

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik

Tübingen

Abteilung Innere Medizin III

(Schwerpunkt : Kardiologie und Kreislauferkrankungen)

**Expression monozytärer Inflammations- und
Remodelingmarker auf Monozytensubtypen bei
Patienten mit Vorhofflimmern**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard Karls Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Fuß, Stefan

2019

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1.Berichterstatter: Professor Dr. P. Seizer

2.Berichterstatter: Professor Dr. R. Plentz

Tag der Disputation: 15.03.2019

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Vorhofflimmern | 1 |
| 1.2 Koronare Herzerkrankung..... | 5 |
| 1.3 Ätiologie der koronaren Herzerkrankung..... | 6 |
| 1.4 Rolle von Monozyten bei inflammatorischen Erkrankungen..... | 7 |
| 1.5 Matrix-Metalloproteinasen..... | 10 |
| 1.6 Matrix-Metalloproteinasen-9 (MMP-9) | 11 |
| 1.7 Rolle von MMP-9 bei Vorhofflimmern | 12 |
| 1.8 Der Receptor for Advanced Glycation End-Products | 14 |
| 2 FRAGESTELLUNG | 16 |
| 3 MATERIAL UND METHODEN | 17 |
| 3.1 Studienaufbau und Population..... | 17 |
| 3.2 Materialien..... | 19 |
| 3.2.1 Verbrauchsmaterialien | 19 |
| 3.2.2 Geräte..... | 19 |
| 3.2.3 Antikörper und Reagenzien | 19 |
| 3.3 Methoden..... | 21 |
| 3.3.1 Durchflusszytometrie | 21 |
| 3.3.2 Vollblutfärbung..... | 22 |
| 3.3.3 Auswertung der Durchflusszytometrie | 25 |
| 4 ERGEBNISSE | 29 |
| 4.1 Beschreibung der Patientenkollektive | 29 |
| 4.1.1 Stabile Angina pectoris und Vorhofflimmern | 29 |
| 4.1.2 Vorhofflimmern und andere supraventrikuläre Rhythmusstörungen (SVR) | 30 |
| 4.2 Expression des Rage-Rezeptors | 32 |
| 4.2.1 Der Rage-Rezeptor wird vorwiegend auf nicht-klassischen Monozyten (CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺) exprimiert..... | 32 |
| 4.2.2 Der Rage-Rezeptor weist bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung eine niedrigere monozytäre Expression auf als bei gesunden Probanden..... | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2.3 Der Rage-Rezeptor weist bei Patienten mit Vorhofflimmern eine niedrigere Expression auf klassischen und intermediären Monozyten auf als bei Patienten im Sinusrhythmus. | 35 |
| 4.2.4 Patienten mit Vorhofflimmern, die mittels Ablationsverfahren behandelt wurden und postinterventionell im Sinusrhythmus waren, weisen 24 Stunden später eine höhere Expression von Rage auf allen Monozyten-Subpopulationen auf. | 37 |
| 4.3 Expression der Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) | 40 |
| 4.3.1 Die drei Monozyten-Subpopulationen zeigen keine Unterschiede in der Expression von MMP-9 bei gesunden Probanden. | 40 |
| 4.3.2 MMP-9 weist bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung in allen drei Monozyten-Subtypen eine höhere Expression auf als bei gesunden Probanden. | 41 |
| 4.3.3 Patienten mit Vorhofflimmern exprimieren in intermediären und nicht-klassischen Monozyten mehr MMP-9 als Patienten mit koronarer Herzerkrankung. | 43 |
| 4.3.4 Patienten mit Vorhofflimmern weisen in klassischen und intermediären Monozyten eine höhere zelluläre Expression von MMP-9 auf als Probanden im Sinusrhythmus. | 44 |
| 4.3.5 Patienten mit Vorhofflimmern, die mittels Ablationsverfahren behandelt wurden und postinterventionell im Sinusrhythmus waren, weisen 24 Stunden später eine niedrigere Expression von MMP-9 in allen Monozyten-Subtypen auf. | 46 |
| 4.4 Verteilungsmuster der Monozyten-Subpopulationen | 49 |
| 4.4.1 Die quantitative Verteilung der Subtypen unterscheidet sich signifikant zwischen gesunden Probanden und Patienten mit koronarer Herzerkrankung. | 49 |
| 4.4.2 Patienten mit Vorhofflimmern weisen signifikant weniger nicht-klassische Monozyten auf als Patienten mit anderen supraventrikulären Rhythmusstörungen. | 50 |
| 5. DISKUSSION..... | 51 |
| 5.1 Die Rolle der Matrix-Metalloproteinase - 9 (MMP-9) bei Vorhofflimmern | 51 |
| 5.2 Monozytensubtypen als Quelle von MMP-9 bei Patienten mit Vorhofflimmern | 52 |
| 5.2.1 Regulation der monozytären Expression der MMP-9 | 52 |
| 5.2.2 Patienten mit Vorhofflimmern exprimieren verstärkt MMP-9 in Monozyten-Subtypen..... | 52 |
| 5.3 Die Rolle der MMP-9 bei koronarer Herzkrankheit..... | 54 |
| 5.4 Patienten mit Vorhofflimmern weisen eine höhere Expression der MMP-9 in intermediären und nicht-klassischen Monozyten auf als Patienten mit koronarer Herzkrankheit | 55 |
| 5.5 Die monozytäre Rage Expression bei Vorhofflimmern und koronarer Herzerkrankung | 57 |
| 5.5.1 Die Bedeutung des Rage Rezeptors bei Vorhofflimmern..... | 57 |
| 5.5.2 Rage wird vor allem auf nicht-klassischen Monozyten exprimiert..... | 58 |
| 5.5.3 Der Rage Rezeptor zeigt bei Patienten mit Vorhofflimmern eine geringere Expression auf klassischen und intermediären Monozyten als bei Patienten im Sinusrhythmus | 59 |

| | |
|--|-----------|
| 5.5.4 Der Rage-Rezeptor zeigt bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung eine geringere Expression auf intermediären und nicht-klassischen Monozyten als bei gesunden Probanden... | 60 |
| 5.6 Unterschiede in der quantitativen Monozyten-Verteilung..... | 61 |
| 6. ZUSAMMENFASSUNG | 63 |
| 7. LITERATURVERZEICHNIS..... | 65 |
| 8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 72 |
| 9. TABELLENVERZEICHNIS | 74 |
| 10.ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL DER DISSERTATIONSSCHRIFT..... | 75 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|---|
| ACS | Acute coronary syndrome |
| AGE | Advanced glycation endproduct |
| ApoE | Apolipoprotein E |
| AP | Angina pectoris |
| APC | Allophycocyanin |
| | |
| cRage | Cleaved Rage |
| CD | Cluster of differentiation |
| CPDA | Citrate phosphate dextrose adenine |
| | |
| EKG | Elektrokardiogramm |
| EPU | Elektrophysiologische Untersuchung |
| esRage | Endogenous secretory Rage |
| | |
| FSC | Forward Scatter |
| FITC | Fluorescein-Isothiocyanat |
| | |
| IL | Interleukin |
| | |
| KHK | Koronare Herzerkrankung |
| | |
| LA | Left atrium |
| LDL | Low density lipoprotein |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| | |
| MFI | Mean fluorescence intensity |
| MMP-9 | Matrix-Metalloproteinase-9 |
| | |
| PBS | Phosphate-buffered saline |
| PE | Phycoerythrin |
| | |
| Rage | Receptor for advanced glycation endproducts |
| | |
| SEM | Standard error of the mean |
| sRage | Soluble Rage |
| SSC | Side Scatter |
| SVR | Supraventrikuläre Rhythmusstörung |
| | |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| | |
| VHF | Vorhofflimmern |

1 Einleitung

1.1 Vorhofflimmern

Vorhofflimmern (VHF) ist die häufigste anhaltende Herzrhythmusstörung mit einer deutlich altersabhängigen Prävalenz von ca. 1-2 %. Bei Personen unter 40 Jahren liegt die Prävalenz bei unter 0,5 %, bei den über 80 Jährigen bereits bei 15 %. Mit zunehmender Alterung der Bevölkerung wird deshalb eine Zunahme dieses Krankheitsbildes um den Faktor 2,5 in den nächsten 50 Jahren erwartet. Mit steigender Inzidenz, Prävalenz und Vorhofflimmern assoziierter Mortalität, erhöht sich die Notwendigkeit wissenschaftlicher Forschung auf diesem Gebiet.[1]

Vorhofflimmern kann primär ohne zugrunde liegende Grunderkrankung auftreten („lone atrial fibrillation“), häufiger ist es allerdings mit kardialen wie auch extrakardialen Krankheiten vergesellschaftet. Eine Herzinsuffizienz ist bei ca. 50 % der Patienten diagnostizierbar und erhöht das Risiko für Vorhofflimmern um das 4,5 bis 6-fache. Ungefähr 25 % der Betroffenen haben eine koronare Herzerkrankung, genauso viele leiden an Hypertonie, ca. 20 % haben einen Herzklappenfehler. Häufige extrakardiale Ursachen sind Hyperthyreose, arterielle Hypertonie und medikamentös-toxische Einflüsse.[2]

Vorhofflimmern führt zu verschiedenen klinischen Ereignissen, die für den betroffenen Patienten gravierende Folgen haben: Die Todesraten sind verdoppelt, das Schlaganfallrisiko ist erhöht (Vorhofflimmern ist mit besonders schweren Schlaganfällen assoziiert), die Belastbarkeit und damit Lebensqualität kann massiv eingeschränkt sein, die reduzierte linksventrikuläre Funktion kann bis zur Herzinsuffizienz führen.

Um die Diagnose Vorhofflimmern stellen zu können, müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

Im Oberflächen-Elektrokardiogramm sind die RR-Intervalle irregulär, das heißt sie folgen keinem sich wiederholenden Muster („absolute Arrhythmie“), P-Wellen sind nicht eindeutig abgrenzbar und die Vorhofzykluslänge ist (falls abgrenzbar) variabel und kleiner als 200ms.

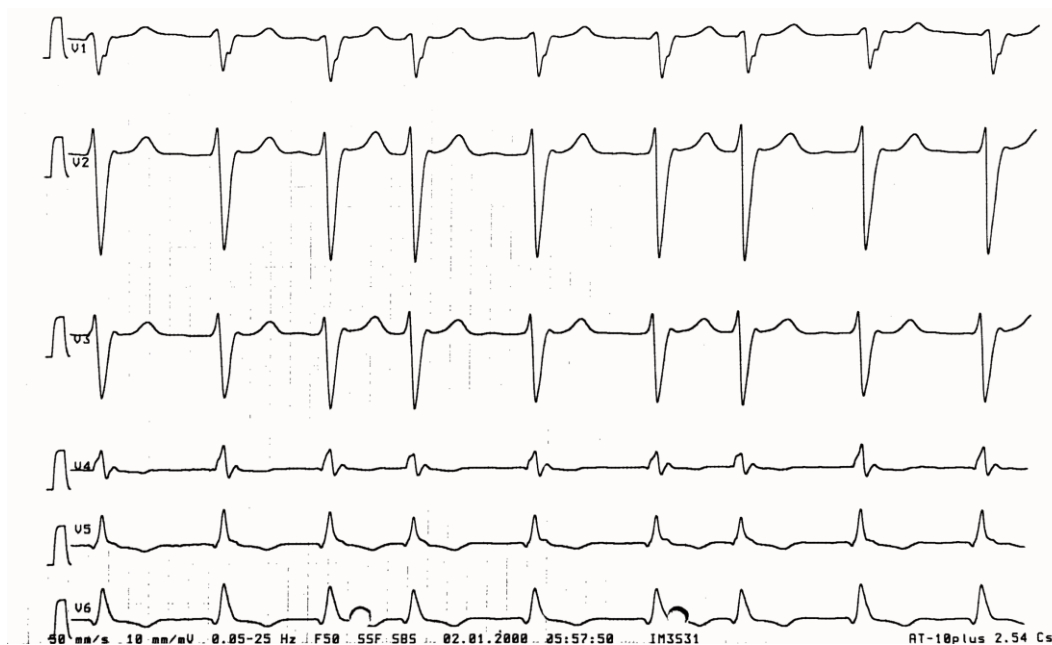
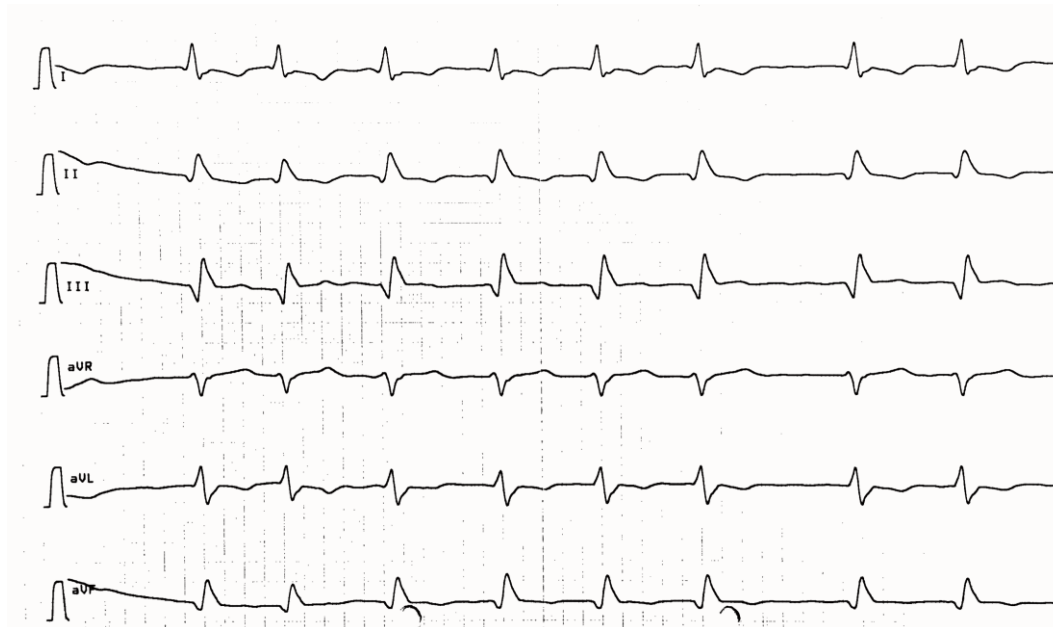


Abbildung 1
Typisches 12-Kanal EKG einer absoluten Arrhythmie bei
Vorhofflimmern
Die RR-Abstände sind irregulär, P Wellen sind nicht abgrenzbar

Die Erkrankung lässt sich in verschiedene Typen einteilen:

Als erstmalig diagnostiziertes Vorhofflimmern wird die Rhythmusstörung bezeichnet, falls die Diagnose noch nie zuvor gestellt wurde.

Paroxysmales, also anfallsartiges Vorhofflimmern, konvertiert häufig innerhalb von 48 Stunden, spätestens jedoch nach sieben Tagen, spontan in den Sinusrhythmus. Falls innerhalb von sieben Tagen eine Kardioversion erfolgt, wird das Vorhofflimmern ebenfalls als paroxysmal bezeichnet.

Persistierend ist das Vorhofflimmern dann, wenn die Rhythmusstörung länger als sieben Tage andauert oder nach mindestens sieben Tagen durch den Arzt beendet wird (medikamentös oder durch Elektrokardioversion).

Von lang anhaltendem Vorhofflimmern spricht man, wenn der Zustand länger als ein Jahr anhält.

Permanentes Vorhofflimmern beschreibt die Situation, dass der Patient und sein behandelnder Arzt die Rhythmusstörung akzeptieren und keine weiteren Versuche einer Rhythmuskontrolle erfolgen.[3]

Zwei Therapiestrategien, welche prognostisch gleichwertig sind, lassen sich unterscheiden: Die medikamentöse Normalisierung der Kammerfrequenz und die Überführung in den Sinusrhythmus, welche medikamentös oder durch EKG-getriggerte Elektrokardioversion durchgeführt werden kann.

Da Vorhofflimmern die häufigste Ursache von Schlaganfällen ist, muss zusätzlich je nach individuellem Schlaganfallrisiko eine Antikoagulation erfolgen. Zur Abschätzung des Risikos dient zum Beispiel der CHA₂-DS₂-VASc-Score. [4][5]

Eine kurative Behandlungsoption stellen bei ausgewählten Fällen von Vorhofflimmern Katheterablationsverfahren dar, also die komplette Isolation der Pulmonalvenen und eventuelle zusätzliche Substratmodifikation. Diese Methoden haben sich in den letzten Jahren zunehmend klinisch etabliert. Dabei macht man sich den Umstand zunutze, dass ektopie Potenziale in den Pulmonalvenen oder deren Ostien eine wichtige Ursache von Vorhofflimmern

sind und diese durch Radiofrequenz- oder Kälteanwendung isoliert und damit unschädlich gemacht werden können.[6]

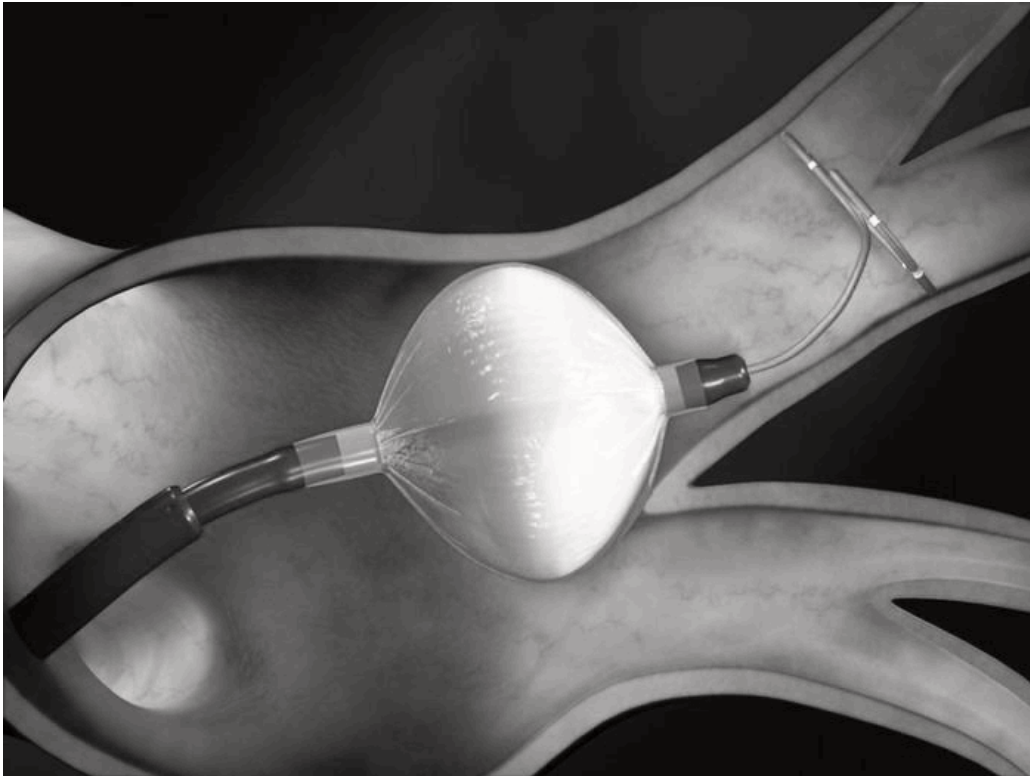


Abbildung 2

Schema einer Pulmonalvenenisolation mit Kryoballon

Dargestellt ist die Isolation einer Pulmonalvene mittels Kryoballon. Der Katheter wurde über die Vena cava inferior in den rechten Vorhof eingeführt. Von dort wird das Vorhofseptum punktiert um in den linken Vorhof, in den die vier Pulmonalvenen münden, zu gelangen. Der Kryoballon verschließt die Pulmonalvene komplett. Über ein vom Arzt zugeführtes Kühlmittel in den Ballon wird dem Herzgewebe Wärme entzogen und es entsteht eine Läsion an den Kontaktstellen. Die Pulmonalvene ist damit vom linken Vorhof elektrisch isoliert und ektope Potenziale aus der betroffenen Pulmonalvene werden nicht mehr in den Vorhof übergeleitet.

(Quelle: Mit Genehmigung von Medtronic GmbH, Meerbusch/Deutschland)

1.2 Koronare Herzerkrankung

Kardiovaskuläre Erkrankungen und hierbei vor allem die koronare Herzerkrankung (KHK), stellen aktuell die häufigste Todesursache in den Industrieländern dar.

In Deutschland wurden im Jahr 2011 40,2 % aller Todesfälle auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückgeführt.[7] Darin enthalten sind 70.557 Fälle, bei denen eine chronisch ischämische Herzerkrankung für das Versterben verantwortlich war.[8]

Die koronare Herzerkrankung ist definiert als die Manifestation der Atherosklerose an den Herzkranzarterien. Zu den anerkannten Risikofaktoren zählen arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Adipositas, Dyslipidämie und Nikotinabusus.[9, 10] Die durch die Atherosklerose bedingten Stenosen der Arterien führen zu einer Koronarinsuffizienz und damit zu einer Ischämie des Myokards. Dadurch erklärt sich das Leitsymptom Angina pectoris (AP), welche sich als retrosternaler Schmerz, der durch physische wie psychische Ursachen ausgelöst werden kann, präsentiert.

Bei dem untersuchten Patientenkollektiv dieser Studie wurde jeweils eine KHK mit der Symptomatik einer stabilen AP diagnostiziert. Stabil ist die AP dann, wenn die Beschwerden regelmäßig durch bestimmte Belastungen auftreten und nach Beendigung der Belastung wieder verschwinden oder aber auf Nitratgabe eine rasche Besserung zeigen.

Abzugrenzen von der stabilen AP als Leitsymptom der chronischen KHK ist das Akute Koronarsyndrom (ACS). Das ACS vereint die potentiell lebensbedrohlichen Verlaufsformen der KHK in sich: Instabile Angina pectoris, ST-Strecken-Hebungsinfarkt (STEMI) und Nicht-ST-Strecken-Hebungsinfarkt (NSTEMI). Patienten mit diesen Krankheitsbildern wurden von der Studie ausgeschlossen.

1.3 Ätiologie der koronaren Herzerkrankung

Die Atherosklerose ist eine chronisch-progressive inflammatorische Erkrankung der Blutgefäße und damit Hauptverursacher kardiovaskulärer Erkrankungen.

Die Zellen des Immunsystems und insbesondere die Monozyten, welche eine wichtige Quelle von Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) darstellen, tragen einen erheblichen Teil zur Entstehung der atherosklerotischen Plaques bei. So werden sie für die Progression atherosklerotischer Umbauprozesse und die Vulnerabilität von Koronarplaques verantwortlich gemacht. [11, 12]

Am gesunden Endothel können Leukozyten im Normalfall nicht binden und damit auch nicht in die Gefäßwand eindringen. Mit der beginnenden Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen am Endothel wird durch verschiedene proinflammatorische Mechanismen eine Anheftung und Diapedese, also die Einwanderung von Leukozyten in die Intima möglich. Unter anderem werden verstärkt Adhäsionsmoleküle, also Selektine und Integrine vom Endothel exprimiert.[13] Das Adhäsionsmolekül V-CAM-1 („vascular cell adhesion molecule“), wird nur unter dem Einfluss von bestimmten Zytokinen in der Gefäßwand exprimiert und bindet Monozyten und Lymphozyten.[14]

In der Intima der Gefäßwand differenzieren die Monozyten zu Makrophagen aus, unterhalten dort die Entzündungsreaktion und stellen eine wichtige Quelle von MMP-9 dar. Über Scavenger-Rezeptoren sind sie in der Lage oxidiertes LDL, welches sich in der Zellwand akkumuliert, aufzunehmen und sich dadurch in die für frühe atherosklerotische Läsionen typischen Schaumzellen umzuwandeln.[15, 16] Die vorherige Akkumulation von LDL in der subendothelialen Matrix wird begünstigt durch eine Dysfunktion des Endothels, welche durch die klassischen Risikofaktoren der Atherosklerose bedingt ist.[17] Die lipidbeladenen Makrophagen bewirken in der Folge über die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und pro-inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-18 und Interleukin-1 β zum einen die Einwanderung von T-Lymphozyten und zum anderen die Einwanderung von glatten Muskelzellen aus der Media in die Intima der Gefäßwand.[18-20]

Die eingewanderten Muskelzellen setzen in diesem inflammatorischen Milieu extrazelluläre Matrix frei, welche eine fibröse Kappe bildet. Diese schützt die zirkulierenden Thrombozyten im Gefäßlumen vor Kontakt mit den potentiell thrombogenen Substanzen in der nekrotischen Kernregion des Plaque. Diese besteht vor allem aus den Überresten von toten Schaumzellen, extrazellulären Lipiden, Kalk und neigt zur Größenprogredienz.[21, 22]

Diese Plaques können zunächst über einen langen Zeitraum asymptomatisch bleiben. Kommt es jedoch zur Plaqueruptur können sich daraus schwerwiegende klinische Folgen ergeben. Die Matrix-Metalloproteinase-9, welche in der Lage ist extrazelluläre Matrix abzubauen und damit das Wachstum von Plaques hemmen sollte, kann falls ihre Aktivität lokal dysreguliert ist, zur Plaqueinstabilität führen.[23] Reißt ein solcher Plaque auf, kommt es zu Kontakt von subendothelialen thrombogenen Substanzen mit dem Gefäßlumen und damit den Blutzellen. Folge ist die Aktivierung der Gerinnungskaskade und ein potentieller Gefäßverschluss durch Bildung eines Thrombus.[24]

Es gilt als erwiesen, dass eine dysregulierte oder verstärkte Funktion von MMP-9 die Entwicklung von Atherosklerose an den Herzkranzgefäßen und deren Komplikationen mitbedingt und die Progression der Erkrankung und die damit verbundenen Umbauprozesse unterstützt. Zugleich sind sie jedoch auch über ihre Extrazellulärmatrix abbauende Aktivität an Reparationsmechanismen beteiligt.[25, 26]

1.4 Die Rolle von Monozyten bei inflammatorischen Erkrankungen wie Atherosklerose und KHK

Monozyten spielen eine gewichtige Rolle bei vielen entzündlichen Erkrankungen. Sie entstammen der myeloischen Zellreihe im Knochenmark und bilden durch ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation ein wichtiges Bindeglied zwischen unspezifischer und adaptiver Immunabwehr. Sie sind in der Lage sich

nach 1-3 tägiger Zirkulation im Blutkreislauf in Makrophagen oder dendritische Zellen zu differenzieren.[27-29]

Mittels CD14 und CD16 spezifischer Antikörper können Monozyten in der Durchflusszytometrie identifiziert und anhand unterschiedlich stark ausgeprägter Expression dieser Oberflächenmarker in verschiedene Subtypen eingeteilt werden.[30, 31]

Es werden klassische ($CD14^{++}CD16^{-}$), intermediäre ($CD14^{++}CD16^{+}$) und nicht-klassische ($CD14^{+}CD16^{++}$) Monozyten unterschieden. Man nimmt an, dass eine Entwicklung der klassischen Monozyten, über die intermediären, zu den nicht-klassischen Monozyten möglich ist.[30, 32, 33]

Es existieren Hypothesen, dass zum einen diese verschiedenen Subtypen spezifische Aufgaben im Immunsystem wahrnehmen, zum anderen aber auch spezifische Einflüsse auf bestimmte Erkrankungen ausüben.

Klassische Monozyten ($CD14^{++}CD16^{-}$), deren Hauptfunktion die Phagozytose darstellt, stellen anteilmäßig die größte Subpopulation dar. Ihre Peroxidaseaktivität ist hoch, die TNF- α Synthese bei Lipopolysaccharid-Applikation (LPS) nur gering. Sie sind in der Lage viel Interleukin-10 zu synthetisieren, ein die Abwehrvorgänge hemmendes und begrenzendes Zytokin. Sie sind involviert in Angiogenese, Wundheilung und Blutgerinnung.
[34]

Nicht-klassische Monozyten sind gut charakterisiert und gelten durch ihre ausgeprägte TNF- α Produktion und dabei fast fehlende IL-10 Produktion als stark proinflammatorisch.[35]

Intermediäre Monozyten, welche erst 2010 durch das Nomenklatur-Komitee der Internationale Vereinigung immunologischer Wissenschaften als dritte Subpopulation ergänzt wurden, weisen eine geringere Peroxidaseaktivität auf. Sie sind jedoch in der Lage durch Stimulation mit LPS große Mengen TNF- α und IL-1 β zu synthetisieren.[34]

Es gibt Hinweise darauf, dass den intermediären Monozyten ein hoher Stellenwert bei der Entstehung der Atherosklerose zukommt.[36] Dies beruht auf einer selektiven Expression von CCR5, einem proinflammatorischen Chemokinrezeptor, welcher mit Atherosklerose assoziiert ist.[37, 38]

1.5 Matrix-Metalloproteinasen

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind eine Gruppe von 28 Peptidasen (MMP-1 bis MMP-28), also Enzymen welche in der Lage sind Peptidbindungen zu spalten. Sie sind Zink-abhängig, können durch Calcium aktiviert werden und werden als inaktive Vorstufen (Zymogene) synthetisiert.[39]

Jedes Molekül besteht aus einem Pro-Peptid am N-Terminus, welches im Rahmen der Aktivierung abgespalten wird, einer Zink bindenden katalytischen Domäne, einer Gelenkregion und einem Hämopexin-ähnlichem (ein Serumprotein) C-Terminus. Diese Hämopexin-ähnliche Domäne ist für die substratspezifische Wirkung des Enzyms von großer Bedeutung.

Inaktiviert werden Matrix-Metalloproteinasen über eine Gruppe von vier Proteaseinhibitoren („Tissue Inhibitor of Metallo-Proteinasen“, TIMP 1-4). Diese sind in der Lage MMPs zu binden und damit zu inaktiveren. Eine gestörte Balance zwischen MMPs und TIMPs scheint von großer Bedeutung für die Entwicklung pathologischer Zustände zu sein.[40, 41]

Den MMPs ist gemeinsam, dass sie Proteine der extrazellulären Matrix abbauen können. Aus diesem Grund können sie nach ihrem jeweiligen Substrat eingeteilt werden:

Kollagenasen (z.B. MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18) sind in der Lage Kollagen, welches sich hauptsächlich im Knochen, in Dentin und im Knorpel befindet, zu spalten.

Stromelysine (MMP-3, MMP-10, MMP-11) können beinahe alle Bestandteile der extrazellulären Matrix abbauen, nicht aber Kollagene.

Gelatinasen (MMP-2, MMP-9) spalten Typ-4 Kollagene und Gelatine (die denaturierte Form von Kollagen).[42]

Zusätzlich lässt sich eine Unterscheidung bezüglich der zellulären Lokalisation treffen:

Sie werden entweder aus der Zelle sekretiert oder sind membrangebunden („Membran type MMP“, z.B. MMP-14).[40]

MMPs spielen vielfältige Rollen bei physiologischen wie pathologischen Prozessen, insbesondere bei damit assoziierten Umbauvorgängen der extrazellulären Matrix.

Sie sind beispielsweise essentiell für die regelrechte Embryonalentwicklung, Angiogenese, Nervenwachstum, Apoptose, Wundheilung und vielfältige „Remodeling“-Prozesse.

Jedoch sind sie auch an pathologischen Prozessen wie Tumorwachstum, Metastasierung, Arthritis, Ulzerationen, Leberzirrhose, Emphysemen und nicht zuletzt an kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt. Eine Vielzahl von MMPs ist im gesunden Normalgewebe nur minimal oder gar nicht vorhanden. Dagegen lässt sich in Gewebe, welches sich im Umbau befindet, entzündet oder anderweitig krank ist häufig eine gesteigerte MMP-Aktivität nachweisen. Allerdings wurde in den letzten Jahren deutlich, dass die Funktionen der MMPs viel weitreichender sind als zunächst gedacht und sie neben ihrer Funktion als Extrazellulärmatrix abbauende Enzyme auch als essentielle Regulatoren von Zellsignalen betrachtet werden müssen. So sind sie zum Beispiel an der Prozessierung von Zytokinen beteiligt und modulieren so deren Funktion. Außerdem gelten Wachstumsfaktoren, Zelladhäsionsmoleküle, Bestandteile des Komplementsystems und andere Proteasen als potentielle Substrate. Sie sind somit wichtige Mediatoren von entzündlichen Prozessen.[40, 43, 44]

1.6 Matrix-Metalloproteinase-9

MMP-9 ist wie MMP-2 eine Gelatinase und wird als Prä-Proenzym in inaktiver Form synthetisiert. Es besteht aus 707 Aminosäuren, einschließlich einem 19 Aminosäuren langem Signalpeptid. MMP-9 hat als Pro-Enzym eine Molekülmasse von 92 kDa und besteht wie alle MMPs aus fünf Domänen. Die Propeptid-Domäne sorgt über den Mechanismus des „Cystein-Switch“ zu einer Blockade der katalytischen Domäne.[45]

Die Aktivierung läuft über eine Kaskade zweier beteiligter Proteasen: Plasmin aktiviert zunächst das Zymogen von MMP-3 zur aktiven Form. Das aktive MMP-3 schneidet schließlich das Propeptid vom Pro-MMP-9 ab und erzeugt damit die 82 kDa schwere aktive Form von MMP-9.[46]

MMP-9 ist nachweislich mit kardiovaskulären Erkrankungen wie u.a. Atherosklerose, koronarer Herzerkrankung, dilatativer Kardiomyopathie, Vorhofflimmern und Myokardinfarkt assoziiert.

Es wurde gezeigt, dass es eine wichtige Rolle bei durch Myokardischämie und anschließende Reperfusion induzierte Remodeling-Vorgängen des Myokards, spielt. So konnte unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass EMMPRIN („extracellular matrix metalloproteinase inducer“), also ein wichtiger Regulator von MMP-9, bei akutem Myokardinfarkt auf Monozyten signifikant hochreguliert wird und dessen Outcome beeinflusst.[47-49]

Somit ist MMP-9 ein potentielles Ziel einer möglichen Therapie, den akuten Myokardschaden zu begrenzen.[25, 50, 51]

MMP-9 ist in der aortalen Gefäßwand bei Bauchortenaneurysmata nachweisbar. Die Progression des Aneurysmas kann mittels Doxycyclin, einem unspezifischen Inhibitor von MMPs, im Tiermodell verzögert werden.[52-54]

Außerdem ist es im Serum und in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis erhöht und könnte deshalb einen möglichen Serum-Marker für diese Erkrankung darstellen.[55]

Eine zentrale Rolle spielt MMP-9 bei Tumorerkrankungen. Eine Vielzahl von malignen Erkrankungen geht mit erhöhter MMP-9 Expression einher. Verstärkte Expression von MMP-9 begünstigt Migration und Invasion von Tumorzellen und damit die Tumorprogression. In vitro konnten Migration und Invasion von Tumorzellen mittels Inhibitoren von Matrix-Metalloproteinasen verhindert werden.[56, 57]

1.7 Rolle von MMP-9 bei Vorhofflimmern

Umbauprozesse des Myokards im Bereich der Vorhöfe („atriaales Remodeling“) scheinen eine wichtige Voraussetzung von Vorhofflimmern und dessen Übergang in eine persistierende Rhythmusstörung zu sein.[58]

Diese Umbauprozesse lassen sich in drei Abschnitte einteilen:

Zunächst kommt es durch eine Episode von Vorhofflimmern innerhalb weniger Tage zum elektrischen Remodeling, welches sich in einer Verkürzung der Refraktärperiode des Atriums zeigt.[59] Es folgt, über einen längeren Zeitraum von Wochen bis Monaten, eine Abnahme der Kontraktilität der Vorhöfe (kontraktiler Remodeling) und schließlich ein strukturelles Remodeling, welches sich unter anderem in Form vermehrter Fibrose zeigt. Diese Umbauprozesse scheinen die Neigung zur Persistenz zu begünstigen. Das Vorhofflimmern unterhält sich somit selbst.[60, 61]

In der Literatur ist der Zusammenhang zwischen MMP-9 und Vorhofflimmern mehrfach vorbeschrieben.

So konnten Nakano et al. zeigen, dass sich in Gewebeproben des Myokards bei Patienten mit Vorhofflimmern signifikant mehr MMP-9 nachweisen lässt als in Proben von Probanden mit Sinusrhythmus.[58]

Zudem scheint eine erhöhte Expression von MMP-9 aufgrund von Genpolymorphismen ein Risikofaktor für die Rhythmusstörung zu sein.[62]

Eine weitere Studie zeigte, dass die MMP-9 Konzentrationen im peripheren Blut von Patienten mit Vorhofflimmern signifikant höher sind als die von gesunden Probanden. Außerdem scheint der MMP-9 Level abhängig vom Stadium der Erkrankung zu sein. So ist die Konzentration bei paroxysmalen VHF am niedrigsten und bei persistierenden und permanentem VHF jeweils signifikant erhöht.[63]

Desweiteren wurde beschrieben, dass eine elektrische Kardioversion die Serumlevel von MMP-9 verändert. Lewkowicz et al. konnten zeigen, dass die Werte nach einer Elektrokardioversion signifikant ansteigen.[64]

Da MMP-9 im Verdacht steht das strukturelle Remodeling und die atriale Dilatation bei Vorhofflimmern zu begünstigen, scheint das Enzym eine entscheidende Rolle für die Entstehung, Progression und Selbsterhaltung der Erkrankung zu spielen.

1.8 Der Receptor for Advanced Glycation End-Products

Der Receptor for Advanced Glycation End-Products (Rage) wurde 1992 erstmals beschrieben und seitdem in einer Vielzahl von Studien mit inflammatorischen Pathologien in Zusammenhang gebracht.[65] Assoziierte Erkrankungen sind u.a. Diabetes mellitus, Atherosklerose, koronare Herzerkrankung und Morbus Alzheimer. Es handelt sich um einen ubiquitär vorkommenden Rezeptor, der auf Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen, Kardiomyozyten, Lymphozyten und Monozyten exprimiert wird. Namensgebend ist seine Funktion als Rezeptor für „Advanced Glycation End-Products“ (AGE), welche u.a. die Liganden von Rage darstellen.[66]

Rage ist ein transmembranständiger Rezeptor der Immunglobulin-Superfamilie mit einer Molekülmasse von 35 kDa und besteht aus drei Domänen:

Die extrazelluläre Domäne dient der Bindung der Liganden, eine lipophile Domäne verankert den Rezeptor in der Zellmembran und eine zytosolische Domäne vermittelt die intrazelluläre Signalkaskade.

AGEs, die Liganden von Rage, sind Proteine und Lipide welche nach Kontakt mit Aldosen (zum Beispiel Glucose) nicht-enzymatisch glykiert wurden. Dieser Prozess ist bereits seit dem frühen 20. Jahrhundert als Maillard-Reaktion bekannt. AGEs entstehen gehäuft unter hyperglykämischen Bedingungen sowie auch als Teil des Alterungsprozesses des Individuums.

Neben AGEs sind mittlerweile auch andere Liganden beschrieben: Hierbei sind unter anderem Protein S100 [67], High Mobility Group Box 1 (HMGB1)[68] und Amyloid [69] zu nennen.

Die Bindung von AGEs an Rage führt zur intrazellulären Anhäufung freier Radikale und damit zu oxidativen Stress. Folge ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und der Expression damit assoziierter Gene (z.B. Interleukin-1 α , Interleukin-6, TNF- α). Die AGE-Rage Interaktion kann somit Einfluss auf inflammatorische Prozesse nehmen. [70]

Bemerkenswerterweise zeigen RAGE Knockout-Mäuse (RAGE^{-/-}, ApoE^{-/-}) deutlich verminderte atherosklerotische Läsionen im Vergleich zu reinen ApoE^{-/-} Mäusen. [71]

Bei Patienten mit KHK zeigen sich in mononuklearen Zellen signifikant höhere Level von RAGE assoziierter messenger-RNA im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. [72]

Eine Isoform des RAGE-Rezeptors besteht nur aus der extrazellulären Domäne (soluble RAGE, sRAGE). Diese im Serum zirkulierende Variante von RAGE besteht zum einen aus dem endogen sekretierten RAGE (esRAGE) und zum anderen aus dem von der Zelloberfläche gespaltenen („abgeschnittenen“) RAGE (cleaved RAGE, cRAGE).[73] Diese Isoformen scheinen eine inhibitorische Funktion auf den membranständigen Rezeptor auszuüben und damit die Entstehung und Progression von atherosklerotischen Plaques zu hemmen. [74, 75] Somit stellt sRAGE ein potentielles Ziel zur Prävention der Atherosklerose dar.

Auch bei der Pathogenese des Vorhofflimmerns scheint die AGE-RAGE Interaktion eine Rolle zu spielen. Zum einen steht die bereits beschriebene inflammationsfördernde Wirkung der intrazellulären RAGE-Signalkaskade im Verdacht das atriale Remodeling welches zur Erhaltung des VHF beiträgt, zu fördern. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass die Synthese von Matrix-Metalloproteinasen auch durch die AGE-RAGE Signalkaskade stimuliert wird. In Anbetracht der Tatsache, dass MMP- 9 wie bereits beschrieben mit der Pathogenese und Erhaltung von VHF assoziiert ist, deutet dies auf eine mögliche Beteiligung von RAGE an diesem Krankheitsbild hin. [73]

2 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es monozytäre Inflammations- und Remodelingmarker bei Patienten mit Vorhofflimmern zu charakterisieren und deren Expression auf den verschiedenen Monozytensubtypen (Klassische, intermediäre, nicht-klassische Monozyten) zu vergleichen.

Inflammatorische Prozesse gelten unter anderem über die Induktion von kardialen Umbauprozessen (zum Beispiel als Folge verstärkter Expression von Matrix-Metalloproteinasen) als wichtige Faktoren bei der Etablierung des Vorhofflimmerns. Der Rage-Rezeptor ist ein ubiquitär vorkommender pro-inflammatorischer multi-Ligand Rezeptor, der bei Aktivierung eine Inflammationskaskade über die Synthese von NF- κ B initiiert. Die Rolle des Rage-Rezeptors bei der Pathogenese des Vorhofflimmerns wurde bisher noch nicht genauer untersucht. Ziel war es deshalb den Rage-Rezeptor auf den drei verschiedenen Subtypen von Monozyten zu charakterisieren und mit einem gesunden Kollektiv sowie einem Kollektiv mit chronisch inflammatorischer Erkrankung (KHK-Kollektiv) zu vergleichen.

In der Pathogenese des Vorhofflimmerns spielt das kardiale Remodeling der Vorhöfe welches sich in Fibrosierung und Dilatation ebendieser zeigt eine ausschlaggebende Rolle. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) ermöglichen bekanntermaßen diese kardialen Umbauprozesse und spielen deshalb eine wichtige Rolle bei der Entstehung, bei der Progression und auch bei der selbsterhaltenden Natur der Erkrankung.

Monozyten gelten als wichtige Quelle von MMP-9 und sind auch verstärkt in den Atria von Patienten mit Vorhofflimmern nachweisbar. Ziel der Arbeit war es nun erstmals die Rolle der verschiedenen Monozyten-Subtypen, welche bekannterweise unterschiedliche Eigenschaften und Funktionen haben, zu charakterisieren. Hierzu wurden die unterschiedlichen Subtypen mittels Durchflusszytometrie auf deren Expression von MMP-9 untersucht und zudem mit einem gesunden Vergleichskollektiv verglichen. Außerdem wurde die Expression in den Subtypen mit einem Kollektiv mit diagnostizierter koronarer Herzerkrankung, und damit bekannter chronisch inflammatorischer Erkrankung verglichen. Ein weiteres Ziel war es, einen möglichen Einfluss des

Herzrhythmus (Sinusrhythmus versus Vorhofflimmern) auf die Expression von MMP-9 zu untersuchen.

3 Material und Methoden

3.1 Studienaufbau und Populationen

In der vorliegenden Studie wurden die Blutproben von insgesamt 68 Patienten und 20 gesunden Probanden analysiert. Es handelt sich um eine prospektiv durchgeführte Studie. Patienten mit diagnostizierten chronisch entzündlichen Erkrankungen oder Tumorerkrankungen wurden ausgeschlossen.

Die Patientengruppe wurde unterteilt in ein Kollektiv von 20 Probanden mit koronarer Herzerkrankung und ein Kollektiv von 24 Probanden mit Vorhofflimmern (hiervon 12 mit persistierenden und 12 mit paroxysmalen Vorhofflimmern). Als weitere Vergleichsgruppe diente ein Kollektiv von 24 Patienten mit anderen supraventrikulären Rhythmusstörungen (SVRs) als Vorhofflimmern.

Folgende Begleiterkrankungen wurden bei Erfüllung spezifischer Kriterien diagnostiziert:

Arterielle Hypertonie bei erhöhten vorbestehenden Blutdruckwerten ($> 140/90$ mmHg) oder antihypertensiver Therapie. Diabetes mellitus bei erhöhten HbA1c-Werten ($> 6,5\%$) oder Nüchternblutglukosewerten (> 7 mmol/l) sowie bei oraler Antidiabetika- oder Insulintherapie. Hyperlipoproteinämie bei erhöhten Gesamtcholesterinspiegeln (> 240 mg/dl) oder medikamentöser Lipidsenkung. Ein Body-Mass-Index (BMI) von > 30 kg/m² definiert die Adipositas.

Die Laborwerte, also das Differentialblutbild, sowie die Serumkonzentrationen von Kreatinin und Kreatinkinase wurden im Zentrallabor des Universitätsklinikums Tübingens standardmäßig bestimmt. Eine Echokardiographie wurde zur Bestimmung von Septumdicke, linksatrialer Größe, Ejektionsfraktion und zur Detektion von Klappenvitien genutzt.

Sämtliche Studienteilnehmer haben schriftlich ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie erteilt. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Tübingen (270/2011B01) genehmigt und im Einvernehmen mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

3.2 Materialien

3.2.1 Verbrauchsmaterialien

| | |
|----------------------------------|--|
| S – Monovette 8,5ml CPDA | Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland |
| Pipettenspitzen | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| BD Falcon 5 ml round bottom tube | Becton Dickson, Heidelberg, Deutschland |
| Eppendorfcups 1,5 und 2,5ml | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Parafilm | Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA |

3.2.2 Geräte

| | |
|----------------------------|--|
| BD FACSCalibur | Becton Dickson GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Multifuge 1s Heraeus | Thermo Corporation, Osterode, Deutschland |
| VF2 Vortexer | Janke & Kunkel GmbH, Staufen, Deutschland |
| Pipette Eppendorf research | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |

3.2.3 Antikörper und Reagenzien

| | |
|-------------------------------|-------------------------------|
| Anti-human CD14-Phycoerythrin | R&D Systems, Minneapolis, USA |
| Anti-human Fcγ RIII A/B-APC | R&D Systems, Minneapolis, USA |

| | |
|--|---|
| Goat Anti-human RAGE (N-16) | Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA |
| Anti-human MMP-9 Fluorescein-conjugated Antibody | R&D Systems, Minneapolis, USA |
| Donkey Anti-goat Alexa Flour 488 | Life Technologies, Waltham, USA |
| Goat IgG Isotype Control | Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA |
| Mouse IgG2B Fluorescein-conjugated Isotype Control | R&D Systems, Minneapolis, USA |
| Formaldehydlösung 4 % | Otto Fischar GmbH, Saarbrücken, Deutschland |
| BD FACS Lysing Solution | BD Biosciences, San Jose, USA |
| Tween 20 % | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Phosphat Buffered Saline | Sigma Aldrich, München, Deutschland |

3.3 Methoden

3.3.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, welches die schnelle und objektive Charakterisierung und Zählung von Zellen ermöglicht. Die Differenzierung der Zellen erfolgt dabei nach ihrer Größe, Struktur, Granularität und Oberflächenbeschaffenheit.

Die Zellen passieren in hohem Tempo jeweils einzeln einen Laserstrahl und emittieren dabei je nach Zellbeschaffenheit ein spezifisches optisches Signal. Ein Detektor registriert das dabei entstehende Streulicht. Das Vorwärtstreulicht (Forward Scatter, FSC), also nach vorne abgelenkte Lichtstrahlen, hängt vom Volumen der Zelle ab und ermöglicht damit eine Aussage über die Zellgröße. Das Seitwärtstreulicht (Side Scatter, SSC), also im rechten Winkel abgelenkte Strahlen, charakterisiert die Granularität der Zelle (Größe und Struktur der Zellorganellen).[76]

Zusätzlich können Zelleigenschaften wie Antigene und Oberflächenstrukturen mit Hilfe fluoreszierender Antikörper nachgewiesen und quantifiziert werden. Es existieren je nach Antigen spezifische bereits primär gelabelte oder ungelabelte Antikörper. Primär gelabelt bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die fluoreszierende Substanz direkt an den Antikörper gekoppelt ist. Ungelabelte Antikörper können nur über einen gelabelten Sekundärantikörper detektiert werden.

Für die vorliegende Studie wurden die fluoreszierenden Farbstoffe Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC) und Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) verwendet. Diese werden durch den Laser angeregt und emittieren ein Signal in deren jeweiligen Wellenlänge. Die Fluoreszenz ist dabei direkt proportional zur Anzahl spezifisch gebundener farbstoffkonjugierter Antikörper.

Vor der Analyse der gewonnenen Daten verhindert eine Kompensation mit Isotyp-Kontrollen falsch positive Signale aufgrund von Überlappungen zwischen Emissionsspektren von Fluorchrom-Farbstoffen.

Mithilfe der Software BD CellQuest Pro können die Daten automatisch analysiert werden und in Form von Dotplots und Histogrammen dargestellt werden.

3.3.2 Vollblutfärbung

Sämtliche arterielle Blutproben wurden unmittelbar vor einer Koronarangiographie (über die in der Arteria femoralis oder Arteria radialis liegende Schleuse) bzw. vor einer Katheterablation im Rahmen einer elektrophysiologischen Untersuchung entnommen.

Dem Patientenkollektiv mit Vorhofflimmern wurde 24 Stunden nach Ablation im Rahmen einer Routinekontrolle eine zweite Blutprobe über eine periphere Vene entnommen.

Das Blut wurde dabei stets in einer mit CPDA (citrate phosphate dextrose adenine) versetzten 8,5 ml fassenden Monovette (Sarstedt AG, Nümbrecht) entnommen.

Aus dieser Monovette wurden jeweils 150 µl Vollblut mittels einer Pipette in ein 5 ml Falcon gegeben. Hinzu kommen in jedes Falcon jeweils 10 µl mouse anti-human CD14-PE-Antikörper und 10 µl mouse anti-human CD16-APC-Antikörper. Die folgenden Schritte unterscheiden sich je nach Antikörper.

Pro Proband wurden drei Ansätze hergestellt:

| Tabelle 1 Versuchsansätze pro Proband |
|--|
| Ansatz 1 : 150 µl Vollblut + 10 µl CD14-PE + 10 µl CD16-APC + Isotypkontrolle |
| Ansatz 2 : 150 µl Vollblut + 10 µl CD14-PE + 10 µl CD16-APC + 7,5 µl Rage + 10 µl Alexa Fluor 488 |
| Ansatz 3 : 150 µl Vollblut + 10 µl CD14-PE + 10 µl CD16-APC + 10 µl MMP-9 FITC |

Tabelle 1

Die verschiedenen Vollblutfärbungen für die FACS-Messung

Ansatz 1 : Isotypen-Kontrolle

In diesem Ansatz wird wie in den restlichen Ansätzen vorgegangen, nur dass statt den Rage bzw. MMP-9 Antikörpern jeweils der spezifische Isotyp-Antikörper benutzt wird. Normal goat IgG für Rage und IgG-2b FITC für MMP-9.

Ansatz 2 : Rage-Rezeptor

Nach Zugabe des Rage-Antikörpers wird der Ansatz zunächst 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Es folgt die Lyse der enthaltenen Erythrozyten mittels BD FACS Lysing Solution. Hierzu wird 1 ml der im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. verdünnten Lösung hinzugegeben, die Probe kurz gevortext und anschließend zehn Minuten inkubiert.

Um die lysierten Erythrozytenfragmente zu entfernen, wird die Probe bei 1450 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der flüssige Überstand verworfen.

Da es sich bei dem benutzten Rage Antikörper um einen ungelabelten Antikörper handelt, muss dieser anschließend sekundär gelabelt werden um in der Durchflusszytometrie ein Fluoreszenzsignal zu erhalten. Dafür wird die Probe mit 10 µl Alexa Fluor 488 (1:40 verdünnt mit PBS) versetzt und erneut bei Dunkelheit 30 Minuten inkubiert.

Um ein sauberes Ergebnis bei der Durchflusszytometrie zu erhalten, wird die Probe darauffolgend erneut mit 1 ml der FACS Lysing Solution gewaschen.

Nach 10 Minuten Inkubationszeit wird wieder zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit 300 µl einer 1-prozentigen Paraformaldehyd-Lösung fixiert.

Ansatz 3 : MMP-9

Da es sich bei MMP-9 um ein intrazelluläres Enzym handelt, müssen die Zellen in diesem Ansatz permeabilisiert werden, damit der Antikörper ins Zellinnere gelangen kann.

Hierfür werden die Zellen nach der ersten Inkubation mit CD14-PE und CD16-APC und der anschließenden Lysierung der Erythrozyten mittels 1 ml einer 0,5-prozentigen Tween20® Lösung permeabilisiert. Bei Tween® handelt es sich um Polysorbat, eine grenzflächenaktive Substanz, welche eine Permeabilisierung von Zellen ermöglicht. Nach einer 15 minütigen Inkubationszeit, werden die Proben erneut zentrifugiert, der Überstand abgekippt und anschließend mit 10 µl des MMP-9 Antikörpers versetzt. Nach 30 Minuten Inkubation werden die Zellen mit 300 µl einer 1-prozentigen Paraformaldehyd-Lösung fixiert.

Sämtliche Proben wurden bis zur Analyse maximal 24 Stunden aufbewahrt und bei 4° C gelagert.

Mit dem Analysegerät FACSCalibur von Becton Dickson wurden pro Ansatz jeweils 20000 CD14-positive Ereignisse gezählt und analysiert. Die mittlere Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity, MFI) ist dabei direkt proportional zur Expression der Rezeptoren bzw. Enzyme. Die dazugehörige Software Cellquest Pro von Becton Dickson ermöglicht die Erfassung und Auswertung der Daten.

3.3.3 Auswertung der Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie lassen sich, wie in der Literatur vorbeschrieben, im Erythrozyten-lysierten Vollblut drei Population von Leukozyten deutlich voneinander unterscheiden. Es handelt sich dabei um Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten. Diese Unterscheidung beruht auf der jeweils unterschiedlichen Emission von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht.[49, 77]

Da Monozyten untersucht werden sollten, wurde ein Gate um die entsprechende Population gezogen.

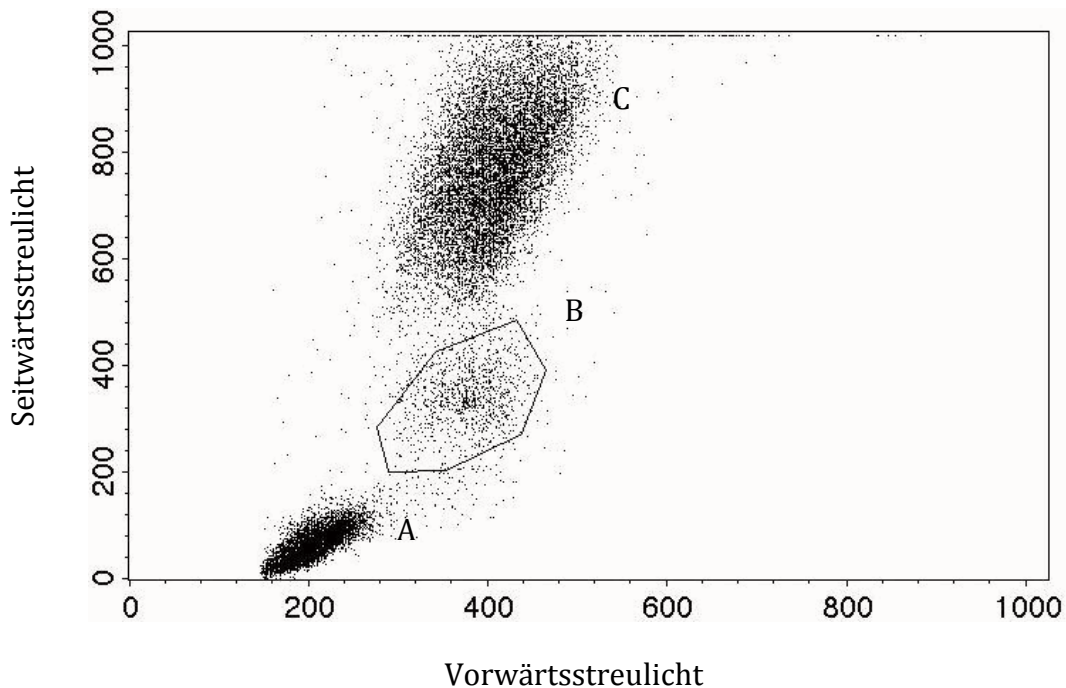


Abbildung 3

Darstellung einer Vollblutmessung durch Durchflusszytometrie

In diesem Dotplot sind Seitwärts- und Vorwärtsstreulicht einer typischen Vollblutmessung dargestellt. Die Erythrozyten wurden wie beschrieben lysiert. Zur Färbung der Zellen wurde monozytenspezifisches CD14 (PE-konjugiert), CD16 (APC-konjugiert) und Rage N16 (sekundär gelabelt mit Alexa Flour) verwendet. Population A zeigt Lymphozyten, Population B Monozyten und Population C Granulozyten.

Um sicherzustellen, dass die korrekte Population untersucht wird, wurde in einem zweiten Dotplot das Vorwärtsstreulicht gegen die CD14-Expression aufgetragen. Hier zeigt sich, dass die Population im Gate B aus Abbildung 1 als einzige CD14-positiv ist und es sich deshalb um monozytäre Zellen handeln muss.

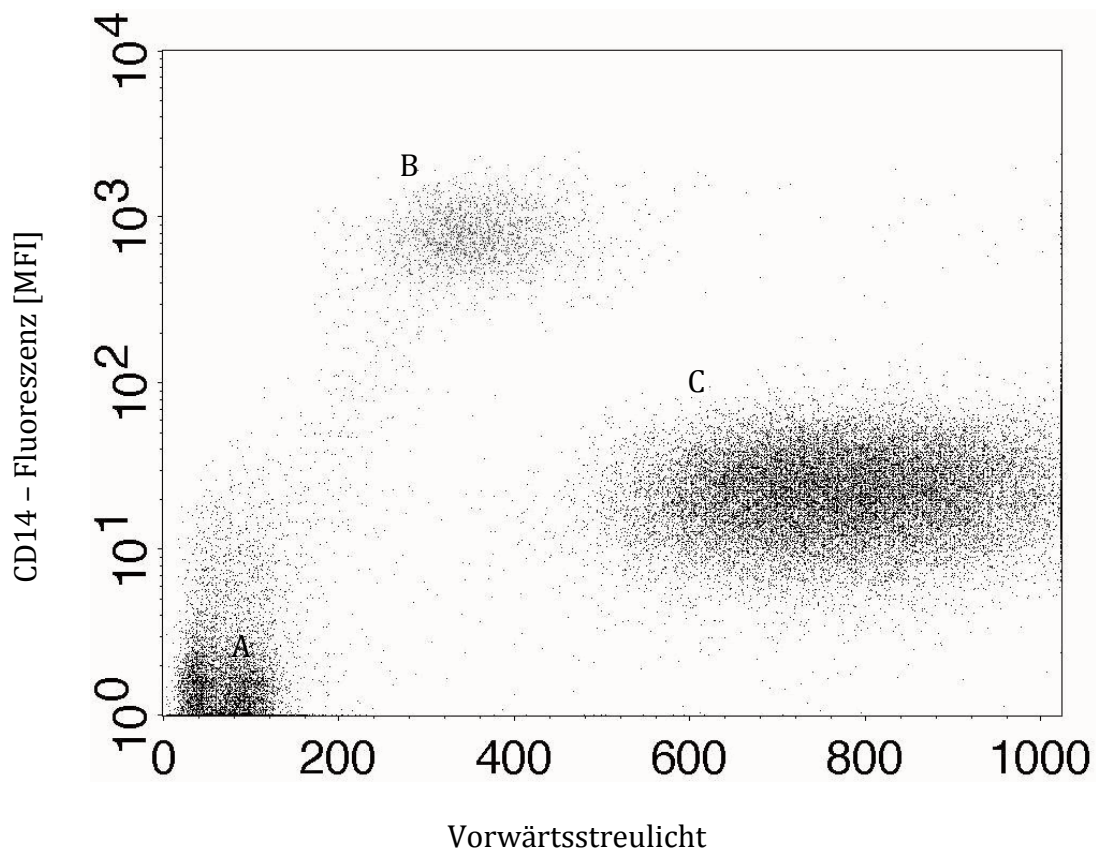


Abbildung 4

Darstellung zur Identifizierung der monozytären Zellen

In diesem Dotplot ist das Vorwärtsstreulicht gegen die CD14-Floureszenz [MFI] aufgetragen. Zur Färbung der Zellen wurde monozytenspezifisches CD14 (PE-konjugiert), CD16 (APC-konjugiert) und RAGE N16 (sekundär gelabelt mit Alexa Flour) verwendet. Die eindeutige CD14-PE-Expression von Population B beweist, dass es sich hierbei um monozytäre Zellen handelt.

Da in der vorliegenden Arbeit die drei verschiedenen Subtypen von Monozyten auf ihre Unterschiede hin untersucht werden sollten, wurde im nächsten Schritt in einem weiteren Dotplot die CD14-PE Fluoreszenz gegen die CD16-APC Fluoreszenz aufgetragen. Der dabei entstehende Dotplot lässt sich in drei Gates unterteilen und ist in der Literatur vorbeschrieben.[27, 49, 77]

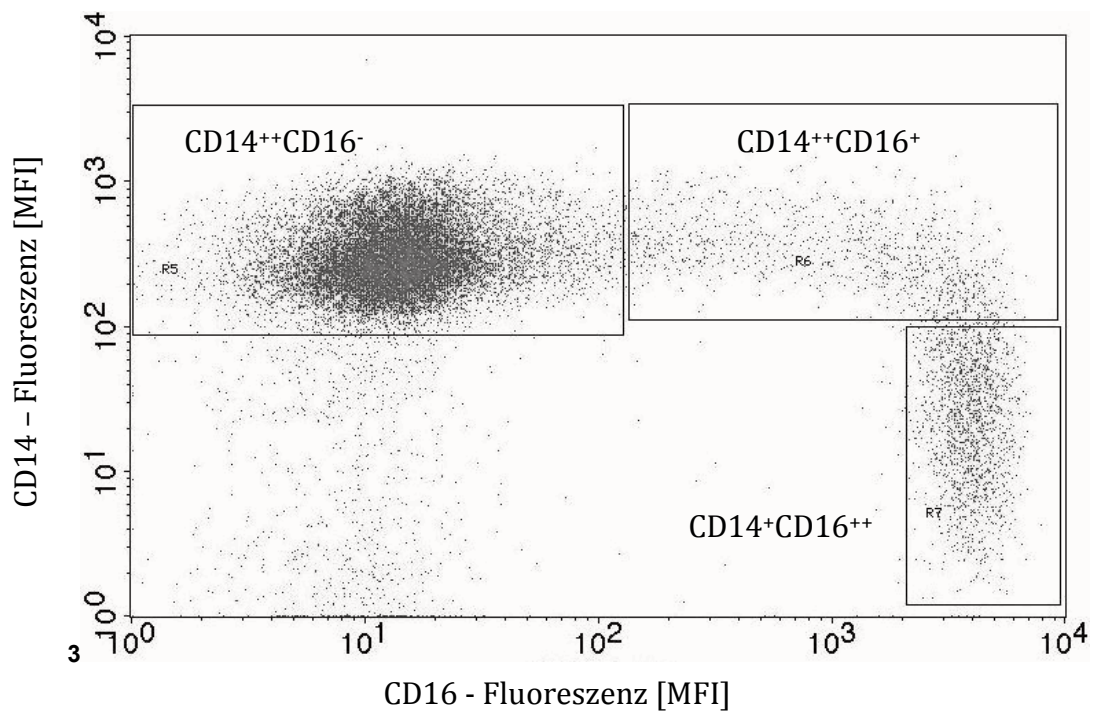


Abbildung 5
Die drei Subpopulationen von Monozyten

Beispiel der Darstellung von Monozyten - Subpopulationen (Population B aus Abb.3) in einem Dotplot in dem CD14-PE gegen CD16-APC aufgetragen ist. Die Unterteilung erfolgt nach Ausmaß der Oberflächenexpression von CD14-PE und CD16-APC in die folgenden drei Subtypen: Klassische Monozyten (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediäre Monozyten (CD14⁺⁺CD16⁺) und nicht-klassische Monozyten (CD14⁺CD16⁺⁺).

Es ist nun möglich für jeden Subtyp ein Histogramm zu erstellen, welches die spezifische Expression des jeweiligen Antikörpers darstellt. In jedem der drei Histogramme ist auf der x-Achse die Fluoreszenz und auf der y-Achse die Zellzahl aufgetragen. Die Software CellQuest Pro errechnet aus jedem Histogramm einen Mittelwert der Fluoreszenz (MFI). Dieser Wert bildet die Grundlage für die Auswertung dieser Studie.

Statistische Auswertung:

Die gewonnenen Daten wurden mittels GraphPad Prism, Version 6, (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) ausgewertet.

Die Testung auf Normalverteilung wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov Test durchgeführt.

Normalverteilte Daten werden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

Die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) wurden mittels Student t-Test auf Signifikanz getestet. Hierbei wurde ein p-Wert $< 0,05$ als signifikant gewertet. Signifikante Ergebnisse sind mit einem * markiert.

4 Ergebnisse

4.1 Beschreibung der Patientenkollektive

Das gesunde Vergleichskollektiv besteht aus 20 Probanden. Diese weisen keine relevanten Erkrankungen auf. Das Durchschnittsalter liegt bei 27 ± 4 Jahren. 45 % der Probanden sind weiblichen, 55 % sind männlichen Geschlechts.

4.1.1 Stabile Angina pectoris und Vorhofflimmern

Für diese Arbeit wurden 20 Patienten mit stabiler Angina pectoris aufgrund einer koronaren Herzerkrankung untersucht und mit einem gesunden Kollektiv von 20 Probanden ohne relevante Vorerkrankungen bzw. einem Kollektiv von 24 Probanden mit Vorhofflimmern verglichen. Die Diagnose koronare Herzerkrankung wurde mittels Herzkatheter-Untersuchung gestellt, Vorhofflimmern wurde mittels Elektrokardiographie diagnostiziert.

| | Stabile Angina pectoris | Vorhofflimmern |
|---|--------------------------------|-----------------------|
| Patientenzahl | (n=20) | (n=24) |
| Alter (Jahre) | 68 ± 11 | 64 ± 10 |
| Männlich (%) | 16 (80.0) | 15 (62.5) |
| Arterielle Hypertonie | 19 (95.0) | 14 (58.3) |
| Diabetes | 3 (15.0) | 3 (12.5) |
| Dyslipoproteinämie | 15 (75.0) | 11 (45.8) |
| Adipositas | 7 (35.0) | 10 (41.7) |
| Raucher | 10 (50.0) | 3 (12.5) |
| Leukozyten ($\times 10^3$ Zellen / μl) | 8.0 ± 2.2 | 6.5 ± 1.8 |
| Kreatinin (mg/dl) | 0.9 ± 0.2 | 1.0 ± 0.3 |
| Kreatinkinase (U/l) | 137 ± 83 | - |
| LV-Ejektionsfraktion (%) | 48.9 ± 11.9 | - |
| Medikation | | |
| ASS | 19 (95.0) | 2 (8.3) |
| ADP-Rezeptor Antagonist | 14 (70.0) | 0 (0) |
| ACE-Hemmer | 18 (90.0) | 15 (62.5) |
| Diuretika | 9 (45.0) | 7 (29.2) |
| Betablocker | 18 (90.0) | 23 (95.8) |
| Statin | 16 (80.0) | 9 (37.5) |

Tabelle 2

Beschreibung der Patientenkollektive mit stabiler Angina pectoris und Vorhofflimmern

4.1.2 Vorhofflimmern und andere supraventrikuläre Rhythmusstörungen (SVR)

In einem weiteren Schritt wurde ein Kollektiv, welches an Vorhofflimmern leidet mit einem Kollektiv welches an anderen supraventrikulären Rhythmusstörungen leidet verglichen. Beide Kollektive wurden im Rahmen einer elektrophysiologischen Untersuchung einem Ablationsverfahren unterzogen.

| | Vorhofflimmern | Andere supraventrikuläre Rhythmusstörungen |
|--|-----------------------|---|
| Patientenzahl | (n=24) | (n=24) |
| Alter (Jahre) | 64 ± 10 | 61 ± 18 |
| Männlich (%) | 15 (62.5) | 16 (66.7) |
| Arterielle Hypertonie | 14 (58.3) | 12 (50.0) |
| Diabetes | 3 (12.5) | 3 (12.5) |
| Dyslipoproteinämie | 11 (45.8) | 8 (33.3) |
| KHK | 4 (16.7) | 4 (16.7) |
| Adipositas | 10 (41.7) | 4 (16.7) |
| Raucher | 3 (12.5) | 1 (4.2) |
| Leukozyten (x10³ Zellen /µl) | 6.5 ± 1.8 | 7.3 ± 2.2 |
| Kreatinin (mg/dl) | 1.0 ± 0.3 | 0.9 ± 0.4 |
| LV-Ejektionsfraktion (%) : | | |
| Normal | 22 (91.7) | 20 (83.3) |
| Leichtgradig eingeschränkt | 1 (4.7) | 1 (4.2) |
| Mittelgradig eingeschränkt | 1 (4.7) | 3 (12.5) |
| LA-Größe (mm): | | |
| Normal | 6 (25.0) | 16 (66.7) |
| Leichtgradig verändert | 11 (45.8) | 4 (16.7) |
| Mittelgradig verändert | 6 (25.0) | 3 (12.5) |
| Hochgradig verändert | 1 (4.2) | 1 (4.2) |
| Septumdicke (mm) | 12.4 ± 1.5 | 14.5 ± 4.5 |
| Diastolische Dysfunktion | 4 (16.7) | 5 (20.8) |
| Mitralinsuffizienz | 21 (87.5) | 9 (37.5) |
| Aortenstenose | 0 (0.0) | 4 (16.7) |
| Medikation | | |
| ASS | 2 (8.3) | 4 (16.7) |
| Faktor Xa- Inhibitor | 15 (62.5) | 3 (12.5) |
| Thrombin-Inhibitor | 3 (12.5) | 0 (0.0) |
| ACE-Hemmer | 15 (62.5) | 10 (41.7) |
| Diuretika | 7 (29.2) | 6 (25.0) |

| | | |
|--------------------|-----------|-----------|
| Betablocker | 23 (95.8) | 16 (66.7) |
| Statin | 9 (37.5) | 8 (33.3) |

Tabelle 3

Beschreibung der Kollektive mit Vorhofflimmern und anderen supraventrikulären Rhythmusstörungen

4.2 Expression des RAGE-Rezeptors

4.2.1 Der RAGE-Rezeptor wird vorwiegend auf nicht-klassischen Monozyten (CD14⁺CD16⁺⁺) exprimiert

In einem gesunden Kollektiv von 20 Probanden zeigte sich eine unterschiedliche Expression von RAGE auf den drei Monozyten-Subpopulationen. Klassische Monozyten (CD14⁺⁺CD16⁻) weisen dabei die geringste mittlere Fluoreszenzintensität für RAGE auf. Nicht-klassische Monozyten (CD14⁺CD16⁺⁺) dagegen weisen eine signifikant höhere Expression von RAGE auf als klassische und auch als intermediäre Monozyten (CD14⁺⁺CD16⁺).

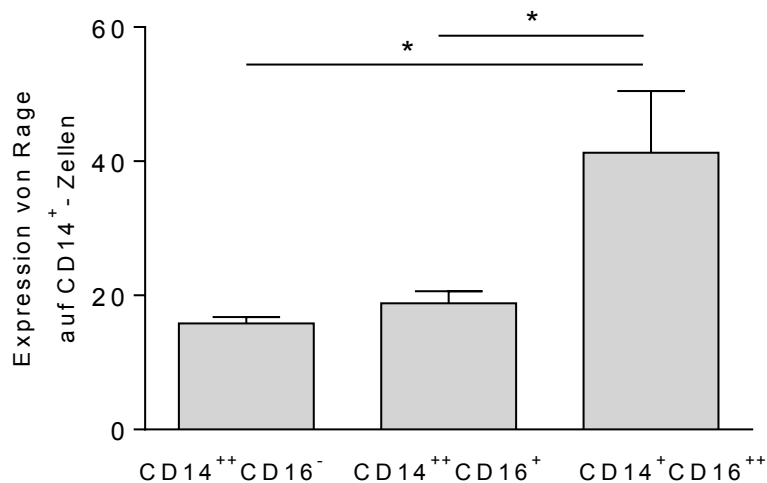


Abbildung 6

Der RAGE-Rezeptor wird vorwiegend auf nicht-klassischen Monozyten (CD14⁺CD16⁺⁺) exprimiert

Das Diagramm zeigt die mittlere RAGE Fluoreszenzintensität (MFI) auf den drei Monozyten - Subpopulationen in einem gesunden Kollektiv von 20 Probanden: Klassische (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediäre (CD14⁺⁺CD16⁺) und nicht-klassische Monozyten (CD14⁺CD16⁺⁺).

Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie von Erythrozyten-lysierten Vollblut. Folgende Antikörper wurden verwendet: CD14 - Antikörper konjugiert mit PE, CD16 - Antikörper konjugiert mit APC, RAGE (N16) sekundär gelabelt mit Alexa Fluor 488.

Die RAGE Expression auf nicht-klassischen Monozyten unterscheidet sich signifikant von der auf klassischen und intermediären Monozyten.

(* zeigt signifikanten Unterschied, $p < 0,05$)

4.2.2 Der Rage-Rezeptor weist bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung eine niedrigere monozytäre Expression auf als bei gesunden Probanden

In dieser Arbeit wurde die Oberflächenexpression von Rage auf Monozyten-Subpopulationen untersucht. Beim Vergleich zwischen Monozyten von 20 Patienten mit KHK und Monozyten von einem gesunden Vergleichskollektiv mit 20 Personen konnte gezeigt werden, dass sich die gemessene mittlere Rage-Fluoreszenz (MFI) bei intermediären und nicht-klassischen Monozyten signifikant unterscheidet.

In der folgenden Gegenüberstellung sind die Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) der Rage-Werte aufgetragen:

| | | |
|----------------------------|---------|-------------------|
| Klassische Monozyten | Gesund: | 15,83 ± 0,9 (SEM) |
| | KHK: | 13,26 ± 1,0 (SEM) |
| Intermediäre Monozyten | Gesund: | 18,84 ± 1,8 |
| | KHK: | 13,39 ± 1,1 |
| Nicht-klassische Monozyten | Gesund: | 41,28 ± 9,2 |
| | KHK: | 18,15 ± 1,8 |

Tabelle 4

Rage Expression (MFI) im Vergleich zwischen gesunden Probanden und Patienten mit KHK.

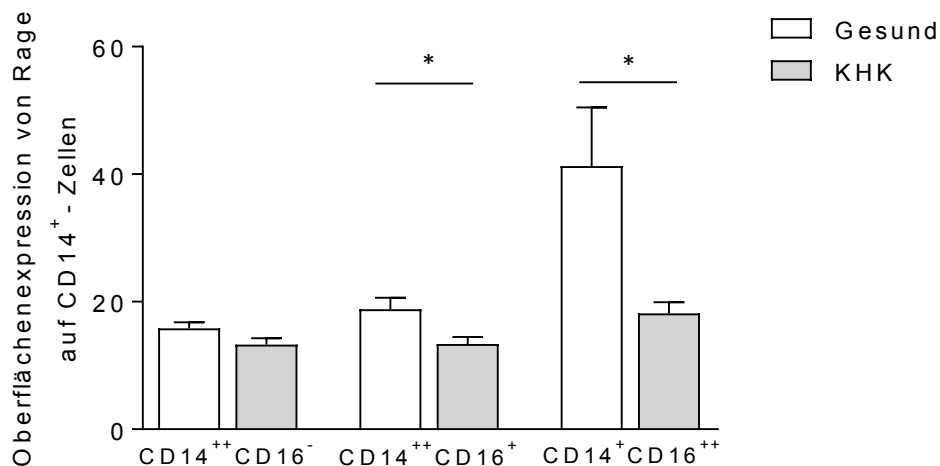


Abbildung 7

Die Rage Expression unterscheidet sich zwischen gesunden Probanden und Patienten mit koronarer Herzerkrankung auf intermediären (CD14⁺⁺CD16⁺) und nicht-klassischen (CD14⁺CD16⁺⁺) Monozyten

In diesem Diagramm ist die mittlere Rage-Fluoreszenzintensität auf den drei verschiedenen Monozyten-Subpopulationen dargestellt: Klassische (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediäre (CD14⁺⁺CD16⁺) und nicht-klassische Monozyten (CD14⁺CD16⁺⁺).

Ein gesundes Kollektiv (weiß, n=20) wird je mit einem KHK-Kollektiv (grau, n=20) verglichen. Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie von Erythrozyten-lysierten Vollblut. Verwendete Antikörper: CD14 - Antikörper konjugiert mit PE, CD16 - Antikörper konjugiert mit APC, Rage (N16) sekundär gelabelt mit Alexa Fluor 488.

Die mittlere Rage-Expression ist bei intermediären und nicht-klassischen Monozyten im KHK-Kollektiv signifikant niedriger.

(* zeigt signifikanten Unterschied, p<0,05)

4.2.3 Der Rage-Rezeptor weist bei Patienten mit Vorhofflimmern eine niedrigere Expression auf klassischen und intermediären Monozyten auf als bei Patienten im Sinusrhythmus

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob sich die Expression von Rage auf Monozyten zwischen Patienten mit Vorhofflimmern und Patienten deren Herzrhythmus sich im Sinusrhythmus befindet unterscheidet. Hierfür wurde bei 24 Probanden, welche wegen Vorhofflimmern einer elektrophysiologischen Untersuchung und Ablation von Pulmonalvenen zugeführt wurden, unmittelbar vor dieser Prozedur im Rahmen der Routineblutuntersuchung Blut entnommen. Zum anderen wurden die Blutproben von 24 Probanden, welche wegen anderen supraventrikulären Rhythmusstörungen einer elektrophysiologischen Untersuchung zugeführt wurden, mittels der bereits beschriebenen Methoden untersucht. Hierbei zeigte sich, dass klassische und intermediäre Monozyten bei Patienten mit Vorhofflimmern eine signifikant niedrigere Rage Expression aufweisen.

In der folgenden Tabelle sind die Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) der Rage-Werte aufgetragen:

| | | |
|----------------------------|----------------|-------------------|
| Klassische Monozyten | Sinusrhythmus: | 13,96 ± 1,5 (SEM) |
| | VHF: | 9,96 ± 0,9 (SEM) |
| Intermediäre Monozyten | Sinusrhythmus: | 19,44 ± 3,5 |
| | VHF: | 12,15 ± 1,2 |
| Nicht-klassische Monozyten | Sinusrhythmus: | 24,61 ± 4,0 |
| | VHF: | 22,27 ± 2,3 |

Tabelle 5

Rage Expression (MFI) im Vergleich zwischen Patienten mit Vorhofflimmern und Probanden im Sinusrhythmus.

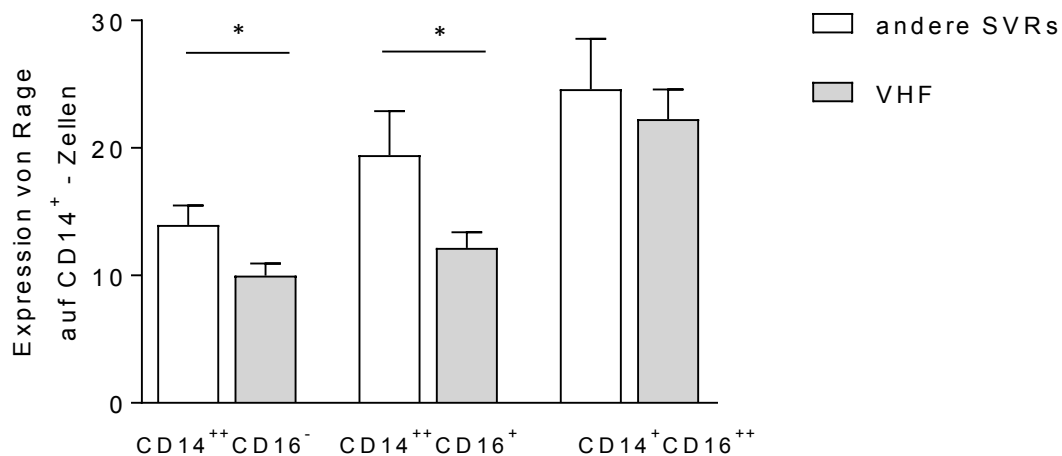


Abbildung 8
Patienten mit Vorhofflimmern zeigen niedrigere Werte der Rage Expression als Patienten mit anderen supraventrikulären Rhythmusstörungen (SVRs) in klassischen(CD14⁺⁺CD16⁻) und intermediären (CD14⁺⁺CD16⁺) Monozyten

In diesem Diagramm ist die mittlere Rage-Fluoreszenzintensität auf den drei verschiedenen Monozyten-Subpopulationen dargestellt:

Klassische (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediäre (CD14⁺⁺CD16⁺) und nicht-klassische Monozyten (CD14⁺CD16⁺⁺).

Ein Kollektiv mit VHF (grau, n=24) wird mit einem Kollektiv mit Sinusrhythmus (weiß, n=24) verglichen. Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie von Erythrozyten-lysierten Vollblut. Verwendete Antikörper: CD14 - Antikörper konjugiert mit PE, CD16 - Antikörper konjugiert mit APC, Rage (N16) sekundär gelabelt mit Alexa Fluor 488.

Die mittlere Rage-Expression ist bei klassischen und intermediären Monozyten im VHF-Kollektiv signifikant niedriger.

(* zeigt signifikanten Unterschied, p<0,05)

4.2.4 Patienten mit Vorhofflimmern, die mittels Ablationsverfahren behandelt wurden und postinterventionell im Sinusrhythmus waren, weisen 24 Stunden später eine höhere Expression von Rage auf allen Monozyten-Subpopulationen auf

Um den Einfluss der Wiederherstellung des Sinusrhythmus mittels Ablationsverfahren im Rahmen einer elektrophysiologischen Untersuchung auf die Expression von Rage auf Monozyten zu untersuchen, wurde bei diesen Patienten 24 Stunden nach dem Ende der Ablation im Rahmen der Routineblutbildkontrollen unter Sinusrhythmus eine weitere Blutprobe mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Es stellte sich heraus, dass die Rage-Fluoreszenzintensität in allen Monozyten - Subpopulationen im Vergleich zum Vorwert 24 Stunden zuvor signifikant anstieg:

| | | |
|----------------------------|------------------------------------|-------------------|
| Klassische Monozyten | Vor Ablation / Vorhofflimmern: | 9,98 ± 1,0 (SEM) |
| | 24 Stunden später / Sinusrhythmus: | 15,70 ± 1,0 (SEM) |
| Intermediäre Monozyten | Vor Ablation / Vorhofflimmern: | 12,15 ± 1,2 |
| | 24 Stunden später / Sinusrhythmus: | 15,98 ± 1,3 |
| Nicht-klassische Monozyten | Vor Ablation / Vorhofflimmern: | 22,27 ± 2,3 |
| | 24 Stunden später / Sinusrhythmus: | 87,76 ± 31,0 |

Tabelle 6

Vergleich der monozytären Rage Expression vor und nach Ablation auf den drei verschiedenen Monozyten-Subpopulationen.

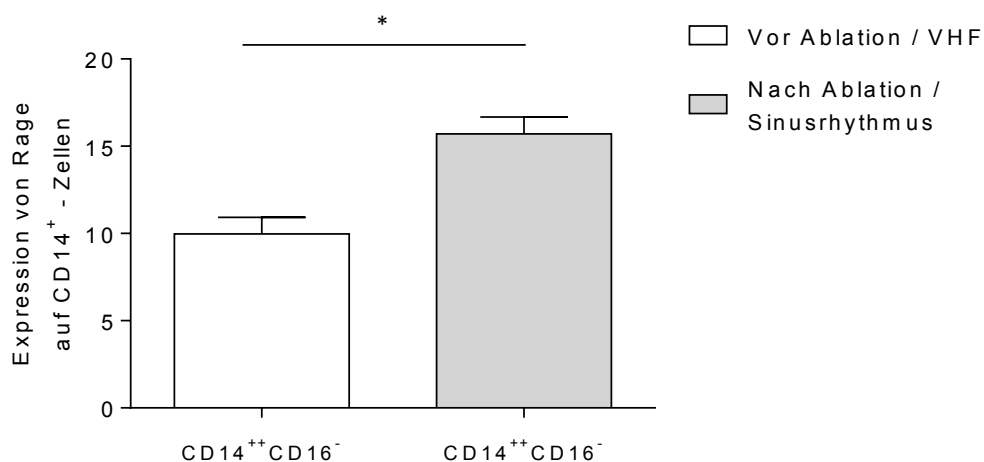


Abbildung 9
Expression von RAGE auf klassischen Monozyten vor und nach Wiederherstellung eines Sinusrhythmus

In dieser Abbildung ist die mittlere RAGE-Expression auf den klassischen Monozyten (CD14⁺⁺CD16⁻) dargestellt. Es wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten gemessen: Vor einer Ablationsbehandlung wegen VHF (weiß, n=24) und 24 Stunden danach im Sinusrhythmus (grau, n=24). Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie von Erythrozyten-lysierten Vollblut. Verwendete Antikörper: CD14 - Antikörper konjugiert mit PE, CD16 - Antikörper konjugiert mit APC, RAGE (N16) sekundär gelabelt mit Alexa Fluor 488.

Die mittlere RAGE- Expression ist zum zweiten Zeitpunkt signifikant erhöht. (* zeigt signifikanten Unterschied, p<0,05)

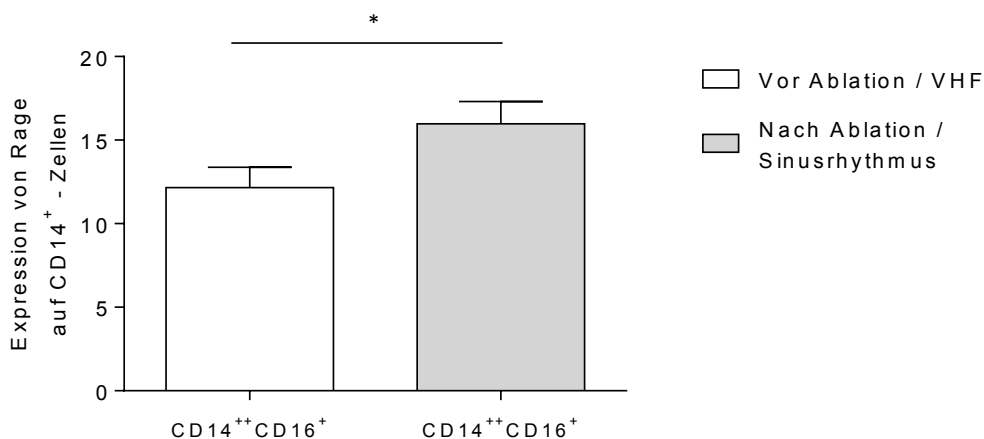


Abbildung 10
Expression von RAGE auf intermediären Monozyten vor und nach Wiederherstellung eines Sinusrhythmus

Diese Abbildung zeigt die mittlere RAGE-Expression auf den intermediären Monozyten (CD14⁺⁺CD16⁺). Es wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten

gemessen: Vor einer Ablationsbehandlung wegen VHF (weiß, n=24) und 24 Stunden danach im Sinusrhythmus (grau, n=24).

Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie von Erythrozyten-lysierten Vollblut. Verwendete Antikörper: CD14 - Antikörper konjugiert mit PE, CD16 - Antikörper konjugiert mit APC, Rage (N16) sekundär gelabelt mit Alexa Fluor 488.

Die mittlere Rage- Expression ist zum zweiten Zeitpunkt signifikant erhöht. (* zeigt signifikanten Unterschied, $p < 0,05$)

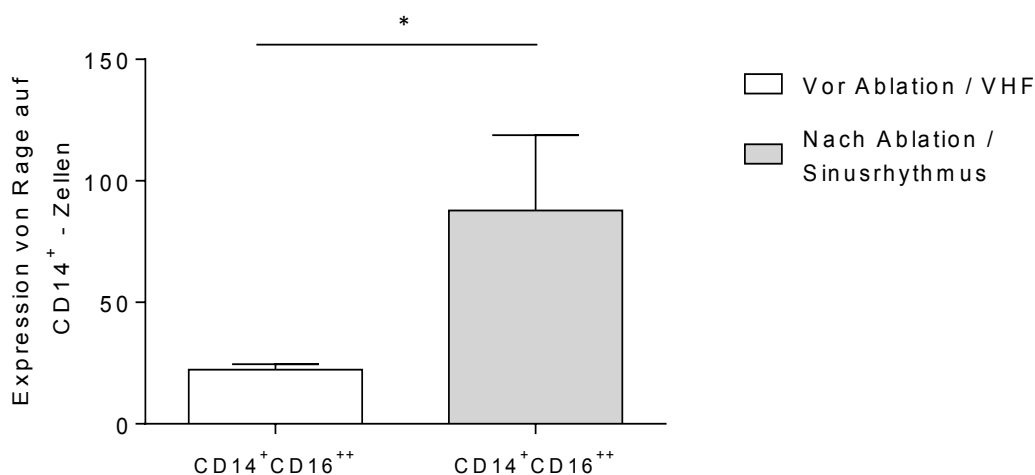


Abbildung 11

Expression von Rage auf nicht-klassischen Monozyten vor und nach Wiederherstellung eines Sinusrhythmus

In dieser Abbildung ist die mittlere Rage-Expression auf den nicht-klassischen Monozyten ($CD14^+CD16^{++}$) dargestellt. Es wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten gemessen: Vor einer Ablationsbehandlung wegen VHF (weiß, n=24) und 24 Stunden danach im Sinusrhythmus (grau, n=24).

Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie von Erythrozyten-lysierten Vollblut. Verwendete Antikörper: CD14 - Antikörper konjugiert mit PE, CD16 - Antikörper konjugiert mit APC, Rage (N16) sekundär gelabelt mit Alexa Fluor 488.

Die mittlere Rage- Expression ist zum zweiten Zeitpunkt signifikant erhöht. (* zeigt signifikanten Unterschied, $p < 0,05$)

4.3 Expression der Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9)

4.3.1 Die drei Monozyten-Subpopulationen zeigen keine Unterschiede in der Expression von MMP-9 bei gesunden Probanden

In einem Kollektiv von 20 gesunden Probanden wurde die mittlere Fluoreszenz-Intensität von zellulärem MMP-9 gemessen. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Subtypen gefunden werden. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) stellt sich in allen drei Subpopulation ähnlich dar.

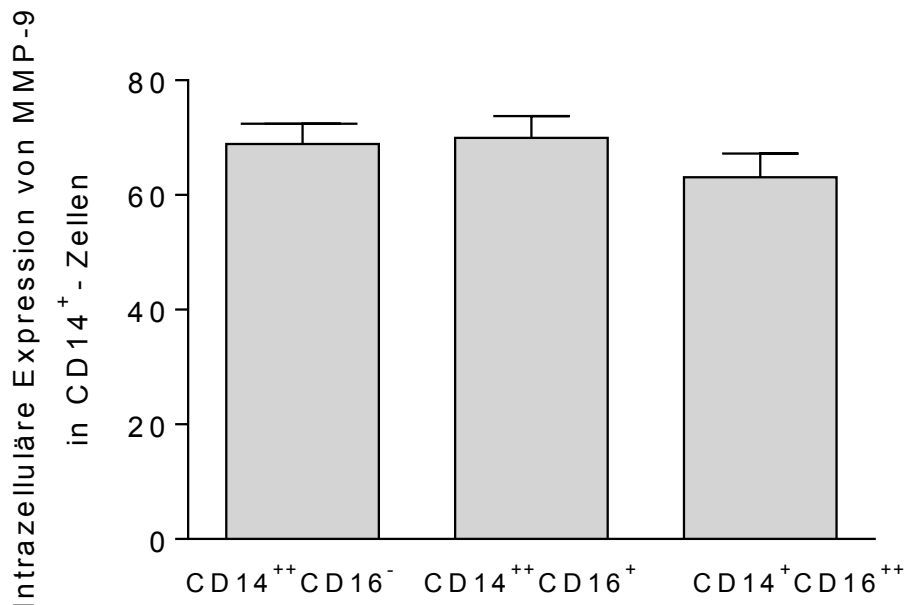


Abbildung 12

MMP-9 wird in allen drei Monozyten - Subtypen gleichartig exprimiert

Das Diagramm zeigt die mittlere MMP-9 Fluoreszenzintensität der drei Monozyten Subpopulationen in einem gesunden Kollektiv von 20 Probanden: Klassische (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediäre (CD14⁺⁺CD16⁺) und nicht-klassische Monozyten (CD14⁺CD16⁺⁺).

Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie von Erythrozyten-lysierten Vollblut. Verwendete Antikörper: CD14 - Antikörper konjugiert mit PE, CD16 – Antikörper konjugiert mit APC, MMP-9 - Antikörper konjugiert mit FITC.

Die MMP-9 Expression zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Populationen.

4.3.2 MMP-9 weist bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung in allen drei Monozyten - Subtypen eine höhere Expression auf als bei gesunden Probanden

Ein Kollektiv von 20 Probanden mit KHK wurde mit einem gesunden Vergleichskollektiv von 20 Probanden bezüglich der Expression von zellulären MMP-9 in Monozyten verglichen. Es zeigte sich, dass klassische, intermediäre und auch nicht-klassische Monozyten bei Patienten mit KHK signifikant höhere MMP-9 Fluoreszenzwerte aufweisen. In folgender Tabelle sind die mittleren Fluoreszenzwerte für MMP-9 der beiden Kollektive gegenübergestellt:

| | | |
|----------------------------|---------|--------------------|
| Klassische Monozyten | Gesund: | 68,89 ± 3,5 (SEM) |
| | KHK: | 100,72 ± 9,8 (SEM) |
| Intermediäre Monozyten | Gesund: | 69,98 ± 3,8 |
| | KHK: | 92,0 ± 7,4 |
| Nicht-klassische Monozyten | Gesund: | 63,11 ± 4,1 |
| | KHK: | 79,6 ± 4,5 |

Tabelle 7 :

Vergleich der MMP-9 Expression in Monozyten-Subpopulationen gesunder und kardiovaskulär vorbelasteter Probanden

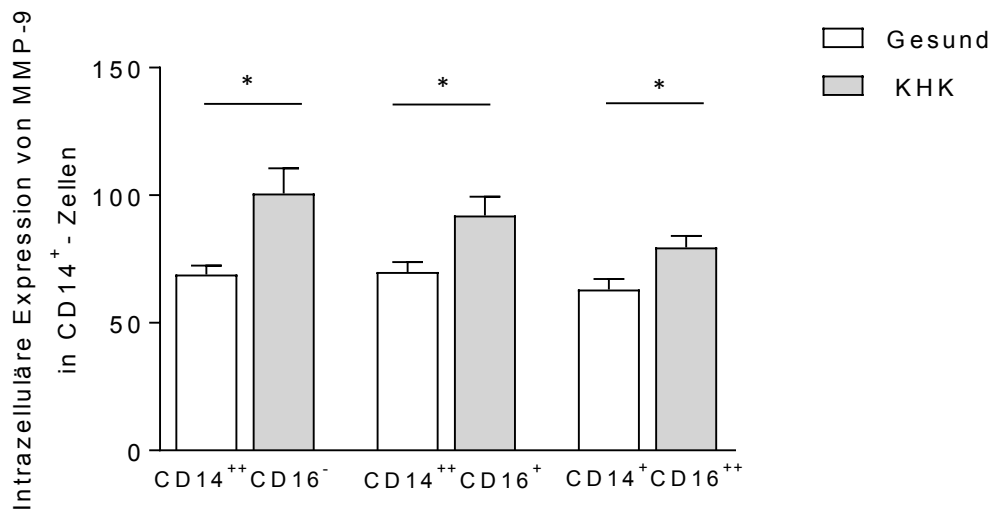


Abbildung 13

Patienten mit koronarer Herzerkrankung weisen signifikant mehr zelluläres MMP-9 in allen Monozyten - Subtypen auf

In diesem Diagramm ist die mittlere MMP-9-Fluoreszenzintensität in den drei verschiedenen Monozyten-Subpopulationen dargestellt: Klassische (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediäre (CD14⁺⁺CD16⁺) und nicht-klassische Monozyten (CD14⁺CD16⁺⁺).

Ein gesundes Kollektiv (weiß, n=20) wird je mit einem KHK-Kollektiv (grau, n=20) verglichen. Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie von Erythrozyten-lysierten Vollblut. Verwendete Antikörper: CD14 - Antikörper konjugiert mit PE, CD16 - Antikörper konjugiert mit APC, MMP-9 - Antikörper konjugiert mit FITC.

Die mittlere MMP-9 Expression ist bei klassischen, intermediären und nicht-klassischen Monozyten im KHK-Kollektiv signifikant erhöht .

(* zeigt signifikanten Unterschied, p<0,05)

4.3.3 Patienten mit Vorhofflimmern exprimieren in intermediären und nicht-klassischen Monozyten mehr MMP-9 als Patienten mit koronarer Herzerkrankung

Ein Patientenkollektiv mit diagnostizierten Vorhofflimmern, jedoch ohne koronare Herzerkrankung, wurde mit einem Kollektiv an Patienten im Sinusrhythmus, jedoch bestätigter koronarer Herzerkrankung verglichen. Es zeigte sich, dass Patienten mit VHF ohne KHK mehr intrazelluläres MMP-9 aufweisen als Patienten mit KHK und Sinusrhythmus. Eine signifikant höhere Expression von MMP-9 lag in intermediären und nicht-klassischen Monozyten vor.

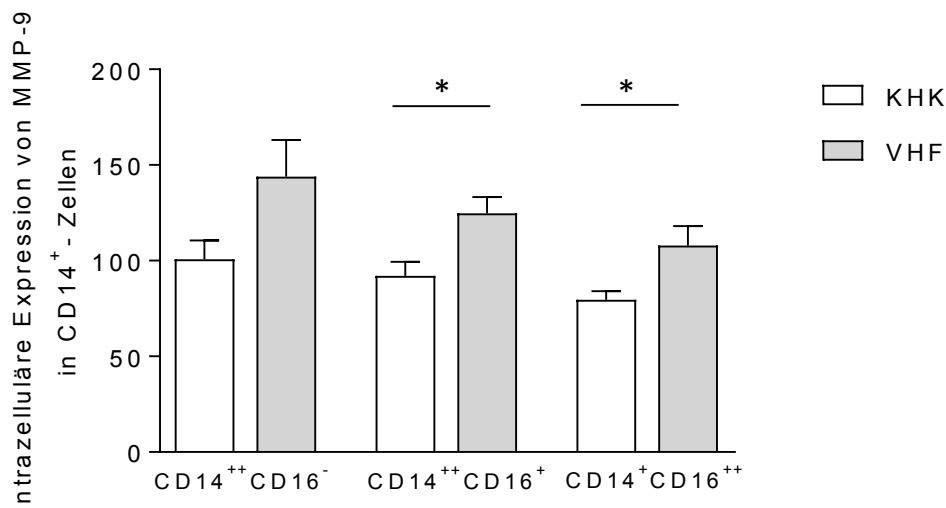


Abbildung 14
Patienten mit Vorhofflimmern exprimieren signifikant mehr MMP-9 in intermediären und nicht-klassischen Monozyten als Patienten mit koronarer Herzerkrankung und Sinusrhythmus

In diesem Diagramm ist die mittlere MMP-9-Fluoreszenzintensität in den drei verschiedenen Monozyten-Subpopulationen dargestellt: Klassische (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediäre (CD14⁺⁺CD16⁺) und nicht-klassische Monozyten (CD14⁺CD16⁺⁺).

Ein KHK-Kollektiv (weiß, n=20) wird je mit einem VHF-Kollektiv (grau, n=24) verglichen. Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie von Erythrozyten-lysierten Vollblut. Verwendete Antikörper: CD14 - Antikörper konjugiert mit PE, CD16 - Antikörper konjugiert mit APC, MMP-9 - Antikörper konjugiert mit FITC.

Die mittlere MMP-9 Expression ist bei intermediären und nicht-klassischen Monozyten im VHF-Kollektiv signifikant erhöht.
 (* zeigt signifikanten Unterschied, $p < 0,05$)

4.3.4 Patienten mit Vorhofflimmern weisen in klassischen und intermediären Monozyten eine höhere zelluläre Expression von MMP-9 auf als Probanden im Sinusrhythmus

Im Folgenden wurde untersucht, ob sich Unterschiede in der Expression von zellulären MMP-9 in Monozyten zwischen Patienten mit Vorhofflimmern und Patienten mit Sinusrhythmus (jeweils ohne koronare Vorbelastung) nachweisen lassen. Dazu wurden die bereits beschriebenen Kollektive untersucht und verglichen. Es stellte sich heraus, dass Patienten mit Vorhofflimmern in klassischen und intermediären Monozyten eine signifikant höhere MMP-9 Expression aufweisen als Probanden mit Sinusrhythmus. In folgender Tabelle sind die mittleren Fluoreszenzwerte für MMP-9 der beiden Kollektive gegenübergestellt:

| | | |
|----------------------------|----------------|---------------------|
| Klassische Monozyten | Sinusrhythmus: | 86,72 ± 8,3 (SEM) |
| | VHF: | 143,98 ± 19,1 (SEM) |
| Intermediäre Monozyten | Sinusrhythmus: | 86,67 ± 6,6 |
| | VHF: | 124,69 ± 8,6 |
| Nicht-klassische Monozyten | Sinusrhythmus: | 87,65 ± 9,7 |
| | VHF: | 107,98 ± 10,1 |

Tabelle 8 :

Vergleich der MMP-9 Expression zwischen Patienten mit Sinusrhythmus (andere SVRs) und Patienten mit Vorhofflimmern

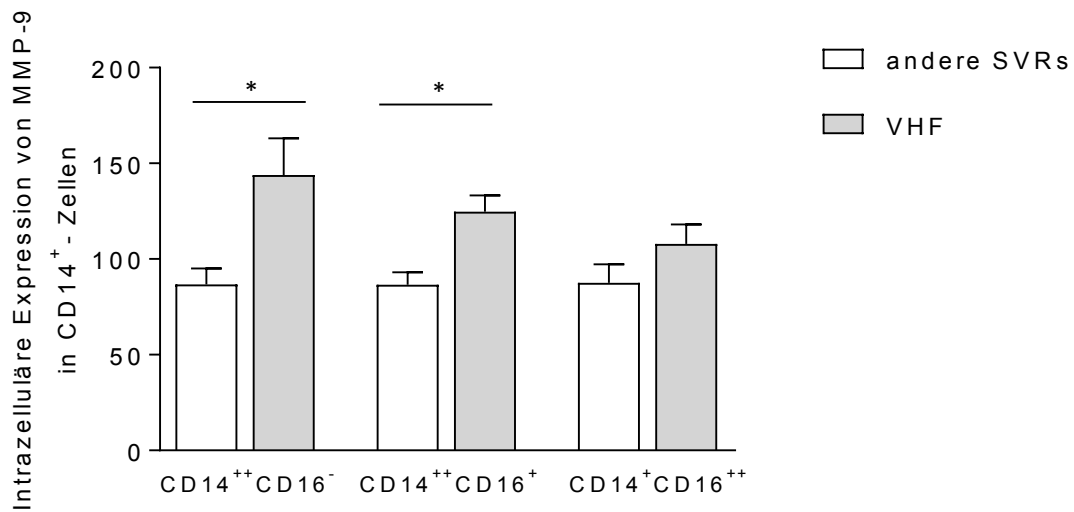


Abbildung 15
Patienten mit Vorhofflimmern exprimieren signifikant mehr zelluläres MMP-9 in klassischen und intermediären Monozyten als Patienten mit anderen SVRs

Das Diagramm stellt die mittlere MMP-9-Fluoreszenzintensität in den drei verschiedenen Monozyten-Subpopulationen dar: Klassische (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediäre (CD14⁺⁺CD16⁺) und nicht-klassische Monozyten (CD14⁺CD16⁺⁺). Ein Kollektiv mit VHF (grau, n=24) wird mit einem Kollektiv mit Sinusrhythmus (andere SVRs) (weiß, n=24) verglichen.

Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie von Erythrozyten-lysierten Vollblut. Verwendete Antikörper: CD14 - Antikörper konjugiert mit PE, CD16 - Antikörper konjugiert mit APC, MMP-9 - Antikörper konjugiert mit FITC.

Die mittlere MMP-9-Expression ist bei klassischen und intermediären Monozyten im VHF-Kollektiv signifikant erhöht.

(* zeigt signifikanten Unterschied, p<0,05)

4.3.5 Patienten mit Vorhofflimmern, die mittels Ablationsverfahren behandelt wurden und postinterventionell im Sinusrhythmus waren, weisen 24 Stunden später eine niedrigere Expression von MMP-9 in allen Monozyten-Subtypen auf

Um auch den Einfluss der Wiederherstellung des Sinusrhythmus auf die MMP-9 Expression zu untersuchen, wurde neben der bereits beschriebenen Rage Expression auch die MMP-9 Expression 24 Stunden nach der Ablation im Rahmen der Routineblutbildkontrollen bei nun vorliegendem Sinusrhythmus gemessen. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der MMP- 9 Expression in allen Monozyten-Subtypen:

| | | |
|----------------------------|------------------------------------|---------------------|
| Klassische Monozyten | Vor Ablation / Vorhofflimmern: | 143,98 ± 19,1 (SEM) |
| | 24 Stunden später / Sinusrhythmus: | 82,88 ± 11,4 (SEM) |
| Intermediäre Monozyten | Vor Ablation / Vorhofflimmern: | 124,69 ± 8,6 |
| | 24 Stunden später / Sinusrhythmus: | 72,35 ± 4,6 |
| Nicht-klassische Monozyten | Vor Ablation / Vorhofflimmern: | 107,98 ± 10,1 |
| | 24 Stunden später / Sinusrhythmus: | 78,9 ± 6,3 |

Tabelle 9 :

Vergleich der monozytären MMP-9 Expression vor und nach Ablation bei Vorhofflimmern

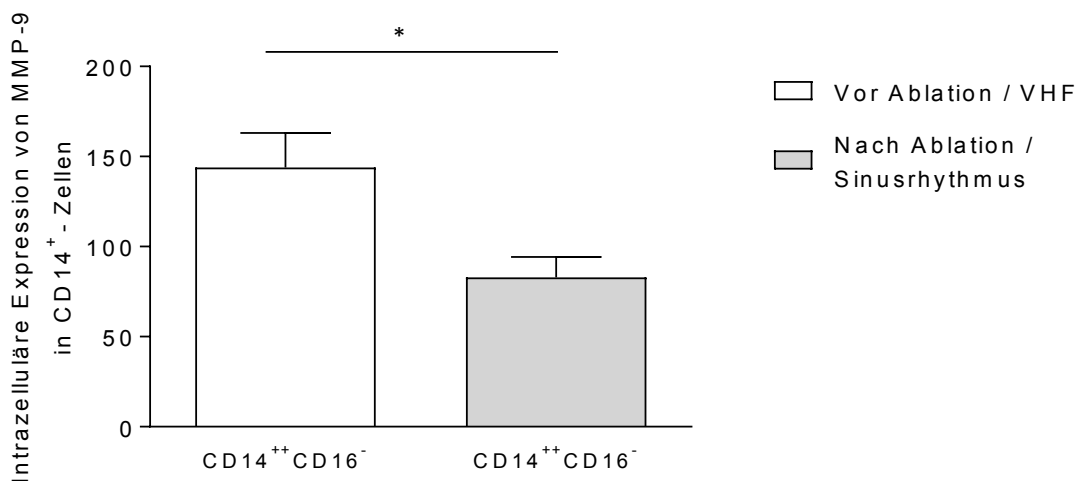


Abbildung 16

Expression von MMP-9 in klassischen Monozyten vor und nach Wiederherstellung eines Sinusrhythmus

In dieser Abbildung ist die mittlere MMP-9-Expression der klassischen Monozyten ($CD14^{++}CD16^{-}$) dargestellt. Es wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten gemessen: Vor einer Ablationsbehandlung wegen Vorhofflimmern (weiß, $n=24$) und 24 Stunden danach im Sinusrhythmus (grau, $n=24$). Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie von Erythrozyten-lysierten Vollblut. Verwendete Antikörper: CD14 - Antikörper konjugiert mit PE, CD16 - Antikörper konjugiert mit APC, MMP-9 - Antikörper konjugiert mit FITC. Die mittlere MMP-9-Expression ist zum zweiten Zeitpunkt signifikant erniedrigt. (* zeigt signifikanten Unterschied, $p < 0,05$)

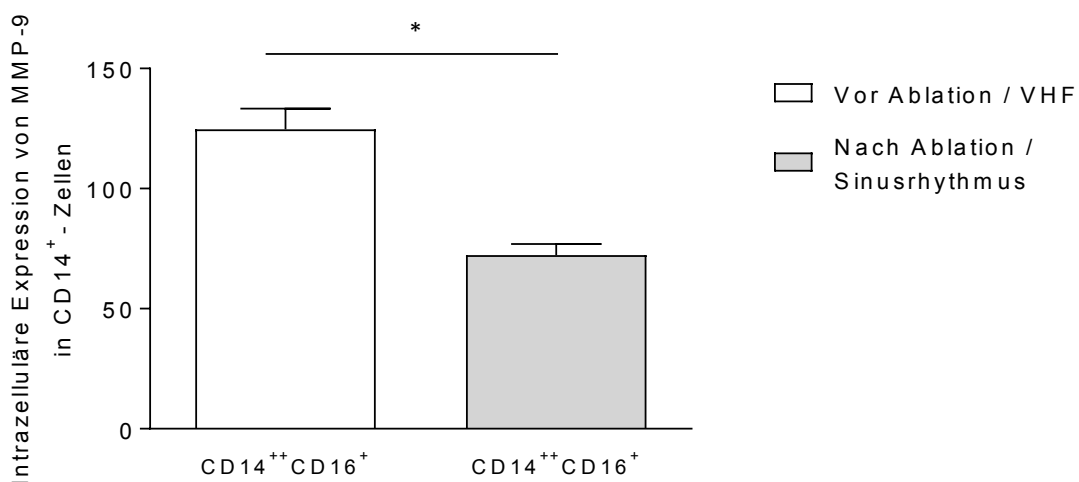


Abbildung 17

Expression von MMP-9 in intermediären Monozyten vor und nach Wiederherstellung eines Sinusrhythmus

Die Abbildung zeigt die mittlere MMP-9-Expression der intermediären

Monozyten (CD14⁺⁺CD16⁺). Es wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten gemessen: Vor einer Ablationsbehandlung wegen VHF (weiß, n=24) und 24 Stunden danach im Sinusrhythmus (grau, n=24).

Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie von Erythrozyten-lysierten Vollblut. Verwendete Antikörper: CD14 - Antikörper konjugiert mit PE, CD16 - Antikörper konjugiert mit APC, MMP-9 - Antikörper konjugiert mit FITC.

Die mittlere MMP-9- Expression ist zum zweiten Zeitpunkt signifikant erniedrigt. (* zeigt signifikanten Unterschied, p<0,05)

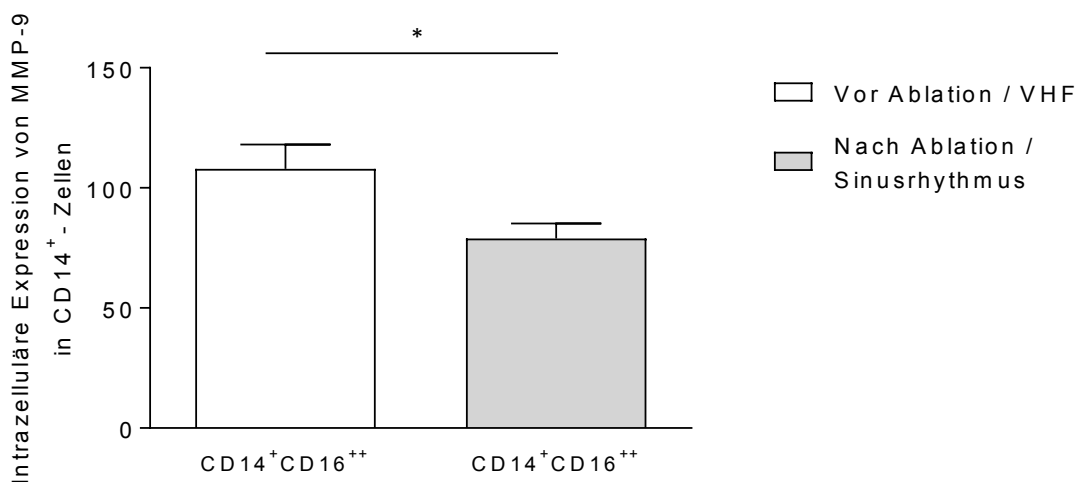


Abbildung 18

Expression von MMP-9 in nicht-klassischen Monozyten vor und nach Wiederherstellung eines Sinusrhythmus

In dieser Abbildung ist die mittlere MMP-9-Expression der nicht - klassischen Monozyten (CD14⁺CD16⁺⁺) dargestellt. Es wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten gemessen: Vor einer Ablationsbehandlung wegen VHF (weiß, n=24) und 24 Stunden danach im Sinusrhythmus (grau, n=24).

Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie von Erythrozyten-lysierten Vollblut. Verwendete Antikörper: CD14 - Antikörper konjugiert mit PE, CD16 - Antikörper konjugiert mit APC, MMP-9 - Antikörper konjugiert mit FITC.

Die mittlere MMP-9- Expression ist zum zweiten Zeitpunkt signifikant erniedrigt. (* zeigt signifikanten Unterschied, p<0,05)

4.4 Verteilungsmuster der Monozyten-Subpopulationen

Um die Verteilung der drei Monozyten-Subpopulationen bei verschiedenen Krankheitsbildern zu quantifizieren, wurden die einzelnen Gates in Prozent der Gesamt-Monozyten-Population berechnet und dargestellt. Dabei zeigte sich eine deutliche quantitative Dominanz der klassischen Monozyten mit jeweils mehr als 80 %. Es folgten die intermediären Monozyten mit einem Anteil von ca. 10 % und ein Anteil von jeweils unter 5 % an nicht-klassischen Monozyten.

4.4.1 Die quantitative Verteilung der Subtypen unterscheidet sich signifikant zwischen gesunden Patienten und Patienten mit koronarer Herzerkrankung

Bei genauerer Betrachtung der verschiedenen Kollektive fällt ein signifikanter Unterschied zwischen den gesunden und den kardiovaskulär erkrankten Patienten auf. Der prozentuale Anteil klassischer Monozyten ist bei Patienten mit KHK signifikant geringer und der Anteil an sowohl intermediären als auch an nicht-klassischen Monozyten ist signifikant erhöht.

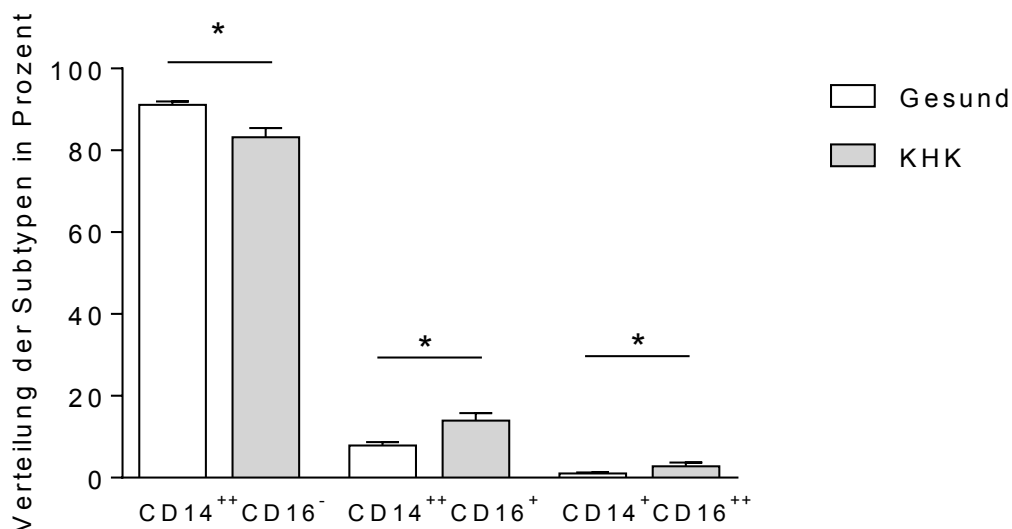


Abbildung 19

Vergleich der quantitativen Verteilung der Monozyten-Subtypen zwischen gesunden Probanden und Probanden mit koronarer Herzerkrankung

Die Abbildung zeigt die prozentuale Verteilung der Subpopulationen der

Gesamt-Monozyten-Population im Vergleich der beiden Kollektive. Klassische (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediäre (CD14⁺⁺CD16⁺) und nicht-klassische Monozyten (CD14⁺CD16⁺⁺) werden verglichen.

Es zeigen sich für jeden Subtyp signifikante Unterschiede.
(* weist auf einen signifikanten Unterschied hin, $p < 0,05$)

4.4.2 Patienten mit Vorhofflimmern weisen signifikant weniger nicht-klassische Monozyten auf als Patienten mit anderen supraventrikulären Rhythmusstörungen

Im Vergleich der Kollektive mit Vorhofflimmern und anderen SVRs unterscheidet sich die prozentuale Verteilung von klassischen und intermediären Monozyten nur geringfügig und nicht signifikant. Allerdings besteht eine signifikante Differenz bei der nicht-klassischen Monozyten - Subpopulation. Es zeigte sich, dass Patienten mit Vorhofflimmern signifikant weniger nicht-klassische Monozyten aufweisen.

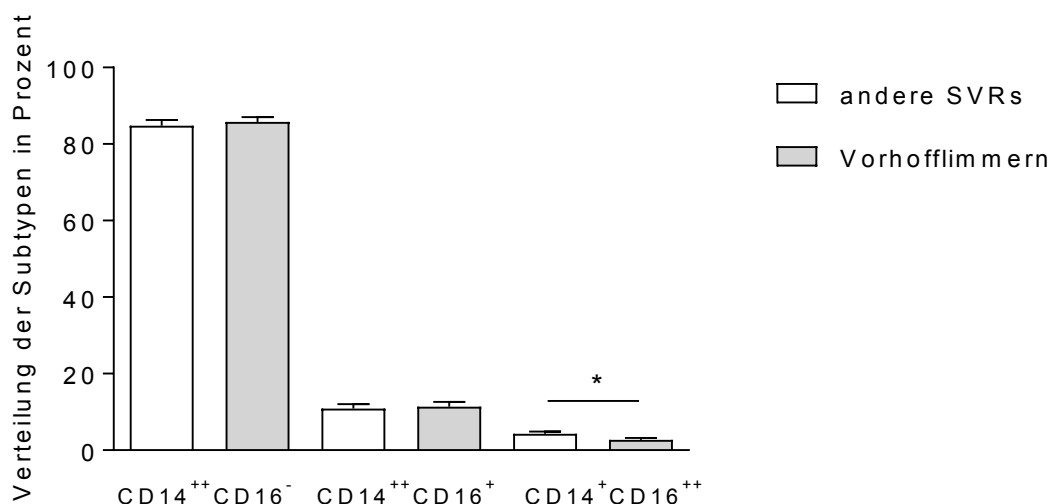


Abbildung 20

Vergleich der quantitativen Verteilung der Monozyten-Subtypen zwischen Probanden mit VHF und Probanden mit anderen SVRs

Die Abbildung zeigt die prozentuale Verteilung der Subpopulationen der Gesamt-Monozyten-Population im Vergleich der beiden Kollektive. Klassische (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediäre (CD14⁺⁺CD16⁺) und nicht-klassische Monozyten (CD14⁺CD16⁺⁺) werden verglichen.

Es zeigt einen signifikanten Unterschied für die nicht-klassischen Monozyten.
(* weist auf einen signifikanten Unterschied hin, $p < 0,05$)

5. Diskussion

5.1 Die Rolle der Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) bei Vorhofflimmern

Vorhofflimmern ist eine chronisch-progrediente inflammatorische Erkrankung, welche sich selbst unterhält und eine progressive Natur aufweist. Die Entwicklung von permanentem Vorhofflimmern ist eng mit dem strukturellen Remodeling der Vorhöfe verknüpft. Die Fibrose der Vorhöfe, welche eine Folge von kardiovaskulären Erkrankungen aber auch vom Vorhofflimmern selbst ist und in gewissem Sinne den Endpunkt der strukturellen Umbauprozesse darstellt, rückte deshalb zunehmend ins Blickfeld möglicher neuer Strategien zur Prävention und Therapie des Vorhofflimmerns. Die Pathogenese der Vorhoffibrose und insbesondere die Rolle von MMP-9 ist jedoch noch unzureichend verstanden. In der aktuellen Literatur wird ein Zusammenhang zwischen Extrazellulärmatrix abbauenden Enzymen und Vorhofflimmern beschrieben.[64]

So konnten Lewkowicz et al. zeigen, dass MMP-9 bei Patienten mit paroxysmalen und permanenten Vorhofflimmern im Vergleich zu einem Kollektiv im Sinusrhythmus im Serum erhöht ist. Außerdem wurde gezeigt, dass die MMP-9 Werte im Serum nach Elektrokardioversion, also im Sinusrhythmus, signifikant erhöht waren.[64]

Auch in atrialen Gewebebiopsien wurden erhöhte MMP-9 Level bei Patienten mit Vorhofflimmern gemessen.[58]

Bis dato lagen jedoch noch keine Hinweise auf die Herkunft des MMP-9 vor. Allerdings ist bekannt, dass in den Atria von Patienten mit Vorhofflimmern signifikant mehr Entzündungszellen vorhanden sind.[78] Die Rhythmusstörung wurde in den letzten Jahren somit zunehmend auch als inflammatorische Erkrankung verstanden, dessen genaue Pathomechanismen noch im Unklaren liegen.

Wir untersuchten deshalb erstmals die drei Subpopulationen von monozytären Zellen (klassische, intermediäre, nicht-klassische Monozyten), welche bekannterweise unterschiedliche Funktionen bei immunologischen Prozessen erfüllen, auf deren unterschiedliche MMP-9 Expression. [79]

5.2 Monozytensubtypen als Quelle von MMP-9 bei Patienten mit Vorhofflimmern

5.2.1 Regulation der monozytären Expression der MMP-9

Sturhan et al. beschrieben, dass EMMPRIN, ein ubiquitär verbreitetes Glykoprotein, welches Matrix-Metalloproteinasen in verschiedenen Zelltypen reguliert, vorrangig auf klassischen Monozyten (CD14⁺⁺CD16⁻) exprimiert wird.[49] Es stellt sich deshalb die Frage, ob vor allem klassische Monozyten in die EMMPRIN-abhängige MMP-9 Expression involviert sind und deshalb eine besondere Rolle in der Pathogenese der MMP-9 assoziierten Krankheiten spielen.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigten jedoch keine erhöhte Expression von MMP-9 in klassischen Monozyten, wie man aus der erhöhten Expression von EMMPRIN auf ebendiesen Subtyp schlussfolgern könnte. MMP-9 wird auf allen Subtypen gleichartig exprimiert [Abbildung 11].

Dies könnte als Hinweis darauf dienen, dass die intrazelluläre MMP-9 Expression nicht nur von der EMMPRIN Expression abhängt, sondern dass noch weitere Faktoren an der Regulation von MMP-9 beteiligt sind.

5.2.2 Patienten mit Vorhofflimmern exprimieren verstärkt MMP-9 in Monozyten-Subtypen

Um die, wie in der Literatur beschrieben, erhöhten MMP-9 Level im Serum sowie in atrialen Gewebeproben genauer einzuordnen, untersuchten wir für diese Arbeit die drei Monozyten-Subtypen, welche als relevante Quelle von

Extrazellulärmatrix abbauenden Enzymen dienen, auf deren MMP-9 Expression.

Die Ergebnisse ergaben auch in den zirkulierenden Monozyten erhöhte MMP-9 Werte in den Subtypen im Vergleich von Patienten mit Vorhofflimmern und Patienten mit anderen supraventrikulären Rhythmusstörungen. Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Subtypen ergaben sich signifikante Unterschiede bei den klassischen wie den intermediären Monozyten [Abbildung 14].

Man könnte deshalb spekulieren, dass Monozyten zu der Erhöhung der MMP-9 Level in Serum und Vorhofgewebe in einem beträchtlichen Maße beitragen. Insbesondere intermediären Monozyten, welche bei Patienten mit Vorhofflimmern im peripheren Blut quantitativ erhöht zu sein scheinen und wie von uns gezeigt auch eine erhöhte MMP-9 Expression zeigen, könnten damit eine nicht unerhebliche Rolle bei der Pathogenese des Vorhofflimmerns spielen. [80]

In einem weiteren Schritt untersucht die vorliegende Arbeit auch die MMP-9 Expression der verschiedenen Monozytensubtypen vor einer Ablation wegen Vorhofflimmern und 24 Stunden nach einer Ablation unter Sinusrhythmusbedingungen. Lewkowicz et al. beschreiben die MMP-9 Erhöhung im Serum nach der Elektrokardioversion als akuten Ausdruck der „Remodeling“ - Prozesse am Herzen.[64]

Die von uns erhobenen Daten zeigen nun, dass komplementär zum vorbeschriebenen Serumanstieg von MMP-9, der intrazelluläre Gehalt von MMP-9 in allen Monozyten-Subtypen nach Wiederherstellung eines Sinusrhythmus signifikant abnimmt. [Abbildung 15-17]

Man könnte also mutmaßen, dass monozytäre Zellen unter Sinusrhythmusbedingungen weniger MMP-9 exprimieren und, dass dieser Effekt auch innerhalb kurzer Zeit nach iatrogenen Konversion bei vorangehenden Vorhofflimmern eintritt. Interessanterweise zeigen die Monozyten der durch Ablation kardiovertierten Patienten eine ähnliche MMP-9 Expression wie die Monozyten im gesunden Vergleichskollektiv. Ob sich durch die Konversion in den Sinusrhythmus und der damit einhergehenden erniedrigten MMP-9 Expression in Monozyten die Fibrosierung und damit die

Progression der Erkrankung verlangsamen und die selbsterhaltende Natur des Vorhofflimmerns durchbrechen lässt, bedarf jedoch weitergehender Untersuchungen.

5.3 Die Rolle der MMP-9 bei koronarer Herzkrankheit

MMP-9 spielt eine gewichtige Rolle bei der Entstehung und Progression von atherosklerotischen Plaques und trägt zur Vulnerabilität dieser und damit zur Plaqueruptur bei. Die Serum Level des Enzyms wurden als Mortalitätsprädiktor bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung beschrieben. MMP-9 könnte damit einen neuen Prädiktor der kardiovaskulären Mortalität darstellen und ein neuer Parameter zur Identifizierung von Risikogruppen sein.[81]

In atherosklerotischen Plaques befinden sich eingewanderte Monozyten welche sich durch LDL-Aufnahme in Schaumzellen umwandeln und für ein inflammatorisches Milieu in der atherosklerotischen Läsion sorgen. Exprimierte Matrix-Metalloproteinasen führen zur Plaqueinstabilität. Die Plaqueruptur ist, vielmehr als die Größe des Plaques, der Ausgangspunkt schwerwiegender klinischer Konsequenzen. In der Literatur wird deshalb die medikamentöse Stabilisierung der Plaques mittels MMP-Inhibitoren als mögliche Prävention von kardiovaskulären Ereignissen beschrieben.[82]

Blankenberg et al. beschreibt erhöhte mediane MMP-9 Werte im Serum bei Patienten welche ein kardiovaskuläres Ereignis erlitten. Ob MMP-9 als unabhängiger Prognosemarker gelten kann bedarf jedoch weiterer Studien.[12] Auch die Quelle der erhöhten MMP-9 Level im Serum ist noch unklar. Fang et al. untersuchten deshalb isolierte mononukleare Zellen bei Patienten mit Myokardinfarkt auf deren MMP-9 Expression. Es zeigte sich eine erhöhte Expression von MMP-9 bei Patienten mit Myokardinfarkt im Vergleich zu einem gesunden Kollektiv. [83]

Um diese Ergebnisse nun zu erweitern untersuchten wir im Blut zirkulierende Monozyten-Subtypen mittels Durchflusszytometrie auf deren MMP-9 Gehalt bei

Patienten, welche noch kein kardiovaskuläres Ereignis erlitten, jedoch bereits an einer klinisch manifesten koronaren Herzerkrankung leiden.

Es fand sich eine signifikant erhöhte MMP-9 Expression in allen Subtypen bei Patienten mit diagnostizierter koronarer Herzerkrankung im Vergleich zu einem gesunden Kollektiv [Abbildung 12].

Die Messung der MMP-9 Expression in Monozyten könnte deshalb einerseits zur Risikostratifizierung dienen und andererseits einen möglichen Angriffspunkt von Inhibitoren von MMP-9 darstellen.

Interessanterweise weisen Patienten mit koronarer Herzerkrankung keine erhöhte EMMPRIN-Expression auf, erst ein akuter Herzinfarkt ist mit erhöhter EMMPRIN Expression assoziiert.[49] EMMPRIN führt über Aktivierung durch verschiedene Liganden, wie bereits beschrieben, zur erhöhten Expression von MMP-9.

Unsere Daten legen allerdings nahe, dass die Erhöhung der MMP-9 Expression bereits vor Eintritt von kardiovaskulären Ereignissen in Monozyten stattfindet und somit früher im Krankheitsverlauf eintritt. Theoretisch könnte es also möglich sein, über eine Quantifizierung von monozytären MMP-9 das Risiko einer Plaqueruptur besser zu stratifizieren.

5.4 Patienten mit Vorhofflimmern weisen eine höhere Expression der MMP-9 in intermediären und nicht-klassischen Monozyten auf als Patienten mit koronarer Herzkrankheit

Sowohl Vorhofflimmern, als auch die koronare Herzerkrankung, gelten als Erkrankungen bei denen inflammatorische Prozesse eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielen. Wie oben beschrieben weisen alle Monozyten-Subtypen bei Vorliegen einer KHK eine erhöhte MMP-9 Expression im Vergleich zu einem gesunden Kollektiv auf.

Wir verglichen nun erstmals die Monozyten-Subtypen eines VHF-Kollektivs mit einem Kollektiv mit diagnostizierter KHK (und Sinusrhythmus) und damit bekannter kardialer Inflammation. Erstaunlicherweise fand sich eine signifikant erhöhte MMP-9 Expression in intermediären wie in nicht-klassischen

Monozyten im VHF-Kollektiv. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass den Monozyten-Subtypen als Quelle von MMP-9 und damit als Wegbereiter des atrialen Remodelings, eine besondere Rolle in der Pathophysiologie des Vorhofflimmerns zukommt. Besonderes Augenmerk gilt dabei den intermediären Monozyten. Es wird postuliert, dass dieser Subtyp eine besondere Rolle beim Remodeling der Atria spielt. [80] Wir konnten diese These insofern bestätigen, als intermediäre Monozyten bei VHF signifikant mehr MMP-9 exprimieren als bei anderen inflammatorischen Erkrankungen des Herzens bzw. bei gesunden Personen.

5.5 Die monozytäre Rage Expression bei Vorhofflimmern und koronarer Herzerkrankung

5.5.1 Die Bedeutung des Rage Rezeptors bei Vorhofflimmern

In den letzten Jahren mehrten sich Hinweise, dass die Pathogenese und die zugrundeliegenden Mechanismen des Vorhofflimmerns auch mit inflammatorischen Prozessen assoziiert sind. Inflammation begünstigt die Entwicklung der Fibrosierung der Vorhöfe und ermöglicht damit das strukturelle Remodeling der Vorhöfe, welches die Progredienz und Persistenz des Vorhofflimmerns ermöglichen.[84]

Der Rage Rezeptor agiert als zellständiger Rezeptor für die sogenannten „advanced glycation endproducts“ (AGEs). Die Bindung dieser Liganden an den Rage Rezeptor führt über die Aktivierung von NF- κ B und die gesteigerte Synthese von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen zur Inflammation und Fibrose.[85]

Ob die AGE-Rage Interaktion auch die Pathophysiologie des Vorhofflimmerns beeinflusst, ist jedoch noch unzureichend erforscht.

In Studien an diabetischen Ratten konnte gezeigt werden, dass durch die Inhibition des Rage Rezeptors der Fibrosegrad in den Vorhöfen geringer war. Außerdem ist in der Literatur vorbeschrieben, dass die Aktivierung der Age-Rage-Achse die Synthese von Matrix-Metalloproteinasen welche bekanntlich mit Vorhofflimmern assoziiert sind, stimulieren kann. [73] Der Rage Rezeptor könnte also eine nicht unerhebliche Rolle in der Entstehung des Vorhofflimmerns spielen.

Es wird vermutet, dass die Serumlevel von soluble Rage (sRage) und AGEs, also den Liganden des Rage Rezeptors, die Aktivität der AGE-Rage-Achse widerspiegeln. Soluble Rage ist in der Lage zirkulierende AGEs zu eliminieren und damit als eine Art Lockvogel für AGEs, deren Wirkung am Rage Rezeptor zu mindern. Allerdings konnte in vivo eine positive Korrelation zwischen AGEs

und sRage festgestellt werden, was gegen eine effektive Hemmung von AGE durch sRage spricht. [86]

Lancefield et al. konnte 2016 zeigen, dass die Serumlevel von sRage bei Patienten mit Vorhofflimmern im Vergleich zu einem Kollektiv im Sinusrhythmus signifikant erhöht sind.[85]

Somit stellt sich die Frage, ob die AGE-Rage-Achse in das strukturelle Remodeling, neben seiner allgemein proinflammatorischen Wirkung, involviert ist.[87]

Wir untersuchten deshalb erstmals die drei monozytären Subtypen (klassische, intermediäre und nicht-klassische Monozyten) auf die Expression des Rage-Rezeptors und versuchten außerdem einen möglichen Einfluss des Herzrhythmus auf die monozytäre Rage Expression darzustellen.

5.5.2 Rage wird vor allem auf nicht-klassischen Monozyten exprimiert

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Rage auf nicht-klassischen Monozyten am stärksten exprimiert wird. [Abbildung 6]

Die Erkenntnis deckt sich damit, dass nicht-klassische Monozyten als proinflammatorisch gelten: Dieser Monozyten Subtyp ist erhöht bei Infektionen und Sepsis und produziert unter Stimulation mit LPS vermehrt TNF- α . [35]

Die vermehrte Expression von Rage und die damit verbundene Aktivierung der Age-Rage-Achse könnte also eine Komponente der inflammationsfördernden Wirkung der nicht-klassischen Monozyten sein.

Intermediäre Monozyten, welche bei Vorhofflimmern im Serum erhöht sind, weisen jedoch keine erhöhte Expression von Rage im Vergleich zu klassischen Monozyten auf.[80] Ob nicht-klassische Monozyten in der Pathophysiologie der Rhythmusstörung somit eine besondere Rolle spielen bedarf deshalb weiteren Untersuchungen.

5.5.3 Der Rage Rezeptor zeigt bei Patienten mit Vorhofflimmern eine geringere Expression auf klassischen und intermediären Monozyten als bei Patienten im Sinusrhythmus

In dieser Arbeit wird auch die Rage Expression auf zirkulierenden Monozyten zwischen Patienten mit Vorhofflimmern und Patienten im Sinusrhythmus verglichen. Unsere Daten zeigen interessanterweise eine erniedrigte Expression des zellulären Rage Rezeptors bei Patienten mit Vorhofflimmern. [Abbildung 8]

Klassische und intermediäre Monozyten wiesen signifikante Unterschiede auf. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass der Rage Rezeptor bei Vorhofflimmern vermehrt von der Zelloberfläche „abgeschnitten“ wird und deshalb auf den Zellen nur noch vermindert nachweisbar ist, jedoch im Serum in Form von sRage verstärkt messbar ist. Die Ergebnisse von Lancefield et al., welche erhöhte sRage Werte im Serum bei Patienten mit Vorhofflimmern zeigen, unterstützen diese These.

Die erhöhte Expression von MMP-9 in Monozyten bei Patienten mit Vorhofflimmern [Abbildung 14] könnte zu den verminderten Rage Werten beitragen: MMP-9 ist in der Lage den Rage Rezeptor von der Zelloberfläche „abzuschneiden“ („Shedding“) und stellt damit einen möglichen Regulationsmechanismus von sRage dar.[88, 89]

Damit könnte ein möglicher Zusammenhang zwischen erhöhten MMP-9 und erniedrigten Rage Werten in Monozyten bestehen.

Wir untersuchten auch, ob sich eine Pulmonalvenenablation und die damit einhergehende Konversion in den Sinusrhythmus auf die monozytäre Rage Expression auswirkt. Nach Ablation zeigten sich signifikant erhöhte Rage Werte auf allen Monozyten Subpopulationen. Da sich in unseren Vorversuchen eine erhöhte monozytäre Rage Expression bei Patienten im Sinusrhythmus fand, könnte der Anstieg nach Ablation mit der dadurch erfolgten Konversion zusammenhängen. Ob die Rage Expression tatsächlich vom Herzrhythmus

abhängt und damit durch iatrogene Konversionen beeinflussbar ist, muss jedoch in Folgestudien weiter untersucht werden.

5.5.4 Der RAGE Rezeptor zeigt bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung eine geringere Expression auf intermediären und nicht-klassischen Monozyten als bei gesunden Probanden

Der RAGE Rezeptor und seine im Serum lösliche Form scheinen bei der Pathogenese der koronaren Herzkrankheit und den möglichen Komplikationen eine Rolle zu spielen. Die Datenlage ist jedoch zum momentanen Zeitpunkt noch spärlich und teilweise widersprüchlich. [90]

Inflammation ist ein elementarer Bestandteil in der Entstehung der Atherosklerose und der RAGE Rezeptor trägt über eine Vielzahl an zum Teil noch unbekanntem Faktoren dazu bei: Zum einen kommt es durch Aktivierung des Rezeptors zu einer proinflammatorischen Signalkaskade, andererseits wird die Synthese von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und Matrix-Metallo-Proteinase gesteigert.[66]

Falcone et al. zeigte, dass bei Patienten mit diagnostizierter koronarer Herzerkrankung weniger sRAGE im Serum vorhanden ist als bei gesunden Kontrollpersonen.[90] sRAGE wird deshalb als potentieller Biomarker in Erwägung gezogen.

Da der Ursprung des löslichen sRAGE noch unklar ist, untersuchten Mahajan et al. im peripheren Blut zirkulierende Monozyten auf deren mRNA Expression. In der Gruppe der Patienten mit KHK fand sich signifikant mehr RAGE mRNA in den Monozyten. [72]

In der vorliegenden Arbeit werden nun im Blut zirkulierende Monozyten auf deren zellmembranständige RAGE Expression untersucht. Wir verglichen dabei ein Patientenkollektiv mit KHK mit einem gesunden Vergleichskollektiv. Es fand sich eine signifikant niedrigere Expression von RAGE auf intermediären und nicht-klassischen Monozyten in der Gruppe der Patienten mit KHK. [Abbildung 7]

Eine mögliche Erklärung für diese geringere monozytäre Rage Expression bei KHK ist ebenso ein verstärktes „Abschneiden“ des Rezeptors durch Matrix-Metalloproteinasen. Diese sind, wie ebenfalls in dieser Arbeit beschrieben, bei bestehender KHK in allen Subtypen signifikant erhöht, und könnten trotz in der Literatur beschriebener verstärkter Expression von Rage mRNA zu erniedrigter Rage Expression auf der Zelloberfläche führen. Ob durch das verstärkte „Abschneiden“ des Rezeptors jedoch eine Verminderung der Rage Aktivierung zustande kommt bzw. ob dieser Vorgang eventuell einen Autoregulationsmechanismus darstellt, bedarf weitergehender Folgestudien. Die Hypothese, dass sich durch das verstärkte „Abschneiden“ von zellmembranständigen Rage die Serumlevel von sRage erhöhen, lässt sich anhand der aktuellen Literatur weder bestätigen noch widerlegen, da die Datenlage hierzu noch inkonsistent ist.

5.6 Unterschiede in der quantitativen Monozyten-Verteilung

Monozyten stellen eine heterogene Gruppe von Immunzellen dar, deren unterschiedliche Subtypen spezifische, zum Teil unerforschte Aufgaben übernehmen und bei verschiedenen Krankheitsbildern spezifisch reguliert werden.

Die aktuelle Literatur bezüglich der quantitativen Verteilung von Monozytenpopulationen bei verschiedenen Krankheitsbildern beschreibt übereinstimmend eine Erhöhung der Anzahl an intermediären Monozyten bei inflammatorischen Prozessen. Intermediäre Monozyten gelten deshalb als zuverlässiger Biomarker inflammatorischer Erkrankungen und auch als potentieller Angriffspunkt einer Therapie der Atherosklerose.[36]

Bezüglich der nicht-klassischen Monozyten ist die Datenlage jedoch noch unübersichtlich.

Wir untersuchten deshalb auch, ob Unterschiede im Verteilungsmuster der Subtypen zwischen den Versuchskollektiven bestehen.

Das Kollektiv der Patienten mit KHK wies im Vergleich zu einem kardiovaskulär gesunden Kollektiv ein signifikant unterschiedliches Verteilungsmuster aller drei Subpopulationen auf:

Klassische Monozyten waren weniger, intermediäre und nicht-klassische Monozyten vermehrt im Blut nachzuweisen.[Abbildung 19]. Diese Veränderungen sind in der Literatur, wie auch in Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe bereits beschrieben.[34]

Man geht davon aus, dass eine Differenzierung der klassischen Monozyten, über die intermediären, hin zu den nicht-klassischen Monozyten stattfinden kann.[36] Dieser Differenzierungsprozess im Verlauf der Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung könnte eine mögliche Ursache unserer Erkenntnisse sein. Weiterhin unterstützen unsere Daten die These, dass den intermediären Monozyten eine besondere Rolle bei der Koronarsklerose zukommen könnte. Ob das Verteilungsmuster der Subpopulationen als Marker für das Vorliegen einer Koronarsklerose dienen kann, bedarf jedoch noch weiterer Studien.

Wir untersuchten auch das Verteilungsmuster der Subtypen bei einem Kollektiv mit Vorhofflimmern. Hierbei konnte kein so deutlicher Unterschied festgestellt werden. Lediglich die nicht-klassischen Monozyten waren bei Patienten mit Vorhofflimmern erniedrigt im Vergleich zu einem Kollektiv im Sinusrhythmus [Abbildung 20]. Es existieren unserer Erkenntnis nach noch keine Daten zur Heterogenität von Monozytensubtypen bei Vorhofflimmern. Deshalb bedarf es weiterer Untersuchungen um dieses Ergebnis besser einordnen zu können.

6. Zusammenfassung

Kardiale Inflammation sowie kardiale Remodelingprozesse sind entscheidende Mechanismen in der Entstehung und Etablierung von Vorhofflimmern. Die Bedeutung die dabei den verschiedenen Subtypen von Monozyten zukommt, welche bekannterweise unterschiedliche Eigenschaften aufweisen, ist jedoch noch unzureichend verstanden.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb die Expression und Regulation des monozytären proinflammatorischen RAGE Rezeptors sowie des Remodelingmarkers Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) auf den unterschiedlichen Monozyten-Subtypen bei Patienten mit Vorhofflimmern genauer zu charakterisieren. Hierzu wurde in einer klinischen Studie das Blut von 24 Patienten mit Vorhofflimmern und 20 Patienten mit bekannter chronisch kardialer Inflammation (KHK-Kollektiv) untersucht. Als Vergleichskollektive dienten 20 gesunde Probanden sowie ein Kollektiv von 24 Probanden mit anderen supraventrikulären Rhythmusstörungen.

Die Monozyten wurden durchflusszytometrisch in die folgenden, in der aktuellen Literatur vorbeschriebenen, Subtypen eingeteilt:

Klassische Monozyten ($CD14^{++}CD16^{-}$), intermediäre Monozyten ($CD14^{++}CD16^{+}$) und nicht-klassische Monozyten ($CD14^{+}CD16^{++}$). Für jeden Subtyp wurde jeweils die Expression von RAGE auf der Zelloberfläche sowie die intrazelluläre Expression der Matrix-Metalloproteinase-9 bestimmt.

Es zeigte sich, dass der RAGE-Rezeptor vor allem auf nicht-klassischen Monozyten exprimiert wird. Patienten mit Vorhofflimmern weisen auf klassischen ($CD14^{++}CD16^{-}$) wie intermediären ($CD14^{++}CD16^{+}$) Monozyten eine niedrigere RAGE-Expression als Patienten mit Sinusrhythmus auf. Eine mögliche Ursache könnte ein verstärktes „Abschneiden“ des Rezeptors von der Zelloberfläche (zum Beispiel durch MMP-9) sein.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Rage-Expression auf allen Monozyten-Subtypen nach iatrogenen Konversion in den Sinusrhythmus signifikant verstärkt ist. Somit scheint es möglich, dass die Rage-Expression auf Monozyten-Subtypen vom Herzrhythmus abhängt und durch iatrogene Interventionen beeinflussbar ist.

Aus Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass der extrazelluläre Matrix-Metalloproteinase-Inducer EMMPRIN, welcher die Synthese von Matrix-Metalloproteinase reguliert, vor allem auf klassischen Monozyten exprimiert wird. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die Matrix-Metalloproteinase-9 auf allen Monozyten-Subtypen gleichartig exprimiert wird und die erhöhte Expression von EMMPRIN auf klassischen Monozyten nicht mit einer erhöhten Expression von MMP-9 einhergeht.

Desweiteren konnte diese Arbeit zeigen, dass Patienten mit Vorhofflimmern in klassischen wie intermediären Monozyten signifikant mehr MMP-9 exprimieren als Patienten im Sinusrhythmus. Fand eine Konversion in den Sinusrhythmus im Rahmen einer Pulmonalvenenisolation statt, sank die Expression von MMP-9 in allen Monozyten-Subtypen signifikant ab, was auf einen Einfluss des Herzrhythmus auf die Expression des Remodelingmarkers MMP-9 schließen lässt.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass sowohl der proinflammatorische Rage Rezeptor als auch der Remodelingmarker MMP-9 bei Patienten mit Vorhofflimmern einer spezifischen Regulation unterliegen zu scheinen. Ob sich dadurch in Zukunft mögliche diagnostische oder therapeutische Möglichkeiten ergeben, bedarf weiterführender Untersuchungen.

7. Literaturverzeichnis

1. Chugh, S.S., et al., *Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: a Global Burden of Disease 2010 Study*. *Circulation*, 2014. **129**(8): p. 837-47.
2. Schnabel, R.B., et al., *Atrial fibrillation: its prevalence and risk factor profile in the German general population*. *Dtsch Arztebl Int*, 2012. **109**(16): p. 293-9.
3. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V. (2012), Leitlinien für das Management von Vorhofflimmern
4. Erdmann E (2011). *Klinische Kardiologie*, Heidelberg, Springer, 8.Auflage
5. Gage, B.F., et al., *Validation of clinical classification schemes for predicting stroke: results from the National Registry of Atrial Fibrillation*. *JAMA*, 2001. **285**(22): p. 2864-70.
6. Haissaguerre, M., et al., *Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins*. *N Engl J Med*, 1998. **339**(10): p. 659-66.
7. Pressemitteilung des Statistischen Bundesamtes Deutschland 2012
8. Statistisches Bundesamt (2011). *Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2011*, Statistisches Bundesamt Bonn
9. Riou, S., et al., *High pressure promotes monocyte adhesion to the vascular wall*. *Circ Res*, 2007. **100**(8): p. 1226-33.
10. Alamanda, V., et al., *Nicotine-mediated induction of E-selectin in aortic endothelial cells requires Src kinase and E2F1 transcriptional activity*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **418**(1): p. 56-61.
11. Hansson, G.K. and A. Hermansson, *The immune system in atherosclerosis*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(3): p. 204-12.
12. Blankenberg, S., et al., *Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease*. *Circulation*, 2003. **107**(12): p. 1579-85.
13. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Maseri, *Inflammation and atherosclerosis*. *Circulation*, 2002. **105**(9): p. 1135-43.

14. Li, H., et al., *An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium*. *Arterioscler Thromb*, 1993. **13**(2): p. 197-204.
15. Greaves, D.R. and S. Gordon, *The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges*. *J Lipid Res*, 2009. **50** Suppl: p. S282-6.
16. Kunjathoor, V.V., et al., *Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(51): p. 49982-8.
17. Cai, H. and D.G. Harrison, *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress*. *Circ Res*, 2000. **87**(10): p. 840-4.
18. Stary, H.C., et al., *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. **15**(9): p. 1512-31.
19. Duewell, P., et al., *NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals*. *Nature*, 2010. **464**(7293): p. 1357-61.
20. Schroder, K. and J. Tschopp, *The inflammasomes*. *Cell*, 2010. **140**(6): p. 821-32.
21. Hegyi, L., et al., *Foam cell apoptosis and the development of the lipid core of human atherosclerosis*. *J Pathol*, 1996. **180**(4): p. 423-9.
22. Ball, R.Y., et al., *Evidence that the death of macrophage foam cells contributes to the lipid core of atheroma*. *Atherosclerosis*, 1995. **114**(1): p. 45-54.
23. Newby, A.C. and J.L. Johnson, *Genetic strategies to elucidate the roles of matrix metalloproteinases in atherosclerotic plaque growth and stability*. *Circ Res*, 2005. **97**(10): p. 958-60.
24. Fuster, V., et al., *Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. **46**(6): p. 937-54.
25. Romanic, A.M., et al., *Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by targeted deletion of matrix metalloproteinase-9*. *Cardiovasc Res*, 2002. **54**(3): p. 549-58.
26. Ducharme, A., et al., *Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction*. *J Clin Invest*, 2000. **106**(1): p. 55-62.

27. Zawada, A.M., et al., *SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset*. *Blood*, 2011. **118**(12): p. e50-61.
28. Hume, D.A., *The mononuclear phagocyte system*. *Curr Opin Immunol*, 2006. **18**(1): p. 49-53.
29. Ziegler-Heitbrock, H.W., *Definition of human blood monocytes*. *J Leukoc Biol*, 2000. **67**(5): p. 603-6.
30. Passlick, B., D. Flieger, and H.W. Ziegler-Heitbrock, *Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood*. *Blood*, 1989. **74**(7): p. 2527-34.
31. Ziegler-Heitbrock, H.W., *Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14⁺ CD16⁺ subpopulation*. *Immunol Today*, 1996. **17**(9): p. 424-8.
32. Ziegler-Heitbrock, L. and T.P. Hofer, *Toward a refined definition of monocyte subsets*. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 23.
33. Ziegler-Heitbrock, L., et al., *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood*. *Blood*, 2010. **116**(16): p. e74-80.
34. Yang, J., et al., *Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases*. *Biomark Res*, 2014. **2**(1): p. 1.
35. Skrzeczynska-Moncznik, J., et al., *Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10*. *Scand J Immunol*, 2008. **67**(2): p. 152-9.
36. Zawada, A.M., et al., *Monocyte heterogeneity in human cardiovascular disease*. *Immunobiology*, 2012. **217**(12): p. 1273-84.
37. Ancuta, P., et al., *Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16⁺ monocytes*. *J Exp Med*, 2003. **197**(12): p. 1701-7.
38. Muntinghe, F.L., et al., *CCR5 deletion protects against inflammation-associated mortality in dialysis patients*. *J Am Soc Nephrol*, 2009. **20**(7): p. 1641-9.
39. Wilhelm, S.M., et al., *SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(29): p. 17213-21.
40. Seizer, P. and A.E. May, *Platelets and matrix metalloproteinases*. *Thromb Haemost*, 2013. **110**(5): p. 903-9.
41. Bode, W., et al., *Insights into MMP-TIMP interactions*. *Ann N Y Acad Sci*, 1999. **878**: p. 73-91.

42. Snoek-van Beurden, P.A. and J.W. Von den Hoff, *Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors*. Biotechniques, 2005. **38**(1): p. 73-83.
43. Nagase, H. and J.F. Woessner, Jr., *Matrix metalloproteinases*. J Biol Chem, 1999. **274**(31): p. 21491-4.
44. Rodriguez, D., C.J. Morrison, and C.M. Overall, *Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1803**(1): p. 39-54.
45. Van Wart, H.E. and H. Birkedal-Hansen, *The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(14): p. 5578-82.
46. Ramos-DeSimone, N., et al., *Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion*. J Biol Chem, 1999. **274**(19): p. 13066-76.
47. Schmidt, R., et al., *Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates matrix metalloproteinase activity in cardiovascular cells: implications in acute myocardial infarction*. Circulation, 2006. **113**(6): p. 834-41.
48. Seizer, P., et al., *Disrupting the EMMPRIN (CD147)-cyclophilin A interaction reduces infarct size and preserves systolic function after myocardial ischemia and reperfusion*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(6): p. 1377-86.
49. Sturhan, H., et al., *Regulation of EMMPRIN (CD147) on monocyte subsets in patients with symptomatic coronary artery disease*. Thromb Res, 2015. **135**(6): p. 1160-4.
50. Creemers, E.E., et al., *Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure?* Circ Res, 2001. **89**(3): p. 201-10.
51. Spinale, F.G., *Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart*. Circ Res, 2002. **90**(5): p. 520-30.
52. Newman, K.M., et al., *Identification of matrix metalloproteinases 3 (stromelysin-1) and 9 (gelatinase B) in abdominal aortic aneurysm*. Arterioscler Thromb, 1994. **14**(8): p. 1315-20.
53. Pyo, R., et al., *Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms*. J Clin Invest, 2000. **105**(11): p. 1641-9.
54. Lindeman, J.H., et al., *Clinical trial of doxycycline for matrix metalloproteinase-9 inhibition in patients with an abdominal aneurysm:*

- doxycycline selectively depletes aortic wall neutrophils and cytotoxic T cells.* Circulation, 2009. **119**(16): p. 2209-16.
55. Gruber, B.L., et al., *Markedly elevated serum MMP-9 (gelatinase B) levels in rheumatoid arthritis: a potentially useful laboratory marker.* Clin Immunol Immunopathol, 1996. **78**(2): p. 161-71.
 56. Morini, M., et al., *The alpha 3 beta 1 integrin is associated with mammary carcinoma cell metastasis, invasion, and gelatinase B (MMP-9) activity.* Int J Cancer, 2000. **87**(3): p. 336-42.
 57. Farina, A.R. and A.R. Mackay, *Gelatinase B/MMP-9 in Tumour Pathogenesis and Progression.* Cancers (Basel), 2014. **6**(1): p. 240-96.
 58. Nakano, Y., et al., *Matrix metalloproteinase-9 contributes to human atrial remodeling during atrial fibrillation.* J Am Coll Cardiol, 2004. **43**(5): p. 818-25.
 59. Goette, A., C. Honeycutt, and J.J. Langberg, *Electrical remodeling in atrial fibrillation. Time course and mechanisms.* Circulation, 1996. **94**(11): p. 2968-74.
 60. Allesie, M., J. Ausma, and U. Schotten, *Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation.* Cardiovasc Res, 2002. **54**(2): p. 230-46.
 61. Kostin, S., et al., *Structural correlate of atrial fibrillation in human patients.* Cardiovasc Res, 2002. **54**(2): p. 361-79.
 62. Gai, X., et al., *Association of MMP-9 gene polymorphisms with atrial fibrillation in hypertensive heart disease patients.* Clin Chim Acta, 2009. **408**(1-2): p. 105-9.
 63. Li, M., et al., *Changes in matrix metalloproteinase-9 levels during progression of atrial fibrillation.* J Int Med Res, 2014. **42**(1): p. 224-30.
 64. Lewkowicz, J., et al., *MMP-9 in atrial remodeling in patients with atrial fibrillation.* Ann Cardiol Angeiol (Paris), 2015. **64**(4): p. 285-91.
 65. Neeper, M., et al., *Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins.* J Biol Chem, 1992. **267**(21): p. 14998-5004.
 66. Mahajan, N. and V. Dhawan, *Receptor for advanced glycation end products (RAGE) in vascular and inflammatory diseases.* Int J Cardiol, 2013. **168**(3): p. 1788-94.
 67. Hofmann, M.A., et al., *RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides.* Cell, 1999. **97**(7): p. 889-901.

68. Andrassy, M., et al., *High-mobility group box-1 in ischemia-reperfusion injury of the heart*. *Circulation*, 2008. **117**(25): p. 3216-26.
69. Yan, S.D., et al., *RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease*. *Nature*, 1996. **382**(6593): p. 685-91.
70. Singh, R., et al., *Advanced glycation end-products: a review*. *Diabetologia*, 2001. **44**(2): p. 129-46.
71. Soro-Paavonen, A., et al., *Receptor for advanced glycation end products (RAGE) deficiency attenuates the development of atherosclerosis in diabetes*. *Diabetes*, 2008. **57**(9): p. 2461-9.
72. Mahajan, N., et al., *Receptor for advanced glycation end products (RAGE) and its inflammatory ligand EN-RAGE in non-diabetic subjects with pre-mature coronary artery disease*. *Atherosclerosis*, 2009. **207**(2): p. 597-602.
73. Zhang, Q., G. Li, and T. Liu, *Receptor for advanced glycation end products (RAGE): novel biomarker and therapeutic target for atrial fibrillation*. *Int J Cardiol*, 2013. **168**(5): p. 4802-4.
74. Ha, C.H., et al., *Inhibitory effect of soluble RAGE in disturbed flow-induced atherogenesis*. *Int J Mol Med*, 2013. **32**(2): p. 373-80.
75. Bucciarelli, L.G., et al., *RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice*. *Circulation*, 2002. **106**(22): p. 2827-35.
76. Gross, A., et al., *Technologies for Single-Cell Isolation*. *Int J Mol Sci*, 2015. **16**(8): p. 16897-919.
77. Ozaki, Y., et al., *Circulating CD14+CD16+ monocyte subsets as biomarkers of the severity of coronary artery disease in patients with stable angina pectoris*. *Circ J*, 2012. **76**(10): p. 2412-8.
78. Chen, M.C., et al., *Increased inflammatory cell infiltration in the atrial myocardium of patients with atrial fibrillation*. *Am J Cardiol*, 2008. **102**(7): p. 861-5.
79. Harada, M., D.R. Van Wagoner, and S. Nattel, *Role of inflammation in atrial fibrillation pathophysiology and management*. *Circ J*, 2015. **79**(3): p. 495-502.
80. Suzuki, A., et al., *Circulating intermediate CD14++CD16+ monocytes are increased in patients with atrial fibrillation and reflect the functional remodelling of the left atrium*. *Europace*, 2016.
81. Weiss, T.W., et al., *Prediction of cardiovascular events by matrix metalloproteinase (MMP)-9 in elderly men*. *Thromb Haemost*, 2010. **103**(3): p. 679-81.

82. Rival, Y., et al., *Cardiovascular drugs inhibit MMP-9 activity from human THP-1 macrophages*. DNA Cell Biol, 2004. **23**(5): p. 283-92.
83. Fang, L., et al., *Activation of peripheral blood mononuclear cells and extracellular matrix and inflammatory gene profile in acute myocardial infarction*. Clin Sci (Lond), 2010. **119**(4): p. 175-83.
84. Raposeiras-Roubin, S., et al., *Evidence for a role of advanced glycation end products in atrial fibrillation*. Int J Cardiol, 2012. **157**(3): p. 397-402.
85. Lancefield, T.F., et al., *The Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Is Associated with Persistent Atrial Fibrillation*. PLoS One, 2016. **11**(9): p. e0161715.
86. Yamagishi, S., et al., *Positive association between serum levels of advanced glycation end products and the soluble form of receptor for advanced glycation end products in nondiabetic subjects*. Metabolism, 2006. **55**(9): p. 1227-31.
87. Kato, T., et al., *AGEs-RAGE system mediates atrial structural remodeling in the diabetic rat*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2008. **19**(4): p. 415-20.
88. Hanford, L.E., et al., *Purification and characterization of mouse soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE)*. J Biol Chem, 2004. **279**(48): p. 50019-24.
89. Zhang, L., et al., *Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases*. J Biol Chem, 2008. **283**(51): p. 35507-16.
90. Falcone, C., et al., *Soluble RAGE plasma levels in patients with coronary artery disease and peripheral artery disease*. ScientificWorldJournal, 2013. **2013**: p. 584504.

8. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| ABBILDUNG 1 | |
| TYPISCHES EKG BEI ABSOLUTER ARRHYTHMIE BEI VORHOFFLIMMERN..... | 02 |
| ABBILDUNG 2 | |
| SCHEMA EINER PULMONALVENENISOLATION MIT KRYOBALLON.. | 04 |
| ABBILDUNG 3 | |
| DARSTELLUNG EINER VOLLBLUTMESSUNG DURCH DURCHFLUSSZYTOMETRIE.. | 25 |
| ABBILDUNG 4 | |
| DOTPLOT ZUR IDENTIFIZIERUNG DER MONOZYTÄREN ZELLEN..... | 26 |
| ABBILDUNG 5 | |
| DIE DREI SUBPOPULATIONEN VON MONOZYTEN..... | 27 |
| ABBILDUNG 6 | DI |
| DER RAGE-REZEPTOR WIRD VORWIEGEND AUF NICHT-KLASSISCHEN MONOZYTEN (CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺) EXPRIMIERT | 32 |
| ABBILDUNG 7 | |
| DIE RAGE EXPRESSION UNTERSCHIEDET SICH ZWISCHEN GESUNDEN PROBANDEN UND PATIENTEN MIT KHK | 34 |
| ABBILDUNG 8 | |
| PATIENTEN MIT VORHOFFLIMMERN ZEIGEN NIEDRIGERE WERTE DER RAGE EXPRESSION ALS PATIENTEN MIT ANDEREN SUPRAVENTRIKULÄREN RHYTHMUSSTÖRUNGEN | 36 |
| ABBILDUNG 9 | |
| RAGE AUF KLASSISCHEN MONOZYTEN VOR UND NACH ABLATION..... | 38 |
| ABBILDUNG 10 | |
| RAGE AUF INTERMEDIÄREN MONOZYTEN VOR UND NACH ABLATION | 38 |
| ABBILDUNG 11 | |
| RAGE AUF NICHT-KLASSISCHEN MONOZYTEN VOR UND NACH ABLATION..... | 39 |
| ABBILDUNG 12 | |
| MMP-9 WIRD IN ALLEN DREI SUBTYPEN GLEICHARTIG EXPRIMIERT | 40 |
| ABBILDUNG 13 | |
| PATIENTEN MIT KHK WEISEN SIGNIFIKANT MEHR ZELLULÄRES MMP-9 AUF | 42 |

| | |
|--------------|---|
| ABBILDUNG 14 | |
| | PATIENTEN MIT VORHOFFLIMMERN EXPRIMIEREN SIGNIFIKANT MEHR ZELLULÄRES MMP-9 IN MONOZYTEN ALS PATIENTEN MIT KHK 43 |
| ABBILDUNG 15 | |
| | PATIENTEN MIT VORHOFFLIMMERN EXPRIMIEREN SIGNIFIKANT MEHR ZELLULÄRES MMP-9 IN MONOZYTEN ALS PATIENTEN MIT ANDEREN SVRS 45 |
| ABBILDUNG 16 | |
| | MMP-9 IN KLASSISCHEN MONOZYTEN VOR UND NACH ABLATION 47 |
| ABBILDUNG 17 | |
| | MMP-9 IN INTERMEDIÄREN MONOZYTEN VOR UND NACH ABLATION 47 |
| ABBILDUNG 18 | |
| | MMP-9 IN NICHT-KLASSISCHEN MONOZYTEN VOR UND NACH ABLATION 48 |
| ABBILDUNG 19 | |
| | VERGLEICH DER QUANTITATIVEN VERTEILUNG DER MONOZYTEN-SUBTYPEN ZWISCHEN GESUNDEN PROBANDEN UND PROBANDEN MIT KHK 49 |
| ABBILDUNG 20 | |
| | VERGLEICH DER QUANTITATIVEN VERTEILUNG DER MONOZYTEN-SUBTYPEN ZWISCHEN PROBANDEN MIT VHF UND PROBANDEN MIT ANDEREN SVRS 50 |

9. Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| TABELLE 1 | |
| DIE VERSCHIEDENEN VOLLBLUTFÄRBUNGEN FÜR DIE FACS-MESSUNG..... | 23 |
| TABELLE 2 | |
| BESCHREIBUNG DER PATIENTENKOLLEKTIVE MIT STABILER ANGINA PECTORIS UND VORHOFFLIMMERN..... | 29 |
| TABELLE 3 | |
| BESCHREIBUNG DER KOLLEKTIVE MIT VORHOFFLIMMERN UND ANDEREN SUPRAVENTRIKULÄREN RHYTHMUSSTÖRUNGEN | 31 |
| TABELLE 4 | |
| RAGE EXPRESSION (MFI) IM VERGLEICH ZWISCHEN GESUNDEN PROBANDEN UND PATIENTEN MIT KHK..... | 33 |
| TABELLE 5 | |
| RAGE EXPRESSION (MFI) IM VERGLEICH ZWISCHEN PATIENTEN MIT VORHOFFLIMMERN UND PROBANDEN IM SINUSRHYTHMUS..... | 35 |
| TABELLE 6 | |
| VERGLEICH DER MONOZYTÄREN RAGE EXPRESSION VOR UND NACH ABLATION AUF DEN DREI VERSCHIEDENEN MONOZYTEN-SUBPOPULATIONEN..... | 37 |
| TABELLE 7 | |
| VERGLEICH DER MMP-9 EXPRESSION IN MONOZYTEN-SUBPOPULATIONEN GESUNDER UND KARDIOVASKULÄR VORBELASTETER PROBANDEN | 41 |
| TABELLE 8 | |
| VERGLEICH DER MMP-9 EXPRESSION ZWISCHEN PATIENTEN MIT SINUSRHYTHMUS UND PATIENTEN MIT VORHOFFLIMMERN | 44 |
| TABELLE 9 | |
| VERGLEICH DER MONOZYTÄREN MMP-9 EXPRESSION VOR UND NACH ABLATION BEI VORHOFFLIMMERN | 46 |

10. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen, Abteilung Innere Medizin 3 (Schwerpunkte: Kardiologie und Kreislauferkrankungen) unter Betreuung von Prof. Dr. med Peter Seizer durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr.med. Peter Seizer.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Klaudia Povasec (MTA) von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Saskia Ungern-Sternberg.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den
