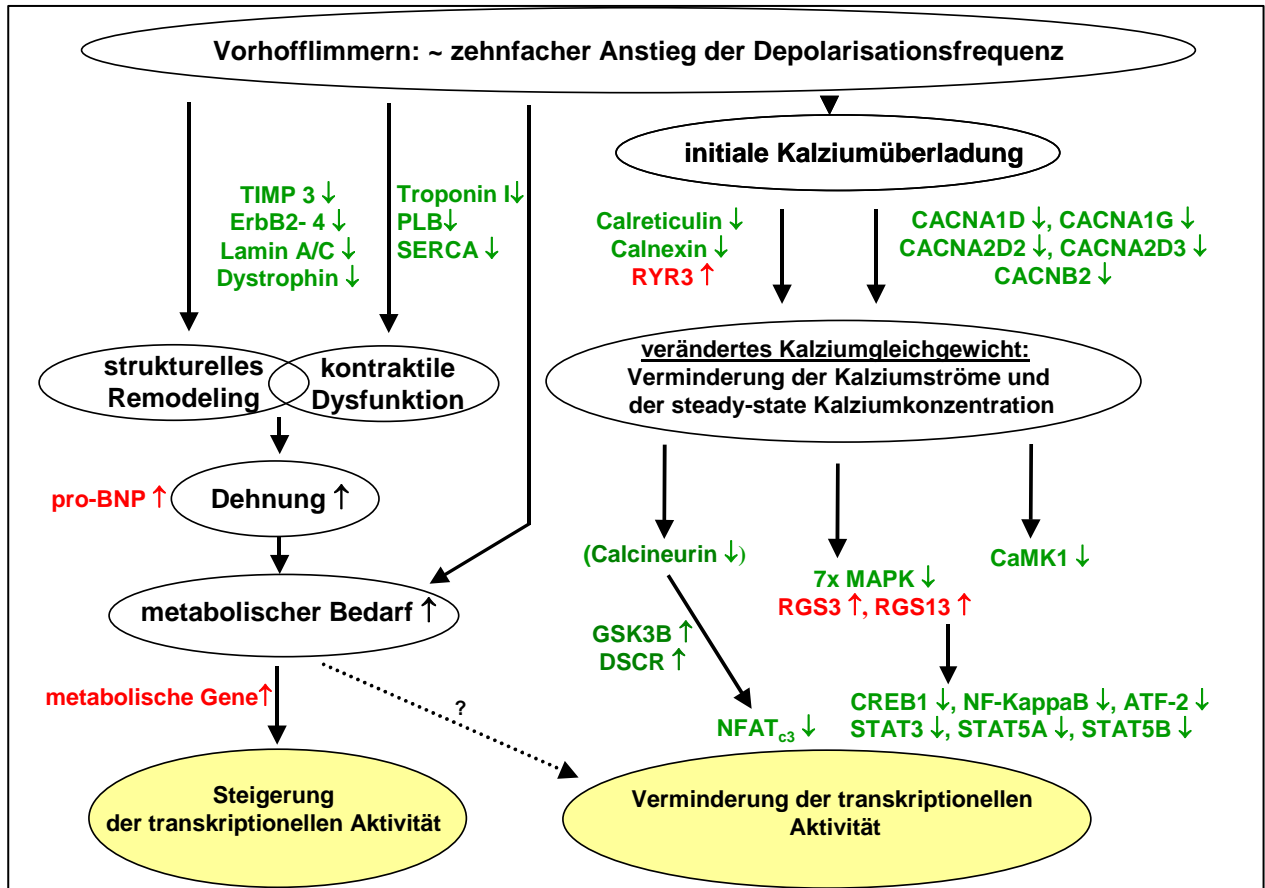


Abbildung 13

Arbeitsmodell für transkriptionelle Veränderungen bei chronischem Vorhofflimmern. Die hohe atriale Depolarisationsfrequenz bei Vorhofflimmern führt zu einem gesteigerten intrazellulären Kalziumeinström über sarkolemmale Kalziumkanäle und zu einer Erhöhung des zellulären Kalziumgehalts. Um eine längerfristige intrazelluläre Kalziumüberladung zu verhindern, erfolgt eine Herunterregulation der L-Typ-Kalziumkanäle. Die Hochregulation des Gens RYR3, welches den sarkoplasmatischen Kalziumausstrom inhibiert und die verminderte Expression weiterer regulatorischer Transkripte der sarkoplasmatischen Retikulums, lässt auf eine veränderte Kalziumhomöostase schließen. Verminderte sarkolemmale Kalziumströme und SR-vermittelte Kalziumtransienten können zur Herunterregulation kalziumabhängiger Signalwege wie Calcineurin-NFAT-, MAPKs- und CaMK-Signalwege führen. Die Folge könnte eine starke Verminderung transkriptioneller Prozesse sein, die beispielhaft an der Herunterregulation von Schlüsselkomponenten bestimmter Transkriptionsfaktoren wie NFAT, CREB, STAT3, STAT5 und NF-κB zu erkennen sind.

Weiterhin sind verminderte Kalziumströme sowie die hohe Depolarisationsfrequenz an der kontraktile Dysfunktion beteiligt. Letzteres trägt zusammen mit dem strukturellen Remodeling zu einer erhöhten Wandspannung bei. Die erhöhte hämodynamische Belastung führt zu einem hohen metabolischen Bedarf des flimmernden Atriums, so daß kompensatorisch ein metabolisches Genprogramm aktiviert wird. Im Zusammenhang mit den metabolischen Mehrbedarf bei permanentem Vorhofflimmern könnte auch die Verminderung transkriptioneller Prozesse der Energieersparnis dienen, indem die Synthese auf ausgewählte Proteine eingeschränkt wird – ähnlich dem *hibernierenden* Myokard.

4.3.2 Veränderungen in der atrialen Transkription als Grundlage für Remodelingprozesse

Kennzeichnend für den Verlauf von Vorhofflimmern ist die Neigung zur Chronifizierung und Progression. Pathophysiologisch wird dies auf charakteristische Veränderungen des Myokards auf elektrophysiologischer, struktureller und kontraktile Ebene zurückgeführt, die in ihrer Gesamtheit als Remodeling bezeichnet werden ([vgl. Kap. 1.3](#); Allessie et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnten wesentliche transkriptionelle Grundlagen dieser drei zentralen Remodelingvorgänge identifiziert werden. Das Charakteristikum des elektrophysiologischen Remodelings besteht in einer Verkürzung der Aktionspotentialdauer mit dadurch verkürzter atrialer Refraktärzeit (Allessie et al., 2002). Die Verkürzung der Aktionspotentialdauer kann auf einer Abnahme einwärts gerichteter Kalzium- und Natriumströme, einer Zunahme auswärts gerichteter Kaliumströme oder auf einer Kombination beider Veränderungen beruhen. Im Einklang mit der zentralen Stellung des L-Typ Kalziumkanals in der Pathophysiologie von Vorhofflimmern wurde in der vorliegenden Arbeit eine verminderte Expression von fünf Genen festgestellt, die für Untereinheiten von Kalziumkanälen kodieren. Des Weiteren fand sich eine Hochregulation von Transkripten, die für auswärtsgerichtete Kaliumkanäle kodieren. So konnte erstmals aufgezeigt werden, dass die Expression des Kaliumkanals KCNK3 bei Vorhofflimmern signifikant erhöht ist (online Tab. 3, Barth et al., 2005a). Allerdings fand sich überdies auch eine verminderte Transkription von Genen, die für repolarisierende Kaliumkanäle bzw. deren assoziierte Untereinheiten kodieren (z.B. KCNIP2, KCNJ3 und KCNJ5; online Tab. 3, Barth et al., 2005a). Die Verminderung von Kaliumströmen wird in diesem Zusammenhang als Kompensationsmechanismus aufgefasst, der eine exzessive Aktionspotentialverkürzung bei Vorhofflimmern verhindern soll.

Die elektrophysiologischen Veränderungen bei Vorhofflimmern sind nicht nur an Veränderungen sarkolemmaler Ionenkanäle gebunden, sondern umfassen auch das sarkoplasmatische Retikulum. Beispielhaft hierfür konnten eine Hochregulation von RYR3 (inhibitorische Isoform des Kalziumfreisetzungskanals RYR2) und eine Herunterregulation von ATP2A2 nachgewiesen werden (online Tab. 3, Barth et al., 2005a).

Die strukturellen Veränderungen bei chronischem Vorhofflimmern sind im Wesentlichen durch zunehmende Fibrosierung mit nachfolgender intraatrialer Leitungsstörung, atrialer Dilatation und kontraktile Dysfunktion gekennzeichnet (Thijssen et al., 2000; Allessie et al., 2002). Im Einklang mit einer Zunahme der Fibrose bei Vorhofflimmern fand sich in der vorliegenden Untersuchung eine Hochregulation von

Kollagentranskripten, TNC und BGN sowie der extrazellulären Proteinase MMP9 und ADAM19 (online Tab. 3 und 5, Barth et al., 2005a). Das bei Vorhofflimmern statistisch am signifikantesten regulierte Gen, TIMP3, steht ebenfalls mit dem extrazellulären Remodeling in Verbindung. TIMP3, dessen Expression bei Vorhofflimmern reduziert war, ist ein Inhibitor von Matrixmetalloproteinasen, die für Umbauvorgänge der extrazellulären Matrix verantwortlich sind. Bei einer Untersuchung von TIMP3-defizienten Mäusen zeigte sich, dass die Tiere einen kardiomyopathischen Phänotyp mit Dilatation und kontraktile Dysfunktion entwickelten (Fedak et al., 2004). Es ist daher anzunehmen, dass die Herunterregulation von TIMP3 bei chronischem Vorhofflimmern - ähnlich wie bei dilatativer Kardiomyopathie – nicht nur zum strukturellen Remodeling sondern auch zur Beeinträchtigung der kontraktile Funktion beiträgt (Li et al., 1998).

Weiterhin konnten Änderungen der TGF β -vermittelten Signaltransduktion nachgewiesen werden. TGF β nimmt eine zentrale Stellung unter den profibrotischen Stoffwechselwegen ein und ist mit einer Vielzahl kardiovaskulärer und fibrotischer Erkrankungen assoziiert (Akhurst, 2004). Neben einer Hochregulation von TGF β fiel zudem eine Herunterregulation des TGF β -Rezeptors 2 (TGFBR2) und von *fibrillin 1* (FBN1) auf (online Tab. 3, Barth et al., 2005a). Mutationen, die zum Funktionsverlust des TGFBR2 und von FBN1 führen, sind mit dem Marfan-Syndrom in Verbindung gebracht worden (Mizuguchi et al., 2004). Das Marfan-Syndrom ist eine Erkrankung der extrazellulären Matrix. Betroffene Patienten können neben Vorhofflimmern eine myokardiale Gefügedilatation entwickeln. Bemerkenswerterweise wies eine Patientin mit Vorhofflimmern ein Marfan-Syndrom auf (18-jährige Patientin mit marfanoiden Habitus und dilatativer Kardiomyopathie). In [Abbildung 14a und 14b](#) sind die individuellen Messwerte für TGFBR2 und FBN1 in allen Gewebeproben dargestellt. Es wird ersichtlich, dass Expressionswerte für TGFBR2 und FBN1 nicht nur bei der Patientin mit Marfan-Syndrom, sondern im gesamten Kollektiv der Patienten mit Vorhofflimmern vermindert waren.

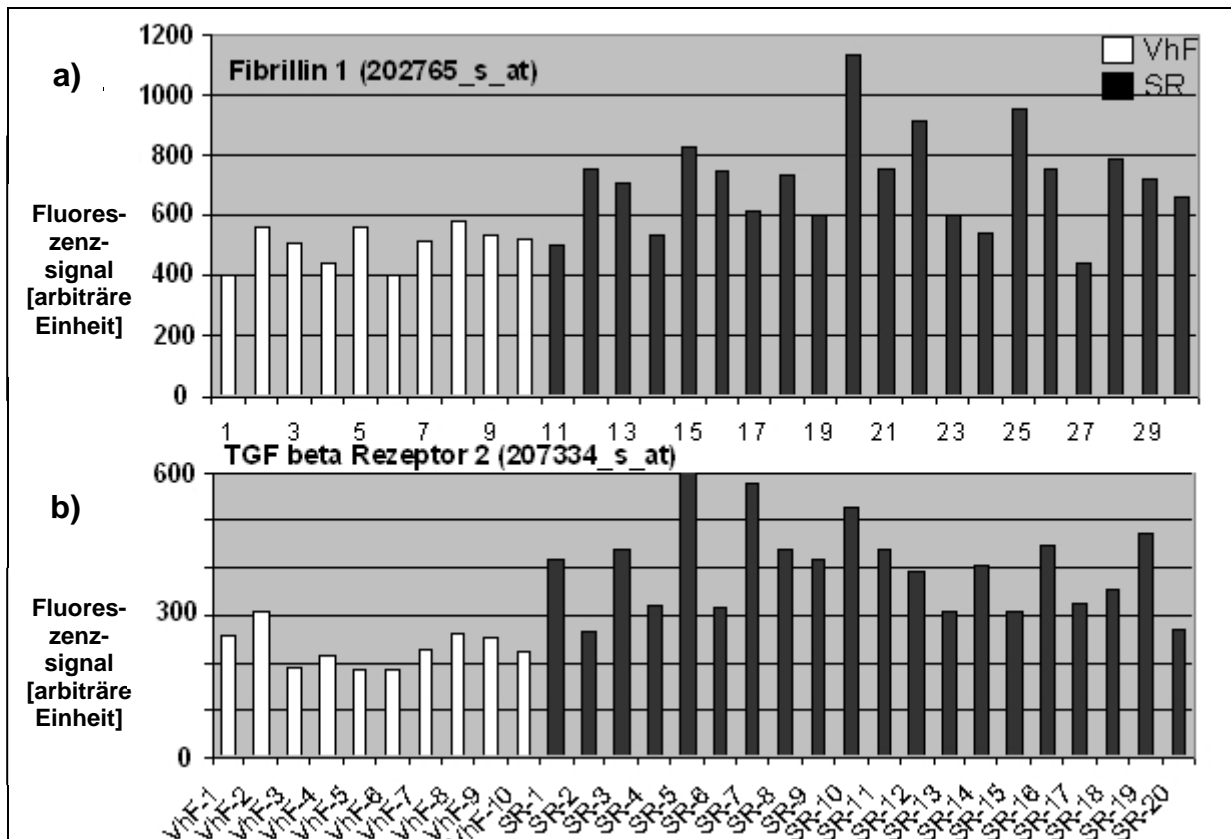


Abbildung 14a und 14b

Einzelmessungen für FBN 1 (a) und TGF β -Rezeptor 2 (b) in allen Gewebeproben mit Sinusrhythmus (schwarze Säulen) und chronischem Vorhofflimmern (weiße Säulen) weisen darauf hin, dass die verminderte Expression dieser Gene nicht nur bei der Patientin mit Marfan-Syndrom (VhF-1, erste Säule), sondern bei allen Patienten mit chronischem Vorhofflimmern nachweisbar war.

In diesem Zusammenhang fand sich ferner eine verminderte Expression von Genen, die an der Bildung des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes beteiligt sind (DMD, DAG1, SGCE und SNTB2; online Tab. 3 und 5, Barth et al., 2005a). Mutationen in diesen Genen führen zu hereditären Formen von dilatativen Kardiomyopathien (Lapidos et al., 2004). Eine Schwächung dieses Komplexes, der die mechanische Verbindung des intrazellulären Zytoskeletts mit der Zellmembranen und der extrazellulären Matrix darstellt, könnte ebenso bei Vorhofflimmern zur Entwicklung eines kardiomyopathischem Phänotyps beitragen.

Ebenso zeigte sich in der vorliegenden Studie eine Herunterregulation von LMNA (online Tab. 3, Barth et al., 2005a). Bei LMNA handelt es sich um ein intermediäres Filament der inneren Kernmembran, das für die strukturelle Integrität der Zelle und die Organisation des Chromatins verantwortlich ist. Mutationen im LMNA Gen können unter anderem zu einer dilatativen Kardiomyopathie führen. Gleichwohl konnte auch eine Mutation im LMNA Gen

identifiziert werden, bei der es zu Vorhofflimmern noch vor Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie kam (Sébillon et al., 2003).

Schließlich fand sich bei Vorhofflimmern eine verminderte Expression der ErbB2- und ErbB4 (online Tab. 3, Barth et al., 2005a). Diese Rezeptoren besitzen eine Tyrosinkinaseaktivität und sind mit Wachstumsprozessen, Inhibition der Apoptose, Zelltransformation und Tumorinduktion in Zusammenhang gebracht worden. Bei Patientinnen mit Mammakarzinom, die zusätzlich zu einer anthrazyklinhaltigen Chemotherapie mit dem monoklonalen ErbB2 – Antikörper Herceptin behandelt worden sind, ist ein dramatischer Anstieg der Inzidenz von dilatativen Kardiomyopathien auf bis zu 30% verzeichnet worden (Garratt et al., 2003). Zusätzlich lassen sich experimentell bei einer längerfristigen Exposition kultivierter humaner Kardiomyozyten mit anti-ErbB2-Antikörpern negativ inotrope Effekte beobachten (Garratt et al., 2003). ErbB2-knock-out Mäuse entwickeln als führenden Phänotyp eine dilatative Kardiomyopathie. Die transkriptionelle Herunterregulation von ErbB2 bei Vorhofflimmern könnte somit nicht nur mit dem strukturellen Remodeling bei chronischem Vorhofflimmern in Verbindung stehen, sondern auch einen Erklärungsansatz für die kontraktile Dysfunktion bieten, die nach Konversion in den Sinusrhythmus noch mehrere Wochen anhält.

Letztlich sind die in dieser Studie identifizierten transkriptionellen Veränderungen eher Folge als Ursache des Vorhofflimmerns. Dennoch untermauert die transkriptionelle Herunterregulation von Genen, die sowohl bei hereditären als auch bei erworbenen Formen von strukturellem Remodeling (TIMP3) bzw. Vorhofflimmern (TGFB2, FBN1) beteiligt sind, das Konzept, dass Vorhofflimmern zu molekularen Veränderungen führt, die das Fortbestehen der Arrhythmie weiter begünstigen (Wijffels et al., 1995).

Neben den drei zentralen Remodelingprozessen, die elektrophysiologische, kontraktile und strukturelle Eigenschaften betreffen, fanden sich in der vorliegenden Arbeit erstmals Hinweise auf tiefgreifende Veränderungen metabolischer Prozesse. Die ausgeprägte Hochregulation von Genen, die metabolische Funktionen erfüllen, lässt auf Veränderungen in der atrialen Bioenergetik mit gesteigertem Energiebedarf bei Vorhofflimmern schließen (online Tab. 4 und 5, „biologischer Prozess“, Ebene 5; Barth et al., 2005a). So konnte nachgewiesen werden, dass sich der atriale Sauerstoffverbrauch und der koronare Blutfluss mit Auftreten der Arrhythmie um das Dreifache erhöhen (White et al., 1982). Als Ursachen hierfür kommt neben der erhöhten Wandspannung v.a. auch die drastisch gesteigerte atriale Depolarisationsfrequenz in Betracht: Zur Aufrechterhaltung des physiologischen Ionengleichgewichts und der Kalziumhomöostase muss ausreichend Energie für ATP-abhängige Ionentransportprozesse zur Verfügung gestellt werden.

Tierexperimentell nahm der Gehalt an Phosphokreatin nach einer Woche Vorhofflimmern in atrialen Myozyten um 60% ab, was als ein Hinweis auf den erhöhten Bedarf dieses energiereichen Phosphates gewertet werden kann (Ausma et al., 2000b). Da der Phosphokreatingehalt trotz Fortbestehen der Arrhythmie in der Folge wieder zunahm und nach einer Vorhofflimmerdauer von 16 Wochen zu den Ausgangswerten zurückkehrte, wurde die These aufgestellt, dass kompensatorische Mechanismen aktiviert werden, um das metabolische Gleichgewicht zwischen Energiebedarf und Energieversorgung wiederherzustellen (Ausma et al., 2000b). In der vorliegenden Arbeit findet dieses Konzept in der ausgeprägten transkriptionellen Hochregulation von Stoffwechselwegen seine Bestätigung ([Abb. 11](#); (online Tab. 5, „zelluläre Lokalisation“, Ebene 5; Barth et al., 2005a).

4.3.3 Entwicklung eines ventrikulären und fetalen Expressionsmusters im atrialen Myokard

Atriale und ventrikuläre Kardiomyozyten weisen unter physiologischen Bedingungen hinsichtlich ihrer Histologie und ihrer funktionellen Eigenschaften grundlegende Unterschiede auf (Piper et al., 1989). Damit der Ventrikel seiner Hauptfunktion, der Kontraktion, gerecht werden kann, sind seine Zellen mit einem hohen Anteil an Mitochondrien ausgestattet, während atriale Zellen eine endokrine Spezialisierung mit gut ausgebildetem rauhen endoplasmatischen Retikulum, Golgi-Apparat und sekretorischen Granula aufweisen (Piper et al., 1989) ([vgl. Kap. 4.2.1](#)).

Diese ultrastrukturellen Unterschiede, die auf einer regional spezifischen Genexpression beruhen, sind jedoch keineswegs statisch. Vielmehr können sie durch verschiedene pathophysiologische Zustände wie Hypertrophie (Kumar et al., 1988), Herzinsuffizienz (Wankerl et al., 1999) und Vorhofflimmern (Lai et al., 2004) moduliert werden. Hierbei ist die vermehrte Expression ventrikulärer Myosinisoformen im atrialen Myokard bei Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern am besten untersucht. Bisher wurden diese Veränderungen mit Anpassungsreaktionen an veränderte hämodynamische Bedingungen, u.a. mit dem Anstieg des intraatrialen Drucks, in Zusammenhang gebracht (Kumar et al., 1988). Nachdem prinzipiell ähnliche Veränderungen während der embryonalen Entwicklungsphase vorkommen, wurden sie als Reexpression eines fetalen Genexpressionsmusters angesehen. Entsprechend ließen sich ultrastrukturelle Veränderungen bei chronischem Vorhofflimmern aufzeigen, die den histologischen Merkmalen fetaler Kardiomyozyten ähneln (Ausma et al., 2001). Beispielsweise konnte eine perinukleäre Akkumulation von Glykogen nachgewiesen werden, die auf Veränderungen im Metabolismus hindeutet. Der Glykogenvorrat dient neben der mechanischen Stabilisierung

der Zelle als Energiequelle für kontraktile Prozesse (Knaapen et al., 1997). Auf dieser Grundlage entstand bei chronischem Vorhofflimmern das Konzept der „Anpassung der Zelle durch Dedifferenzierung“ (Thijssen et al., 2001). Hiernach soll der fetale Phänotyp den Myozyten das Überleben in Phasen sichern, in denen das Myokard durch Vorhofflimmern metabolisch oder kontraktile überlastet ist. Weitere histologische Befunde stützen diese Hypothese. So zeigen atriale Zellen aus Herzen mit Vorhofflimmern Kennzeichen ventrikulärer und fetaler Differenzierung auf: Ultrastrukturell waren der Golgi-Apparat und das raue endoplasmatische Retikulum ausgedünnt, der Gehalt an Myofibrillen und Mitochondrien demgegenüber erhöht. In Analogie zum fetalen Myokard fand sich auch bei Vorhofflimmern eine veränderte Chromatinverteilung (Ausma et al., 2001). Für einen Großteil dieser ultrastrukturellen Befunde konnte die vorliegende Arbeit die zugrundeliegenden transkriptionellen Veränderungen aufdecken (online Tab. 5, „zelluläre Lokalisation“, Ebene 5; Barth et al., 2005a).

Im Einklang mit der Reexpression eines fetalen Genexpressionsmusters sind die metabolischen Veränderungen mit vermehrter Glukoseverwertung bei gleichzeitig verminderter Fettsäureoxidation zu werten ([Abb. 11](#)). Diese metabolischen Veränderungen sind eingebettet in eine generelle Hochregulation von Transkripten des Energiestoffwechsels, die adaptiv als Reaktion auf einen erhöhten Energiebedarf erfolgt. Vor diesem Hintergrund ist ebenso die Expression der ventrikulären Myosinisoform, die einen fünfmal geringeren Energieverbrauch als die atriale Isoform aufweist, zu betrachten (Narolska et al., 2004; online Tab. 3, Barth et al., 2005a). Die Expression ventrikulärer Myosinisoformen bei Vorhofflimmern ist somit integraler Teil eines ventrikulären Genexpressionsmusters im Vorhof.

Dieses ventrikuläre Expressionsprogramm im Atrium bei Vorhofflimmern beruht vor allem auf einer verminderten Aktivität atrialer Gene und weniger auf einer Hochregulation ventrikulärer Transkripte (online Tab. 3, Barth et al., 2005a). Desgleichen verhält es sich beim Genexpressionsmuster im Sinne einer fetalen Differenzierung, bei dem überwiegend adulte Gene vermindert exprimiert werden. Die Hochregulation fetaler Transkripte spielt dagegen eine weitaus geringere Rolle (Razeghi et al., 2001).

4.4 Klinische Relevanz

Vorhofflimmern ist die häufigste Arrhythmie beim Menschen und weist einen altersabhängigen Anstieg der Inzidenz und Prävalenz auf. So sind bei den über 65-jährigen

bis zu 4% der Bevölkerung betroffen, bei den 80-jährigen sind dies bereits über 10% (Braunwald et al. 2001; Herold et al., 2004). Häufig stellt Vorhofflimmern keine eigenständige Erkrankung dar, sondern ist das Symptom einer Grunderkrankung wie Hyperthyreose, arterieller Hypertension, Klappenfehler, koronare Herzerkrankung oder Herzinsuffizienz. Obwohl Vorhofflimmern im Einzelfall wenig Symptome verursachen kann, bleibt es stets mit zwei ernsthaften Komplikationen behaftet: Thrombembolien und akuter Linksherzinsuffizienz durch Tachy- oder Bradyarrhythmie. Bei neu aufgetretenem Vorhofflimmern kann die Therapie der Grunderkrankung in bis zu 50% zu einer spontanen Rhythmisierung führen (Karow et al., 2004). Mit zunehmender Dauer der Arrhythmie gestaltet sich die Therapie jedoch als schwierig und ist durch eine hohe Rate an Rezidiven gekennzeichnet. Ursächlich hierfür werden u.a. die Veränderungen der elektrophysiologischen und strukturellen Eigenschaften des Atriums gemacht. Kennzeichen dieser Remodelingvorgänge ist, dass sie die Arrhythmie zu stabilisieren vermögen (Wijffels et al., 1995). Als medikamentöse Behandlungsstrategien stehen derzeit Rhythmus- und Frequenzkontrolle gleichberechtigt nebeneinander (Blackshear et al., 2003; Prasun et al., 2003). Ein Vorteil der Rhythmuskontrolle auf das Überleben der Patienten ließ sich in grossen Studien nicht nachweisen, da die eingesetzten Antiarrhythmika mit zahlreichen Nebenwirkungen behaftet sind. Einen besonders limitierenden Faktor stellt hierbei v.a. die ventrikuläre Proarrhythmie dieser Pharmakagruppe dar, die den positiven Effekt durch die Terminierung des Vorhofflimmerns wieder aufwiegt. Insofern bildet das Wissen um die physiologischen regionalen Expressionsmuster im Myokard die Grundvoraussetzung, um regional selektive Pharmaka gezielt zu entwickeln. Beispielhaft kann hier AVE0118 herangeführt werden, welches den präferentiell atrial lokalisierten Kaliumkanal KCNA5 blockiert (online Tab. 3, Barth et al., 2005b). Mittels einer pharmakologische Hemmung des KCNA5-vermittelten Kaliumausstroms lässt sich selektiv das atriale Aktionspotential verlängern, ohne dass proarrhythmische Effekte im Ventrikel zu befürchten sind. So konnten tierexperimentelle Befunde bei hoher Wirksamkeit in der medikamentösen Kardioversion von Vorhofflimmern keine QTc-Verlängerung zeigen. Analog zu KCNA5 würde der überwiegend atrial exprimierte Ionenkanal KCNK3 als ein weiterer Angriffspunkt einer pharmakologischen Therapie dienen (online Tab., Barth et al., 2005b), mit der das elektrische Verhalten atrialer Zellen bei Vorhofflimmern gezielt modulierbar wäre.

Weiterhin stellt die vorliegende Arbeit auch eine Rationale für die Behandlung von Vorhofflimmern mit ACE-Hemmern oder AT-II-Rezeptorantagonisten dar. Für diese Substanzgruppen wurden pleiotrope Effekte nachgewiesen, die überdies eine Hemmung des TGF β -Stoffwechselweges umfassen und somit das strukturelle Remodeling und die Fibrose des atrialen Myokards effektiv reduzieren können (Karow et al., 2004).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Vorhofflimmern ist die häufigste anhaltende Arrhythmie des Menschen. Durch die assoziierte Morbidität und Mortalität ist die Erkrankung von großer medizinischer, aber auch volkswirtschaftlicher Bedeutung. Die derzeitigen medikamentösen Behandlungsstrategien zur Terminierung von Vorhofflimmern sind bisher wenig erfolgreich und überdies mit zahlreichen Nebenwirkungen behaftet. Erst ein besseres molekulares Verständnis der zugrunde liegenden Remodelingprozesse bildet die Voraussetzung für die Entwicklung neuartiger, rationaler Therapiekonzepte bei Vorhofflimmern.

Als Teil des kontraktiven Remodelings wurde im Atrium bei Vorhofflimmern für Muskelstrukturproteine eine Verschiebung von atrialen zu ventrikulären Isoformen beschrieben (Lai et al., 2004). Eine Einbettung dieser Befunde in einen pathophysiologischen Zusammenhang setzt ein detailliertes Wissen um die transkriptionellen Prozesse im nicht-insuffizienten atrialen und ventrikulären Myokard voraus.

Als **Hypothese** wurde angenommen, dass

- 1) strukturelle und funktionelle Unterschiede zwischen atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten in einer unterschiedlichen Genexpression begründet sind,
- 2) Remodelingvorgänge bei chronischem Vorhofflimmern transkriptionell bedingt sind und
- 3) die Expression ventrikulärer Myosinisoformen bei Vorhofflimmern einen integralen Teil eines ventrikulären Genexpressionsmusters im Vorhof darstellt.

Zielsetzung der Arbeit war deshalb eine umfassende funktionelle Charakterisierung der atrialen und ventrikulären Genexpression im nicht-insuffizienten humanen Myokard.

Zur Erfassung transkriptioneller Veränderungen bei Vorhofflimmern wurde ferner ein Vergleich der Genaktivität im Atrium bei chronischem Vorhofflimmern und Sinusrhythmus angestrebt. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob bei der Erkrankung eine Modulation der atrialen Genexpression erfolgte. Hierzu wurde ein Vergleich der atrialen Transkriptionsaktivität bei Vorhofflimmern mit dem ventrikulären Genexpressionsmuster durchgeführt.

Methodisch wurde die atriale Genexpression bei 20 Patienten mit Sinusrhythmus, zehn Patienten mit chronischem Vorhofflimmern und fünf linksventrikulären Gewebeproben von nicht-insuffizienten Spenderherzen mit Hilfe von Affymetrix U133A+B-Microarrays miteinander verglichen. Nach gemeinsamer Normalisierung der Arrays wurden regional unterschiedlich exprimierte Gene mittels des Welch's t-Tests identifiziert, mit Hilfe der False Discovery Rate (FDR) priorisiert und anschließend mit Hilfe von Gene Ontology funktionell klassifiziert. Mit Hilfe der semiquantitativen real-time RT-PCR konnten wesentliche Ergebnisse der Microarray-Daten validiert werden.

Mit Hilfe einer funktionellen Klassifizierung konnten als **Ergebnis** spezifische Expressionsmuster von Atrium und Ventrikel identifiziert und mit ultrastrukturellen und funktionellen Befunden korreliert werden. Transkripte des endoplasmatischen Retikulums, des Golgi-Apparates und sekretorischer Vesikel waren im Atrium überrepräsentiert, während mitochondriale Gene hauptsächlich im Ventrikel exprimiert waren ([Abb. 10a](#)). Überdies war das atriale Transkriptom vor allem durch die Expression von Genen gekennzeichnet, die für die Zell-Zell-Kommunikation, die Signalübertragung und eine endokrine Funktion von Bedeutung sind (online Tab. 5, „biologischer Prozess“, Ebenen 4 und 5; Barth et al., 2005b). Dagegen zeichnete sich das ventrikuläre Expressionsprogramm durch eine Überrepräsentation metabolischer Transkripte aus (online Tab. 5, „biologischer Prozess“, Ebenen 4 und 5; Barth et al., 2005b).

Bei der Untersuchung der atrialen Proben mit chronischem Vorhofflimmern wurde anhand eines hierarchischen Clustering festgestellt, dass diese zu den ventrikulären Proben aus nicht-insuffizientem Myokard und nicht - wie zu erwarten gewesen wäre - zu den atrialen Proben aus Herzen mit Sinusrhythmus clustern ([Abb. 12](#)). Es zeigte sich, dass Proben aus Herzen mit Vorhofflimmern generell eine Hochregulation ventrikulärer Transkripte und eine verminderte Expression atrialer Gene aufwiesen (online Tab. 3, Barth et al., 2005a). Mit Hilfe einer funktionellen Klassifikation aller bei Vorhofflimmern differentiell exprimierten Transkripte konnten Genexpressionsänderungen mit den bekannten Veränderungen der elektrophysiologischen, strukturellen und kontraktile Eigenschaften der atrialen Kardiomyozyten bei Vorhofflimmern korreliert werden und neue, pathophysiologisch relevante Gene dieses Remodelingprozesses identifiziert werden. Erstmals gelang zudem der Nachweis einer gesteigerten Expression metabolischer Gengruppen (online Tab. 4, „biologischer Prozess“, Ebenen 4 und 5; Barth et al., 2005a).

Diese Befunde lassen folgende **Schlussfolgerungen** zu:

Die grundlegenden ultrastrukturellen und funktionellen Unterschiede zwischen atrialen und ventrikulären Myozyten korrelieren mit der regionalen Transkriptionsaktivität. Atriale Kardiomyozyten weisen eine erhöhte Expression endokriner Gengruppen auf, die es ihnen ermöglicht, über neurohumorale Regelkreise Einfluss auf den Volumenhaushalt, Gefäßtonus und die Kontraktilität zu nehmen. Hingegen sind im Ventrikel überwiegend metabolische Gene exprimiert, so dass die für die Kontraktion notwendige Energie bereitgestellt werden kann. Die gute Übereinstimmung der Transkriptionsaktivität zwischen Atrium und Ventrikel im humanen Myokard mit Befunden an Mäuseherzen lässt auf ein in der Säugetierentwicklung konserviertes Genexpressionsmuster schließen ([Abb. 9a und 9b](#), Tabibiazar et al., 2003).

Bei Vorhofflimmern steht die vermehrte Expression ventrikulärer Gene, die überwiegend metabolismus-assoziierte funktionelle Gengruppen beinhalten, im Einklang mit einem stark erhöhten Energiebedarf. Dieser ist u.a. durch die gesteigerte Aktivität energieabhängiger Ionentransportprozesse, die zur Aufrechterhaltung der Homöostase erforderlich sind, sowie durch die bei Vorhofflimmern erhöhte Wandspannung, bedingt. Aufgrund des zehnfachen Anstiegs der Depolarisationsfrequenz kommt es zusätzlich zu Veränderungen im Kalziumhaushalt mit relativer Verkleinerung des einzelnen Kalziumtransienten. Vor dem Hintergrund, dass Kalzium neben seiner Rolle bei der elektromechanischen Kopplung auch ein wichtiger intrazellulärer *second messenger* ist, resultiert als mögliche Folge der veränderten Kalziumgradienten die Verminderung kalziumabhängiger Signaltransduktionskaskaden und transkriptioneller Prozesse.

Die vorliegende Untersuchung trägt wesentlich zu einem besseren Verständnis der molekularen Grundlagen von Genexpressionsunterschieden zwischen Atrium und Ventrikel in nicht-insuffizientem Myokard bei. Zusätzlich konnte bei chronischem Vorhofflimmern eine nachhaltige Veränderung der atrialen Genexpression mit Verschiebung hin zu einem ventrikulären Muster nachgewiesen werden. Ein detailliertes Wissen um die Unterschiede regionaler Genexpressionsmuster lässt für die Zukunft entscheidende Fortschritte in der Therapie von Herzrhythmusstörungen erwarten und ist für die Entwicklung selektiver pharmakologischer Therapieansätze unerlässlich.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Akar, J.G. et al. "Intracellular chloride accumulation and subcellular elemental distribution during atrial fibrillation." Circulation 107.13 (2003): 1810-15.
- 2) Akhurst, R.J. "TGF β signaling in health and disease." Nature Genetics 36.8 (2004): 790-92.
- 3) Allesie, M., Ausma J. und Schotten U. "Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation." Cardiovascular Research 54.2 (2002): 230-46.
- 4) Arai, H. et al. "Functional regulation of TEL by p38-induced phosphorylation." Biochem.Biophys.Res.Commun. 299.1 (2002): 116-25.
- 5) Ausma, J. et al. "Atrial high energy phosphate content and mitochondrial enzyme activity during chronic atrial fibrillation." Cardiovascular Research 47.4 (2000b): 788-96.
- 6) Ausma, J. et al. "Changes in ultrastructural calcium distribution in goat atria during atrial fibrillation." Journal of Molecular and Cellular Cardiology 32.3 (2000a): 355-64.
- 7) Ausma, J. et al. "Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat." Circulation 96.9 (1997): 3157-63.
- 8) Ausma, J. et al. "Time course of atrial fibrillation-induced cellular structural remodeling in atria of the goat." Journal of Molecular and Cellular Cardiology 33.12 (2001): 2083-94.
- 9) Barrans, J.D. et al. "Chromosomal distribution of the human cardiovascular transcriptome." Genomics 81 (2003): 519-24.
- 10) Barrett, J.C. and Kawasaki, E.S. "Microarrays: the use of oligonucleotides and cDNA for the analysis of gene expression." Drug Discov.Today 8.3 (2003): 134-41.
- 11) Barth, A.S. et al. "Functional profiling of human atrial and ventricular gene expression." Pflugers Arch. – Eur. J. Phys. 450 (2005b): 201-8.
- 12) Barth, A.S. et al. "Reprogramming of the human atrial transcriptome in permanent atrial fibrillation: expression of a ventricular-like genomic signature." Circ. Res. 13.96 (2005a): 1022-9.

- 13) Baumer, A.T. et al. "Gene expression of adrenomedullin in failing myocardium: comparison to atrial natriuretic peptide." Journal of Applied Physiology 92.3 (2002): 1058-63.
- 14) Berridge, M.J., Bootman, M.D. und Roderick, H.L. "Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling." Nature Reviews Molecular Cell Biology 4.7 (2003): 517-29.
- 15) Berridge, M.J., Lipp, P. und Bootman, M.D. "The versatility and universality of calcium signalling." Nat.Rev.Mol.Cell Biol. 1.1 (2000): 11-21.
- 16) Blackshear, J.L. und Safford, R.E. "AFFIRM and RACE trials: implications for the management of atrial fibrillation." Card Electrophysiol.Rev. 7.4 (2003): 366-69.
- 17) Boheler, K.R. et al. "Sex- and age-dependent human transcriptome variability: Implications for chronic heart failure." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100.5 (2003): 2754-59.
- 18) Bosch, R.F. et al. "Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation." Cardiovasc.Res. 44.1 (1999): 121-31.
- 19) Braunwald et al. "Harrison's Principles of Internal Medicine" McGrawHill (2001): 1295-1297.
- 20) Brazma, A. et al. "One-stop shop for microarray data." Nature 403.6771 (2000): 699-700.
- 21) Brundel, B.J. et al. "Endothelin system in human persistent and paroxysmal atrial fibrillation." J.Cardiovasc.Electrophysiol. 12.7 (2001): 737-42.
- 22) Brundel, B.J.J.M. et al. "Gene expression of proteins influencing the calcium homeostasis in patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation." Cardiovascular Research 42.2 (1999): 443-54.
- 23) Bruneau, B.G. et al. "Chamber-specific cardiac expression of Tbx5 and heart defects in Holt-Oram syndrome." Developmental Biology 211.1 (1999): 100-08.
- 24) Chomczynski, P. und Sacchi, N. "Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal.Biochem., 162, 156-159.
- 25) Dixon, J.E. und McKinnon, D. "Quantitative analysis of potassium channel mRNA expression in atrial and ventricular muscle of rats." Circ.Res. 75.2 (1994): 252-60.

- 26) Dixon, J.E. et al. "Role of the Kv4.3 K⁺ channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current." Circ.Res. 79.4 (1996): 659-68.
- 27) Dobrev, D. und Ravens, U. "Remodeling of cardiomyocyte ion channels in human atrial fibrillation." Basic Research in Cardiology 98.3 (2003): 137-48.
- 28) Elsasser, A. et al. "Human hibernating myocardium is jeopardized by apoptotic and autophagic cell death." J.Am.Coll.Cardiol. 43.12 (2004): 2191-99.
- 29) Fedak, P.W. et al. "TIMP-3 Deficiency Leads to Dilated Cardiomyopathy." Circulation 110 (2004): 2401-09.
- 30) Feng, J.L. et al. "Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K⁺ current in cultured adult human atrial myocytes." Circulation Research 80.4 (1997): 572-79.
- 31) Florea, A.M., Yamoah E.N. und Dopp, E. "Intracellular calcium disturbances induced by arsenic and its methylated derivatives in relation to genomic damage and apoptosis induction." Environ.Health Perspect. 113.6 (2005): 659-64.
- 32) Fodor, S.P. et al. "Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis." Science 251.4995 (1991): 767-73.
- 33) Fodor, S.P. et al. "Multiplexed biochemical assays with biological chips." Nature 364.6437 (1993): 555-56.
- 34) Franco, D., Lamers, W.H. und Moorman, A.F.M. "Patterns of expression in the developing myocardium: towards a morphologically integrated transcriptional model." Cardiovascular Research 38.1 (1998): 25-53.
- 35) Frick, H. et al. „Spezielle Anatomie II“ Thieme (1992): 37.
- 36) Garratt, A.N., Ozcelik, C. und Birchmeier, C. "ErbB2 pathways in heart and neural diseases." Trends in Cardiovascular Medicine 13.2 (2003): 80-86.
- 37) Hanna, N. et al. "Differences in atrial versus ventricular remodeling in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure." Cardiovasc.Res. 63.2 (2004): 236-44.
- 38) Herold et al. "Innere Medizin." Herold (2004): 236-238.

- 39) Higuchi, R. et al. "Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences." Biotechnology (N.Y.) 10.4 (1992): 413-17.
- 40) Holubarsch, C. et al. "Functional-Significance of Angiotensin Receptors in Human Myocardium - Significant Differences Between Atrial and Ventricular Myocardium." European Heart Journal 15 (1994): 88-91.
- 41) Jones, L. R. und Field, L.J. "Residues 2-25 of Phospholamban Are Insufficient to Inhibit Ca²⁺ Transport Atpase of Cardiac Sarcoplasmic-Reticulum." Journal of Biological Chemistry 268.16 (1993): 11486-88.
- 42) Kääb, S. et al. "Global gene expression in human myocardium-oligonucleotide microarray analysis of regional diversity and transcriptional regulation in heart failure." Journal of Molecular Medicine-Jmm 82.5 (2004): 308-16.
- 43) Karow, T. und Lang-Roth, R. "Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie." Karow/Lang (2004): 154-157.
- 44) Kirmanoglou, K., Hannekum, A. und Schafler, A.E. "Expression of mortalin in patients with chronic atrial fibrillation." Basic Res.Cardiol. 99.6 (2004): 404-08.
- 45) Kittleson, M.M. et al. "Gene expression analysis of ischemic and nonischemic cardiomyopathy: shared and distinct genes in the development of heart failure." Physiol Genomics 21.3 (2005): 299-307.
- 46) Klinke R. und Silbernagel S. „Lehrbuch de Physiologie“ Thieme (2001): 126-127.
- 47) Knaapen, M.W.M., Vrolijk, B.C.M. und Wenink, A.C.G.. "Ultrastructural changes of the myocardium in the embryonic rat heart." Anatomical Record 248.2 (1997): 233-41.
- 48) Kneller, J. et al. "Remodeling of Ca²⁺-handling by atrial tachycardia: evidence for a role in loss of rate-adaptation." Cardiovascular Research 54.2 (2002): 416-26.
- 49) Kubisch, C. et al. "Immediate-early gene induction by repetitive mechanical but not electrical activity in adult rat cardiomyocytes." FEBS 335.1 (1993): 37-40.
- 50) Kumagai, K. et al. "Expression of the von Willebrand factor in atrial endocardium is increased in atrial fibrillation depending on the extent of structural remodeling." Circulation Journal 68.4 (2004): 321-27.
- 51) Kumar, C. et al. "Expression of ventricular-type myosin light chain messenger-RNA in spontaneously hypertensive rat atria." Circulation Research 62.6 (1988): 1093-97.

- 52) Kurabayashi, M. et al. "Molecular cloning and characterization of human atrial and ventricular myosin alkali light chain cDNA clones." J.Biol.Chem. 263.27 (1988): 13930-36.
- 53) Lai, L.P. et al. "Functional genomic study on atrial fibrillation using cDNA microarray and two-dimensional protein electrophoresis techniques and identification of the myosin regulatory light chain isoform reprogramming in atrial fibrillation." Journal of Cardiovascular Electrophysiology 15.2 (2004): 214-23.
- 54) Langenickel, T. et al. "Differential regulation of cardiac ANP and BNP mRNA in different stages of experimental heart failure." Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol 278.5 (2000): H1500-H1506.
- 55) Lapidos, K.A., Kakkar, R. und McNally, E.M. "The dystrophin glycoprotein complex - Signaling strength and integrity for the sarcolemma." Circulation Research 94.8 (2004): 1023-31.
- 56) Lee, S.H. et al. "Effect of verapamil on long-term tachycardia-induced atrial electrical remodeling." Circulation 101.2 (2000): 200-06.
- 57) Legato, M.J. "Ultrastructure of the Atria, Ventricular, and Purkinje Cell, with Special Reference to the Genesis of Arrhythmias." Circulation 46 (1973): 178-89.
- 58) Lesage, F. und Lazdunski, M. "Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels." American Journal of Physiology-Renal Physiology 279.5 (2000): F793-F801.
- 59) Li, D. et al. "Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort." Circulation 100.1 (1999): 87-95.
- 60) Li, Y.Y. et al. "Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in the failing human heart." Circulation 98.17 (1998): 1728-34.
- 61) Lockhart, D.J. et al. "Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays." Nat.Biotechnol. 14.13 (1996): 1675-80.
- 62) Marshall, E. "Getting the noise out of gene arrays." Science 306.5696 (2004): 630-31.
- 63) McDonough, P.M. und Glembotski, C.C. "Induction of atrial natriuretic factor and myosin light chain-2 gene expression in cultured ventricular myocytes by electrical stimulation of contraction." Journal of Biological Chemistry 267.17 (1992): 11665-68.

- 64) McGall, G. et al. "Light-directed synthesis of high-density oligonucleotide arrays using semiconductor photoresists." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 93.24 (1996): 13555-60.
- 65) Minamisawa, S. et al. "Atrial chamber-specific expression of sarcolipin is regulated during development and hypertrophic remodeling." Journal of Biological Chemistry 278.11 (2003): 9570-75.
- 66) Mizuguchi, T. et al. "Heterozygous TGFBR2 mutations in Marfan syndrome." Nature Genetics 36.8 (2004): 855-60.
- 67) Morillo, C.A. et al. "Chronic rapid atrial pacing. Structural, functional, and electrophysiological characteristics of a new model of sustained atrial fibrillation." Circulation 91.5 (1995): 1588-95.
- 68) Mullies, K.B. and Faloona, F.A., "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol. (1987): 155:335-50.
- 69) Näbauer, M. und Kääh, S. "Potassium channel down-regulation in heart failure." Cardiovasc.Res. 37.2 (1998): 324-34.
- 70) Nakano, Y. et al. "Matrix metalloproteinase-9 contributes to human atrial remodeling during atrial fibrillation." Journal of the American College of Cardiology 43.5 (2004): 818-25.
- 71) Narolska, N.A. et al. "Myocardial contraction is 5-fold more economical in ventricular than in atrial human tissue." Cardiovasc.Res. 65.1 (2005): 221-29.
- 72) Netter et al. "Farbatlanten der Medizin-Herz." Georg Thieme Verlag Stuttgart (1976): 10+49.
- 73) Ohki-Kaneda, R. et al. "Cardiac function-related gene expression profiles in human atrial myocytes." Biochemical and Biophysical Research Communications 320.4 (2004): 1328-36.
- 74) Pesu, M. et al. "p38 Mitogen-activated protein kinase regulates interleukin-4-induced gene expression by stimulating STAT6-mediated transcription." J.Biol.Chem. 277.41 (2002): 38254-61.
- 75) Pfaffl, M. W., G. W. Horgan, and L. Dempfle. "Relative expression software tool (REST (c)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." Nucleic Acids Research 30.9 (2002).

- 76) Philip-Couderc, P. et al. "Cardiac transcriptome analysis in obesity-related hypertension." Hypertension 41.3 (2003): 414-21.
- 77) Phillips, H.M. et al. "Vangl2 acts via RhoA signaling to regulate polarized cell movements during development of the proximal outflow tract." Circ.Res. 96.3 (2005): 292-99.
- 78) Piper, H.M. und Isenberg, G. "Isolated Cardiac Myocytes." Ed. Piper HM and Isenberg G. Boca Raton, FL., USA: CRC Press, Inc., (1989).
- 79) Prasun, M.A. und Kocheril, A.G. "Treating atrial fibrillation: rhythm control or rate control." J.Cardiovasc.Nurs. 18.5 (2003): 369-73.
- 80) Razeghi P. et al. "Metabolic gene expression in fetal and failing human heart." Circulation 104.24 (2001): 2923-31
- 81) Romppanen, H. et al. "Adrenomedullin gene expression in the rat heart is stimulated by acute pressure overload: Blunted effect in experimental hypertension." Endocrinology 138.6 (1997): 2636-39.
- 82) Schotten, U. et al. "Cellular mechanisms of depressed atrial contractility in patients with chronic atrial fibrillation." Circulation 103.5 (2001): 691-98.
- 83) Sébillon, P. et al. "Expanding the phenotype of LMNA mutations in dilated cardiomyopathy and functional consequences of these mutations." Journal of Medical Genetics 40.8 (2003): 560-67.
- 84) Sharma, S. et al. "Regional heterogeneity in gene expression profiles: a transcript analysis in human and rat heart." Cardiology 100.2 (2003): 73-79.
- 85) Silbernagel, S. und Lang, F. "Taschenatlas der Pathophysiologie" Thieme (1998): 180-81.
- 86) Small, E.M. und Krieg, P.A. "Molecular regulation of cardiac chamber-specific gene expression." Trends in Cardiovascular Medicine 14.1 (2004): 13-18.
- 87) Steenman, M. et al. "Transcriptomal analysis of failing and nonfailing human hearts." Physiol Genomics 12.2 (2003): 97-112.
- 88) Storey, J.D. und Tibshirani, R. "Statistical significance for genomewide studies." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100.16 (2003): 9440-45.

- 89) Tabibiazar, R. et al. "Transcriptional profiling of the heart reveals chamber-specific gene expression patterns." Circulation Research 93.12 (2003): 1193-201.
- 90) Thijssen, V.L.J.L. et al. "Structural changes of atrial myocardium during chronic atrial fibrillation." Cardiovascular Pathology 9.1 (2000): 17-28.
- 91) Thijssen, V.L.J.L., Ausma, J. und Borgers, M. "Structural remodelling during chronic atrial fibrillation: act of programmed cell survival." Cardiovascular Research 52.1 (2001): 14-24.
- 92) Tuinenburg, A.E. et al. "Gene expression of the natriuretic peptide system in atrial tissue of patients with paroxysmal and persistent atrial fibrillation." Journal of Cardiovascular Electrophysiology 10.6 (1999): 827-35.
- 93) Wang, Z. et al. "Differential distribution of inward rectifier potassium channel transcripts in human atrium versus ventricle." Circulation 98.22 (1998): 2422-28.
- 94) Wankerl, M. et al. "Calcium sensitivity and myosin light chain pattern of atrial and ventricular skinned cardiac fibers from patients with various kinds of cardiac disease." Journal of Molecular and Cellular Cardiology 22.12 (1990): 1425-38.
- 95) Weiss, L. "Cell and Tissue Biology." Urban und Schwarzenberg (1988): 410.
- 96) White, C.W. et al. "The effects of atrial fibrillation on atrial pressure-volume and flow relationships." Circulation Research 51.2 (1982): 205-15.
- 97) Wijffels, M.C.E.F. et al. "Atrial fibrillation begets atrial fibrillation - a study in awake chronically instrumented goats." Circulation 92.7 (1995): 1954-68.
- 98) Wodicka, L. et al. "Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*." Nat.Biotechnol. 15.13 (1997): 1359-67.
- 99) Yue, L. et al. "Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation." Circ.Res. 81.4 (1997): 512-25.
- 100) Zhao, Z. und Rivkees, S.A. "Rho-associated kinases play a role in endocardial cell differentiation and migration." Dev.Biol. 275.1 (2004): 183-91.

Internetquellen (Stand 10/2007)

- <http://circres.ahajournals.org>
- <http://discover.nci.nih.gov>
- <http://genome.tugraz.at>
- <http://mousedevlopment.org>
- <http://www.affymetrix.com>
- <http://www.bioconductor.org>
- <http://www.fatigo.org>
- <http://www.geneontology.org>
- <http://www.genomatix.de>
- <http://www.mged.org>

DANK

Herrn Prof. Dr. med. Steinbeck, Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik I Großhadern der LMU, möchte ich Dank aussprechen für die Möglichkeit an seiner Klinik die Dissertation durchführen und die Ressourcen nutzen zu können.

Herrn PD Dr. med. M. Näbauer möchte ich Dank sagen für die Vergabe des Themas und die Ermöglichung der Arbeit, für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die fortwährende Unterstützung und Förderung der Arbeit.

Herrn Dr. med. A. Barth gilt mein Dank für die Möglichkeit zur Mitarbeit auf dem Gebiet der kardialen Molekularbiologie sowie die stetige Betreuung und Förderung. Seine umfassende und zielorientierte Hilfe hat es mir leicht gemacht, mich in das Gebiet einzuarbeiten. Immer hat er mir mit hilfreichen Ratschlägen und Hinweisen bis zum Abschluss der Arbeit zur Seite gestanden.

Herrn Prof. Dr. Reichart, Direktor der Herzchirurgischen Klinik im Klinikum Großhadern, danke ich für die Überlassung von Myokardproben.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Mansmann, Direktor des Instituts für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie, der LMU München, sowie Frau Dr. med. vet. S. Merk und Herrn PD Dr. med. M. Dugas danke ich für die freundliche Unterstützung und Anleitung bei der Analyse der Microarraydaten.

Herrn Dr. rer. nat. M. Gebauer und PD Dr. rer. nat. K. Steinmeyer von Sanofi-Aventis Deutschland GmbH möchte ich für die Hybridisierungen der Microarrays danken.

Bei Frau Heike Kartmann und Bianca Hildebrand bedanke ich mich herzlich für die Einweisung und die Hilfe beim Erlernen der Labortechniken.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Familienname	Arnoldi
Vorname	Elisabeth Marie
Anschrift	Schrämelstr. 4 D-81247 München
Geburtsdatum	10. Februar 1980
Geburtsort	München, Deutschland
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schul Ausbildung

1986 – 1990	Volksschule München
1990 – 1999	Karls gymnasium München (humanistisches Gymnasium, neusprachlicher Zweig)
Juni 1999	Abitur

Studium

Oktober 1999 – September 2001	1.- 4. vorklinisches Semester Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
August 2001	Ärztliche Vorprüfung
Oktober 2001 – September 2002	1.- 2. klinisches Semester Humanmedizin an der LMU München
August 2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 2002 – September 2004	(1) 3.- 6. klinisches Semester Humanmedizin an der LMU München (2) Famulaturen in Innerer Medizin-Kardiologie und Dermatologie
August/September 2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Mai 2003 bis Juli 2007	Dissertation im Bereich Molekularbiologie des humanen Myokards an der Medizinischen Klinik I des Klinikums Großhadern
April 2005 – August 2005	Erstes Tertial des Praktischen Jahres

in der Chirurgischen und Herzchirurgischen Klinik des
Klinikums Großhadern

August 2005 –
November 2005

Zweites Tertial des Praktischen Jahres
(1) Medizinische Klinik I des Klinikums Großhadern
(2) Kardiologische Abteilung in The Prince Charles
Hospital, Brisbane, Queensland, Australien

November 2005 – März 2006

Drittes Tertial des Praktischen Jahres in der Klinik für
Anaesthesiologie des Klinikums Großhadern

Mai 2006

Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Seit 01. Juli 2006

Assistenzärztin am Deutschen Herzzentrum München,
Kardiologie

Publikationen

Barth A.S., Merk S., Arnoldi E., Zwermann L., Kloos P., Gebauer M., Steinmeyer K., Bleich M., Kääh S., Pfeufer A., Überfuhr P., Dugas M., Steinbeck G., Näbauer M.
Functional profiling of human atrial and ventricular gene expression.
Pflügers Arch. 2005 Jul;450(4):201-8. Epub 2005 May 5.

Barth A.S., Merk S., Arnoldi E., Zwermann L., Kloos P., Gebauer M., Steinmeyer K., Bleich M., Kääh S., Hinterseer M., Kartmann H., Kreuzer E., Dugas M., Steinbeck G., Näbauer M.
Reprogramming of the human atrial transcriptome in permanent atrial fibrillation: expression of a ventricular-like genomic signature.
Circ Res. 2005 May 13;96(9):1022-9.

Abstracts für die 71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz-und Kreislaufforschung, 31. März – 2. April 2005, Mannheim:

Identifizierung myokardialer „Housekeeping“ Gene mit Hilfe von Microarrays.

A.S. Barth, E. Arnoldi, G. Goppel, S. Merk, P. Kloos, L. Zwermann, K. Steinmeyer, S.Kääh, M. Dugas, M. Näbauer
Z Kardiologie 94: Suppl 1 (2005) V1433

Interpendenz des strukturellen und kontraktiven Remodelings bei permanentem Vorhofflimmern.

A.S. Barth, E. Arnoldi, S. Merk, L. Zwermann, P. Kloss, S. Kääh, K. Steinmeyer, M. Bleich, M. Dugas, M. Näbauer
Z Kardiologie 94: Suppl 1 (2005) V1558

Permanentes Vorhofflimmern führt zu einem ventrikulären Genexpressionsprogramm und einer Repression atrialer transkriptioneller Aktivität.

A.S. Barth, E. Arnoldi, S. Merk, P. Kloos, L. Zwermann, S.Kääh, K. Steinmeyer, M. Bleich, M. Dugas, M. Näbauer
Z Kardiologie 94: Suppl 1 (2005) V71

Postersitzung für die 71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz-und Kreislaufforschung, 31. März – 2. April 2005, Mannheim:

Genomweite Genexpressionsanalyse regionaler Unterschiede des humanen Myokards: Funktionelle Charakterisierung des atrialen und ventrikulären Transkriptom.

E. Arnoldi, A.S. Barth, S. Merk, L. Zwermann, P. Kloos, S. Kääh, K. Steinmeyer, M. Bleich, M. Dugas, M. Näbauer
Z Kardiologie 94: Suppl 1 (2005) P1301