

Aus dem  
Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg  
Leipziger Straße 44  
39120 Magdeburg

**Die Effekte des Gerinnungsfaktors Xa auf atriale  
Kardiomyozyten der HL-1 Zelllinie**

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von  
aus  
Magdeburg

Lukas Moritz Ruf  
Tuttlingen  
2023

# ***Dokumentationsblatt***

## **Bibliographische Beschreibung**

Ruf, Lukas Moritz

Die Effekte des Gerinnungsfaktors Xa auf atriale Kardiomyozyten der HL-1 Zelllinie  
- 2023. - 103 Bl., 25 Abb., 14 Tab., 2 Anl.

## **Kurzreferat**

Das Vorhofflimmern (VHF), gekennzeichnet durch irreguläre, hochfrequente Kontraktionen der Vorhöfe des Herzens, hat eine immer größere klinische Relevanz. Die Gründe hierfür sind u.a. die steigende Prävalenz und die durch VHF hervorgerufenen thromboembolischen Komplikationen. Das sogenannte atriale Remodeling ist u.a. durch eine Vorhofdilatation und einen fibrotischen Umbau gekennzeichnet. Dadurch hält sich das VHF selbst aufrecht und bildet einen prokoagulatorischen Zustand. Spronk et al. (2017) zeigten an transgenen Mäusen mit einem prokoagulatorischen Phänotyp, dass Hyperkoagulabilität die Anfälligkeit für VHF und die Kollagenablagerung in den Vorhöfen erhöhte. So scheint die Hyperkoagulation nicht nur die Folge von VHF zu sein, sondern auch zur Entstehung und Aufrechterhaltung beizutragen (Spronk et al., 2017). Denn Gerinnungsfaktoren können über Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) Einfluss auf Zellen ausüben. An humanen Herzvorhofschnitten stimulierte der aktivierte Gerinnungsfaktor X (FXa) PAR-vermittelt inflammatorische Signalwege (Bukowska et al., 2013). Das Herzgewebe besteht aus Kardiomyozyten, Endothelzellen, perivaskulären Zellen und Fibroblasten (Zhou & Pu, 2016). Um die Pathophysiologie des atrialen Remodelings weiter zu entschlüsseln, wurden die Effekte des FXa auf Kardiomyozyten der murinen „Heart Like-1“ (HL-1) Zelllinie untersucht. Es wurde eine PAR1-, PAR2- und PAR4-Expression in den Kardiomyozyten festgestellt. In den *in vitro* Experimenten zeigte sich nach Inkubation mit FXa (5 nM–100 nM; 15 min–24 h) und PAR1/-2-Agonisten (20 µM; 15 min–24 h) keine signifikanten Änderungen der Expression von PAR1, PAR2 und PAR4 und der nachfolgenden intrazellulären Signalkaskade. Hierbei wurde keine Änderung in der Phosphorylierung von ERK1/2 oder von NF-κB nachgewiesen. Zudem zeigte sich keine Expressionsänderung von ICAM-1, VCAM-1, FN, CXCR1, CTGF, TGF-β1, NOX2 und GATA4. Somit konnte kein FXa-vermittelter, PAR-abhängiger Einfluss auf Kardiomyozyten der HL-1 Zelllinie festgestellt werden. Durchaus könnte FXa Effekte auf andere Zelltypen wie z.B. Fibroblasten haben und Einfluss auf Kardiomyozyten über die Interaktionen im Zellverband nehmen.

# ***Inhaltsverzeichnis***

<b>Dokumentationsblatt.....</b>	<b>II</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>1 Einführung .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Vorhofflimmern (VHF) .....</b>	<b>13</b>
1.1.1 Entdeckung, Epidemiologie und Risikofaktoren .....	13
1.1.2 Klassifizierung, Symptome und Komplikationen .....	14
1.1.3 Therapie .....	15
1.1.4 Pathophysiologische Grundlagen des VHF .....	16
1.1.5 Förderung eines prokoagulatorischen Zustandes durch VHF .....	18
<b>1.2 Protease-aktivierte Rezeptoren und inflammatorische Signalkaskade ....</b>	<b>19</b>
1.2.1 Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR).....	19
1.2.2 Mitogen-aktivierte Proteinkinase ERK1/2.....	21
1.2.3 Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B Untereinheit p65 .....	22
1.2.4 Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und Fibronektin (FN).....	22
1.2.5 Immunrezeptoren CXCR1 und CXCR2.....	23
1.2.6 CTGF und TGF- $\beta$ 1: Zwei Biomarker der kardialen Fibrose.....	23
1.2.7 NADPH-Oxidase 2 (NOX2).....	24
1.2.8 GATA4: Ein Marker der kardialen Hypertrophie .....	24
<b>1.3 Plasmatische Gerinnungskaskade, Faktor Xa und Rolle der PAR.....</b>	<b>25</b>
1.3.1 Gerinnungsfaktor X (FX).....	25
1.3.2 Effekte der Gerinnungsfaktoren außerhalb der Blutgerinnung .....	25
1.3.3 Förderung von VHF durch Hyperkoagulabilität .....	26
1.3.4 Mögliche protektive Effekte der FXa-Inhibitoren .....	26
<b>1.4 <i>In vitro</i> Experimente an Kardiomyozyten der HL-1 Zelllinie .....</b>	<b>27</b>
<b>1.5 Ziele der Arbeit .....</b>	<b>28</b>
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Zellkultur .....</b>	<b>29</b>
2.1.1 Kultivierung der HL-1 Zellen .....	29
2.1.2 Passagieren der HL-1 Zellen und Einfrieren .....	30
2.1.3 Zellexperimente.....	30

<b>2.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>31</b>
2.2.1	Isolation und Quantifizierung der RNA.....	31
2.2.2	cDNA Synthese .....	32
2.2.3	RealTime Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	32
<b>2.3</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b> .....	<b>34</b>
2.3.1	Proteinisolation und -bestimmung.....	34
2.3.2	Diskontinuierliche Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	34
2.3.3	Western Blot.....	35
2.3.4	Immundetektion.....	36
<b>2.4</b>	<b>Statistische Analyse</b> .....	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Expression von PAR1, PAR2 und PAR4 und der Einfluss von FXa und PAR1/-2-Agonisten</b> .....	<b>38</b>
3.1.1	Expression von PAR1, PAR2 und PAR4 .....	38
3.1.2	Inkubation mit dem aktivierten Gerinnungsfaktor X.....	38
3.1.3	Der mögliche Einfluss der PAR1- und PAR2-Agonisten auf die PAR1-Expression .....	43
<b>3.2</b>	<b>Der mögliche Einfluss von FXa und PAR1/-2-Agonisten auf die Extracellular-Signal Regulated Kinases (ERK)</b> .....	<b>47</b>
<b>3.3</b>	<b>Transkriptionsfaktor NF-<math>\kappa</math>B: Mögliche Effekte von FXa und PAR1/-2-Agonisten auf die Untereinheit p65</b> .....	<b>50</b>
<b>3.4</b>	<b>Mögliche Effekte von FXa und PAR1/-2-Agonisten auf ICAM-1, VCAM-1 und Fibronektin</b> .....	<b>52</b>
<b>3.5</b>	<b>Der mögliche Einfluss von FXa und PAR1/-2-Agonisten auf den Immunrezeptor CXCR1</b> .....	<b>56</b>
<b>3.6</b>	<b>Der mögliche Einfluss von FXa und PAR1/-2-Agonisten auf die Expression von CTGF und TGF-<math>\beta</math>1</b> .....	<b>57</b>
<b>3.7</b>	<b>Der mögliche Einfluss von FXa und PAR1/-2-Agonisten auf die Expression von NOX-2</b> .....	<b>58</b>
<b>3.8</b>	<b>Mögliche Effekte von FXa und PAR1/-2-Agonisten auf den Zinkprotein-Transkriptionsfaktor GATA4</b> .....	<b>59</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>60</b>
<b>4.1</b>	<b>Hauptergebnisse</b> .....	<b>60</b>

<b>4.2</b>	<b>Die zunehmende Bedeutung des VHF .....</b>	<b>61</b>
<b>4.3</b>	<b>Expression von PAR1, PAR2 und PAR4 auf Kardiomyozyten der HL-1 Zelllinie.....</b>	<b>62</b>
<b>4.4</b>	<b>Fehlende Effekte des FXa auf Kardiomyozyten der HL-1 Zelllinie .....</b>	<b>63</b>
4.4.1	Fehlende Effekte auf die Expression von PAR1, PAR2 und PAR4 in Kardiomyozyten nach FXa Stimulation .....	63
4.4.2	Fehlende Aktivierung der inflammatorischen Signalkaskade in Kardiomyozyten der HL-1 Zelllinie durch FXa.....	64
4.4.3	Fehlende Aktivierung der PAR auf Kardiomyozyten der HL-1 Zelllinie durch PAR1- und PAR2-Agonisten.....	67
<b>4.5</b>	<b>Mögliche Zielzellen des FXa .....</b>	<b>68</b>
4.5.1	Die Effekte des FXa auf Kardiomyozyten .....	68
4.5.2	Der Einfluss von FXa auf Fibroblasten.....	68
<b>4.6</b>	<b>Mögliche klinische Relevanz .....</b>	<b>70</b>
<b>4.7</b>	<b>Limitationen der Arbeit .....</b>	<b>72</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>74</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>75</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>95</b>
	<b>Ehrenerklärung.....</b>	<b>96</b>
	<b>Darstellung des Bildungsweges .....</b>	<b>97</b>
	<b>Anlagen.....</b>	<b>98</b>
	<b>Verwendete Chemikalien, Materialien und Geräte: .....</b>	<b>98</b>
	<b>Poster:.....</b>	<b>103</b>

# **Abkürzungsverzeichnis**

Ala	Alanin
ANOVA	Analysis of variance (dt. Varianzanalyse)
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APC	Aktiviertes Protein C
Arg	Arginin
BAFFR	B-cell-activating factor belonging to TNF family receptor
BCA	Bicinchoninic acid
BE	Belgien
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BMI	Body-Mass-Index
CA	Kanada
cDNA	Complementary DNA
CH	Schweiz
CN	China
COS	CV-1 in Origin, carrying SV40
CTGF	Connective tissue growth factor
CXCR1	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 1
CXCR2	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2
DE	Deutschland
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOAK	Direkte orale Antikoagulantien
DS	Downstream
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EKG	Elektrokardiogramm
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
ESC	European Society of Cardiology
EZM	Extrazellulärmatrix
FBS	Fetal bovine serum
FN	Fibronectin
FIIa	Aktivierter Gerinnungsfaktor II, Thrombin
FXa	Aktivierter Gerinnungsfaktor X
GATA4	GATA binding protein 4
GB	Großbritannien
GIT	Gastrointestinaltrakt
GLA	Gamma-Carboxyglutaminsäure
HBV	Hepatitis-B-Virus

HEL	Human erythroleukemia
HIV-1	Humanes Immundefizienz-Virus 1
HL-1 Zellen	Heart Like-1 Zellen
HTLV-1	Humanes T-Zell-Leukämie-Virus 1
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IL-1	Interleukin-1
IL-2	Interleukin-2
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
Ile	Isoleucin
INR	International Normalized Ratio
JP	Japan
KHK	Koronare Herzkrankheit
LPS	Lipopolysaccharide
LT $\beta$ R	Lymphotoxin beta receptor
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MHC- $\beta$	Myosin heavy chain beta
MI	Myocardial infarction
mRNA	Messenger RNA
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduzierte Form
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NOX2	NADPH-Oxidase 2
ns	Nicht signifikant
NYHA	New York Heart Association
OAC	Orale Antikoagulation
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor, Protease-aktivierte Rezeptoren
PAR1-AG	Protease-aktivierter Rezeptor 1 Agonist
PAR2-AG	Protease-aktivierter Rezeptor 2 Agonist
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PLC	Phospholipase C
PTCA	Percutaneous transluminal coronary angioplasty
RANK	Receptor activator of NF- $\kappa$ B
RAS	Renin-Angiotensin-System
RF	Risikofaktor

RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species (dt. Reaktive Sauerstoffspezies)
RPLP0	Ribosomal protein lateral stalk subunit P0
RT	Real Time
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SE	Schweden
SEM	Standard error of the mean (dt. Standardfehler)
Ser	Serin
SF-36	36-item short-form survey
slope	dt. Steigung der Standardkurve
SMC	Smooth muscle cells
SR	Sinusrhythmus
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TBS	Tris buffered saline
TGF- $\beta$ 1	Transforming growth factor beta 1
Thr	Threonin
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRP	Transient receptor potential
US	Upstream
US	USA
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (dt. Endothelwachstumsfaktor)
VHF	Vorhofflimmern
VKA	Vitamin-K-Antagonisten



# ***Tabellenverzeichnis***

<b>Tabelle 1:</b>	Kulturmedien der HL-1 Zellen .....	29
<b>Tabelle 2:</b>	Aktivierter Gerinnungsfaktor X (FXa) und PAR1- und PAR2- Agonisten .....	31
<b>Tabelle 3:</b>	cDNA-Synthese-Kit.....	32
<b>Tabelle 4:</b>	Synthese der cDNA .....	32
<b>Tabelle 5:</b>	Für die RT- PCR verwendete Reagenzien .....	32
<b>Tabelle 6:</b>	Für die RT-PCR verwendete Maus-Primersequenzen .....	33
<b>Tabelle 7:</b>	Die Zyklen der RT-PCR .....	33
<b>Tabelle 8:</b>	Herstellung des Trenn- und Sammelgels .....	34
<b>Tabelle 9:</b>	Zusammensetzung des Transferpuffers.....	35
<b>Tabelle 10:</b>	Für die Immundetektion verwendete Primärantikörper .....	36
<b>Tabelle 11:</b>	Für die Immundetektion verwendete Sekundärantikörper .....	37
<b>Tabelle 13:</b>	Chemikalien.....	98
<b>Tabelle 14:</b>	Materialien und Geräte .....	100

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b>	Übersicht über das VHF-induzierte atriale Remodeling und das Substrat zu dessen Aufrechterhaltung (Jalife & Kaur, 2015 Atrial remodeling, fibrosis, and atrial fibrillation. Trends Cardiovasc Med, 25(6), p 476), mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.....	17
<b>Abbildung 2:</b>	Schematischer Aufbau des Protease-aktivierten Rezeptors 1 (S. F. Steinberg, 2005 The cardiovascular actions of protease-activated receptors. Mol Pharmacol, 67(1), p 3), mit freundlicher Genehmigung von der American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics (ASPET).....	20
<b>Abbildung 3:</b>	Proteinexpression von PAR1 in HL-1 Zellen nach 4-stündiger Inkubation mit steigenden FXa-Konzentrationen (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM).....	39
<b>Abbildung 4:</b>	Proteinexpression von PAR1 in HL-1 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit steigenden FXa-Konzentrationen (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM).....	40
<b>Abbildung 5:</b>	Proteinexpression von PAR2 in HL-1 Zellen nach 4- und 24-stündigen Inkubationen mit steigenden FXa-Konzentrationen (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM).....	41
<b>Abbildung 6:</b>	Proteinexpression von PAR4 in HL-1 Zellen nach 4- und 24-stündigen Inkubationen mit steigenden FXa-Konzentrationen (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM).....	42
<b>Abbildung 7:</b>	mRNA-Expression von PAR1 und PAR4 in HL-1 Zellen nach 4- und 24-stündigen Inkubationen mit steigenden Konzentrationen des FXa (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM und 100 nM) .....	43
<b>Abbildung 8:</b>	Proteinexpression von PAR1 in HL-1 Zellen nach 4- und 24-stündigen Inkubationen mit den PAR1- und PAR2-Agonisten in einer Konzentration von je 20 µM. ....	44
<b>Abbildung 9:</b>	Proteinexpression von PAR2 in HL-1 Zellen nach 4- und 24-stündigen Inkubationen mit den PAR1- und PAR2-Agonisten in einer Konzentration von je 20 µM. ....	45
<b>Abbildung 10:</b>	Proteinexpression von PAR4 in HL-1 Zellen nach 4- und 24-stündigen Inkubationen mit den PAR1- und PAR2-Agonisten in einer Konzentration von je 20 µM. ....	46

<b>Abbildung 11:</b> mRNA-Expression von PAR1 und PAR4 in HL-1 Zellen nach 4- und 24-stündigen Inkubationen mit den PAR1- und PAR2-Agonisten in einer Konzentration von je 20 µM .....	47
<b>Abbildung 12:</b> Proteinexpression von pERK1/2 in HL-1 Zellen nach 15-, 30-, 60-minütigen und 4- und 24-stündigen Inkubationen mit den PAR1- und PAR2-Agonisten in einer Konzentration von je 20 µM.....	48
<b>Abbildung 13:</b> Proteinexpression von pERK1/2 in HL-1 Zellen nach 15-, 30-, 60-minütigen und 4- und 24-stündigen Inkubationen mit steigenden Konzentrationen des FXa (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM). .....	49
<b>Abbildung 14:</b> Proteinexpression von Phospho-NF-κB UE p65 (pp65) in HL-1 Zellen nach 15-, 30-, und 60-minütigen und 4- und 24-stündigen Inkubationen mit steigenden Konzentrationen des FXa (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM).....	50
<b>Abbildung 15:</b> Proteinexpression von Phospho-NF-κB UE p65 (pp65) in HL-1 Zellen nach 15-, 30- und 60-minütigen und 4- und 24-stündigen Inkubationen mit den PAR1- und PAR2- Agonisten in einer Konzentration von je 20 µM. ....	51
<b>Abbildung 16:</b> Proteinexpression von ICAM-1 (85-110 kDa) in HL-1 Zellen nach 15-, 30- und 60-minütigen und 4- und 24-stündigen Inkubationen mit steigenden FXa-Konzentrationen (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM). ....	53
<b>Abbildung 17:</b> Die Proteinexpression von ICAM-1 (85-110 kDa) in HL-1 Zellen nach 15-, 30- und 60-minütigen und 4- und 24-stündigen Inkubationen mit den PAR1- und PAR2-Agonisten in einer Konzentration von je 20 µM. ....	54
<b>Abbildung 18:</b> mRNA-Expression von ICAM-1 in HL-1 Zellen nach 4- und 24-stündigen Inkubationen mit dem FXa in verschiedenen Konzentrationen (5nM, 10nM, 20nM, 30nM, 50nM, 100nM) und den PAR1- und PAR2-Agonisten in einer Konzentration von je 20 µM .....	55
<b>Abbildung 19:</b> mRNA-Expression von VCAM-1 in HL-1 Zellen nach 4- und 24-stündigen Inkubationen mit FXa in verschiedenen Konzentrationen (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM, 100 nM) und den PAR1- und PAR2-Agonisten in einer Konzentration von je 20 µM.....	55
<b>Abbildung 20:</b> mRNA-Expression von Fibronectin in HL-1 Zellen nach 4- und 24-stündigen Inkubationen mit FXa in verschiedenen Konzentrationen (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM, 100 nM) und den PAR1- und PAR2-Agonisten in einer Konzentration von je 20 µM.....	56

<b>Abbildung 21:</b> mRNA-Expression von CXCR1 in HL-1 Zellen nach 4- und 24-stündigen Inkubationen mit FXa in verschiedenen Konzentrationen (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM) und den PAR1- und PAR2-Agonisten in einer Konzentration von je 20 µM.....	57
<b>Abbildung 22:</b> mRNA-Expression von CTGF in HL-1 Zellen nach 4- und 24-stündigen Inkubationen mit FXa in verschiedenen Konzentrationen (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM, 100 nM) und PAR1- und PAR2-Agonisten in einer Konzentration von je 20 µM.....	57
<b>Abbildung 23:</b> mRNA-Expression von TGF-β1 in HL-1 Zellen nach 4- und 24-stündigen Inkubationen mit FXa in verschiedenen Konzentrationen (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM, 100 nM) und den PAR1- und PAR2-Agonisten in einer Konzentration von je 20 µM.....	58
<b>Abbildung 24:</b> mRNA-Expression von NOX-2 in HL-1 Zellen nach 4- und 24-stündigen Inkubationen mit FXa in verschiedenen Konzentrationen (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM, 100 nM) und den PAR1- und PAR2-Agonisten in einer Konzentration von je 20 µM.....	59
<b>Abbildung 25:</b> mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors GATA4 in HL-1 Zellen nach 4- und 24- stündigen Inkubationen mit FXa in verschiedenen Konzentrationen (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM, 100 nM) und den PAR1- und PAR2-Agonisten in einer Konzentration von je 20 µM .....	59

# 1 Einführung

## 1.1 Vorhofflimmern (VHF)

### 1.1.1 Entdeckung, Epidemiologie und Risikofaktoren

James MacKenzie beobachtete 1905 erstmals, dass bei einer Patientin mit paroxysmaler Tachykardie die a-Welle im Venenpuls nicht mehr zu detektieren war (Aronson, 2005; Mackenzie, 1905; Silverman, 1994). Willem Einthoven zeigte daraufhin 1906 das erste EKG mit Vorhofflimmern, welches er als „pulsus inaequalis et irregularis“ beschrieb (Aronson, 2005; Silverman, 1994). Diese beiden Entdeckungen ermöglichten es schließlich 1909 Thomas Lewis in London, das VHF als „auricular fibrillation“ zu beschreiben (Lewis, 1909).

Die Prävalenz des Vorhofflimmerns schätzt man in der Allgemeinbevölkerung in den Industrienationen auf 1,5–2% (Camm et al., 2012). In Deutschland liegt die Prävalenz bei den 35- bis 74-Jährigen bei 2,5% (Schnabel et al., 2012) und in den USA bei den über 40-Jährigen bei 2,3% (Feinberg et al., 1995). Die Prävalenz und die Inzidenz des VHF stiegen in den letzten Jahrzehnten an (Chugh et al., 2014; Miyasaka et al., 2006; Wolf et al., 1996). In einer Auswertung der Framingham-Herz-Studie zeigte der Vergleich zweier 10-Jahreszeiträume 1958–1967 vs. 1998–2007 pro 1000 Personenjahre einen vierfachen Anstieg der altersadjustierten Periodenprävalenz (Männer 20,4 vs. 96,2; Frauen 13,7 vs. 49,4,  $p_{\text{trend}} < 0,0001$ ) und eine Verdreifachung der altersadjustierten Inzidenzrate (Männer 3,7 vs. 13,4; Frauen 2,5 vs. 8,6,  $p_{\text{trend}} < 0,0001$ ) (Schnabel, Yin, et al., 2015). Die Inzidenz des VHF steigt zudem mit höherem Lebensalter an, es handelt sich dementsprechend vor allem um eine Erkrankung älterer Menschen (Kannel et al., 1983). So beschrieben Feinberg et al., dass die Prävalenz ab dem 40. Lebensjahr zu steigen begann und die Hälfte aller Patienten mit VHF in den USA über 75 Jahre war (Feinberg et al., 1995). Auch in Deutschland zeigten Schnabel et al. einen Anstieg der Prävalenz des VHF mit steigendem Lebensalter: Während für 35- bis 44-Jährige die Prävalenz für Männer bei 0,7% und für Frauen bei 0,3% lag, stieg sie für 65- bis 74-Jährige bei Männern auf bis zu 10,6% und bei Frauen auf bis zu 4,9% (Schnabel et al., 2012).

Schnabel et al. charakterisierten durch Analysen der Gutenberg Health Study in einer Studienkohorte kardiovaskuläre Risikofaktoren, kardiovaskuläre Erkrankungen und echokardiographische Charakteristika für das Vorhofflimmern. Hierbei zeigte sich, dass Patienten mit VHF häufiger kardiovaskuläre Risikofaktoren wie z.B. höheres Alter, erhöhten Body-Mass-Index (BMI), Hypertonie und Dyslipidämie aufwiesen, öfter an kardiovaskulären Erkrankungen wie Herzinsuffizienz oder Schlaganfällen litten und auch

echokardiographisch häufiger eine linksventrikuläre Hypertrophie und eine verminderte linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) zeigten (Schnabel, Johannsen, et al., 2015).

### **1.1.2 Klassifizierung, Symptome und Komplikationen**

Das VHF kann folgendermaßen klassifiziert werden (Fuster et al., 2011; Kirchhof et al., 2016):

- erstmals detektiertes VHF
- paroxysmales VHF (<7 Tage, meistens <24h, eventuell wiederkehrend)
- persistierendes VHF (>7 Tage, eventuell wiederkehrend)
- langanhaltendes, persistierendes VHF (>1 Jahr)
- permanentes VHF (Kardioversion nicht erfolgreich bzw. nicht versucht)
- sekundäres VHF (z.B. durch einen Herzinfarkt, Herz-OP, Peri- oder Myokarditis, Hyperthyreose etc.)

Dorian et al. (2000) zeigten, dass die gesundheitsbezogene Lebensqualität, welche durch den Fragebogen SF-36 (Ware & Sherbourne, 1992) erfasst wurde, bei Patienten mit VHF, verglichen mit gesunden Probanden, signifikant reduziert war. Des Weiteren war die gesundheitsbezogene Lebensqualität entweder ähnlich oder sogar schlechter als bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) mit Zustand nach perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (PTCA) oder einem Herzinfarkt (Dorian et al., 2000). Unter anderem wurden folgende Symptome des VHF beschrieben: Palpitationen, Dyspnoe, Brustschmerzen, Synkopen, Schwindelanfälle und Fatigue (Levy et al., 1999). Um die Schwere der Symptomatik zu erfassen und dadurch eine symptomorientierte Behandlung zu ermöglichen, wurde die Zuhilfenahme der „modified European Heart Rhythm Association (mEHRA) symptom scale“ empfohlen (Kirchhof et al., 2016, pp. 1622-1623). Diese bezieht sich vor allem auf die Beeinträchtigungen bei den täglichen Aktivitäten, welche durch das VHF entstehen (Kirchhof et al., 2007; Wynn et al., 2014). Bis zu 38,2% der Patienten mit VHF sind asymptomatisch (EHRA 1) (Freeman et al., 2015).

Die größte Gefahr bei VHF besteht durch thromboembolische Ereignisse. Hierbei spielt es keine Rolle, ob es sich um paroxysmales oder anhaltendes (persistierendes oder permanentes) VHF handelt, da beide Subtypen das gleiche Risiko für diese Ereignisse haben (Hohnloser et al., 2007). Marini et al. (2005) konnten elektrokardiographisch nachweisen, dass 24,6% der Patienten mit einem ischämischen Schlaganfall gleichzeitig VHF hatten. Knapp ein Viertel dieses akuten Krankheitsbildes war daher auf eine kardioembolische Ursache zurückzuführen. Diese Patienten zeigten zudem eine

schlechtere Prognose beispielsweise im Langzeitüberleben (25,4% vs. 49,7%;  $p < 0,0001$ ; log-rank test) (Marini et al., 2005).

Weiterhin war VHF bei Frauen und Männern mit einem erhöhten Langzeitrisiko für eine Herzinsuffizienz und mit einer erhöhten Gesamtmortalität assoziiert, verglichen mit Personen ohne diese Herzrhythmusstörung (Stewart et al., 2002). Beinahe jeder dritte ambulante Patient mit VHF hatte innerhalb eines Jahres mindestens einen Krankenhausaufenthalt (B. A. Steinberg et al., 2014). Zudem stieg in den vergangenen Jahren weltweit die Zahl der Krankenhausaufnahmen aufgrund von VHF an (Wattigney et al., 2003; C. X. Wong et al., 2012).

### **1.1.3 Therapie**

In der ESC-Leitlinie wurde ein zielorientiertes Therapiekonzept beschrieben, wobei zwischen einer für den Patienten prognostisch relevanten Therapie (Kontrolle der kardiovaskulären Komorbiditäten und Antikoagulation), einer vorwiegend symptomatischen Therapie (Herzfrequenzkontrolle und Rhythmuskontrolle) sowie für die Umsetzung der Therapie bzw. Patientenadhärenz wichtigen Maßnahmen (Aufklärung über Erkrankung und weiterführende Betreuung der Patienten) unterschieden wurde (Kirchhof et al., 2016, pp. 1630-1631).

Bei der Therapie des VHF spielt die Thromboembolieprophylaxe eine wichtige Rolle. Zur Risikostratifizierung des Schlaganfallrisikos bei VHF wird der sogenannte  $\text{CHA}_2\text{DS}_2\text{-VASc}$ -Score herangezogen (Lip et al., 2010). Bei fehlender Kontraindikation wird von der ESC-Leitlinie 2016 bei einem  $\text{CHA}_2\text{DS}_2\text{-VASc}$ -Score  $\geq 2$  bei Männern bzw.  $\geq 3$  bei Frauen eine orale Antikoagulation empfohlen. Bei einem  $\text{CHA}_2\text{DS}_2\text{-VASc}$ -Score von 1 bei Männern bzw. 2 bei Frauen sollte eine orale Antikoagulation in Erwägung gezogen werden (Kirchhof et al., 2016).

In der Antikoagulation unterscheidet man Vitamin-K-Antagonisten (VKA) von direkten oralen Antikoagulantien (DOAK). Vor allem aufgrund der vorhersagbaren zeitlichen Wirkung und des dadurch entbehrlichen Therapiemonitorings gewannen DOAK zunehmend an klinischer Bedeutung und wurden vermehrt verschrieben (Kirchhof et al., 2016, p. 1633; Olesen et al., 2015). Morgan et al. zeigten auf, wie wichtig es unter einer Therapie mit Warfarin für das Outcome in Bezug auf das Schlaganfallrisiko und die Gesamtmortalität war, dass die Patienten eine Ziel-INR von 2-3 hielten (Morgan et al., 2009). Während Ruff et al. (2014) in einer groß angelegten Metaanalyse herausfanden, dass DOAK gegenüber Warfarin im Nebenwirkungsprofil das Risiko für intrakranielle Blutungen halbierten (RR 0,48; 95% KI 0,39-0,59  $p < 0,0001$ ), allerdings das Risiko für gastrointestinale Blutungen erhöhten (RR 1,25; 95% KI 1,01-1,55  $p = 0,043$ ) (Ruff et al., 2014), empfahl auch die ESC-Leitlinie 2016 bei entsprechendem  $\text{CHA}_2\text{DS}_2\text{-VASc}$ -Score

(siehe oben) eine Antikoagulation mit DOAK (Kirchhof et al., 2016, p. 1632). Bei Patienten mit VHF und einer mechanischen Herzklappe oder einer Mitralklappenstenose galten allerdings auch weiterhin die VKA als Therapie der Wahl (Kirchhof et al., 2016, p. 1632), was u.a. Eikelboom et al. (2013) für Patienten mit mechanischer Herzklappe eindrucksvoll zeigen konnten (Eikelboom et al., 2013).

#### **1.1.4 Pathophysiologische Grundlagen des VHF**

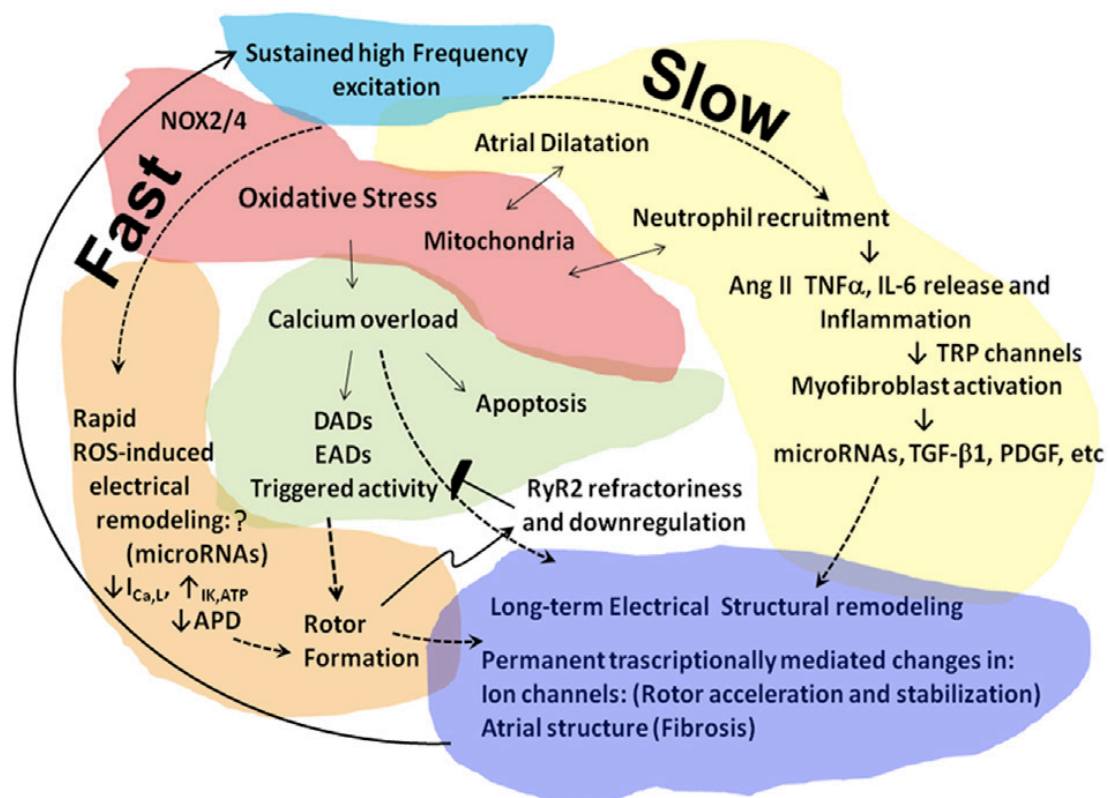
Das sogenannte atriale Remodeling kann in der Folge des VHF auftreten oder dem VHF durch eine zugrundeliegende strukturelle Herzerkrankung vorangehen (Schotten et al., 2011). Es ist u.a. durch Aktivierung und Proliferation von Fibroblasten, Hypertrophie von Kardiomyozyten und Fibrosierung gekennzeichnet und wird durch Veränderungen in den zellulären Signalkaskaden ausgelöst (Schotten et al., 2011).

Einen Überblick über diese verschiedenen intrazellulären Signalkaskaden bei VHF-induziertem atrialen Remodeling sowie dem Substrat zu dessen Aufrechterhaltung liefert Abbildung 1 (Seite 17), in welchem Signalwege mit einer schnellen („fast“) und langsamen („slow“) Kinetik unterschieden werden (Jalife & Kaur, 2015).

Zu den schnellen Veränderungen zählen Jalife und Kaur (2015) den oxidativen Stress, der durch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch die NADPH-Oxidasen 2/4 (NOX2/4) ausgelöst wird. Dieser bewirkt unmittelbare elektrophysiologische Veränderungen in den Ionenströmen, wie eine Reduzierung des sog. L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Ionenstroms ( $I_{\text{Ca,L}}$ ) und eine Erhöhung des sog. „inward rectifier“  $\text{K}^+$  Ionenstroms ( $I_{\text{K1}}$ , einwärts gleichrichtender  $\text{K}^+$  Ionenstrom). Dadurch kommt es zur Verkürzung der atrialen Aktionspotentialdauer (APD) und der Refraktärzeit, was zum Reentry-Mechanismus (rotor formation) führt (Jalife & Kaur, 2015). Außerdem kommt es durch VHF zu einer gesteigerten intrazellulären Kalziumkonzentration (Goette et al., 1996; H. Sun et al., 2001). Man geht davon aus, dass Störungen im Kalziumhaushalt zu frühen und späten Nachdepolarisationen führen (Dobrev & Nattel, 2011), die in Abbildung 1 als EADs für „early afterdepolarizations“ und DADs für „delayed afterdepolarizations“ bezeichnet werden. Diese Nachdepolarisationen fördern eine ektope, getriggerte Aktivität (Dobrev & Nattel, 2011). Außerdem kann eine gesteigerte intrazelluläre Kalziumkonzentration die Apoptose über die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien einleiten (Mattson & Chan, 2003). Zudem führt die gesteigerte intrazelluläre Kalziumkonzentration bei VHF zu einer verstärkten Calcineurin-Aktivität (Bukowska et al., 2006; C. C. Lin et al., 2004). Die erhöhte Calcineurin-Aktivität nimmt Einfluss auf die Gentranskription und steigert die mRNA-Expression der kardialen Hypertrophie-assoziierten Gene „myosin heavy chain beta“ (MHC- $\beta$ ) und Troponin I (Bukowska et al., 2006).



Weiterführend kommt es auf dem langsamen Signalweg zur Vorhofdehnung und zur Freisetzung von Hormonen wie Angiotensin II (Ang II) oder proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-6 (IL-6) (Jalife & Kaur, 2015). Ang II führt u.a. über den AT1-Rezeptor zu einer Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 (Goette et al., 2000; D. Li et al., 2001; Schotten et al., 2011) sowie zu einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) (Tsai et al., 2008). Zudem fördert die Expression und Aktivierung von „transient receptor potential“ (TRP)-Kanälen die Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten (Adapala et al., 2013; Du et al., 2010; Harada et al., 2012). Die Überexpression des Zytokins TGF- $\beta$ 1 führt zu einer Fibrosierung in Mäusevorhöfen (Nakajima et al., 2000; Verheule et al., 2004). Die Vorgänge münden in einer veränderten Genexpression, die zur Fibrosierung und elektrophysiologischen Veränderungen führt, was wiederum das VHF aufrechterhält (Jalife & Kaur, 2015).



**Abbildung 1:** Übersicht über das VHF-induzierte atriale Remodeling und das Substrat zu dessen Aufrechterhaltung (Jalife & Kaur, 2015 Atrial remodeling, fibrosis, and atrial fibrillation. Trends Cardiovasc Med, 25(6), p 476), mit freundlicher Genehmigung von Elsevier. NOX2/4: NADPH-Oxidase 2/4, ROS: reaktive Sauerstoffspezies,  $I_{Ca,L}$ : L-type  $Ca^{2+}$  current,  $I_{K1}$  inward rectifier  $K^+$  current, APD: action potential duration, rotor formation: Reentry-Mechanismus, DADs: delayed afterdepolarizations, EADs: early afterdepolarizations, Ryr2: Ryanodine receptor 2, Ang II: Angiotensin II, TRP: transient receptor potential, PDGF: platelet-derived growth factor.

Um die vielen verschiedenen, komplexen, pathophysiologischen Grundlagen des atrialen Remodelings zusammenfassend einordnen zu können, hilft das von Schotten et al. (2011) aufgestellte Modell der „four different positive-feedback loops“, die wie Zahnräder ineinandergreifen und das VHF aufrechterhalten (Schotten et al., 2011, pp. 305-306):

- „Trigger loop“ mit spontaner  $\text{Ca}^{2+}$ - Freisetzung und resultierender Ektopie
- „Electrical loop“ mit veränderten Ionenströmen, dadurch verkürzten Aktionspotentialen und erhöhtem Reentry-Mechanismus
- „Structural loop“ mit chronischer Vorhofdehnung, dadurch aktivierten Signalkaskaden mit resultierender Veränderung der extrazellulären Matrix und der elektrischen Leitung einmündend im Reentry-Mechanismus
- „Hemodynamic loop“ mit verminderter Vorhofkontraktilität und dadurch erhöhter Compliance sowie LV-Dysfunktion mit verminderter ventrikulärer Füllung, beides zu einer chronischen Vorhofdehnung führend

#### **1.1.5 Förderung eines prokoagulatorischen Zustandes durch VHF**

Die Virchow'sche Trias, bestehend aus Veränderungen von Gefäßwand, Blutstromgeschwindigkeit und Blutzusammensetzung, beschreibt pathophysiologisch die Ursachen der Bildung einer Thrombose (Brotman et al., 2004). Die Begünstigung der Thrombusentstehung bei VHF ist nicht nur auf den insbesondere im linken Vorhof veränderten Blutstrom aufgrund eines insuffizient kontrahierenden linken Vorhofes zurückzuführen. Es sind durchaus auch die anderen beiden Komponenten der Virchow'schen Trias erfüllt (Watson et al., 2009).

So gibt es in Bezug auf die Blutzusammensetzung Belege einer verstärkten primären sowie sekundären Hämostase. Dabei konnte gezeigt werden, dass das  $\beta$ -Thromboglobulin bei Patienten mit VHF im Vergleich zu Patienten mit Sinusrhythmus (SR) erhöht war (Kamath et al., 2002; Lip et al., 1996; Yamauchi et al., 1986).  $\beta$ -Thromboglobulin wird physiologisch bei der Thrombozytenaktivierung ausgeschüttet. Außerdem zeigten erhöhte D-Dimer-Spiegel eine erhöhte Thrombogenese bzw. einen erhöhten Fibrinumsatz in der plasmatischen Blutgerinnung an (Lip et al., 1995; Marin et al., 2004). Des Weiteren konnte in einem Ziegenmodell gezeigt werden, dass vierwöchiges VHF die Thrombinbildung im Plasma erhöhte, VHF also Hyperkoagulabilität induzierte (Spronk et al., 2017).

Es gibt zudem im Sinne der Virchow'schen Trias Hinweise auf spezifische Veränderungen der Gefäßwände. Nakamura et al. (2003) gelang es, bei Patienten mit VHF im linken Vorhof eine erhöhte Expression von tissue factor und von-Willebrand-Faktor im Endothel nachzuweisen. Weiterhin konnte histopathologisch eine erhöhte

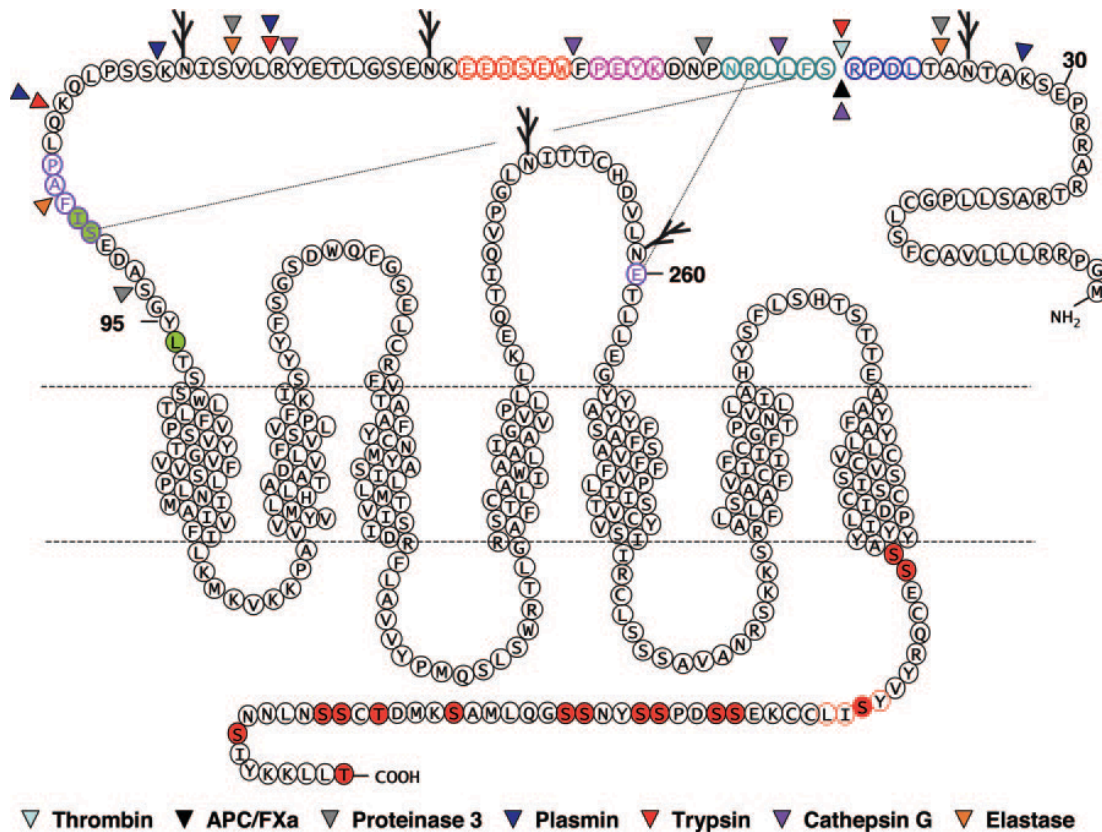
Anzahl an aktivierten T-Zellen im Endokard nachgewiesen werden, was auf eine inflammatorische Genese hindeutete (Nakamura et al., 2003). Zudem fanden Dudley et al. (2005) heraus, dass das VHF die Produktion des reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) Hyperoxid-Anions  $O_2^-$  im linken Vorhof und linken Vorhofohr erhöhte. Dies ist vermutlich auf die ebenfalls erhöhte Aktivität der NADPH- und Xanthin Oxydasen zurückzuführen (Dudley et al., 2005). Außerdem wurde in einem VHF-simulierenden Kaninchenmodell gezeigt, dass in der VHF-Gruppe die Expression des Zelladhäsionsmoleküls p-Selektin und das Auftreten „intercellular adhesion molecule 1“ (ICAM-1) positiver, adhärenter Leukozyten im Endothel des linken Vorhofohres erhöht waren (Kamiyama, 1998).

Um das atriale Remodeling besser zu verstehen und etwaige Therapiemöglichkeiten ableiten zu können, ist es essentiell, die verschiedenen zellulären Signalkaskaden aufzuschlüsseln. Daher wurde der Frage nachgegangen, ob es über die sogenannten Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR) noch weitere inflammatorische Signalkaskaden gibt, die das atriale Remodeling beeinflussen.

## **1.2 Protease-aktivierte Rezeptoren und inflammatorische Signalkaskade**

### **1.2.1 Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR)**

Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) sind sogenannte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) mit einer heptahelikalen Struktur (Abbildung 2, Seite 20), wobei man vier Isoformen unterscheidet (PAR1- PAR4) (S. F. Steinberg, 2005).



**Abbildung 2:** Schematischer Aufbau des Protease-aktivierten Rezeptors 1 (S. F. Steinberg, 2005 The cardiovascular actions of protease-activated receptors. Mol Pharmacol, 67(1), p 3), mit freundlicher Genehmigung von der American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics (ASPET).

Extrazelluläre N-terminale Region: Dreiecke: Spaltungsstellen der Proteasen (Renesto et al., 1997). Funktionell wichtige Sequenzen: Blau umrandet: Einfluss auf die Thrombinbindung/-Katalyse, Grün umrandet: gebundener Ligand (AS-Sequenz: SFLLRN), Pink umrandet: Bindungsstelle für Thrombin, Orange umrandet: saure Aminosäure Cluster, Lila umrandet: mutmaßliche Ligandenbindungsstelle, hiervon Grün gefüllt: Aminosäuren, deren Substitution durch Alanin zur fehlenden PAR1-Aktivierung durch den PAR1-Agonisten (AS-Sequenz: SFLLRN) führt, jedoch die Aktivierung durch Thrombin nicht beeinflusst (Blackhart et al., 2000).

Intrazelluläre C-terminale Region: Rot gefüllt: Potentielle Stellen für die G-Proteingekoppelte Rezeptor-Kinase vermittelte Phosphorylierung. Orange umkreist: Tyrosin basiertes YXXL-Sequenzmotiv zur Verlagerung und Internalisierung des Rezeptors.

Vu et al. (1991) gelang es, den Mechanismus der PAR anhand der Serinprotease Thrombin aufzudecken. Indem Thrombin (in Abbildung 2: hellblaues Dreieck) die extrazelluläre, N-terminale Domäne des Rezeptors zwischen den Aminosäuren Arginin (Pos. 41) und Serin (Pos. 42) proteolytisch spaltet, kann das dadurch neu entstandene und mit der Aminosäure Serin beginnende N-terminale Ende (AS-Sequenz SFLLRN, in Abbildung 2 grün umrandet) als gebundener Ligand den Rezeptor aktivieren (Vu et al., 1991). Die mutmaßliche Ligandenbindungsstelle für PAR1 ist in der Abbildung 2 lila umrandet. Hier bindet auch das synthetisch hergestellte Peptid, das die Aminosäuresequenz des gebundenen Liganden (SFLLRN) besitzt und somit als PAR1-Agonist wirkt (Scarborough et al., 1992; Vu et al., 1991). Für PAR2 sind auch

synthetische Peptide beschrieben, die als PAR2-Agonisten wirken (Nystedt et al., 1995). Zudem gibt es mittlerweile nicht-peptidische Agonisten (Gardell et al., 2008). Die PAR-Agonisten aktivieren spezifisch ihren jeweiligen Rezeptor, ohne dass eine proteolytische Spaltung der Rezeptoren und daraus resultierend ein gebundener Ligand notwendig wäre. Damit kann untersucht werden, welche Auswirkungen eine PAR-Aktivierung hat und welche intrazellulären Signalkaskaden ausgelöst werden.

Für den Protease-aktivierten Rezeptor 1 (PAR1) sind verschiedene posttranslationale Modifikationen beschrieben worden. In der von der cDNA-Sequenz vorhergesagten Form mit 47 kDa entsteht durch N-Glykosylierung eine Variante mit 66 kDa, deren Saccharidanteil die molekulare Masse also um fast ein Drittel erhöht (Brass et al., 1992). PAR werden in den unterschiedlichsten Geweben bzw. Zellen exprimiert (Macfarlane et al., 2001). So bewirkte die Aktivierung von PAR1, der als Prototyp der PAR-Familie gilt (S. F. Steinberg, 2005), beispielsweise eine Stimulierung der Thrombozytenaggregation (Andersen et al., 1999). Ebenso wurde für PAR4 nach Aktivierung auf humanen Thrombozyten eine Thrombozytenaggregation beschrieben (Kahn et al., 1998). PAR spielen unter anderem bei Atemwegserkrankungen, die durch eine Hyperreagibilität der Atemwege (Schmidlin et al., 2002) oder Asthma bronchiale (Knight et al., 2001) gekennzeichnet sind, eine Rolle. Auch bei der Schmerzübertragung sollen PAR involviert sein. So wurde nach PAR2-Aktivierung eine Hyperalgesie beschrieben (Vergnolle et al., 2001). Weiterhin konnte an transgenen Mäusen, die eine PAR1-Überexpression in Kardiomyozyten aufweisen, eine exzentrische Hypertrophie des Herzens festgestellt werden (Pawlinski et al., 2007).

Insgesamt sind die verschiedenen Effekte der PAR-Aktivierung hochkomplex. Die vielen durch PAR-Aktivierung verursachten Veränderungen betreffen vor allem inflammatorische Signalkaskaden (Heuberger & Schuepbach, 2019; Macfarlane et al., 2001). Die in dieser Arbeit untersuchten Signalwege werden im Folgenden näher beschrieben und stützen sich auf die Erkenntnisse aus den pathophysiologischen Vorgängen des atrialen Remodelings (siehe oben). Weiterführend wurde die Expression von Molekülen untersucht, die generell eine Rolle in inflammatorischen Signalkaskaden spielen.

### **1.2.2 Mitogen-aktivierte Proteinkinase ERK1/2**

Die zu den Mitogen-aktivierten Kinasen (MAPK) gehörenden „extracellular-signal regulated kinases“ (ERK) sind Serin/Threonin-Kinasen, die durch verschiedene Proteinkinasen mittels Phosphorylierung aktiviert werden und wiederum durch Phosphorylierung Substrate in verschiedenen Zellkompartimenten aktivieren (Davis, 1993). Die Aktivierung von PAR1 oder PAR2 kann zur Phosphorylierung von ERK1/2

führen (Ossovskaya & Bunnett, 2004). MAP-Kinasen des in dieser Arbeit untersuchten ERK1/2 Signalweges werden folgendermaßen aktiviert: Raf (MAPKKK) aktiviert MEK1/2 (MAPKK), die weiter ERK1/2 (MAPK) aktiviert (Pearson et al., 2001; Seger & Krebs, 1995). Durch die Signaltransduktion vom Zytoplasma in den Zellkern beeinflusst ERK Transkriptionsfaktoren und die Genexpression (Seth et al., 1992). Generell ist ERK1/2 in verschiedenen Aspekten der Zellregulation involviert, unter anderem innerhalb des Zellüberlebens und der Zellvermehrung (Chang & Karin, 2001; Meloche & Pouyssegur, 2007).

Sowohl *in vitro* an Kardiomyozyten als auch in *in vivo* an transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von ERK1/2 zur kardialen Hypertrophie führte (Bueno et al., 2000; Ueyama et al., 2000).

### **1.2.3 Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B Untereinheit p65**

NF- $\kappa$ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) ist ein ubiquitär vorkommender, primärer Transkriptionsfaktor, welcher nach Freisetzung aus dem inhibitorischen Protein I $\kappa$ B und der Translokation in den Nukleus in seiner aktiven Form als Dimer am häufigsten aus den DNA-bindenden Untereinheiten p50 und p65 zusammengesetzt wird (Baeuerle & Henkel, 1994). NF- $\kappa$ B vermittelt neben einer Differenzierung und Proliferation von Immunzellen auch inflammatorische und proliferative Prozesse in anderen Zellen über signalinduzierte Expression verschiedener Gene wie z.B. Wachstumsfaktoren und -rezeptoren (Baeuerle & Henkel, 1994; Hayden & Ghosh, 2012).

Virusinfektionen (HIV-1, HTLV-1, HBV), virale Proteine, Zytokine (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-2), bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), UV- und Röntgenstrahlung, Phorbolster und Stickstoffmonoxid aktivieren den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (Verma et al., 1995). Man unterscheidet den kanonischen vom nichtkanonischen Signalweg. Der kanonische Signalweg wird über verschiedene Rezeptoren aktiviert. Hierzu gehören u.a. die Pattern Recognition Receptors (PRRs), TNF-Rezeptoren, andere Zytokinrezeptoren sowie T- und B-Zell-Rezeptoren (Vallabhapurapu & Karin, 2009; Zhang & Sun, 2015). Der nichtkanonische Signalweg wird über eine Untergruppe der TNF-Rezeptoren wie z.B. LT $\beta$ R, RANK, BAFFR und CD40 aktiviert (S. C. Sun, 2011; Zhang & Sun, 2015). Außerdem wird der NF- $\kappa$ B Signalweg über PAR aktiviert (Buddenkotte et al., 2005; Kanke et al., 2001; Rallabhandi et al., 2008).

### **1.2.4 Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und Fibronectin (FN)**

Das zu der Immunglobulin-Superfamilie gehörende „intercellular adhesion molecule“ (ICAM-1, CD54) kann von vielen verschiedenen Zellen und Geweben exprimiert werden

und ist ein wichtiger Vermittler der inflammatorischen Antwort über die Steigerung der Adhäsion von Lymphozyten und Monozyten (Springer, 1990). Smith et al. (1991) zeigten, dass ICAM-1 sowohl auf Endothelzellen als auch auf Kardiomyozyten exprimiert wird (C. W. Smith et al., 1991). Ebenfalls gehört „vascular cell adhesion molecule 1“ (VCAM-1) zur Immunglobulin-Superfamilie, das nach Zytokinstimulation von aktivierten Endothelzellen exprimiert wird und die Bindung von Lymphozyten ermöglicht (Osborn et al., 1989). VCAM-1 konnte auf mRNA-Ebene in Kardiomyozyten nachgewiesen werden (Hattori & Kasai, 1997). Für die beiden Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 konnte man nach aktivierter Gerinnungsfaktor X (FXa)-Stimulation an „human umbilical vein endothelial cells“ (HUVEC) eine vermehrte Proteinexpression feststellen (Senden et al., 1998).

Fibronektin (FN) ist ein Hauptbestandteil der Extrazellulärmatrix (EZM) und hat Funktionen in der Embryogenese und Wundheilung (Mosher, 1984). Eine Überexpression von FN kann in fibroproliferativen Lungenerkrankungen nachgewiesen werden (Kuhn et al., 1989; Limper & Roman, 1992). Zudem wurde nach FXa-Stimulation eine Überexpression von FN in murinen Fibroblasten und Myoblasten nachgewiesen (Borensztajn et al., 2008).

### **1.2.5 Immunrezeptoren CXCR1 und CXCR2**

Die Chemokinrezeptoren CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 1 (CXCR1) und CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2 (CXCR2), die erstbeschriebenen Subtypen der Chemokinrezeptoren, stellen die Hauptchemokinrezeptoren auf neutrophilen Granulozyten dar und spielen daher vor allem eine Rolle in der angeborenen Immunität und im akuten Entzündungsgeschehen (Murphy et al., 2000). Außerdem konnte gezeigt werden, dass beide Rezeptoren im Endstadium der Herzinsuffizienz vermehrt im humanen Myokard exprimiert werden (Damas et al., 2000).

### **1.2.6 CTGF und TGF- $\beta$ 1: Zwei Biomarker der kardialen Fibrose**

Bradham et al. (1991) beschrieben erstmals das 36-38 kDa schwere und cysteinreiche Protein „connective tissue growth factor“ (CTGF) (Bradham et al., 1991). CTGF spielt in der Embryogenese, Zelldifferenzierung, Angiogenese, Wundheilung und insbesondere im fibrotischen Umbau von Geweben eine Rolle (Brigstock, 1999; Daniels et al., 2009; Ihn, 2002; Kubota & Takigawa, 2007; Oemar & Luscher, 1997). Tatsächlich korrelierte der CTGF-Spiegel in humanen Kardiomyozyten mit dem myokardialen Fibrosegrad (Koitabashi et al., 2007). An glatten Gefäßmuskelzellen von Ratten konnte belegt werden, dass Thrombin über PAR1 die CTGF-Expression steigerte (W. C. Ko et al., 2012).

TGF- $\beta$  induzierte sowohl in Kardiomyozyten als auch in kardialen Fibroblasten die Expression von CTGF (Chen et al., 2000). An transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von TGF- $\beta$ 1 zur atrialen Fibrose führte (Nakajima et al., 2000) und dadurch die Anfälligkeit für Vorhofflimmern erhöhte (Verheule et al., 2004).

### **1.2.7 NADPH-Oxidase 2 (NOX2)**

Im kardiovaskulären System wird NOX2-mRNA in Kardiomyozyten (Bendall et al., 2002; Xiao et al., 2002), Endothelzellen (Gorlach et al., 2000), kardialen Fibroblasten (Sorescu et al., 2002) und glatten Gefäßmuskelzellen (Lassegue et al., 2001; Sorescu et al., 2002) exprimiert. NOX2 ist ein aus sechs transmembranären Proteindomänen bestehendes Enzym, das Elektronen auf Sauerstoff über das Coenzym NADPH transferiert und dadurch das Hyperoxid-Anion  $O_2^{\cdot-}$  bildet (Bedard & Krause, 2007). Die NADPH-Oxidase produziert also reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und dadurch oxidativen Stress, dem eine bedeutende Rolle bei vielen kardiovaskulären Erkrankungen zukommt (Griendling et al., 2000; J. M. Li et al., 2002). Unter anderem war die NADPH-Oxidase Aktivität im Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz im Stadium NYHA IV erhöht (Heymes et al., 2003). Zudem war die NOX2 Expression im infarzierten Areal von Myokardinfarkt-Patienten erhöht (Krijnen et al., 2003). Die NOX2-Expression in Kardiomyozyten verstärkte hierbei die Hypertrophie und die Fibrose und damit das kardiale Remodeling nach einem Myokardinfarkt (Sirker et al., 2016). Außerdem zeigten Reilly et al. sowohl in einem VHF-induziertem Tiermodell als auch an Patienten mit postoperativem VHF, dass die atriale Aktivität und Expression von NOX2 bei Vorhofflimmern erhöht war (Reilly et al., 2011).

### **1.2.8 GATA4: Ein Marker der kardialen Hypertrophie**

„GATA binding protein 4“ (GATA4) gehört zur Familie der Transkriptionsfaktoren GATA1-6, deren DNA-bindende Proteindomäne ein oder zwei hochkonservierte Zinkfinger-Motive umfasst (L. J. Ko & Engel, 1993; Lowry & Atchley, 2000). Arceci et al. (1993) zeigten, dass GATA4-mRNA unter anderem im Herzen adulter Mäuse exprimiert wurde (Arceci et al., 1993). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des Transkriptionsfaktors GATA4 zur Hypertrophie von Kardiomyozyten führte (Liang, De Windt, et al., 2001). Liang et al. (2001) konnten einen direkten Signalweg zwischen den MAP-Kinasen ERK1/2 und dem Transkriptionsfaktor GATA4 in primären, neonatalen Rattenkardiomyozyten nachweisen. ERK1/2 phosphorylierte GATA4 an Serin 105, die sich in einer zwischen verschiedenen Tierarten konservierten Aminosäuresequenz befindet. Durch die direkte Phosphorylierung an



dieser Transkriptionsaktivierungsdomäne erhöhte sich die GATA4 DNA-Bindung und damit die Transkriptionsaktivität (Liang, Wiese, et al., 2001).

## **1.3 Plasmatische Gerinnungskaskade, Faktor Xa und Rolle der PAR**

### **1.3.1 Gerinnungsfaktor X (FX)**

Der Gerinnungsfaktor X (auch Stuart-Prower-Faktor genannt) verbindet in der Blutgerinnungskaskade den extrinsischen und den intrinsischen Weg. Der aktivierte Faktor X (Faktor Xa) aktiviert Prothrombin (Faktor II) zu Thrombin (IIa) durch eine Komplexbildung mit dem Faktor Va, Phospholipiden und  $Ca^{2+}$ -Ionen (sog. Prothrombinase-Komplex). Dabei ist der Faktor Xa eine Serinprotease und gehört zu den Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren. Der FX wird, wie die anderen Gerinnungsfaktoren, primär in Hepatozyten synthetisiert (Stanton & Wallin, 1992). Zusätzlich gibt es neuere Belege, dass FX in anderen Organen verstärkt lokal exprimiert wurde, wie in fibrotischen Lungen (Scotton et al., 2009) oder in druckbelasteten linken Herzventrikeln (Guo et al., 2020).

### **1.3.2 Effekte der Gerinnungsfaktoren außerhalb der Blutgerinnung**

In den letzten Jahren gibt es stetig mehr Belege über die PAR-vermittelten Wirkungen einiger Gerinnungsfaktoren, auch außerhalb der Blutgerinnung, auf bestimmte Gewebe und Zellen (S. F. Steinberg, 2005). Der FXa kann PAR1, PAR2 und PAR4 aktivieren (Camerer et al., 2000; Nystedt et al., 1994; Sidhu et al., 2014). Thrombin hingegen kann PAR1, PAR3 und PAR4 aktivieren (Kahn et al., 1999; Kahn et al., 1998; Sidhu et al., 2014). Nachfolgend werden einige PAR-abhängige Effekte von Gerinnungsfaktoren insbesondere auf Fibroblasten erläutert.

Thrombin führte *in vitro* über die Aktivierung von PAR1 zu einer Differenzierung von Lungenfibroblasten in einen Myofibroblastenphänotyp (Bogatkevich et al., 2001). Sabri et al. (2002) konnten zeigen, dass Thrombin überwiegend über die PAR1-Aktivierung auf kardiale Fibroblasten einwirkte. So führte Faktor IIa über eine „Epidermal Growth Factor Receptor“ (EGFR)-Transaktivierung zur Phospholipase C (PLC)-Aktivierung, zur Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 und zur Steigerung der [<sup>3</sup>H]Thymidin-Inkorporation (Sabri et al., 2002). Spronk et al. (2017) zeigten in adulten, atrialen Rattenfibroblasten, dass Thrombin unter anderem über PAR1 die Phosphorylierung von ERK1/2 und p38 stimulierte und die [<sup>3</sup>H]Prolin-Inkorporation steigerte. Faktor IIa erzeugte dementsprechend eine profibrotische und proinflammatorische Antwort und führte zusätzlich über eine Steigerung der PAR1-mRNA zu einer positiven Feedback-Regulation für PAR1 (Spronk et al., 2017).

FXa wirkte auf zelluläre Signalkaskaden in Fibroblasten (Bachli et al., 2003; Borensztajn et al., 2008). Die profibrotischen Effekte des FXa auf Fibroblasten könnten stärker sein als die von FIIa, was bisher unter anderem durch eine vermehrte Produktion des ROS  $H_2O_2$  und eine erhöhte TGF- $\beta$ 1 Expression nachgewiesen wurde (Kitasato et al., 2014). FXa setzte in murinen, embryonalen Fibroblasten über PAR2 sowohl profibrotische als auch proinflammatorische Signalkaskaden in Gang (Borensztajn et al., 2008). Dagegen stimulierte FXa die Prokollagensynthese und damit die EZM-Produktion über PAR1 in humanen und murinen Lungenfibroblasten (Blanc-Brude et al., 2005). Auch Guo et al. (2020) zeigten diesen bevorzugten Signalweg des FXa über PAR1 an kardialen, neonatalen Rattenfibroblasten. So führte FXa über PAR1 zu einer Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2, wohingegen PAR2 bei der Signaltransduktion keine Rolle spielte (Guo et al., 2020). Die Fibroblasten zeigten also u. a. je nach Tierart, biologischem Alter und Gewebeart eine unterschiedliche FXa-vermittelte PAR1- oder PAR2-Signaltransduktion. Die Herkunft der Fibroblasten scheint demnach Auswirkungen auf die PAR-Aktivität zu haben.

### **1.3.3 Förderung von VHF durch Hyperkoagulabilität**

Spronk et al. (2017) zeigten, dass Hyperkoagulabilität die Anfälligkeit für VHF erhöhte. Hierbei nutzten sie transgene Mäuse, in denen eine Thrombomodulin-Genmutation zu einer stark verminderten Bildung von aktiviertem Protein C (APC) führte (Weiler-Guettler et al., 1998). Durch die verminderte APC-vermittelte Inaktivierung von FVa und FVIIIa entstand ein prokoagulatorischer Phänotyp. In diesem *in vivo* Modell wurden die transgenen Mäuse und Wildtyp-Mäuse transösophageal elektrisch stimuliert. Hierbei zeigten die transgenen Mäuse elektrophysiologisch eine erhöhte Anfälligkeit für VHF und eine vermehrte Ablagerung von Kollagen in den Vorhöfen. Der prokoagulatorische Zustand förderte somit die Entstehung von VHF (Spronk et al., 2017).

### **1.3.4 Mögliche protektive Effekte der FXa-Inhibitoren**

Die effektive Antikoagulation von FXa-Inhibitoren wurde bereits sowohl im Tiermodell (P. C. Wong et al., 1996) als auch in großen klinischen Studien (Giugliano et al., 2013; Turpie et al., 2009) nachgewiesen. Darüber hinaus gibt es Belege zur Wirkung von Gerinnungsfaktoren über PAR, den dadurch ablaufenden intrazellulären Signalkaskaden und den damit einhergehenden pathophysiologischen Veränderungen. Dies führte zu der Annahme, dass die Inhibition von FXa möglicherweise protektive Effekte bezüglich Inflammation und Fibrosierung auf zellulärer Ebene zeigen könnte.

*In vitro* zeigten Mc Lean et al. (2001), dass die durch FXa induzierte IL-6 Produktion in glatten Muskelzellen der humanen Koronararterie durch den FXa-Inhibitor ZK-807834 gehemmt wurde (McLean et al., 2001). Außerdem zeigten Bukowska et al. (2013) an humanen, atrialen Gewebeschnitten, dass die durch 24-stündige FXa-Stimulation ausgelöste inflammatorische Signalkaskade durch den FXa-Inhibitor Rivaroxaban abgeschwächt wurde. So konnte eine verminderte Aktivierung der MAP-Kinase ERK2 und eine verminderte ICAM-1- und Interleukin-8 (IL-8)-mRNA-Expression nachgewiesen werden (Bukowska et al., 2013).

Spronk et al. (2017) induzierten VHF für vier Wochen durch die Implantation eines endokardialen Schrittmachers in das rechte Vorhofrohr von Ziegen. In diesem Ziegenmodell gab es eine Kontrollgruppe und eine Therapiegruppe, die mit Nadroparin behandelt wurde. Hierbei handelt es sich um ein niedermolekulares Heparin, das vor allem FXa hemmt. Es konnte gezeigt werden, dass die FXa-Inhibition die elektrophysiologische Komplexität von VHF verringerte. Dabei wurde eine Mapping-Elektrode über beiden Vorhöfen platziert. Weiterhin wurde in der Therapiegruppe histologisch eine verminderte atriale, endomyxiale Fibrose festgestellt (Spronk et al., 2017).

#### **1.4 *In vitro* Experimente an Kardiomyozyten der HL-1 Zelllinie**

Gerinnungsfaktoren können über ihre proteolytische Aktivität PAR aktivieren, die über die inflammatorischen Signalkaskaden zum sogenannten „Remodeling“ von Gewebe führen können. In humanen, rechtsatrialen Gewebeschnitten aus dem Vorhofrohr stimulierte FXa über PAR1 und PAR2 eine inflammatorische Antwort (Bukowska et al., 2013). Obwohl in der Histologie des Herzens Kardiomyozyten 70-85% des Volumens ausmachen, liegt die numerische Verteilung bei 33% Kardiomyozyten, 24% Endothelzellen und 43% Mesenchymzellen (vermutlich v. a. Fibroblasten) (Bergmann et al., 2015; Zhou & Pu, 2016). Es wurde nun die Rolle atrialer Kardiomyozyten nach FXa-Inkubation untersucht. Für die *in vitro* Experimente wurde eine kultivierbare Zelllinie benötigt, da reife Herzmuskelzellen physiologischerweise keine proliferativen Eigenschaften besitzen. Loren J. Field (1988) generierte mit dem Fusionsgen ANF-TAG (Atrial natriuretic factor promotor and the SV40 large T antigen oncogene) transgene Mäuse, die eine ausgeprägte Hyperplasie des rechten Vorhofes und Arrhythmien entwickelten (Field, 1988). Nach syngener Transplantation der rechten, atrialen Tumore in subkutanes Gewebe des Empfängers konnte man sogenannte AT-1 (Atrialer Tumor) Zellen züchten (Delcarpio et al., 1991; Steinhilper et al., 1990). Claycomb et al. (1998) gelang es aus einer Primärkultur von AT-1 Zellen der transgenen weiblichen C57BL/6J Maus, die sogenannten „Heart Like-1“ (HL-1) Zellen zu isolieren. Diese HL-1 Zellen,

ursprünglich stammend aus dem murinen rechten Vorhof, sind eine immortalisierte Zelllinie mit kontraktile sowie phänotypisch adulten Kardiomyozyten-Eigenschaften, die auch nach *in vitro* Subkultivierungen erhalten bleiben (Claycomb et al., 1998).

## 1.5 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte des aktivierten Gerinnungsfaktors X (FXa) über Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) auf Kardiomyozyten untersucht. Das Ziel war es, die Rolle von FXa und PAR in den atrialen Umbauprozessen, die bei Vorhofflimmern (VHF) ablaufen, weiter zu entschlüsseln. Hierfür wurden *in vitro* Experimente an den murinen atrialen Kardiomyozyten der HL-1 Zelllinie durchgeführt, um die folgenden drei Fragen zu beantworten:

- 1. Werden die Rezeptoren PAR1, PAR2 und PAR4 in HL-1 Zellen exprimiert?** Es ist bekannt, dass FXa PAR1, PAR2 und PAR4 aktivieren kann (Camerer et al., 2000; Nystedt et al., 1994; Sidhu et al., 2014).
- 2. Welche Effekte hat die Aktivierung von PAR1 und PAR2 auf HL-1 Zellen?** Hierfür wurden PAR1- und PAR2-Agonisten genutzt. Diese aktivieren spezifisch ihren jeweiligen Rezeptor, ohne dass eine proteolytische Spaltung der Rezeptoren und daraus resultierend ein gebundener Ligand notwendig wäre. Somit kann untersucht werden, welche Auswirkungen eine PAR-Aktivierung hat und welche intrazellulären Signalkaskaden ausgelöst werden.
- 3. Hat FXa Einfluss auf die PAR1, PAR2- und PAR4-Expression und auf proinflammatorische und profibrotische Prozesse in HL-1 Zellen?** Dazu wurden die Effekte von FXa in verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten auf die Expression von PAR1, PAR2 und PAR4 und auf den Phosphorylierungsstatus der MAP-Kinasen ERK1/2 und der Untereinheit p65 von NF- $\kappa$ B untersucht. Weiterhin wurde eine Expressionsänderung von ICAM-1, VCAM-1, FN, CXCR1, CTGF, TGF- $\beta$ 1, NOX2 und GATA4 geprüft.

## 2 Material und Methoden

Die verwendeten Chemikalien und Materialien für die Zellkultur (2.1), die molekularbiologischen Methoden (2.2) und proteinbiochemischen Methoden (2.3) sind in den Tabellen 13 und 14 im Anhang aufgelistet.

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Kultivierung der HL-1 Zellen

Es wurde in der Zellkultur mit HL-1 Zellen gearbeitet, die von W. C. Claycomb, Ph.D. (LSU Health Sciences Center, New Orleans, Louisiana, USA), bereitgestellt wurden. Hierbei orientierte man sich bei der Kultivierung der HL-1 Zellen stets an der von Claycomb et al. (1998) beschriebenen Vorgehensweise (Claycomb et al., 1998). Zuerst wurden die Zellkulturflaschen einen Tag vor der Kultivierung mit 25 µg Fibronectin in 2 ml 0,02% Gelatine (w/v) beschichtet und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die im Einfriermedium (Zusammensetzung siehe Tabelle 1) bei -196 °C kryokonservierten HL-1 Zellen wurden im Wasserbad (37 °C) aufgetaut, in 5 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) resuspendiert und anschließend zentrifugiert (5 min, 1500 rpm). Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 15 ml Vollmedium (Zusammensetzung siehe Tabelle 1) resuspendiert. Daraufhin wurden die HL-1 Zellen in T-75 Zellkulturflaschen (etwa 30000 Zellen/cm<sup>2</sup>) ausgesät. Die optimalen Zellkulturbedingungen der HL-1 Zellen lagen bei einer Temperatur von 37 °C, einem CO<sub>2</sub> Anteil von 5% sowie einer Luftfeuchtigkeit von 95% (Claycomb et al., 1998). Das Vollmedium wurde täglich gewechselt.

**Tabelle 1:** Kulturmedien der HL-1 Zellen

Zellkultur	Bestandteile
Vollmedium	Claycomb-Medium, Fetales Kälberserum (FBS) 10% (v/v), 100 µg/ml Streptomycin, 100 units/ml Penicillin, 2 mM L-Glutamin, 0,03 mM Ascorbinsäure; 10 µM Norepinephrin
Mangelmedium	Claycomb-Medium, 100 µg/ml Streptomycin, 100 units/ml Penicillin, 2 mM L-Glutamin
Einfriermedium	FBS 95% (v/v), DMSO 5% (v/v)

Zur Vitalitätsprüfung der Zellkultur wurde der Farbstoff Trypanblau verwendet, der avitale Zellen blau anfärbt. Mittels manueller Zellzahlbestimmung durch die Neubauer Zählkammer konnte der Anteil an vitalen HL-1 Zellen in der Zellkultur ermittelt werden.

### **2.1.2 Passagieren der HL-1 Zellen und Einfrieren**

Bevor die Zellen Konfluenz erreicht hatten, wurden sie folgendermaßen passagiert. Zum Waschen der Zellkultur wurde PBS verwendet, um anschließend durch 2-minütige Inkubation mittels 0,1% Trypsin die Zellen von der T-75 Zellkulturflasche zu lösen. Mittels fetalem Kälberserum (FBS) wurde die Trypsinreaktion gestoppt und die Zellsuspension zentrifugiert (5 min, 1500 rpm). Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet erneut in Vollmedium resuspendiert und die Zellen daraufhin auf drei Zellkulturflaschen verteilt. Um die Möglichkeit zu haben, zu einem späteren Zeitpunkt erneut eine Zellkultur anzulegen oder Experimente durchführen zu können, wurden die HL-1 Zellen im Einfriermedium kryokonserviert. Hierfür wurde der Gefrierbehälter „Mr. Frosty“ genutzt, der Isopropanol enthielt und mit einer Geschwindigkeit von  $-1\text{ °C/ min}$  ein kontrolliertes Einfrieren der Zellkultur bei  $-80\text{ °C}$  im Tiefkühlschrank über Nacht ermöglichte. Danach wurden die Zellen mittels flüssigem Stickstoff bei  $-196\text{ °C}$  kryokonserviert.

### **2.1.3 Zellexperimente**

Die Zellexperimente wurden auf 6-Well-Zellkulturplatten ( $37\text{ °C}$ ,  $\text{CO}_2$  Anteil von 5%, Luftfeuchtigkeit von 95%) durchgeführt. Nach Erreichen der Konfluenz der HL-1 Zellen im Vollmedium wurde mittels PBS gewaschen und durch ein Mangelmedium (Zusammensetzung siehe Tabelle 1) ein 24-stündiger Serumentzug zur Synchronisation der Zellphasen durchgeführt. Daraufhin erfolgte der Austausch des Mangelmediums durch ein Mangelmedium, das mit dem jeweiligen Stimulans substituiert worden war. Hierbei handelte es sich um FXa oder um die PAR1- und PAR2-Agonisten (PAR1-AG und PAR2-AG, Tabelle 2). Für FXa wurden mögliche konzentrationsabhängige Effekte untersucht und hierfür die folgenden Konzentrationen genutzt: 5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM und 50 nM. Molekularbiologisch wurden noch die Effekte einer FXa-Konzentration von 100 nM untersucht. Die Konzentrationen von PAR1-AG und PAR2-AG betragen jeweils 20  $\mu\text{M}$ . Um mögliche zeitabhängige Effekte zu untersuchen, wurden verschiedene Inkubationszeiten genutzt. Diese betragen für FXa, PAR1-AG und PAR2-AG bei allen Experimenten 4 h und 24 h. Zusätzlich wurden die Effekte einer 15-, 30- und 60-minütigen Inkubation mit FXa, PAR1-AG und PAR2-AG bei ERK1/2, NF- $\kappa$ B und ICAM-1 untersucht.

**Tabelle 2:** Aktivierter Gerinnungsfaktor X (FXa) und PAR1- und PAR2-Agonisten

Reagenzien	Konzentration	Firma
Aktivierter Gerinnungsfaktor X (FXa)	5–100 nM	Haemochrom Diagnostica, Essen, DE
Muriner PAR1-Agonist (PAR1-AG)	20 µM	Bachem, Bubendorf, CH
Muriner PAR2-Agonist (PAR2-AG)	20 µM	Bachem, Bubendorf, CH

Nach erfolgter Inkubation wurde das Kulturmedium entfernt und die HL-1 Zellen auf der 6-Well-Zellkulturplatte mittels PBS gewaschen. Die weiteren Arbeitsschritte werden für die Isolation der RNA in Abschnitt 2.2.1 und für die Gewinnung der Proteine in Abschnitt 2.3.1 erläutert.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Isolation und Quantifizierung der RNA

Zur Isolation der RNA wurde das RNA-Isolationskit der Firma Analytik Jena verwendet. Zur Lyse der adhärenen HL-1 Zellen wurden pro Well bei Raumtemperatur 400 µl „Lysis Solution RL“ appliziert und restliche Zellfragmente mittels Zellschaber abgelöst. Daraufhin wurde das Zelllysate in den „Spin Filter D“ übertragen und zentrifugiert (2 min, 11000 rpm). Nun wurde zu dem Filtrat die gleiche Menge 70% Ethanol hinzugegeben. Durch Pipettieren wurde die Probe durchmischt, anschließend auf den „Spin Filter R“ transferiert und zentrifugiert (2 min, 11000 rpm). Dort wurde die RNA in 500 µl „Washing Solution HS“ gelöst und zentrifugiert (1 min, 11000 rpm). Nach dem Verwerfen des Filtrats und der Hinzugabe von 700 µl „Washing Solution LS“ wurde die Probe erneut zentrifugiert (1 min, 11000 rpm). Das Filtrat wurde verworfen, die sich auf dem „Spin Filter R“ befindende RNA erneut zentrifugiert (3 min, 11000 rpm) und daraufhin in 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Es erfolgte eine 1-minütige Inkubation bei Raumtemperatur sowie anschließend eine Zentrifugation (1 min, 11000 rpm).

Zur Quantifizierung der RNA wurde die Konzentration mittels Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Zur Ermittlung der Reinheit bzw. einer möglichen Proteinkontamination der jeweiligen RNA-Probe wurde das Verhältnis bei den Wellenlängen 260 nm zu 280 nm (Ratio  $A_{260/280}$ ) berechnet (Glaser, 1995), das mindestens bei 1,8 zu liegen hatte und optimalerweise 2,0 erreichte.

### 2.2.2 cDNA Synthese

Zur Gewinnung von cDNA (komplementäre Desoxyribonukleinsäure) wurden die bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten RNA-Proben aufgetaut und mittels reverser Transkription in DNA umgeschrieben. Hierfür wurde das cDNA-Synthese-Kit „RevertAid™ First Strand“ des Herstellers Fermentas genutzt (Zusammensetzung siehe Tabelle 3), wobei stets ein Ansatz mit sowie ohne Reverse Transkriptase durchgeführt wurde, um etwaige Verfälschungen durch in der Probe bereits vorhandene DNA zu erkennen.

**Tabelle 3:** cDNA-Synthese-Kit

Reagenzien	Volumen	Firma
Reaktionspuffer	4 $\mu\text{l}$	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
Random Primer	1 $\mu\text{l}$	
dNTPs	2 $\mu\text{l}$	
Reverse Transkriptase	1 $\mu\text{l}$	
RNase Inhibitor	1 $\mu\text{l}$	
1 $\mu\text{g}$ RNA in RNase freiem Wasser	9 $\mu\text{l}$	-

Im Reaktionsansatz wurde die cDNA im iCycler™ von Bio-Rad mit den in Tabelle 4 beschriebenen Phasen synthetisiert.

**Tabelle 4:** Synthese der cDNA

Temperatur	25 $^{\circ}\text{C}$	42 $^{\circ}\text{C}$	72 $^{\circ}\text{C}$
Dauer	10 min	60 min	10 min

### 2.2.3 RealTime Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Zur Vervielfältigung der DNA wurde die RT-PCR genutzt. Zunächst wurden hierbei die entsprechenden DNA-Proben, die bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden, aufgetaut, durch Vortexen und Zentrifugieren vorbereitet und danach auf Eis gestellt. Für jede Probe wurde ein Reaktionsansatz (25  $\mu\text{l}$ ) mit den in Tabelle 5 genannten Reagenzien benötigt.

**Tabelle 5:** Für die RT- PCR verwendete Reagenzien

Reagenzien	Volumen	Firma
DEPC-behandeltes Wasser	9,5 $\mu\text{l}$	Roth, Karlsruhe, DE
SensiMix™	12,5 $\mu\text{l}$	Bioline, London, GB
cDNA	0,5 $\mu\text{l}$	-
5 $\mu\text{M}$ Primermix	2,5 $\mu\text{l}$	Eurofine



Die verwendeten Primer mit ihrer jeweiligen Effizienz (%) und Sequenz (5'–3') sind in Tabelle 6 aufgelistet.

**Tabelle 6:** Für die RT-PCR verwendete Maus-Primersequenzen

Primer	E (%) <sup>*</sup>	Upstream (5'–3'), Downstream (5'–3')
PAR1	90	US: AGCCAGCCAGAATCAGAGAG DS: TCGGAGATGAAGGGAGGAG
PAR4	102	US: AGCCGAAGTCCTCAGACAAG DS: GCAAGTGGTAAGCCAGTCGT
ICAM-1	90	US: CTTCTCATGCAAGGAGGAC DS: CACTCTCCGGAAACGAATAC
VCAM	94	US: GTTTGGAAGTAACCTTTACTC DS: CCATCCTCATAGCAATTAAGG
Fibronektin	100	US: CTGGTGGCTACATGTTAGAG DS: CTGCGGTTGGTAAATAGCTG
CXCR1	106	US: AATCTGTTGTGGCTTCACCCA DS: GCTATCTTCCGCCAGGCATAT
RPLP0	95	US: GCACTTTCGCTTTCTGGAGGGTGT DS: TGACTTGGTTGCTTTGGCGGGATT

\* E (=Effizienz in %) =  $[10^{(-1/\text{slope})} - 1] \times 100$

Die RT-PCR erfolgte im iCycler™ von Bio-Rad nach dem in Tabelle 7 dargestellten Ablaufprogramm.

**Tabelle 7:** Die Zyklen der RT-PCR

Zyklen		Temperatur
1x	10 min	95 °C
40x	10 sec	95 °C
	30 sec	Je nach Primer 58-62 °C
	30 sec	72 °C
1x	2 min	72 °C
1x	DNA-Schmelzkurvenanalyse	72-95 °C

Die Beurteilung der Qualität der PCR-Produkte erlaubte die Schmelzkurvenanalyse, da spezifische, doppelsträngige DNA im Gegensatz zu unspezifischen Bindungen wie Primerdimere erst bei höheren Temperaturen denaturiert. Die erhobenen Daten wurden nach der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode von Bio-Rad berechnet. Die mRNA-Expression der jeweiligen Moleküle wurde zu dem konstitutiv exprimierten Gen („Haushaltsgen“) RPLP0 normalisiert.

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 Proteinisolation und -bestimmung

Die HL-1 Zellen wurden mit dem RIPA Lysepuffer bei 4 °C für 30 min lysiert und mit einem Zellschaber abgelöst. Nach darauffolgender Zentrifugation (30 min, 4 °C, 13000 rpm) konnte der Überstand entnommen werden und die Proteine bei einer Temperatur von –80 °C aufbewahrt werden.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die von P. K. Smith et al. (1985) beschriebene Methode genutzt, basierend auf der Biuretreaktion zwischen Proteinmolekülen und Kupferionen und der Hinzugabe von Bicinchoninsäure (BCA), die eine Komplexbildung mit den entstehenden einwertigen Kupferionen ermöglicht und ein Absorptionsmaximum bei 562 nm besitzt (P. K. Smith et al., 1985).

### 2.3.2 Diskontinuierliche Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mithilfe der diskontinuierlichen Gelelektrophorese wurden die Proteinproben nach ihren Molekülmassen aufgetrennt. Je nach Protein bzw. seiner molekularen Masse wurde eine 10% oder 12% Acrylamidkonzentration verwendet.

Das Trenngel wurde nach dem in Tabelle 8 stehenden Schema zubereitet, in die Gelgießstand-Apparatur von Bio-Rad gegossen und mit Milli-Q® Wasser aufgefüllt, damit es gleichmäßig waagrecht aushärten konnte. Nach dem Abkippen des Milli-Q® Wassers vom Trenngel wurde das Sammelgel pipettiert. Für das Sammelgel wurden die in Tabelle 8 genannten Volumina verwendet. Mit einem Kamm, der jeweils die zehn Taschen formte, härtete das Sammelgel nach 45 min aus.

**Tabelle 8:** Herstellung des Trenn- und Sammelgels

Material	Trenngel		Sammelgel
Acrylamidkonzentration	10%	12%	4%
Acrylamid- Bisacrylamid 30%	5,0 ml	6,0 ml	0,67 ml
1,5 M Tris-HCl pH=8,8	3,75 ml	3,75 ml	-
0,5 M Tris-HCl pH=6,8	-	-	1,25 ml
Destilliertes Wasser (Milli-Q®)	5,93 ml	4,93 ml	2,97 ml
SDS 10% (v/v)	150 µl	150 µl	50 µl
APS 10% (v/v)	150 µl	150 µl	50 µl
TEMED	15 µl	15 µl	5 µl

Der Laufpuffer für die Gelelektrophorese bestand aus 100 ml 10x Rotiphorese® Laufpuffer und 900 ml Milli-Q® Wasser.

Während die Gele aushärteten, konnten die Proben vorbereitet werden. Die Proben wurden bei –80 °C gelagert und mussten somit erst aufgetaut, mit dem Vortex-Schüttler durchmischt und kurz zentrifugiert werden. Die Geltaschen wurden jeweils mit 20 µg Protein im Laemmli-Probenpuffer („Sample Buffer“ des Herstellers Sigma) beladen. Die pipettierten Proben wurden für 5 min im Thermomixer bei 95 °C gekocht, abgekühlt und kurz zentrifugiert.

Nun konnten die Taschen befüllt werden. In die erste Tasche wurden 4 µl des Proteinmarkers pipettiert. In der zweiten Tasche befand sich die Kontrolle (CTL) und darauffolgend die jeweiligen Proben, die mit PAR1- und PAR2-Agonisten oder mit ansteigenden Konzentrationen von FXa behandelt wurden. Mithilfe der SDS-PAGE Apparatur (Mini-PROTEAN® von Bio-Rad) wurde eine Spannung von 100 Volt für 15 min eingestellt, damit die Proteine ins Sammelgel wandern konnten. Anschließend lief die Gelelektrophorese für 45–60 min bei 200 Volt ab.

### 2.3.3 Western Blot

Die durch die Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden auf eine Trägermembran (PVDF-Membran) mittels Western Blot übertragen. Zur Aktivierung der PVDF-Membran wurde Methanol und zur anschließenden Äquilibration der Transferpuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 9) verwendet. Dann wurde der Western Blot von unten nach oben folgendermaßen zusammengestellt: Filterpad – Filterpapier – Das SDS-Gel mit den aufgetrennten Proteinen – die äquilibrierte PVDF-Membran – Filterpapier – Filterpad. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte im Transferpuffer für 90 min bei einer Spannung von 100 Volt.

**Tabelle 9:** Zusammensetzung des Transferpuffers

Material	Volumen	Firma
Reinstwasser (Milli-Q® Wasser)	560 mL	Merck Millipore, Billerica, US
10x Trisglycin (pH=8,6)	70 mL	Roth, Karlsruhe, DE
Methanol	70 mL	Roth, Karlsruhe, DE

Zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen wurde die Trägermembran mit den übertragenen Proteinen für eine Stunde in 5% (m/v) 1xTris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS)-Milchpulverlösung geschwenkt. Anschließend wurde mittels 1xTBS-Lösung die

Milchpulverlösung von der Membran entfernt, um die Inkubation der primären Antikörper beginnen zu können.

#### 2.3.4 Immundetektion

Nachdem die Proteine mittels Western Blot auf die PVDF-Membran übertragen wurden, wurden die Membranen mit den primären Antikörpern (Auflistung siehe Tabelle 10) für 12–16 h bzw. bis zum nächsten Tag bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Trägermembranen mittels 1xTBST-Lösung (1xTBS + 0,1% Tween® 20) dreimal für je 10 min gewaschen. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Auflistung siehe Tabelle 11) für 1,5 h bei Raumtemperatur und anschließend das erneute dreimalige Waschen für je 15 min in 1xTBST (1xTBS + 0,1% Tween® 20).

**Tabelle 10:** Für die Immundetektion verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Spezies	Typ	Hersteller	Verdünnung
Phospho- Erk 1/2	Maus	monoklonal	Cell Signaling, Danvers, US	1:500
Phospho-NF- $\kappa$ B p65	Kaninchen	monoklonal	Cell Signaling, Danvers, US	1:500
ERK 1/2	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling, Danvers, US	1:1000
ICAM-1	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz, Dallas, US	1:500
PAR1	Maus	monoklonal	Santa Cruz, Dallas, US	1:500
PAR2	Maus	monoklonal	Santa Cruz, Dallas, US	1:500
PAR4	Maus	monoklonal	Santa Cruz, Dallas, US	1:500
$\beta$ -Actin	Maus	monoklonal	Santa Cruz, Dallas, US	1:5000

**Tabelle 11:** Für die Immundetektion verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-Maus-Antikörper	Cell Signaling, Danvers, US	1:5000 in 1xTBS-Lösung
Anti-Kaninchen-Antikörper	Cell Signaling, Danvers, US	1:5000 in 1xTBS-Lösung

Zur Detektion wurden die Substrate Luminol und Wasserstoffperoxid in einem 1:1 Verhältnis durch die Meerrettichperoxidase, welche an den sekundären Antikörper gekoppelt war, in der Chemilumineszenzreaktion katalysiert. Nach dreiminütiger Inkubation in der Substratlösung wurde mit Hilfe des Detektionsgerätes C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biosciences) das emittierte Licht des Luminols detektiert und das Signal mit der Software Image Studio Digits 5.2 (LI-COR Biosciences) digitalisiert.

Die quantitative, densitometrische Auswertung der Banden erfolgte mit der Software Image Studio Digits 5.2 und die Bearbeitung sowie das Ausschneiden der Western Blot Ausschnitte mit den Programmen ImageJ Version 2.0.0-rc-69/1.52i (National Institutes of Health) und Corel PHOTO-PAINT X5 (Corel Corporation). Als Kontrolle und zur Normierung der OD-Werte wurde das „Haushaltsprotein“  $\beta$ -Actin verwendet. Lediglich für Phospho-ERK1/2 wurde die Kontrolle ERK1/2 verwendet.

Um weitere Moleküle auf den PVDF-Trägermembranen detektieren zu können, wurden sie im Restore™ Western Blot Stripping-Puffer (Thermo Scientific) für 30 min im Schüttelwasserbad bei 40–45 °C geschüttelt (Strip-Methode) und anschließend für 5 min in 1xTBS-Lösung gewaschen. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation in der Roti-Block Lösung, um anschließend die Membranen erneut mit den primären Antikörpern zu inkubieren. Im Gegensatz zu den primären Antikörpern wurden die Sekundärantikörper für jede Inkubation neu angesetzt.

## 2.4 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse wurde die Software Origin® 8.5 (OriginLab Corporation) verwendet. Es wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt, hierbei gilt ein p-Wert < 0,05 als statistisch signifikant. Die Ergebnisse werden in der vorliegenden Arbeit mit dem Mittelwert und dem Standardfehler des Mittelwertes (mean  $\pm$  SEM) angegeben.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Expression von PAR1, PAR2 und PAR4 und der Einfluss von FXa und PAR1/-2-Agonisten**

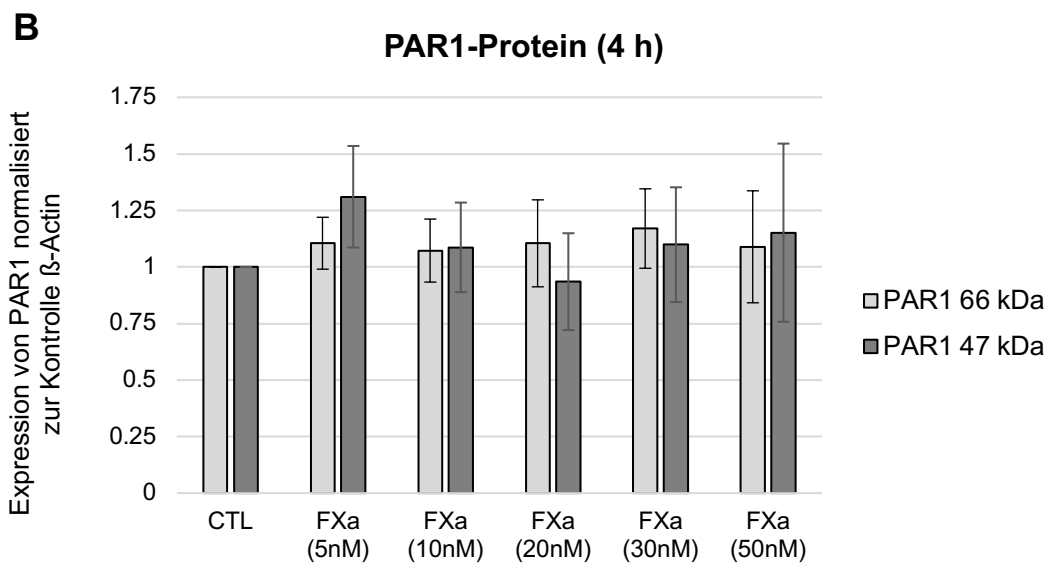
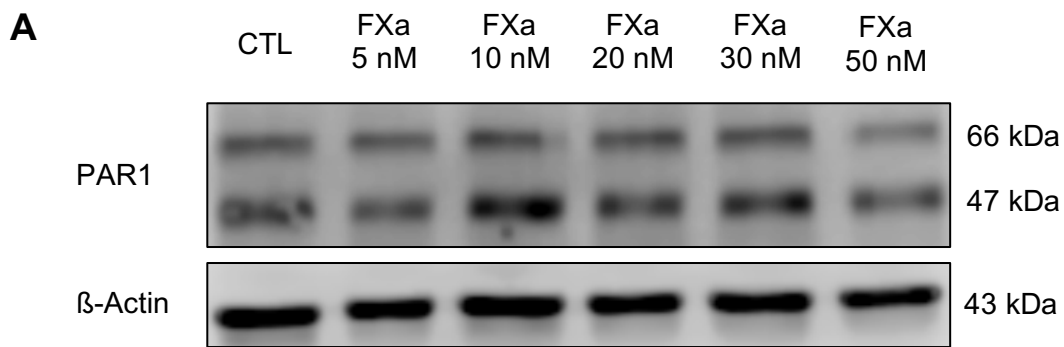
Es wurden die Effekte des aktivierten Gerinnungsfaktors X (FXa) in einer 4- und 24-stündigen Inkubation und mit steigenden Konzentrationen (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM) auf die Expression von Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR1, PAR2 und PAR4) in Kardiomyozyten der murinen HL-1 Zellen untersucht. Weiterhin wurden mögliche Effekte des murinen PAR1-Agonisten (PAR1-AG) und des murinen PAR2-Agonisten (PAR2-AG), jeweils in einer Konzentration von 20 µM und in einer 4- und 24-stündigen Inkubation, auf die Expression der PAR geprüft.

#### **3.1.1 Expression von PAR1, PAR2 und PAR4**

In den HL-1 Zellen konnte für PAR1 sowohl die von der cDNA-Sequenz vorhergesagte Molekülmasse mit 47 kDa, als auch die durch N-Glykosylierung entstehende, posttranslational modifizierte Variante mit 66 kDa (Brass et al., 1992) nachgewiesen werden (Abbildungen 3, 4 und 8). PAR2 konnte mit einer molekularen Masse von 60 kDa in der HL-1 Zelllinie festgestellt werden (Abbildung 5 und 9). Zudem konnte PAR4 mit dem Molekulargewicht von 47 kDa in den HL-1 Zellen detektiert werden (Abbildung 6 und 10).

#### **3.1.2 Inkubation mit dem aktivierten Gerinnungsfaktor X**

Zu Beginn wurde in einer 4-stündigen Inkubation untersucht, ob steigende Konzentrationen von FXa die Expression von PAR1 in HL-1 Zellen beeinflusste. Wie in Abbildung 3 gezeigt wird, wurden keine signifikanten Änderungen der Expression von PAR1 in der nicht modifizierten (47 kDa) und glykosylierten Form des Rezeptors (66 kDa) auf Proteinebene nachgewiesen.

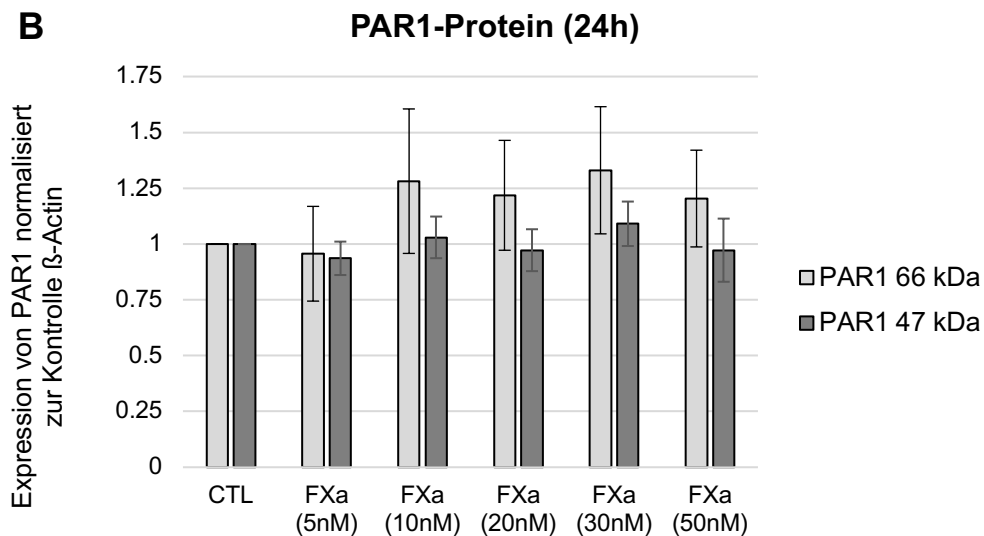
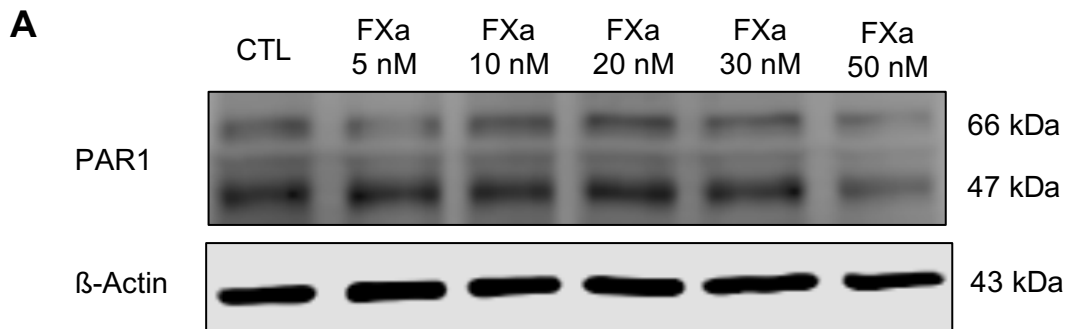


**Abbildung 3:** Proteinexpression von PAR1 in HL-1 Zellen nach 4-stündiger Inkubation mit steigenden FXa-Konzentrationen (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM).

**A:** Repräsentativer Ausschnitt eines Western Blots

**B:** Quantitative Auswertung der PAR1-Expression (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im Vergleich zur Kontrolle (CTL=1), Expression von PAR1 normalisiert zu  $\beta$ -Actin, n=4

Auch die 24-stündige Inkubation der Kardiomyozyten mit FXa in aufsteigenden Konzentrationen hatte keinen Einfluss auf die Proteinexpression der beiden PAR1-Formen (47 kDa und 66 kDa, siehe Abbildung 4).



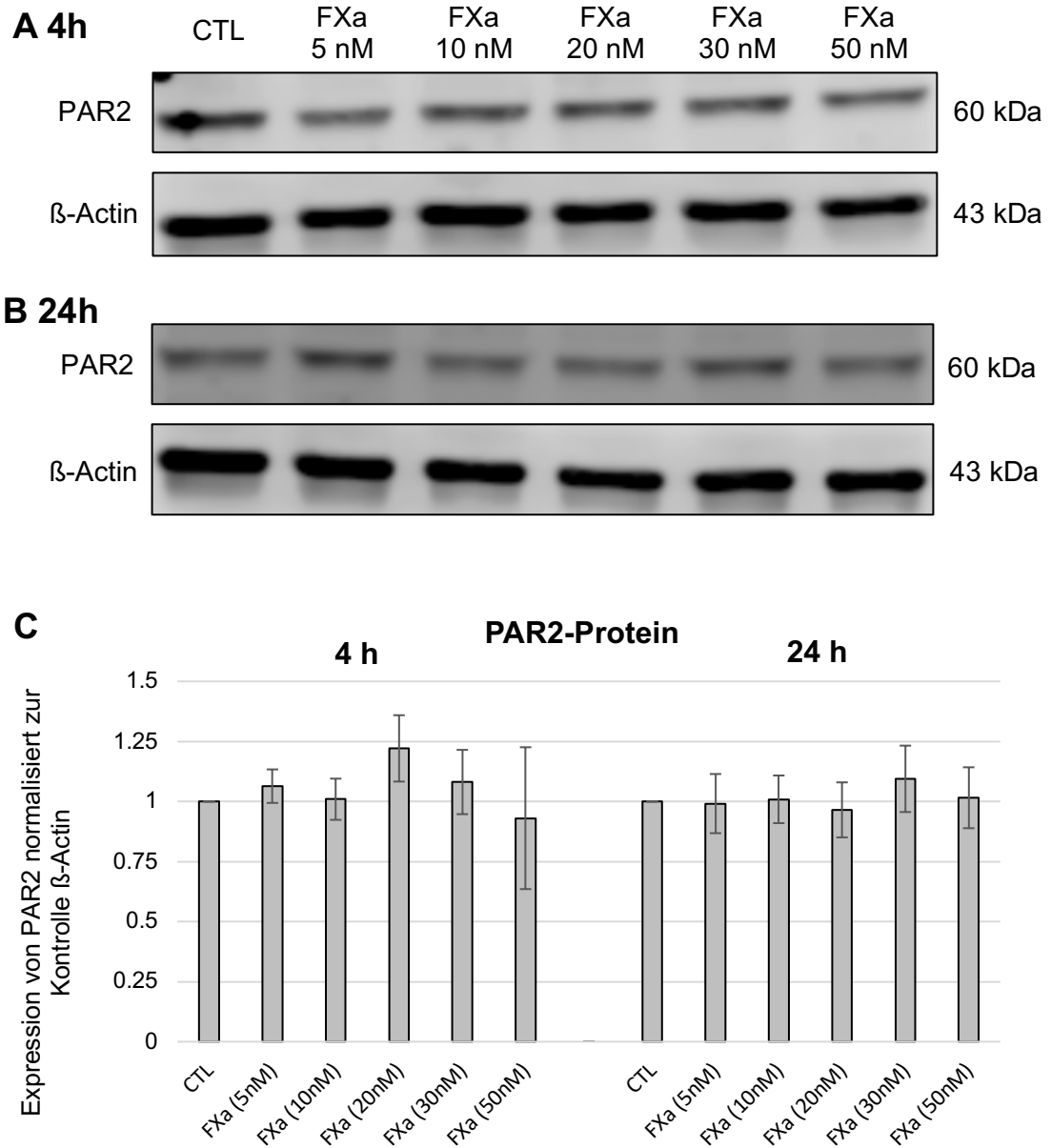
**Abbildung 4:** Proteinexpression von PAR1 in HL-1 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit steigenden FXa-Konzentrationen (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM).

**A:** Repräsentativer Ausschnitt eines Western Blots

**B:** Quantitative Auswertung der PAR1-Expression (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im Vergleich zur Kontrolle (CTL=1), Expression von PAR1 normalisiert zu  $\beta$ -Actin, n=5

Weiterführend wurden die Wirkungen des FXa auf die PAR2-Expression untersucht. In 4- und 24-stündigen Inkubationen mit FXa in aufsteigenden Konzentrationen konnten keine signifikanten Änderungen der Proteinexpression von PAR2 (60 kDa) beobachtet werden (Abbildung 5).



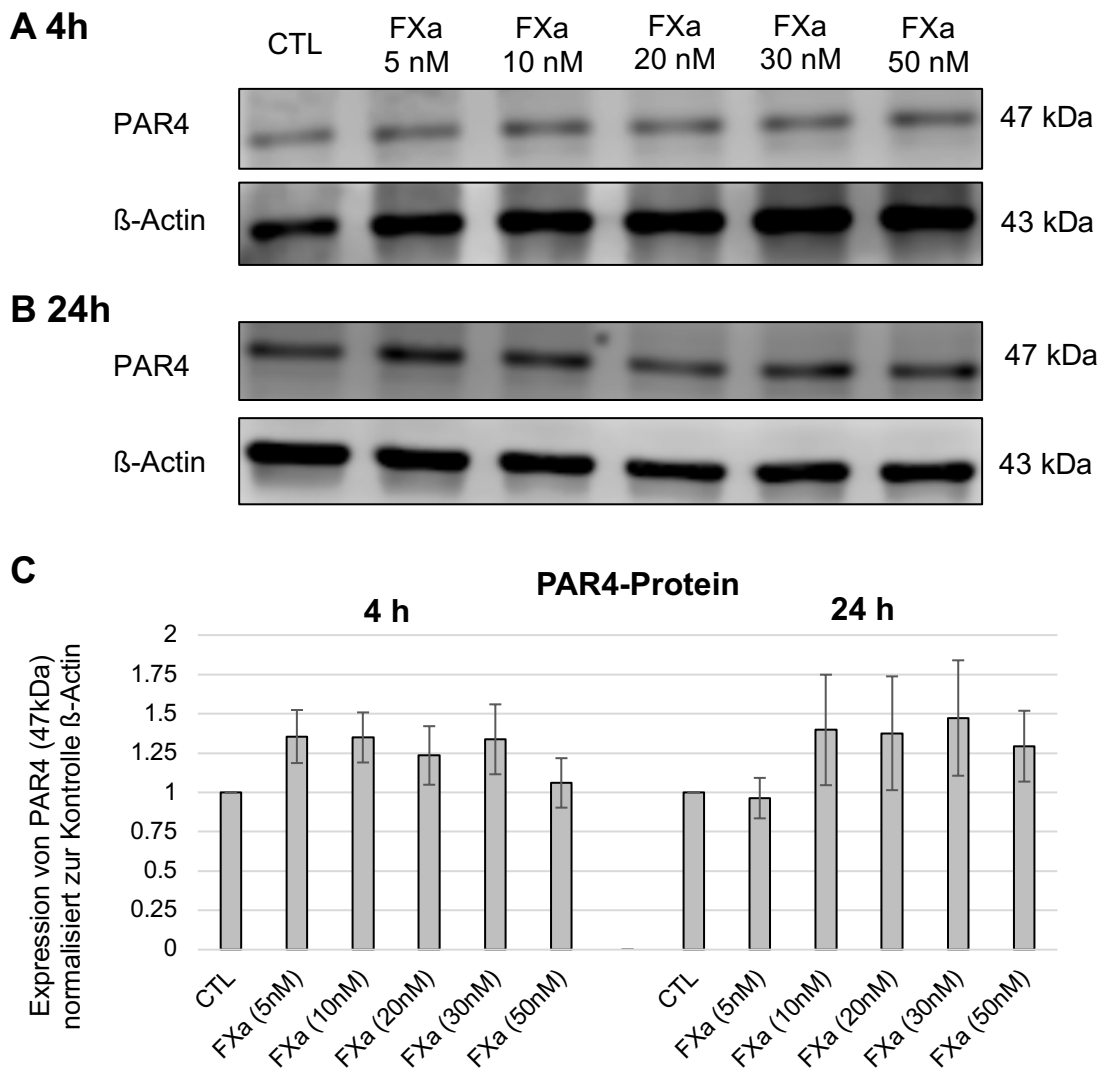


**Abbildung 5:** Proteinexpression von PAR2 in HL-1 Zellen nach 4- und 24-stündigen Inkubationen mit steigenden FXa-Konzentrationen (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM).

**A und B:** Repräsentative Ausschnitte der Western Blots

**C:** Quantitative Auswertung der PAR2-Expression (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im Vergleich zur Kontrolle (CTL=1), Expression von PAR2 normalisiert zu  $\beta$ -Actin, n=5

Danach wurde die Expression von PAR4 (47 kDa) nach FXa-Inkubation betrachtet. Auch hier konnten keine signifikanten Effekte festgestellt werden, weder konzentrations- noch zeitabhängig (siehe Abbildung 6).

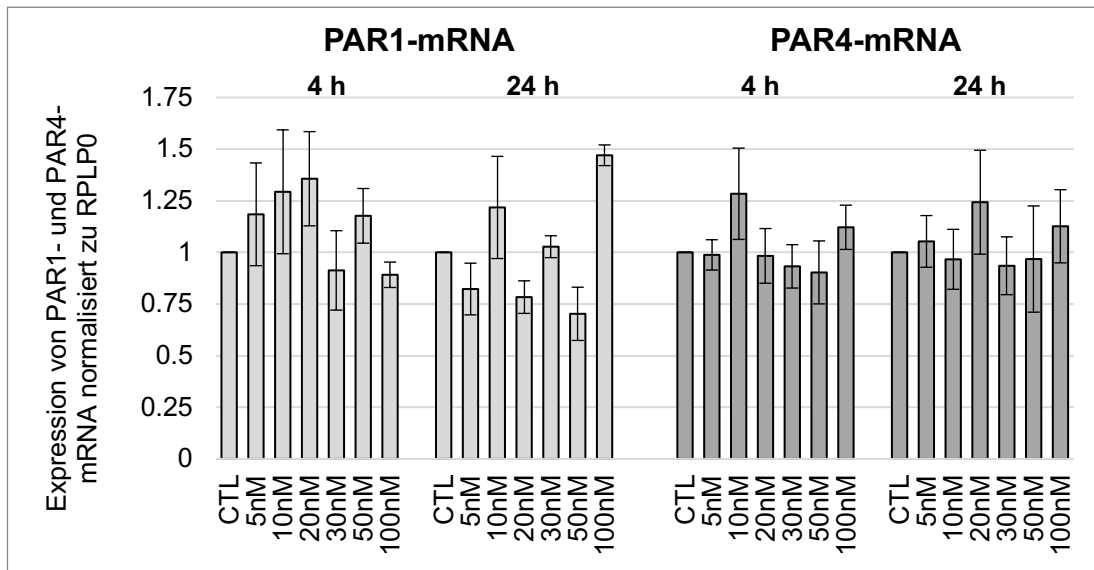


**Abbildung 6:** Proteinexpression von PAR4 in HL-1 Zellen nach 4- und 24-stündigen Inkubationen mit steigenden FXa-Konzentrationen (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM).

**A und B:** Repräsentative Ausschnitte der Western Blots

**C:** Quantitative Auswertung der PAR4-Expression (Mittelwerte ± SEM) im Vergleich zur Kontrolle (CTL=1), Expression von PAR4 normalisiert zu β-Actin, n=5

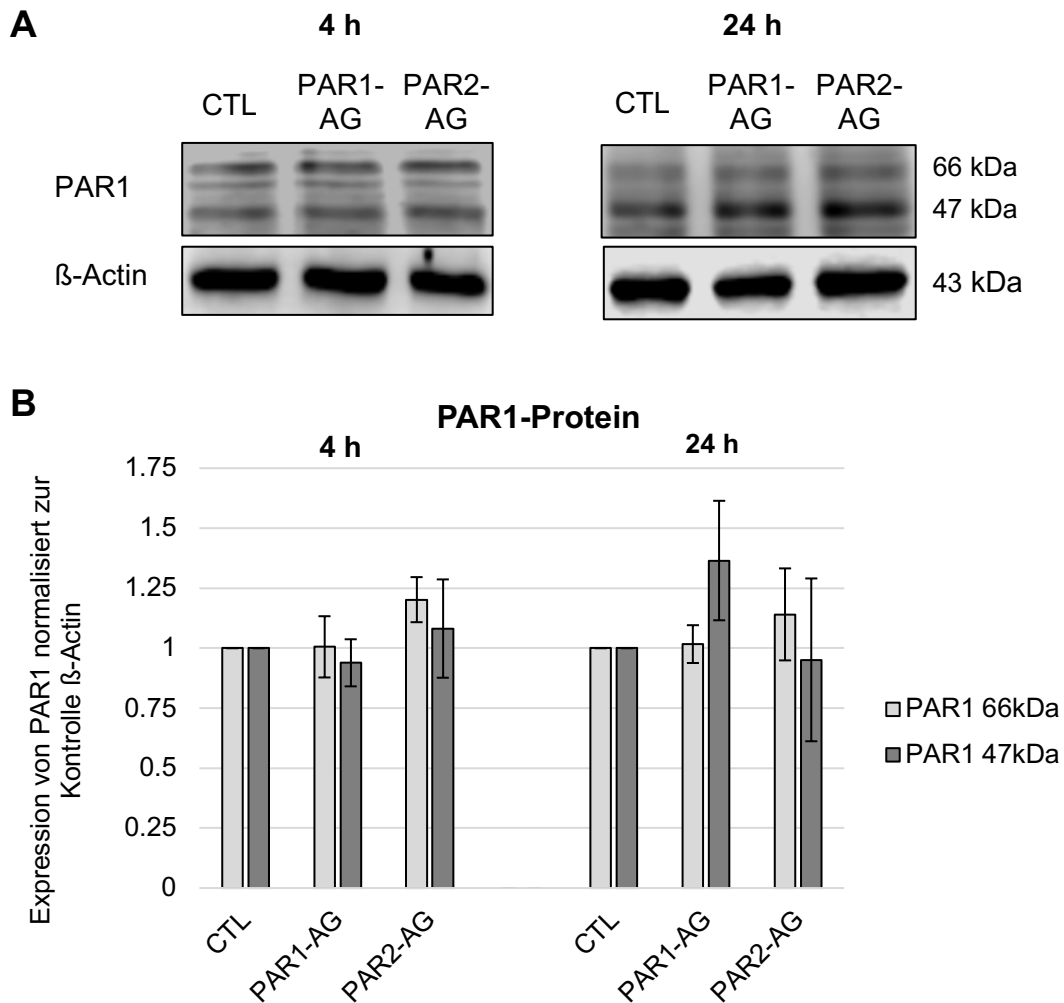
Diese Ergebnisse spiegeln sich auch auf Transkriptionsebene wider. Hierfür wurde der gleiche, oben beschriebene Versuchsansatz verwendet mit der zusätzlichen Konzentration des FXa von 100 nM. Mittels RT-PCR wurde die Expression der PAR1- und PAR4-mRNA gemessen (siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7:** mRNA-Expression von PAR1 und PAR4 in HL-1 Zellen nach 4- und 24-stündigen Inkubationen mit steigenden Konzentrationen des FXa (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM und 100 nM). Mittelwerte  $\pm$  SEM im Vergleich zur Kontrolle (CTL=1). PAR1 n=4, PAR4 n=4.

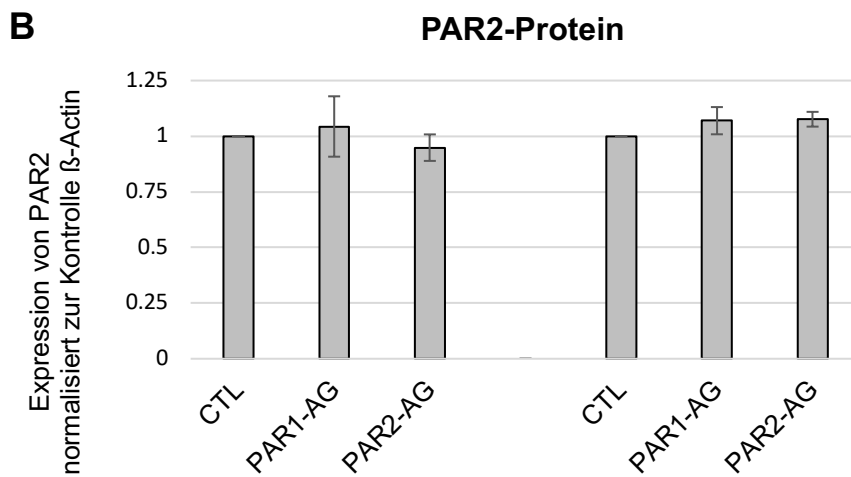
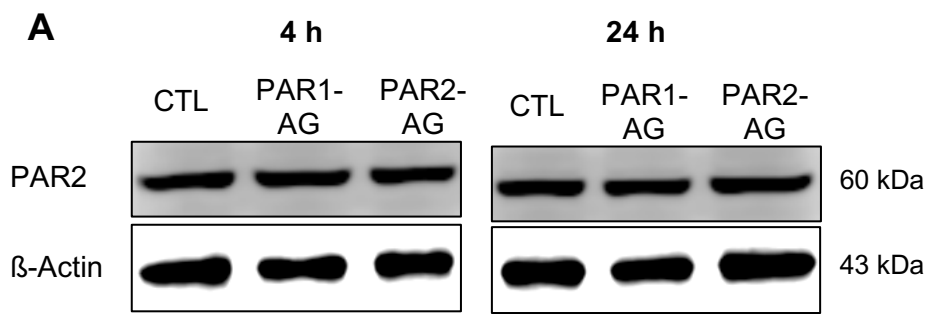
### 3.1.3 Der mögliche Einfluss der PAR1- und PAR2-Agonisten auf die PAR1-Expression

Nachdem FXa die PAR1-, PAR2- und PAR4-Expressionen in den HL-1 Zellen nicht beeinflusste, wurde der Frage nachgegangen, ob spezifische PAR1- und PAR2-Agonisten eine Wirkung auf die Protease-aktivierten Rezeptoren in murinen Kardiomyozyten hatten. Denn wie unter 1.2.1 bereits beschrieben wurde, aktivieren die PAR-Agonisten spezifisch ihren jeweiligen Rezeptor, ohne dass eine proteolytische Spaltung der Rezeptoren und daraus resultierend ein gebundener Ligand notwendig wäre. Wie in Abbildung 8 deutlich wird, konnte nach 4- und 24-stündigen Inkubationen mit PAR1- und PAR2-Agonisten keine signifikanten Änderungen der glykosylierten (66 kDa) und der nicht-glykosylierten (47 kDa) PAR1-Form auf Proteinebene festgestellt werden.

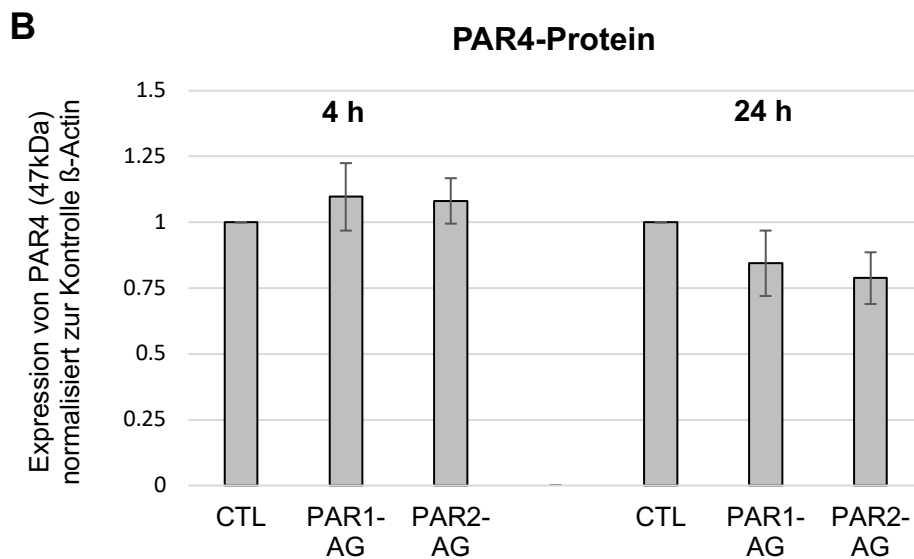
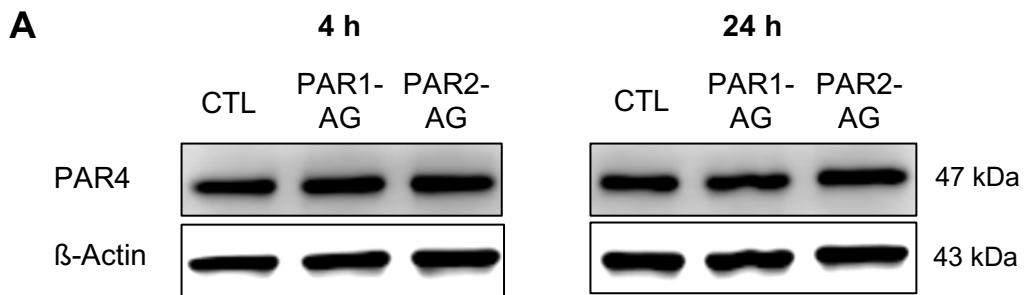


**Abbildung 8:** Proteinexpression von PAR1 in HL-1 Zellen nach 4- und 24-stündigen Inkubationen mit den PAR1- und PAR2-Agonisten in einer Konzentration von je 20  $\mu$ M.  
**A:** Repräsentativer Ausschnitt der Western Blots  
**B:** Quantitative Auswertung der PAR1-Expression (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im Vergleich zur Kontrolle (CTL=1), Expression von PAR1 normalisiert zu  $\beta$ -Actin, n=4

Weiterhin wurden die Effekte der PAR1- und PAR2-Agonisten auf die Expression von PAR2 und PAR4 analysiert. Es konnten nach 4- und 24-stündigen Inkubationen keine signifikanten Änderungen der Proteinexpression festgestellt werden (Abbildung 9 und 10).



**Abbildung 9:** Proteinexpression von PAR2 in HL-1 Zellen nach 4- und 24-stündigen Inkubationen mit den PAR1- und PAR2-Agonisten in einer Konzentration von je 20  $\mu$ M.  
**A:** Repräsentativer Ausschnitt eines Western Blots  
**B:** Quantitative Auswertung der PAR2-Expression (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im Vergleich zur Kontrolle (CTL=1), Expression von PAR2 normalisiert zu  $\beta$ -Actin, n=6

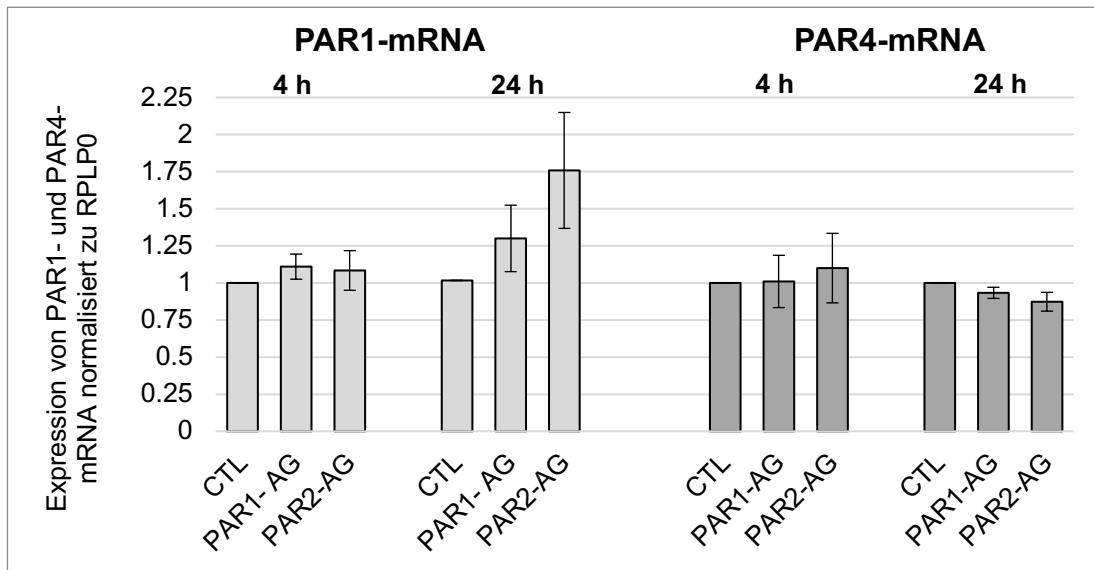


**Abbildung 10:** Proteinexpression von PAR4 in HL-1 Zellen nach 4- und 24-stündigen Inkubationen mit den PAR1- und PAR2-Agonisten in einer Konzentration von je 20  $\mu$ M.

**A:** Repräsentativer Ausschnitt eines Western Blots

**B:** Quantitative Auswertung der PAR4-Expression (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im Vergleich zur Kontrolle (CTL=1), Expression von PAR4 normalisiert zu  $\beta$ -Actin, n=6

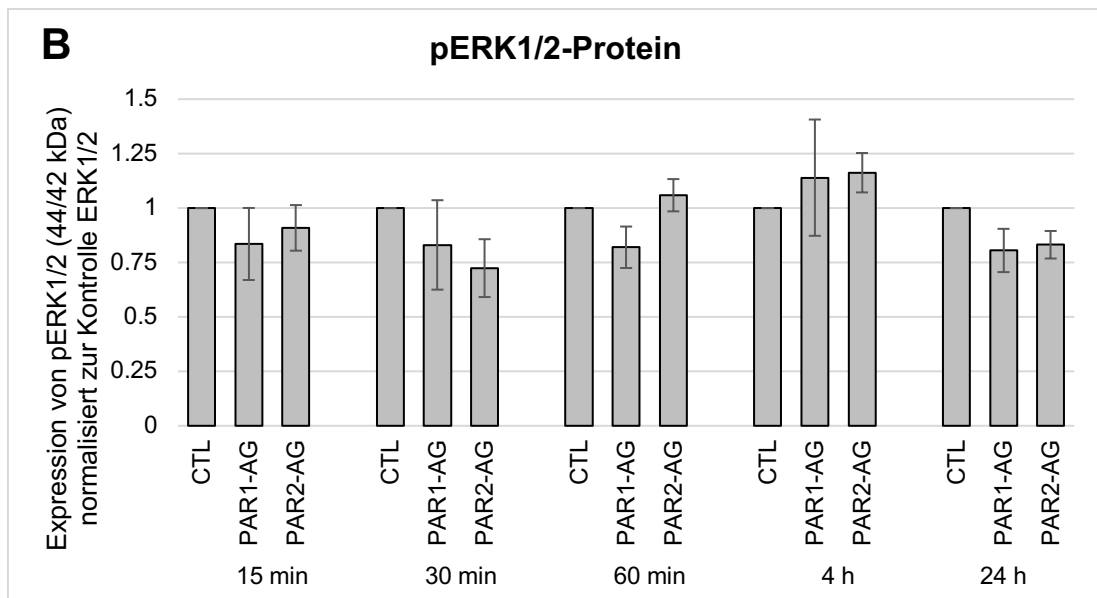
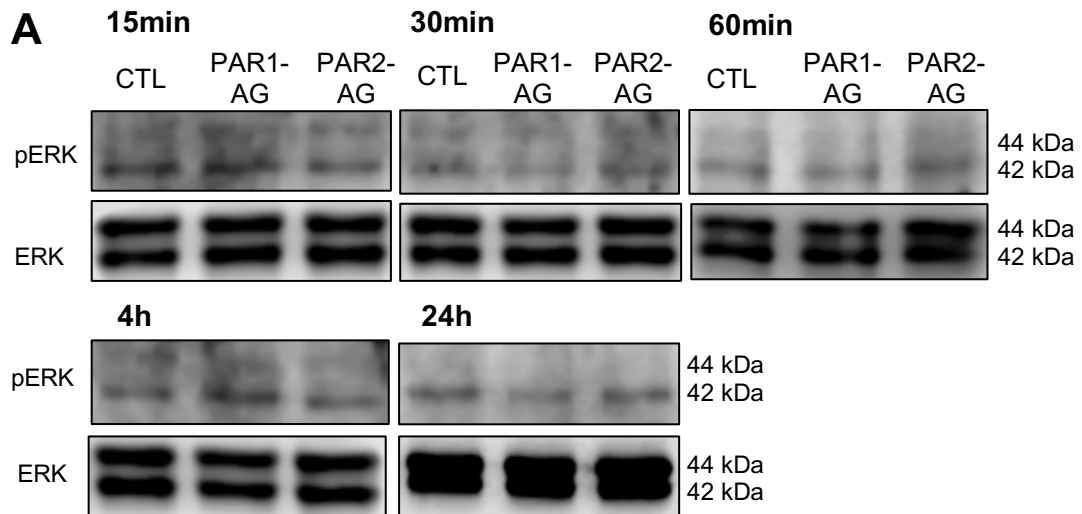
Für PAR1 und PAR4 wurden gleichartige Untersuchungen auf mRNA-Ebene durchgeführt. Dabei wurden ebenfalls keine signifikanten Änderungen der PAR1-mRNA und PAR4-mRNA beobachtet (siehe Abbildung 11).



**Abbildung 11:** mRNA-Expression von PAR1 und PAR4 in HL-1 Zellen nach 4- und 24-stündigen Inkubationen mit den PAR1- und PAR2-Agonisten in einer Konzentration von je 20  $\mu$ M, Mittelwerte  $\pm$  SEM im Vergleich zur Kontrolle (CTL=1). PAR1 n=6; PAR4 n=3.

### 3.2 Der mögliche Einfluss von FXa und PAR1/-2-Agonisten auf die Extracellular-Signal Regulated Kinases (ERK)

Der zellulären Signalkaskade folgend wurden die MAP-Kinase „extracellular-signal regulated kinases 1/2“ ERK1/2 auf eine mögliche Aktivierung in Form einer Phosphorylierung getestet. Hierbei ist ERK1 die p44-MAPK und ERK2 die p42-MAPK (Pearson et al., 2001). Die Aktivierung von PAR1 oder PAR2 kann zur Phosphorylierung von ERK1/2 führen (Ossovskaya & Bunnett, 2004). Es wurde vor allem pERK2 (42 kDa) nachgewiesen, pERK1 (44 kDa) wurde kaum exprimiert (Abbildung 12 und Abbildung 13). Hier war auf Proteinebene bei einer 15-, 30- und 60-minütigen sowie 4- und 24-stündigen Inkubation mit PAR1-AG und PAR2-AG keine verstärkte Phosphorylierung von ERK1/2 nachweisbar (Abbildung 12). Es wurde auch der mögliche Einfluss des FXa auf die Phosphorylierung von ERK1/2 untersucht. Hierbei zeigte FXa konzentrations- und zeitabhängig keine Aktivierung der MAP-Kinase (Abbildung 13).

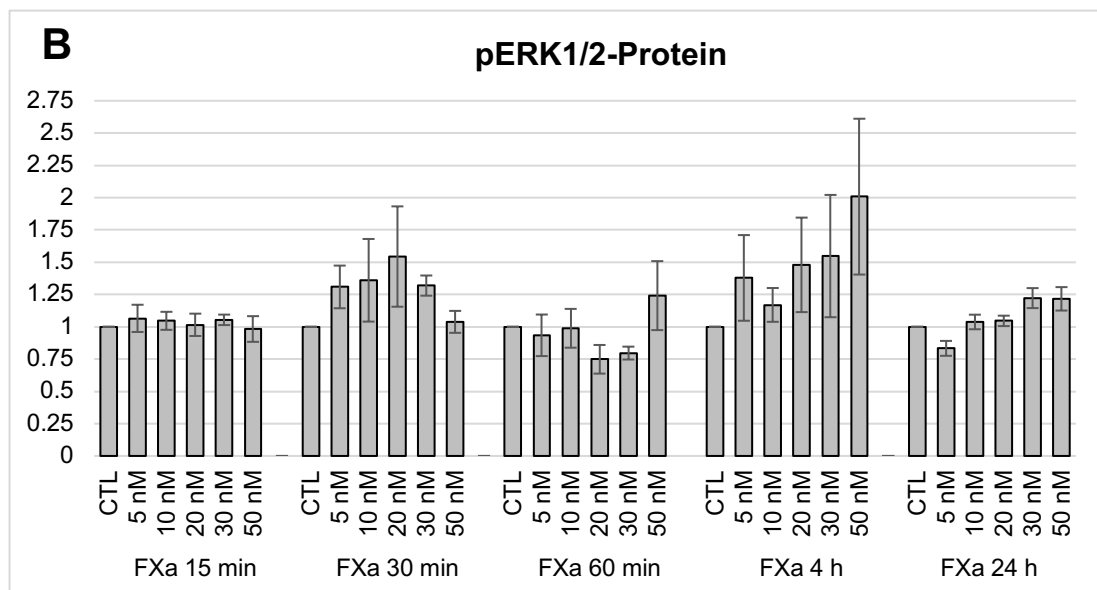
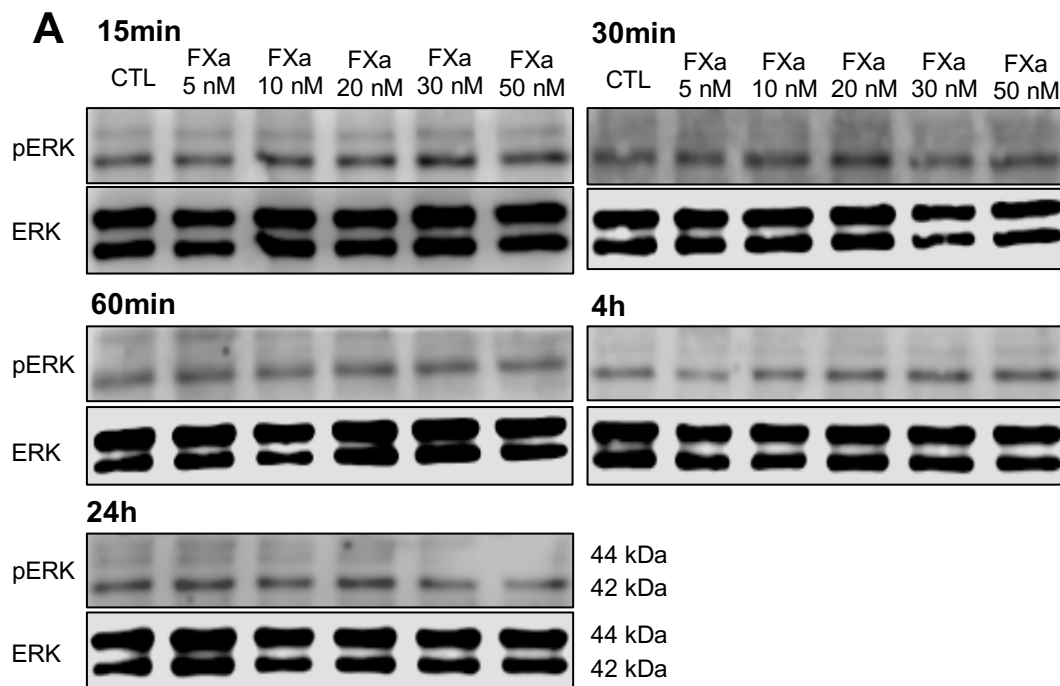


**Abbildung 12:** Proteinexpression von pERK1/2 in HL-1 Zellen nach 15-, 30-, 60-minütigen und 4- und 24-stündigen Inkubationen mit den PAR1- und PAR2-Agonisten in einer Konzentration von je 20  $\mu$ M.

**A:** Repräsentativer Ausschnitt eines Western Blots

**B:** Quantitative Auswertung der pERK1/2-Expression (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im Vergleich zur Kontrolle (CTL=1), Expression von pERK1/2 (44/42 kDa) normalisiert zu ERK1/2, n=3





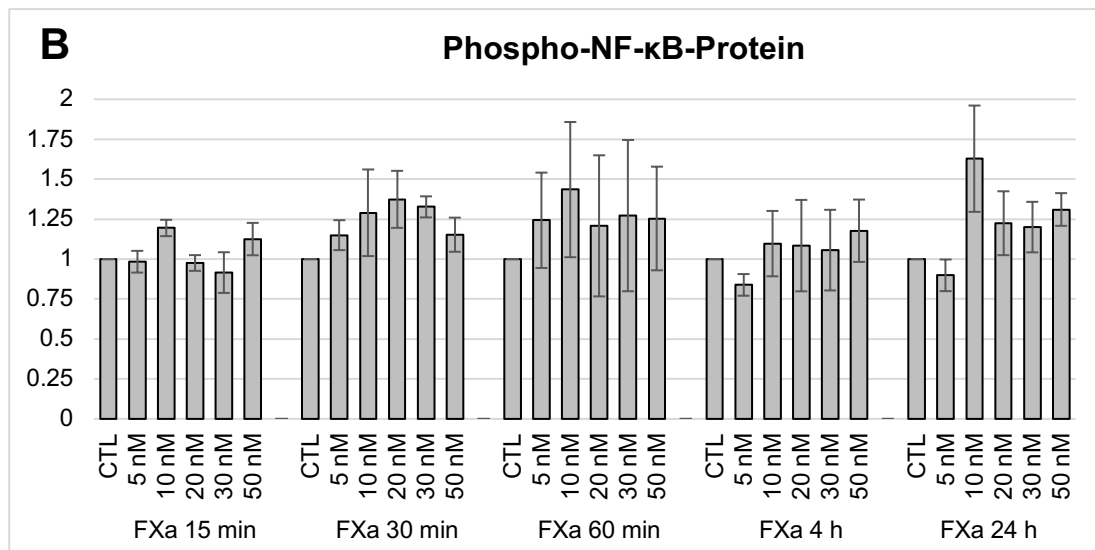
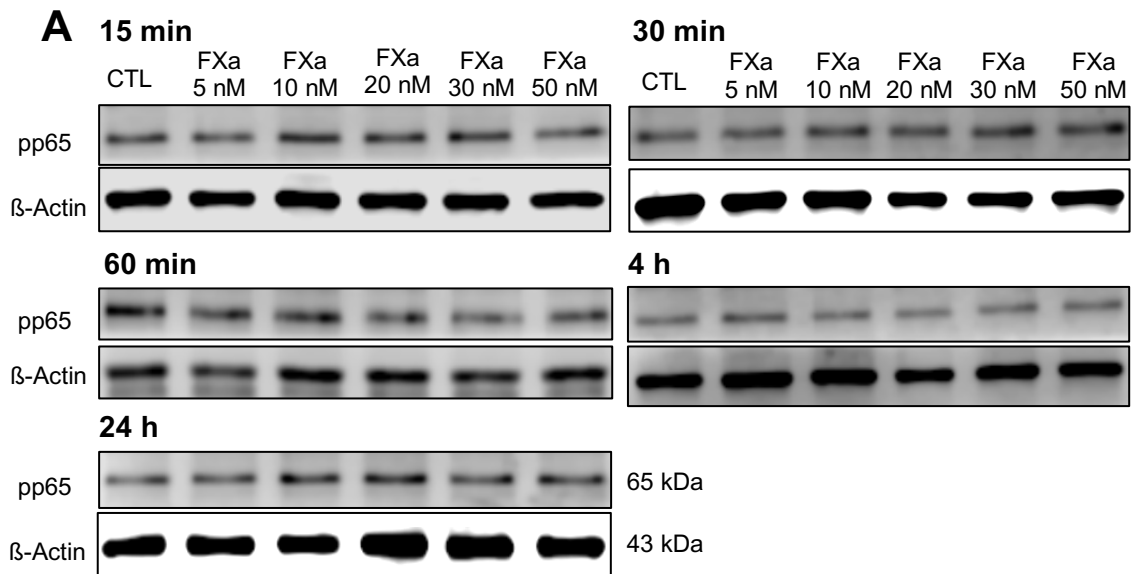
**Abbildung 13:** Proteinexpression von pERK1/2 in HL-1 Zellen nach 15-, 30-, 60-minütigen und 4- und 24-stündigen Inkubationen mit steigenden Konzentrationen des FXa (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM).

**A:** Repräsentativer Ausschnitt eines Western Blots

**B:** Quantitative Auswertung der pERK1/2-Expression (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im Vergleich zur Kontrolle (CTL=1), Expression von pERK1/2 (44/42 kDa) normalisiert zu ERK1/2, n=3

### 3.3 Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B: Mögliche Effekte von FXa und PAR1/-2-Agonisten auf die Untereinheit p65

Als nächstes wurde der zentrale Transkriptionsfaktor Phospho-NF- $\kappa$ B mit der Untereinheit p65 (RelA) untersucht. Wie Abbildung 14 zeigt, veränderte sich die Expression der phosphorylierten Untereinheit p65 (pp65) des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B auch bei konzentrations- und zeitabhängigen FXa-Inkubationen nicht.

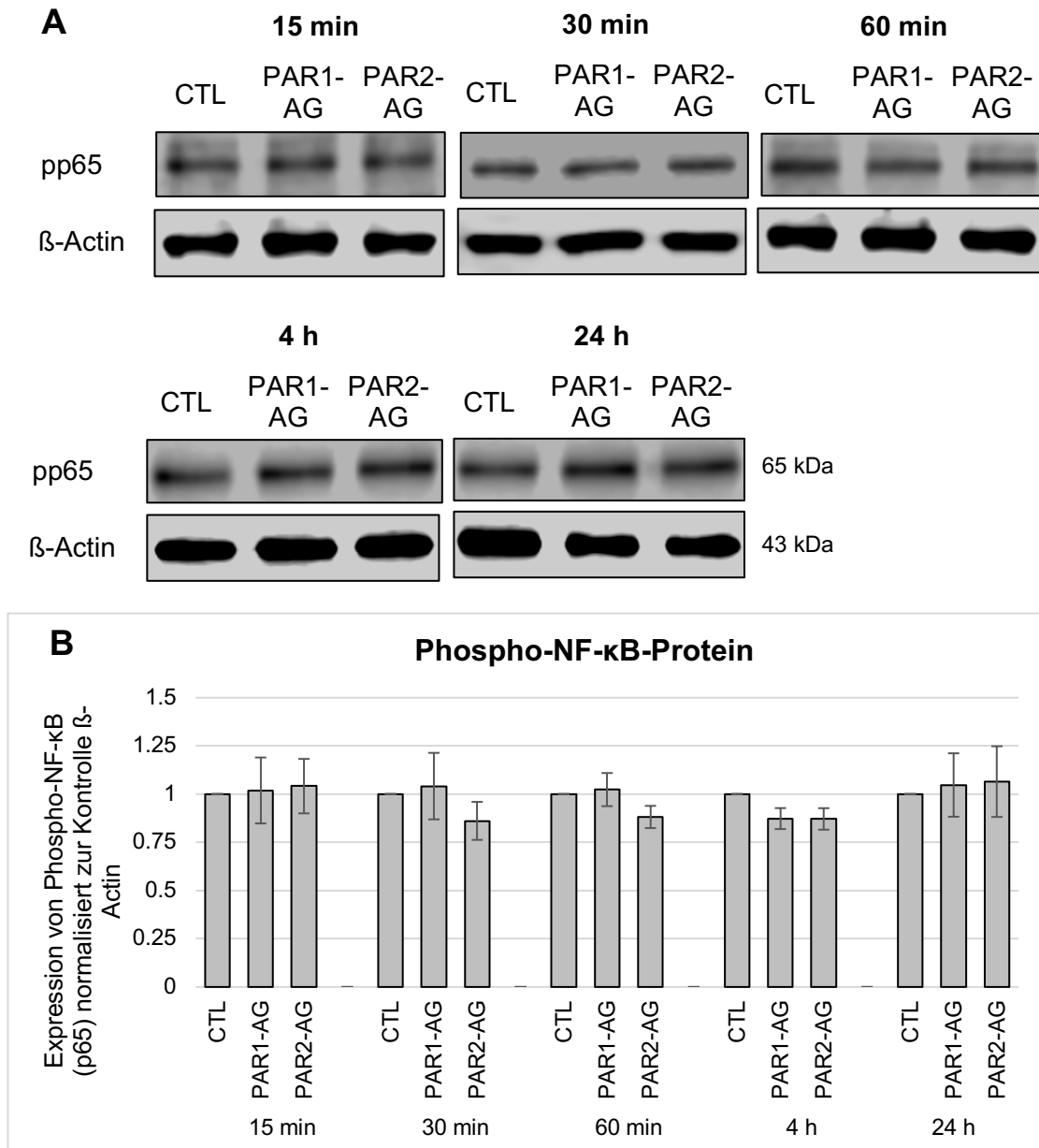


**Abbildung 14:** Proteinexpression von Phospho-NF- $\kappa$ B UE p65 (pp65) in HL-1 Zellen nach 15-, 30-, und 60-minütigen und 4- und 24-stündigen Inkubationen mit steigenden Konzentrationen des FXa (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM).

**A:** Repräsentativer Ausschnitt eines Western Blots

**B:** Quantitative Auswertung der pp65-Expression (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im Vergleich zur Kontrolle (CTL=1), Expression von pp65 normalisiert zur Kontrolle  $\beta$ -Actin, n=3

Weiterhin konnten auch nach der Inkubation mit den PAR1- und PAR2-Agonisten keine signifikanten, zeitabhängigen Effekte auf die Phosphorylierung der Untereinheit p65 (pp65) des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B festgestellt werden (siehe Abbildung 15).



**Abbildung 15:** Proteinexpression von Phospho-NF- $\kappa$ B UE p65 (pp65) in HL-1 Zellen nach 15-, 30- und 60-minütigen und 4- und 24-stündigen Inkubationen mit den PAR1- und PAR2- Agonisten in einer Konzentration von je 20  $\mu$ M.

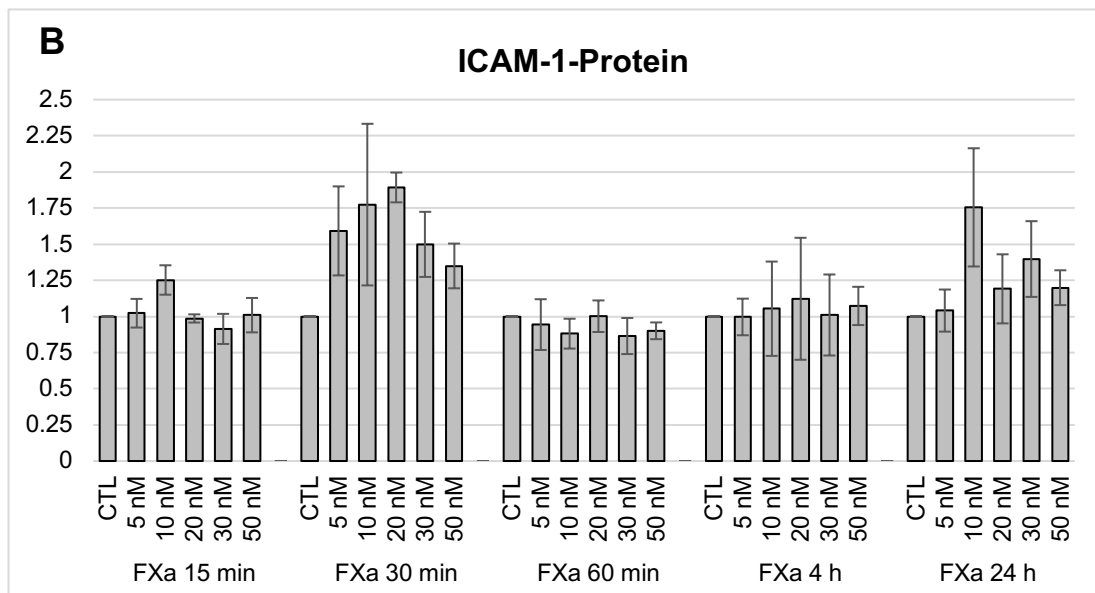
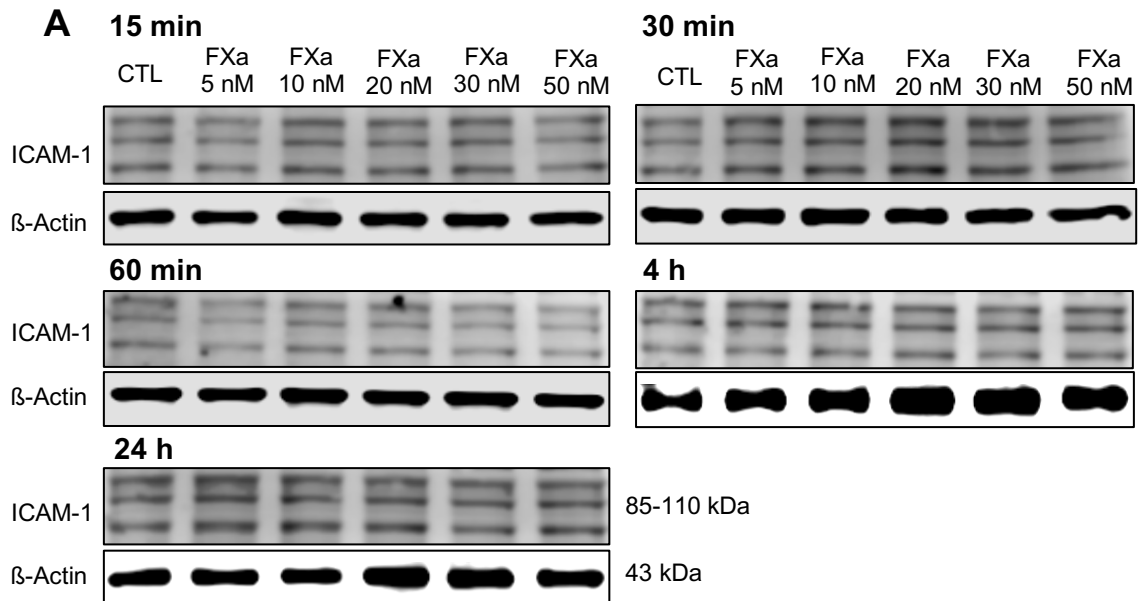
**A:** Repräsentativer Ausschnitt eines Western Blots

**B:** Quantitative Auswertung der pp65-Expression (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im Vergleich zur Kontrolle (CTL=1), Expression von pp65 normalisiert zur Kontrolle  $\beta$ -Actin, n=5

### **3.4 Mögliche Effekte von FXa und PAR1/-2-Agonisten auf ICAM-1, VCAM-1 und Fibronectin**

Es wurden auch mögliche Wirkungen des FXa auf die NF- $\kappa$ B Zielgene untersucht. FXa-Inkubationen über verschiedene Zeiträume und Konzentrationen führten dabei zu keinen signifikanten Änderungen in der „intercellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1) Proteinexpression (siehe Abbildung 16).

ICAM-1 hat nach der Aminosäuresequenz eine Molekülmasse von 55 kDa (Staunton et al., 1988). Da es sich um ein Glykoprotein handelt, beträgt die beobachtete molekulare Masse 73 kDa durch N-Glykosylierung (Dustin et al., 1986). Je nach Zelltyp variiert die Molekülmasse des Glykoproteins von 76 kDa bis 114 kDa (Clark et al., 1986; Dustin et al., 1986). Nach der Herstellerangabe von Santa Cruz der in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper kann man ICAM-1 bei 85–110 kDa detektieren. Dies deckte sich mit dem in dieser Studie beobachteten molekularen Gewicht von ICAM-1 in der HL-1 Zelllinie, wie Abbildung 16 zu erkennen ist.

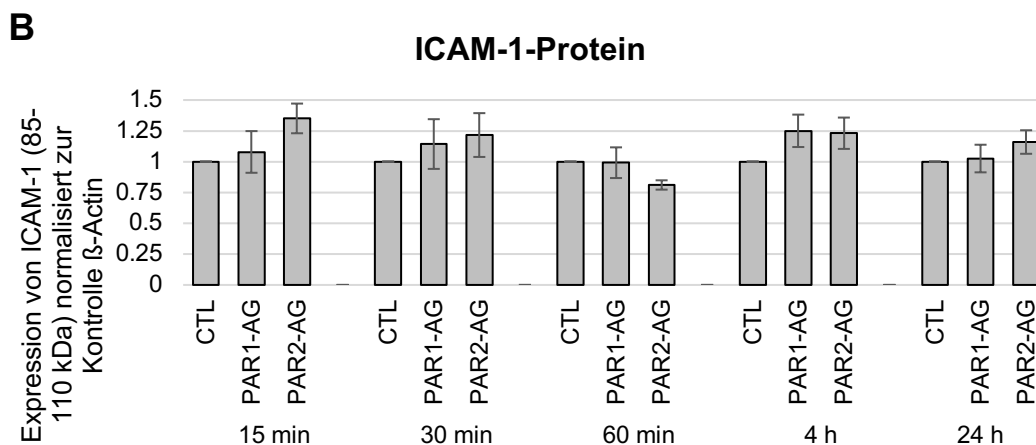
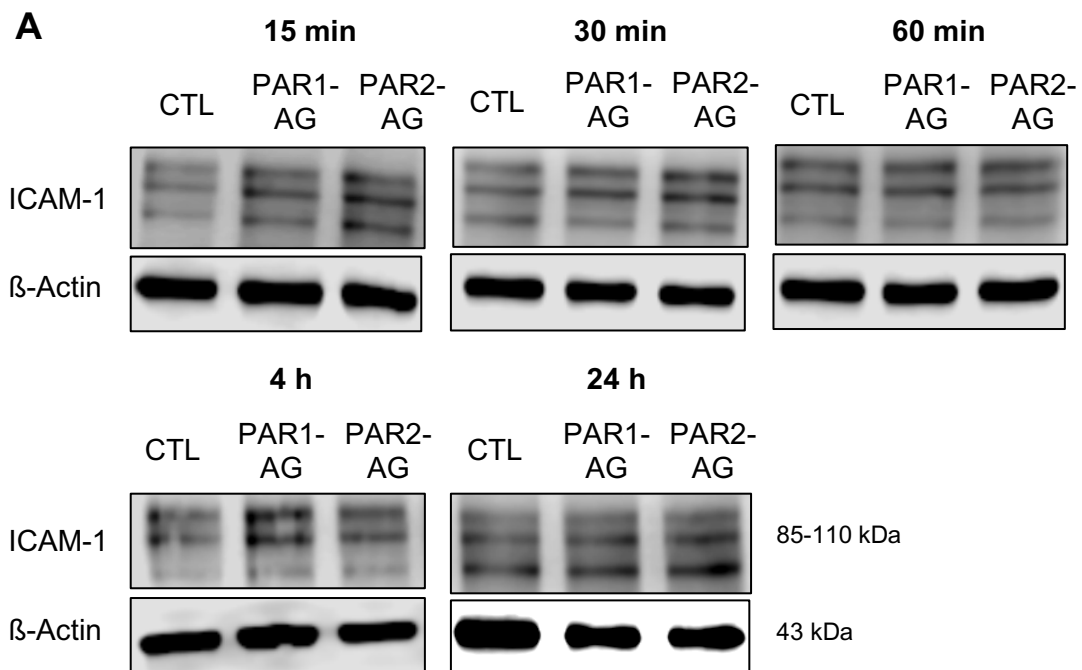


**Abbildung 16:** Proteinexpression von ICAM-1 (85-110 kDa) in HL-1 Zellen nach 15-, 30- und 60-minütigen und 4- und 24-stündigen Inkubationen mit steigenden FXa-Konzentrationen (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM).

**A:** Repräsentativer Ausschnitt eines Western Blots

**B:** Quantitative Auswertung der ICAM-1-Expression (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im Vergleich zur Kontrolle (CTL=1), Expression von ICAM-1 normalisiert zur Kontrolle  $\beta$ -Actin, n=3

Des Weiteren führten die Inkubationen mit den PAR1- und PAR2-Agonisten zu keinen signifikanten, zeitabhängigen Änderungen der ICAM-1-Proteinexpression (siehe Abbildung 17).

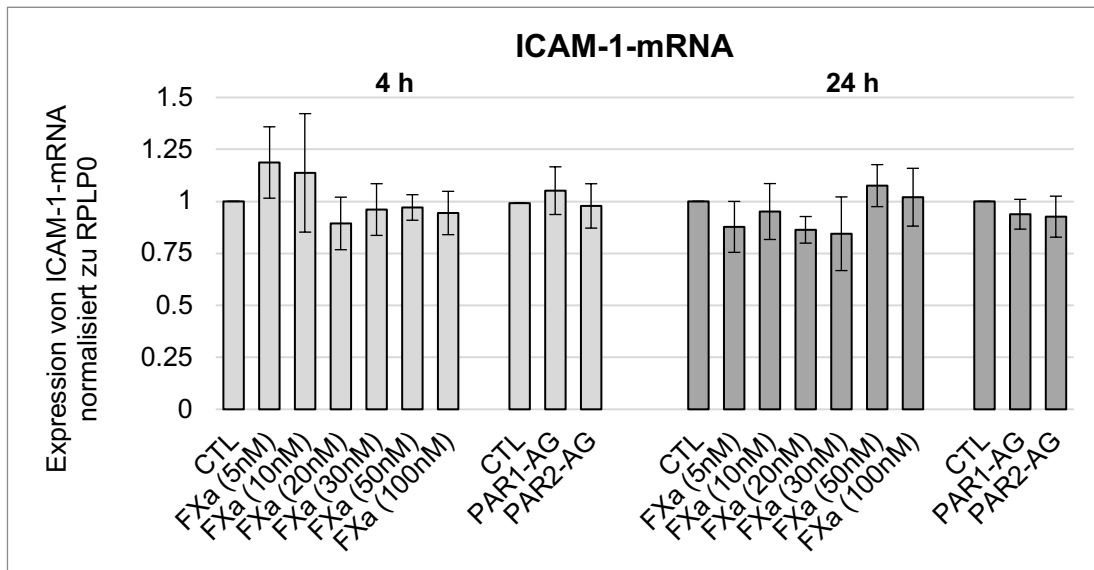


**Abbildung 17:** Die Proteinexpression von ICAM-1 (85-110 kDa) in HL-1 Zellen nach 15-, 30- und 60-minütigen und 4- und 24-stündigen Inkubationen mit den PAR1- und PAR2-Agonisten in einer Konzentration von je 20  $\mu$ M.

**A:** Repräsentativer Ausschnitt eines Western Blots

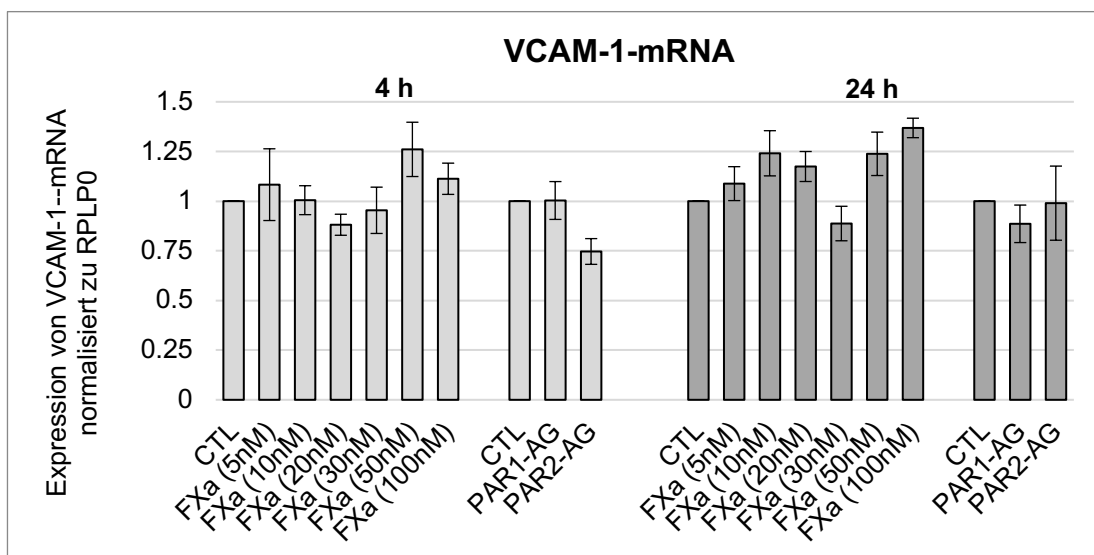
**B:** Quantitative Auswertung der ICAM-1-Expression (Mittelwerte  $\pm$  SEM) im Vergleich zur Kontrolle (CTL=1), Expression von ICAM-1 normalisiert zur Kontrolle  $\beta$ -Actin, n=6

Diese Ergebnisse der ICAM-1-Proteinexpression zeigten sich auch auf Transkriptionsebene, in der keine signifikanten Änderungen der ICAM-1-mRNA nachzuweisen waren (siehe Abbildung 18).

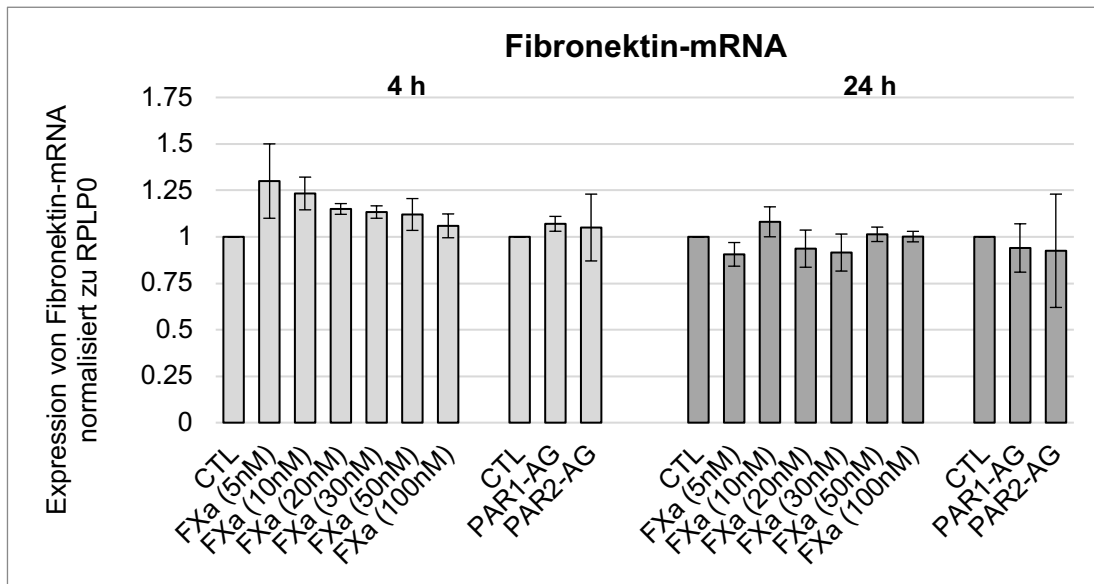


**Abbildung 18:** mRNA-Expression von ICAM-1 in HL-1 Zellen nach 4- und 24-stündigen Inkubationen mit dem FXa in verschiedenen Konzentrationen (5nM, 10nM, 20nM, 30nM, 50nM, 100nM) und den PAR1- und PAR2-Agonisten in einer Konzentration von je 20  $\mu$ M, Mittelwerte  $\pm$  SEM im Vergleich zur Kontrolle (CTL=1). FXa n=4; PAR1/-2-AG n=6.

Es wurden außerdem die Zelladhäsionsmoleküle VCAM-1 und Fibronektin (FN) auf eine mögliche Regulation auf mRNA-Ebene nach 4- und 24-stündigen Inkubationen mit FXa und PAR1- und PAR2-Agonisten untersucht. Auch hier konnten keine signifikanten zeit- oder konzentrationsabhängigen Änderungen beobachtet werden (Abbildungen 19 und 20).



**Abbildung 19:** mRNA-Expression von VCAM-1 in HL-1 Zellen nach 4- und 24-stündigen Inkubationen mit FXa in verschiedenen Konzentrationen (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM, 100 nM) und den PAR1- und PAR2-Agonisten in einer Konzentration von je 20  $\mu$ M, Mittelwerte  $\pm$  SEM im Vergleich zur Kontrolle (CTL=1), FXa n=4; PAR1/-2-AG n=5.

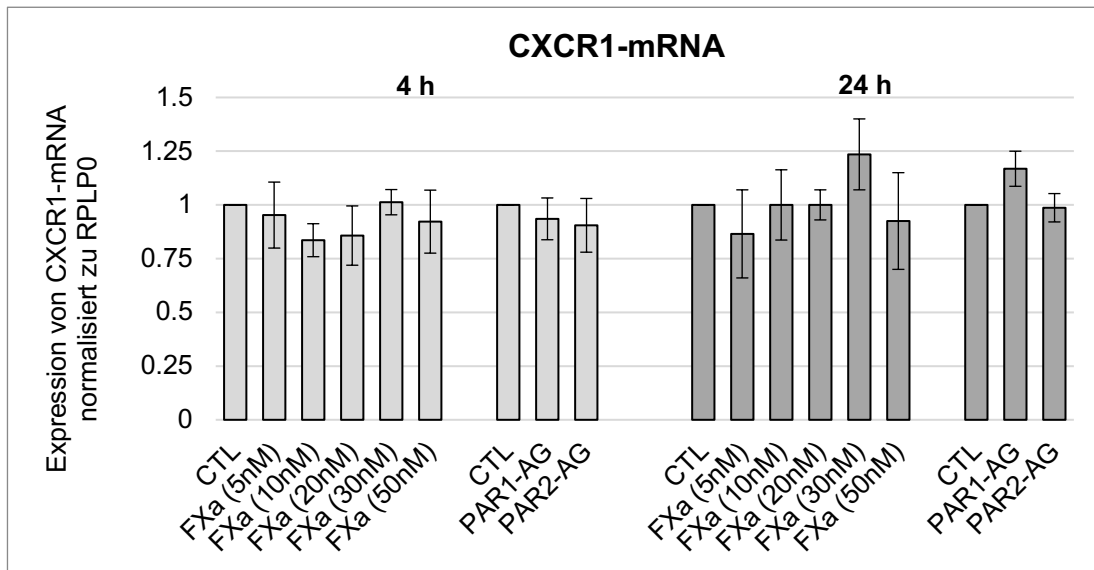


**Abbildung 20:** mRNA-Expression von Fibronectin in HL-1 Zellen nach 4- und 24-stündigen Inkubationen mit FXa in verschiedenen Konzentrationen (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM, 100 nM) und den PAR1- und PAR2-Agonisten in einer Konzentration von je 20  $\mu$ M, Mittelwerte  $\pm$  SEM im Vergleich zur Kontrolle (CTL=1), FXa n=3; PAR1/-2-AG n=3.

### 3.5 Der mögliche Einfluss von FXa und PAR1/-2-Agonisten auf den Immunrezeptor CXCR1

Zusätzlich wurde eine mögliche Beeinflussung des Chemokinrezeptors CXCR1 (C-X-C motif chemokine receptor 1 bzw. Interleukin-8-Rezeptor alpha) durch 4- und 24-stündige Inkubationen mit FXa oder PAR1- und PAR2-Agonisten überprüft. Es konnten keine konzentrations- oder zeitabhängigen Änderungen der Transkription von CXCR1 beobachtet werden (siehe Abbildung 21).

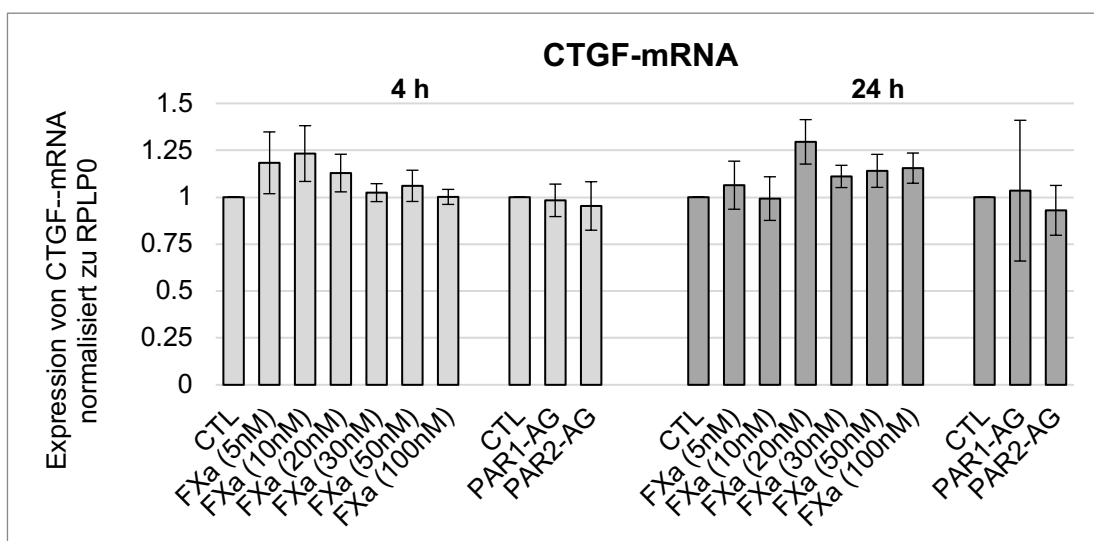




**Abbildung 21:** mRNA-Expression von CXCR1 in HL-1 Zellen nach 4- und 24-stündigen Inkubationen mit FXa in verschiedenen Konzentrationen (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM) und den PAR1- und PAR2-Agonisten in einer Konzentration von je 20  $\mu$ M, Mittelwerte  $\pm$  SEM im Vergleich zur Kontrolle (CTL=1), FXa n=4; PAR1/-2-AG n=6.

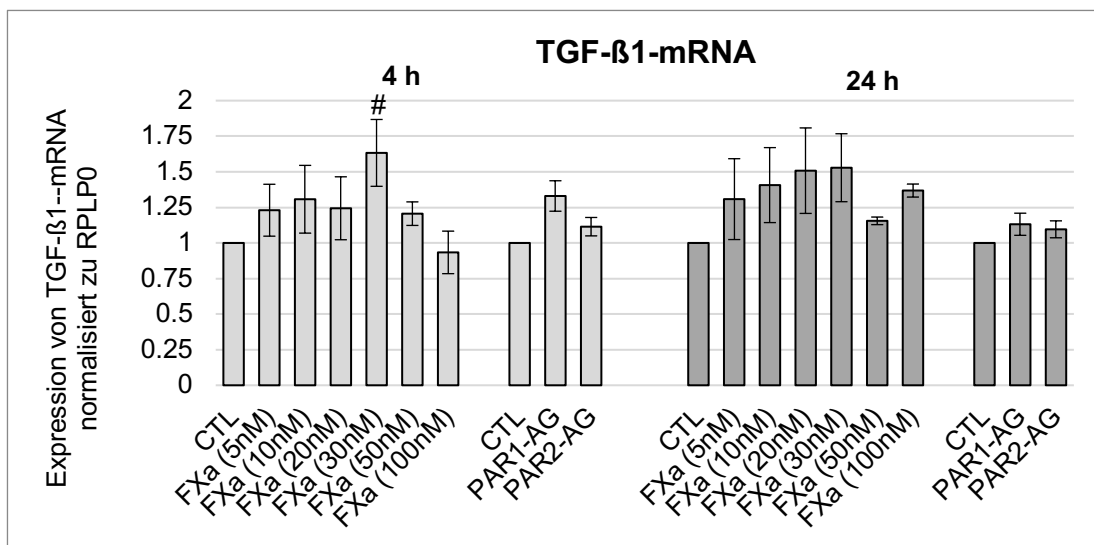
### 3.6 Der mögliche Einfluss von FXa und PAR1/-2-Agonisten auf die Expression von CTGF und TGF- $\beta$ 1

Auf Transkriptionsebene wurde die mRNA-Expression von „connective tissue growth factor“ (CTGF) und „transforming growth factor beta 1“ (TGF- $\beta$ 1) als zwei Biomarker der kardialen Fibrose untersucht. Für CTGF wurde keine zeit- oder konzentrationsabhängige Regulation durch FXa oder PAR1- und PAR2-Agonisten festgestellt (Abbildung 22).



**Abbildung 22:** mRNA-Expression von CTGF in HL-1 Zellen nach 4- und 24- stündigen Inkubationen mit FXa in verschiedenen Konzentrationen (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM, 100 nM) und PAR1- und PAR2-Agonisten in einer Konzentration von je 20  $\mu$ M, Mittelwerte  $\pm$  SEM im Vergleich zur Kontrolle (CTL=1), FXa n=3; PAR1/-2-AG n=3.

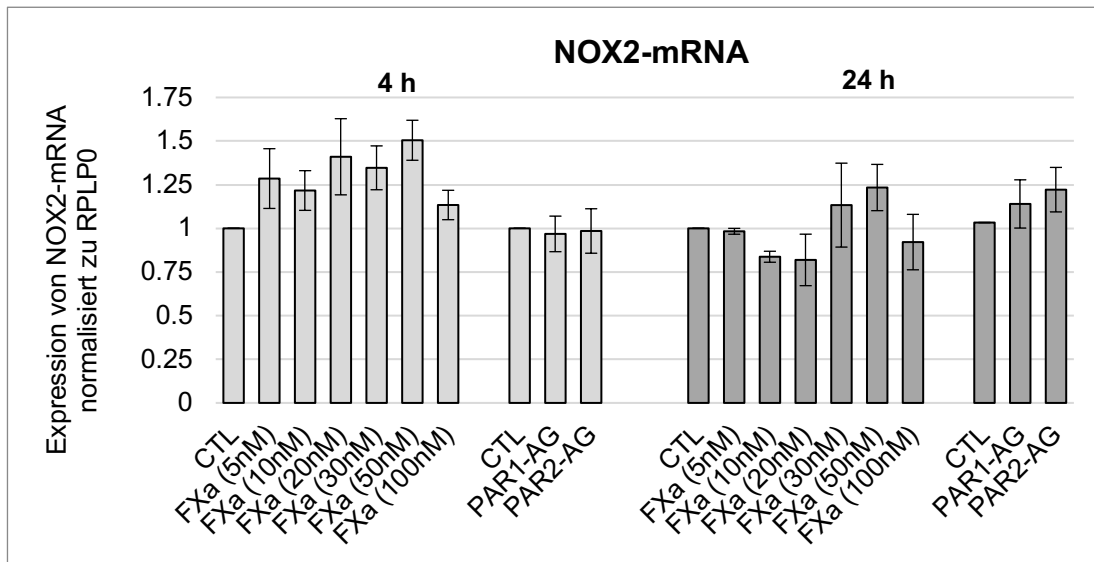
In Abbildung 23 sind die Einflüsse von FXa und PAR1/-2-AG auf die TGF- $\beta$ 1-mRNA Expression gezeigt. Lediglich bei der 4-stündigen FXa-Inkubation (30 nM) konnte ein statistisch signifikanter Anstieg der mRNA-Expression beobachtet werden (CTL: 1,00 vs. FXa [30 nM]:  $1,63 \pm 0,23$ ,  $p < 0,05$ ). Jedoch zeigten sowohl die höheren FXa-Konzentrationen (50 nM, 100 nM) als auch die 24-stündigen FXa-Inkubationen keinen signifikanten Anstieg der TGF- $\beta$ 1-mRNA. Es wurden also insgesamt keine zeit- oder konzentrationsabhängigen Effekte von FXa festgestellt. Die fehlende Stimulation von TGF- $\beta$ 1 zeigte sich auch in den 4- und 24-stündigen Inkubationen mit den PAR1/-2-Agonisten (je 20  $\mu$ M).



**Abbildung 23:** mRNA-Expression von TGF- $\beta$ 1 in HL-1 Zellen nach 4- und 24-stündigen Inkubationen mit FXa in verschiedenen Konzentrationen (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM, 100 nM) und den PAR1- und PAR2-Agonisten in einer Konzentration von je 20  $\mu$ M, Mittelwerte  $\pm$  SEM im Vergleich zur Kontrolle (CTL=1), #= $p < 0,05$  und damit statistisch signifikant erhöht im Vergleich zur CTL, FXa n=4; PAR1/-2-AG n=6.

### 3.7 Der mögliche Einfluss von FXa und PAR1/-2-Agonisten auf die Expression von NOX-2

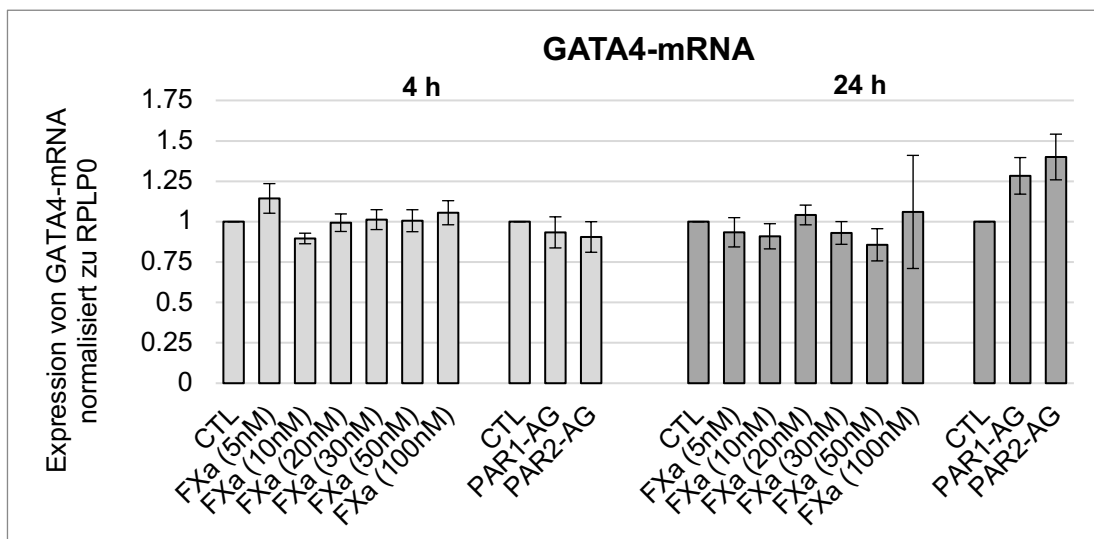
Es konnten keine signifikante Änderung der NOX2 mRNA-Expression auf die konzentrations- und zeitabhängigen Inkubationen mit dem aktivierten Gerinnungsfaktor X (FXa) und den PAR1- und PAR2-Agonisten festgestellt werden (siehe Abbildung 24).



**Abbildung 24:** mRNA-Expression von NOX-2 in HL-1 Zellen nach 4- und 24- stündigen Inkubationen mit FXa in verschiedenen Konzentrationen (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM, 100 nM) und den PAR1- und PAR2-Agonisten in einer Konzentration von je 20  $\mu$ M, Mittelwerte  $\pm$  SEM im Vergleich zur Kontrolle (CTL=1), FXa n=4; PAR1-/2-AG n=6.

### 3.8 Mögliche Effekte von FXa und PAR1/-2-Agonisten auf den Zinkprotein-Transkriptionsfaktor GATA4

Nach Inkubation mit FXa und PAR1- und PAR2-Agonisten konnten weder zeit- noch konzentrationsabhängige Veränderungen der mRNA-Expression des Zinkprotein-Transkriptionsfaktors GATA4 festgestellt werden (siehe Abbildung 25).



**Abbildung 25:** mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors GATA4 in HL-1 Zellen nach 4- und 24- stündigen Inkubationen mit FXa in verschiedenen Konzentrationen (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM, 100 nM) und den PAR1- und PAR2-Agonisten in einer Konzentration von je 20  $\mu$ M, Mittelwerte  $\pm$  SEM im Vergleich zur Kontrolle (CTL=1), FXa n=4; PAR1-/2-AG n=6.

## 4 Diskussion

### 4.1 Hauptergebnisse

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) in Kardiomyozyten der HL-1 Zelllinie exprimiert wurden. PAR1 wurde in der nicht-glykosylierten Form (47 kDa) und glykosylierten Variante (66 kDa) exprimiert. Ebenfalls wurden PAR2 (60 kDa) und PAR4 (47 kDa) exprimiert.

Die *in vitro* durchgeführten Experimente mit den PAR1/-2-Agonisten (20  $\mu$ M; 4 h, 24 h) und dem aktivierten Gerinnungsfaktor X (FXa) (5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM) in verschiedenen Inkubationszeiten (4- und 24-stündiger Stimulation) zeigten keine Änderungen der Expression der Rezeptoren PAR1, PAR2 und PAR4.

Es zeigte sich keine Aktivierung der intrazellulären inflammatorischen Signalkaskade. So gab es keine Änderung in der Expression auf Transkriptions- und Proteinebene von phosphorylierten „extracellular-signal regulated kinases“ (pERK1/2), der phosphorylierten Untereinheit p65 (pp65) des Transkriptionsfaktors „nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“ (NF- $\kappa$ B) und des Zelladhäsionsmoleküls „intercellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1). Die weiteren Zelladhäsionsmoleküle „vascular cell adhesion molecule 1“ (VCAM-1) und Fibronektin (FN) zeigten keine verstärkte mRNA-Expression. Bei den kardialen Biomarkern der Fibrose „transforming growth factor beta 1“ (TGF- $\beta$ 1) und „connective tissue growth factor“ (CTGF) konnte für TGF- $\beta$ 1 bei 4-stündiger Inkubation mit 30 nM FXa eine statistisch signifikant gesteigerte mRNA-Expression ( $p < 0,05$ ) nachgewiesen werden. Jedoch führten sowohl die höheren FXa-Konzentrationen (50 nM, 100 nM), als auch die 24-stündigen FXa-Inkubationen zu keinem signifikanten Anstieg der TGF- $\beta$ 1-mRNA. Es wurden also keine zeit- oder konzentrationsabhängigen Effekte von FXa nachgewiesen. Die fehlende Stimulation von TGF- $\beta$ 1 bestätigte sich auch in den 4- und 24-stündigen Inkubationen mit den PAR1/-2-Agonisten (je 20  $\mu$ M). Für CTGF konnte keine Änderung der mRNA-Expression festgestellt werden. Der Immunrezeptor „CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 1“ (CXCR1), die NADPH-Oxidase 2 (NOX2) und der Transkriptionsfaktor „GATA binding protein 4“ (GATA4) wiesen auch nach FXa- oder PAR1/-2-Agonisten-Inkubation keine zeit- oder konzentrationsabhängigen Änderungen in der mRNA-Expression auf. Der FXa und die murinen PAR1/-2-Agonisten übten also über die PAR keine direkten Effekte auf die Kardiomyozyten der HL-1 Zellen aus.

## 4.2 Die zunehmende Bedeutung des VHF

Wie unter 1.1.1 erläutert wurde, nahmen die Prävalenz und Inzidenz des VHF in den letzten Jahrzehnten zu (Chugh et al., 2014; Miyasaka et al., 2006; Schnabel, Yin, et al., 2015; Wolf et al., 1996). Go et al. beschrieben 2001, dass sich die Prävalenz des VHF in den USA in den nächsten 50 Jahren um das 2,5-Fache erhöhen könnte, was insbesondere den zunehmenden Anteil älterer Menschen widerspiegeln würde (Go et al., 2001). Im Zusammenhang mit einer steigenden Lebenserwartung und der Zunahme kardiovaskulärer Erkrankungen und Risikofaktoren hat das VHF eine große Bedeutung in der heutigen Zeit. Diesen Zusammenhang wiesen unter anderem Wolf et al. (1991) eindrucksvoll in der Framingham Studie nach, in der das VHF als ein unabhängiger Risikofaktor für einen Schlaganfall identifiziert werden konnte: Während das attributable Risiko bei VHF für einen Schlaganfall bei den 50- bis 59-Jährigen noch bei 1,5% lag, stieg es bei den 70- bis 79-Jährigen bereits auf 9,9% und lag bei den 80- bis 89-Jährigen bei 23,5%. Dagegen wurden die attributablen Risiken bei anderen kardiovaskulären Erkrankungen wie Hypertension und KHK vom steigenden Alter nicht beeinflusst oder nahmen sogar ab (Wolf et al., 1991). Aufgrund der zunehmenden klinischen Bedeutung des VHF wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl an internationalen Studien zur Pathophysiologie des VHF publiziert. Hervorzuheben ist hier die Forschung des Netzwerkes „The European Network for Translational Research in Atrial Fibrillation (EUTRAF)“ von 2010-2015, das wesentliche Erkenntnisse in der Ätiologie und Pathophysiologie des atrialen Remodelings durch VHF gewinnen konnte (Schotten et al., 2015).

Wie unter 1.1.5 beschrieben wurde, führt VHF unter Erfüllung der Virchow'schen Trias zu einem prokoagulatorischen Zustand, der u.a. für das Risiko thromboembolischer Ereignisse bei VHF verantwortlich ist. Spronk et al. (2017) zeigten in einem Tiermodell mit transgenen Mäusen mit einem prokoagulatorischen Phänotyp, dass Hyperkoagulabilität die Anfälligkeit für VHF und die Ablagerung von Kollagen in den Vorhöfen erhöhte. So scheint die Hyperkoagulation nicht nur Folge von VHF zu sein, sondern auch zu dessen Entstehung und Aufrechterhaltung beizutragen (Spronk et al., 2017). Es ist bekannt, dass Gerinnungsfaktoren Einfluss auf Zellen über PAR nehmen können. So beobachteten Bukowska et al. (2013) an rechtsatrialen Gewebeschnitten aus dem menschlichen Vorhof eine FXa-abhängige PAR1- und PAR2-vermittelte Aktivierung von ERK1/2 und NF-κB (Bukowska et al., 2013). Um den Einfluss von FXa auf das atriale Remodeling weiter aufzuschlüsseln, wurden die Effekte von FXa auf Kardiomyozyten der murinen, adulten, atrialen HL-1 Zelllinie untersucht.

### **4.3 Expression von PAR1, PAR2 und PAR4 auf Kardiomyozyten der HL-1 Zelllinie**

Die Bedeutung der PAR, die in den unterschiedlichsten Geweben bzw. Zellen exprimiert werden (Macfarlane et al., 2001), wird sowohl in der Hämostaseologie als auch in der Kardiologie intensiv erforscht. Die Aktivierung von PAR1 beispielsweise bewirkte eine Stimulierung der Thrombozytenaggregation (Andersen et al., 1999), erhöhte über einen p-Selektin-abhängigen Mechanismus die Adhäsion in Endothelzellen (HUVECs) (Sugama & Malik, 1992) und induzierte in adulten, atrialen Rattenfibroblasten eine profibrotische und proinflammatorische Antwort (Spronk et al., 2017).

In der vorliegenden Untersuchung konnte belegt werden, dass Kardiomyozyten der HL-1 Zelllinie mit sowohl kontraktile als auch phänotypisch adulten Eigenschaften (Claycomb et al., 1998; Field, 1988) PAR1, PAR2 und PAR4 exprimieren. In der aktuellen Literatur wurde die Expression von PAR1 auf Kardiomyozyten bereits beschrieben, so beispielsweise für ventrikuläre Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten (Glembotski et al., 1993; Jiang et al., 1996). Es konnte die Expression von PAR1 in der nicht-glykosylierten Form (47 kDa) und der glykosylierten Variante (66 kDa) in Kardiomyozyten der HL-1 Zelllinie gezeigt werden. Interessanterweise konnten Brass et al. (1992) in HEL-Zellen (human erythroleukemia), in Thrombozyten und in humanen, megakaryoblastischen Zellen (CHRF-288) nur die glykosylierte Form (66 kDa) detektieren (Brass et al., 1992). Dagegen konnten Kuliopulos et al. für COS-7-Fibroblasten und HEL-Zellen eine breite Streuung im Glykosylierungsgrad des Rezeptors nachweisen, was sich in Molekülmassen von 34–100 kDa äußerte (Kuliopulos et al., 1999). Der Unterschied im Glykosylierungsgrad könnte zum einen darin begründet sein, dass die verschiedenen zur Detektion der Proteine benutzten Antikörper mögliche Formen der N-Glykosylierung von PAR1 nicht erkennen können. Zum anderen könnte je nach Zelllinie und deren Herkunft ein unterschiedlicher Saccharidanteil am N-terminalen Ende durch verschiedene, posttranslationale Modifikationen entstehen. Es konnte gezeigt werden, dass eine fehlende N-Glykosylierung von PAR1 die Expression an der Zelloberfläche verminderte (Soto & Trejo, 2010; Tordai et al., 1995). Inwiefern der Grad der Glykosylierung die Internalisierung, die Translokation oder insbesondere die Funktion von PAR1 beeinflusst, sollte in zukünftigen *in vitro* Experimenten untersucht werden.

Das Molekulargewicht des humanen PAR2 beträgt für die nicht-glykosylierte Form 36–46 kDa und für die glykosylierte Variante 55–100 kDa, wobei auch hier eine fehlende N-Glykosylierung die Rezeptorexpression an der Zelloberfläche verminderte (Compton et al., 2002). Der humane PAR2 hat zu 83% die identische Aminosäuresequenz wie der murine PAR2 (Bohm et al., 1996). In dieser Arbeit konnte nun erstmals eine PAR2-

Proteinexpression in murinen Kardiomyozyten der HL-1 Zelllinie nachgewiesen werden. Die beobachtete Molekülmasse von 60 kDa könnte durch Abweichungen in der Aminosäuresequenz oder durch eine Glykosylierung von PAR2 in HL-1 Zellen begründet sein.

Hohe PAR4-mRNA Spiegel konnten in humanen Geweben über Northern Blot Analysen in Lunge, Pankreas, Schilddrüse, Hoden und Dünndarm und geringere Expressionen in Plazenta, Skelettmuskel, Lymphknoten, Nebenniere, Prostata, Uterus und im Kolon nachgewiesen werden (Xu et al., 1998). Während im humanen Herzgewebe bisher keine PAR4-Expression festgestellt werden konnte (Xu et al., 1998), wurde im murinen Herzgewebe eine schwache Expression detektiert (Kahn et al., 1998). Dies bestätigte sich auch in den Kardiomyozyten der murinen HL-1 Zelllinie, in der eine Expression von PAR4 mit der vorhergesagten molekularen Masse von 47 kDa nachgewiesen werden konnte.

## **4.4 Fehlende Effekte des FXa auf Kardiomyozyten der HL-1 Zelllinie**

### **4.4.1 Fehlende Effekte auf die Expression von PAR1, PAR2 und PAR4 in Kardiomyozyten nach FXa Stimulation**

Nach der irreversiblen, proteolytischen Aktivierung des Protease-aktivierten Rezeptors wird dieser per Endozytose im Endosom internalisiert und im Unterschied zu anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) nicht zur Wiederverwertung erneut an die Zellmembran gebracht, sondern zu den Lysosomen zur dortigen Degradation transportiert (Hein et al., 1994). Aus einem intrazellulären, endosomalen Speicher werden dann funktionstüchtige PAR an die Zellmembran zur erneuten Thrombinstimulation transportiert (Hein et al., 1994; Horvat & Palade, 1995). Ellis et al. (1999) zeigten an humanen Endothelzellen, dass Thrombin nach PAR1-Aktivierung über den intrazellulären Gi-gekoppelten Ras/MAPK-Signalweg die PAR1-mRNA Expression steigerte (Ellis et al., 1999). Und wie in 1.3.3 bereits beschrieben wurde, zeigten Spronk et al. (2017) an adulten, atrialen Rattenfibroblasten, dass Thrombin die PAR1-mRNA Expression über die PAR1-Aktivierung erhöhte (Spronk et al., 2017). Auch FXa stimulierte die PAR1-mRNA Expression in adulten, atrialen und ventrikulären Rattenfibroblasten (D'Alessandro et al., 2021). In der vorliegenden Untersuchung traten nach FXa-Inkubationen für PAR1, PAR2 und PAR4 keine zeit- oder konzentrationsabhängigen Änderungen in deren Expression in der HL-1 Zelllinie auf.

#### **4.4.2 Fehlende Aktivierung der inflammatorischen Signalkaskade in Kardiomyozyten der HL-1 Zelllinie durch FXa**

*In vitro* führte FXa in aufsteigenden Konzentrationen und zu verschiedenen Inkubationszeiten zu keiner Steigerung der Expression von phosphorylierten ERK1/2 (pERK1/2) oder der phosphorylierten Untereinheit p65 (pp65) des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. Auch auf die Expression der Zielgene des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, wie das Zelladhäsionsmolekül ICAM-1 oder VCAM-1 hatte FXa in unterschiedlichen Konzentrationen und Versuchslängen keinen Einfluss. Hierbei ist vor allem pERK1/2 näher zu betrachten. In der vorliegenden Studie blieb eine vermehrte Phosphorylierung von ERK1/2 aus. Für pERK2 (42 kDa) wurde eine konstante Expression festgestellt, während pERK1 (44 kDa) kaum exprimiert wurde. Dieses Expressionsmuster von pERK1/2 in HL-1 Zellen wurde auch von Herde (2019) nachgewiesen. In der Kontrollgruppe (ohne elektrische Stimulation) wurde vor allem pERK2 exprimiert. Nach der Stimulation der HL-1 Zellen durch 24-stündiges sog. „rapid pacing“ konnte dann eine Zunahme von pERK1/2 festgestellt werden, wobei pERK1 stärker anstieg (Herde, 2019, pp. 47-50). Die verstärkte Expression von pERK1/2 wurde auch in einem Hundemodell mit Herzinsuffizienz und VHF belegt (Cardin et al., 2003). Dagegen ergaben *in vivo* Studien unterschiedliche Ergebnisse. Im Vergleich zu Patienten mit Sinusrhythmus wurde bei Patienten mit VHF im rechten Vorhof entweder eine verstärkte Expression von pERK1/2 (Goette et al., 2000) oder eine gleichbleibende pERK1/2 Expressierung festgestellt (Herde, 2019, pp. 52-54). Diese diskrepanten Beobachtungen erklärte Herde (2019) unter anderem mit Unterschieden bei den Vorerkrankungen, der medikamentösen Therapie und Inhomogenitäten im Vorhofgewebe (Herde, 2019, p. 80). In einer zukünftigen klinischen Studie bestünde die Möglichkeit, die Ursachen für diese diskrepanten Ergebnisse zu identifizieren. Insgesamt ist es von großer Bedeutung, verschiedene kardiale Modelle zu charakterisieren, um möglichst viele Erkenntnisse insbesondere über das atriale Remodeling gewinnen zu können.

##### **4.4.2.1 HL-1 Zellen als Modell zur Untersuchung des atrialen Remodelings**

Wichtige neue Erkenntnisse zum VHF-induzierten, atrialen Remodeling lieferten u. a. *in vivo* Modelle mit Schafen (Filgueiras-Rama et al., 2012; Martins et al., 2014) und Mäusen (Bukowska et al., 2018) und *ex-vivo* Untersuchungen an humanen Vorhofgewebeschnitten (Bukowska et al., 2013). Die Experimente an Tieren und humanen Geweben sind aber in der Regel sehr kosten- und zeitintensiv. Zudem sind hier ethische Aspekte mit zu berücksichtigen. Bei allen Modellen ist zu bedenken, dass es nur eine begrenzte Anzahl an Tieren oder Spendern gibt. Auch sind gesunde Kontrollgruppen hier meist unterrepräsentiert oder nicht vorhanden. Daher ist es wichtig,



auch Zellkulturen für den Erkenntnisgewinn zu nutzen. Um eine Wirkungsbeziehung zwischen FXa und Kardiomyozyten untersuchen zu können, wurde die HL-1 Zelllinie als geeignet angesehen.

An der von uns untersuchten murinen HL-1 Zelllinie konnte gezeigt werden, dass sie als *in vitro* Modell zur Untersuchung des atrialen Remodelings geeignet ist, was sich in elektrophysiologischen und strukturellen Veränderungen der Zellkultur darstellte (Climent et al., 2015). Zudem lieferten Experimente an HL-1 Zellen weitere Einblicke in die intrazelluläre Regulation von Kardiomyozyten nach Hypoxie (Nguyen & Claycomb, 1999) und in mögliche Therapieansätze wie beispielsweise die Aufrechterhaltung des ATP-Spiegels in Mitochondrien (Nagai et al., 2017). Allerdings gibt es auch hier Grenzen für dieses Modell. HL-1 Zellen exprimieren stetig das SV40 large T antigen Onkogen. Dadurch können sich einzelne HL-1 Zellen in verschiedenen Zellzyklusphasen befinden und zur Heterogenität der jeweiligen Zellkultur führen (van Gorp et al., 2020). Es wurden auch elektrophysiologische Unterschiede in den durch Passagieren erhaltenen HL-1 Zellklonen beschrieben, was die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit von Experimenten beeinträchtigen kann (Dias et al., 2014; Sartiani et al., 2002; van Gorp et al., 2020). Tatsächlich fanden Monge et al. (2009) auch erhebliche Unterschiede im Energiestoffwechsel der HL-1 Zellen im Vergleich zu adulten Rattenkardiomyozyten. So zeigte sich in HL-1 Zellen ein anderes Spektrum an Zytochromen mit einem 7-fach geringeren Gehalt des Zytochrom-aa<sub>3</sub>-Komplexes. Auch funktionell zeigte die Atmungskette in HL-1 Zellen eine 4-8-fach niedrigere Aktivität, gemessen am Sauerstoffverbrauch VO<sub>2</sub> nach ADP-Gabe. Bei deutlich höherer Hexokinaseaktivität in den HL-1 Zellen schien der Energiebedarf vornehmlich über die glykolytischen Reaktionen gedeckt zu werden (Monge et al., 2009). Weiterhin konnte in der Fluoreszenzmikroskopie eine unterschiedliche Anordnung der Mitochondrien und eine fehlende Expression von  $\beta$ -Tubulin II in HL-1 Zellen im Vergleich zu embryonalen, ventrikulären Rattenmyoblasten (H9c2) dokumentiert werden (Kuznetsov et al., 2015). Kuznetsov et al. (2015) führten u. a. den Ursprung der HL-1 Zellen aus Tumorzellen als mögliche Erklärung für die Unterschiede auf. Hierbei neigen Tumorzellen im Rahmen des sog. Warburg-Effekts zur anaeroben Glykolyse bei eingeschränkter mitochondrialer Energiegewinnung (Kuznetsov et al., 2015).

#### **4.4.2.2 Unterschiede zwischen den Kardiomyozyten-Zellkulturen**

Im Gegensatz zu der von uns festgestellten ausbleibenden Aktivierung von PAR1 durch FXa an murinen, adulten, atrialen Kardiomyozyten der HL-1 Zelllinie wiesen Sabri et al. (2002) an einer Zellkultur aus neonatalen, ventrikulären Rattenmyozyten eine PAR1-abhängige, thrombininduzierte Steigerung der Phosphorylierung der MAP-Kinasen

ERK1/2 nach (Sabri et al., 2002). Weiterführend zeigten Guo et al. (2020) an neonatalen, ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte, dass eine FXa-vermittelte Aktivierung von PAR1 und PAR2 zu einem exzentrischen, hypertrophen Phänotyp, zur erhöhten ANP-Expression und zur verstärkten Phosphorylierung von ERK1/2 und ERK 5 führt (Guo et al., 2020). Hierbei gibt es zwischen den Kardiomyozyten-Zellkulturen Unterschiede, die nachfolgend erläutert werden.

Dies könnte zum einen darin begründet liegen, dass es Unterschiede zwischen den Spezies (Maus vs. Ratte) nach PAR-Aktivierung gibt. So konnten Derian et al. (1995) Unterschiede in der durch PAR1-Aktivierung induzierten Thrombozytenaggregation in verschiedenen Spezies zeigen (Derian et al., 1995): PAR1 spielte beim Menschen eine wichtige Rolle bei der Thrombin-induzierten Plättchenaggregation (Brass et al., 1992; Hung et al., 1992; Vu et al., 1991), während er beim Kaninchen und beim Hund lediglich zu einer Formänderung der Thrombozyten beitrug (Connolly et al., 1994) und bei Ratten in der Thrombozytenaktivierung keine Rolle spielte (Connolly et al., 1994; Derian et al., 1995). Je nach Spezies kann es also zu unterschiedlichen PAR-Antworten kommen, was bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muss.

Zum anderen wurden Untersuchungen an Kardiomyozyten aus unterschiedlichem Gewebe (Herzvorhof vs. Herzkammer) durchgeführt. Tatsächlich zeigten Nakajima et al. (2000), dass transgene Mäuse mit TGF- $\beta$ 1 überexprimierenden Herzen eine deutliche Fibrose in den Vorhöfen entwickelten, während diese in den Ventrikeln nicht festzustellen war (Nakajima et al., 2000). Bachli et al. (2003) zeigten, dass die FXa-Stimulation an dermalen Fibroblasten im Gegensatz zu Lungenfibroblasten zu keiner Steigerung der VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Sekretion führte. Es gab eine unterschiedliche PAR-Expression, wie eine verringerte PAR1-Expression und eine fehlende PAR2-Expression in dermalen Fibroblasten im Vergleich zu den Lungenfibroblasten. Somit kam es abhängig von der Herkunft der Fibroblasten zu unterschiedlichen Antworten auf FXa (Bachli et al., 2003). D'Alessandro et al. (2021) stellten die zellulären Antworten nach FXa-Stimulation in atrialen und ventrikulären Rattenfibroblasten gegenüber. Zum einen war die basale IL-6-mRNA Expression bei den atrialen Rattenfibroblasten höher als bei den ventrikulären Rattenfibroblasten. Zum anderen zeigte sich nach FXa-Stimulation eine Steigerung der IL-6-mRNA Produktion in den ventrikulären Rattenfibroblasten, die in den atrialen Rattenfibroblasten ausblieb (D'Alessandro et al., 2021).

Es handelte sich zudem um Kardiomyozyten unterschiedlichen biologischen Alters (adult vs. neonatal). Man geht davon aus, dass Kardiomyozyten von Säugetieren innerhalb der ersten zwei neonatalen Wochen in die postmitotische Phase eintreten (F. Li et al., 1996;

Soonpaa et al., 1996). Es ist daher vorstellbar, dass neonatale Kardiomyozyten stärker durch externe Reize wie beispielsweise Gerinnungsfaktoren beeinflusst werden.

#### **4.4.3 Fehlende Aktivierung der PAR auf Kardiomyozyten der HL-1 Zelllinie durch PAR1- und PAR2-Agonisten**

Da es bekannt ist, dass FXa PAR1, PAR2 und PAR4 aktiviert (Camerer et al., 2000; Nystedt et al., 1994; Sidhu et al., 2014), wurde eine mögliche PAR1-Aktivierung mittels des murinen PAR1-Agonisten (PAR1-AG) und eine mögliche PAR2-Aktivierung mittels des murinen PAR2-Agonisten (PAR2-AG) überprüft. In den vorliegenden Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass es trotz der vorhandenen Expression der Rezeptoren in den Kardiomyozyten der HL-1 Zelllinie zu keiner signifikanten Aktivierung der Rezeptoren und der von uns untersuchten inflammatorischen Signalkaskade kam.

##### **4.4.3.1 Zellspezifische Eigenschaften der HL-1 Zellen als mögliche Erklärung für die ausbleibende FXa-abhängige PAR-vermittelte Antwort**

Der mögliche Einfluss von Gerinnungsfaktoren über PAR auf die jeweiligen Zell- und Gewebearten ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Es konnte belegt werden, dass PAR mit verschiedenen heterotrimeren G-Proteinen gekoppelt sind und interagieren können (Macfarlane et al., 2001; Trejo, 2003). Es kommt somit – je nach entsprechender intrazellulärer Ausstattung mit den unterschiedlichen Isoformen der G-Proteine und nachfolgenden Effektorproteinen der jeweiligen Zellen – zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden und damit zu unterschiedlichen zellulären Antworten (Macfarlane et al., 2001; Trejo, 2003). So könnte also die intrazelluläre Ausstattung in den HL-1 Zellen eine Ursache für die fehlende FXa-abhängige PAR-vermittelte Antwort in HL-1 Zellen sein.

Rauch et al. (2004) zeigten, dass eine Stimulation von humanen, vaskulären smooth muscle cells (SMCs) mit Thrombin oder FXa zur „basic fibroblast growth factor“ (bFGF)-Freisetzung führte und es autokrin zur bFGF-abhängigen PAR1-Aktivierung im Sinne einer Transaktivierung der Rezeptoren (FGFR-1, PAR1) kam (Rauch et al., 2004). Zusätzlich sind also die Aktivierungsmöglichkeiten der PAR noch vielfältig und den HL-1 Zellen könnte ein möglicher Korezeptor fehlen.

Darüber hinaus können Gerinnungsfaktoren auch PAR-unabhängig über andere Rezeptoren oder Ionenkanäle Einfluss auf Zellen nehmen. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass L-Typ Kalziumkanäle auf Kardiomyozyten durch Thrombin stimuliert werden, indem die mittlere Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht wird (Albitz et al., 1992). So könnten andere Kanäle oder Rezeptoren auf HL-1 Zellen fehlen oder

unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen unterliegen, wodurch eine FXa-Signalübertragung eingeschränkt werden könnte.

## **4.5 Mögliche Zielzellen des FXa**

### **4.5.1 Die Effekte des FXa auf Kardiomyozyten**

Es wurden keine direkten Einflüsse von FXa auf Kardiomyozyten der HL-1 Zelllinie festgestellt. Proinflammatorische Moleküle sowie Marker des oxidativen Stresses, der kardialen Hypertrophie und der Fibrose blieben in diesem *in vitro* Modell unverändert. Es konnte zwar bei der 4-stündigen FXa-Inkubation (30 nM) ein statistisch signifikanter Anstieg der TGF- $\beta$ 1 mRNA-Expression beobachtet werden ( $p < 0,05$ ). Jedoch zeigten die niedrigeren (5 nM, 10 nM, 20 nM) und höheren (50 nM, 100 nM) FXa-Konzentrationen sowie die 24-stündigen FXa-Inkubationen keinen signifikanten Anstieg der mRNA. Es waren also keine zeit- oder konzentrationsabhängigen Effekte von FXa festzustellen. Die fehlende Stimulation von TGF- $\beta$ 1 zeigte sich auch in den 4- und 24-stündigen Inkubationen mit den PAR1/-2-Agonisten (je 20  $\mu$ M). Dagegen beschrieben Guo et al. (2020) direkte Effekte von FXa auf Kardiomyozyten. Wie bereits unter 4.4.2.2 erläutert wurde, konnte an neonatalen, ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte gezeigt werden, dass eine FXa-vermittelte Aktivierung der PAR1 und PAR2 zu einem exzentrischen, hypertrophen Phänotyp, zur erhöhten ANP-Expression und zur verstärkten Phosphorylierung von ERK1/2 und ERK 5 führt (Guo et al., 2020). Erwähnenswert ist hierbei, dass die Kardiomyozyten für 48 h mit 100 nM FXa stimuliert wurden (Guo et al., 2020). In der vorliegenden Studie wurden die HL-1 Zellen maximal für 24 h mit 50 nM FXa inkubiert. Auf den Einfluss der Stimulationskonzentrationen und -zeiten wird unter 4.7 „Limitationen der Arbeit“ näher eingegangen. Insgesamt findet man aber auch in der Literatur vor allem Belege über FXa-vermittelte Wirkungen auf Fibroblasten. Eine weitere mögliche Erklärung für die fehlende PAR-Aktivierung nach FXa-Stimulation in dieser Arbeit könnte also sein, dass Kardiomyozyten nicht die primären Zielzellen der Gerinnungsfaktoren sind. Daher wird im Folgenden die Rolle der Fibroblasten näher erläutert.

### **4.5.2 Der Einfluss von FXa auf Fibroblasten**

An Lungenfibroblasten konnte festgestellt werden, dass Makrophagen die Expression von TGF- $\beta$ 1 FXa-vermittelt über PAR1 erhöhten (C. Lin et al., 2015). Tatsächlich zeigten D'Alessandro et al. (2021) erst kürzlich, dass FXa über eine PAR1-Aktivierung in kardialen Fibroblasten eine profibrotische und proinflammatorische Antwort auslöste. So wurde in adulten, ventrikulären Rattenfibroblasten eine erhöhte TGF- $\beta$ 1 und IL-6-mRNA Expression und in humanen, atrialen Fibroblasten eine erhöhte IL-6-mRNA Expression

nach FXa-Stimulation nachgewiesen (D'Alessandro et al., 2021). Guo et al. (2020) belegten diesen bevorzugten Signalweg des FXa über PAR1 an kardialen, neonatalen Rattenfibroblasten: FXa führte über PAR1 zu einer Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2, wohingegen PAR2 bei der Signaltransduktion keine Rolle spielte (Guo et al., 2020). Dagegen beobachteten Bukowska et al. (2013) an humanen Herzvorhofschnitten eine FXa-abhängige PAR1- und PAR2-vermittelte Aktivierung von ERK1/2 und NF- $\kappa$ B (Bukowska et al., 2013). Diese durch FXa ausgelösten Effekte über verschiedene PAR-Isoformen könnten durch die Wechselwirkungen verschiedener Zelltypen ermöglicht werden. Denn das Herzgewebe besteht neben Kardiomyozyten vor allem aus Fibroblasten, Endothelzellen und perivaskulären Zellen (Zhou & Pu, 2016). So könnten in den humanen Vorhofgewebeschnitten (Bukowska et al., 2013) die FXa-Antworten anderer Zelltypen, wie beispielsweise der Fibroblasten, eine Rolle gespielt haben. Zudem könnten die Fibroblasten in diesem Zellverband anderen Einflüssen unterliegen und dadurch unterschiedliche FXa-abhängige Signaltransduktionen aufweisen. Diese Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Zellarten im Gewebeverbund sind offensichtlich von besonderer Bedeutung. Nachfolgend werden einige Interaktionen durch Fibroblasten erläutert, insbesondere im Hinblick auf mögliche Vorgänge im atrialen Remodeling.

#### **4.5.2.1 Die Rolle der Fibroblasten im kardialen Remodeling**

Es gibt Belege für die Wechselwirkungen zwischen Fibroblasten und anderen Zellen. So zeigten Borensztajn et al. (2009), dass FXa in Endothelzellen trotz der ausgelösten Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2 keine direkten Effekte auf diese Zellen im Hinblick auf das Zellüberleben oder die Proteinsynthese von Fibronectin hatte. Nach der FXa-Stimulation von Fibroblasten wurde deren konditioniertes Medium den Endothelzellen zugesetzt. Diese Zugabe führte zur erhöhten Proteinsynthese von Fibronectin und zur Proliferation und Tube Formation der Endothelzellen. Durch Antikörper, die „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF) blockierten, blieben diese Effekte in den Endothelzellen wieder aus. VEGF, der nach der FXa-Stimulation von den Fibroblasten produziert wurde, war der entscheidende Mediator im konditionierten Medium (Borensztajn et al., 2009). FXa ist daher über Fibroblasten in der Lage, Einfluss auf andere Zelltypen zu nehmen. Weiterhin konnte bei der Entwicklung der kardialen Fibrose belegt werden, dass „connective tissue growth factor“ (CTGF) autokrin aus Fibroblasten und nicht aus Kardiomyozyten profibrotisch wirkte (Dorn et al., 2018). Zudem gibt es weiterführend erste pathophysiologische Belege, wie Fibroblasten zur Aufrechterhaltung des VHF beitragen könnten. Es konnte mit der Patch-Clamp-Methode nachgewiesen werden, dass TGF- $\beta$ 1 direkt proarrhythmogen auf kardiale

Myofibroblasten wirkte, es also deren elektrophysiologischen Phänotyp veränderte (Salvarani et al., 2017).

Im atrialen Remodeling spielt auch die Vorhofdilataion eine Rolle. In einem *in vitro* Modell konnte gezeigt werden, dass die mechanische Dehnung von Kardiomyozyten die Erregungsleitung kaum verändert, während sie in einer Zellkultur aus Kardiomyozyten und Myofibroblasten zu einer geringeren Leitungsgeschwindigkeit führte, die Myofibroblasten also zu einer erhöhten Spannungssensitivität beitrugen und dadurch die Arrhythmogenität steigerten (Grand et al., 2014).

Um die Pathophysiologie des Zusammenspiels von Fibroblasten und Kardiomyozyten weiterführend zu verstehen, sollten zukünftige Studien auch die FXa-abhängigen und PAR-vermittelten Effekte auf kardiale Fibroblasten untersuchen und mögliche interzelluläre Interaktionswege aufdecken. Außerdem sollte die Rolle der Endothelzellen und perivaskulären Zellen im atrialen Remodeling in anschließenden Arbeiten untersucht werden.

## **4.6 Mögliche klinische Relevanz**

Die in 1.1.4 beschriebenen pathophysiologischen Mechanismen des atrialen Remodelings sind u.a. durch Aktivierung und Proliferation von Fibroblasten, Hypertrophie von Kardiomyozyten sowie Fibrosierung gekennzeichnet und werden durch Veränderungen in den zellulären Signalkaskaden ausgelöst (Schotten et al., 2011). In der vorliegenden Untersuchung traten keine direkten Effekte von FXa auf Kardiomyozyten der HL-1 Zelllinie auf. Dennoch wurden in anderen Forschungsarbeiten durchaus FXa-Effekte auf Kardiomyozyten und insbesondere auf Fibroblasten nachgewiesen. Das führte zu Untersuchungen möglicher protektiver Effekte durch die FXa-Inhibition auf zellulärer Ebene in der Inflammation und Fibrosierung. So beschrieben Guo et al. (2020), dass die FXa-vermittelten Effekte auf neonatale, ventrikuläre Rattenkardiomyozyten durch Rivaroxaban abgeschwächt wurden. Das zeigte sich in einer Reduzierung der Kardiomyozyten-Hypertrophie. So verringerte sich die Zelloberfläche der Kardiomyozyten und die mRNA-Expression des atrialen natriuretischen Peptids (ANP). Zudem hemmte Rivaroxaban die FXa-vermittelte Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 (Guo et al., 2020). Bukowska et al. (2013) konnten an humanen Vorhofschnitten *in vitro* beobachten, dass 24-stündiges Tachypacing (4 Hz) und FXa (50 nM) synergistisch eine Erhöhung der PAR1/-2-mRNA-Expression, eine Phosphorylierung von ERK2 und eine Steigerung der ICAM-1- und IL-8-mRNA-Expression bewirkten. Der Faktor Xa-Inhibitor Rivaroxaban konnte diese FXa-vermittelten Effekte hemmen (Bukowska et al., 2013).

Weiterführend wurden die möglichen schützenden Effekte von DOAK auf strukturelle Umbauprozesse in Tierversuchen analysiert. Wie unter 1.3.5 ausführlicher erläutert wurde, induzierten Spronk et al. (2017) VHF in Ziegen für vier Wochen. Hierbei verringerte die FXa-Inhibition durch Nadroparin die elektrophysiologische Komplexität von VHF. Dazu wurden durch eine Mapping-Elektrode über beiden Vorhöfen die Leitungsveränderungen der Flimmerwellen gemessen. Zudem wurde in der Therapiegruppe mit Nadroparin histologisch eine verminderte atriale, endomyxiale Fibrose festgestellt (Spronk et al., 2017). Jumeau et al. (2016) zeigten in einem *in vivo* Rattenmodell, dass direkte Thrombininhibitoren wie Dabigatran das Fortschreiten der Vorhofdehnung bei Herzinsuffizienz abschwächte, die Fibrosierung sowie die Hypertrophie des Myokards aufhielt und damit ein atriales Remodeling verhindern konnte (Jumeau et al., 2016). Im Gegensatz dazu zeigte sich in einem weiteren Tierversuch an Ratten jedoch, dass Apixaban keinen Einfluss auf das kardiale Remodeling nach einem Myokardinfarkt hatte (Yurista et al., 2020). Die möglichen positiven Effekte der DOAK im Hinblick auf das kardiale Remodeling scheinen also davon abhängig zu sein, welches neue orale Antikoagulans bei welcher kardiovaskulären Grunderkrankung eingesetzt wird.

Eine weitere Therapieoption neben den DOAK könnten PAR-Antagonisten sein. So könnte man beispielsweise Vorapaxar (SCH 530348) in Betracht ziehen, der als PAR1-Antagonist über eine hohe orale Bioverfügbarkeit verfügt und die Thrombin-induzierte Thrombozytenaggregation hemmt (Bonaca & Morrow, 2009). Der PAR2-Antagonist GB83 verhinderte in humanen Vorhofschnitten nach 24-stündiger FXa-Stimulation die Phosphorylierung von ERK2 und verminderte die Expression von ICAM-1- und IL-8-mRNA (Bukowska et al., 2013). An transgenen, Renin-überexprimierenden Mäusen konnte gezeigt werden, dass der PAR1-Antagonist SCH79797 die kardiale Fibrose und Hypertrophie, die durch das kontinuierlich aktive RAS verursacht wurden, abschwächte (Yokono et al., 2020).

Durch das tiefere Verständnis und die Aufschlüsselung der durch FXa stimulierten PAR-Aktivierung und der darauffolgenden Signalkaskade, könnten also DOAKs und auch PAR-Antagonisten neue Therapieansätze bezüglich einer antifibrotischen Therapie darstellen. Der fibrotische Umbau des Herzgewebes wird wahrscheinlich nur sehr begrenzt reversibel sein. Daher könnte der frühzeitige Einsatz antifibrotischer Medikamente ein weiteres Fortschreiten der Umbauprozesse verhindern oder zumindest verlangsamen. Eventuell könnte sogar dieser protektive antifibrotische Effekt bereits bei einer Dosis unterhalb der Beeinflussung der Blutgerinnung erreicht werden. Insbesondere aufgrund der steigenden klinischen Relevanz des VHF sollten daher

zukünftige Forschungsarbeiten die Bedeutung von FXa und der PAR auf das kardiale Remodeling weiterführend untersuchen.

## 4.7 Limitationen der Arbeit

*Murine Zellen:* Wie in 4.3.2 beschrieben wurde, ist es essentiell, die Heterogenität der Ansprechbarkeit der Protease-aktivierten Rezeptoren in verschiedenen Geweben und in unterschiedlichen Spezies zu beachten. Die von uns untersuchten Kardiomyozyten der HL-1 Zelllinie könnten aufgrund der murinen Herkunft im Vergleich mit humanen Kardiomyozyten eine andere PAR-Antwort zeigen.

*Fehlende Messungen intrazellulärer Kalziumkonzentrationen:* In der vorliegenden Studie wurden keine intrazellulären Kalziumkonzentrationsmessungen durchgeführt. Diese hätten weitere Erkenntnisse bezüglich möglicher FXa-vermittelter PAR-abhängiger Wirkungen auf Kardiomyozyten erbringen können. Jiang et al. (1998) beispielsweise wies nach, dass es in ventrikulären Kardiomyozyten von adulten Ratten durch hohe Konzentrationen des PAR-Agonisten SFLLRN, jedoch nicht durch Thrombin, zu einem intrazellulären Kalziumanstieg kam (Jiang et al., 1998). Zudem beeinflusst Kalzium die inflammatorische Signalkaskade. So zeigten Macfarlane et al. (2005), dass intrazelluläres Kalzium Einfluss auf die PAR-vermittelte Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges hatte. So führte in humanen, dermalen Epithelzellen der intrazelluläre Kalziumentzug durch einen Chelatkomplex zu einer verringerten NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität nach PAR2-Aktivierung durch Trypsin (Macfarlane et al., 2005).

*Auswahl der FXa-Konzentrationen:* Für die *in vitro* Inkubationen mit FXa wurden Konzentrationen zwischen 5–100 nM genutzt, die möglicherweise nicht der physiologischen FXa-Konzentration entsprechen. Hierbei orientierte man sich an vorherigen Studien. So ähnelten die verwendeten FXa-Konzentrationen durchaus denen von Borensztajn et al. (2008), die *in vitro* konzentrationsabhängige Effekte von FXa auf Fibroblasten über PAR2 von 0,25 U/ml (=43,5 nM) bis 1 U/ml (=174 nM) nachweisen konnten (Borensztajn et al., 2008). Die Konzentration des Faktor X beträgt im humanen Plasma 170 nM (Di Scipio et al., 1977; Lawson et al., 1994). Bisher gibt es allerdings noch keine Daten zu den *in vivo* Konzentrationen der aktivierten Serinprotease Faktor Xa. Es wurde gezeigt, dass *in vitro* weniger als 1% der Plasmakonzentration des FX als FXa für die maximale Thrombingenerierung benötigt wird (Lawson et al., 1994). Diese niedrige, benötigte FXa-Konzentration in der Blutgerinnungskaskade scheint nicht mit den Konzentrationen für die FXa-abhängigen PAR-vermittelten Effekte auf zellulärer Ebene übereinzustimmen. Hierfür müssen auch die Interaktionen der Serinproteasen mit



den PAR mitberücksichtigt werden. So beschrieben Riewald et al. (2001) die Unterschiede zwischen Thrombin und FXa. Die Bindungsregion Exosite 1 von Thrombin ist eine basische und die von FXa eine azidische. Dadurch kann Thrombin direkt an PAR binden und hat daher eine schnelle Kinetik in der Rezeptorspaltung und damit in der Signaltransduktion sowie in der Gentranskription. Dagegen kann FXa nicht direkt an PAR andocken und muss zuerst über die Gamma-Carboxyglutaminsäure (Gla)-Domäne an die Zellmembran binden (Riewald et al., 2001; Riewald & Ruf, 2001). Folglich wird für die Gentranskription durch PAR-Aktivierung vermutlich eine relativ hohe FXa-Konzentration von 10–100 nM benötigt, die der Membranbindungsaffinität von FXa entsprechen würde (Riewald et al., 2001).

*Auswahl der FXa-Inkubationszeiten:* Weiterhin könnten die gewählten FXa-Inkubationszeiten (bis max. 24 h) zu kurz gewesen sein. Ebenfalls orientierte man sich hierbei an vorherigen *in vitro* Untersuchungen. So reichten FXa-Inkubationszeiten an humanen Vorhofschnitten von 2 h und 24 h aus, um eine verstärkte Phosphorylierung von ERK1/2 und NF- $\kappa$ B zu belegen (Bukowska et al., 2013). Dagegen verwendeten Guo et al. (2020) FXa-Inkubationszeiten von 48 h an neonatalen, ventrikulären Rattenkardiomyozyten, um eine verstärkte Phosphorylierung von ERK1/2 und ERK 5 nachzuweisen (Guo et al., 2020). An HL-1 Zellen konnten nach  $3.1 \pm 1.3$  und  $9.7 \pm 0.5$  Tagen nach Initiierung des VHF elektrophysiologische und strukturelle Veränderungen im Sinne eines VHF-induzierten Remodelings nachgewiesen werden (Climent et al., 2015).

## 5 Zusammenfassung

Das VHF hat in der heutigen Zeit eine große klinische Bedeutung. So stiegen die Prävalenz und die Inzidenz des VHF in den letzten Jahrzehnten an (Chugh et al., 2014; Miyasaka et al., 2006; Wolf et al., 1996). Zudem herrscht beim VHF ein prokoagulatorischer Zustand. Knapp ein Viertel der ischämischen Schlaganfälle ist auf eine kardioembolische Ursache bei VHF zurückzuführen (Marini et al., 2005). Des Weiteren zeigten Spronk et al. (2017) an transgenen Mäusen, dass Hyperkoagulabilität die Anfälligkeit für VHF und die Kollagenablagerung in den Vorhöfen erhöhte. So scheint die Hyperkoagulation nicht nur die Folge von VHF zu sein, sondern auch zu dessen Entstehung und Aufrechterhaltung beizutragen (Spronk et al., 2017). Dieses sogenannte atriale Remodeling ist unter anderem durch eine Vorhofdilataion und einen fibrotischen Umbau gekennzeichnet. Dadurch hält sich das VHF selbst aufrecht und fördert wiederum einen prokoagulatorischen Zustand. Gerinnungsfaktoren können über Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) Einfluss auf Zellen und Gewebe nehmen. Das Ziel dieser Studie war es, weitere Einblicke in die kardialen Umbauprozesse bei VHF zu erhalten. Bukowska et al. (2013) belegten an humanen Herzvorhofsnitten eine Aktivierung der inflammatorischen Signalkaskade durch FXa über PAR (Bukowska et al., 2013). Jedoch besteht das Herzgewebe aus Kardiomyozyten, Endothelzellen, perivaskulären Zellen und Fibroblasten (Zhou & Pu, 2016) und insgesamt sind die FXa-vermittelten PAR-abhängigen Effekte speziell auf Kardiomyozyten wenig untersucht. Bisher belegten Guo et al. (2020), dass die FXa-Inkubation in neonatalen, ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte zur verstärkten Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 führte (Guo et al., 2020). In dieser Arbeit wurde der Einfluss von FXa auf HL-1 Zellen untersucht, hierbei handelt es sich um murine, adulte, atriale Kardiomyozyten. Es wurde eine PAR1-, PAR2- und PAR4-Expression in den Kardiomyozyten der HL-1 Zelllinie nachgewiesen. Nach der Inkubation mit FXa (5 nM–100 nM; 15 min–24 h) oder PAR1-/2-Agonisten (20 µM; 15 min–24 h) traten keine Änderungen in der PAR1-, PAR2- und PAR4-Expression sowie in der intrazellulären inflammatorischen und profibrotischen Signalkaskade auf. Hierbei zeigten sich keine zeit- oder konzentrationsabhängigen Änderungen in der Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 oder der Untereinheit p65 von NF-κB sowie in der Expression von ICAM-1, VCAM-1, FN, CXCR1, CTGF, TGF-β1, NOX2 und GATA4. FXa hat also keinen direkten PAR-abhängigen Einfluss auf HL-1 Zellen. Durchaus könnte FXa Effekte auf andere Zelltypen wie z.B. Fibroblasten haben und Einfluss auf Kardiomyozyten über die Wechselwirkungen im Zellverband nehmen. Zukünftige Studien sollten daher mögliche Wirkungen des FXa auf humane Kardiomyozyten und Fibroblasten sowie deren Interaktionen untersuchen, um die Rolle von FXa im atrialen Remodeling weiter zu entschlüsseln.

## 6 *Literaturverzeichnis*

1. Adapala, R. K., Thoppil, R. J., Luther, D. J., Paruchuri, S., Meszaros, J. G., Chilian, W. M., et al.: TRPV4 channels mediate cardiac fibroblast differentiation by integrating mechanical and soluble signals. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 54. 45-52. (2013)
2. Albitz, R., Droogmans, G., Nilius, B., & Casteels, R.: Thrombin stimulates L-type calcium channels of guinea pig cardiomyocytes in cell-attached patches but not after intracellular dialysis. *Cell Calcium*. 13(4). 203-210. (1992)
3. Andersen, H., Greenberg, D. L., Fujikawa, K., Xu, W., Chung, D. W., & Davie, E. W.: Protease-activated receptor 1 is the primary mediator of thrombin-stimulated platelet procoagulant activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96(20). 11189-11193. (1999)
4. Arceci, R. J., King, A. A., Simon, M. C., Orkin, S. H., & Wilson, D. B.: Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Molecular and Cellular Biology*. 13(4). 2235-2246. (1993)
5. Aronson, J. K.: One hundred years of atrial fibrillation. *Br J Clin Pharmacol*. 60(4). 345-346. (2005)
6. Bachli, E. B., Pech, C. M., Johnson, K. M., Johnson, D. J., Tuddenham, E. G., & McVey, J. H.: Factor Xa and thrombin, but not factor VIIa, elicit specific cellular responses in dermal fibroblasts. *J Thromb Haemost*. 1(9). 1935-1944. (2003)
7. Baeuerle, P. A., & Henkel, T.: Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annual Review of Immunology*. 12. 141-179. (1994)
8. Bedard, K., & Krause, K. H.: The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*. 87(1). 245-313. (2007)
9. Bendall, J. K., Cave, A. C., Heymes, C., Gall, N., & Shah, A. M.: Pivotal role of a gp91(phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation*. 105(3). 293-296. (2002)
10. Bergmann, O., Zdunek, S., Felker, A., Salehpour, M., Alkass, K., Bernard, S., et al.: Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell*. 161(7). 1566-1575. (2015)
11. Blackhart, B. D., Ruslim-Litrus, L., Lu, C. C., Alves, V. L., Teng, W., Scarborough, R. M., et al.: Extracellular mutations of protease-activated receptor-1 result in differential activation by thrombin and thrombin receptor agonist peptide. *Molecular Pharmacology*. 58(6). 1178-1187. (2000)

12. Blanc-Brude, O. P., Archer, F., Leoni, P., Derian, C., Bolsover, S., Laurent, G. J., et al.: Factor Xa stimulates fibroblast procollagen production, proliferation, and calcium signaling via PAR1 activation. *Experimental Cell Research*. 304(1). 16-27. (2005)
13. Bogatkevich, G. S., Tourkina, E., Silver, R. M., & Ludwicka-Bradley, A.: Thrombin differentiates normal lung fibroblasts to a myofibroblast phenotype via the proteolytically activated receptor-1 and a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem*. 276(48). 45184-45192. (2001)
14. Bohm, S. K., Kong, W., Bromme, D., Smeekens, S. P., Anderson, D. C., Connolly, A., et al.: Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. *Biochemical Journal*. 314 ( Pt 3). 1009-1016. (1996)
15. Bonaca, M. P., & Morrow, D. A.: SCH 530348: a novel oral thrombin receptor antagonist. *Future Cardiology*. 5(5). 435-442. (2009)
16. Borensztajn, K., Aberson, H., Peppelenbosch, M. P., & Spek, C. A.: FXa-induced intracellular signaling links coagulation to neoangiogenesis: potential implications for fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1793(5). 798-805. (2009)
17. Borensztajn, K., Stiekema, J., Nijmeijer, S., Reitsma, P. H., Peppelenbosch, M. P., & Spek, C. A.: Factor Xa stimulates proinflammatory and profibrotic responses in fibroblasts via protease-activated receptor-2 activation. *Am J Pathol*. 172(2). 309-320. (2008)
18. Bradham, D. M., Igarashi, A., Potter, R. L., & Grotendorst, G. R.: Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *Journal of Cell Biology*. 114(6). 1285-1294. (1991)
19. Brass, L. F., Vassallo, R. R., Jr., Belmonte, E., Ahuja, M., Cichowski, K., & Hoxie, J. A.: Structure and function of the human platelet thrombin receptor. Studies using monoclonal antibodies directed against a defined domain within the receptor N terminus. *Journal of Biological Chemistry*. 267(20). 13795-13798. (1992)
20. Brigstock, D. R.: The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocrine Reviews*. 20(2). 189-206. (1999)
21. Brotman, D. J., Deitcher, S. R., Lip, G. Y., & Matzdorff, A. C.: Virchow's triad revisited. *South Med J*. 97(2). 213-214. (2004)
22. Buddenkotte, J., Stroh, C., Engels, I. H., Moormann, C., Shpacovitch, V. M., Seeliger, S., et al.: Agonists of proteinase-activated receptor-2 stimulate upregulation of intercellular cell adhesion molecule-1 in primary human

- keratinocytes via activation of NF-kappa B. *Journal of Investigative Dermatology*. 124(1). 38-45. (2005)
23. Bueno, O. F., De Windt, L. J., Tymitz, K. M., Witt, S. A., Kimball, T. R., Klevitsky, R., et al.: The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO Journal*. 19(23). 6341-6350. (2000)
  24. Bukowska, A., Felgendreher, M., Scholz, B., Wolke, C., Schulte, J. S., Fehrmann, E., et al.: CREM-transgene mice: An animal model of atrial fibrillation and thrombogenesis. *Thrombosis Research*. 163. 172-179. (2018)
  25. Bukowska, A., Lendeckel, U., Hirte, D., Wolke, C., Striggow, F., Rohnert, P., et al.: Activation of the calcineurin signaling pathway induces atrial hypertrophy during atrial fibrillation. *Cell Mol Life Sci*. 63(3). 333-342. (2006)
  26. Bukowska, A., Zacharias, I., Weinert, S., Skopp, K., Hartmann, C., Huth, C., et al.: Coagulation factor Xa induces an inflammatory signalling by activation of protease-activated receptors in human atrial tissue. *Eur J Pharmacol*. 718(1-3). 114-123. (2013)
  27. Camerer, E., Huang, W., & Coughlin, S. R.: Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(10). 5255-5260. (2000)
  28. Camm, A. J., Lip, G. Y., De Caterina, R., Savelieva, I., Atar, D., Hohnloser, S. H., et al.: 2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation: an update of the 2010 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation. Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association. *Eur Heart J*. 33(21). 2719-2747. (2012)
  29. Cardin, S., Li, D., Thorin-Trescases, N., Leung, T. K., Thorin, E., & Nattel, S.: Evolution of the atrial fibrillation substrate in experimental congestive heart failure: angiotensin-dependent and -independent pathways. *Cardiovascular Research*. 60(2). 315-325. (2003)
  30. Chang, L., & Karin, M.: Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 410(6824). 37-40. (2001)
  31. Chen, M. M., Lam, A., Abraham, J. A., Schreiner, G. F., & Joly, A. H.: CTGF expression is induced by TGF- beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 32(10). 1805-1819. (2000)
  32. Chugh, S. S., Havmoeller, R., Narayanan, K., Singh, D., Rienstra, M., Benjamin, E. J., et al.: Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: a Global Burden of Disease 2010 Study. *Circulation*. 129(8). 837-847. (2014)

33. Clark, E. A., Ledbetter, J. A., Holly, R. C., Dinndorf, P. A., & Shu, G.: Polypeptides on human B lymphocytes associated with cell activation. *Human Immunology*. 16(1). 100-113. (1986)
34. Claycomb, W. C., Lanson, N. A., Jr., Stallworth, B. S., Egeland, D. B., Delcarpio, J. B., Bahinski, A., et al.: HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95(6). 2979-2984. (1998)
35. Climent, A. M., Guillem, M. S., Fuentes, L., Lee, P., Bollensdorff, C., Fernandez-Santos, M. E., et al.: Role of atrial tissue remodeling on rotor dynamics: an in vitro study. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*. 309(11). H1964-1973. (2015)
36. Compton, S. J., Sandhu, S., Wijesuriya, S. J., & Hollenberg, M. D.: Glycosylation of human proteinase-activated receptor-2 (hPAR2): role in cell surface expression and signalling. *Biochemical Journal*. 368(Pt 2). 495-505. (2002)
37. Connolly, T. M., Condra, C., Feng, D. M., Cook, J. J., Stranieri, M. T., Reilly, C. F., et al.: Species variability in platelet and other cellular responsiveness to thrombin receptor-derived peptides. *Thrombosis and Haemostasis*. 72(4). 627-633. (1994)
38. D'Alessandro, E., Scaf, B., Munts, C., van Hunnik, A., Trevelyan, C. J., Verheule, S., et al.: Coagulation Factor Xa Induces Proinflammatory Responses in Cardiac Fibroblasts via Activation of Protease-Activated Receptor-1. *Cells*. 10(11). (2021)
39. Damas, J. K., Eiken, H. G., Oie, E., Bjerkeli, V., Yndestad, A., Ueland, T., et al.: Myocardial expression of CC- and CXC-chemokines and their receptors in human end-stage heart failure. *Cardiovascular Research*. 47(4). 778-787. (2000)
40. Daniels, A., van Bilsen, M., Goldschmeding, R., van der Vusse, G. J., & van Nieuwenhoven, F. A.: Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis. *Acta Physiologica (Oxford, England)*. 195(3). 321-338. (2009)
41. Davis, R. J.: The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 268(20). 14553-14556. (1993)
42. Delcarpio, J. B., Lanson, N. A., Jr., Field, L. J., & Claycomb, W. C.: Morphological characterization of cardiomyocytes isolated from a transplantable cardiac tumor derived from transgenic mouse atria (AT-1 cells). *Circulation Research*. 69(6). 1591-1600. (1991)
43. Derian, C. K., Santulli, R. J., Tomko, K. A., Haertlein, B. J., & Andrade-Gordon, P.: Species differences in platelet responses to thrombin and SFLLRN. receptor-mediated calcium mobilization and aggregation, and regulation by protein kinases. *Thrombosis Research*. 78(6). 505-519. (1995)

44. Di Scipio, R. G., Hermodson, M. A., Yates, S. G., & Davie, E. W.: A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas factor), factor X (Stuart factor), and protein S. *Biochemistry*. 16(4). 698-706. (1977)
45. Dias, P., Desplantez, T., El-Harasis, M. A., Chowdhury, R. A., Ullrich, N. D., Cabestrero de Diego, A., et al.: Characterisation of connexin expression and electrophysiological properties in stable clones of the HL-1 myocyte cell line. *PLoS One*. 9(2). e90266. (2014)
46. Dobrev, D., & Nattel, S.: New insights into the molecular basis of atrial fibrillation: mechanistic and therapeutic implications. *Cardiovascular Research*. 89(4). 689-691. (2011)
47. Dorian, P., Jung, W., Newman, D., Paquette, M., Wood, K., Ayers, G. M., et al.: The impairment of health-related quality of life in patients with intermittent atrial fibrillation: implications for the assessment of investigational therapy. *J Am Coll Cardiol*. 36(4). 1303-1309. (2000)
48. Dorn, L. E., Petrosino, J. M., Wright, P., & Accornero, F.: CTGF/CCN2 is an autocrine regulator of cardiac fibrosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 121. 205-211. (2018)
49. Du, J., Xie, J., Zhang, Z., Tsujikawa, H., Fusco, D., Silverman, D., et al.: TRPM7-Mediated Ca<sup>2+</sup> Signals Confer Fibrogenesis in Human Atrial Fibrillation. *Circulation Research*. 106(5). 992-1003. (2010)
50. Dudley, S. C., Jr., Hoch, N. E., McCann, L. A., Honeycutt, C., Diamandopoulos, L., Fukai, T., et al.: Atrial fibrillation increases production of superoxide by the left atrium and left atrial appendage: role of the NADPH and xanthine oxidases. *Circulation*. 112(9). 1266-1273. (2005)
51. Dustin, M. L., Rothlein, R., Bhan, A. K., Dinarello, C. A., & Springer, T. A.: Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *Journal of Immunology*. 137(1). 245-254. (1986)
52. Eikelboom, J. W., Connolly, S. J., Brueckmann, M., Granger, C. B., Kappetein, A. P., Mack, M. J., et al.: Dabigatran versus warfarin in patients with mechanical heart valves. *N Engl J Med*. 369(13). 1206-1214. (2013)
53. Ellis, C. A., Malik, A. B., Gilchrist, A., Hamm, H., Sandoval, R., Voyno-Yasenetskaya, T., et al.: Thrombin induces proteinase-activated receptor-1 gene expression in endothelial cells via activation of Gi-linked Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 274(19). 13718-13727. (1999)

54. Feinberg, W. M., Blackshear, J. L., Laupacis, A., Kronmal, R., & Hart, R. G.: Prevalence, age distribution, and gender of patients with atrial fibrillation. Analysis and implications. *Arch Intern Med.* 155(5). 469-473. (1995)
55. Field, L. J.: Atrial natriuretic factor-SV40 T antigen transgenes produce tumors and cardiac arrhythmias in mice. *Science.* 239(4843). 1029-1033. (1988)
56. Filgueiras-Rama, D., Price, N. F., Martins, R. P., Yamazaki, M., Avula, U. M., Kaur, K., et al.: Long-term frequency gradients during persistent atrial fibrillation in sheep are associated with stable sources in the left atrium. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 5(6). 1160-1167. (2012)
57. Freeman, J. V., Simon, D. N., Go, A. S., Spertus, J., Fonarow, G. C., Gersh, B. J., et al.: Association Between Atrial Fibrillation Symptoms, Quality of Life, and Patient Outcomes: Results From the Outcomes Registry for Better Informed Treatment of Atrial Fibrillation (ORBIT-AF). *Circ Cardiovasc Qual Outcomes.* 8(4). 393-402. (2015)
58. Fuster, V., Ryden, L. E., Cannom, D. S., Crijns, H. J., Curtis, A. B., Ellenbogen, K. A., et al.: 2011 ACCF/AHA/HRS focused updates incorporated into the ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation.* 123(10). e269-367. (2011)
59. Gardell, L. R., Ma, J. N., Seitzberg, J. G., Knapp, A. E., Schiffer, H. H., Tabatabaei, A., et al.: Identification and characterization of novel small-molecule protease-activated receptor 2 agonists. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 327(3). 799-808. (2008)
60. Giugliano, R. P., Ruff, C. T., Braunwald, E., Murphy, S. A., Wiviott, S. D., Halperin, J. L., et al.: Edoxaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med.* 369(22). 2093-2104. (2013)
61. Glasel, J. A.: Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques.* 18(1). 62-63. (1995)
62. Glembotski, C. C., Irons, C. E., Krown, K. A., Murray, S. F., Sprenkle, A. B., & Sei, C. A.: Myocardial alpha-thrombin receptor activation induces hypertrophy and increases atrial natriuretic factor gene expression. *Journal of Biological Chemistry.* 268(27). 20646-20652. (1993)
63. Go, A. S., Hylek, E. M., Phillips, K. A., Chang, Y., Henault, L. E., Selby, J. V., et al.: Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *JAMA.* 285(18). 2370-2375. (2001)



64. Goette, A., Honeycutt, C., & Langberg, J. J.: Electrical remodeling in atrial fibrillation. Time course and mechanisms. *Circulation*. 94(11). 2968-2974. (1996)
65. Goette, A., Staack, T., Rocken, C., Arndt, M., Geller, J. C., Huth, C., et al.: Increased expression of extracellular signal-regulated kinase and angiotensin-converting enzyme in human atria during atrial fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology*. 35(6). 1669-1677. (2000)
66. Gorlach, A., Brandes, R. P., Nguyen, K., Amidi, M., Dehghani, F., & Busse, R.: A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circulation Research*. 87(1). 26-32. (2000)
67. Grand, T., Salvarani, N., Jousset, F., & Rohr, S.: Aggravation of cardiac myofibroblast arrhythmogenicity by mechanical stress. *Cardiovascular Research*. 104(3). 489-500. (2014)
68. Griendling, K. K., Sorescu, D., & Ushio-Fukai, M.: NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circulation Research*. 86(5). 494-501. (2000)
69. Guo, X., Kolpakov, M. A., Hooshdaran, B., Schappell, W., Wang, T., Eguchi, S., et al.: Cardiac Expression of Factor X Mediates Cardiac Hypertrophy and Fibrosis in Pressure Overload. *JACC Basic Transl Sci*. 5(1). 69-83. (2020)
70. Harada, M., Luo, X., Qi, X. Y., Tadevosyan, A., Maguy, A., Ordog, B., et al.: Transient receptor potential canonical-3 channel-dependent fibroblast regulation in atrial fibrillation. *Circulation*. 126(17). 2051-2064. (2012)
71. Hattori, Y., & Kasai, K.: Induction of mRNAs for ICAM-1, VCAM-1, and ELAM-1 in cultured rat cardiac myocytes and myocardium in vivo. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 41(5). 979-986. (1997)
72. Hayden, M. S., & Ghosh, S.: NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes and Development*. 26(3). 203-234. (2012)
73. Hein, L., Ishii, K., Coughlin, S. R., & Kobilka, B. K.: Intracellular targeting and trafficking of thrombin receptors. A novel mechanism for resensitization of a G protein-coupled receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 269(44). 27719-27726. (1994)
74. Herde, S. *Der Einfluss von Rapid Pacing und Vorhofflimmern auf die Gen/Protein-Expression in HL-1 Kardiomyozyten und humanem Vorhofgewebe*. (Dissertation). Universität Greifswald, (2019)

75. Heuberger, D. M., & Schuepbach, R. A.: Protease-activated receptors (PARs): mechanisms of action and potential therapeutic modulators in PAR-driven inflammatory diseases. *Thromb J.* 17. 4. (2019)
76. Heymes, C., Bendall, J. K., Ratajczak, P., Cave, A. C., Samuel, J. L., Hasenfuss, G., et al.: Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *Journal of the American College of Cardiology.* 41(12). 2164-2171. (2003)
77. Hohnloser, S. H., Pajitnev, D., Pogue, J., Healey, J. S., Pfeffer, M. A., Yusuf, S., et al.: Incidence of stroke in paroxysmal versus sustained atrial fibrillation in patients taking oral anticoagulation or combined antiplatelet therapy: an ACTIVE W Substudy. *J Am Coll Cardiol.* 50(22). 2156-2161. (2007)
78. Horvat, R., & Palade, G. E.: The functional thrombin receptor is associated with the plasmalemma and a large endosomal network in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Cell Science.* 108 ( Pt 3). 1155-1164. (1995)
79. Hung, D. T., Vu, T. K., Wheaton, V. I., Ishii, K., & Coughlin, S. R.: Cloned platelet thrombin receptor is necessary for thrombin-induced platelet activation. *Journal of Clinical Investigation.* 89(4). 1350-1353. (1992)
80. Ihn, H.: Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF. *Current Opinion in Rheumatology.* 14(6). 681-685. (2002)
81. Jalife, J., & Kaur, K.: Atrial remodeling, fibrosis, and atrial fibrillation. *Trends in Cardiovascular Medicine.* 25(6). 475-484. (2015)
82. Jiang, T., Danilo, P., Jr., & Steinberg, S. F.: The thrombin receptor elevates intracellular calcium in adult rat ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 30(11). 2193-2199. (1998)
83. Jiang, T., Kuznetsov, V., Pak, E., Zhang, H., Robinson, R. B., & Steinberg, S. F.: Thrombin receptor actions in neonatal rat ventricular myocytes. *Circulation Research.* 78(4). 553-563. (1996)
84. Jumeau, C., Rupin, A., Chieng-Yane, P., Mougnot, N., Zahr, N., David-Dufilho, M., et al.: Direct Thrombin Inhibitors Prevent Left Atrial Remodeling Associated With Heart Failure in Rats. *JACC Basic Transl Sci.* 1(5). 328-339. (2016)
85. Kahn, M. L., Nakanishi-Matsui, M., Shapiro, M. J., Ishihara, H., & Coughlin, S. R.: Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest.* 103(6). 879-887. (1999)
86. Kahn, M. L., Zheng, Y. W., Huang, W., Bigornia, V., Zeng, D., Moff, S., et al.: A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature.* 394(6694). 690-694. (1998)

87. Kamath, S., Chin, B. S., Blann, A. D., & Lip, G. Y.: A study of platelet activation in paroxysmal, persistent and permanent atrial fibrillation. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 13(7). 627-636. (2002)
88. Kamiyama, N.: Expression of cell adhesion molecules and the appearance of adherent leukocytes on the left atrial endothelium with atrial fibrillation: rabbit experimental model. *Jpn Circ J*. 62(11). 837-843. (1998)
89. Kanke, T., Macfarlane, S. R., Seatter, M. J., Davenport, E., Paul, A., McKenzie, R. C., et al.: Proteinase-activated receptor-2-mediated activation of stress-activated protein kinases and inhibitory kappa B kinases in NCTC 2544 keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 276(34). 31657-31666. (2001)
90. Kannel, W. B., Abbott, R. D., Savage, D. D., & McNamara, P. M.: Coronary heart disease and atrial fibrillation: the Framingham Study. *Am Heart J*. 106(2). 389-396. (1983)
91. Kirchhof, P., Auricchio, A., Bax, J., Crijns, H., Camm, J., Diener, H. C., et al.: Outcome parameters for trials in atrial fibrillation: executive summary. *Eur Heart J*. 28(22). 2803-2817. (2007)
92. Kirchhof, P., Benussi, S., Kotecha, D., Ahlsson, A., Atar, D., Casadei, B., et al.: 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. *Europace*. 18(11). 1609-1678. (2016)
93. Kitasato, L., Yamaoka-Tojo, M., Hashikata, T., Ishii, S., Kameda, R., Shimohama, T., et al.: Factor Xa in mouse fibroblasts may induce fibrosis more than thrombin. *International Heart Journal*. 55(4). 357-361. (2014)
94. Knight, D. A., Lim, S., Scaffidi, A. K., Roche, N., Chung, K. F., Stewart, G. A., et al.: Protease-activated receptors in human airways: upregulation of PAR-2 in respiratory epithelium from patients with asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 108(5). 797-803. (2001)
95. Ko, L. J., & Engel, J. D.: DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Molecular and Cellular Biology*. 13(7). 4011-4022. (1993)
96. Ko, W. C., Chen, B. C., Hsu, M. J., Tsai, C. T., Hong, C. Y., & Lin, C. H.: Thrombin induced connective tissue growth factor expression in rat vascular smooth muscle cells via the PAR-1/JNK/AP-1 pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*. 33(1). 49-56. (2012)
97. Koitabashi, N., Arai, M., Kogure, S., Niwano, K., Watanabe, A., Aoki, Y., et al.: Increased connective tissue growth factor relative to brain natriuretic peptide as a determinant of myocardial fibrosis. *Hypertension*. 49(5). 1120-1127. (2007)

98. Krijnen, P. A., Meischl, C., Hack, C. E., Meijer, C. J., Visser, C. A., Roos, D., et al.: Increased Nox2 expression in human cardiomyocytes after acute myocardial infarction. *Journal of Clinical Pathology*. 56(3). 194-199. (2003)
99. Kubota, S., & Takigawa, M.: CCN family proteins and angiogenesis: from embryo to adulthood. *Angiogenesis*. 10(1). 1-11. (2007)
100. Kuhn, C., 3rd, Boldt, J., King, T. E., Jr., Crouch, E., Vartio, T., & McDonald, J. A.: An immunohistochemical study of architectural remodeling and connective tissue synthesis in pulmonary fibrosis. *American Review of Respiratory Disease*. 140(6). 1693-1703. (1989)
101. Kuliopulos, A., Covic, L., Seeley, S. K., Sheridan, P. J., Helin, J., & Costello, C. E.: Plasmin desensitization of the PAR1 thrombin receptor: kinetics, sites of truncation, and implications for thrombolytic therapy. *Biochemistry*. 38(14). 4572-4585. (1999)
102. Kuznetsov, A. V., Javadov, S., Sickinger, S., Frotschnig, S., & Grimm, M.: H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1853(2). 276-284. (2015)
103. Lassegue, B., Sorescu, D., Szocs, K., Yin, Q., Akers, M., Zhang, Y., et al.: Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circulation Research*. 88(9). 888-894. (2001)
104. Lawson, J. H., Kalafatis, M., Stram, S., & Mann, K. G.: A model for the tissue factor pathway to thrombin. I. An empirical study. *Journal of Biological Chemistry*. 269(37). 23357-23366. (1994)
105. Levy, S., Maarek, M., Coumel, P., Guize, L., Lekieffre, J., Medvedowsky, J. L., et al.: Characterization of different subsets of atrial fibrillation in general practice in France: the ALFA study. The College of French Cardiologists. *Circulation*. 99(23). 3028-3035. (1999)
106. Lewis, T.: Report Cxix. Auricular Fibrillation: A Common Clinical Condition. *Br Med J*. 2(2552). 1528. (1909)
107. Li, D., Shinagawa, K., Pang, L., Leung, T. K., Cardin, S., Wang, Z., et al.: Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on the development of the atrial fibrillation substrate in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. *Circulation*. 104(21). 2608-2614. (2001)
108. Li, F., Wang, X., Capasso, J. M., & Gerdes, A. M.: Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 28(8). 1737-1746. (1996)

109. Li, J. M., Gall, N. P., Grieve, D. J., Chen, M., & Shah, A. M.: Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension*. 40(4). 477-484. (2002)
110. Liang, Q., De Windt, L. J., Witt, S. A., Kimball, T. R., Markham, B. E., & Molkenin, J. D.: The transcription factors GATA4 and GATA6 regulate cardiomyocyte hypertrophy in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*. 276(32). 30245-30253. (2001)
111. Liang, Q., Wiese, R. J., Bueno, O. F., Dai, Y. S., Markham, B. E., & Molkenin, J. D.: The transcription factor GATA4 is activated by extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-mediated phosphorylation of serine 105 in cardiomyocytes. *Molecular and Cellular Biology*. 21(21). 7460-7469. (2001)
112. Limper, A. H., & Roman, J.: Fibronectin. A versatile matrix protein with roles in thoracic development, repair and infection. *Chest*. 101(6). 1663-1673. (1992)
113. Lin, C., Rezaee, F., Waasdorp, M., Shi, K., van der Poll, T., Borensztajn, K., et al.: Protease activated receptor-1 regulates macrophage-mediated cellular senescence: a risk for idiopathic pulmonary fibrosis. *Oncotarget*. 6(34). 35304-35314. (2015)
114. Lin, C. C., Lin, J. L., Lin, C. S., Tsai, M. C., Su, M. J., Lai, L. P., et al.: Activation of the calcineurin-nuclear factor of activated T-cell signal transduction pathway in atrial fibrillation. *Chest*. 126(6). 1926-1932. (2004)
115. Lip, G. Y., Lip, P. L., Zarifis, J., Watson, R. D., Bareford, D., Lowe, G. D., et al.: Fibrin D-dimer and beta-thromboglobulin as markers of thrombogenesis and platelet activation in atrial fibrillation. Effects of introducing ultra-low-dose warfarin and aspirin. *Circulation*. 94(3). 425-431. (1996)
116. Lip, G. Y., Lowe, G. D., Rumley, A., & Dunn, F. G.: Increased markers of thrombogenesis in chronic atrial fibrillation: effects of warfarin treatment. *Br Heart J*. 73(6). 527-533. (1995)
117. Lip, G. Y., Nieuwlaat, R., Pisters, R., Lane, D. A., & Crijns, H. J.: Refining clinical risk stratification for predicting stroke and thromboembolism in atrial fibrillation using a novel risk factor-based approach: the euro heart survey on atrial fibrillation. *Chest*. 137(2). 263-272. (2010)
118. Lowry, J. A., & Atchley, W. R.: Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain. *Journal of Molecular Evolution*. 50(2). 103-115. (2000)
119. Macfarlane, S. R., Seatter, M. J., Kanke, T., Hunter, G. D., & Plevin, R.: Proteinase-activated receptors. *Pharmacological Reviews*. 53(2). 245-282. (2001)

120. Macfarlane, S. R., Sloss, C. M., Cameron, P., Kanke, T., McKenzie, R. C., & Plevin, R.: The role of intracellular Ca<sup>2+</sup> in the regulation of proteinase-activated receptor-2 mediated nuclear factor kappa B signalling in keratinocytes. *British Journal of Pharmacology*. 145(4). 535-544. (2005)
121. Mackenzie, J.: New Methods of Studying Affections of the Heart. *Br Med J*. 1(2311). 812-815. (1905)
122. Marin, F., Roldan, V., Climent, V. E., Ibanez, A., Garcia, A., Marco, P., et al.: Plasma von Willebrand factor, soluble thrombomodulin, and fibrin D-dimer concentrations in acute onset non-rheumatic atrial fibrillation. *Heart*. 90(10). 1162-1166. (2004)
123. Marini, C., De Santis, F., Sacco, S., Russo, T., Olivieri, L., Totaro, R., et al.: Contribution of atrial fibrillation to incidence and outcome of ischemic stroke: results from a population-based study. *Stroke*. 36(6). 1115-1119. (2005)
124. Martins, R. P., Kaur, K., Hwang, E., Ramirez, R. J., Willis, B. C., Filgueiras-Rama, D., et al.: Dominant frequency increase rate predicts transition from paroxysmal to long-term persistent atrial fibrillation. *Circulation*. 129(14). 1472-1482. (2014)
125. Mattson, M. P., & Chan, S. L.: Calcium orchestrates apoptosis. *Nature Cell Biology*. 5(12). 1041-1043. (2003)
126. McLean, K., Schirm, S., Johns, A., Morser, J., & Light, D. R.: FXa-induced responses in vascular wall cells are PAR-mediated and inhibited by ZK-807834. *Thromb Res*. 103(4). 281-297. (2001)
127. Meloche, S., & Pouyssegur, J.: The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene*. 26(22). 3227-3239. (2007)
128. Miyasaka, Y., Barnes, M. E., Gersh, B. J., Cha, S. S., Bailey, K. R., Abhayaratna, W. P., et al.: Secular trends in incidence of atrial fibrillation in Olmsted County, Minnesota, 1980 to 2000, and implications on the projections for future prevalence. *Circulation*. 114(2). 119-125. (2006)
129. Monge, C., Beraud, N., Tepp, K., Pelloux, S., Chahboun, S., Kaambre, T., et al.: Comparative analysis of the bioenergetics of adult cardiomyocytes and nonbeating HL-1 cells: respiratory chain activities, glycolytic enzyme profiles, and metabolic fluxes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 87(4). 318-326. (2009)
130. Morgan, C. L., McEwan, P., Tukiendorf, A., Robinson, P. A., Clemens, A., & Plumb, J. M.: Warfarin treatment in patients with atrial fibrillation: observing outcomes associated with varying levels of INR control. *Thromb Res*. 124(1). 37-41. (2009)

131. Mosher, D. F.: Physiology of fibronectin. *Annual Review of Medicine*. 35. 561-575. (1984)
132. Murphy, P. M., Baggiolini, M., Charo, I. F., Hebert, C. A., Horuk, R., Matsushima, K., et al.: International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacological Reviews*. 52(1). 145-176. (2000)
133. Nagai, H., Satomi, T., Abiru, A., Miyamoto, K., Nagasawa, K., Maruyama, M., et al.: Antihypertrophic Effects of Small Molecules that Maintain Mitochondrial ATP Levels Under Hypoxia. *EBioMedicine*. 24. 147-158. (2017)
134. Nakajima, H., Nakajima, H. O., Salcher, O., Dittie, A. S., Dembowsky, K., Jing, S., et al.: Atrial but not ventricular fibrosis in mice expressing a mutant transforming growth factor-beta(1) transgene in the heart. *Circulation Research*. 86(5). 571-579. (2000)
135. Nakamura, Y., Nakamura, K., Fukushima-Kusano, K., Ohta, K., Matsubara, H., Hamuro, T., et al.: Tissue factor expression in atrial endothelia associated with nonvalvular atrial fibrillation: possible involvement in intracardiac thrombogenesis. *Thromb Res*. 111(3). 137-142. (2003)
136. Nguyen, S. V., & Claycomb, W. C.: Hypoxia regulates the expression of the adrenomedullin and HIF-1 genes in cultured HL-1 cardiomyocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 265(2). 382-386. (1999)
137. Nystedt, S., Emilsson, K., Wahlestedt, C., & Sundelin, J.: Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(20). 9208-9212. (1994)
138. Nystedt, S., Larsson, A. K., Aberg, H., & Sundelin, J.: The mouse proteinase-activated receptor-2 cDNA and gene. Molecular cloning and functional expression. *Journal of Biological Chemistry*. 270(11). 5950-5955. (1995)
139. Oemar, B. S., & Luscher, T. F.: Connective tissue growth factor. Friend or foe? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 17(8). 1483-1489. (1997)
140. Olesen, J. B., Sorensen, R., Hansen, M. L., Lamberts, M., Weeke, P., Mikkelsen, A. P., et al.: Non-vitamin K antagonist oral anticoagulation agents in anticoagulant naive atrial fibrillation patients: Danish nationwide descriptive data 2011-2013. *Europace*. 17(2). 187-193. (2015)
141. Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Vassallo, C., Luhowskyj, S., Chi-Rosso, G., et al.: Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell*. 59(6). 1203-1211. (1989)

142. Ossovskaya, V. S., & Bunnett, N. W.: Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiological Reviews*. 84(2). 579-621. (2004)
143. Pawlinski, R., Tencati, M., Hampton, C. R., Shishido, T., Bullard, T. A., Casey, L. M., et al.: Protease-activated receptor-1 contributes to cardiac remodeling and hypertrophy. *Circulation*. 116(20). 2298-2306. (2007)
144. Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., et al.: Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews*. 22(2). 153-183. (2001)
145. Rallabhandi, P., Nhu, Q. M., Toshchakov, V. Y., Piao, W., Medvedev, A. E., Hollenberg, M. D., et al.: Analysis of proteinase-activated receptor 2 and TLR4 signal transduction: a novel paradigm for receptor cooperativity. *Journal of Biological Chemistry*. 283(36). 24314-24325. (2008)
146. Rauch, B. H., Millette, E., Kenagy, R. D., Daum, G., & Clowes, A. W.: Thrombin- and factor Xa-induced DNA synthesis is mediated by transactivation of fibroblast growth factor receptor-1 in human vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*. 94(3). 340-345. (2004)
147. Reilly, S. N., Jayaram, R., Nahar, K., Antoniadis, C., Verheule, S., Channon, K. M., et al.: Atrial sources of reactive oxygen species vary with the duration and substrate of atrial fibrillation: implications for the antiarrhythmic effect of statins. *Circulation*. 124(10). 1107-1117. (2011)
148. Renesto, P., Si-Tahar, M., Moniatte, M., Balloy, V., Van Dorsselaer, A., Pidard, D., et al.: Specific inhibition of thrombin-induced cell activation by the neutrophil proteinases elastase, cathepsin G, and proteinase 3: evidence for distinct cleavage sites within the aminoterminal domain of the thrombin receptor. *Blood*. 89(6). 1944-1953. (1997)
149. Riewald, M., Kravchenko, V. V., Petrovan, R. J., O'Brien, P. J., Brass, L. F., Ulevitch, R. J., et al.: Gene induction by coagulation factor Xa is mediated by activation of protease-activated receptor 1. *Blood*. 97(10). 3109-3116. (2001)
150. Riewald, M., & Ruf, W.: Mechanistic coupling of protease signaling and initiation of coagulation by tissue factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98(14). 7742-7747. (2001)
151. Ruff, C. T., Giugliano, R. P., Braunwald, E., Hoffman, E. B., Deenadayalu, N., Ezekowitz, M. D., et al.: Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet*. 383(9921). 955-962. (2014)
152. Sabri, A., Short, J., Guo, J., & Steinberg, S. F.: Protease-activated receptor-1-mediated DNA synthesis in cardiac fibroblast is via epidermal growth factor



- receptor transactivation: Distinct PAR-1 signaling pathways in cardiac fibroblasts and cardiomyocytes. *Circulation Research*. 91(6). 532-539. (2002)
153. Salvarani, N., Maguy, A., De Simone, S. A., Miragoli, M., Jousset, F., & Rohr, S.: TGF- $\beta$ 1(Transforming Growth Factor- $\beta$ 1) Plays a Pivotal Role in Cardiac Myofibroblast Arrhythmogenicity. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 10(5). e004567. (2017)
  154. Sartiani, L., Bochet, P., Cerbai, E., Mugelli, A., & Fischmeister, R.: Functional expression of the hyperpolarization-activated, non-selective cation current I(f) in immortalized HL-1 cardiomyocytes. *Journal of Physiology*. 545(1). 81-92. (2002)
  155. Scarborough, R. M., Naughton, M. A., Teng, W., Hung, D. T., Rose, J., Vu, T. K., et al.: Tethered ligand agonist peptides. Structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function. *Journal of Biological Chemistry*. 267(19). 13146-13149. (1992)
  156. Schmidlin, F., Amadesi, S., Dabbagh, K., Lewis, D. E., Knott, P., Bunnett, N. W., et al.: Protease-activated receptor 2 mediates eosinophil infiltration and hyperreactivity in allergic inflammation of the airway. *Journal of Immunology*. 169(9). 5315-5321. (2002)
  157. Schnabel, R. B., Johannsen, S. S., Wild, P. S., & Blankenberg, S.: [Prevalence and risk factors of atrial fibrillation in Germany : data from the Gutenberg Health Study]. *Herz*. 40(1). 8-15. (2015)
  158. Schnabel, R. B., Wilde, S., Wild, P. S., Munzel, T., & Blankenberg, S.: Atrial fibrillation: its prevalence and risk factor profile in the German general population. *Dtsch Arztebl Int*. 109(16). 293-299. (2012)
  159. Schnabel, R. B., Yin, X., Gona, P., Larson, M. G., Beiser, A. S., McManus, D. D., et al.: 50 year trends in atrial fibrillation prevalence, incidence, risk factors, and mortality in the Framingham Heart Study: a cohort study. *Lancet*. 386(9989). 154-162. (2015)
  160. Schotten, U., Hatem, S., Ravens, U., Jais, P., Muller, F. U., Goette, A., et al.: The European Network for Translational Research in Atrial Fibrillation (EUTRAF): objectives and initial results. *Europace: European Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Electrophysiology*. 17(10). 1457-1466. (2015)
  161. Schotten, U., Verheule, S., Kirchhof, P., & Goette, A.: Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal. *Physiol Rev*. 91(1). 265-325. (2011)
  162. Scotton, C. J., Krupiczkoj, M. A., Konigshoff, M., Mercer, P. F., Lee, Y. C., Kaminski, N., et al.: Increased local expression of coagulation factor X contributes

- to the fibrotic response in human and murine lung injury. *Journal of Clinical Investigation*. 119(9). 2550-2563. (2009)
163. Seger, R., & Krebs, E. G.: The MAPK signaling cascade. *FASEB Journal*. 9(9). 726-735. (1995)
  164. Senden, N. H., Jeunhomme, T. M., Heemskerk, J. W., Wagenvoord, R., van't Veer, C., Hemker, H. C., et al.: Factor Xa induces cytokine production and expression of adhesion molecules by human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Immunology*. 161(8). 4318-4324. (1998)
  165. Seth, A., Gonzalez, F. A., Gupta, S., Raden, D. L., & Davis, R. J.: Signal transduction within the nucleus by mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 267(34). 24796-24804. (1992)
  166. Sidhu, T. S., French, S. L., & Hamilton, J. R.: Differential signaling by protease-activated receptors: implications for therapeutic targeting. *Int J Mol Sci*. 15(4). 6169-6183. (2014)
  167. Silverman, M. E.: From rebellious palpitations to the discovery of auricular fibrillation: contributions of Mackenzie, Lewis and Einthoven. *Am J Cardiol*. 73(5). 384-389. (1994)
  168. Sirker, A., Murdoch, C. E., Protti, A., Sawyer, G. J., Santos, C. X., Martin, D., et al.: Cell-specific effects of Nox2 on the acute and chronic response to myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 98. 11-17. (2016)
  169. Smith, C. W., Entman, M. L., Lane, C. L., Beaudet, A. L., Ty, T. I., Youker, K., et al.: Adherence of neutrophils to canine cardiac myocytes in vitro is dependent on intercellular adhesion molecule-1. *Journal of Clinical Investigation*. 88(4). 1216-1223. (1991)
  170. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., et al.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 150(1). 76-85. (1985)
  171. Soonpaa, M. H., Kim, K. K., Pajak, L., Franklin, M., & Field, L. J.: Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *American Journal of Physiology*. 271(5 Pt 2). H2183-2189. (1996)
  172. Sorescu, D., Weiss, D., Lassegue, B., Clempus, R. E., Szocs, K., Sorescu, G. P., et al.: Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation*. 105(12). 1429-1435. (2002)
  173. Soto, A. G., & Trejo, J.: N-linked glycosylation of protease-activated receptor-1 second extracellular loop: a critical determinant for ligand-induced receptor

- activation and internalization. *Journal of Biological Chemistry*. 285(24). 18781-18793. (2010)
174. Springer, T. A.: Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 346(6283). 425-434. (1990)
175. Spronk, H. M., De Jong, A. M., Verheule, S., De Boer, H. C., Maass, A. H., Lau, D. H., et al.: Hypercoagulability causes atrial fibrosis and promotes atrial fibrillation. *Eur Heart J*. 38(1). 38-50. (2017)
176. Stanton, C., & Wallin, R.: Processing and trafficking of clotting factor X in the secretory pathway. Effects of warfarin. *Biochemical Journal*. 284 ( Pt 1). 25-31. (1992)
177. Staunton, D. E., Marlin, S. D., Stratowa, C., Dustin, M. L., & Springer, T. A.: Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell*. 52(6). 925-933. (1988)
178. Steinberg, B. A., Kim, S., Fonarow, G. C., Thomas, L., Ansell, J., Kowey, P. R., et al.: Drivers of hospitalization for patients with atrial fibrillation: Results from the Outcomes Registry for Better Informed Treatment of Atrial Fibrillation (ORBIT-AF). *Am Heart J*. 167(5). 735-742 e732. (2014)
179. Steinberg, S. F.: The cardiovascular actions of protease-activated receptors. *Mol Pharmacol*. 67(1). 2-11. (2005)
180. Steinhilber, M. E., Lanson, N. A., Jr., Dresdner, K. P., Delcarpio, J. B., Wit, A. L., Claycomb, W. C., et al.: Proliferation in vivo and in culture of differentiated adult atrial cardiomyocytes from transgenic mice. *American Journal of Physiology*. 259(6 Pt 2). H1826-1834. (1990)
181. Stewart, S., Hart, C. L., Hole, D. J., & McMurray, J. J.: A population-based study of the long-term risks associated with atrial fibrillation: 20-year follow-up of the Renfrew/Paisley study. *Am J Med*. 113(5). 359-364. (2002)
182. Sugama, Y., & Malik, A. B.: Thrombin receptor 14-amino acid peptide mediates endothelial hyperadhesivity and neutrophil adhesion by P-selectin-dependent mechanism. *Circulation Research*. 71(4). 1015-1019. (1992)
183. Sun, H., Chartier, D., Leblanc, N., & Nattel, S.: Intracellular calcium changes and tachycardia-induced contractile dysfunction in canine atrial myocytes. *Cardiovasc Res*. 49(4). 751-761. (2001)
184. Sun, S. C.: Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. *Cell Research*. 21(1). 71-85. (2011)

185. Tordai, A., Brass, L. F., & Gelfand, E. W.: Tunicamycin inhibits the expression of functional thrombin receptors on human T-lymphoblastoid cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 206(3). 857-862. (1995)
186. Trejo, J.: Protease-activated receptors: new concepts in regulation of G protein-coupled receptor signaling and trafficking. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 307(2). 437-442. (2003)
187. Tsai, C. T., Lai, L. P., Kuo, K. T., Hwang, J. J., Hsieh, C. S., Hsu, K. L., et al.: Angiotensin II activates signal transducer and activators of transcription 3 via Rac1 in atrial myocytes and fibroblasts: implication for the therapeutic effect of statin in atrial structural remodeling. *Circulation*. 117(3). 344-355. (2008)
188. Turpie, A. G., Lassen, M. R., Davidson, B. L., Bauer, K. A., Gent, M., Kwong, L. M., et al.: Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after total knee arthroplasty (RECORD4): a randomised trial. *Lancet*. 373(9676). 1673-1680. (2009)
189. Ueyama, T., Kawashima, S., Sakoda, T., Rikitake, Y., Ishida, T., Kawai, M., et al.: Requirement of activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade in myocardial cell hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 32(6). 947-960. (2000)
190. Vallabhapurapu, S., & Karin, M.: Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annual Review of Immunology*. 27. 693-733. (2009)
191. van Gorp, P. R. R., Trines, S. A., Pijnappels, D. A., & de Vries, A. A. F.: Multicellular In vitro Models of Cardiac Arrhythmias: Focus on Atrial Fibrillation. *Front Cardiovasc Med*. 7. 43. (2020)
192. Vergnolle, N., Bunnett, N. W., Sharkey, K. A., Brussee, V., Compton, S. J., Grady, E. F., et al.: Proteinase-activated receptor-2 and hyperalgesia: A novel pain pathway. *Nature Medicine*. 7(7). 821-826. (2001)
193. Verheule, S., Sato, T., Everett, T. t., Engle, S. K., Otten, D., Rubart-von der Lohe, M., et al.: Increased vulnerability to atrial fibrillation in transgenic mice with selective atrial fibrosis caused by overexpression of TGF-beta1. *Circ Res*. 94(11). 1458-1465. (2004)
194. Verma, I. M., Stevenson, J. K., Schwarz, E. M., Van Antwerp, D., & Miyamoto, S.: Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes and Development*. 9(22). 2723-2735. (1995)
195. Vu, T. K., Hung, D. T., Wheaton, V. I., & Coughlin, S. R.: Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*. 64(6). 1057-1068. (1991)

196. Ware, J. E., Jr., & Sherbourne, C. D.: The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection. *Medical Care*. 30(6). 473-483. (1992)
197. Watson, T., Shantsila, E., & Lip, G. Y.: Mechanisms of thrombogenesis in atrial fibrillation: Virchow's triad revisited. *Lancet*. 373(9658). 155-166. (2009)
198. Wattigney, W. A., Mensah, G. A., & Croft, J. B.: Increasing trends in hospitalization for atrial fibrillation in the United States, 1985 through 1999: implications for primary prevention. *Circulation*. 108(6). 711-716. (2003)
199. Weiler-Guettler, H., Christie, P. D., Beeler, D. L., Healy, A. M., Hancock, W. W., Rayburn, H., et al.: A targeted point mutation in thrombomodulin generates viable mice with a prethrombotic state. *Journal of Clinical Investigation*. 101(9). 1983-1991. (1998)
200. Wolf, P. A., Abbott, R. D., & Kannel, W. B.: Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. *Stroke*. 22(8). 983-988. (1991)
201. Wolf, P. A., Benjamin, E. J., Belanger, A. J., Kannel, W. B., Levy, D., & D'Agostino, R. B.: Secular trends in the prevalence of atrial fibrillation: The Framingham Study. *Am Heart J*. 131(4). 790-795. (1996)
202. Wong, C. X., Brooks, A. G., Leong, D. P., Roberts-Thomson, K. C., & Sanders, P.: The increasing burden of atrial fibrillation compared with heart failure and myocardial infarction: a 15-year study of all hospitalizations in Australia. *Archives of Internal Medicine*. 172(9). 739-741. (2012)
203. Wong, P. C., Crain, E. J., Jr., Nguan, O., Watson, C. A., & Racanelli, A.: Antithrombotic actions of selective inhibitors of blood coagulation factor Xa in rat models of thrombosis. *Thromb Res*. 83(2). 117-126. (1996)
204. Wynn, G. J., Todd, D. M., Webber, M., Bonnett, L., McShane, J., Kirchhof, P., et al.: The European Heart Rhythm Association symptom classification for atrial fibrillation: validation and improvement through a simple modification. *Europace*. 16(7). 965-972. (2014)
205. Xiao, L., Pimentel, D. R., Wang, J., Singh, K., Colucci, W. S., & Sawyer, D. B.: Role of reactive oxygen species and NAD(P)H oxidase in alpha(1)-adrenoceptor signaling in adult rat cardiac myocytes. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*. 282(4). C926-934. (2002)
206. Xu, W. F., Andersen, H., Whitmore, T. E., Presnell, S. R., Yee, D. P., Ching, A., et al.: Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95(12). 6642-6646. (1998)

207. Yamauchi, K., Furui, H., Taniguchi, N., & Sotobata, I.: Plasma beta-thromboglobulin and platelet factor 4 concentrations in patients with atrial fibrillation. *Jpn Heart J.* 27(4). 481-487. (1986)
208. Yokono, Y., Hanada, K., Narita, M., Tatara, Y., Kawamura, Y., Miura, N., et al.: Blockade of PAR-1 Signaling Attenuates Cardiac Hypertrophy and Fibrosis in Renin-Overexpressing Hypertensive Mice. *J Am Heart Assoc.* 9(12). e015616. (2020)
209. Yurista, S. R., Sillje, H. H. W., Nijholt, K. T., Dokter, M. M., van Veldhuisen, D. J., de Boer, R. A., et al.: Factor Xa Inhibition with Apixaban Does Not Influence Cardiac Remodelling in Rats with Heart Failure After Myocardial Infarction. *Cardiovascular Drugs and Therapy.* (2020)
210. Zhang, H., & Sun, S. C.: NF-kappaB in inflammation and renal diseases. *Cell Biosci.* 5. 63. (2015)
211. Zhou, P., & Pu, W. T.: Recounting Cardiac Cellular Composition. *Circulation Research.* 118(3). 368-370. (2016)

## ***Danksagung***

Die Danksagung ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

# ***Ehrenerklärung***

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

## **Die Effekte des Gerinnungsfaktors Xa auf atriale Kardiomyozyten der HL-1 Zelllinie**

im Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

mit Unterstützung durch Frau Dr. rer. nat. Alicja Bukowska, Prof. Dr. med. Andreas Götte und Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Gardemann ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 14.08.2023

Lukas Moritz Ruf



## ***Darstellung des Bildungsweges***

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

# Anlagen

## Verwendete Chemikalien, Materialien und Geräte:

**Tabelle 12:** Chemikalien

Zellkultur	Hersteller	
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, München, DE	
Claycomb-Medium	Sigma-Aldrich, München, DE	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München, DE	
fetal bovine serum (FBS)	Sigma-Aldrich, München, DE	
Fibronectin	Sigma-Aldrich, München, DE	
Gelatine	Sigma-Aldrich, München, DE	
L-Glutamin	Thermo Scientific, Karlsruhe, DE	
Norepinephrin	Sigma-Aldrich, München, DE	
Penicillin	Merck Millipore, Billerica, US	
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Merck Millipore, Billerica, US	
Streptomycin	Merck Millipore, Billerica, US	
Trypsin	Merck Millipore, Billerica, US	
Molekularbiologische Methoden	Bezeichnung	Hersteller
DEPC-behandeltes Wasser	-	Roth, Karlsruhe, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	-	Roth, Karlsruhe, DE
RNA-Isolationskit	innuPREP RNA Mini Kit 2.0	Analytik Jena, Jena, DE
SensiMix™ SYBR® & Fluorescein Kit	-	Bioline, London, GB
Trichlormethan (Chloroform)	Trichlormethan Rotipuran®	Roth, Karlsruhe, DE
Proteinbiochemische Methoden	Bezeichnung	Hersteller
10x Trisglycin (pH=8,6)	-	Roth, Karlsruhe, DE
Acrylamid- Bisacrylamid 30%	Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Roth, Karlsruhe, DE
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	-	Roth, Karlsruhe, DE
Blockierungslösung	Roti®-Block	Roth, Karlsruhe, DE

Laufpuffer Rotiphorese für die Gelelektrophorese	Rotiphorese® 10x SDS-Page	Roth, Karlsruhe, DE
Lysepuffer	RIPA-Puffer	-
Methanol	-	Roth, Karlsruhe, DE
Milchpulver	Blottin grade, pulv.	Roth, Karlsruhe, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	-	Sigma-Aldrich, München, DE
Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaurat	Tween® 20	Sigma-Aldrich, München, DE
Proteinmarker (Molekulargewichtsmarker)	Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Karlsruhe, DE
Proteinpuffer	Sample Buffer, Laemmli	Sigma-Aldrich, München, DE
Proteinquantifizierungskit	Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Karlsruhe, DE
Reinstwasser (Milli-Q® Wasser)	Synthesis A10 Milli- Q®	Merck Millipore, Billerica, US
Schwächere Chemilumineszenzlösung: Luminol/Enhancer und Peroxid	Western BLoT Chemiluminescence	Takara Holdings, Kyoto, JP
Stärkere Chemilumineszenzlösung: Luminol/Enhancer und Peroxid	Western BLoT Hyper	Takara Holdings, Kyoto, JP
Stripping-Puffer	Thermo Scientific™ Restore™ Western Blot Stripping-Puffer	Thermo Scientific, Karlsruhe, DE
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Pierce™ TEMED	Thermo Scientific, Karlsruhe, DE
Tris-gepufferte Kochsalzlösung pH 7,4	TBS: 200 mM Tris, 1,37 M NaCl	AppliChem, Darmstadt, DE

**Tabelle 13:** Materialien und Geräte

<b>Zellkultur</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
1. CO <sub>2</sub> -Inkubator	MCO-5AC	Sanyo Electric Co., Ltd., Moriguchi, JP
2. CO <sub>2</sub> -Inkubator	HERA cell®	Heraeus, Hanau, DE
6-Well-Zellkulturplatte	-	Thermo Scientific, Karlsruhe, DE
Gefrierbehälter	„Mr. Frosty“	Thermo Scientific, Karlsruhe, DE
Neubauer-Zählkammer	-	Marienfeld, Lauda-Königshofen, DE
Serologische Pipetten	-	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Sicherheitswerkbank	LaminAir® HB 2448	Heraeus, Hanau, DE
Zellkulturflasche	T75 Flask	Thermo Scientific, Karlsruhe, DE
Zellkulturröhrchen 15 ml und 50 ml	-	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zellschaber 25 cm	-	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zentrifuge	Biofuge® Primo R	Heraeus, Hanau, DE
<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
96-Well-PCR-Platten	PCR plates for iCycler iQ®	Bio-Rad, München, DE
cDNA-Synthese-Kit	RevertAid™ First Strand	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
Filterspitzen 10 µl	SafeSeal SurPhob® Spitzen	Biozym, Hessisch Oldendorf, DE

Minizentrifuge	Minizentrifuge C1301B	Labnet International Inc, Edison, US
PCR-Cycler	iCycler™ Thermal Cycler	Bio-Rad, München, DE
PCR- Plattenversiegelungsfolie	Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film	Bio-Rad, München, DE
RNase-freie Mikroreaktionsgefäße	RNase-freie Eppendorf Tubes®	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Spektralphotometer	Spectrometer GeneQuant	Pharmacia Biotech, Uppsala, SE
Zentrifuge	Megafuge 2.0R	Heraeus, Hanau, DE
<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Blotapparatur	-	Bio-Rad, München, DE
Detektiergerät Western Blots	C-DiGit Blot Scanner Modell: 3600	LI-COR Biosciences, Lincoln, US
Filterpapier	Gel-Blotting Paper	Whatman, Maidstone, GB
Gelgießstand	-	Bio-Rad, München, DE
Kipp-Schüttler	Biometra WT17	Biometra, Göttingen, DE
Mikrozentrifuge	VWR Micro Star 12	VWR International BVBA, Löwen, BE
Minizentrifuge	Minizentrifuge C1301B	Labnet International Inc, Edison, US
Misch- und Heizblock	ThermoCell Mixing Block MB- 102	Bioer Technology Co., Ltd, Hangzhou, CN
Netzteil Elektrophorese	PowerPac™ Basic	Bio-Rad, München, DE

Netzteil Elektrophorese	PowerPac™ HC	Bio-Rad, München, DE
Pipettenspitzen	epT.I.P.S.®	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Rollenmischer	Rollenmischer CAT RM 5	CAT, Ballrechten- Dottingen, DE
Rührgerät	Heiz- und Rührgerät MR3002	Heidolph, Schwabach, DE
Schüttelwasserbad (Stripping)	Schüttelwasserbad GFL® 1092	LAUDA-GFL, Burgwedel, DE
SDS-PAGE Apparatur	Mini-PROTEAN®	Bio-Rad, München, DE
Transfermembran Syn.: Trägermembran	Polyvinylidenfluorid (PVDF) - Membran Porengröße: 0,45 µm	Merck Millipore, Billerica, US
Universeller Kleinschüttler	Minishaker MS1	IKA®-Werke, Staufen, DE
Vortex-Schüttler	Vortex-Schüttler REAX 2000	Heidolph, Schwabach, DE
Western Blot Apparatur	Mini Trans- Blot Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad, München, DE
Zellkulturtestplatte	TPP-Zellkulturtestplatte	TPP, Trasadingen, CH
Zentrifuge	Biofuge® pico	Heraeus, Hanau, DE

**Poster:**

Bukowska A., Ruf L., Raschick M., Wolke C., Weinert S., Gardemann A., Scherner M., Staack T., Wippermann J., Lendeckel U., Goette A.: Importance of atrial fibroblasts in inflammatory responses to clotting factor Xa in atrial tissue (2019)