

Arbeitsgruppe „Molekularpharmakologische Elektrophysiologie“  
Bereich Pathobiochemie (Prof. Dr. A. Gardemann)  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg  
Leipziger Str. 44  
39120 Magdeburg

**Gerinnungsfaktor Xa induziert inflammatorische Prozesse durch die Aktivierung Protease-  
aktivierter Rezeptoren in humanem Vorhofgewebe**

## **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 Ines Bielig, geb. Zacharias  
geboren in Brandenburg/Havel  
Magdeburg 2016

## **Dokumentationsblatt**

### **Bibliographische Beschreibung**

Bielig, Ines:

Gerinnungsfaktor Xa induziert inflammatorische Prozesse durch die Aktivierung Protease-aktivierter Rezeptoren in humanem Vorhofgewebe. - 2016. - 97 Bl., 33 Abb., 20 Tab., 4 Anl.

### **Kurzreferat**

FXa spielt als Thrombinaktivator eine bedeutende Rolle in der Blutgerinnungskaskade, welche auch während des Vorhofflimmerns (VHF) aktiviert wird. Studien deuten darauf hin, dass FXa die Signaltransduktion in verschiedenen Zelltypen beeinflusst, indem es Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) aktiviert. Bisher ist nicht bekannt, ob molekulare Effekte von FXa die atriale Signaltransduktion beeinflussen. Weiterhin ist auch der Effekt einer kombinierten Stimulation mit FXa und einer simulierten Tachyarrhythmie auf die zelluläre Signaltransduktion unbekannt. Um die Effekte von FXa zu untersuchen, wurden humane Vorhofgewebeschnitte mit ausgewählten FXa-Konzentrationen bis zu 24 h kultiviert. Zur Simulation des VHF wurden diese zusätzlich bei 4,0 Hz im elektrischen Feld stimuliert. Weiterhin wurde der hemmende Einfluss des FXa-Antagonisten Rivaroxaban, des PAR 1-Antagonisten SCH79797 und des PAR 2-Antagonisten GB83 unter experimentellen Bedingungen analysiert. Die Exposition des Vorhofgewebes mit FXa ergab eine 1,7 fache Hochregulation der PAR 2-mRNA, die Aktivierung der MAP-Kinasen (ERK1/2) und des NF- $\kappa$ B-Signalweges. Weiterhin erhöhte FXa die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1, des Chemokins IL-8 sowie des prothrombotischen Moleküls PAI-1. Die Kombination von simulierter Tachyarrhythmie und FXa verursachte eine signifikante Hochregulation von PAR-1, -2, ICAM-1, IL-8, LOX-1 sowie PAI-1 auf Transkriptionsebene. Rivaroxaban und GB83 konnten die Hochregulation der PAR, ICAM-1, LOX-1, IL-8 und die Aktivierung der MAP-Kinasen verhindern. Der Anstieg in der Expression von PAI-1 konnte durch SCH79797 und Rivaroxaban verhindert werden. Die Arbeit impliziert, dass FXa inflammatorische Signalprozesse im Vorhofgewebe vermittelt. Interessanterweise agieren FXa sowie Tachyarrhythmie synergistisch bzgl. der gesteigerten Expression der PAR und Entzündungsmarker. Deshalb könnte FXa ein zusätzlicher Faktor bzgl. des bekannten Phänomens des strukturellen Vorhofremodelings bei VHF-Patienten sein.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Dokumentationsblatt</b> .....	<b>II</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>XII</b>
<b>1 Einführung</b> .....	<b>13</b>
1.1 Vorhofflimmern .....	13
1.1.1 Epidemiologie, Klinik, Klassifikation und Prognose .....	13
1.1.2 Pathophysiologische Grundlagen des Vorhofflimmerns .....	15
1.1.3 Pathogenese der Thrombenentstehung sowie Therapie und Thromboemboliepro- phylaxe des Vorhofflimmerns.....	15
1.1.4 Nicht VKA orale Antikoagulanzen (NOAK) .....	17
1.1.5 Fxa-Inhibitor Rivaroxaban.....	17
1.2 Gerinnungsfaktor Xa .....	20
1.2.1 Protease-aktivierte Rezeptoren.....	21
1.2.2 PAR-Antagonisten SCH79797 und GB83.....	23
1.3 Inflammatorische Marker .....	24
1.3.1 Mitogen-activated protein-Kinasen und Nukleärer Faktor- $\kappa$ B .....	24
1.3.2 Adhäsionsmolekül ICAM-1.....	25
1.3.3 Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1 (PAI-1) .....	25
1.3.4 Lectin-like oxidized low-density lipoprotein Rezeptor-1 (LOX-1).....	26
1.4 Fragestellung .....	27
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>28</b>
2.1 Probanden und Materialgewinnung.....	28
2.2 Experimentaldesign .....	29
2.3 Genexpression – Analysen auf RNA-Ebene .....	31
2.3.1 RNA-Präparation aus Gewebe .....	31
2.3.2 Quantifizierung der RNA.....	32

2.3.3	Qualitätskontrolle durch RNA-Gele .....	32
2.3.4	cDNA-Synthese (Reverse Transkription).....	32
2.3.5	Real-time-quantitative-PCR (RT-PCR) .....	33
2.4	Analysen auf Proteinebene .....	35
2.4.1	Herstellung von Proteinlysaten .....	35
2.4.2	Gesamtproteinbestimmung mittels BCA-Reaktion .....	35
2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	36
2.4.4	Western Blot – Transfer der Proteine .....	37
2.5	Statistische Analyse .....	38
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>39</b>
3.1	Zellviabilität der humanen atrialen Gewebeschnitte .....	39
3.2	Expression der Protease-aktivierten Rezeptoren als Reaktion auf FXa und simulierter Tachyarrhythmie in humanem Vorhofgewebe .....	40
3.3	Aktivierung von ERK in Vorhofgewebe .....	44
3.4	Aktivierung NF- $\kappa$ B-vermittelter Signalprozesse im Vorhofgewebe .....	47
3.5	Induktion der NF- $\kappa$ B-Targetproteine im Vorhofgewebe .....	50
3.5.1	Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-8 sowie des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 .....	50
3.5.2	Effekte der Stimulation mit FXa und simulierter Tachyarrhythmie auf die Expression von PAI-1.....	53
3.5.3	Induktion des prooxidativen LOX-1 als Reaktion auf die Stimulation mit FXa und simulierter Tachyarrhythmie .....	56
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>60</b>
4.1	Hauptergebnisse.....	60
4.2	Vorhof-Remodeling bei Vorhofflimmern.....	60
4.3	FXa-abhängige inflammatorische Signalprozesse im Vorhofgewebe.....	62
4.3.1	FXa-vermittelte Induktion der Expression Protease-aktivierter Rezeptoren .....	63
4.3.2	FXa-abhängige inflammatorische Prozesse vermittelt durch NF- $\kappa$ B-Signalwege und ERK 1/2 (p44/p42-MAPK) .....	64

4.3.3	Induktion der NF- $\kappa$ B-vermittelten inflammatorischen Marker ICAM-1, IL-8, PAI-1 sowie Induktion des NF- $\kappa$ B-vermittelten oxidativen Markers LOX-1 durch FXa und simulierter Tachyarrhythmie .....	65
4.3.4	Antioxidative und antiinflammatorische Effekte des FXa-Inhibitors Rivaroxaban unter den Bedingungen des Vorhofflimmerns.....	67
4.4	Klinische Relevanz.....	68
4.5	Limitationen der Studie .....	71
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>72</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>73</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>85</b>
	<b>Ehrenerklärung.....</b>	<b>86</b>
	<b>Darstellung des Bildungsweges .....</b>	<b>87</b>
	<b>Anlagen .....</b>	<b>88</b>
	Patienteninformation .....	88
	Geräte und Materialien .....	90
	Ethikvotum.....	95
	Publikationsliste.....	97

## Abkürzungsverzeichnis

ACE	-	Angiotensin Converting Enzyme
AERP	-	atriale effektive Refraktärperiode
ANOVA	-	Analysis of variance
ASS	-	Acetylsalicylsäure
AT1	-	Angiotensin II Typ I Rezeptor Blocker
BCA	-	Bicinchoninic acid
bFGF	-	Basic fibroblast growth factor
bp	-	Basenpaare
BCA	-	Bicinchoninsäure
BSA	-	Bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
cDNA	-	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
D	-	Deutschland
DEPC	-	Diethylpyrocarbonat
d.h.	-	das heißt
DNA	-	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	-	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	-	Dithiothreitol
EKG	-	Elektrokardiogramm
eNOS	-	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EPR-1	-	Effector cell protease receptor-1
ERK	-	Extracellular-signal regulated kinase
FXa	-	aktivierter Gerinnungsfaktor X
GAPDH	-	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HBSS	-	Hank's balanced salt solution
HRP	-	Horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
HuR	-	Human antigen receptor
ICAM-1	-	Intercellular adhesion molecule-1
Ig	-	Immunglobulin
IL-8	-	Interleukin-8
I $\kappa$ B $\alpha$	-	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
JNK	-	C-Jun N-terminal kinase
KCl	-	Kaliumchlorid

kg	-	Kilogramm
LDH	-	Laktatdehydrogenase
LE	-	Lungenembolie
LOX-1	-	Endothelial lectin-like oxidised low-density lipoprotein receptor-1
LVEF	-	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
m	-	männlich
m <sup>2</sup>	-	Quadratmeter
MAP	-	Mitogen-activated protein
MAPK	-	Mitogen-activated protein kinase
MCP-1	-	Monocyte chemotactic protein-1
MEK	-	MAPK/ERK-kinase
MgCl <sub>2</sub>	-	Magnesiumchlorid
MIF	-	Macrophage migration inhibitory factor
MIP-1 $\alpha$	-	Macrophage inflammatory protein 1-alpha
MMP	-	Matrixmetalloproteasen
mRNA	-	Messenger ribonucleic acid, Messenger Ribonukleinsäure
n	-	Anzahl
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	Natriumcarbonat
NADPH	-	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaHCO <sub>3</sub>	-	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	-	Natriumhydroxid
NF- $\kappa$ B	-	Nukleärer Faktor kappa B
NO	-	Stickstoffmonoxid
ns	-	nicht signifikant
NYHA	-	New York Heart Association
OD	-	optische Dichte
PAGE	-	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI-1	-	Plasminogen-activator inhibitor, Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1
PAR	-	Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	-	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	-	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
Riva	-	Rivaroxaban
RNA	-	Ribonukleinsäure
ROS	-	Reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
rpm	-	Umdrehungen pro Minute

RT	-	reverse Transkriptase/Reverse Transkription
SCH	-	PAR 1-Antagonist SCH79797
SDS	-	Sodium dodecyl sulfate
SEM	-	Standard error of the mean, Standardfehler
SMC	-	Smooth muscle cells
Taq	-	Bakterium Thermus aquaticus
TBS	-	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (pH 7,4)
TGF- $\beta$	-	Transforming growth factor- $\beta$
TNF- $\alpha$	-	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
t-PA	-	gewebsspezifischer Plasminogenaktivator
TVT	-	Tiefe Venenthrombose
u-PA	-	Urokinase
VCAM-1	-	Vascular cell adhesion molecule-1
VHF	-	Vorhofflimmern
VTE	-	venöse Thromboembolien
vWF	-	von-Willebrand-Faktor
w	-	weiblich
WB	-	Western Blot
Z. n.	-	Zustand nach

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b>	Gerinnungskaskade (nach Borissoff et al. 2011). .....	21
<b>Abbildung 2:</b>	BCA-Reaktionsschema. ....	36
<b>Abbildung 3:</b>	Eichkurve der photometrischen Bestimmung. ....	36
<b>Abbildung 4:</b>	Fluoreszenzmikroskopie eines atrialen Gewebeschnittes nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden zur Überprüfung der Zellviabilität. ....	39
<b>Abbildung 5:</b>	Fluoreszenzmikroskopie eines atrialen Gewebeschnittes nach einer 24-stündigen Elektrostimulation zur Überprüfung der Zellviabilität. ....	39
<b>Abbildung 6:</b>	Darstellung des LDH-Verlustes zur Überprüfung der Integrität der atrialen Gewebeschnitte nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden bzw. nach 24-stündiger Elektrostimulation. ....	40
<b>Abbildung 7:</b>	Effekte von FXa auf die Proteinexpression des PAR 2. ....	41
<b>Abbildung 8:</b>	Effekte von Rivaroxaban auf die Proteinexpression des PAR 2. ....	41
<b>Abbildung 9:</b>	Proteinexpression des PAR 2 unter Stimulation des atrialen Gewebes mit FXa sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83. ....	42
<b>Abbildung 10:</b>	Proteinexpression des PAR 2 unter Stimulation des Gewebes mit FXa und simulierter Tachyarrhythmie sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83. ....	42
<b>Abbildung 11:</b>	Expression der PAR 1-mRNA als Reaktion auf die Stimulation des Gewebes mit FXa und simulierter Tachyarrhythmie sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83. ....	43
<b>Abbildung 12:</b>	Expression der PAR 2-mRNA als Reaktion auf die Stimulation des Gewebes mit FXa und simulierter Tachyarrhythmie sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83. ....	44
<b>Abbildung 13:</b>	Effekte von FXa auf die Proteinexpression von Phospho-ERK. ....	45
<b>Abbildung 14:</b>	Effekte von Rivaroxaban auf die Proteinexpression von Phospho-ERK. ....	45
<b>Abbildung 15:</b>	Proteinexpression von Phospho-ERK unter Stimulation des atrialen Gewebes mit FXa sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83. ....	46
<b>Abbildung 16:</b>	Proteinexpression von Phospho-ERK unter Stimulation des Gewebes mit FXa und simulierter Tachyarrhythmie sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83. ....	47

<b>Abbildung 17:</b> Aktivierung der ERK-Kinasen als Reaktion auf die Stimulation des Gewebes mit FXa und schneller Vorhofstimulation sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83.....	47
<b>Abbildung 18:</b> Proteinexpression von p-NF- $\kappa$ Bp65 unter Stimulation des atrialen Gewebes mit FXa sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83.....	49
<b>Abbildung 19:</b> Proteinexpression von p-NF- $\kappa$ Bp65 unter Stimulation des Gewebes mit FXa und simulierter Tachyarrhythmie sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83.....	49
<b>Abbildung 20:</b> Aktivierung NF- $\kappa$ B-vermittelter Signalprozesse als Reaktion auf die Stimulation mit FXa und schneller Vorhofstimulation sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83.....	49
<b>Abbildung 21:</b> Proteinexpression von ICAM-1 unter Stimulation des atrialen Gewebes mit FXa sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83.....	50
<b>Abbildung 22:</b> Proteinexpression von ICAM-1 unter Stimulation des Gewebes mit FXa und simulierter Tachyarrhythmie sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83.....	51
<b>Abbildung 23:</b> Aktivierung von ICAM-1 als Reaktion auf die Stimulation mit FXa und schneller Vorhofstimulation sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83.....	51
<b>Abbildung 24:</b> Effekte der Stimulation mit FXa und schneller Vorhofstimulation sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83 auf die Expression von ICAM-1 auf Transkriptionsebene.....	52
<b>Abbildung 25:</b> Effekte der Stimulation mit FXa und schneller Vorhofstimulation sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83 auf die Expression von IL-8 auf Transkriptionsebene.....	53
<b>Abbildung 26:</b> Proteinexpression von PAI-1 unter Stimulation des atrialen Gewebes mit FXa sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83.....	54
<b>Abbildung 27:</b> Proteinexpression von PAI-1 unter Stimulation des Gewebes mit FXa und simulierter Tachyarrhythmie sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83.....	54

<b>Abbildung 28:</b> Aktivierung von PAI-1 als Reaktion auf die Stimulation mit FXa und schneller Vorhofstimulation sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83.....	55
<b>Abbildung 29:</b> Effekte der Stimulation mit FXa und schneller Vorhofstimulation sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83 auf die Expression von PAI-1 auf Transkriptionsebene.....	56
<b>Abbildung 30:</b> Proteinexpression von LOX-1 unter Stimulation des atrialen Gewebes mit FXa sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83.....	57
<b>Abbildung 31:</b> Proteinexpression von LOX-1 unter Stimulation des Gewebes mit FXa und simulierter Tachyarrhythmie sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83.....	57
<b>Abbildung 32:</b> Aktivierung von LOX-1 als Reaktion auf die Stimulation mit FXa und schneller Vorhofstimulation sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83.....	58
<b>Abbildung 33:</b> Effekte der Stimulation mit FXa und schneller Vorhofstimulation sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83 auf die Expression von LOX-1 auf Transkriptionsebene.....	59

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	Rivaroxaban – klinisches Phase-III-Studienprogramm. ....	19
<b>Tabelle 2:</b>	Rivaroxaban – Phase-IV-Studien.....	20
<b>Tabelle 3:</b>	Patientencharakteristika. ....	29
<b>Tabelle 4:</b>	Kultivierung der Gewebeschnitte. ....	30
<b>Tabelle 5:</b>	<i>Ex vivo</i> -Stimulation der Gewebeschnitte. ....	31
<b>Tabelle 6:</b>	Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die cDNA-Synthese. ....	33
<b>Tabelle 7:</b>	Bedingungen während der cDNA-Synthese. ....	33
<b>Tabelle 8:</b>	Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die RT-PCR. ....	34
<b>Tabelle 9:</b>	verwendete Primer-Sequenzen für die RT quantitative PCR. ....	34
<b>Tabelle 10:</b>	Zyklen innerhalb des Amplifikationsprogrammes.....	35
<b>Tabelle 11:</b>	Auflistung der verwendeten Geräte.....	90
<b>Tabelle 12:</b>	Auflistung der verwendeten Arbeitsmaterialien.....	91
<b>Tabelle 13:</b>	Auflistung der verwendeten Reagenzien. ....	92
<b>Tabelle 14:</b>	Zusammensetzung des Lysepuffers zur Protein-Isolation (modifizierter RIPA-Puffer).....	92
<b>Tabelle 15:</b>	Zusammensetzung des Transport- und Kulturmediums für Herzohren – serumfrei. ....	93
<b>Tabelle 16:</b>	Auflistung der verwendeten primären Antikörper.....	93
<b>Tabelle 17:</b>	Auflistung der verwendeten sekundären Antikörper. ....	93
<b>Tabelle 18:</b>	Zusammensetzung der Gele unterschiedlicher Acrylamidkonzentration für die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese.....	94
<b>Tabelle 19:</b>	Verwendete Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	94
<b>Tabelle 20:</b>	Verwendete Lösungen für Western Blot und Protein-Detektion.....	94

## 1 Einführung

### 1.1 Vorhofflimmern

#### 1.1.1 Epidemiologie, Klinik, Klassifikation und Prognose

Der englische Arzt William Harvey beschrieb im 17. Jahrhundert in seinem Werk „Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus“ die Entdeckung des Blutkreislaufs und somit die physiologischen Grundlagen der Herzrhythmusstörung „Vorhofflimmern“. Bei seinen Studien beobachtete er ineffektive Palpitationen der Vorhöfe (McMichael 1982). Das Vorhofflimmern (VHF) als häufigste Form der supraventrikulären Tachyarrhythmie stellt heutzutage die häufigste anhaltende Herzrhythmusstörung dar, welche mit zunehmender Alterung der Bevölkerung einen stetigen Anstieg der Inzidenz und Prävalenz zu verzeichnen hat (Kannel et al. 1998; Go et al. 2001; Camm et al. 2010). Die Herzrhythmusstörung, bei der weder im Oberflächen-EKG noch während einer intrakardialen Ableitung eine regelmäßige Vorhofaktivität erkennbar ist, zeigt in der Bevölkerung momentan eine Prävalenz von 1% (Kannel et al. 1998); wobei infolge der zunehmenden Inzidenz des VHF, der alternden Bevölkerung sowie durch verlängertes Überleben bei kardiovaskulären Erkrankungen zu erwarten ist, dass sich die Anzahl der betroffenen Personen innerhalb der nächsten zwei bis drei Jahrzehnte weiterhin verdoppelt bis verdreifacht (Go et al. 2001; Fuster et al. 2006; Stewart et al. 2001; Stewart et al. 2002). Derzeit besteht ein Lebenszeitrisiko an VHF zu erkranken von annähernd 25% (Lloyd-Jones et al. 2004).

Durch Untersuchungen im Setting der Kohortenstudie FRAMINGHAM HEART Study konnten zusätzlich zu intrinsischen Ursachen ein fortgeschrittenes Alter, Diabetes, Hypertension, kongestive Herzinsuffizienz, rheumatische sowie nichtrheumatische Herzklappenfehler und Myokardinfarkt als klinische Risikofaktoren für VHF identifiziert werden (Benjamin et al. 1994). Verschiedene bevölkerungsbezogene Studien haben zudem eine stabile Beziehung zwischen Adipositas und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Vorhofflimmern demonstriert (Wang et al. 2004; Tedrow et al. 2010). Die arterielle Hypertonie betrifft ca. eine Milliarde Menschen weltweit und stellt den häufigsten und möglicherweise modifizierbarsten Risikofaktor für VHF dar. Laut Kistler et al. (2006) führt ein erhöhter Blutdruck in tierexperimentellen Studien zu signifikanten elektrischen und strukturellen Remodelingvorgängen im Vorhof (Kistler et al. 2006). Die Ausdehnung der pathophysiologischen Prozesse durch die arterielle Hypertonie schließt eine Linksherzhypertrophie, eine diastolische Dysfunktion, einen erhöhten linksatrialen Druck und daraus resultierend die Vergrößerung des linken Vorhofs ein. Laut der Framingham-Studie steigt das Risiko für die Entwicklung von VHF bei einem Anstieg der Größe des linken Vorhofs um 5 mm auf 39%. Verschiedene antihypertensive Medikamente können die

strukturellen Veränderungen der Vergrößerung des linken Vorhofs und der linksventrikulären Hypertrophie vermindern (Kannel et al. 1998). Die echokardiographischen Risikofaktoren für nichtrheumatisches VHF umfassen neben der oben genannten Vergrößerung des linken Vorhofs und einer Zunahme der Dicke der linksventrikulären Wand auch die reduzierte fraktionelle Verkürzung des linken Ventrikels (Vaziri et al. 1994). VHF kann in über 10% der Fälle auch als primäres VHF bzw. idiopathisch ohne Vorliegen einer strukturellen Herzerkrankung (sog. „lone atrial fibrillation“) auftreten (Brand et al. 1985), gelegentlich besteht auch eine familiäre Disposition (Fox et al. 2004). Als nichtkardiale Grunderkrankungen kommen als weitere Ursachen zudem endokrine Stoffwechselstörungen wie eine Hyperthyreose (Frost et al. 2004), Alkoholabusus (Ettinger et al. 1978) sowie psychosoziale Faktoren infrage.

Bezüglich der Beschwerdesymptomatik muss eine Unterscheidung zwischen asymptomatischen und symptomatischen Episoden getroffen werden. Die typischen vorhofflimmerassoziierten Symptome sind laut der ALFA-Studie Palpitationen, Brustschmerzen, Dyspnoe, Synkopen, Schwindelanfälle sowie Schwäche/Müdigkeit (Levy et al. 1999).

Die Klassifikation des VHF nach seinem Verlauf wird eingeteilt in (Fuster et al. 2011):

- erste Episode eines VHF,
- paroxysmales VHF mit einer Selbstlimitierung nach <7 Tagen (meist <24 Stunden),
- persistierendes VHF mit einer Dauer >7 Tage und Beendigung des VHF nur durch eine therapeutische Intervention sowie
- permanentes VHF, bei dem kein Kardioversionserfolg zu verzeichnen ist.

VHF beeinträchtigt nicht nur die Lebensqualität, sondern steigert auch die Mortalität infolge der gefürchteten Komplikationen thromboembolischer Ereignisse bis hin zu einem 3-bis 5-fach erhöhten Risiko eines Schlaganfallereignisses sowie durch die Entwicklung einer mit dem VHF in Zusammenhang stehenden Herzinsuffizienz (Camm et al. 2010; Currie et al. 2006; Schotten et al. 2011; Wolf et al. 1991). Das VHF leistet einen enormen Beitrag zum ischämisch bedingten Schlaganfall in allen Altersklassen (ca. 30%), was auf die Thrombusformierung und Embolisation ausgehend vom linken Herzvorhof zurückerzählbar ist (Camm et al. 2010; Hobbs, F. D. R. et al. 2005; Lip 2011; Watson et al. 2009). Abhängig von klinischen Risikofaktoren wie Hypertension, Alter, Diabetes mellitus etc. variiert das individuelle Risiko für thromboembolische Ereignisse von ca. 2% bis 20% pro Jahr (Camm et al. 2010; Lip 2011; Lip et al. 2011; Schotten et al. 2011; Watson et al. 2009). Zuvor erschienene Studien verdeutlichten die Relevanz von prothrombotischen endokardialen Veränderungen für die Entwicklung von Vorhofthromben (Goette et al. 2008; Schotten et al. 2011; Watson et al. 2009). Der initiale Mechanismus scheint eine durch oxidativen Stress induzierte ansteigende Expression von Adhäsionsmolekülen, Plasminogen-Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1) und von-Willebrand-Faktor (vWF) zu sein, welche ein endokardiales

Recruitment von inflammatorischen Zellen und eine vermehrte Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten am Vorhofendokard des flimmernden Vorhofgewebes nach sich zieht (Bukowska et al. 2008; Dudley 2005; Hammwöhner et al. 2007; Kamiyama 1998). Dementsprechend könnten therapeutische Interventionen, welche mit diesen zellulären Signalprozessen interferieren, einen Benefit bei Patienten mit VHF zeigen.

Benjamin et al. (1998) konnten zeigen, dass die erhöhte Mortalität und Morbidität jedoch nicht allein durch die thromboembolischen Ereignisse und die kardiovaskuläre Morbidität begründbar ist (Benjamin et al. 1998).

### **1.1.2 Pathophysiologische Grundlagen des Vorhofflimmerns**

Die Entstehung und Aufrechterhaltung des persistierenden VHF begründet sich auf dem pathophysiologischen Konzept des Vorhandenseins multipler funktioneller Reentry-Kreise im Vorhof. Dies wurde erstmals von Moe et al. (1964) beschrieben (Moe et al. 1964). Dabei liegen die Foci der Mikro-Reentry-Störung nicht primär im Sinusknoten, sondern im Vorhof und im Mündungsbereich der Pulmonalvenen. Begünstigende Faktoren, welche zum Auftreten von Reentry-Kreisen in bestimmten Myokardarealen beitragen, sind laut der Theorie der „multiple wavelets“ eine Verkürzung der Refraktarität sowie eine Verlangsamung der Erregungsleitungsgeschwindigkeit (Fuster et al. 2011). Durch weitere Beobachtungen konnte festgestellt werden, dass auch das Vorliegen von morphologischen Veränderungen im Vorhof wesentlich zu den Mechanismen des VHF beiträgt (Fuster et al. 2011). Weitere Theorien gehen davon aus, dass an der Entstehung und Aufrechterhaltung von VHF ein einziger Focus mit Ausbreitung von sekundären Erregungsfronten beteiligt sei (Fuster et al. 2011). Bei allen genannten Mechanismen entsteht eine hohe Flimmerfrequenz im Vorhof von 350-600/min, wobei eine hämodynamisch wirksame Vorhofkontraktion verhindert wird. Dies führt insbesondere bei myokardial vorgeschädigten Patienten zu einem Abfall des Herzzeitvolumens.

### **1.1.3 Pathogenese der Thrombenentstehung sowie Therapie und Thromboembolieprophylaxe des Vorhofflimmerns**

Laut der ESC-Guidelines erfolgt eine Unterscheidung zwischen kausalen und symptomatischen Therapiestrategien. Bei letzterer kommen die Frequenzkontrolle, bei der eine medikamentöse Normalisierung der Kammerfrequenz bei Tachyarrhythmia absoluta bzw. eine VVI(R)-Schrittmacherimplantation bei Bradyarrhythmia absoluta erwogen werden kann, sowie die Rhythmuskontrolle mit Überführung des VHF in einen Sinusrhythmus infrage. Zur Regularisierung des VHF stehen die medikamentöse Kardioversion und die EKG-getriggerte Elektrokardioversion

zur Verfügung, wobei auf eine adäquate Rezidivprophylaxe geachtet werden sollte. Verschiedene Katheterablationsverfahren wie die Pulmonalvenenablation sowie die Maze-Operation stehen als kurative Therapieverfahren zur Auswahl (Camm et al. 2010).

Die medikamentöse Thromboembolieprophylaxe wird unter Berücksichtigung der CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc-Score-Risikoklassifikation für Hirnembolien vorgenommen (Lip et al. 2010). Nach diesem gehören zu den thromboembolischen Risikofaktoren ein Alter >75 Jahre, früherer Hirninfarkt oder TIA, Herzinsuffizienz mit eingeschränkter linksventrikulärer Ejektionsfraktion, Arterieller Hypertonus sowie Diabetes mellitus. Zudem gibt es zusätzliche Punkte für Gefäßerkrankungen (z.B. Myokardinfarkt, KHK, pAVK, venöse Thrombose), Vorliegen eines weiblichen Geschlechtes sowie eine genauere Differenzierung des Alters. Weitere von diesem Score unabhängige Risikofaktoren sind ein in der transösophagealen Echokardiographie sichtbar vergrößerter Vorhof, Vorhofthromben, ein spontaner Echoktrast sowie eine verminderte Vorhofrohrflussgeschwindigkeit im Bereich des linken Herzohres (Bernhardt et al. 2005; Kamp et al. 1999). Das Schlaganfallrisiko steigt altersabhängig, sodass das Risiko bei Patienten im Alter von 50-59 Jahren 1,5% und im Alter von 80-89 Jahren bereits 23,5% beträgt. Die Hälfte aller Insulte finden sich bei Patienten >75 Jahren (Wolf et al. 1991). Eine adäquate Thromboembolieprophylaxe ist somit unverzichtbar. Bei bestehenden Kontraindikationen oder Ablehnung der empfohlenen antikoagulatorischen Therapie durch den Patienten besteht die Möglichkeit eines interventionellen Vorhofverschlusses oder der Einsatz von Thrombozytenaggregationshemmern (Camm et al. 2010).

Die pathogenetische Entstehung von Thromben im Vorhof bei VHF kann auf die Virchow-Trias der Thrombogenese zurückgeführt werden. Demnach sind bei VHF folgende Voraussetzungen erfüllt: 1. Blutstromveränderung, welche durch Verlust der Kontraktilität der Vorhöfe und die absolute Arrhythmie der Herzkammern entsteht, 2. Endothelalteration, welche möglicherweise durch eine strukturelle Herzerkrankung selbst oder infolge eines verminderten Blutflusses im linken Vorhof oder durch systemische Ursachen wie turbulente Strömungen und verminderter Schubspannung auf der Gefäßwand zustande kommt, die zu einer Endotheldysfunktion führen kann, sowie 3. eine Veränderung der Blutzusammensetzung. Diese Veränderungen führen insgesamt zu prothrombotischen Zuständen bei VHF (Freestone und Lip 2008). Conway et al. (2003) zeigten bei VHF-Patienten erhöhte vWF-Konzentrationen im Plasma als Indikator für eine Endothelschädigung/Endotheldysfunktion, welche somit als prädiktiver Marker für einen späteren Schlaganfall oder andere vaskuläre Ereignisse gelten können (Conway, D. S. G. et al. 2003). Ob die erhöhten vWF-Konzentrationen allein dem VHF oder den evtl. vorliegenden koexistenten Risikofaktoren zuzuschreiben sind, bleibt in der wissenschaftlichen Diskussion umstritten (Feng et al. 2001; Fukuchi et al. 2001). Weiterhin konnten Asakura et al. (1992) auch eine Zunahme des

Prothrombin-Fragments F1+2 und des Thrombin-Antithrombin-III-Komplexes als Indikator einer gesteigerten Thrombinbildung für eine gesteigerte Thrombogenese verantwortlich machen (Asakura et al. 1992). Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch die Fibrinogenkonzentration, Plättchenfaktor 4 und die D-Dimere im Plasma bei VHF-Patienten erhöht waren und somit zum prothrombogenen Milieu im Vorhof beitragen können (Gustafsson et al. 1990; Lip et al. 1995). Die Downregulation der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) und die rückläufige NO-Produktion bei Patienten mit VHF dürfte ebenfalls eine bedeutende Rolle in der Thrombogenese bei VHF spielen (Fukuchi et al. 2001). Zusammenfassend könnte eine verminderte fibrinolytische Funktion, beispielsweise durch erhöhte Plasmakonzentrationen von PAI-1 (Roldan et al. 1998), zu einem prothrombogenen Milieu beitragen; dies könnte jedoch ebenso das Resultat koexistenter Risikofaktoren, endothelialer Schäden/Endotheldysfunktion oder inflammatorischer Signalprozesse sowie das Resultat einer Kombination aller genannten Parameter sein.

#### **1.1.4 Nicht VKA orale Antikoagulanzen (NOAK)**

Die Prophylaxe mit oralen Vitamin K-Antagonisten wie Phenprocoumon oder Warfarin ist bei einem moderaten bis hohen Risiko (CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASC-Score 1 bis  $\geq 2$ ) zur Antikoagulation indiziert. Alternativ stehen neue orale Antikoagulanzen wie die selektiven Faktor Xa (Fxa)-Hemmer Fondaparinux, Rivaroxaban, Danaparoid oder Apixaban, direkte Thrombininhibitoren wie Dabigatran, verschiedene Hirudine sowie Argatroban zur Verfügung. Für die Thromboembolieprophylaxe des nichtvalvulären Vorhofflimmerns werden insbesondere Rivaroxaban, Apixaban und Dabigatran eingesetzt (Camm et al. 2010; Camm et al. 2012). Erst kürzlich wurde diskutiert, ob alle VHF-Patienten antikoaguliert werden sollten, insbesondere im Hinblick auf die gesunkene Rate an lebensbedrohlichen und/oder intrakraniellen Blutungen unter NOAK-Therapie (Hammwöhner und Goette 2015).

#### **1.1.5 Fxa-Inhibitor Rivaroxaban**

Mit Rivaroxaban steht ein hochselektiver direkter FXa-Inhibitor zur Verfügung, der einmal täglich in fester Dosierung oral eingenommen wird. Das Oxazolidinonderivat interagiert mit dem aktiven Zentrum des FXa und wirkt somit am extrinsischen sowie intrinsischen System der Gerinnungskaskade gleichermaßen. Anders als jedoch bei dem wirkähnlichen Fondaparinux oder den niedermolekularen Heparinen inhibiert es die Thrombus-assoziierte sowie die freie FXa-Aktivität, die Prothrombinase-Aktivität und reduziert die Thrombin-Generierung. Rivaroxaban zeichnet sich durch eine hohe orale Bioverfügbarkeit sowie einen schnellen Wirkeintritt aus und zeigt eine vorhersagbare Pharmakokinetik und Pharmakodynamik in gesunden Individuen und

Patienten, welche sich einer totalen Hüft- oder Knieendoprothetik unterzogen haben (Perzborn et al. 2007). Annähernd 2/3 der Dosis werden metabolisiert, die Metabolite werden zu 66% über die Niere und zu 28% über die Fäzes; 1/3 der eingenommenen Dosis wird unverändert über die Niere ausgeschieden (Weinz et al. 2009). In der kürzlich veröffentlichten randomisierten, doppelblinden ROCKET-AF-Studie wurde bei Patienten mit nichtvalvulärem Vorhofflimmern und erhöhtem Schlaganfall-Risiko nach CHADS<sub>2</sub>-Score die Therapie mit dem oralen Antikoagulanzen Rivaroxaban (20 mg/d bzw. 15 mg/d bei eingeschränkter Nierenfunktion) gegenüber der Therapie mit dosisangepasstem Warfarin verglichen. Bei Patienten mit Vorhofflimmern erwies sich Rivaroxaban im Vergleich zu Warfarin hinsichtlich der Prävention des primären Endpunktes Schlaganfall bzw. systemische Embolien als gleichwertig. Es zeigte sich zwischen diesen beiden Gruppen kein Unterschied bezüglich des Risikos einer schweren bzw. minderschweren klinisch relevanten Blutung, jedoch traten unter Rivaroxaban seltener intrakranielle und tödliche Blutungen auf. Die Zulassung des Medikaments zur Indikation der Schlaganfallprävention bei Patienten mit VHF im Jahr 2011 basiert auf den Ergebnissen der Phase-III-Studie ROCKET-AF; es steht somit ein alternatives Medikament zur Warfarintherapie mit vergleichbarer Wirksamkeit und gutem Sicherheitsprofil zur Verfügung, um Thromboembolieereignisse bei Patienten mit VHF zu verhindern (The Executive Steering Committee, on behalf of the ROCKET AF Study Investigators 2010; Patel et al. 2011; del Zoppo, G. J. und Eliasziw 2011). Zur Therapie von Lungenembolien und zur Prävention erneut auftretender tiefer Venenthrombosen und Lungenembolien ist Rivaroxaban seit 2012 zugelassen. Diese Zulassung beruht auf den Ergebnissen der Studien EINSTEIN-DVT sowie EINSTEIN-PE (Bauersachs et al. 2010; Buller et al. 2012). Seit 2008 ist Rivaroxaban bei Erwachsenen bereits zur Prävention venöser Thromboembolien nach elektivem Hüft- oder Kniegelenksersatz zugelassen (RECORD-Studien). In einer Phase-III-Studie zeigte Rivaroxaban höhere Wirksamkeit als Enoxaparin zur Vermeidung thromboembolischer Ereignisse nach Kniegelenksersatzoperationen bei vergleichbar niedrigen Blutungsraten (Perzborn et al. 2007). Zukünftig kann Rivaroxaban in einer zweimaligen Dosis von 2,5 mg täglich und in Kombination mit einer plättchenhemmenden Therapie auch zur Prävention atherothrombotischer Ereignisse (kardiovaskuläre Sterblichkeit, Myokardinfarkt oder Schlaganfall) nach Akutem Koronarsyndrom eingesetzt werden (Mega et al. 2013). Eine Übersicht über relevante Studien zu Rivaroxaban geben Tabelle 1 und Tabelle 2.

**Tabelle 1:** Rivaroxaban – klinisches Phase-III-Studienprogramm.

Studie	Ergebnis
<p><b>RECORD 1-4</b></p> <p><b>REgulation of Coagulation in major Orthopaedic surgery reducing the Risk of DVT and PE</b> (Eriksson et al. 2008; Kakkar et al. 2008; Lassen et al. 2008; Turpie, A. G. G. et al. 2009)</p>	<p><b>Prophylaxe von VTE nach elektiven totalen Hüft- oder Kniegelenkersatzoperationen</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1xtgl. Rivaroxaban 10 mg vs. Enoxaparin s.c. 40 mg</li> <li>• signifikante Reduktion venöser Thromboembolien unter Rivaroxaban bei vergleichbarer Sicherheit</li> </ul>
<p><b>EINSTEIN DVT, PE, EXT</b></p> <p>Oral direct factor Xa inhibitor rivaroxaban in patients with acute symptomatic deep-vein thrombosis or pulmonary embolism (Bauersachs et al. 2010; Buller et al. 2012)</p>	<p><b>Therapie und Sekundärprophylaxe der TVT und LE</b></p> <p><b>DVT/PE:</b> Rivaroxaban vs. Vitamin-K-Antagonisten überlappend mit Enoxaparin</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>DVT:</b> Nicht-Unterlegenheit von Rivaroxaban bei akuter symptomatischer proximaler TVT (ohne symptomatische LE) hinsichtlich des primären Wirksamkeitsendpunktes; vergleichbare Ergebnisse beim primären Sicherheitsendpunkt</li> <li>• <b>PE:</b> Nicht-Unterlegenheit von Rivaroxaban bei symptomatischer LE (mit oder ohne TVT) hinsichtlich des primären Wirksamkeitsendpunktes (<math>p &lt; 0,003</math> für Nicht-Unterlegenheit); vergleichbare Ergebnisse beim primären Sicherheitsendpunkt (schwere und nicht schwere klinisch relevante Blutungen, Inzidenz von 10,3% unter Rivaroxaban vs. 11,4% unter Enoxaparin/VKA); unter Rivaroxaban in 1,1% schwere Blutungen vs. 2,2% unter Enoxaparin/VKA (<math>p = 0,003</math>)</li> </ul> <p><b>EXT:</b> Patienten mit TVT und LE, die bereits für 6 oder 12 Monate mit Rivaroxaban oder VKA therapiert wurden</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• RRR 82% bzgl. rezidivierender VTE bei 6- oder 12-monatiger verlängerter Prophylaxe mit Rivaroxaban (<math>p &lt; 0,0001</math>), ARR 5,8%, NNT 15; Inzidenz schwerer Blutungen in der Rivaroxaban-Gruppe 0,7%</li> </ul>
<p><b>ROCKET AF</b></p> <p>Rivaroxaban Once Daily Oral Direct Factor Xa Inhibition Compared with Vitamin K Antagonism for Prevention of Stroke and Embolism Trial in Atrial Fibrillation (Patel et al. 2011)</p>	<p><b>Schlaganfallprophylaxe bei Patienten mit VHF</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rivaroxaban 20 mg 1xtgl. (oder 15 mg bei CI 30-49 ml/min) vs. Warfarin</li> <li>• Nicht-Unterlegenheit von Rivaroxaban gegenüber Warfarin</li> <li>• Sicherheitsprofil beider Substanzen vergleichbar</li> <li>• Ergebnisse für den primären Wirksamkeitsendpunkt (Kombination aus Schlaganfall und systemischen Embolien außerhalb des ZNS; Ereignisrate pro 100 Patientenjahre): <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Per-Protocol-Population</b> (as treated): Rivaroxaban 1,7% vs. Warfarin 2,2% (<math>p &lt; 0,001</math> für Nicht-Unterlegenheit)</li> <li>- <b>Safety-Population</b> (as treated): Rivaroxaban 1,7% vs. Warfarin 2,2% (<math>p &lt; 0,02</math> für Überlegenheit)</li> <li>- <b>Intention-to-treat-Population:</b> Rivaroxaban 2,1% vs. Warfarin 2,4% (<math>p &lt; 0,001</math> für Nicht-Unterlegenheit; <math>p = 0,12</math> für Überlegenheit)</li> </ul> </li> </ul>
<p><b>ATLAS</b></p> <p>Anti-Xa-Therapy to Lower Cardiovascular Events in Addition to Aspirin with/without Thienopyridine Therapy in Subjects with Acute Coronary Syndrome (Gibson et al. 2011)</p>	<p><b>Sekundärprophylaxe nach akutem Koronarsyndrom</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vergleich Rivaroxaban (2,5 oder 5 mg 2x tgl.) vs. Placebo, kombiniert mit Aspirin allein oder mit Aspirin + Thienopyridin</li> <li>• Reduktion der kardiovaskulären Ereignisrate durch Rivaroxaban kombiniert mit Thrombozytenaggregationshemmern</li> <li>• erhöhte Anzahl schwerer und intrakranieller Blutungen, tödliche Blutungen jedoch nicht häufiger als unter Placebo</li> </ul>
<p><b>MAGELLAN</b></p> <p>Multicenter, RAndomized, Parallel Group Efficacy and Safety Study for the Prevention of Venous Thromboembolism in Hospitalized Medically ILL Patients Comparing RivaroxabAN with Enoxaparin (Cohen et al. 2011)</p>	<p><b>VTE-Prophylaxe bei hospitalisierten Patienten mit akuter internistischer Erkrankung</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• überlegene Wirksamkeit einer verlängerten VTE-Prophylaxe (<math>35 \pm 4</math> Tage) mit Rivaroxaban 10 mg 1xtgl. vs. Kurzzeit-Prophylaxe (<math>10 \pm 4</math> Tage) mit Enoxaparin 40 mg 1xtgl.</li> <li>• Nicht-Unterlegenheit von Rivaroxaban 10 mg 1xtgl. (<math>10 \pm 4</math> Tage) vs. Enoxaparin 40 mg 1xtgl. (<math>10 \pm 4</math> Tage)</li> </ul>

VTE: venöse Thromboembolien, TVT: tiefe Venenthrombose, LE: Lungenembolie, VKA: Vitamin-K-Antagonisten.

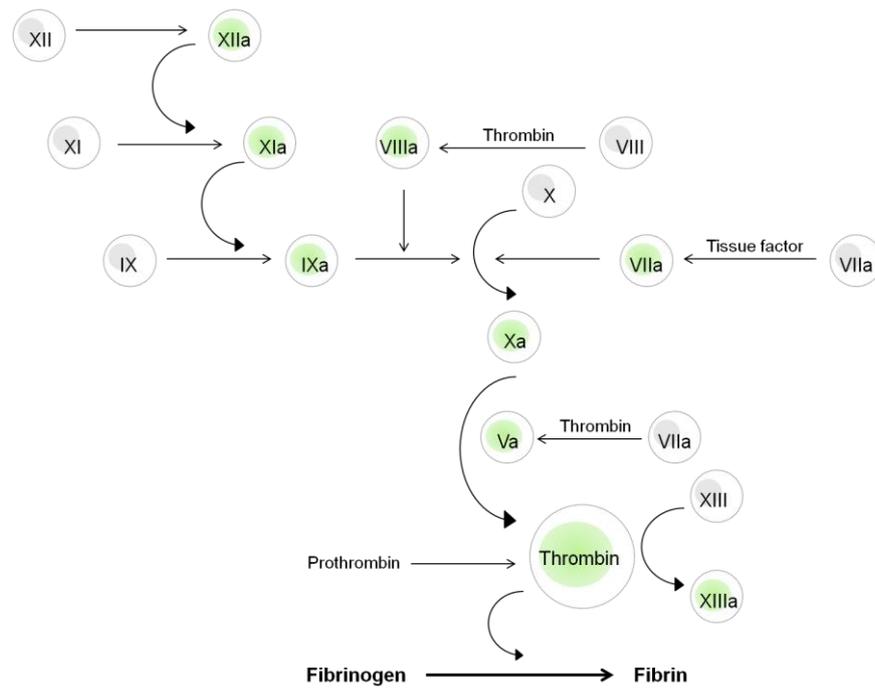
**Tabelle 2:** Rivaroxaban – Phase-IV-Studien.

Studie	Ergebnis
<b>XAMOS</b> <b>XA</b> relto <sup>®</sup> in the prophylaxis of post-surgical venous thromboembolism after elective <b>Major Orthopaedic Surgery</b> of hip or knee (Turpie, A. G. G. et al. 2014)	<b>VTE-Prophylaxe nach Hüft-TEP/Knie-TEP: Sicherheit und Wirksamkeit von oralem Rivaroxaban verglichen mit konventioneller Thromboseprophylaxe unter Alltagsbedingungen</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Rivaroxaban bewirkt bei 1.000 Patienten eine Reduktion von fünf symptomatischen Thromboembolien bei Auftreten von weniger als einer zusätzlichen schweren Blutung</li> <li>Bestätigung des klinischen Nutzens unter Alltagsbedingungen und eines positiven Nutzen-Risiko-Profiles von Rivaroxaban bei Patienten nach elektiven Hüft- oder Kniegelenksoperationen bei vergleichbarer Sicherheit</li> </ul>
<b>XALIA</b> <b>XA</b> relto <sup>®</sup> for Long-term and Initial Anticoagulation in Venous Thromboembolism (VTE) (Informationen bereitgestellt durch BAYER)	<b>Rivaroxaban zur initialen und Langzeitantikoagulation nach VTE-Ereignissen unter Alltagsbedingungen</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Einzelsubstanzstrategie mit Rivaroxaban vs. bisherige Standardtherapie (bestehend aus zwei Medikamenten)</li> <li>Hauptziel: Analyse der langfristigen Sicherheit der Behandlung von akuten TVT mit Rivaroxaban in der klinischen Praxis</li> </ul>
<b>XANTUS</b> <b>Xa</b> relto <sup>®</sup> on Prevention of Stroke and non Non-central Nervous System Systemic Embolism in Patients With Non-valvular Atrial Fibrillation (Informationen bereitgestellt durch BAYER)	<b>Rivaroxaban zur Prophylaxe von Schlaganfällen und systemischen Embolien bei Patienten mit nicht-valvulärem VHF unter Alltagsbedingungen</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Rivaroxaban 20 mg 1xtgl. (oder 15 mg bei moderat eingeschränkter Nierenfunktion (Cl 30-49 ml/min))</li> <li>Hauptziel: Bestätigung des Sicherheitsprofils von Rivaroxaban unter Alltagsbedingungen</li> </ul>

VTE: venöse Thromboembolien, TEP: Totalendoprothese, Cl: Clearance.

## 1.2 Gerinnungsfaktor Xa

Der aktivierte Faktor Xa (FXa) ist eine Serinprotease und spielt eine zentrale Rolle in der Blutgerinnungskaskade, indem es den extrinsischen und den intrinsischen Weg der Kaskade vernetzt. Während der Hämostase bildet FXa zusammen mit FVa und Phospholipiden den Prothrombinasekomplex und aktiviert Prothrombin zu Thrombin (Abbildung 1) In zahlreichen Arbeiten wurden jedoch auch direkte, Thrombin-unabhängige zelluläre Wirkungen von FXa untersucht.



**Abbildung 1:** Gerinnungskaskade (nach Borissoff et al. 2011).

### 1.2.1 Protease-aktivierte Rezeptoren

Zusätzlich zu seiner wichtigen Rolle in der Blutgerinnungskaskade gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass FXa als ein Signalmolekül zelluläre Antworten vermittelt, indem es Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) aktiviert (Steinberg 2005; Ossovskaya und Bunnnett 2004). PAR bilden eine Untergruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, welche die zellulären Effekte verschiedener Proteasen, insbesondere Thrombin, vermittelt. Die Aktivierung der Protease-aktivierten Rezeptoren wird durch Abspaltung des extrazellulären N-Terminus des Rezeptors, wodurch eine Proteindomäne freigelegt wird und als gebundener Ligand (sog. "tethered ligand") fungiert, realisiert (Martorell et al. 2008; Vu et al. 1991).

Folgende Forschungen identifizierten PAR 1 als einen Prototypen der PAR-Familie, welche wichtige nichthämostatische Funktionen erfüllen, eine Rolle in der Tumorbilogie spielen und eine Reihe von hochregulativen Antworten vermitteln, die wesentlich für die inflammatorische Antwort und grundlegend für die normale Geweberegeneration sind. Der enorme Umfang der durch die PAR regulierten zellulären Prozesse wurde kürzlich beschrieben. Dabei wurden verschiedene Rollen und Funktionen der PAR in der Inflammation und Wundheilung, Vasoregulation, Angiogenese, Atherosklerose, bei gastrointestinalen Erkrankungen, bei der Schmerzempfindung durch sensorische Neurone, Atemwegshyperreagibilität und bei entzündlichen pulmonalen Erkrankungen betrachtet (Kandulski et al. 2010; Macfarlane et al. 2001; Major et al. 2003; Ossovskaya und Bunnnett 2004; Vergnolle 2000; Vergnolle et al. 2001).

Studien in Form von Rezeptordesensibilisierungen mit Peptidagonisten (PAR 1 oder PAR 2) und Experimente mit PAR 1-blockierenden Antikörpern deuten darauf hin, dass FXa-induzierte Signalprozesse meist durch PAR 1 und PAR 2 vermittelt werden (McLean et al. 2001). Beide PAR-Rezeptoren werden in verschiedenen Geweben exprimiert: in Geweben der Atemwege, Osteoblasten, im kardiovaskulären System, Epidermis, Immunsystem, Intestinum, Niere, Nervensystem und Magen; PAR 2 wird zusätzlich auch im Pankreas und Ureter exprimiert (Ossovskaya und Bunnett 2004). Bedeutenderweise sei hierbei zu erwähnen, dass FXa und Thrombin den PAR 1-Rezeptor gemeinsam nutzen (Rao, L. V. M. und Pendurthi 2005). PAR 2 hingegen wird nicht durch Thrombin, sondern durch verschiedene andere Gerinnungsfaktoren, insbesondere die Faktoren VIIa und Xa, sowie unterschiedlichen trypsinähnlichen Serinproteasen einschließlich Trypsin oder Tryptase aktiviert (Coughlin und Camerer 2003). Insgesamt werden vier PAR-Isoformen unterschieden (PAR 1, PAR 2, PAR 3 und PAR 4). PAR 1, PAR 3 und PAR 4 können unter physiologischen Bedingungen durch Thrombin aktiviert werden (Coughlin 2000).

Die Aktivierung von PAR-Rezeptoren beeinflusst ein breites Spektrum an intrazellulären Signalwegen und verursacht eine Zunahme von Inositol-Phosphatasen und die Mobilisation von Kalziumionen in einer Vielzahl von Zelltypen (Bohm et al. 1996; Shapiro et al. 2000); dies suggeriert, dass diese Rezeptoren imstande sind, Gq und/oder Gi-vermittelte Signalwege zu aktivieren. Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren neigen dazu, innerhalb der Subtypen miteinander zu interagieren. Deshalb hängt die Antwort der PAR-Aktivierung von der G-Protein-gekoppelten Formierung und dem Repertoire an Effektoren ab, die in dem jeweiligen Zelltyp exprimiert werden (Trejo 2003; Macfarlane et al. 2001). FXa triggert zudem die Phosphorylierung von MAP(Mitogen-activated protein)-Kinasen, insbesondere ERK (Extracellular-signal regulated kinase)- und JNK-(C-Jun N-terminale Kinase)vermittelte Signalwege, welche zur Initiierung verschiedener Signalprozesse führen (Borensztajn et al. 2008a). Diese werden in Abschnitt 1.3.1 näher erläutert.

Weitere Daten unterstützen, dass die FXa-abhängigen Signalprozesse durch Aktivierung von PAR 2 eine wesentliche Rolle im Prozess der Fibrose spielen. Die Aktivierung von proximalen Tubuluszellen durch FXa führt zur PAR 2-abhängigen Expression von PAI-1 und Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), welches ein sehr potentes profibrotisches Zytokin darstellt (Grandaliano et al. 2003). Einige Erkenntnisse unterstützen die Hypothese, dass die durch FXa ausgelösten Signalprozesse eine wichtige Rolle in der Vermittlung des Gewebsremodeling spielen. FXa fördert die Proliferation und Migration von Smooth muscle cells (SMC) (Bretschneider und Schror 2001; Rauch et al. 2004) und die Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten (Borensztajn et al. 2008b). Unfraktionierte und niedermolekulare Heparine sowie andere FXa-Inhibitoren inhibierten dabei die ausgelösten mitogenen Effekte des FXa und somit die VSMC-Proliferation

(Bretschneider und Schror 2001; Kaiser 2003). Weiterhin spielt FXa eine indirekte Rolle in der Angiogenese im Prozess der Fibrose und/oder Tumorbildung. Durch FXa-stimulierte Fibroblasten bzw. SMC schütten dabei Vascular endothelial growth factor (VEGF) und Matrix metalloproteinases (MMP) aus (Bachli et al. 2003; Rauch et al. 2002). In Krebszellen induziert FXa direkt zelluläre Effekte und spielt somit eine essentielle Rolle während des Tumorwachstums und/oder Metastasierung (Borensztajn et al. 2007; Lima und Monteiro 2013; Morris et al. 2006). Bei diesen proliferativen Veränderungen steht insbesondere die Vermittlung über PAR 2 im Vordergrund, PAR 1 spielt hierbei möglicherweise eine untergeordnete Rolle (Borensztajn et al. 2008a).

In der bisher veröffentlichten Literatur lag der Fokus meist auf der PAR-vermittelten Wirkung in Thrombozyten und im Blutgefäßsystem. Es gibt Hinweise, dass PAR auch direkte Effekte auf das Herz ausüben, welche zu Veränderungen der Kontraktilität und zu strukturellem Remodeling der ventrikulären Kardiomyozyten führen (Steinberg 2005).

### **1.2.2 PAR-Antagonisten SCH79797 und GB83**

SCH79797 ist ein neuer potenter, nichtpeptidischer selektiver PAR 1-Antagonist, welcher PAR 1 in humanen Thrombozyten und in humanen SMC von Koronararterien (hCASMC) effektiv inhibiert (Ahn et al. 2000). Bisher wurde der Effekt von SCH79797 auf das humane Vorhofgewebe nicht untersucht. Di Serio et al. (2007) berichteten auch von einem proapoptotischen und antiproliferativen Effekt des SCH79797 durch Inhibition von MAPK, welcher wahrscheinlich nicht durch den PAR-Antagonismus hervorgerufen wird, da diese Effekte auch in Fibroblasten PAR 1-loser Mäuse beobachtet wurden (Di Serio et al. 2007). Sonin et al. (2013) konnten durch Experimente an Ratten feststellen, dass die Inhibition des PAR 1 die linksventrikuläre Dilatation abschwächen und die linksventrikuläre systolische Funktion bei Postinfarktpatienten verbessern konnte. Diese PAR 1-Inhibition durch SCH79797 vermittelt möglicherweise eine Reduktion der inflammatorischen zellulären Prozesse und der Kollagenablagerung, um so das unerwünschte Remodeling und die Fibrosierungsprozesse abzuschwächen (Sonin et al. 2013). Es existieren zwei weitere PAR 1-Inhibitoren, SCH530348 (Vorapaxar) und E5555 (Atopaxar), welche für eine thrombozytenaggregationshemmende Therapie bei Patienten mit Koronarer Herzerkrankung entwickelt wurden und derzeit der klinischen Evaluation unterzogen werden (Morrow et al. 2012; Wiviott et al. 2011).

GB83 ist der derzeit potenteste und einzige PAR 2-Antagonist, welcher die trypsin- und die peptid-induzierte Aktivierung von PAR 2 inhibieren kann. Dieser inhibiert selektiv und reversibel die durch verschiedene PAR-Agonisten (Trypsin, 2f-LIGRLO-NH<sub>2</sub>, GB110) in HT29-Zellen ausgelöste intrazelluläre Kalziumfreisetzung (Barry et al. 2010).

### 1.3 Inflammatorische Marker

#### 1.3.1 Mitogen-activated protein-Kinasen und Nukleärer Faktor- $\kappa$ B

Bei den Mitogen-activated protein-Kinasen (MAPK) handelt es sich um Serin/Threonin-Kinasen, welche durch Phosphorylierung an Threonin- und/oder Tyrosinresten aktiviert werden können und dann im Zellkern akkumulieren, um dort verschiedene Transkriptionsfaktoren zu phosphorylieren. Dadurch besitzen diese die Fähigkeit, unterschiedliche Zielgene zu regulieren. Die MAPK werden in drei Gruppen eingeteilt: ERK 1/2, p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen (p38 $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ / $\delta$ ) und die Jun-Amino-terminalen Kinasen (JNK 1/2/3) (Chang und Karin 2001). Einer der drei verschiedenen Signalwege, welchem in dieser Arbeit eine bedeutende Rolle zugeschrieben wird, führt über die Aktivierung von Mitogenen (einschließlich Insulin, Epidermal growth factor (EGF) und Phorbolestern) (Anderson et al. 1990) zur Aktivierung der MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK) Raf und über die MAP-Kinase MEK 1/2 (MAPK/ERK kinase) schließlich zur Aktivierung der MAPK ERK (Extracellular signal-regulated kinase) 1 (p44-MAPK) bzw. ERK 2 (p42-MAPK) (Seeger und Krebs 1995; Pearson et al. 2001). Diese Stimulation führt zu verschiedenen zellulären Antworten, beispielsweise Differenzierung, Zellproliferation oder -überleben (Chang und Karin 2001). Weiterhin findet die Induktion unterschiedlicher Gene statt, welche für Zytokine wie Interleukin-6, -8 oder MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1), die eine chemotaktische Wirkung aufweisen, Rezeptoren wie TF (Tissue factor) oder ICAM (Intercellular adhesion molecule) oder Proteine der extrazellulären Matrix wie CTGF (Connective tissue growth factor), Kollagen oder Fibronectin kodieren (Borensztajn et al. 2008b). Auch andere MAPKKK können ERK 1/2 als Reaktion auf proinflammatorische Stimuli aktivieren.

Transkriptionsfaktoren der Nukleären Faktor- $\kappa$ B-Familie haben eine grundlegende Funktion im Entzündungsgeschehen, bei der Vermittlung von inflammatorischen, oxidativen Prozessen an unterschiedliche Effektoren und bei der Vermittlung von Immunantworten (Baeuerle und Henkel 1994). Der Nukleäre Faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) besteht aus zwei Ketten mit 50 kDa und 65 kDa. Ohne eine Stimulation der Zelle verbleibt der Transkriptionsfaktor inaktiv im Zytoplasma und ist dort mit einer weiteren Kette, dem Inhibitormolekül I $\kappa$ B $\alpha$  (Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha), verbunden, welches die Aktivierung von NF- $\kappa$ B unmöglich macht und zusätzlich lokalisierte Kernsequenzen verdeckt und somit eine Bindung von NF- $\kappa$ B an die Desoxyribonukleinsäure (DNA) verhindert. NF- $\kappa$ B ist einer der Transkriptionsfaktoren, die durch Toll-ähnliche Rezeptoren stimuliert werden (Murphy et al. 2009; Verma et al. 1995). Verschiedene inflammatorische und oxidative Effektoren, Mitogene oder Wachstumsfaktoren verursachen unter anderem eine Aktivierung von Kinasen, welche die beiden Untereinheiten des Transkriptionsfaktors phosphorylieren: NF- $\kappa$ Bp65 und NF- $\kappa$ Bp50. Die Phosphorylierung am Ser-536 von NF- $\kappa$ Bp65 sowie die Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteinen mit nachfolgendem

proteolytischen Abbau ermöglicht die Freisetzung aus dem inhibitorischen Komplex und den Eintritt in den Zellkern zur Regulation der Genexpression von beispielsweise Zytokinen oder Adhäsionsmolekülen. I $\kappa$ B $\alpha$  wird anschließend rasch resynthetisiert, um seine inhibitorische Funktion bzgl. NF- $\kappa$ B erneut aufnehmen zu können. Unter den NF- $\kappa$ B-Signalwegen spielt auch der zuvor beschriebene MAP-Kinase-Weg eine bedeutende Rolle. Die Interferenz mit der Aktivierung oder Aktivität von NF- $\kappa$ B könnte möglicherweise einen wichtigen Angriffspunkt für die Entwicklung neuer Therapieansätze beispielsweise für die Unterdrückung eines toxischen/septischen Schocks, einer Graft-versus-Host-Reaktion oder akuter inflammatorischer Reaktionen darstellen (Baeuerle und Henkel 1994).

### **1.3.2 Adhäsionsmolekül ICAM-1**

Zelladhäsionsmoleküle gehören zur Familie der eng verwandten Oberflächenglykoproteine, welche an den Zell-Zell-Interaktionen während des Wachstums beteiligt sind und denen eine wichtige Rolle in der Embryogenese und Entwicklung zugeschrieben wird. Zu den bedeutendsten Adhäsionsmolekülen gehören die Selektine, die Integrine, die Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie sowie einige mucinähnliche Moleküle (Murphy et al. 2009). Weiterhin übernehmen die Adhäsionsmoleküle eine wichtige Funktion in der Vermittlung inflammatorischer Reaktionen. Die Mobilisierung von Phagozyten zum Ort der Infektion wird durch Expression von Adhäsionsmolekülen an der Oberfläche des lokalen Endothels nach Aktivierung durch Entzündungsmediatoren wie Interleukin-1, Interferon- $\gamma$  oder Tumornekrosefaktor-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) vermittelt. Insbesondere das ICAM-1, ein integrales induzierbares Membranprotein der Immunglobulinsuperfamilie mit einer Molekülmasse von ca. 100 kDa, spielt eine wesentliche Rolle in der Leukozytenmobilisierung, indem es Proteine der Integrin-Proteinfamilie auf den Leukozyten (z.B. LFA-1 oder CR3) bindet und somit zu einer festen Adhäsion zwischen Leukozyten und Endothelzellen führt (Murphy et al. 2009).

### **1.3.3 Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1 (PAI-1)**

Die Aktivierung der Fibrinolyse, welche zeitgleich zur Hämostase eingeleitet wird und normalerweise mit dieser im Gleichgewicht steht, geht mit der Umwandlung des Plasminogens in Plasmin zur Spaltung der Fibrinpolymere einher. Körper eigene Aktivatoren des fibrinolytischen Systems sind der gewebspezifische Plasminogenaktivator (t-PA) und die Urokinase (u-PA). Aktuell sind aus der Familie der Serpine vier Inhibitoren der Plasminogenaktivatoren bekannt (PAI-1, -2, -3, -4). Der wichtigste Vertreter PAI-1 hemmt während der Fibrinolyse sowohl den t-PA als auch die u-PA. PAI-1 ist ein 52.000 Dalton großes Glykoprotein und scheint neben seiner Rolle in der

Fibrinolyse wichtig im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen (hauptsächlich durch die Inhibition des t-PA) zu sein. Thøgersen et al. (1998) identifizierten eine starke Assoziation zwischen erhöhten PAI-1-Konzentrationen und einem erhöhten Risiko für Myokardinfarkt bei Patienten mittleren Alters; eine Assoziation, welche unabhängig von anderen bekannten Risikofaktoren war (Thøgersen et al. 1998). Zudem wird dem Molekül laut einiger Studien eine potenzielle Rolle in der Pathogenese tiefer Venenthrombosen (Meltzer et al. 2010) und Neointimabildung sowie Restenosierung zugeschrieben (Garg und Fay 2007; Konstantinides et al. 2002). Derzeit gibt es ausgedehnte Forschungen mit dem Fokus auf die Entwicklung selektiver PAI-1-Inhibitoren, um möglicherweise die Inzidenz von thromboembolischen Ereignissen zu vermindern bzw. die Effizienz einer thrombolytischen Therapie zu erhöhen. Weiterhin wird PAI-1 auch im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen beschrieben (Binder und Mihaly 2008). Diese Ergebnisse stehen jedoch im Kontrast zu Beobachtungen aus anderen Studien wie beispielsweise von Prins und Hirsh (1991) zusammengefasst wurde (Prins und Hirsh 1991).

#### **1.3.4 Lectin-like oxidized low-density lipoprotein Rezeptor-1 (LOX-1)**

LOX-1 gehört zur Familie der Scavenger-Rezeptoren, welcher unter anderem die Erkennung, Bindung und Internalisierung des oxidierten LDL (ox-LDL) vermittelt. Das Membranprotein gehört strukturell zur C-Typ-Lektin-Superfamilie und besteht aus vier funktionellen Domänen.

Kakutani et al. (2000) deckten auf, dass LOX-1 weiterhin eine Funktion als Adhäsionsmolekül für Thrombozyten in der Thrombozyten-Endothel-Interaktion übernimmt und somit einen direkten Einfluss auf die Endotheldysfunktion zeigt (Kakutani et al. 2000). Diese Daten weisen darauf hin, dass LOX-1 möglicherweise in den Prozess der Pathogenese der Thrombose involviert sein könnte. Eine kritische Frage bleibt weiterhin, wie das ox-LDL/LOX-1-System die Aktivierung und/oder die Dysfunktion von Endothelzellen, welches nachfolgend eine prokoagulatorische und vermehrt adhäsive Wirkung bzgl. Thrombozyten zeigt, initiiert. Ein Erklärungsversuch dafür könnte sein, dass die Bindung eines oxidierenden Stimulus (ox-LDL) an das Endothel in der Zelle oxidativen Stress durch Akkumulation von ROS mit nachfolgender Aktivierung von NF- $\kappa$ B auslösen kann (Akhmedov et al. 2014). Zusätzlich stellten Akhmedov et al. (2014) in diesem Zusammenhang eine vermehrte NF- $\kappa$ B-vermittelte Expression von Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) und E-Selektin fest (Akhmedov et al. 2014).

Weiterhin vermittelt ox-LDL durch die Aktivierung von LOX-1 eine intrazelluläre Signaltransduktion und reguliert die Expression vieler Gene in Endothelzellen. Am zytosolischen Anteil von LOX-1 gibt es in der Tat einige potenzielle Phosphorylierungsstellen, die suggerieren, dass die Phosphorylierung an diesen Stellen möglicherweise biologische Signale oder die Regulierung der Endothelfunktion vermitteln könnte (Sawamura et al. 1997).

Takanabe-Mori et al. (2010) untersuchten tierexperimentell die LOX-1-Expression im Fettgewebe und fanden eine positive Korrelation zwischen der LOX-Expression und der Expression des proinflammatorischen Zytokins Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Durch knocking out von LOX-1 in Mäusen konnte in diesem experimentellen Setting eine Suppression der proinflammatorischen Zytokine wie MCP-1, Interleukin-6 und macrophage inflammatory protein 1-alpha (MIP-1 $\alpha$ ) festgestellt werden (Takanabe-Mori et al. 2010). Bei Aktivierung von LOX-1 in humanen Endothelzellen wird die MCP-1-Expression durch Aktivierung der MAP-Kinase induziert. Zusammengefasst kann angenommen werden, dass ox-LDL hauptsächlich über LOX-1 mit Endothelzellen interagiert und diesen somit zu einem signifikanten Risikofaktor für Atherosklerose macht. LOX-1 ist zusätzlich in die Pathogenese der Endotheldysfunktion und inflammatorischen Prozessen im Endothel sowie im Gefäßsystem involviert. Bei ähnlichem histologischem Aufbau von Endothel und Endokard ist anzunehmen, dass die Pathogenese von Vorhoffthromben bei Patienten mit VHF unter anderem auch durch eine endokardiale Dysfunktion begünstigt wird. Die Effekte des LOX-1 auf das humane Vorhofmyokard wurden bisher nicht untersucht.

#### **1.4 Fragestellung**

Bisher wurden die Effekte des FXa und dessen synergistischer Effekt mit Tachyarrhythmien auf die zelluläre Signaltransduktion nicht in humanem Vorhofgewebe untersucht. Deshalb war es Ziel dieser Studie, diesen kombinierten Effekt von *ex vivo*-Elektrostimulation mit 4,0 Hz und Stimulation mit FXa zu untersuchen. In diesem experimentellen Setting sollte anschließend die Expression der PAR, die Aktivierung der MAP-Kinasen (ERK1/2) und des NF- $\kappa$ B-Signalweges untersucht werden. Weiterhin stand die Analyse der Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1, des Chemokins IL-8 sowie des prothrombotischen Moleküls PAI-1 und des LOX-1 im Mittelpunkt dieser Arbeit. Zusätzlich sollte im Rahmen dieser Arbeit analysiert werden, inwieweit der FXa-Antagonist Rivaroxaban, der PAR 1-Antagonist SCH79797 sowie der PAR 2-Antagonist GB83 unter experimentellen Bedingungen Einfluss auf diese Signaltransduktion nehmen konnten. Insgesamt wurde durch diese Studie untersucht, ob FXa ein zusätzlicher Faktor sein könnte, welcher durch die Vermittlung inflammatorischer Signalprozesse das bisher gut dokumentierte Phänomen des strukturellen kardialen Remodelings bei Patienten mit Vorhofflimmern mit beeinflusst.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Probanden und Materialgewinnung**

Die gewonnenen Gewebeproben entstammten den Vorhofohren des rechten Herzvorhofes von 54 Patienten, welche bisher keine bekannte Anamnese bezüglich jeglicher Arrhythmien aufzeigten. Alle untersuchten Gewebeproben aus den Jahren 2009 bis 2013 entstammten Patienten, die sich in der Klinik für Herz-und Thoraxchirurgie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg einer koronaren Bypassoperation und/oder eines Mitral-oder Aortenklappenersatzes bzw. -rekonstruktion unter Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine unterzogen und zuvor schriftlich ihr Einverständnis zur Studienteilnahme nach erfolgter mündlicher und schriftlicher Aufklärung am Tag vor der geplanten Operation gaben (siehe Patienteninformation in der Anlage). Beim Anschluss der Herz-Lungen-Maschine an das Kreislaufsystem der Patienten wird standardisiert ein Teil des rechten Herzohres abgetrennt; dieses Gewebe diente als Gewebeprobe für die folgenden Untersuchungen. Jegliche diagnostische und therapeutische Interventionen wurden üblicherweise 24 Stunden vor der durchgeführten Operation arretiert. Einen Überblick über die wichtigsten klinischen Patientencharakteristika sowie die Einnahme einiger im Zusammenhang mit der Studie als relevant erachteter Medikamente gibt Tabelle 3. Die Studie entspricht den Vorgaben der Deklaration von Helsinki und das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg im Vorfeld des Studienbeginns genehmigt (Nr. 93/10 vom 03.08.2010).

Eine Auflistung der für die Durchführung dieser Arbeit verwendeten Geräte, Arbeitsmaterialien und Reagenzien ist in der Anlage (Tabelle 11, Tabelle 12 und Tabelle 13) einzusehen.

**Tabelle 3:** Patientencharakteristika.

Patientencharakteristika	Gesamtanzahl n= 54
Geschlecht m/w	38/16 [70%/30%]
Patientenalter (Jahre)	69±9
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	29±4
Hypertonus	45 [83%]
Diabetes mellitus	23 [43%]
Hyperlipoproteinämie	43 [80%]
Linksventrikuläre Hypertrophie	39 [72%]
Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) (%)	51±9
stattgehabter Myokardinfarkt	27 [50%]
Koronare Herzerkrankung (Anzahl betroffener Gefäße)	2,7±0,6
NYHA-Klassifikation (Stadium)	2,3±0,6
stattgehabte/r Thromboembolie/Apoplex	7 [13%]
Nikotinabusus	31 [57%]
früherer Nikotinabusus	3 [5%]
Therapie vor Operation:	
ACE-Hemmer	26 [48%]
AT1-Antagonisten	21 [39%]
Statine	35 [65%]
Betablocker	36 [67%]
Calcium-Antagonisten	16 [30%]
Nitrate	15 [28%]
Antikoagulanzen	38 [70%]
Diuretika	25 [46%]
ASS	43 [80%]

Mittelwerte ± SD; n: Anzahl, m: männlich, w: weiblich, NYHA: New York Heart Association, ACE: Angiotensin Converting Enzyme, AT1: Angiotensin II Typ I Rezeptor Blocker, ASS: Acetylsalicylsäure.

## 2.2 Experimentaldesign

Unmittelbar im Anschluss der Abtragung der Gewebeproben wurden diese in speziellem Medium (Zusammensetzung des Transportmediums vgl. Anlage Tabelle 15) und auf Eis transportiert und unverzüglich im Labor weiterverarbeitet. Das Myokard wurde nach Abtragung des Perikards mit dem Mikrotom Integraslice 7550 MM in Pufferlösung in 350 µm-Schnitte geschnitten und auf 0,4 µm Anopore-Membranen aufgezogen. Diese Teflonmembranen wurden auf Petrischalen mit entsprechendem Medium, welches mit 100 nM Lepirudin (Refludan, Pharmion) implementiert war, verteilt (Zusammensetzung des Kulturmediums vgl. Anlage Tabelle 15) und für bis zu 24 Stunden im Inkubator kultiviert.

Das Medium wurde, je nach Versuchsaufbau, mit unterschiedlichen Konzentrationen des aktivierten humanen Faktors Xa (FXa), welcher in einer Konzentration von 50 nM (Dunn, Deutschland) genutzt wurde, sowie des oralen Faktor Xa-Inhibitors Rivaroxaban (1µM) oder Antagonisten des Protease-aktivierten Rezeptors 1 (SCH79797-Hydrochlorid, 10µM) und 2 (GB83, 10µM) eine Stunde vor der Exposition mit FXa oder der Stimulation im elektrischen Feld (s.u.) versetzt (Tabelle 4). Rivaroxaban wurde von der Firma Bayer HealthCare (Deutschland) und die

PAR-Antagonisten von Axon Medchem (Groningen, Niederlande) bereitgestellt. Zusätzlich wurden einige Proben durch speziell für diesen Versuchsaufbau angefertigte Carbon-Elektroden mit Wechselstrom zusätzlich zur Zugabe von FXa (50nM) stimuliert und die Effekte von 1  $\mu$ M Rivaroxaban, 10  $\mu$ M SCH79797 und 10  $\mu$ M GB83 untersucht (Tabelle 5). Diese simulierte Tachyarrhythmie der Gewebeschnitte wurde wie zuvor von Goette et al. (2008) und Bukowska et al. (2008) beschrieben durchgeführt (Bukowska et al. 2008; Goette et al. 2008). Für die elektrische Stimulation wurde ein biphasischer Rechteckstrom (150 V) mit Frequenzen von 0,6 Hz ( $\cong$  36 Herzschlägen/min) und 4,0 Hz ( $\cong$  240 Herzschlägen/min) eingesetzt. Die Impulsdauer betrug dabei stets 5 ms.

Alle Gewebeproben wurden anschließend im Inkubator (21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C) kultiviert. Nach zwei bzw. 24 Stunden wurden diese in flüssigem Stickstoff transportiert und bei -196°C bis zu ihrer weiteren Verwendung aufbewahrt.

Die Überlebensfähigkeit der kultivierten oder elektrisch stimulierten atrialen Gewebeschnitte wurde durch Fluoreszenzmikroskopie der vitalen Zellen bestätigt (CellTracker Green CMFDA, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) (Bussek et al. 2009). Hierbei wurden die vitalen Gewebeschnitte für 1-2 Stunden mit einer Farbstoffkonzentration von 5  $\mu$ M in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend mit dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 200m) dargestellt. Als Filter wurde hierbei ein 505 nm dichroitischer Filter benutzt. Die zelluläre Integrität der Gewebeschnitte wurde durch den Einsatz eines Laktatdehydrogenase-Assays (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) beurteilt. Die Enzymfreisetzung vom Gewebe ins Kultivierungsmedium wurde nach 24 Stunden Inkubationszeit gemessen. Um den gesamten LDH-Gehalt zu bestimmen, wurden die Gewebeschnitte gesammelt und in 1 ml Medium mit 0,5% Triton X-100 homogenisiert. Der Test wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Wirkung von FXa auf das Vorhofmyokard wurde anschließend sowohl mittels Real-time-quantitative-PCR (RT-PCR) als auch mittels Durchführung von Immunblots untersucht. Alle verwendeten Geräte und Arbeitsmaterialien sind in der Anlage aufgelistet.

**Tabelle 4:** Kultivierung der Gewebeschnitte.

	1	2	3
	CTL	FXa	Fxa + Rivaroxaban/SCH/GB83
serumfreies Medium	+	+	+
FXa 50nM	-	+	+
RIVA/SCH/GB83	-	-	+
			(30-60 min Vorinkubation)

CTL: Kontrolle, FXa: aktivierter Faktor X, RIVA: Rivaroxaban, SCH: SCH79797.

**Tabelle 5:** *Ex vivo*-Stimulation der Gewebeschnitte.

	1	2	3
	0,6 Hz	4,0 Hz + FXa	4,0 Hz + FXa + RIVA/SCH/GB83
serumfreies Medium	+	+	+
FXa 50nM	-	+	+
Rivaroxaban/SCH/GB83	-	-	+
			(30-60 min Vorinkubation)

FXa: aktivierter Faktor X, RIVA: Rivaroxaban, SCH: SCH79797.

## 2.3 Genexpression – Analysen auf RNA-Ebene

### 2.3.1 RNA-Präparation aus Gewebe

Die Ribonukleinsäure (RNA) aus den Vorhofgewebeschnitten wurde zur nachfolgenden Analyse der Genexpression mittels der Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion nach Chomczynski et al. (Chomczynski und Sacchi 1987) isoliert. Die zuvor bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrten pelletierten Gewebeschnitte wurden mit 1 ml Trizol-Reagenz und nachfolgender Zugabe von 200 ml Chloroform mithilfe eines Dispergiergerätes (Ultra Turrax) homogenisiert. Anschließend wurde die Suspension zur Phasentrennung für 15 min bei 13.000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert (Megafuge 20R). Die RNA-enhaltende transparente Phase wurde anschließend in RNase-freie Eppendorfgefäße transferiert. Zur Präzipitation der RNA wurde ein äquivalentes Volumen Isopropanol hinzugefügt. Nach einer Inkubation der Probe bei 15 min Raumtemperatur oder einer Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  wurde zu einem späteren Zeitpunkt erneut eine Zentrifugation bei 13.000 rpm bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 30 min durchgeführt und der Überstand anschließend dekantiert. Für die weitere RNA-Präparation wurde das NucleoSpin RNA II-Kit (Macherey-Nagel, Deutschland) nach Angaben des Herstellers angewandt. Zu Beginn wurde ein Lysepuffer aus 350  $\mu\text{l}$  RA1-Puffer und 3,5  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) hergestellt. 350  $\mu\text{l}$  des Lysepuffers sowie 350  $\mu\text{l}$  75%iges Ethanol wurden miteinander vermischt auf die NucleoSpin RNA II-Säule mit Filter zu dem RNA-Pellet gegeben. Nach erneuter Zentrifugation für 30 sec bei 10.000 rpm wurde die Säule in einem neuen Collection-Tube platziert und 350  $\mu\text{l}$  MDB (Membrane Desalting Buffer) hinzugefügt mit anschließender Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm. Die Beseitigung von Salzen, Metaboliten und makromolekularen zellulären Komponenten wurde durch Waschen mit zwei unterschiedlichen Puffern erreicht. Beim ersten Waschvorgang wurden 200  $\mu\text{l}$  des Puffers RA2 in die NucleoSpin RNA II -Säulen hinzugefügt und für 30 sec mit 10.000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde dann erneut in einem Collection-Tube platziert. Der zweite Waschvorgang erfolgte durch Zugabe von 600  $\mu\text{l}$  RA3 und einer Zentrifugation für 30 sec. Beim letzten Waschvorgang mit 250  $\mu\text{l}$  des RA3-Puffers und zweiminütiger Zentrifugation wurde die Membran vollständig getrocknet. Die Säule wurde anschließend in einem nukleasefreien Collection-Tube platziert. Zuletzt erfolgte

die Eluierung der RNA in RNase-freiem Wasser und eine erneute Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm. Die erhaltenen Proben wurden bis zur weiteren Verwendung sofort auf Eis gelagert oder bei -80°C eingefroren.

### **2.3.2 Quantifizierung der RNA**

Diese erfolgte durch eine photometrische Bestimmung mit dem Spektrometer (GeneQuant, Pharmacia Biotech). Die Ratio  $A_{260/280}$ , der Quotient aus der optischen Dichte OD 260 nm und OD 280 nm, gibt Information über den Reinheitsgrad der RNA-Extrakte und lag bei allen RNA-Präparationen stets zwischen 1,79 und 2,0.

### **2.3.3 Qualitätskontrolle durch RNA-Gele**

Die isolierte RNA wurde zur qualitativen Überprüfung in einem 1,2 %igen Agarosegel aufgetrennt, um die Intaktheit und RNA-Integrität zu kontrollieren. Da die Nukleinsäuren bei neutralem pH-Wert eine negative Ladung aufweisen, wandern sie im elektrischen Feld in Richtung der Anode. Das Agarosegel reduziert die elektrophoretische Mobilität der unterschiedlichen Fragmente in Abhängigkeit der Größe (bei RNA auch der Konformation). Dadurch kommt es zu einer Auftrennung von Molekülen unterschiedlicher Größe. Hierbei wurden 300ng RNA in 6x Loading Dye (Promega) aufgenommen und auf die Gele aufgetragen. Dabei fungierte Tris-Acetat Puffer (TAE) (pH 8,3) als Laufpuffer. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 5 V/cm. Im Anschluss erfolgte eine Anfärbung der Agarosegele mit Ethidiumbromid.

### **2.3.4 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)**

Zur Präparation einer komplementären full-length-cDNA aus den RNA-Templates wurde das RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit benutzt. Das Kit beruht auf einer gentechnisch veränderten Version der Reversen Transkriptase des Moloney Murine Leukemia Virus (RevertAid™ M-MuLV RT) mit niedriger RNase H-Aktivität. Der verwendete Primer ist der Random Hexamer Primer, durch den die RNA in ihrer gesamten Länge umgeschrieben werden kann. Die Synthese des ersten Stranges beginnt dabei an unspezifischen Punkten entlang der RNA-Templates. Die Reverse Transkription wurde nach folgendem Reaktionsansatz durchgeführt (Tabelle 6):

**Tabelle 6:** Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die cDNA-Synthese.

6,0 µl	5x Reaktionspuffer (500µl des Reaktionspuffers (5x)): 250mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C), 250mM KCl, 20mM MgCl <sub>2</sub> , 50mM DTT)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
3,0 µl	10mM dNTP-Mix	
1,5 µl	RiboLock™ Ribonuklease-Inhibitor (20 U/µl)	
1,5 µl	Random Hexamer Primer (0,2 µg/µl)	
1,5 µl	RevertAid™ M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)	
16,5 µl	400 ng RNA in RNase-freiem Wasser	

KCl: Kaliumchlorid, MgCl<sub>2</sub>: Magnesiumchlorid, DTT: Dithiothreitol, dNTP: Desoxyribonucleosidtriphosphat.

Die verwendeten Primer des Fermentas Kit entsprachen dem angegebenen Protokoll des Herstellers (Fermentas, Deutschland). Für alle Proben wurde je ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase zur Überprüfung auf DNA-Kontaminationen angesetzt. Die cDNA-Synthese wurde unter folgenden Bedingungen im Bio Rad iCycler durchgeführt (Tabelle 7). Die entstandene Erststrang-cDNA wurde bei -20°C gelagert und zu späterem Zeitpunkt für Amplifikationsreaktionen durch die PCR eingesetzt.

**Tabelle 7:** Bedingungen während der cDNA-Synthese.

°C	25		42					72	
sec	1	600	1	900	900	900	900	1	600
	10 min bei 25°C		60 min bei 42°C					10 min bei 72°C	

### 2.3.5 Real-time-quantitative-PCR (RT-PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur *in vitro*-Amplifikation eines definierten DNA-Fragments. Im ersten Schritt wird die zu amplifizierende DNA zunächst bei 95°C denaturiert und somit in Einzelstränge aufgespalten. Beide Einzelstränge fungieren weiterhin als Matrize und werden durch einen Gegenstrang erneut komplettiert. Bei einer Temperatur von 45 – 62°C erfolgt die Hybridisierung mit synthetischen Oligonukleotiden mit dem jeweils komplementären Strang, das Annealing der Primer. Die Elongation erfolgt bei einer Temperatur von 72°C, welche ein Temperaturoptimum für die Taq-DNA-Polymerase darstellt. Sie katalysiert die DNA-Synthese durch Verlängerung der beiden Primer mit den vier Desoxyribonucleotidtriphosphaten in Richtung auf die Zielsequenz. In jedem nachfolgenden Zyklus wird die jeweils vorliegende DNA verdoppelt, indem diese Teilschritte erneut durchlaufen werden. Die DNA-Kopien werden in dieser Weise in exponentieller Anzahl synthetisiert. Zur quantitativen Bestimmung der relativen Mengen spezifischer mRNA mittels RT-PCR wurde der iCycler (Bio-Rad) verwendet. Die Mengen der untersuchten spezifischen mRNA wurden gegen die der  $\beta$ -Actin-mRNA normalisiert. Man

benötigte für einen Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 25µl folgende Zusammensetzung (Tabelle 8):

**Tabelle 8:** Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die RT-PCR.

12,5 µl	2x SensiMixPlus SYBR & Fluorescein	Quantace, Biotek, UK
1,0 µl	cDNA	
9,0 µl	DEPC-behandeltes Wasser	Roth, Karlsruhe, D
2,5 µl	Primer (3-5µM, Tabelle 9)	

DEPC: Diethylpyrocarbonat.

**Tabelle 9:** verwendete Primer-Sequenzen für die RT quantitative PCR.

Primer	Größe = PCR-Produkt (bp)	Sequenzen
β-Actin	648	US: AAGATGACCCAGATCATGTTTGAG DS: AGGAGGAGCAATGATCTTGATCTT
ICAM-1	437	US: AGTCAGTGTGACCGCAGAGG DS: CCTGGCACATTGGAGTCTGC
LOX-1	458	US: ACAGATCTCAGCCCGCAACAAGCA DS: GGGAGACAGCGCCTCGACTCTAAAT
PAI-1	460	US: TCTCAGGAAGTCCAGCCACT DS: ACCCTCTGGCTGGTAGGTTT
PAR 1	196	US: AAGTCAGGAGAGAGAGGGTGAAGC DS: GATCTAAGGTGGCATTGTTGC
PAR 2	168	US: CACCATCCAAGGAACCAATAG DS: AATTGGAAGGAAGACAGTGGTC

ICAM-1: Intercellular adhesion molecule-1, LOX-1: Endothelial lectin-like oxidized low-density lipoprotein Rezeptor-1, PAI-1: Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1, PAR: Protease-aktivierter Rezeptor.

Eine Negativ-Kontrolle mit DEPC-behandeltem Wasser ohne cDNA wurde für jeden verwendeten Primer zum Ausschluss von Primerdimeren stets mitgeführt. Die Messung erfolgte in Doppelbestimmungen. Zur anschließenden Detektion fand der asymmetrische Cyanin-Farbstoff Sybr Green I Verwendung. Dieser interkaliert mit doppelsträngiger DNA, welche während der Annealing- und Elongationsphase vorliegt, und kann zur Fluoreszenz angeregt werden und somit anschließend grünes Licht emittieren. Ausgehend von einer Basalfluoreszenz (aufgrund doppelsträngiger Template-DNA) kann eine mit jedem Zyklus zunehmende Fluoreszenz detektiert werden, welche sich proportional zur Menge an DNA (Zuwachs an PCR-Produkt) verhält. Innerhalb des Amplifikationsprogrammes wurden folgende Zyklen durchlaufen (Tabelle 10):

**Tabelle 10:** Zyklen innerhalb des Amplifikationsprogrammes.

1x	10 min	95°C	initiale Denaturierung
40x	10 sec	95°C	Denaturierung
	30 sec	58 – 62°C	primerabhängiges Annealing
	30 sec	72°C	Elongation
1x	2 min	72°C	finale Elongation
1x		von 72°C auf 95°C	Schmelzkurvenanalyse (Fluoreszenzmessung)
1x		4°C	

Die Expressionsanalysen wurden mithilfe der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode durchgeführt. Die spezifischen Amplifikationen der PCR-Produkte wurden durch Schmelzkurvenanalysen, indem die durch die Denaturierung der doppelsträngigen DNA entstandene Abnahme der Fluoreszenzintensität mit steigender Temperatur, d.h. von 72°C auf 95°C, gemessen wurde, sowie Agarosegelelektrophoresen bestätigt. Bei der Analyse der Schmelzkurven kann eine Aussage über die Reinheit des Produktes getroffen werden, da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt aufweist als unspezifisch entstandene Primerdimere.

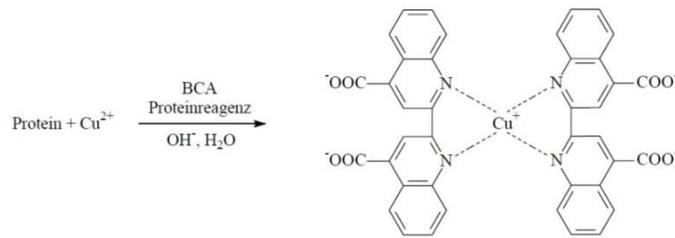
## 2.4 Analysen auf Proteinebene

### 2.4.1 Herstellung von Proteinlysaten

Die Gewebeproben wurden mittels Mörser, Pistill und flüssigem Stickstoff zu festem Pulver verarbeitet und dieses für den chemischen Aufschluss in einem Lysepuffer (modifizierter RIPA-Puffer, Tabelle 14) aufgenommen. Nach 30-minütiger Inkubationszeit bei 4°C und anschließender Zentrifugation für 30 min bei 13.000 rpm und 4°C wurde der entstandene Überstand in sterile Eppendorfgefäße pipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

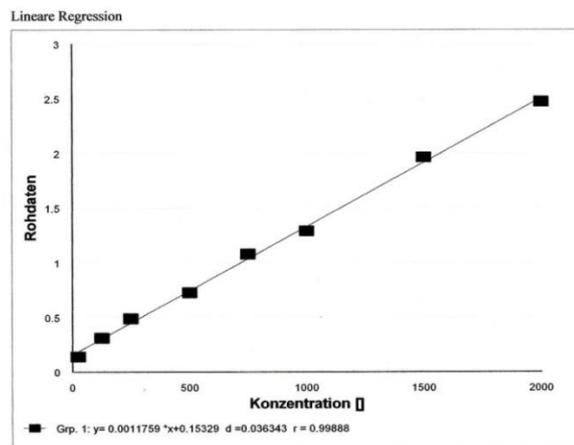
### 2.4.2 Gesamtproteinbestimmung mittels BCA-Reaktion

Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte mittels BCA-Methode nach Smith et al. (Smith et al. 1985). Dabei werden Kupfer-Ionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ) durch Proteine zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert. Diese Ionen bilden mit der Bicinchoninsäure (BCA) unter alkalischen Bedingungen einen violetten Farbkomplex, welcher durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen werden kann (Abbildung 2). Die Absorption bei dieser Wellenlänge ist in einem bestimmten Konzentrationsbereich direkt proportional der Proteinkonzentration.



**Abbildung 2:** BCA-Reaktionsschema.

Zur Proteinbestimmung wurden jeweils 25  $\mu\text{l}$  der 5fach-verdünnten Proben in Doppelbestimmung und jeweils 25  $\mu\text{l}$  der Protein-Standardverdünnungen (25-2000  $\mu\text{g/ml}$ ) auf eine Testplatte aufgetragen. Dieser Ansatz wurde mit 200  $\mu\text{l/Well}$  des Nachweisreagenzes, bestehend aus 50 Teilen BCA™ Protein Assay Reagenz A und einem Teil BCA™ Protein Assay Reagenz B versetzt (enthalten Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ), BCA-Detektions-Reagenz, Natrium-Tartrat in 0,1M Natriumhydroxid ( $\text{NaOH}$ )) und die Testplatte für 30 min bei 37°C im Trockenschrank (Heraeus) inkubiert. Anschließend erfolgte die photometrische Messung der Absorption des Reaktionsansatzes bei einer Wellenlänge von 562 nm (Sunrise TECAN) und die Gesamtproteinbestimmung anhand der Eichkurve (Abbildung 3). Diese Quantifizierung konnte nachfolgend zur Berechnung der Beladung für die anschließende SDS-Gelelektrophorese genutzt werden.



**Abbildung 3:** Eichkurve der photometrischen Bestimmung.

### 2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine wurden zuvor mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt, wobei die hydrophoben Anteile der Proteine von diesem gebunden und über seine anionische Kopfgruppe eine hohe negative Gesamtladung in den SDS-Proteinkomplex gebracht sowie die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur zerstört wird. Dadurch wandern die Proteine durch das Polyacrylamidgel in Richtung der positiven Elektrode und werden nach ihrer Molekülmasse

aufgetrennt. Als Trägermaterial dient bei der hier durchgeführten diskontinuierlichen Elektrophorese ein hochvernetztes Polyacrylamidgel (zur Herstellung der Gele vgl. Tabelle 18), welches durch Polymerisierung von Monomeren hergestellt wird. Dabei kann die Porengröße durch Variation des Vernetzungsgrades so eingestellt werden, dass sich eine optimale Auftrennung der Proteine ergibt. Während das Sammelgel 4%ig war, wurde die Prozentigkeit des Trenngels entsprechend der zu messenden Proteine gewählt.

Zunächst wurden die Proteine mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und im Thermomixer (Eppendorf Thermomixer 5436) bei 95°C inkubiert. Nach 5 min wurden die Proben auf Eis abgekühlt und anschließend nochmals bei 5.000 rpm für 2 min zentrifugiert (Uniequip UEC2). Im Anschluss konnte die Elektrophoreseeinheit mit Elektrophoresepuffer gefüllt sowie das Gel mit den denaturierten Proteinen (20 µg Protein/Tasche) beladen werden. In der ersten Puffertasche wurde als Größenstandard stets der Molekulargewichtsmarker (Fermentas) aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im Sammelgel bei 100 V und anschließend im Trenngel bei 180-200 V, bis die Farbstofffront das Gelende erreichte. Die verwendeten Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese sind in Tabelle 19 aufgelistet.

#### **2.4.4 Western Blot – Transfer der Proteine**

Im Anschluss wurden die aufgetrennten Proteine vom Polyacrylamidgel mithilfe des Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell Systems (Bio-Rad) auf die Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Zur Äquilibration wurde die Membran zunächst in Methanol und im aufgelisteten Transferpuffer (Tabelle 20 in der Anlage) geschwenkt. Der Proteintransfer erfolgte bei 100 V für ca. 90 min. Während der anschließenden Blockierung wurden die PVDF-Membranen für eine Stunde in 1xTBS + 5% (w/v) Milchpulver bei Raumtemperatur inkubiert; um freie unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nachfolgend wurden die Membranen in 1xTBS mit 1% Tween 20 (=TBST) 3x für jeweils 10 min gewaschen, um überschüssige Blockierungslösung zu entfernen.

Zur Visualisierung der Proteine diente die indirekte Immundetektion, bei der das Antigen-Antikörper-Bindungs-Prinzip genutzt wird. Die Inkubation mit dem Primärantikörper zur Markierung des Zielproteins erfolgte bei 4°C über Nacht. Die jeweiligen Konzentrationen der verwendeten Antikörper können Tabelle 16 in der Anlage entnommen werden. Hierbei kamen primäre Antikörper gegen Phospho-44/42 ERK, 44/42 ERK, LOX-1, PAI-1, Phospho-NFκBp65, ICAM-1, PAR 1, PAR 2 und β-Actin zum Einsatz. Am folgenden Tag wurden die Membranen erneut 3x für jeweils 10 min in 1xTBS mit 1% Tween 20 gewaschen. Die Detektion erfolgte mithilfe eines sekundären Antikörpers, an den das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt wurde. Die verwendeten sekundären Antikörper waren: HRP-konjugiertes Anti-mouse IgG, HRP-konjugiertes Anti-rabbit IgG (Cell Signaling) sowie Goat-anti-rabbit IgG (Dianova) (Tabelle 17 in der Anlage). Die

Inkubation erfolgte für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Membranen zur Entfernung des überflüssigen Antikörpers und somit zur Verminderung störender Hintergrundsignale erneut 4x15 min in 1xTBS/1%Tween 20 und nachfolgend 1x15min in 1xTBS gewaschen. Der anschließende Proteinnachweis erfolgte in der Dunkelkammer mithilfe eines Chemilumineszenzverfahrens. Als Substratlösung für die Blots diente dabei die SuperSignal West Pico Luminol Enhancer Solution in Verbindung mit der SuperSignal West Pico Stable Peroxide Solution (Pierce). Die Inkubation der Blots erfolgte für 1 min bei Raumtemperatur in einem 1:1-Gemisch der Chemilumineszenz-Lösungen; alternativ kann auch die stärker reagierende SuperSignal West Dura Luminol/Enhancer Solution in Verbindung mit dem SuperSignal West Dura Stable Peroxide Buffer zur Detektion verwendet werden. Die Blots wurden anschließend in die Filmkassette übertragen und das emittierte Licht auf Röntgenfilmen (X-Ray Film Curix, Agfa) in der Dunkelkammer mithilfe des Entwicklers (Curix 60™ processor, Agfa) sichtbar gemacht. Dabei war die Expositionszeit der Filme unter anderem von dem jeweiligen Antikörper abhängig.

Um die Membranen zu einem späteren Zeitpunkt erneut mit unterschiedlichen Antikörpern inkubieren zu können, wurden die Blots in 1xTBS gewaschen, für 20-30 min bei 37°C in 10 ml Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific/Pierce) inkubiert und nachfolgend erneut 2x5 min in 1xTBS gewaschen. Im Anschluss wurde eine erneute Blockierung mit Roti-Block (Roth) für eine Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt, um die Membranen erneut mit einem Primärantikörper inkubieren zu können (Strippen des Blots).

Die entwickelten Filme wurden im Anschluss digitalisiert und die quantitative Auswertung der Banden erfolgte densitometrisch unter Nutzung der Software AlphaEaseFC (Alphamager System, Alpha Innotech, CA, USA). Die Normierung der OD-Werte erfolgte zu  $\beta$ -Actin. Dieses gehört zu den Haushaltsgenen und stellt somit ein nicht-reguliertes, konstitutiv exprimiertes Gen dar.

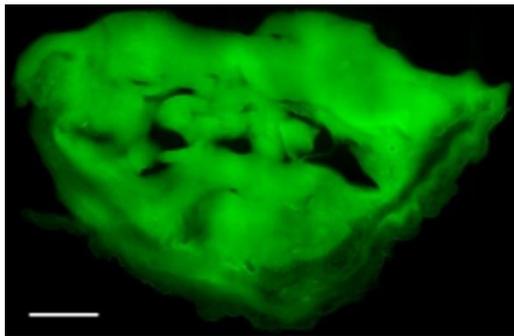
## **2.5 Statistische Analyse**

Alle Werte sind, soweit nicht anders vermerkt, durch den Mittelwert  $\pm$  SEM (Standardfehler des Mittelwertes) ausgedrückt. Die statistischen Analysen wurden mithilfe des Origin 8,5 (OriginLab Corporation, USA) durchgeführt. Ein p-Wert von  $< 0,05$  gilt bei der durchgeführten Varianzanalyse (ANOVA) als statistisch signifikant, ein p-Wert  $< 0,01$  als hochsignifikant.

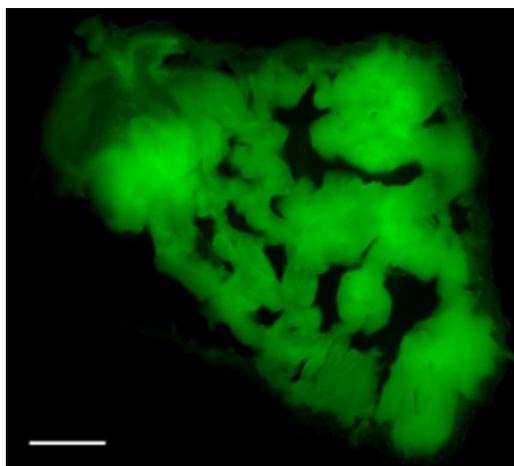
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Zellviabilität der humanen atrialen Gewebeschnitte

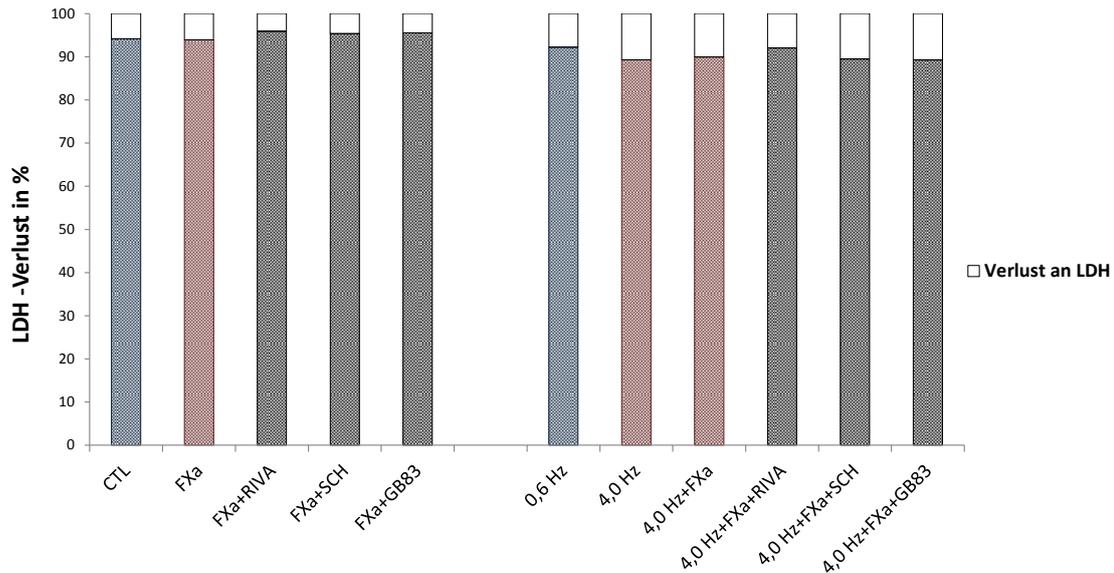
Um den Einfluss des aktivierten Gerinnungsfaktors X (FXa) auf das humane Vorhofgewebe untersuchen zu können, wurden Gewebeschnitte des rechten Herzvorhofes präpariert und bis zu 24 Stunden nach oben genanntem Experimentaldesign (vgl. Abschnitt 2.2) kultiviert. Die Viabilität der kultivierten bzw. im elektrischen Feld stimulierten humanen Gewebeschnitte kann der Abbildung 4 - Abbildung 6 entnommen werden. Die Abbildung 5 und Abbildung 6 zeigen hochauflösende Bilder humaner Gewebeschnitte des rechten Herzvorhofes mit einer Dicke von 350  $\mu\text{m}$ . Diese wurden mit CellTracker green nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden (Abbildung 4) sowie nach 24-stündiger Stimulation im elektrischen Feld (Abbildung 5) markiert. Des Weiteren wurde die zelluläre Integrität der Vorhofschnitte durch Messungen der Laktatdehydrogenase (LDH) unter verschiedenen Bedingungen überprüft. Der Verlust an LDH während der Kultivierung oder der elektrischen Stimulation wurde als Prozentsatz der vorkommenden Gesamt-LDH bestimmt. Dies kann der Abbildung 6 entnommen werden.



**Abbildung 4:** Fluoreszenzmikroskopie eines atrialen Gewebeschnittes nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden zur Überprüfung der Zellviabilität. Maßstabsbalken: 1000  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 5:** Fluoreszenzmikroskopie eines atrialen Gewebeschnittes nach einer 24-stündigen Elektrostimulation zur Überprüfung der Zellviabilität. Maßstabsbalken: 1000  $\mu\text{m}$ .



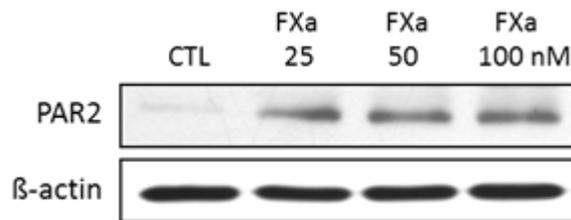
**Abbildung 6:** Darstellung des LDH-Verlustes zur Überprüfung der Integrität der atrialen Gewebeschnitte nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden bzw. nach 24-stündiger Elektrostimulation. Der Verlust an LDH während der Kultivierung oder der elektrischen Stimulation wurde als Prozentsatz der vorkommenden Gesamt-LDH bestimmt. LDH: Lactatdehydrogenase, CTL: Kontrolle, FXa: aktivierter Faktor X, RIVA: Rivaroxaban, SCH: SCH79797.

### 3.2 Expression der Protease-aktivierten Rezeptoren als Reaktion auf FXa und simulierter Tachyarrhythmie in humanem Vorhofgewebe

Gerinnungsfaktoren vermitteln ihre Wirkung durch Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR). Um untersuchen zu können, welche der Isoformen zu der FXa-abhängigen Antwort im Vorhofgewebe beiträgt, wurden die Gewebeschnitte des Vorhofs der Stimulation mit FXa ausgesetzt und die Veränderungen in der Expression des Protease-aktivierten Rezeptors 1 (PAR 1) (Abbildung 11) und des Protease-aktivierten Rezeptors 2 (PAR 2) (Abbildung 12) auf dem Transkriptionslevel mithilfe der zuvor beschriebenen RT-PCR analysiert. Dabei wurden die humanen Gewebeschnitte des Vorhofs dem Faktor Xa in einer Konzentration von 50 nM über 24 Stunden ausgesetzt. Diese Experimente erfolgten ohne (n=9) oder mit Zugabe von 1 µM Rivaroxaban (n=6 vs. FXa) oder 10 µM SCH79797 (n=3 vs. FXa) oder 10 µM GB83 (n=3 vs. FXa). Um sich den Bedingungen des Vorhofflimmerns anzunähern, wurden die Gewebeschnitte bei 4,0 Hz und unter Zugabe von FXa in einer Konzentration von 50 nM (n=7 vs. 0,6 Hz) und mit FXa und 1 µM Rivaroxaban (n=4 vs. 4,0 Hz + FXa) oder FXa und 10 µM SCH79797 (n=3 vs. 4,0 Hz + FXa) oder FXa und 10 µM GB83 (n=3 vs. 4,0 Hz + FXa) für 24 Stunden elektrisch stimuliert. Zusätzlich wurden weiterführende Experimente zur Analysierung der Effekte durch alleinige Elektrostimulation (n=5 vs. 0,6 Hz) durchgeführt. Die

entstandenen Werte sind durch den Mittelwert  $\pm$  SEM ausgedrückt und mit Kontrollen ohne Elektrostimulation (CTL) beziehungsweise mit 0,6 Hz-elektrostimulierten Kontrollen verglichen.

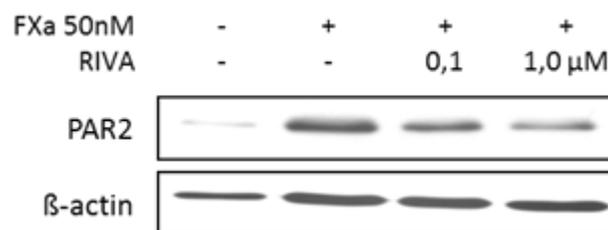
Die PAR 2-Expression auf Proteinebene wurde mithilfe von Western Blots analysiert. Dabei war festzustellen, dass FXa den PAR 2-Proteingehalt erhöhte (Abbildung 7, obere Leiste). Der Immunblot ist für zwei eigenständige Experimente repräsentativ.



**Abbildung 7:** Effekte von FXa auf die Proteinexpression des PAR 2. Repräsentative Darstellung eines Western Blots. Zur versuchsinternen Kontrolle wurde anti-β-Actin eingesetzt. PAR: Protease-aktivierter Rezeptor, CTL: Kontrolle, FXa: aktivierter Faktor X.

Um die Effekte von Rivaroxaban festzustellen, wurden die atrialen Gewebeschnitte mit 0,1  $\mu$ M (n=4) und 1  $\mu$ M (n=4) Rivaroxaban eine Stunde vor der Zugabe des FXa in einer Konzentration von 50 nM für zwei weitere Stunden vorinkubiert. Der orale FXa-Inhibitor Rivaroxaban konnte bei der Versuchsreihe die PAR 2-Proteinexpression konzentrationsabhängig inhibieren (Abbildung 8).

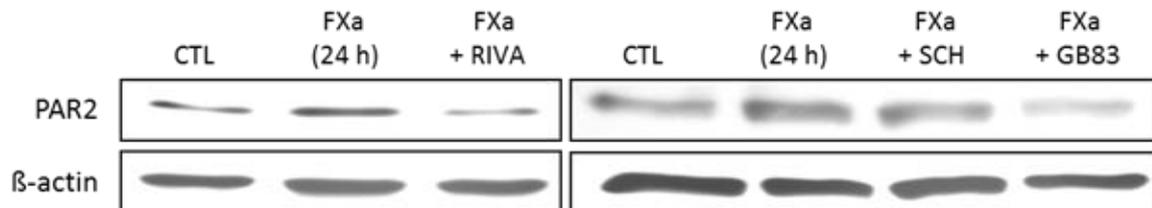
Eine Rivaroxabankonzentration von 0,1  $\mu$ M zeigte keinen Effekt bei der Quantifizierung des PAR-Expressionslevels während der durchgeführten real-time PCR. Rivaroxaban in der Konzentration 1  $\mu$ M hingegen zeigte eine Tendenz zur Verringerung der PAR-Expression auf Transkriptionsebene (nicht abgebildet).



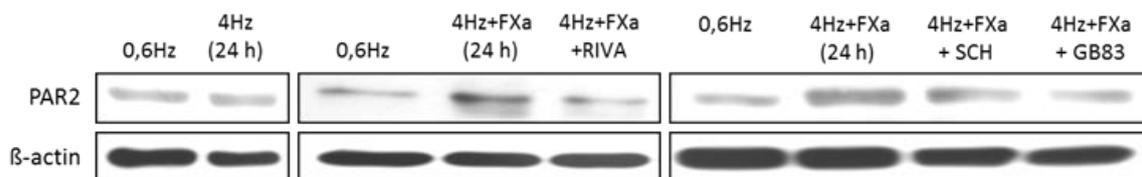
**Abbildung 8:** Effekte von Rivaroxaban auf die Proteinexpression des PAR 2. Repräsentative Darstellung eines Western Blots. Zur versuchsinternen Kontrolle wurde anti-β-Actin eingesetzt. PAR: Protease-aktivierter Rezeptor, FXa: aktivierter Faktor X, RIVA: Rivaroxaban.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Vorhofgewebeschnitte mit 50 nM FXa ohne oder mit zusätzlichem Rivaroxaban in der Konzentration von 1  $\mu$ M oder 10  $\mu$ M SCH79797 oder 10  $\mu$ M GB83 inkubiert. Die folgende Abbildung 9 zeigt den Anstieg des PAR 2-Proteins als Reaktion auf die

Zugabe des FXa. Weiterhin wurden die atrialen Gewebeschnitte während einer zeitgleichen Inkubation mit 50 nM FXa bei 4,0 Hz elektrostimuliert. Weitere Experimente erfolgten mit 50 nM FXa und 1  $\mu$ M Rivaroxaban oder 10  $\mu$ M SCH79797 oder 10  $\mu$ M GB83 über 24 Stunden (Abbildung 10). Die abgebildeten Immunblots sind für drei eigenständige Experimente repräsentativ.



**Abbildung 9:** Proteinexpression des PAR 2 unter Stimulation des atrialen Gewebes mit FXa sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83. Repräsentative Darstellung eines Western Blots. Zur versuchsinternen Kontrolle wurde anti-β-Actin eingesetzt. PAR: Protease-aktivierter Rezeptor, CTL: Kontrolle, FXa: aktivierter Faktor X, RIVA: Rivaroxaban, SCH: SCH79797.

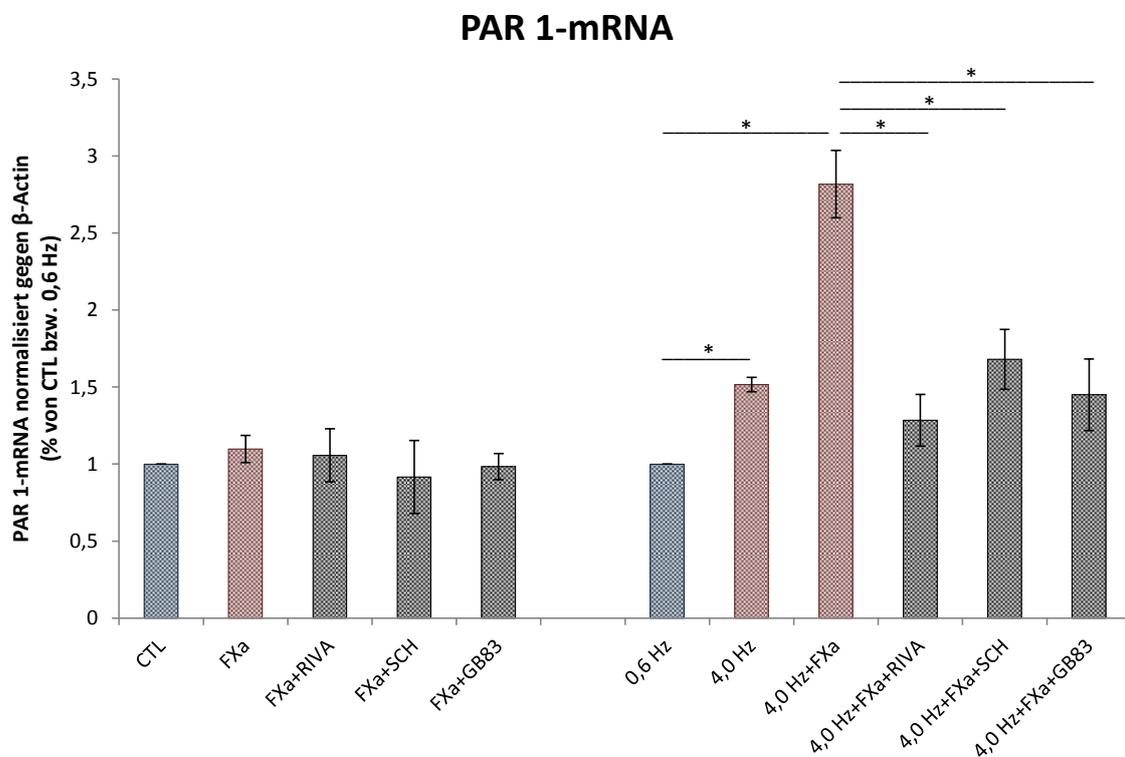


**Abbildung 10:** Proteinexpression des PAR 2 unter Stimulation des Gewebes mit FXa und simulierter Tachyarrhythmie sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83. Repräsentative Darstellung eines Western Blots. Zur versuchsinternen Kontrolle wurde anti-β-Actin eingesetzt. PAR: Protease-aktivierter Rezeptor, FXa: aktivierter Faktor X, RIVA: Rivaroxaban, SCH: SCH79797.

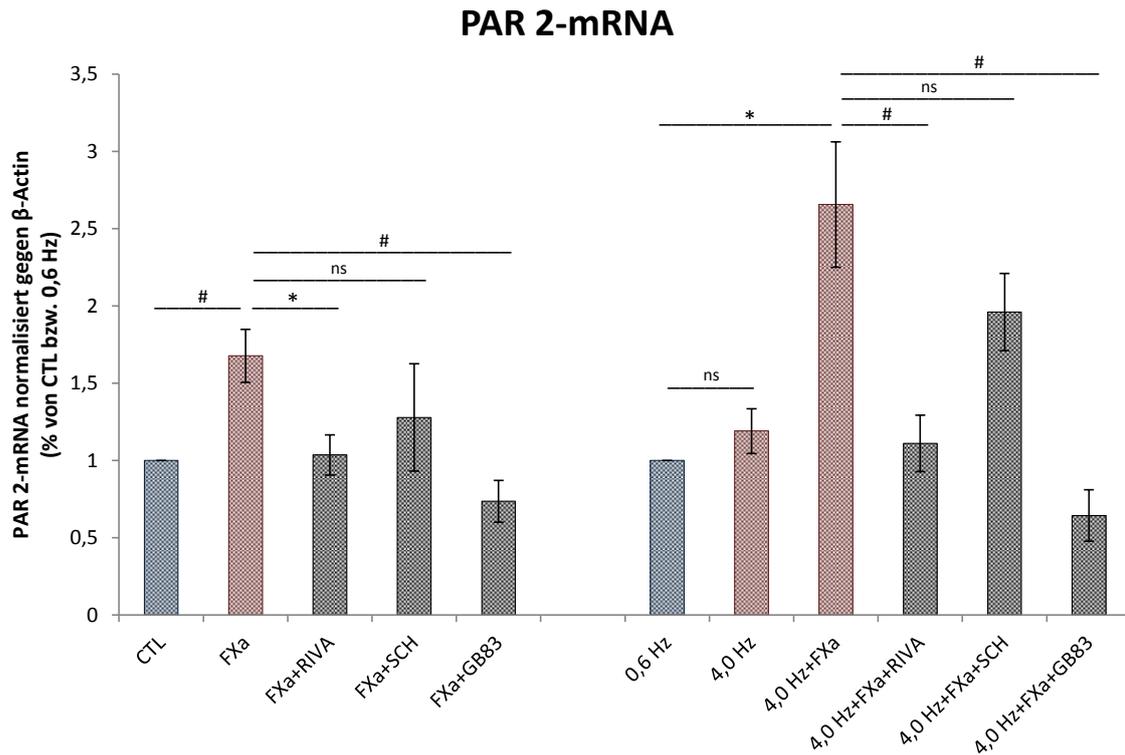
Die Ergebnisse der Western Blots bestätigen die durch die RT-PCR erhaltenen Aussagen. Wie in Abbildung 9, Abbildung 10 und Abbildung 12 veranschaulicht wird, erhöht FXa die Expression des Rezeptors PAR 2 auf Transkriptions- und Proteinebene signifikant. Darüber hinaus agieren FXa sowie die simulierte Tachyarrhythmie synergistisch bezüglich der gesteigerten Expression des PAR 2. Der orale FXa-Inhibitor Rivaroxaban erlangte bzgl. der Prävention des FXa-abhängigen Anstiegs der PAR 2-Expression sehr ähnliche Effekte wie der PAR 2-Antagonist GB83 (FXa+Riva:  $1,04 \pm 0,13$  vs.  $1,68 \pm 0,17$ ,  $p=0,006$ ; FXa+GB83:  $0,74 \pm 0,14$  vs.  $1,68 \pm 0,17$ ,  $p=0,036$ ; 4,0Hz+FXa+Riva:  $1,11 \pm 0,18$  vs.  $2,66 \pm 0,41$ ,  $p=0,014$ ; 4,0Hz+FXa+GB83:  $0,64 \pm 0,17$  vs.  $2,66 \pm 0,41$ ,  $p=0,015$ ) (Abbildung 12).

Die kombinierte elektrische Stimulation mit Zusatz des aktivierten Gerinnungsfaktors X steigerte die PAR 1-Expression wesentlich stärker als die schnelle Elektrostimulation allein (4,0Hz+FXa:  $2,82 \pm 0,22$  vs. 0,6Hz,  $p=0,0001$ ; 4,0Hz:  $1,52 \pm 0,05$  vs. 0,6Hz,  $p=0,0001$ ) (Abbildung 11).

Interessanterweise wirkten beide Antagonisten bezogen auf die Induktion der PAR 1-Expression, welche durch die Elektrostimulation angeregt wurde, signifikant entgegengesetzt (Riva:  $1,29 \pm 0,17$  vs.  $2,82 \pm 0,22$ ,  $p=0,0001$ ; GB83:  $1,45 \pm 0,23$  vs.  $2,82 \pm 0,22$ ,  $p=0,002$ ). Im Gegensatz dazu zeigte der PAR 1-Antagonist SCH79797 eine große Spezifität gegenüber PAR 1 und beeinflusste die Expression des PAR 2 nur in geringerem Maße (PAR 1-mRNA:  $1,68 \pm 0,19$  vs.  $2,82 \pm 0,22$ ,  $p=0,0095$ ; PAR 2-mRNA:  $1,96 \pm 0,25$  vs.  $2,66 \pm 0,41$ ,  $p=ns$ ).



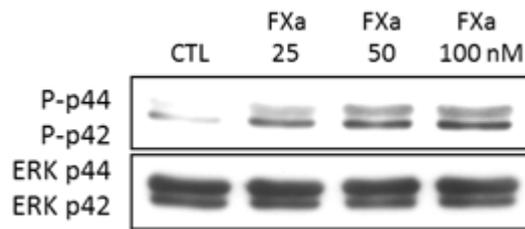
**Abbildung 11:** Expression der PAR 1-mRNA als Reaktion auf die Stimulation des Gewebes mit FXa und simulierter Tachyarrhythmie sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83. PAR: Protease-aktivierter Rezeptor, CTL: Kontrolle, FXa: aktivierter Faktor X, RIVA: Rivaroxaban, SCH: SCH79797. \* $p<0,01$ .



**Abbildung 12:** Expression der PAR 2-mRNA als Reaktion auf die Stimulation des Gewebes mit FXa und simulierter Tachyarrhythmie sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83. PAR: Protease-aktivierter Rezeptor, CTL: Kontrolle, FXa: aktivierter Faktor X, RIVA: Rivaroxaban, SCH: SCH79797. \* $p < 0,01$ , # $p < 0,05$ , ns=nicht signifikant.

### 3.3 Aktivierung von ERK in Vorhofgewebe

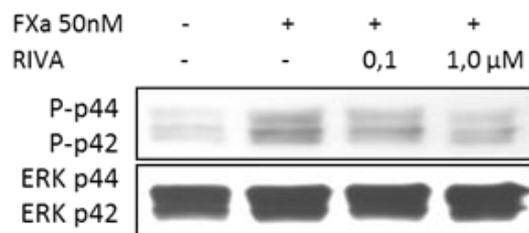
Forschungen über die durch Gerinnungsfaktoren vermittelten Signalprozesse in Endothelzellen haben gezeigt, dass Thrombin und FXa die Fähigkeit besitzen, MAP-Kinasen zu aktivieren, welche unter anderem für Zellwachstum, -proliferation und -differenzierung verantwortlich sind. Um dies auch im Vorhofgewebe bestätigen zu können, wurde der Phosphorylierungszustand von ERK-Kinasen, welcher durch unterschiedliche Konzentrationen von FXa hervorgerufen wird, untersucht (Abbildung 13). Dieser wurde mithilfe von Western Blots analysiert. Aus Abbildung 13 wird ersichtlich, dass ERK durch FXa konzentrationsabhängig aktiviert wurde. Hierbei wurden humane atriale Gewebeschnitte mit unterschiedlichen FXa-Konzentrationen (25 nM, 50 nM sowie 100 nM) über 2h kultiviert. Der abgebildete Immunblot ist repräsentativ für zwei eigenständige Experimente.



**Abbildung 13:** Effekte von FXa auf die Proteinexpression von Phospho-ERK. Repräsentative Darstellung eines Western Blots. Zur versuchsinternen Kontrolle wurden ERK1/2-Antikörper eingesetzt. P-p44/42: Phospho-ERK 1/2, CTL: Kontrolle, FXa: aktivierter Faktor X.

Um das Signal in der Gegenwart des zugegebenen Hirudins (in einer Konzentration von 100 nM) zu maximieren, wurde für die Experimente eine FXa-Konzentration von 50 nM genutzt. Hirudin bindet an die Fibrinogenbindestelle von Thrombin und blockiert somit dessen Wirkung.

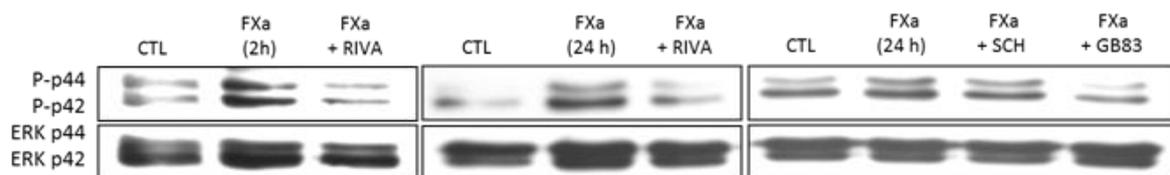
Die folgenden Immunblots (Abbildung 14, Abbildung 15 und Abbildung 16) zeigen die Inhibition der FXa-abhängigen ERK-Aktivierung durch Rivaroxaban. Die Gewebe wurden mit 0,1  $\mu$ M und 1,0  $\mu$ M Rivaroxaban für eine Stunde vorinkubiert, anschließend erfolgte die Exposition mit 50 nM FXa für zusätzliche zwei Stunden. Der Immunblot ist repräsentativ für drei eigenständige Experimente. Wie in Abbildung 14 dargestellt ist, war eine Konzentration von 1  $\mu$ M Rivaroxaban notwendig, um die FXa-induzierte Aktivierung der ERK-Kinasen unter experimentellen Bedingungen zu verringern.



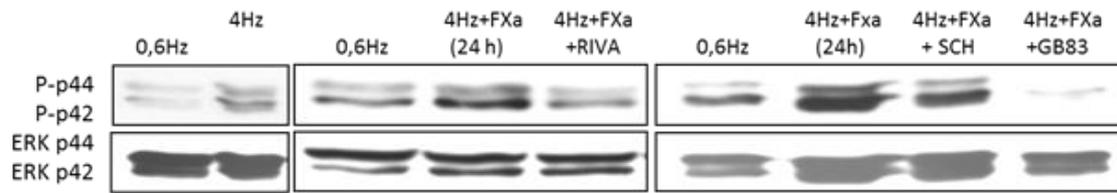
**Abbildung 14:** Effekte von Rivaroxaban auf die Proteinexpression von Phospho-ERK. Repräsentative Darstellung eines Western Blots. Zur versuchsinternen Kontrolle wurden ERK1/2-Antikörper eingesetzt. P-p44/42: Phospho-ERK 1/2, CTL: Kontrolle, FXa: aktivierter Faktor X, RIVA: Rivaroxaban.

Abbildung 15 stellt die Aktivierung der ERK-Kinasen dar, hierbei wurde der Phosphorylierungszustand nach einer zwei- bzw. 24-stündigen Stimulation mit FXa analysiert. Bei diesem Versuchsaufbau wurden die Gewebeschnitte des Vorhofs für zwei Stunden der Anwesenheit von 50 nM FXa ohne oder mit 1  $\mu$ M Rivaroxaban ( $n=6$  vs. FXa) bzw. 24 Stunden der Anwesenheit von FXa in einer Konzentration von 50 nM, ohne ( $n=10$ ) oder mit Zusatz von 1  $\mu$ M Rivaroxaban ( $n=7$  vs. FXa) oder 10  $\mu$ M SCH ( $n=3$  vs. FXa) oder GB83 ( $n=3$  vs. FXa) ausgesetzt. Abbildung 15 stellt den anhaltenden Charakter der FXa-abhängigen Aktivierung der ERK-Kinasen

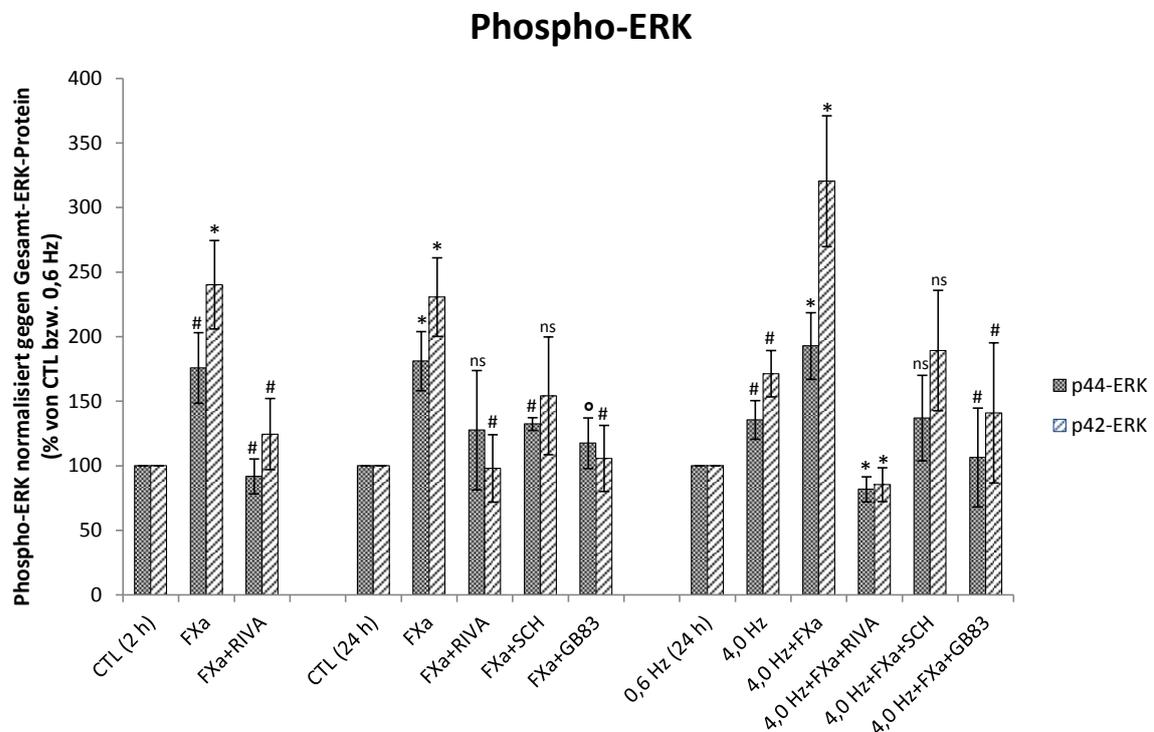
dar. Diese Effekte konnten durch den FXa-Inhibitor Rivaroxaban effektiv vermindert werden, selbst nach 24-stündiger Exposition mit FXa. Um sich experimentell den Bedingungen des Vorhofflimmerns annähern zu können, erfolgte eine schnelle Elektrostimulation der atrialen Gewebeschnitte mit einer Frequenz von 4,0 Hz und Zugabe von FXa. Abbildung 16 veranschaulicht die Aktivierung der ERK-Kinasen als Reaktion auf die Stimulation des Gewebes mit FXa und der Elektrostimulation. Bei diesem Versuchsaufbau wurden die atrialen Gewebeschnitte sowohl mit 4,0 Hz und 50 nM FXa (n= 10 vs. 0,6 Hz) als auch zusätzlich zur simulierten Tachyarrhythmie mit FXa und 1 µM Rivaroxaban (n= 5 vs. 4,0 Hz + FXa) oder 10 µM SCH79797 (n=5 vs. 4,0 Hz + FXa) oder 10µM GB83 (n=5 vs. 4,0 Hz + FXa) für 24 Stunden stimuliert. Darüber hinaus wurden einige Experimente durchgeführt, um die Effekte einer alleinigen Elektrostimulation festzustellen (n=4 vs. 0,6 Hz). Rivaroxaban und der PAR 2-Antagonist GB83 zeigten hierbei ähnliche inhibitorische Effekte auf die Aktivierung der ERK-Kinasen im experimentellen Setting unter verschiedenen Bedingungen (Abbildung 15, Abbildung 16). Der PAR 1-Antagonist SCH79797 verursachte eine signifikante Verminderung der durch FXa ausgelösten Aktivierung des p44-ERK (ERK 1) ( $132,30 \pm 5,04$  vs.  $181,00 \pm 22,84$ ,  $p=0,027$ ) unter nicht-elektrostimulierten Bedingungen, jedoch nicht bei p42-ERK ( $154,10 \pm 45,63$  vs.  $230,63 \pm 30,48$ ,  $p=ns$ ). Die Werte sind durch den Mittelwert  $\pm$  SEM ausgedrückt und mit Kontrollen ohne Elektrostimulation (CTL) beziehungsweise mit 0,6 Hz-elektrostimulierten Kontrollen verglichen. Abbildung 17 zeigt die Quantifizierung der Proteingehalte durch densitometrische Analysen der Western Blots.



**Abbildung 15:** Proteinexpression von Phospho-ERK unter Stimulation des atrialen Gewebes mit FXa sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83. Repräsentative Darstellung eines Western Blots. Zur versuchsinternen Kontrolle wurden ERK1/2-Antikörper eingesetzt. P-p44/42: Phospho-ERK 1/2, CTL: Kontrolle, FXa: aktivierter Faktor X, RIVA: Rivaroxaban, SCH: SCH79797.



**Abbildung 16:** Proteinexpression von Phospho-ERK unter Stimulation des Gewebes mit FXa und simulierter Tachyarrhythmie sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83. Repräsentative Darstellung eines Western Blots. Zur versuchsinternen Kontrolle wurden ERK1/2-Antikörper eingesetzt. P-p44/42: Phospho-ERK 1/2, FXa: aktivierter Faktor X, RIVA: Rivaroxaban, SCH: SCH79797.



**Abbildung 17:** Aktivierung der ERK-Kinasen als Reaktion auf die Stimulation des Gewebes mit FXa und schneller Vorhofstimulation sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83. Quantifizierung des phospho-ERK-Gesamtproteingehaltes durch densitometrische Analysen der Western Blots. P-p44/42: Phospho-ERK 1/2, CTL: Kontrolle, FXa: aktivierter Faktor X, RIVA: Rivaroxaban, SCH: SCH79797. \* $p < 0,01$ , # $p < 0,05$ , ° $p = 0,07$ , ns=nicht signifikant.

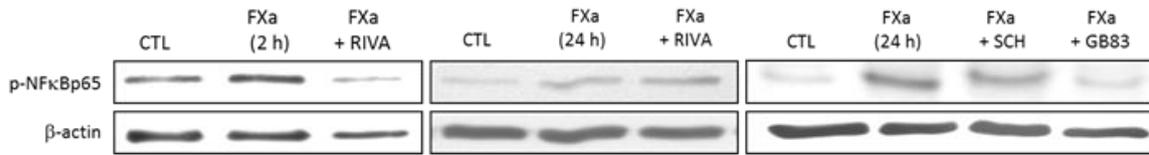
### 3.4 Aktivierung NF- $\kappa$ B-vermittelter Signalprozesse im Vorhofgewebe

Wie in 1.3.1 bereits beschrieben, spielen NF- $\kappa$ B-vermittelte Signalwege eine bedeutende Rolle bei der Vermittlung von inflammatorischen, oxidativen Prozessen an unterschiedliche Effektoren. Unter nicht stimulierten Bedingungen verbleibt der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B in einem Komplex

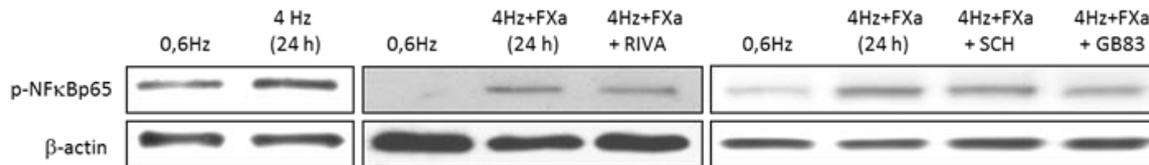
mit einem Inhibitormolekül, welcher lokalisierte Kernsequenzen verdeckt. Verschiedene inflammatorische und oxidative Effektoren verursachen eine Aktivierung von Kinasen, welche in der Folge die Untereinheiten des Transkriptionsfaktors phosphorylieren, NF- $\kappa$ Bp65 und NF- $\kappa$ Bp50. Die Phosphorylierung am Ser-536 von NF- $\kappa$ Bp65 ermöglicht die Freisetzung aus dem inhibitorischen Komplex und den Eintritt in den Zellkern. In dieser Arbeit folgte ich diesem Phosphorylierungsstatus, um die Aktivierung von NF- $\kappa$ B-abhängigen Signalprozessen unter der Exposition von FXa evaluieren zu können.

Die Phosphorylierung am Ser-536 von NF $\kappa$ B-p65 wurde mithilfe von Western Blots analysiert und die Ergebnisse der Exposition der humanen atrialen Gewebeschnitte mit 50 nM FXa ohne (n=4) oder mit Zusatz von 1  $\mu$ M Rivaroxaban (n=6 vs. FXa) für zwei Stunden und der Exposition mit 50 nM FXa ohne (n=10 vs. CTL) oder mit 1  $\mu$ M Rivaroxaban (n=7 vs. FXa) oder 10  $\mu$ M SCH79797 (n=3 vs. FXa) oder 10  $\mu$ M GB83 (n=3 vs. FXa) für 24 Stunden in Abbildung 18 dargestellt. Die Analysen der Immunblots zeigen hierbei den durchgängigen Charakter der Aktivierung von NF- $\kappa$ Bp65 im Vorhofgewebe. Rivaroxaban inhibierte diese Aktivierung zeitabhängig und erreichte seine höchste Inhibierungspotenz nach zweistündiger Exposition mit FXa (2h:  $86,00 \pm 20,41$  vs.  $181,50 \pm 25,06$ ,  $p=0,025$ ; 24h:  $155,72 \pm 35,34$  vs.  $198,80 \pm 27,80$ ,  $p=ns$ ). Der PAR 2-Antagonist GB83 zeigte diesbezüglich eine prolongierte Aktivität bis zu 24 Stunden ( $120,00 \pm 25,17$  vs.  $198,80 \pm 27,80$ ,  $p=0,07$ ). Der PAR 1-Antagonist SCH79797 beeinflusste die NF- $\kappa$ B-Aktivierung nur in geringerem Umfang ( $155,67 \pm 35,63$  vs.  $198,80 \pm 27,80$ ,  $p=ns$ ) (Abbildung 18, Abbildung 19 und Abbildung 20). Anschließend wurden die atrialen Schnitte in einem weiteren Versuchsaufbau mithilfe der simulierten Tachyarrhythmie sowohl mit 4,0 Hz und 50 nM FXa (n=10 vs. 0,6 Hz) als auch zusätzlich mit FXa und 1  $\mu$ M Rivaroxaban (n=5 vs. 4,0 Hz + FXa) oder 10  $\mu$ M SCH79797 (n=5 vs. 4,0 Hz + FXa) oder 10  $\mu$ M GB83 (n=5 vs. 4,0 Hz + FXa) für 24 Stunden stimuliert. Zusätzlich wurden einige Experimente durchgeführt, um die Effekte einer alleinigen Elektrostimulation festzustellen (n=4 vs. 0,6 Hz) (Abbildung 19). Die kombinierte Stimulation mit zusätzlicher Elektrostimulation für 24 Stunden konnte einen signifikanten Anstieg in der Phosphorylierung am Ser-536 von NF- $\kappa$ Bp65 hervorrufen ( $263,13 \pm 22,22$  vs. 0,6 Hz,  $p=0,0036$ ) (Abbildung 19, Abbildung 20). Auch hierbei zeigten Rivaroxaban, SCH sowie GB83 eine Tendenz in Richtung Absenkung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung (RIVA:  $203,37 \pm 64,65$  vs.  $263,13 \pm 22,22$ ,  $p=ns$ ; SCH:  $218,29 \pm 25,16$  vs.  $263,13 \pm 22,22$ ,  $p=ns$ ; GB83:  $174,89 \pm 26,73$  vs.  $263,13 \pm 22,22$ ,  $p=0,07$ ).

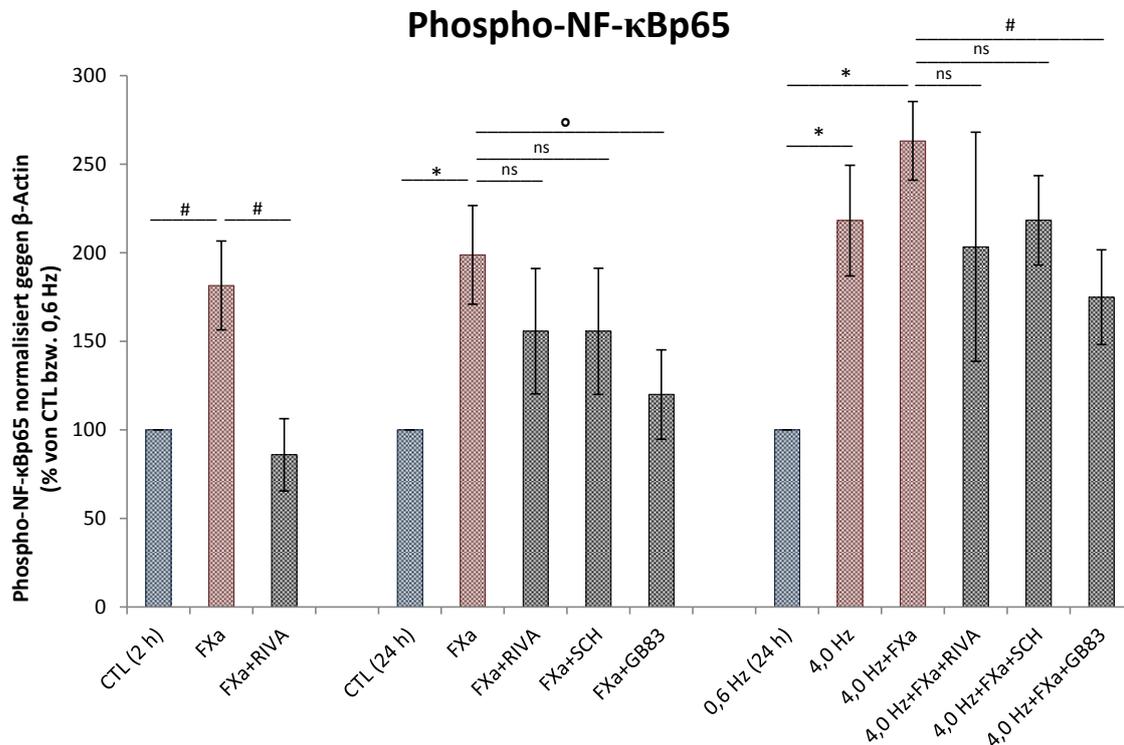
Die Quantifizierung des phospho-NF- $\kappa$ Bp65-Gesamtproteingehaltes erfolgte durch densitometrische Analysen der Immunblots (Abbildung 20). Die Werte sind durch den Mittelwert  $\pm$  SEM ausgedrückt und mit Kontrollen ohne Elektrostimulation (CTL) beziehungsweise mit 0,6 Hz-elektrostimulierten Kontrollen verglichen.



**Abbildung 18:** Proteinexpression von p-NF-κBp65 unter Stimulation des atrialen Gewebes mit FXa sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83. Repräsentative Darstellung eines Western Blots. Zur versuchsinternen Kontrolle wurde anti-β-Actin eingesetzt. CTL: Kontrolle, FXa: aktivierter Faktor X, RIVA: Rivaroxaban, SCH: SCH79797.



**Abbildung 19:** Proteinexpression von p-NF-κBp65 unter Stimulation des Gewebes mit FXa und simulierter Tachyarrhythmie sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83. Repräsentative Darstellung eines Western Blots. Zur versuchsinternen Kontrolle wurde anti-β-Actin eingesetzt. FXa: aktivierter Faktor X, RIVA: Rivaroxaban, SCH: SCH79797.



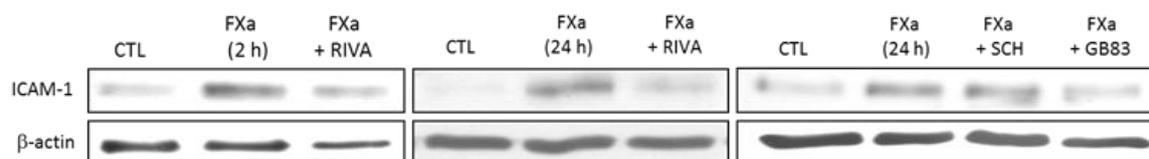
**Abbildung 20:** Aktivierung NF-κB-vermittelter Signalprozesse als Reaktion auf die Stimulation mit FXa und schneller Vorhofstimulation sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83. Quantifizierung des phospho-NF-κBp65-Gesamtproteingehaltes durch densitometrische Analysen der Western Blots. CTL: Kontrolle, FXa: aktivierter Faktor X, RIVA: Rivaroxaban, SCH: SCH79797. \*p<0,01, #p<0,05, °p=0,07, ns=nicht signifikant.

### 3.5 Induktion der NF- $\kappa$ B-Targetproteine im Vorhofgewebe

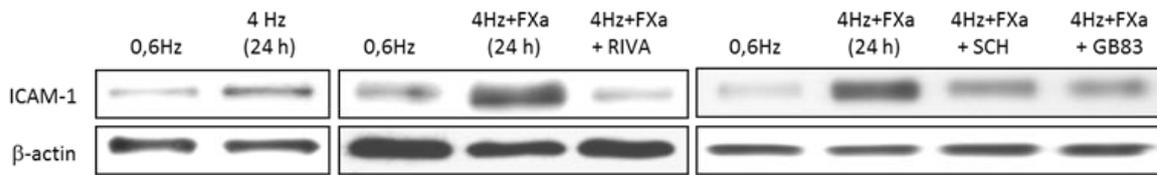
Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B reguliert die Expression verschiedener inflammatorischer, prooxidativer und prothrombotischer Moleküle. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aufmerksamkeit auf die Moleküle gerichtet, welche an der atrialen Thrombogenität teilhaben, wie beispielsweise ICAM-1, Interleukin-8 (IL-8), PAI-1 und der Rezeptor für oxidiertes LDL (LOX-1).

#### 3.5.1 Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-8 sowie des Adhäsionsmoleküls ICAM-1

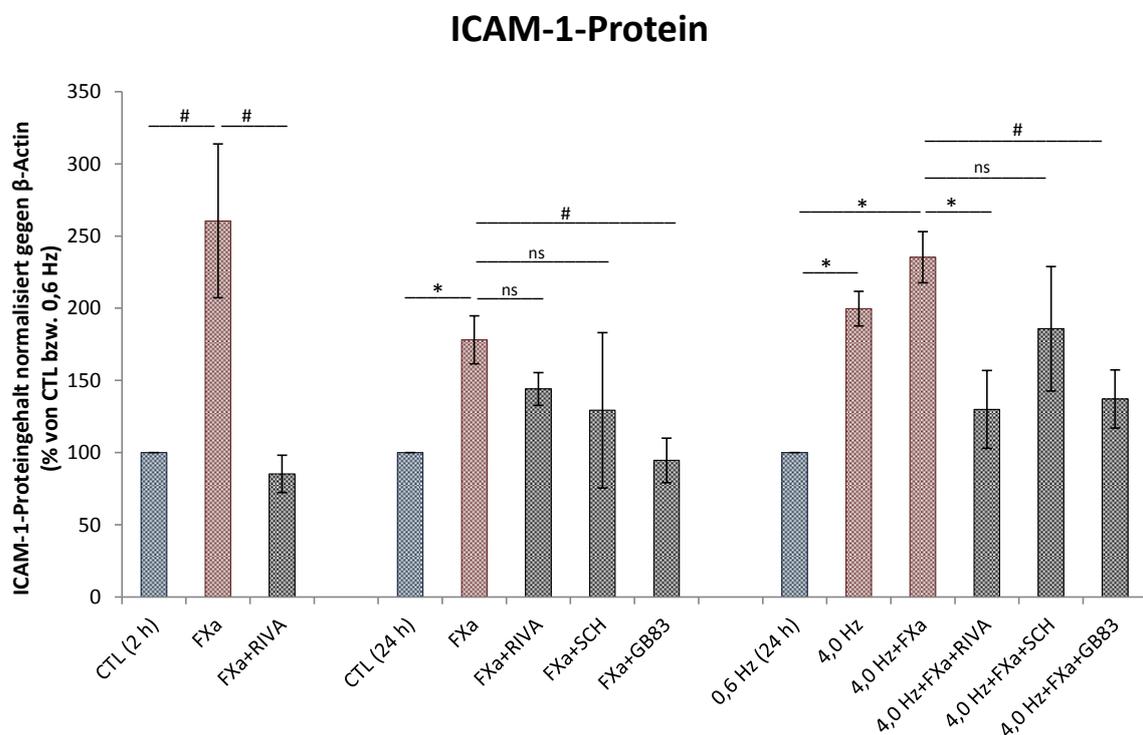
Die Expression von ICAM-1 wurde auf Transkriptions- und Proteinebene analysiert. Wie in Abbildung 21 - Abbildung 24 illustriert, wurde als Reaktion auf die Stimulation mit FXa das Adhäsionsmolekül ICAM-1 auf transkriptionaler- und Proteinebene hochreguliert (mRNA:  $1,82 \pm 0,20$  vs. CTL,  $p=0,0001$ ; WB 24h:  $178,13 \pm 16,56$  vs. CTL,  $p=0,0003$ ). Ein signifikanter Anstieg ergab sich auch bei zusätzlicher Exposition des Vorhofgewebes mit elektrischer Stimulation bei 4,0 Hz (mRNA:  $2,13 \pm 0,25$  vs. 0,6 Hz,  $p=0,0001$ ; WB 24h:  $235,40 \pm 17,73$  vs. 0,6 Hz,  $p=0,0007$ ). Hierbei konnte der PAR 2-Antagonist GB83 den größten inhibitorischen Effekt auf die ICAM-Induktion, selbst nach 24-stündiger FXa-Exposition, erzielen (mRNA FXa+GB83:  $0,97 \pm 0,21$  vs.  $1,82 \pm 0,20$ ,  $p=0,023$ ; WB FXa+GB83:  $94,67 \pm 15,38$  vs.  $178,13 \pm 16,56$ ,  $p=0,027$ ). Die protektiven Effekte von Rivaroxaban waren nach zweistündiger Stimulation mit FXa am höchsten und erreichten sogar Werte unterhalb derer unter Ruhebedingungen (WB:  $85,25 \pm 12,88$  vs.  $260,50 \pm 53,29$ ,  $p=0,024$ ). Zudem wurde dieser Effekt mit der Zeit geringer. Dagegen beeinflusste SCH79797 die ICAM-Expression nur in geringerem Umfang ( $p=ns$  bei allen untersuchten Bedingungen).



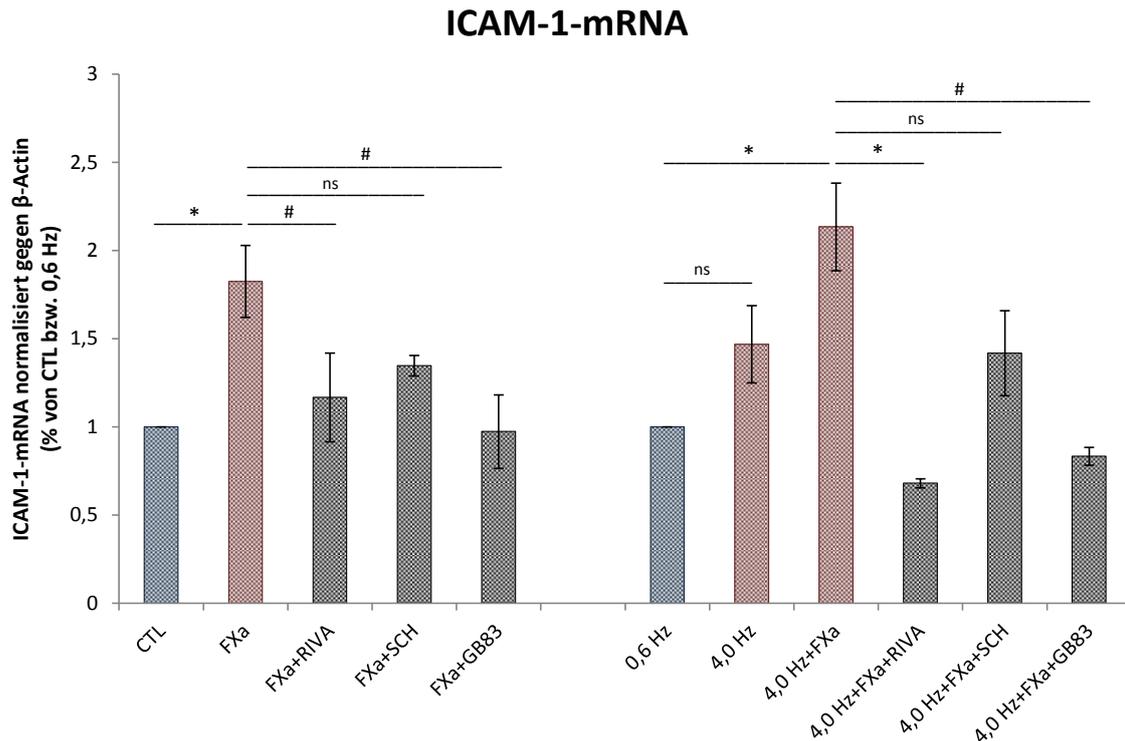
**Abbildung 21:** Proteinexpression von ICAM-1 unter Stimulation des atrialen Gewebes mit FXa sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83. Repräsentative Darstellung eines Western Blots. Zur versuchsinternen Kontrolle wurde anti- $\beta$ -Actin eingesetzt. ICAM-1: Intercellular adhesion molecule-1, CTL: Kontrolle, FXa: aktivierter Faktor X, RIVA: Rivaroxaban, SCH: SCH79797.



**Abbildung 22:** Proteinexpression von ICAM-1 unter Stimulation des Gewebes mit FXa und simulierter Tachyarrhythmie sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83. Repräsentative Darstellung eines Western Blots. Zur versuchsinternen Kontrolle wurde anti- $\beta$ -Actin eingesetzt. ICAM-1: Intercellular adhesion molecule-1, FXa: aktivierter Faktor X, RIVA: Rivaroxaban, SCH: SCH79797.



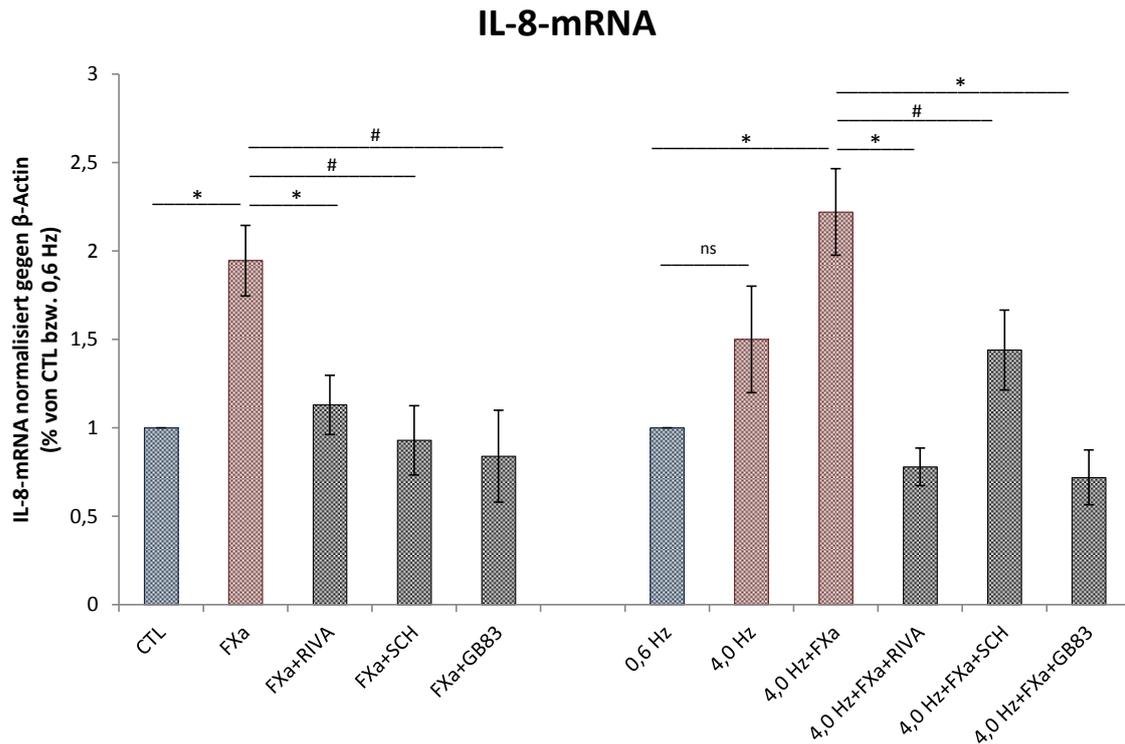
**Abbildung 23:** Aktivierung von ICAM-1 als Reaktion auf die Stimulation mit FXa und schneller Vorhofstimulation sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83. Quantifizierung des ICAM-1-Gesamtproteingehaltes durch densitometrische Analysen der Western Blots. ICAM-1: Intercellular adhesion molecule-1, CTL: Kontrolle, FXa: aktivierter Faktor X, RIVA: Rivaroxaban, SCH: SCH79797. \* $p < 0,01$ , # $p < 0,05$ , ns=nicht signifikant.



**Abbildung 24:** Effekte der Stimulation mit FXa und schneller Vorhoffstimulation sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83 auf die Expression von ICAM-1 auf Transkriptionsebene. ICAM-1: Intercellular adhesion molecule-1, CTL: Kontrolle, FXa: aktivierter Faktor X, RIVA: Rivaroxaban, SCH: SCH79797. \* $p < 0,01$ , # $p < 0,05$ , ns=nicht signifikant.

Zusätzlich wurden weitere Experimente bezüglich der Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-8 durchgeführt. Die Analyse erfolgte unter Nutzung der RT-PCR (Abbildung 25). Dabei wurden die Schnitte sowohl mit FXa inkubiert ( $n = 9$  vs. CTL) als auch der simulierten Tachyarrhythmie und FXa für 24 Stunden ausgesetzt ( $n = 7$  vs. 0,6 Hz). Eine 24-stündige Exposition unter FXa verursachte einen signifikanten Anstieg der IL-8 mRNA ( $1,95 \pm 0,20$  vs. CTL,  $p = 0,0001$ ). Die IL-8-Expression wurde durch die applizierten Antagonisten signifikant vermindert (RIVA:  $1,13 \pm 0,17$  vs.  $1,95 \pm 0,20$ ,  $p = 0,006$ ; SCH:  $0,93 \pm 0,20$  vs.  $1,95 \pm 0,20$ ,  $p = 0,019$ ; GB83:  $0,84 \pm 0,26$  vs.  $1,95 \pm 0,29$ ,  $p = 0,035$ ) (Abbildung 25). Die zusätzliche schnelle Vorhoffstimulation mit 4,0 Hz wirkte synergistisch auf die IL-8-Induktion ( $2,22 \pm 0,24$  vs. 0,6 Hz,  $p = 0,001$ ). Auch hierbei konnte die IL-8-Expression durch die drei applizierten Antagonisten signifikant vermindert werden (RIVA:  $0,78 \pm 0,11$  vs.  $2,22 \pm 0,24$ ,  $p = 0,00162$ ; SCH:  $1,44 \pm 0,23$  vs.  $2,22 \pm 0,24$ ,  $p = 0,044$ ; GB83:  $0,72 \pm 0,16$  vs.  $2,22 \pm 0,24$ ,  $p = 0,0088$ ) (Abbildung 25).

Die Werte sind durch den Mittelwert  $\pm$  SEM ausgedrückt und mit Kontrollen ohne Elektrostimulation (CTL) beziehungsweise mit 0,6 Hz-elektrostimulierten Kontrollen verglichen.

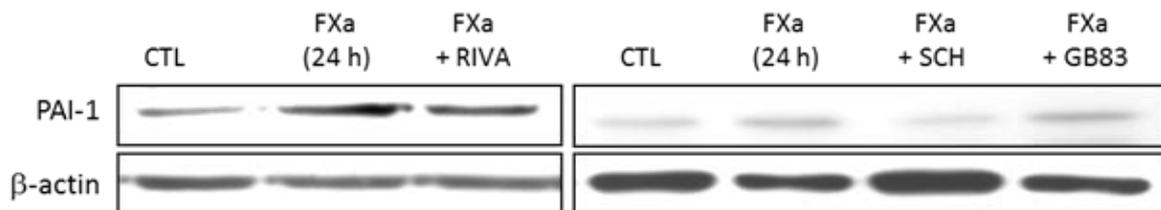


**Abbildung 25:** Effekte der Stimulation mit FXa und schneller Vorhofstimulation sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83 auf die Expression von IL-8 auf Transkriptionsebene. IL-8: Interleukin-8, CTL: Kontrolle, FXa: aktivierter Faktor X, RIVA: Rivaroxaban, SCH: SCH79797. \* $p < 0,01$ , # $p < 0,05$ , ns=nicht signifikant.

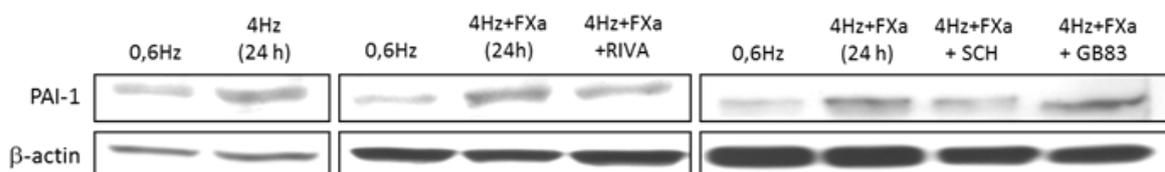
### 3.5.2 Effekte der Stimulation mit FXa und simulierter Tachyarrhythmie auf die Expression von PAI-1

Die PAI-1-Expression wurde mithilfe von Western Blots (Abbildung 26, Abbildung 27) und der RT-PCR (Abbildung 29) analysiert. Zur Analyse mittels Immunblot wurden die atrialen Gewebeschnitte mit 50 nM FXa, ohne ( $n=10$ ) oder mit Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  Rivaroxaban ( $n=7$  vs. FXa) oder 10  $\mu\text{M}$  SCH79797 ( $n=3$  vs. FXa) oder 10  $\mu\text{M}$  GB83 ( $n=3$  vs. FXa) für 24 Stunden versetzt (Abbildung 26). Weiterhin wurden die Vorhofgewebeschnitte in einem weiteren Versuchsaufbau mithilfe der schnellen Elektrostimulation sowohl mit 4,0 Hz und 50 nM FXa ( $n=10$  vs. 0,6 Hz) als auch zusätzlich mit FXa und 1  $\mu\text{M}$  Rivaroxaban ( $n=5$  vs. 4,0 Hz + FXa) oder 10  $\mu\text{M}$  SCH79797 ( $n=5$  vs. 4,0 Hz + FXa) oder 10  $\mu\text{M}$  GB83 ( $n=5$  vs. 4,0 Hz + FXa) für 24 Stunden stimuliert (Abbildung 27). Zusätzlich wurden einige Experimente durchgeführt, um die Effekte einer alleinigen Elektrostimulation festzustellen ( $n=4$  vs. 0,6 Hz). Die Werte sind durch den Mittelwert  $\pm$  SEM ausgedrückt und mit Kontrollen ohne Elektrostimulation (CTL) beziehungsweise mit 0,6 Hz-elektrostimulierten Kontrollen verglichen.

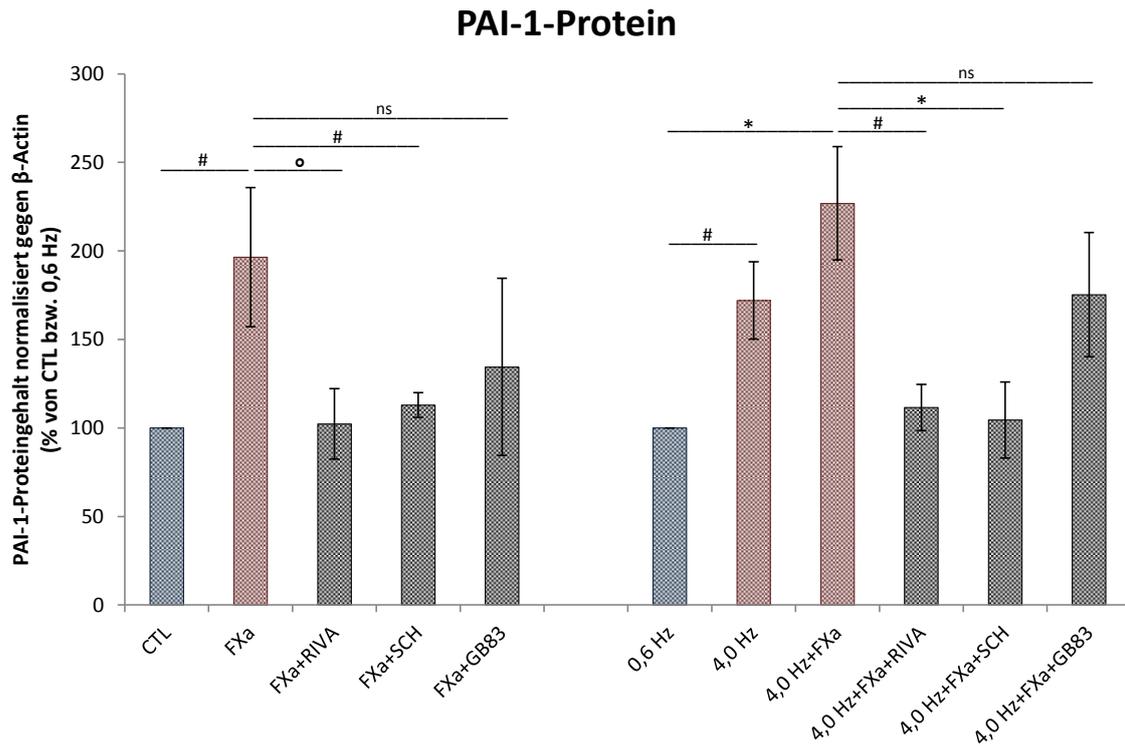
Die Exposition der atrialen Gewebeschnitte mit FXa für 24 Stunden beeinflusste die Expression des prothrombotischen Moleküls PAI-1 auf mRNA- ( $1,52 \pm 0,17$  vs. CTL,  $p=0,0067$ ) und Proteinebene ( $196,44 \pm 39,30$  vs. CTL,  $p=0,026$ ) signifikant. Die Kombination von Elektrostimulation und Stimulation mit FXa konnte die PAI-1-Expression auf Transkriptions- ( $2,65 \pm 0,52$  vs. 0,6 Hz,  $p=0,008$ ) und Proteinebene ( $226,89 \pm 31,97$  vs. 0,6 Hz,  $p=0,0011$ ) synergistisch steigern (Abbildung 28, Abbildung 29). Interessanterweise zeigten der PAR 1-Antagonist SCH79797 sowie der FXa-Inhibitor Rivaroxaban die größten inhibitorischen Effekte auf die PAI-1-Induktion unter allen experimentellen Bedingungen. Hierbei zeigte der PAR 2-Antagonist GB83 unter Kombination von Elektrostimulation und Stimulation mit FXa eine geringere Tendenz, die FXa-induzierten Effekte auf mRNA- und Proteinebene zu vermindern, welche jedoch nicht statistisch signifikant war (Abbildung 28, Abbildung 29). Die inhibitorischen Effekte des spezifischen PAR 1-Antagonisten implizieren, dass eine Beteiligung dieses Rezeptors an der Vermittlung FXa-spezifischer Signalprozesse eine große Rolle spielt.



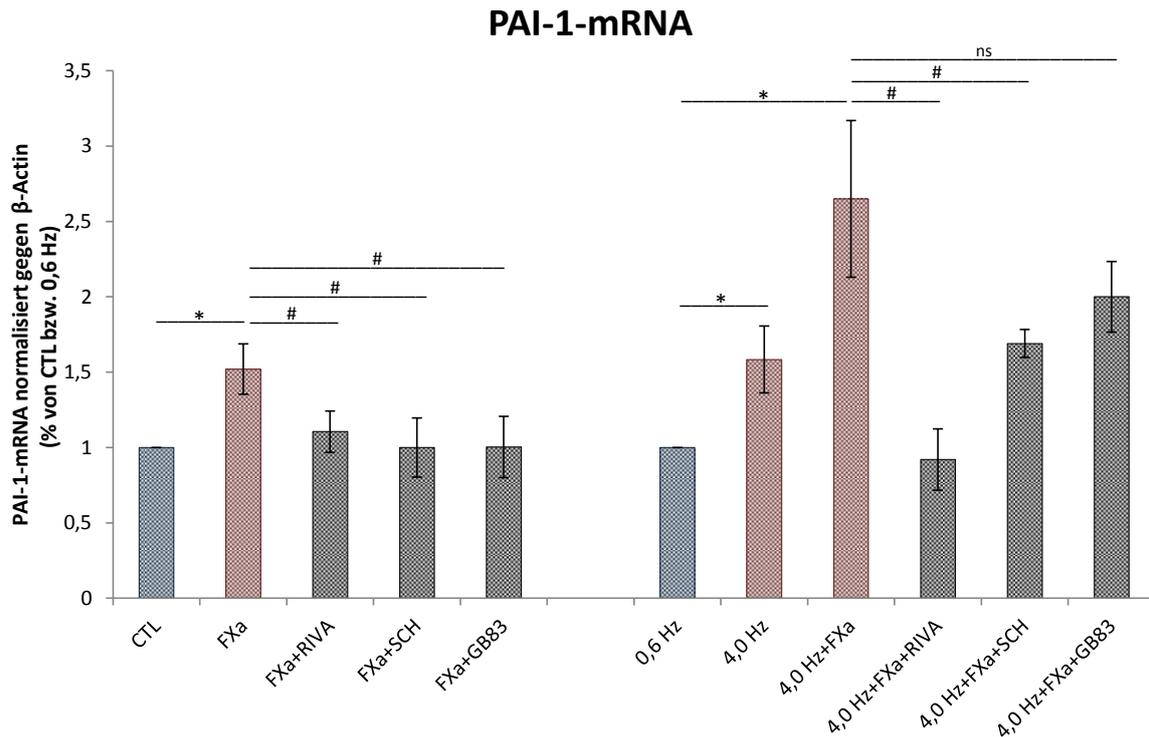
**Abbildung 26:** Proteinexpression von PAI-1 unter Stimulation des atrialen Gewebes mit FXa sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83. Repräsentative Darstellung eines Western Blots. Zur versuchsinternen Kontrolle wurde anti-β-Actin eingesetzt. PAI-1: Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1, CTL: Kontrolle, FXa: aktivierter Faktor X, RIVA: Rivaroxaban, SCH: SCH79797.



**Abbildung 27:** Proteinexpression von PAI-1 unter Stimulation des Gewebes mit FXa und simulierter Tachyarrhythmie sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83. Repräsentative Darstellung eines Western Blots. Zur versuchsinternen Kontrolle wurde anti-β-Actin eingesetzt. PAI-1: Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1, FXa: aktivierter Faktor X, RIVA: Rivaroxaban, SCH: SCH79797.



**Abbildung 28:** Aktivierung von PAI-1 als Reaktion auf die Stimulation mit FXa und schneller Vorhofstimulation sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83. Quantifizierung des PAI-1-Gesamtproteingehaltes durch densitometrische Analysen der Western Blots. PAI-1: Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1, CTL: Kontrolle, FXa: aktivierter Faktor X, RIVA: Rivaroxaban, SCH: SCH79797. \* $p < 0,01$ , # $p < 0,05$ , ° $p = 0,07$ , ns=nicht signifikant.



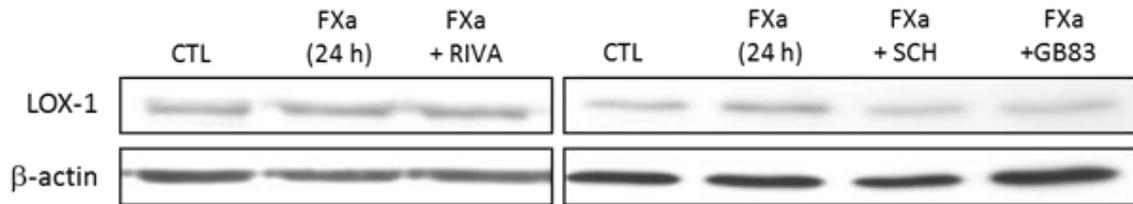
**Abbildung 29:** Effekte der Stimulation mit FXa und schneller Vorhoffstimulation sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83 auf die Expression von PAI-1 auf Transkriptionsebene. PAI-1: Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1, CTL: Kontrolle, FXa: aktivierter Faktor X, RIVA: Rivaroxaban, SCH: SCH79797. \* $p < 0,01$ , # $p < 0,05$ , ns=nicht signifikant.

### 3.5.3 Induktion des prooxidativen LOX-1 als Reaktion auf die Stimulation mit FXa und simulierter Tachyarrhythmie

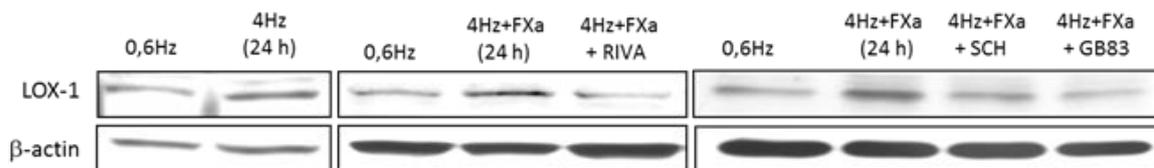
Die LOX-1-Expression wurde mithilfe von Immunblots (Abbildung 30 - Abbildung 32) und der RT-PCR analysiert (Abbildung 33). Die Werte sind durch den Mittelwert  $\pm$  SEM ausgedrückt und mit Kontrollen ohne Elektrostimulation (CTL) beziehungsweise mit 0,6 Hz-elektrostimulierten Kontrollen verglichen.

Die Expression von LOX-1, einem prooxidativen Marker, blieb nach der Inkubation mit 50 nM FXa für 24 Stunden ( $n=12$  für Immunblots,  $n=9$  für RT-PCR) unbeeinflusst (WB:  $110,08 \pm 10,76$  vs. CTL,  $p=ns$ ; mRNA:  $1,29 \pm 0,13$  vs. CTL,  $p=ns$ ) (Abbildung 30 - Abbildung 33). Hingegen wurde die Expression auf Transkriptions- und Proteinebene bei zusätzlicher schneller Vorhoffstimulation mit 4,0 Hz ( $n=9$  für Immunblots,  $n=7$  für RT-PCR) 2,5-fach erhöht (WB:  $275,00 \pm 33,27$  vs. 0,6 Hz,  $p=0,0007$ ; mRNA:  $2,59 \pm 0,35$  vs. 0,6 Hz,  $p=0,0001$ ) (Abbildung 32, Abbildung 33). Interessanterweise verhinderten 1  $\mu$ M Rivaroxaban sowie auch die beiden PAR-Antagonisten in einer Konzentration von 10  $\mu$ M bei diesem Versuchsaufbau die FXa-abhängige Induktion der LOX-1-Expression auf Proteinebene (RIVA,  $n=3$ :  $145,70 \pm 36,68$  vs.  $275,00 \pm 33,27$ ,  $p=0,049$ ; SCH,  $n=5$ :

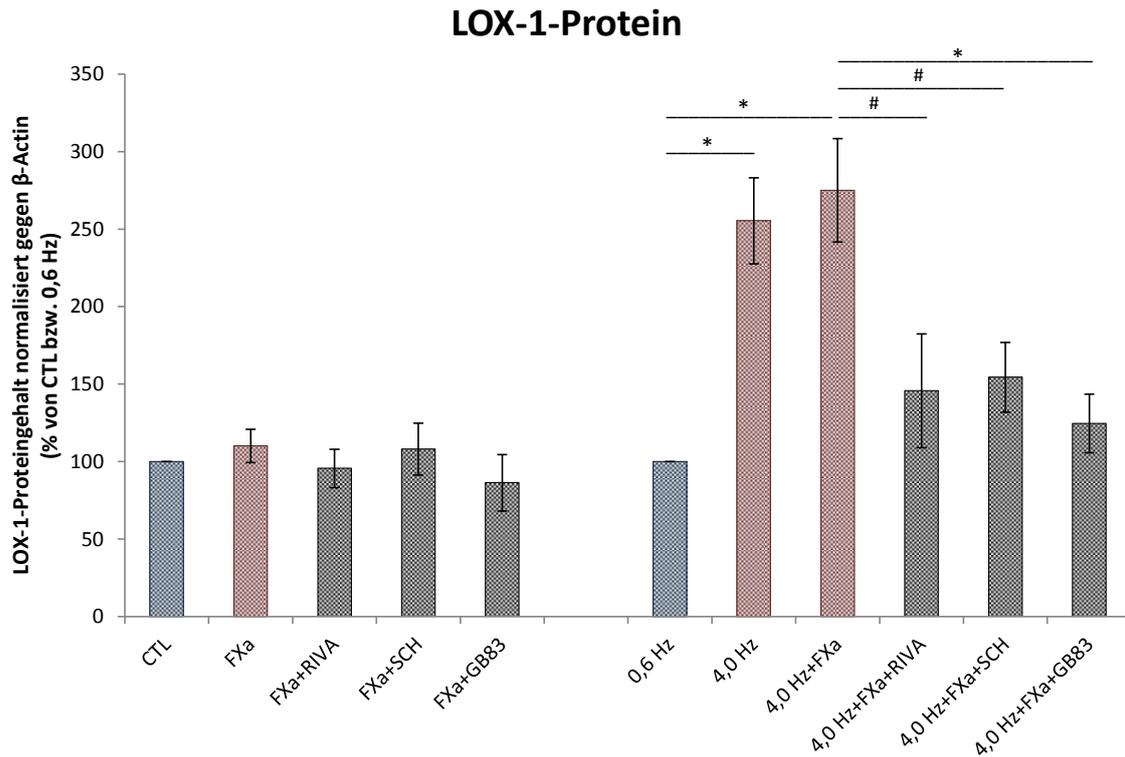
154,41 ± 22,55 vs. 275,00 ± 33,27,  $p=0,02$ ; GB83,  $n=5$ : 124,60 ± 18,87 vs. 275,00 ± 33,27,  $p=0,0062$ ) als auch auf mRNA-Ebene (RIVA,  $n=3$ : 1,02 ± 0,22 vs. 2,59 ± 0,35,  $p=0,036$ ; SCH,  $n=3$ : 1,41 ± 0,53 vs. 2,59 ± 0,35,  $p=0,07$ ; GB83,  $n=3$ : 0,98 ± 0,14 vs. 2,59 ± 0,35,  $p=0,012$ ) signifikant. (Abbildung 30 - Abbildung 33).



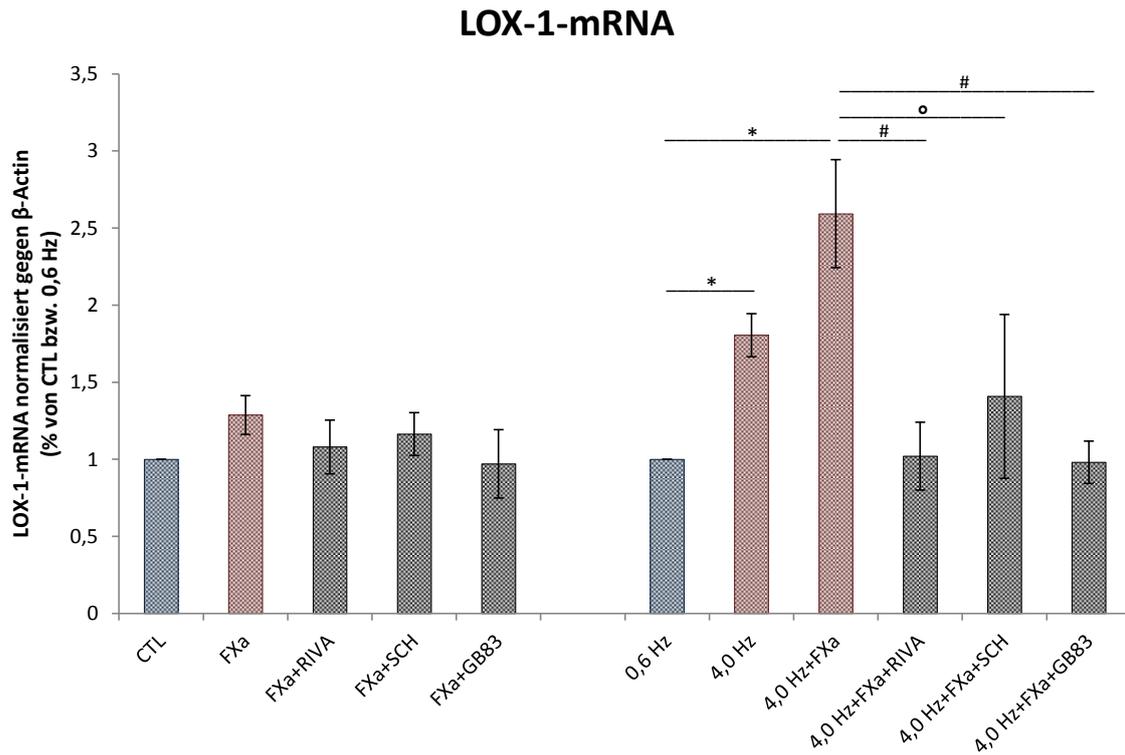
**Abbildung 30:** Proteinexpression von LOX-1 unter Stimulation des atrialen Gewebes mit FXa sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83. Repräsentative Darstellung eines Western Blots. Zur versuchsinternen Kontrolle wurde anti-β-Actin eingesetzt. LOX-1: Endothelial lectin-like oxidized low-density lipoprotein Rezeptor-1, CTL: Kontrolle, FXa: aktivierter Faktor X, RIVA: Rivaroxaban, SCH: SCH79797.



**Abbildung 31:** Proteinexpression von LOX-1 unter Stimulation des Gewebes mit FXa und simulierter Tachyarrhythmie sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83. Repräsentative Darstellung eines Western Blots. Zur versuchsinternen Kontrolle wurde anti-β-Actin eingesetzt. LOX-1: Endothelial lectin-like oxidized low-density lipoprotein Rezeptor-1, FXa: aktivierter Faktor X, RIVA: Rivaroxaban, SCH: SCH79797.



**Abbildung 32:** Aktivierung von LOX-1 als Reaktion auf die Stimulation mit FXa und schneller Vorhofstimulation sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83. Quantifizierung des LOX-1-Gesamtproteingehaltes durch densitometrische Analysen der Western Blots. LOX-1: Endothelial lectin-like oxidized low-density lipoprotein Rezeptor-1, CTL: Kontrolle, FXa: aktivierter Faktor X, RIVA: Rivaroxaban, SCH: SCH79797. \* $p < 0,01$ , # $p < 0,05$ .



**Abbildung 33:** Effekte der Stimulation mit FXa und schneller Vorhofstimulation sowie zusätzlicher Inkubation mit dem FXa-Inhibitor Rivaroxaban und den PAR-Antagonisten SCH79797/GB83 auf die Expression von LOX-1 auf Transkriptionsebene. LOX-1: Endothelial lectin-like oxidized low-density lipoprotein Rezeptor-1, CTL: Kontrolle, FXa: aktivierter Faktor X, RIVA: Rivaroxaban, SCH: SCH79797. \* $p < 0,01$ , # $p < 0,05$ , ° $p = 0,07$ , ns=nicht signifikant.

## 4 Diskussion

### 4.1 Hauptergebnisse

Die vorliegende Studie beschreibt erstmalig die Effekte von FXa in einem Modell simulierter Tachyarrhythmie in humanem Vorhofgewebe. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Gewebestimulation mittels Applikation von FXa und eine durch *ex vivo*-Stimulation induzierte Tachyarrhythmie synergistisch betreffend einer Zunahme der myokardialen PAR 1- und PAR 2-Expression agieren. Dieser vermehrten Expression folgte die Aktivierung der MAP-Kinasen (ERK 1/2) und der NF- $\kappa$ B-Signalwege. Demzufolge wurde die Expression der proinflammatorischen Moleküle IL-8, ICAM-1, der endothelialen Faktoren wie das prooxidative LOX-1 und das prothrombotische PAI-1, hochreguliert. Es ist festzustellen, dass Rivaroxaban den FXa- und Tachykardie-induzierten Remodelingprozess in humanem Vorhofgewebe aufhebt.

### 4.2 Vorhof-Remodeling bei Vorhofflimmern

Es ist bekannt, dass eine kardiale Tachyarrhythmie signifikante elektrophysiologische und strukturelle Veränderungen in kardialem Gewebe, insbesondere der Vorhofmyozyten induzieren kann, welche wiederum zu einer Persistenz und Aggravation des Vorhofflimmerns beitragen können (Allessie 1998; Goette et al. 1996; Schotten et al. 2011). Wijffels et al. (1995) untersuchten in einer früheren tierexperimentellen Studie, dass eine artifiziell erzeugte Aufrechterhaltung des Vorhofflimmerns über einen längeren Zeitraum zu einer deutlich verkürzten atrialen effektiven Refraktärperiode (AERP) des Vorhofmyokards, auch nach Beendigung der Stimulation, führt. Dieser als „elektrisches Remodeling“ beschriebene Prozess erleichtert nach Wijffels et al. (1995) einen Anstieg der Frequenzrate, die Induzierbarkeit und Stabilität des Vorhofflimmerns sowie eine Umkehrung der physiologischen Herzfrequenzadaptation (Wijffels et al. 1995). Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration und die Aktivierung oxidativer Stress-Signalprozesse konnten als Trigger für das atriale Remodeling identifiziert werden (Bukowska et al. 2008; Dudley 2005; Schild et al. 2006; Yue et al. 1997). Nach längerer Stimulation durch das Vorhofflimmern über Stunden bis Tage ereignen sich in einem Zeitraum von Tagen Veränderungen auf molekularer Ebene. Von Bedeutung scheinen hierbei eine Verminderung der Anzahl der langsamen Kalzium-Kanäle sowie eine verminderte Dichte von Kaliumkanälen in der Zellmembran (Grammer et al. 2000; Yue et al. 1997) zu sein. Somit kommt es zu einer Verkürzung der Dauer des Aktionspotentials und der effektiven Refraktärperiode und einer dadurch gesteigerten Vorhofvulnerabilität. Zudem bewirkt das atriale Remodeling eine Abnahme der Kontraktilität (Brundel et al. 1999). Diese molekularen

Veränderungen waren jedoch nach wiederhergestelltem Sinusrhythmus innerhalb von Tagen wieder reversibel.

Das strukturelle und das elektrische Remodeling sind eng miteinander gekoppelt (Allessie et al. 2002). Die molekularen Grundlagen des strukturellen Remodelings sind jedoch bis heute weiterhin Diskussionsgegenstand (Nattel 2002). Bei kurzfristiger tachykarder Erregung kommt es zur frequenzbedingten Zunahme des Kalzium-Einstroms und somit zur vorübergehenden Kalzium-Überladung in den Myozyten (Goette et al. 1996). Wie zuvor bereits beschrieben, erfolgt längerfristig kompensatorisch eine Inaktivierung und Minderexpression von Kalziumkanälen. Die veränderte Kalziumhomöostase scheint auch für morphologische Schädigungen der Mitochondrien, Disruption des endoplasmatischen Retikulums sowie Veränderungen der kontraktilen Filamente verantwortlich zu sein (Goette et al. 2002a; Goette et al. 2002b). Dies geht mit einer Erhöhung des Calpain I-Proteingehaltes sowie der -Enzymaktivität einher (Goette et al. 2002a). Desweiteren ließ sich durch weitere Untersuchungen eine veränderte Expression von Connexinen, welche durch Bildung von Gap junctions für die elektrische Kopplung von Myozyten verantwortlich sind, feststellen (Allessie et al. 2002). Eine zentrale Bedeutung im Remodelingprozess kommt weiterhin der vermehrten Bildung von Angiotensin II zu, welches über die Aktivierung des Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (AT1-Rezeptor) die Induktion von MAPK-Signalprozessen vermittelt. Diese verursachen über die Aktivierung von MEK 1/2, ERK 1/2, JNK und NF- $\kappa$ B-Signalprozesse Apoptose, atriale Fibrose, oxidativen Stress sowie eine zelluläre Hypertrophie (Goette et al. 2000a; Goette et al. 2000b; Goette et al. 2002b). Bisher wurden einige Studien veröffentlicht, welche beschreiben, dass dem oxidativen Stress im Prozess des elektrischen und strukturellen Remodelings eine zentrale Rolle zugeschrieben wird. Mihm et al. konnten erstmals den oxidativen Schaden im Vorhofmyokard bei Patienten mit Vorhofflimmern demonstrieren (Mihm et al. 2001). Der durch das VHF ausgelöste oxidative Stress verursacht die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), welche über freie Radikale die Oxidation von zellulären Lipiden, Proteinen und der DNA und somit den Zelltod durch Nekrose und/oder Apoptose begünstigen (Carnes et al. 2001; Mihm et al. 2001). Die NADPH-Oxidase konnte als eine bedeutende Quelle in der Entstehung von ROS im Vorhof identifiziert werden (Bukowska et al. 2008; Goette und Lendeckel 2004; Kim et al. 2005). Carnes et al. (2001) konnten belegen, dass Ascorbinsäure die Effekte des oxidativen Stresses und das damit assoziierte elektrophysiologische Remodeling abschwächen konnte, da sie in ihrem VHF-Modell verringerte Ascorbatkonzentrationen sowie eine Akkumulation von Peroxynitrit nachweisen konnten (Carnes et al. 2001). Auf Molekularebene sind einige durch das Vorhofflimmern bedingte Veränderungen des Vorhofgewebes einhergehend mit der Aktivierung von verschiedenen Signaltransduktionssystemen. Kürzlich konnten Bukowska et al. den Einfluss des NF- $\kappa$ B-

Signalprozesses auf die Induktion oxidativen Stresses während einer *ex vivo* simulierten Tachyarrhythmie zeigen (Bukowska et al. 2008). Typische Targetgene von NF- $\kappa$ B sind jene der proinflammatorischen Zytokine, der Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1, ICAM-1 und LOX-1. Einhergehend mit der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges beobachteten sie einen Anstieg von proinflammatorischen und prothrombotischen Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 sowie auch LOX-1 in Vorhofgeweben bei Patienten mit Vorhofflimmern und in *in vitro*-elektrostimulierten atrialen Gewebeschnitten. Diese Ergebnisse implizieren, dass jene Prozesse, welche durch oxidativen Stress in Vorhofgewebe ausgelöst werden, eine endokardiale Aktivierung gefolgt von einem erhöhten Risiko der Thrombusformation im Vorhof während einer Tachyarrhythmie erklären. In flimmernden Vorhöfen finden sich Endothelschäden und prothrombotische Endokardveränderungen (Schotten et al. 2011), welche eine Voraussetzung für die Entwicklung von Vorhofthromben darstellen, da das Wachstum von Vorhofthromben stets an der Vorhofwand beginnt.

Die Beeinflussung sowohl von elektrophysiologischen als auch mechanischen Funktionen auf Ebene der Vorhöfe durch das VHF entsteht also zusammenfassend durch morphologische Gewebeveränderungen im Bereich des Vorhofes (strukturelles Remodeling), welche sich auf zellulärer Ebene (Hypertrophie) sowie auch an der Interzellulärsubstanz (interstitielle Fibrosierung, Amyloidose) manifestieren. Der Remodelingprozess beeinflusst dabei Myokardzellen sowie das Vorhofendokard selbst (endokardiales/endotheliales Remodeling); dabei führt selbst kurzzeitiges VHF zur Aktivierung des Endokards sowie des Endothels im Vorhof. Erst kürzlich stellten Goette et al. (2016) in einem Konsensdokument das rein deskriptive EHRAS-Klassifikationsschema zur Einteilung atrialer Kardiomyopathien vor. Die Klassifikation benennt vier Klassen auf der Basis histologischer und pathologischer Befunde, um die zugrundeliegende Pathologie zu beschreiben. In der Zukunft könnte diese möglicherweise helfen, einen passenden therapeutischen Ansatz für Patienten mit VHF auf der Basis der zugrundeliegenden Ursachen zu entwickeln und so eine individualisierte Therapie zu ermöglichen (Goette et al. 2016).

### **4.3 FXa-abhängige inflammatorische Signalprozesse im Vorhofgewebe**

Es ist allgemein bekannt, dass die Aktivierung der Gerinnungsfaktoren während der Blutgerinnungskaskade in engem Zusammenhang mit der Vermittlung immunologischer und inflammatorischer Signalprozesse *in vivo* steht. In den letzten Jahren fokussierte sich die Aufmerksamkeit primär auf die durch Thrombin-vermittelten inflammatorischen Prozesse in zahlreichen Zelltypen. Die Evidenz, dass FXa möglicherweise ebenso inflammatorische Signalprozesse vermitteln könnte, begründet sich auf *in vivo*-Studien. Cirino et al. zeigten, dass

subplantar in Rattenpfoten injizierter FXa akute inflammatorische Signalprozesse induzierte (über den zellulären Effector cell protease receptor-1 (EPR-1)). Bei diesem *in vivo*-Modell kam es zu einer dosis- und zeitabhängigen Ödembildung in den Rattenpfoten (Cirino et al. 1997). FXa vermittelt weiterhin beispielsweise die Proliferation von Lymphozyten in Anwesenheit akzessorischer Mediatoren (Altieri und Stamnes 1994) oder die Induktion der Mitogenese von Endothelzellen und glatten Muskelzellen (Ko et al. 1996). Senden et al. (1998) demonstrierten, dass FXa proinflammatorische Signalprozesse vermittelt, indem es die Expression der Zytokine IL-6 und IL-8, MCP-1 sowie die der Zelladhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 induziert. Weitere *in vitro*-Studien an dermalen Fibroblasten und Lungenfibroblasten konnten demonstrieren, dass FXa die zelluläre Signaltransduktion mittels PAR 1- und/oder PAR 2-Rezeptoren, abhängig vom Zelltyp und der Expression bestimmter Kofaktoren induzierte. In der Tat zeigte sich dabei, dass FXa die Sekretion von Zytokinen durch Aktivierung beider Rezeptoren vermittelt (Bachli et al. 2003; McLean et al. 2001). Scotton et al. (2009) zeigten, dass PAR 1 in Lungenfibroblasten eine dominante Rolle bei FXa-induzierten Antworten einnimmt (Scotton et al. 2009).

#### **4.3.1 FXa-vermittelte Induktion der Expression Protease-aktivierter Rezeptoren**

Verschiedene Studien haben bisher lediglich den Einfluss der FXa-induzierten Signaltransduktion durch Aktivierung Protease-aktivierter Rezeptoren in anderen Zelltypen untersucht. Die Effekte des Gerinnungsfaktors Xa auf das humane Vorhofgewebe waren bisher nicht Gegenstand der Untersuchungen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Exposition der atrialen Gewebeschnitte mit FXa zu einem Anstieg der transkriptionellen Expression des PAR 2 führt. Die Analysen der Western Blots bestätigen dieses Ergebnis. Im Gegensatz dazu zeigt FXa allein keinen spezifischen Effekt auf die PAR 1-mRNA-Expression. Die regulatorische Wirkung des spezifischen PAR 1-Antagonists SCH79797 auf die IL-8- und die PAI-1-Expression weist jedoch stark auf die Beteiligung des PAR 1-Rezeptors an der Signalvermittlung durch FXa hin (IL-8: Abbildung 25, PAI-1: Abbildung 29). Bemerkenswert ist, dass die applizierte elektrische schnelle Vorhofstimulation eine Hochregulation des PAR 1-Rezeptors auf Transkriptionsebene verursachte. Interessanterweise bewirkte die kombinierte Stimulation von simulierter Tachyarrhythmie und zusätzlichem FXa eine synergistische Hochregulation sowohl von PAR 1 als auch PAR 2 auf Transkriptionsebene. Diese Assoziation zwischen simulierter Tachyarrhythmie und der erhöhten Expression der PAR wurde bisher nicht untersucht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit finden Übereinstimmung mit denen von Studien an humanen vaskulären SMC, in denen FXa in einer Konzentration von 50 nM nur die Expression der PAR 2-mRNA steigerte, ohne die PAR 1-mRNA zu beeinflussen (Jobi et al. 2011). Weiterhin

demonstrierten Jobi et al., dass FXa die PAR 2-mRNA-Stabilisierung durch gesteigerte Bindung der PAR 2-mRNA mit dem Human antigen receptor (HuR) förderte.

Ein Schlüsselement des PAR-vermittelten Signalprozesses hängt von der Modulation der Kalziumhomöostase ab. Zur Stützung dieser Hypothese konnte in einer Subpopulation der Thrombozyten nach der Stimulation mit Thrombin plus Kollagen eine verlängert erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration beschrieben werden, welche auf einem extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Influx beruht und mit der Bildung einer prokoagulatorischen Plättchenoberfläche assoziiert war (Keuren, J. F. W. et al. 2005). Dennoch sind weitere Forschungen notwendig, um alle Mechanismen, die für die Regulation der PAR-vermittelten Signalprozesse verantwortlich sind, vollständig erklären zu können.

#### **4.3.2 FXa-abhängige inflammatorische Prozesse vermittelt durch NF- $\kappa$ B-Signalwege und ERK 1/2 (p44/p42-MAPK)**

Die ERK-MAPK-Aktivierung wurde als Marker für die PAR-Aktivierung herangezogen (Ossovskaya und Bunnett 2004). Diese geht mit einem großen Spektrum an PAR-vermittelten zellulären Prozessen einschließlich Fibrose, Zellproliferation, inflammatorischen Signalprozessen (Borensztajn et al. 2009) und Hypertrophie (Pawlinski et al. 2007) einher. Shimizu et al. (2004) konnten zeigen, dass die durch FXa ausgelöste Hochregulation des Macrophage migration inhibitory factors (MIF) durch p44/p42-MAPK- sowie NF- $\kappa$ B-abhängige Signalwege vermittelt wird, da sich die FXa-stimulierte Hochregulation von MIF durch den MAPKK-Inhibitor PD98089 und den NF- $\kappa$ B-Inhibitor SN50 supprimieren ließ (Shimizu et al. 2004). In humanen Gingiva-Fibroblasten wurde der durch FXa-vermittelte Anstieg der IL-6-mRNA (MAPK- und NF- $\kappa$ B-abhängig) sowie die Aktivierung von NF- $\kappa$ B signifikant durch den FXa-Inhibitor DX-9065a reduziert (Matsushita et al. 2006). Dies unterstreicht die wichtige Bedeutung der ERK- und NF- $\kappa$ B-Signalwege in der FXa-vermittelten Antwort. Auch weitere Studien belegen die Tendenz, dass FXa seine inflammatorische Antwort durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B vermittelt (Jiang et al. 2011; Riewald und Ruf 2001). Zahlreiche inflammatorische Gene werden durch die Familie der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren einschließlich proinflammatorischer Zytokine und Adhäsionsmoleküle reguliert (Hoberg et al. 2004). In humanen vaskulären SMC bewirkt FXa eine dosisabhängige Induktion der Expression von IL-6 und Gewebsthromboplastin (McLean et al. 2001). In Fibroblasten-Zelllinien von Mäusen ging die FXa-induzierte ERK 1/2-Phosphorylierung (PAR 2-vermittelt) mit einer Fibroblastenproliferation, -migration und einer Differenzierung zu Myofibroblasten einher. Weiterhin war dieser Prozess mit einer vermehrten Sekretion der Zytokine MCP-1 und IL-6 sowie mit der Expression von TGF- $\beta$  und Fibronectin assoziiert

(Borensztajn et al. 2008b). Diese Tatsache suggeriert, dass FXa möglicherweise auch eine Rolle in der Progression der Gewebsfibrosierung und des Gewebsremodeling spielen könnte.

In der derzeit verfügbaren Literatur werden unterschiedliche Ansätze der Wirkung von ERK 1/2 auch auf das kardiovaskuläre System beschrieben. In einer Studie von 2004 konnte erstmals demonstriert werden, dass ERK 2-Signalprozesse einen Schutz des Myokards gegenüber Ischämie-Reperfusionsschäden durch apoptotische Schädigungen *in vivo* ermöglichen (Lips et al. 2004) und somit möglicherweise kardioprotektive Wirkungen aufweisen. Auch eine Reihe weiterer Studien unterstützen die Hypothese, dass der MEK 1-ERK 1/2-Zweig des MAPK-Signalweges eine kardioprotektive Wirkung durch direkte Antagonisierung der Apoptose von Myozyten aufweist (Bueno und Molkentin 2002). Wie bereits unter 4.2 dieser Arbeit thematisiert wurde, wurde andererseits durch mehrere Studien belegt, dass eine vermehrte Aktivierung von ERK 1/2 mögliche schädigende Wirkungen durch Induktion der atrialen Fibrose ausübt und somit ein pathophysiologisches Substrat für Vorhofflimmern liefert (Goette et al. 2000b).

In dieser Arbeit wird deutlich, dass FXa die inflammatorische Antwort durch die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK 1/2 und NF- $\kappa$ B vermittelt und dass diese Stimulation im Vorhofgewebe eine verlängerte Aktivierung im Sinne einer verlängerten Phosphorylierung, bis zu 24h anhaltend, auslöste. Dieses Ergebnis steht den Resultaten anderer Studien gegenüber, welche einen transienten Charakter des Phosphorylierungsgeschehens während der Exposition mit FXa aufzeigten. Für diese Studie nutzte ich Gewebeschnitte, welche überwiegend aus atrialen Kardiomyozyten und Fibroblasten bestanden. Diese Zellen könnten sich möglicherweise während der Exposition gegenüber FXa gegenseitig beeinflussen bzw. wechselwirken. Rauch et al. (2004) berichteten, dass FXa den Wachstumsfaktor Basic fibroblast growth factor (bFGF) in die perizelluläre Matrix freisetzt (Rauch et al. 2004). Die autokrine Transaktivierung des FGF-Rezeptor 1 führt zu einer anhaltenden ERK-Phosphorylierung (über 24 h hinaus) in vaskulären SMC (Pratsinis und Kletsas 2007; Rauch et al. 2004), was möglicherweise diesen bimodalen Effekt des FXa zur Folge haben könnte.

#### **4.3.3 Induktion der NF- $\kappa$ B-vermittelten inflammatorischen Marker ICAM-1, IL-8, PAI-1 sowie Induktion des NF- $\kappa$ B-vermittelten oxidativen Markers LOX-1 durch FXa und simulierter Tachyarrhythmie**

Im Rahmen der Aktivierung der MAPK und des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch FXa konnte durch die Untersuchungen für die vorliegende Arbeit ein signifikanter Anstieg der proinflammatorischen Moleküle wie ICAM-1 und IL-8 sowie des prothrombotischen Moleküls PAI-1 im Vorhofgewebe beobachtet werden. Diese Ergebnisse ließen sich auch bei der Durchführung von Western Blots reproduzieren. Interessanterweise deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Applikation von FXa

und applizierter Tachyarrhythmie synergistisch bezüglich der Induktion inflammatorischer und prothrombotischer Gewebseffekte wirken. Der Anstieg der Generierung inflammatorischer Zytokine, Adhäsionsmoleküle und PAI-1 erzeugt einen inflammatorischen, prothrombotischen Zustand im Vorhofendokard, welcher möglicherweise die Bildung atrialer Thromben begünstigt.

Somit konnte in der vorliegenden Studie erstmalig der Effekt des Gerinnungsfaktors Xa auf die Expression dieser drei zuvor genannten Moleküle im Vorhofmyokard demonstriert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen dementsprechend nahe, dass FXa auch auf die Zellen des atrialen Myokards einen inflammatorischen Effekt haben könnte.

In der vorliegenden Studie wurde zudem demonstriert, dass die basale Sekretion des prooxidativen Markers LOX-1 nach Stimulation mit FXa unverändert blieb. Hingegen wurde die Expression auf Transkriptions- und Proteinebene bei zusätzlicher simulierter Tachyarrhythmie 2,5-fach erhöht. Interessanterweise verhinderten Rivaroxaban sowie auch die beiden PAR-Antagonisten diese FXa-abhängige Induktion der LOX-1-Expression auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene signifikant.

Die Funktion von LOX-1 als Risikofaktor für Atherosklerose und die Rolle in der Pathogenese der Endotheldysfunktion und inflammatorischen Prozessen im Endothel sowie im Gefäßsystem wurde unter 1.3.4 bereits kurz erläutert. LOX-1 kann zudem zusätzlich durch Produkte des oxidativen Stresses sowie durch jene Moleküle, welche oxidativen Stress verursachen, hochreguliert werden. Die Aktivierung dieses Rezeptors induziert die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, welche bei oxidativem Stress eine wesentliche pathophysiologische Rolle spielen. In Endothelzellen bindet beispielsweise ox-LDL an LOX-1 und induziert somit die Bildung von Superoxidanionen, welche u.a. die Fähigkeit besitzen NF- $\kappa$ B zu aktivieren und damit die Hochregulation der Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1, P-Selektin oder Chemokinen wie MCP-1 zu bewirken (Sakurai und Sawamura 2003). Dieser Zustand ruft prothrombotische, proinflammatorische Signalprozesse hervor. Um derartige Mechanismen der Thrombenbildung im Vorhofmyokard verhindern zu können, müssen diese und mögliche Präventionsstrategien zukünftig durch weitere Untersuchungen noch besser verstanden werden.

Wie in Abschnitt 4.2 bereits beschrieben, existieren zunehmend mehr Hinweise darauf, dass es eine Verbindung zwischen oxidativen Prozessen und VHF gibt. Mihm et al. (2001) konnten erstmals den substanziellen oxidativen Schaden in atrialem Vorhofmyokard bei Patienten mit chronischem VHF demonstrieren. Die festgestellten oxidativen Modifikationen haben einen beachtlichen Einfluss auf energetische, elektrophysiologische und mechanische Eigenschaften der Vorhofmyozyten und sind somit maßgeblich am atrialen Remodeling beteiligt (Mihm et al. 2001). Weitere Arbeitsgruppen bestätigten diese Mechanismen zur Entstehung von oxidativem Stress durch tieferegehende Untersuchungen (Carnes et al. 2001; van Wagoner 2001). Obwohl der

oxidative Stress einen wesentlichen Beitrag zur kontraktilen Dysfunktion und zum Remodeling bei Herzinsuffizienz leistet, ist die Beurteilung zur Rolle im VHF-vermittelten atrialen Remodelingprozess erst kürzlich erfolgt. Hierbei konnte beispielsweise eine zunehmende Häufigkeit von immundetektierbarem Nitrotyrosin (Marker für nitrosaktiven Stress) in atrialem Gewebe bei Patienten mit persistierendem VHF dokumentiert werden (Mihm et al. 2001). Als eine wichtige Quelle der oxidativen Aktivität in kardialen Myozyten bei Patienten mit VHF wird die NADPH-Oxidase angesehen, welche eine entscheidende Determinante für die myozytäre Hypertrophie, reaktive Fibrose und kontraktile Dysfunktion darstellt (Murdoch et al. 2006). Die Oxidase-Aktivität wird durch Angiotensin II, Endothelin-1, Aldosteron, Dehnung und Tachykardie gesteigert. Weiterhin ist die Aktivität in insuffizienten Ventrikeln (Murdoch et al. 2006) und flimmernden Vorhöfen erhöht (Dudley 2005; Kim et al. 2005).

Durch die bedeutende Stellung des oxidativen Stresses in der Pathogenese und Aufrechterhaltung von VHF, fokussiert sich das Interesse zunehmend auf die Effekte des oxidativen Stresses auf das atriale Myokard sowie Möglichkeiten zur Abschwächung prooxidativer Prozesse. Bukowska et al. (2008) zeigten an Gewebeproben von Patienten mit VHF *in vitro* die Akkumulation von NF- $\kappa$ B und die erhöhte Expression seiner Zielgene ICAM-1 und LOX-1, welches am Vorhofendokard zu einem erhöhten Risiko für Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion beiträgt (Bukowska et al. 2008). Daher scheint die Prävention eines Anstiegs der prothrombogenen Marker LOX-1 und ICAM-1 beispielsweise durch FXa-Inhibitoren ein möglicher Angriffspunkt zu sein, um thrombogene Ereignisse zu vermeiden. Zur Bestätigung der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse sind jedoch weiterführende Experimente notwendig, um weitere Aussagen bezüglich dieser Signaltransduktion treffen zu können.

#### **4.3.4 Antioxidative und antiinflammatorische Effekte des FXa-Inhibitors Rivaroxaban unter den Bedingungen des Vorhofflimmerns**

Nachdem die Ergebnisse dieser Arbeit erfolgreich zeigten, dass die Stimulation des Gewebes durch FXa die Moleküle ERK 1/2, PAR 1/2, NF- $\kappa$ Bp65 sowie die NF- $\kappa$ B-vermittelten Targetproteine ICAM-1, IL-8, PAI-1 sowie LOX-1 sowohl auf Transkriptions- als auch auf Proteinebene hochregulieren kann, sollten weiterführende Experimente in dieser Studie die Effekte von zusätzlicher hochfrequenter simulierter Tachyarrhythmie untersuchen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Studie zeigen die signifikante Erhöhung der Expression des PAR 2 auf Transkriptions- und Proteinebene. Darüber hinaus agieren FXa sowie die *in vitro* erzeugte Tachyarrhythmie synergistisch bezüglich der gesteigerten Expression des PAR 2. Die kombinierte elektrische Stimulation mit Zusatz des aktivierten Gerinnungsfaktors X steigerte die PAR 1-Expression wesentlich stärker als die Elektrostimulation allein. Der orale FXa-Inhibitor

Rivaroxaban erlangte bzgl. der Prävention des FXa-abhängigen Anstiegs der PAR 2-Expression sehr ähnliche Effekte wie der PAR 2-Antagonist GB83. Interessanterweise wirkten beide Antagonisten bezogen auf die Induktion der PAR 1-Expression, welche durch die Elektrostimulation angeregt wurde, signifikant entgegengesetzt. Im Gegensatz dazu zeigte der PAR 1-Antagonist SCH79797 eine große Spezifität gegenüber PAR 1 und beeinflusste die Expression des PAR 2 nur in geringerem Maße.

Hierbei zeigte sich außerdem, dass die NF- $\kappa$ B-induzierte ICAM-1-, IL-8-, PAI-1- und LOX-1-Expression unter hochfrequenter elektrischer Stimulation und zusätzlichem FXa signifikant erhöht wird. Es ist also anzunehmen, dass der Anstieg dieser Moleküle auch *in vivo* bei Patienten mit Vorhofflimmern stattfindet. Dies kann beispielsweise die Arbeit von Bukowska et al. (2008) unterstützen. An atrialen Gewebeschnitten von Patienten mit Vorhofflimmern konnten sie unter anderem oxidativen Stress, welcher mit einer Akkumulation von NF- $\kappa$ B und einer erhöhten Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 und des oxidativen Stress-induzierten Markers LOX-1 vergesellschaftet ist, nachweisen. Diese Veränderungen waren ebenso bei *ex vivo*-elektrostimulierten Geweben reproduzierbar (Bukowska et al. 2008). Weiterhin konnten auch Hammwöhner et al. (2007) bei Patienten mit Vorhofflimmern ein erhöhtes Risiko für eine atriale Thrombusformation eruieren, indem sie eine gesteigerte Expression von ICAM-1 und anderer Moleküle wie VCAM oder MCP-1 demonstrierten (Hammwöhner et al. 2007).

Unter Zugabe von Rivaroxaban zeigte sich unter den Bedingungen des Vorhofflimmerns durch simulierte Tachyarrhythmie bei PAR 1/2, ERK 1/2 sowie ICAM-1, IL-8, PAI-1, LOX-1 eine signifikante Herabregulation. Auf Proteinebene zeigte Rivaroxaban ebenfalls eine Tendenz das Molekül NF- $\kappa$ Bp65 zu vermindern.

#### **4.4 Klinische Relevanz**

Die natürlich und synthetisch vorkommenden FXa-Inhibitoren üben eine starke antikoagulatorische Aktivität aus und haben gezeigt, dass sie als potente antithrombotische Faktoren in Tiermodellen fungieren und die Bildung und das Wachstum venöser und arterieller Thromben verhindern können (Kaiser et al. 1998; Perzborn et al. 2007; Wong et al. 1996). Einige Studien demonstrierten, dass FXa-Inhibitoren neben der antithrombotischen Aktivität auch antiinflammatorische Effekte ausüben (Hoberg et al. 2004; Kaiser et al. 1998; Matsushita et al. 2006; McLean et al. 2001). Die erste Generation der FXa-Inhibitoren, DX-9065a, verhinderte die FXa-induzierte IL-6-mRNA-Expression in humanen Gingiva-Fibroblasten und wurde für ein brauchbares Medikament bei Parodontitis gehalten (Matsushita et al. 2006). Kürzlich konnten Zhou et al. (2011) demonstrieren, dass eine Langzeitanwendung von Rivaroxaban bei Apolipoprotein E-defizienten Mäusen die Expression inflammatorischer Mediatoren wie

beispielsweise IL-6, TNF- $\alpha$  und MCP-1 in Geweben der Aorta reduzierte (Zhou et al. 2011). Der neue orale direkte FXa-Inhibitor Rivaroxaban inhibiert thrombusassoziierte und freie FXa-Aktivitäten, Prothrombinase-Aktivitäten und reduziert die Thrombin-Generierung (Perzborn et al. 2007).

Aufgrund der bekannten bzw. angenommenen Eigenschaften der untersuchten Moleküle ERK 1/2, PAR 1, PAR 2, NF- $\kappa$ Bp65, ICAM-1, IL-8, PAI-1 und LOX-1 und der im Ergebnisteil demonstrierten Effekte von FXa auf diese Moleküle sowie dessen Inhibition, lassen sich einige Schlussfolgerungen daraus ziehen. In der vorliegenden Studie verhinderte Rivaroxaban effektiv die FXa-induzierte IL-8-mRNA-Expression in humanem Vorhofgewebe. Desweiteren zeigte Rivaroxaban unter der kombinierten Applikation von FXa und simulierter Tachyarrhythmie noch ausgeprägtere antiinflammatorische Effekte in humanem Vorhofgewebe, sogar über die Dauer von 24 Stunden. Interessanterweise ließen sich zusätzlich auch andere Effekte mit Rivaroxaban eruieren. Es zeigte demnach antioxidative Effekte durch Reduktion des Anstiegs des Rezeptorproteins LOX-1 und antithrombotische Effekte durch die Reduktion des PAI-1 auf Transkriptionsebene. Es ist von großer Bedeutung, auf molekularer Ebene verdeutlichen zu können, dass inflammatorische und oxidative Signalprozesse ähnliche Mechanismen teilen, einschließlich der Aktivierung von mitogenaktivierten Proteinkinasen und des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. Demnach zeigt Rivaroxaban wahrscheinlich auch positive Effekte bei Patienten mit Vorhofflimmern, welche außerhalb des Zielbereichs für eine antikoagulatorische Therapie liegen.

Die vorliegende Arbeit deutet darauf hin, dass Rivaroxaban die Tachykardie-induzierte Hypertrophie-Reaktion und den oxidativen Stress im Myokard wesentlich reduzieren kann. Anhand des Stimulations-Modells konnte demonstriert werden, dass proarrhythmogene und prothrombogene Veränderungen des atrialen Gewebes, welche u.a. durch oxidativen Stress verursacht werden können, durch die Inhibition der oxidativen Moleküle ICAM-1 und LOX-1 möglicherweise unterdrückt werden können. Spezifische Begleiterkrankungen wie Diabetes mellitus, Hypertonie und Herzinsuffizienz sind dafür bekannt, die Expression der prothrombotischen endokardialen Marker in flimmernden Vorhöfen zu beeinflussen. Demnach könnte darüber spekuliert werden, ob die Inhibition der FXa-induzierten Effekte einen besonderen Einfluss auf diese Patienten haben könnte. Dementsprechend könnte die Therapie mit Rivaroxaban von außerordentlicher Bedeutsamkeit bei Patienten mit begleitenden endokardialen Risikofaktoren sein. Diese Vermutung wird durch die On Treatment-Analyse der ROCKET-AF-Studie gestützt, welche bereits demonstriert hat, dass Rivaroxaban der Warfarin-Therapie bezüglich Hochrisiko-Patienten mit Vorhofflimmern (Studienpopulation der ROCKET-AF-Studie mit mittlerem CHADS<sub>2</sub>-Score von 3,5) überlegen ist (Patel et al. 2011). Obwohl Thrombininhibitoren effektive Gerinnungshemmer darstellen, können sie die FXa-induzierten

Signalprozesse nicht inhibieren. So bleibt die induktive FXa-Wirkung auch in Gegenwart des für die Versuche genutzten direkten Thrombininhibitors Lepirudin (Refludan) erhalten und wird insbesondere über PAR 2 vermittelt, während PAR 1 hierbei eine geringere Bedeutung hat. FXa-Inhibitoren reduzieren im Gegensatz zu direkten Thrombininhibitoren wie Dabigatran, Argatroban oder Hirudine die Thrombinproduktion entweder durch den extrinsischen oder den intrinsischen Weg, ohne die Basisthrombinproduktion, welche für eine normale Hämostase benötigt wird, zu beeinflussen (Harker et al. 1997). Somit ist anzunehmen, dass Inhibitoren des aktiven Zentrums von FXa den Thrombininhibitoren überlegen sein könnten. Interessanterweise wurde durch die ATLAS ACS2 TIMI 51-Studie nachgewiesen, dass die Rivaroxabantherapie der konventionellen Therapie nach koronaren Interventionen überlegen ist (Mega et al. 2012), was wahrscheinlich auf protektive Effekte von Rivaroxaban auf Endothelzellen zurückzuführen ist. Demgegenüber war die Myokardinfarktrate tendenziell höher bei den Patienten, welche mit dem Thrombininhibitor Dabigatran behandelt wurden, verglichen mit der Warfarin-Therapie (RE-LY Trial) (Connolly et al. 2010).

Mit dem Hintergrund der in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse kann zusammenfassend postuliert werden, dass Rivaroxaban wahrscheinlich durch direkte antioxidative Effekte protektive Wirkungen auf das Remodeling im humanen atrialen Myokard vermittelt. Die Ergebnisse zeigen, dass FXa via Stimulation von Protease-aktivierten Rezeptoren, insbesondere PAR 2, an strukturellen, arrhythmogenen und prothrombogenen Veränderungen im Vorhofgewebe beteiligt ist und somit einen Anstieg der Inzidenz von Schlaganfällen bei Patienten mit Vorhofflimmern erklärt.

In vorherigen Studien standen bisher der Einfluss und die Wirkungen von FXa auf das Gefäßsystem sowie andere Gewebe im Vordergrund; in dieser Arbeit fokussierte sich das Interesse auf den Einfluss von FXa auf das humane Vorhofmyokard selbst. Die experimentellen Befunde dieser Arbeit müssen jedoch noch in weiteren Untersuchungen in der klinischen Anwendung bestätigt werden.

Wie bereits im Abschnitt 1.2 beschrieben, spielt FXa desweiteren auch eine Rolle im Prozess der Tumormetastasierung. Somit könnte dies ein weiteres Anwendungsspektrum für FXa-Inhibitoren darstellen. Banke et al. demonstrierten bereits 2005, dass die Behandlung von Mäusen mit dem direkten FXa-Inhibitor WX-FX4 mit einer signifikanten Reduktion der Tumormetastasierung einherging und dies bereits unter solchen Konzentrationen, bei denen nur wenige antikoagulatorische Effekte auftraten (Banke et al. 2005).

#### 4.5 Limitationen der Studie

In der durchgeführten Studie gibt es einige Faktoren, die die Aussagekraft der aufgeführten Ergebnisse einschränken. Da in der vorliegenden Studie das linke Herzohr nicht untersucht wurde, kann keine Aussage über interatriale Unterschiede getroffen werden. Obwohl pathologische Veränderungen wahrscheinlich im linken Vorhof ausgeprägter sind, gibt es bisher keine Daten, die auf einen prinzipiellen Unterschied bezüglich der molekularen Signalkaskaden im linken und rechten Vorhof hinweisen. Alle Patienten, welche in diese Studie eingeschlossen waren, unterzogen sich einer Herzoperation bei zugrundeliegender Koronarer Herzerkrankung oder eines Herzklappendefektes mit begleitender arterieller Hypertonie und/oder Diabetes mellitus, sodass keine Aussage über die Veränderungen im Vorhof in anderen Populationen gemacht werden kann. Im Gegensatz zu Tierstudien wurde hierbei keine gesunde Kontrollgruppe untersucht. Eine weitere Einschränkung der Aussagekraft entstand durch die Unmöglichkeit der Messung von intrazellulären Kalziumkonzentrationen in den Gewebeschnitten während der Kultivierung oder Stimulation aufgrund technischer Probleme bezüglich der Dicke der Schnitte und Dimension der Geräte, welche für das aufgeführte *in vitro*-Modell genutzt wurde. Weiterhin könnte die für die *in vitro*-Experimente genutzte hohe Konzentration an FXa Zweifel bzgl. der Relevanz für *in vivo*-Modelle aufkommen lassen. Im Plasma findet sich eine FX-Konzentration von 178nM (Furie und Furie 1988). Allerdings ist die Konzentration des FXa, welches lokal *in vivo* generiert werden kann, bisher unbekannt. Deshalb könnte die Konzentration des aktivierten Faktor X theoretisch eine höhere Konzentration am Ort der lokalen FXa-Aktivierung erreichen und somit intrazelluläre Signalprozesse *in vivo* beeinflussen. Die Gen-Induktion erfordert eine FXa-Konzentration von 10nM; eine Konzentration, welche der Bindungsaffinität der Zellmembran für FXa entspricht. (Riewald und Ruf 2001). Selbstverständlich sollten zukünftige Forschungen die *in vivo*-Relevanz von FXa bei Vorhofflimmern klären.

## 5 Zusammenfassung

Der aktivierte Faktor X (FXa) spielt als Thrombingenerator eine bedeutende Rolle in der Blutgerinnungskaskade, welche auch während des Vorhofflimmerns aktiviert wird. Zunehmend deuten immer mehr Studien darauf hin, dass FXa die Signaltransduktion in verschiedenen Zelltypen beeinflusst, indem es Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) aktiviert. Bisher war nicht bekannt, ob molekulare Effekte von FXa die atriale Signaltransduktion beeinflussen. Weiterhin ist auch der Effekt von FXa und sein kombinierter Effekt mit einer hochfrequenten *ex vivo*-Elektrostimulation auf die zelluläre Signaltransduktion nicht bekannt. Um die Effekte von FXa zu untersuchen, wurden humane Gewebsschnitte des Vorhofes mit bestimmten FXa-Konzentrationen bis zu 24 Stunden kultiviert. Zur Simulation des Vorhofflimmerns wurden diese zusätzlich bei 4,0 Hz im elektrischen Feld stimuliert. Weiterhin wurde der hemmende Einfluss des FXa-Antagonisten Rivaroxaban, des PAR 1-Antagonisten SCH79797 und des PAR 2-Antagonisten GB83 unter experimentellen Bedingungen analysiert. Die Exposition des Vorhofgewebes mit FXa ergab eine 1,7 fache Hochregulation der PAR 2-mRNA, die Aktivierung der MAP-Kinasen (ERK 1/2) und des NF- $\kappa$ B-Signalweges. Weiterhin erhöhte FXa die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 ( $1,82 \pm 0,20$ ,  $p=0,0001$ ), des Chemokins IL-8 ( $1,95 \pm 0,20$ ,  $p=0,0001$ ) sowie die des prothrombotischen Moleküls PAI-1 ( $1,52 \pm 0,17$ ,  $p=0,007$ ). Die Kombination von simulierter Tachyarrhythmie und FXa verursachte eine signifikante Hochregulation von PAR 1 ( $2,82 \pm 0,22$ ,  $p=0,0001$ ), PAR 2 ( $2,66 \pm 0,41$ ,  $p=0,0001$ ), ICAM-1 ( $2,13 \pm 0,25$ ,  $p=0,001$ ), IL-8 ( $2,22 \pm 0,24$ ,  $p=0,001$ ), LOX-1 ( $2,59 \pm 0,35$ ,  $p=0,0001$ ) sowie PAI-1 ( $2,65 \pm 0,52$ ,  $p=0,008$ ) auf Transkriptionsebene. Rivaroxaban und GB83 konnten die Hochregulation der PAR, ICAM-1, LOX-1, IL-8 und die Aktivierung der MAP-Kinasen verhindern. Der Anstieg in der Expression von PAI-1 konnte durch SCH79797 oder durch Rivaroxaban verhindert werden. Die vorliegende Arbeit impliziert, dass FXa inflammatorische Signalprozesse im Vorhofgewebe vermittelt. Bedeutenderweise agieren FXa sowie die simulierte Tachyarrhythmie synergistisch bezüglich der gesteigerten Expression der PAR und der proinflammatorischen Moleküle. Deshalb könnte FXa ein zusätzlicher Faktor bezüglich des gut beschriebenen Phänomens des strukturellen Remodelings der Vorhöfe bei Patienten mit Vorhofflimmern sein und eine substanzielle Hochregulation von prothrombotischen Endokardveränderungen verursachen. Rivaroxaban verhinderte die FXa-induzierten molekularen Effekte in humanen Vorhofgeweben effektiv, insbesondere während der schnellen Vorhofstimulation. Insgesamt scheinen FXa und die Protease-aktivierten Rezeptoren möglicherweise neue therapeutische Angriffspunkte zu sein, um das strukturelle Vorhofremodeling zu verhindern. Jedoch sollten in Zukunft weitere Experimente an *in vivo*-Modellen vorgenommen werden, um diese beschriebenen Ergebnisse zu bestätigen.

## Literaturverzeichnis

1. Ahn, H. S., Foster, C., Boykow, G., Stamford, A., Manna, M., Graziano, M.: Inhibition of cellular action of thrombin by N3-cyclopropyl-7-4-(1-methylethyl)phenylmethyl-7H-pyrrolo3, 2-fquinazoline-1,3-diamine (SCH 79797), a nonpeptide thrombin receptor antagonist. *Biochem Pharmacol.* 60. 1425–1434 (2000)
2. Akhmedov, A., Rozenberg, I., Paneni, F., Camici, G. G., Shi, Y., Doerries, C. et al.: Endothelial overexpression of LOX-1 increases plaque formation and promotes atherosclerosis in vivo. *Eur Heart J* (2014)
3. Allesie, M., Ausma, J., Schotten, U.: Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 54. 230–246 (2002)
4. Allesie, M. A.: Atrial electrophysiologic remodeling: another vicious circle? *J Cardiovasc Electrophysiol.* 9. 1378–1393 (1998)
5. Altieri, D. C., Stamnes, S. J.: Protease-dependent T cell activation: ligation of effector cell protease receptor-1 (EPR-1) stimulates lymphocyte proliferation. *Cell Immunol.* 155. 372–383 (1994)
6. Anderson, N. G., Maller, J. L., Tonks, N. K., Sturgill, T. W.: Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature.* 343. 651–653 (1990)
7. Asakura, H., Hifumi, S., Jokaji, H., Saito, M., Kumabashiri, I., Uotani, C. et al.: Prothrombin fragment F1 + 2 and thrombin-antithrombin III complex are useful markers of the hypercoagulable state in atrial fibrillation. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 3. 469–473 (1992)
8. Bachli, E. B., Pech, C. M., Johnson, K. M., Johnson, D. J. D., Tuddenham, E. G. D., McVey, J. H.: Factor Xa and thrombin, but not factor VIIa, elicit specific cellular responses in dermal fibroblasts. *J Thromb Haemost.* 1. 1935–1944 (2003)
9. Baeuerle, P. A., Henkel, T.: Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 12. 141–179 (1994)
10. Banke, I. J., Arlt, M. J. E., Mueller, M. M., Sperl, S., Stemberger, A., Sturzebecher, J. et al.: Effective inhibition of experimental metastasis and prolongation of survival in mice by a potent factor Xa-specific synthetic serine protease inhibitor with weak anticoagulant activity. *Thromb Haemost.* 94. 1084–1093 (2005)
11. Barry, G. D., Suen, J. Y., Le, G. T., Cotterell, A., Reid, R. C., Fairlie, D. P.: Novel agonists and antagonists for human protease activated receptor 2. *J Med Chem.* 53. 7428–7440 (2010)
12. Bauersachs, R., Berkowitz, S. D., Brenner, B., Buller, H. R., Decousus, H., Gallus, A. S. et al.: Oral rivaroxaban for symptomatic venous thromboembolism. *N Engl J Med.* 363. 2499–2510 (2010)
13. Benjamin, E. J., Levy, D., Vaziri, S. M., D'Agostino, R. B., Belanger, A. J., Wolf, P. A.: Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort. The Framingham Heart Study. *JAMA.* 271. 840–844 (1994)

14. Benjamin, E. J., Wolf, P. A., D'Agostino, R. B., Silbershatz, H., Kannel, W. B., Levy, D.: Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 98. 946–952 (1998)
15. Bernhardt, P., Schmidt, H., Hammerstingl, C., Luderitz, B., Omran, H.: Patients at high risk with atrial fibrillation: a prospective and serial follow-up during 12 months with transesophageal echocardiography and cerebral magnetic resonance imaging. *J Am Soc Echocardiogr*. 18. 919–924 (2005)
16. Binder, B. R., Mihaly, J.: The plasminogen activator inhibitor "paradox" in cancer. *Immunol Lett*. 118. 116–124 (2008)
17. 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. *Biochem J*. 314 (Pt 3). 1009–1016 (1996)
18. Borensztajn, K., Aberson, H., Peppelenbosch, M. P., Spek, C. A.: FXa-induced intracellular signaling links coagulation to neoangiogenesis: potential implications for fibrosis. *Biochim Biophys Acta*. 1793. 798–805 (2009)
19. Borensztajn, K., Peppelenbosch, M. P., Spek, C. A.: Factor Xa: at the crossroads between coagulation and signaling in physiology and disease. *Trends Mol Med*. 14. 429–440 (2008a)
20. 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. 309–320 (2008b)
21. Borensztajn, K. S., Bijlsma, M. F., Groot, A. P., Bruggemann, L. W., Versteeg, H. H., Reitsma, P. H. et al.: Coagulation factor Xa drives tumor cells into apoptosis through BH3-only protein Bim up-regulation. *Exp Cell Res*. 313. 2622–2633 (2007)
22. Borissoff, J. I., Spronk, H. M. H., ten Cate, H.: The Hemostatic System as a Modulator of Atherosclerosis. *N Engl J Med*. 364. 1746–1760 (2011)
23. Brand, F. N., Abbott, R. D., Kannel, W. B., Wolf, P. A.: Characteristics and prognosis of lone atrial fibrillation. 30-year follow-up in the Framingham Study. *JAMA*. 254. 3449–3453 (1985)
24. Bretschneider, E., Schror, K.: Cellular effects of factor Xa on vascular smooth muscle cells--inhibition by heparins? *Semin Thromb Hemost*. 27. 489–493 (2001)
25. Brundel, B. J., van Gelder, I. C., Henning, R. H., Tuinenburg, A. E., Deelman, L. E., Tieleman, R. G. et al.: Gene expression of proteins influencing the calcium homeostasis in patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 42. 443–454 (1999)
26. Bueno, O. F., Molkentin, J. D.: Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ Res*. 91. 776–781 (2002)
27. Bukowska, A., Schild, L., Keilhoff, G., Hirte, D., Neumann, M., Gardemann, A. et al.: Mitochondrial Dysfunction and Redox Signaling in Atrial Tachyarrhythmia. *Experimental Biology and Medicine*. 233. 558–574 (2008)
28. Buller, H. R., Prins, M. H., Lensin, A. W. A., Decousus, H., Jacobson, B. F., Minar, E. et al.: Oral rivaroxaban for the treatment of symptomatic pulmonary embolism. *N Engl J Med*. 366. 1287–1297 (2012)

29. Bussek, A., Wettwer, E., Christ, T., Lohmann, H., Camelliti, P., Ravens, U.: Tissue slices from adult mammalian hearts as a model for pharmacological drug testing. *Cell Physiol Biochem.* 24. 527–536 (2009)
30. Camm, A. J., Kirchhof, P., Lip, G. Y. H., Schotten, U., Savelieva, I., Ernst, S. et al.: Guidelines for the management of atrial fibrillation: The Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Europace.* 12. 1360–1420 (2010)
31. Camm, A. J., Lip, G. Y. H., Caterina, R. de, 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. *European Heart Journal.* 33. 2719–2747 (2012)
32. Carnes, C. A., Chung, M. K., Nakayama, T., Nakayama, H., Baliga, R. S., Piao, S. et al.: Ascorbate attenuates atrial pacing-induced peroxynitrite formation and electrical remodeling and decreases the incidence of postoperative atrial fibrillation. *Circ Res.* 89. E32-8 (2001)
33. Chang, L., Karin, M.: Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 410. 37–40 (2001)
34. Chomczynski, P., Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162. 156–159 (1987)
35. Cirino, G., Cicala, C., Bucci, M., Sorrentino, L., Ambrosini, G., DeDominicis, G., Altieri, D. C.: Factor Xa as an interface between coagulation and inflammation. Molecular mimicry of factor Xa association with effector cell protease receptor-1 induces acute inflammation in vivo. *J Clin Invest.* 99. 2446–2451 (1997)
36. Cohen, A. T., Spiro, T. E., Buller, H. R., Haskell, L., Hu, D., Hull, R. et al.: Extended-duration rivaroxaban thromboprophylaxis in acutely ill medical patients: MAGELLAN study protocol. *J Thromb Thrombolysis.* 31. 407–416 (2011)
37. Connolly, S. J., Ezekowitz, M. D., Yusuf, S., Reilly, P. A., Wallentin, L.: Newly identified events in the RE-LY trial. *N Engl J Med.* 363. 1875–1876 (2010)
38. Conway, D. S. G., Pearce, L. A., Chin, B. S. P., Hart, R. G., Lip, G. Y. H.: Prognostic value of plasma von Willebrand factor and soluble P-selectin as indices of endothelial damage and platelet activation in 994 patients with nonvalvular atrial fibrillation. *Circulation.* 107. 3141–3145 (2003)
39. Coughlin, S. R.: Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature.* 407. 258–264 (2000)
40. Coughlin, S. R., Camerer, E.: PARTicipation in inflammation. *J Clin Invest.* 111. 25–27 (2003)
41. Currie, C. J., Jones, M., Goodfellow, J., McEwan, P., Morgan, C. L., Emmas, C., Peters, J. R.: Evaluation of survival and ischaemic and thromboembolic event rates in patients with non-valvular atrial fibrillation in the general population when treated and untreated with warfarin. *Heart.* 92. 196–200 (2006)
42. del Zoppo, G. J., Eliasziw, M.: New options in anticoagulation for atrial fibrillation. *N Engl J Med.* 365. 952–953 (2011)

43. Di Serio, C., Pellerito, S., Duarte, M., Massi, D., Naldini, A., Cirino, G. et al.: Protease-activated receptor 1-selective antagonist SCH79797 inhibits cell proliferation and induces apoptosis by a protease-activated receptor 1-independent mechanism. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 101. 63–69 (2007)
44. Dudley, S. C.: Atrial Fibrillation Increases Production of Superoxide by the Left Atrium and Left Atrial Appendage: Role of the NADPH and Xanthine Oxidases. *Circulation.* 112. 1266–1273 (2005)
45. Eriksson, B. I., Borris, L. C., Friedman, R. J., Haas, S., Huisman, M. V., Kakkar, A. K. et al.: Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after hip arthroplasty. *N Engl J Med.* 358. 2765–2775 (2008)
46. Ettinger, P. O., Wu, C. F., De La Cruz, C Jr, Weisse, A. B., Ahmed, S. S., Regan, T. J.: Arrhythmias and the "Holiday Heart": alcohol-associated cardiac rhythm disorders. *Am Heart J.* 95. 555–562 (1978)
47. Feng, D., D'Agostino, R. B., Silbershatz, H., Lipinska, I., Massaro, J., Levy, D. et al.: Hemostatic state and atrial fibrillation (the Framingham Offspring Study). *Am J Cardiol.* 87. 168–171 (2001)
48. Fox, C. S., Parise, H., D'Agostino, R. B. Sr, Lloyd-Jones, D. M., Vasan, R. S., Wang, T. J. et al.: Parental atrial fibrillation as a risk factor for atrial fibrillation in offspring. *JAMA.* 291. 2851–2855 (2004)
49. Freestone, B., Lip, G. Y. H.: The endothelium and atrial fibrillation. The prothrombotic state revisited. *Hamostaseologie.* 28. 207–212 (2008)
50. Frost, L., Vestergaard, P., Mosekilde, L.: Hyperthyroidism and risk of atrial fibrillation or flutter: a population-based study. *Arch Intern Med.* 164. 1675–1678 (2004)
51. Fukuchi, M., Watanabe, J., Kumagai, K., Katori, Y., Baba, S., Fukuda, K. et al.: Increased von Willebrand factor in the endocardium as a local predisposing factor for thrombogenesis in overloaded human atrial appendage. *J Am Coll Cardiol.* 37. 1436–1442 (2001)
52. Furie, B., Furie, B. C.: The molecular basis of blood coagulation. *Cell.* 53. 505–518 (1988)
53. Fuster, V., Ryden, L. E., Cannom, D. S., Crijns, H. J., Curtis, A. B., Ellenbogen, K. A. et al.: ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation-executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2001 Guidelines for the Management of Patients with Atrial Fibrillation). *Eur Heart J.* 27. 1979–2030 (2006)
54. 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 developed in partnership with the European Society of Cardiology and in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *J Am Coll Cardiol.* 57. e101-98 (2011)
55. Garg, N., Fay, W. P.: Plasminogen activator inhibitor-1 and restenosis. *Curr Drug Targets.* 8. 1003–1006 (2007)

56. Gibson, C. M., Mega, J. L., Burton, P., Goto, S., Verheugt, F., Bode, C. et al.: Rationale and design of the Anti-Xa therapy to lower cardiovascular events in addition to standard therapy in subjects with acute coronary syndrome-thrombolysis in myocardial infarction 51 (ATLAS-ACS 2 TIMI 51) trial: a randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and safety of rivaroxaban in subjects with acute coronary syndrome. *Am Heart J.* 161. 815-821.e6 (2011)
57. Go, A. S., Hylek, E. M., Phillips, K. A., Chang, Y., Henault, L. E., Selby, J. V., Singer, D. E.: Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *JAMA.* 285. 2370–2375 (2001)
58. Goette, A., Arndt, M., Rocken, C., Spiess, A., Staack, T., Geller, J. C. et al.: Regulation of angiotensin II receptor subtypes during atrial fibrillation in humans. *Circulation.* 101. 2678–2681 (2000a)
59. Goette, A., Arndt, M., Rocken, C., Staack, T., Bechtloff, R., Reinhold, D. et al.: Calpains and cytokines in fibrillating human atria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283. H264-72 (2002a)
60. Goette, A., Bukowska, A., Lendeckel, U., Erxleben, M., Hammwohner, M., Strugala, D. et al.: Angiotensin II Receptor Blockade Reduces Tachycardia-Induced Atrial Adhesion Molecule Expression. *Circulation.* 117. 732–742 (2008)
61. Goette, A., Honeycutt, C., Langberg, J. J.: Electrical remodeling in atrial fibrillation. Time course and mechanisms. *Circulation.* 94. 2968–2974 (1996)
62. Goette, A., Kalman, J. M., Aguinaga, L., Akar, J., Cabrera, J. A., Chen, S. A. et al.: EHRA/HRS/APHRS/SOLAECE expert consensus on Atrial cardiomyopathies: definition, characterization, and clinical implication. *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology* (2016)
63. Goette, A., Lendeckel, U.: Nonchannel drug targets in atrial fibrillation. *Pharmacol Ther.* 102. 17–36 (2004)
64. Goette, A., Lendeckel, U., Klein, H. U.: Signal transduction systems and atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 54. 247–258 (2002b)
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. *J Am Coll Cardiol.* 35. 1669–1677 (2000b)
66. Grammer, J. B., Bosch, R. F., Kuhlkamp, V., Seipel, L.: Molecular and electrophysiological evidence for "remodeling" of the L-type Ca<sup>2+</sup> channel in persistent atrial fibrillation in humans. *Z Kardiol.* 89 Suppl 4. IV23-9 (2000)
67. Grandaliano, G., Pontrelli, P., Cerullo, G., Monno, R., Ranieri, E., Ursi, M. et al.: Protease-activated receptor-2 expression in IgA nephropathy: a potential role in the pathogenesis of interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 14. 2072–2083 (2003)
68. Gustafsson, C., Blomback, M., Britton, M., Hamsten, A., Svensson, J.: Coagulation factors and the increased risk of stroke in nonvalvular atrial fibrillation. *Stroke.* 21. 47–51 (1990)

69. Hammwohner, M., Goette, A.: The Impact of Novel Anticoagulants: Should All AF Patients Now Be Anticoagulated? *Journal of cardiovascular pharmacology*. 66. 530–539 (2015)
70. Hammwöhner, M., Ittenson, A., Dierkes, J., Bukowska, A., Klein, H. U., Lendeckel, U., Goette, A.: Platelet expression of CD40/CD40 ligand and its relation to inflammatory markers and adhesion molecules in patients with atrial fibrillation. *Experimental Biology and Medicine*. 232. 581–589 (2007)
71. Harker, L. A., Hanson, S. R., Kelly, A. B.: Antithrombotic strategies targeting thrombin activities, thrombin receptors and thrombin generation. *Thromb Haemost*. 78. 736–741 (1997)
72. Hobbs, F. D. R., Fitzmaurice, D. A., Mant, J. et al.: Detection of atrial fibrillation in people aged 65 and over. *Health Technology Assessment*. 40. 1–90 (2005)
73. Hoberg, J. E., Yeung, F., Mayo, M. W.: SMRT derepression by the I $\kappa$ B kinase alpha: a prerequisite to NF- $\kappa$ B transcription and survival. *Mol Cell*. 16. 245–255 (2004)
74. Jiang, R., Wang, N.-P., Tanaka, K. A., Levy, J. H., Guyton, R. A., Zhao, Z.-Q., Vinten-Johansen, J.: Factor Xa induces tissue factor expression in endothelial cells by P44/42 MAPK and NF- $\kappa$ B-dependent pathways. *J Surg Res*. 169. 319–327 (2011)
75. Jobi, K., Rauch, B. H., Dangwal, S., Freidel, K., Doller, A., Eberhardt, W. et al.: Redox regulation of human protease-activated receptor-2 by activated factor X. *Free Radic Biol Med*. 51. 1758–1764 (2011)
76. Kaiser, B.: DX-9065a, a direct inhibitor of factor Xa. *Cardiovasc Drug Rev*. 21. 91–104 (2003)
77. Kaiser, B., Hoppensteadt, D. H., Fareed, J.: Recombinant TFPI and variants: potential implications in the treatment of cardiovascular disorders. *Expert Opin Investig Drugs*. 7. 1121–1137 (1998)
78. Kakkar, A. K., Brenner, B., Dahl, O. E., Eriksson, B. I., Mouret, P., Muntz, J. et al.: Extended duration rivaroxaban versus short-term enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after total hip arthroplasty: a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 372. 31–39 (2008)
79. Kakutani, M., Masaki, T., Sawamura, T.: A platelet-endothelium interaction mediated by lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97. 360–364 (2000)
80. Kamiyama, N.: Expression of Cell Adhesion Molecules and the Appearance of Adherent Leukocytes on the Left Atrial Endothelium With Atrial Fibrillation. *Jpn Circ J.* 62. 837–843 (1998)
81. Kamp, O., Verhorst, P. M., Welling, R. C., Visser, C. A.: Importance of left atrial appendage flow as a predictor of thromboembolic events in patients with atrial fibrillation. *Eur Heart J*. 20. 979–985 (1999)
82. Kandulski, A., Wex, T., Monkemuller, K., Kuester, D., Fry, L. C., Roessner, A., Malfertheiner, P.: Proteinase-activated receptor-2 in the pathogenesis of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol*. 105. 1934–1943 (2010)

83. Kannel, W. B., Wolf, P. A., Benjamin, E. J., Levy, D.: Prevalence, Incidence, Prognosis, and Predisposing Conditions for Atrial Fibrillation: Population-Based Estimates. *Am J Cardiol.* 82. 2N-9N (1998)
84. Keuren, J. F. W., Wielders, S. J. H., Ulrichs, H., Hackeng, T., Heemskerk, J. W. M., Deckmyn, H. et al.: Synergistic effect of thrombin on collagen-induced platelet procoagulant activity is mediated through protease-activated receptor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25. 1499–1505 (2005)
85. Kim, Y. M., Guzik, T. J., Zhang, Y. H., Zhang, M. H., Kattach, H., Ratnatunga, C. et al.: A myocardial Nox2 containing NAD(P)H oxidase contributes to oxidative stress in human atrial fibrillation. *Circ Res.* 97. 629–636 (2005)
86. Kistler, P. M., Sanders, P., Dodic, M., Spence, S. J., Samuel, C. S., Zhao, C. et al.: Atrial electrical and structural abnormalities in an ovine model of chronic blood pressure elevation after prenatal corticosteroid exposure: implications for development of atrial fibrillation. *European Heart Journal.* 27. 3045–3056 (2006)
87. Ko, F. N., Yang, Y. C., Huang, S. C., Ou, J. T.: Coagulation factor Xa stimulates platelet-derived growth factor release and mitogenesis in cultured vascular smooth muscle cells of rat. *J Clin Invest.* 98. 1493–1501 (1996)
88. Konstantinides, S., Schafer, K., Loskutoff, D. J.: Do PAI-1 and vitronectin promote or inhibit neointima formation? The exact role of the fibrinolytic system in vascular remodeling remains uncertain. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22. 1943–1945 (2002)
89. Lassen, M. R., Ageno, W., Borris, L. C., Lieberman, J. R., Rosencher, N., Bandel, T. J. et al.: Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after total knee arthroplasty. *N Engl J Med.* 358. 2776–2786 (2008)
90. Levy, S., Maarek, M., Coumel, P., Guize, L., Lekieffre, J., Medvedowsky, J. L., Sebaoun, A.: Characterization of different subsets of atrial fibrillation in general practice in France: the ALFA study. The College of French Cardiologists. *Circulation.* 99. 3028–3035 (1999)
91. Lima, L. G., Monteiro, R. Q.: Activation of blood coagulation in cancer: implications for tumour progression. *Biosci Rep.* 33 (2013)
92. 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. 527–533 (1995)
93. Lip, G. Y. H.: Stroke in atrial fibrillation: epidemiology and thromboprophylaxis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 9. 344–351 (2011)
94. Lip, G. Y. H., Andreotti, F., Fauchier, L., Huber, K., Hylek, E., Knight, E. et al.: Bleeding risk assessment and management in atrial fibrillation patients: a position document from the European Heart Rhythm Association, endorsed by the European Society of Cardiology Working Group on Thrombosis. *Europace.* 13. 723–746 (2011)
95. Lip, G. Y. H., Nieuwlaat, R., Pisters, R., Lane, D. A., Crijns, H. J. G. M.: 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. 263–272 (2010)

96. Lips, D. J., Bueno, O. F., Wilkins, B. J., Purcell, N. H., Kaiser, R. A., Lorenz, J. N. et al.: MEK1-ERK2 signaling pathway protects myocardium from ischemic injury in vivo. *Circulation*. 109. 1938–1941 (2004)
97. Lloyd-Jones, D. M., Wang, T. J., Leip, E. P., Larson, M. G., Levy, D., Vasan, R. S. et al.: Lifetime risk for development of atrial fibrillation: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 110. 1042–1046 (2004)
98. Macfarlane, S. R., Seatter, M. J., Kanke, T., Hunter, G. D., Plevin, R.: Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev*. 53. 245–282 (2001)
99. Major, C. D., Santulli, R. J., Derian, C. K., Andrade-Gordon, P.: Extracellular mediators in atherosclerosis and thrombosis: lessons from thrombin receptor knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 23. 931–939 (2003)
100. Martorell, L., Martinez-Gonzalez, J., Rodriguez, C., Gentile, M., Calvayrac, O., Badimon, L.: Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis. *Thromb Haemost*. 99. 305–315 (2008)
101. Matsushita, K., Imamura, T., Tomikawa, M., Tanchaoren, S., Tatsuyama, S., Maruyama, I.: DX-9065a inhibits proinflammatory events induced by gingipains and factor Xa. *J Periodontal Res*. 41. 148–156 (2006)
102. 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. 281–297 (2001)
103. McMichael, J.: History of atrial fibrillation 1628-1819 Harvey - de Senac - Laennec. *Br Heart J*. 48. 193–197 (1982)
104. Mega, J. L., Braunwald, E., Murphy, S. A., Plotnikov, A. N., Burton, P., Kiss, R. G. et al.: Rivaroxaban in patients stabilized after a ST-segment elevation myocardial infarction: results from the ATLAS ACS-2-TIMI-51 trial (Anti-Xa Therapy to Lower Cardiovascular Events in Addition to Standard Therapy in Subjects with Acute Coronary Syndrome-Thrombolysis In Myocardial Infarction-51). *J Am Coll Cardiol*. 61. 1853–1859 (2013)
105. Mega, J. L., Braunwald, E., Wiviott, S. D., Bassand, J.-P., Bhatt, D. L., Bode, C. et al.: Rivaroxaban in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med*. 366. 9–19 (2012)
106. Meltzer, M. E., Lisman, T., de Groot, P. G., Meijers, J. C. M., Le Cessie, S., Doggen, C. J. M., Rosendaal, F. R.: Venous thrombosis risk associated with plasma hypofibrinolysis is explained by elevated plasma levels of TAFI and PAI-1. *Blood*. 116. 113–121 (2010)
107. Mihm, M. J., Yu, F., Carnes, C. A., Reiser, P. J., McCarthy, P. M., van Wagoner, D. R., Bauer, J. A.: Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. *Circulation*. 104. 174–180 (2001)
108. Moe, G. K., Rheinboldt, W. C., Abildskov, J. A.: A computer model of atrial fibrillation. *Am Heart J*. 67. 200–220 (1964)
109. Morris, D. R., Ding, Y., Ricks, T. K., Gullapalli, A., Wolfe, B. L., Trejo, J.: Protease-activated receptor-2 is essential for factor VIIa and Xa-induced signaling, migration, and invasion of breast cancer cells. *Cancer Res*. 66. 307–314 (2006)

110. Morrow, D. A., Braunwald, E., Bonaca, M. P., Ameriso, S. F., Dalby, A. J., Fish, M. P. et al.: Vorapaxar in the secondary prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med.* 366. 1404–1413 (2012)
111. Murdoch, C. E., Zhang, M., Cave, A. C., Shah, A. M.: NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. *Cardiovasc Res.* 71. 208–215 (2006)
112. Murphy, K. P.; Travers, P.; Walport, M. (2009): Janeway Immunologie. 7. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag
113. Nattel, S.: New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature.* 415. 219–226 (2002)
114. Ossovskaya, V. S., Bunnett, N. W.: Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev.* 84. 579–621 (2004)
115. Patel, M. R., Mahaffey, K. W., Garg, J., Pan, G., Singer, D. E., Hacke, W. et al.: Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation. *N Engl J Med.* 365. 883–891 (2011)
116. 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. 2298–2306 (2007)
117. Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M. H.: Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 22. 153–183 (2001)
118. Perzborn, E., Kubitz, D., Misselwitz, F.: Rivaroxaban. A novel, oral, direct factor Xa inhibitor in clinical development for the prevention and treatment of thromboembolic disorders. *Hamostaseologie.* 27. 282–289 (2007)
119. Pratsinis, H., Kletsas, D.: PDGF, bFGF and IGF-I stimulate the proliferation of intervertebral disc cells in vitro via the activation of the ERK and Akt signaling pathways. *Eur Spine J.* 16. 1858–1866 (2007)
120. Prins, M. H., Hirsh, J.: A critical review of the evidence supporting a relationship between impaired fibrinolytic activity and venous thromboembolism. *Arch Intern Med.* 151. 1721–1731 (1991)
121. Rao, L. V. M., Pendurthi, U. R.: Tissue factor-factor VIIa signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25. 47–56 (2005)
122. Rauch, B. H., Bretschneider, E., Braun, M., Schror, K.: Factor Xa releases matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) from human vascular smooth muscle cells and stimulates the conversion of pro-MMP-2 to MMP-2: role of MMP-2 in factor Xa-induced DNA synthesis and matrix invasion. *Circ Res.* 90. 1122–1127 (2002)
123. 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. *Circ Res.* 94. 340–345 (2004)
124. Riewald, M., Ruf, W.: Mechanistic coupling of protease signaling and initiation of coagulation by tissue factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98. 7742–7747 (2001)

125. Roldan, V., Marin, F., Marco, P., Martinez, J. G., Calatayud, R., Sogorb, F.: Hypofibrinolysis in atrial fibrillation. *Am Heart J.* 136. 956–960 (1998)
126. Sakurai, K., Sawamura, T.: Stress and vascular responses: endothelial dysfunction via lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1: close relationships with oxidative stress. *J Pharmacol Sci.* 91. 182–186 (2003)
127. Sawamura, T., Kume, N., Aoyama, T., Moriwaki, H., Hoshikawa, H., Aiba, Y. et al.: An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature.* 386. 73–77 (1997)
128. Schild, L., Bukowska, A., Gardemann, A., Polczyk, P., Keilhoff, G., Tager, M. et al.: Rapid pacing of embryoid bodies impairs mitochondrial ATP synthesis by a calcium-dependent mechanism—a model of in vitro differentiated cardiomyocytes to study molecular effects of tachycardia. *Biochim Biophys Acta.* 1762. 608–615 (2006)
129. Schotten, U., Verheule, S., Kirchhof, P., Goette, A.: Pathophysiological Mechanisms of Atrial Fibrillation: A Translational Appraisal. *Physiological Reviews.* 91. 265–325 (2011)
130. Scotton, C. J., Krupiczkoj, M. A., Konigshoff, M., Mercer, P. F., Lee, Y. C. G., Kaminski, N. et al.: Increased local expression of coagulation factor X contributes to the fibrotic response in human and murine lung injury. *J Clin Invest.* 119. 2550–2563 (2009)
131. Seger, R., Krebs, E. G.: The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 9. 726–735 (1995)
132. Shapiro, M. J., Weiss, E. J., Faruqi, T. R., Coughlin, S. R.: Protease-activated receptors 1 and 4 are shut off with distinct kinetics after activation by thrombin. *J Biol Chem.* 275. 25216–25221 (2000)
133. Shimizu, T., Nishihira, J., Watanabe, H., Abe, R., Honda, A., Ishibashi, T., Shimizu, H.: Macrophage migration inhibitory factor is induced by thrombin and factor Xa in endothelial cells. *J Biol Chem.* 279. 13729–13737 (2004)
134. 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. 76–85 (1985)
135. Sonin, D. L., Wakatsuki, T., Routhu, K. V., Harmann, L. M., Petersen, M., Meyer, J., Strande, J. L.: Protease-activated receptor 1 inhibition by SCH79797 attenuates left ventricular remodeling and profibrotic activities of cardiac fibroblasts. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 18. 460–475 (2013)
136. Steinberg, S. F.: The Cardiovascular Actions of Protease-Activated Receptors. *Molecular Pharmacology.* 67. 2–11 (2005)
137. Stewart, S., Hart, C. L., Hole, D. J., McMurray, J. J.: Population prevalence, incidence, and predictors of atrial fibrillation in the Renfrew/Paisley study. *Heart.* 86. 516–521 (2001)
138. Stewart, S., Hart, C. L., Hole, D. J., McMurray, J. J. V.: 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. 359–364 (2002)
139. Takanabe-Mori, R., Ono, K., Sowa, N., Wada, H., Takaya, T., Horie, T. et al.: Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 is required for the adipose tissue expression of proinflammatory cytokines in high-fat diet-induced obese mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 398. 576–580 (2010)

140. Tedrow, U. B., Conen, D., Ridker, P. M., Cook, N. R., Koplan, B. A., Manson, J. E. et al.: The long- and short-term impact of elevated body mass index on the risk of new atrial fibrillation the WHS (women's health study). *Journal of the American College of Cardiology*. 55. 2319–2327 (2010)
141. The Executive Steering Committee, on behalf of the ROCKET AF Study Investigators: Rivaroxaban-once daily, oral, direct factor Xa inhibition compared with vitamin K antagonism for prevention of stroke and Embolism Trial in Atrial Fibrillation: rationale and design of the ROCKET AF study. *Am Heart J*. 159. 340-347.e1 (2010)
142. Thogersen, A. M., Jansson, J. H., Boman, K., Nilsson, T. K., Weinehall, L., Huhtasaari, F., Hallmans, G.: High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circulation*. 98. 2241–2247 (1998)
143. Trejo, J.: Protease-activated receptors: new concepts in regulation of G protein-coupled receptor signaling and trafficking. *J Pharmacol Exp Ther*. 307. 437–442 (2003)
144. Turpie, A. G. G., Haas, S., Kreutz, R., Mantovani, L. G., Pattanayak, C. W., Holberg, G. et al.: A non-interventional comparison of rivaroxaban with standard of care for thromboprophylaxis after major orthopaedic surgery in 17,701 patients with propensity score adjustment. *Thromb Haemost*. 111. 94–102 (2014)
145. Turpie, A. G. 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. 1673–1680 (2009)
146. van Wagoner, D. R.: Redox modulation of cardiac electrical activity. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 12. 183–184 (2001)
147. Vaziri, S. M., Larson, M. G., Benjamin, E. J., Levy, D.: Echocardiographic predictors of nonrheumatic atrial fibrillation. The Framingham Heart Study. *Circulation*. 89. 724–730 (1994)
148. Vergnolle, N.: Review article: proteinase-activated receptors - novel signals for gastrointestinal pathophysiology. *Aliment Pharmacol Ther*. 14. 257–266 (2000)
149. 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. *Nat Med*. 7. 821–826 (2001)
150. 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 Dev*. 9. 2723–2735 (1995)
151. 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. 1057–1068 (1991)
152. Wang, T. J., Parise, H., Levy, D., D'Agostino, R. B Sr, Wolf, P. A., Vasan, R. S., Benjamin, E. J.: Obesity and the risk of new-onset atrial fibrillation. *JAMA*. 292. 2471–2477 (2004)
153. Watson, T., Shantsila, E., Lip, G. Y. H.: Mechanisms of thrombogenesis in atrial fibrillation: Virchow's triad revisited. *Lancet*. 373. 155–166 (2009)

154. Weinz, C., Schwarz, T., Kubitzka, D., Mueck, W., Lang, D.: Metabolism and excretion of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, in rats, dogs, and humans. *Drug Metab Dispos.* 37. 1056–1064 (2009)
155. Wijffels, M. C., Kirchhof, C. J., Dorland, R., Allessie, M. A.: Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation.* 92. 1954–1968 (1995)
156. Wiviott, S. D., Flather, M. D., O'Donoghue, M. L., Goto, S., Fitzgerald, D. J., Cura, F. et al.: Randomized trial of atropaxar in the treatment of patients with coronary artery disease: the lessons from antagonizing the cellular effect of Thrombin-Coronary Artery Disease Trial. *Circulation.* 123. 1854–1863 (2011)
157. Wolf, P. A., Abbott, R. D., Kannel, W. B.: Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. *Stroke.* 22. 983–988 (1991)
158. 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. 117–126 (1996)
159. Yue, L., Feng, J., Gaspo, R., Li, G. R., Wang, Z., Nattel, S.: Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ Res.* 81. 512–525 (1997)
160. Zhou, Q., Bea, F., Preusch, M., Wang, H., Isermann, B., Shahzad, K. et al.: Evaluation of plaque stability of advanced atherosclerotic lesions in apo E-deficient mice after treatment with the oral factor Xa inhibitor rivaroxaban. *Mediators Inflamm.* 2011. 432080 (2011)

## **Danksagung**

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. A. Götte für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Betreuung während der Entstehung dieser Dissertation.

Außerdem gilt mein besonderer Dank Frau Dr. rer. nat. A. Bukowska für die hervorragende Betreuung. Jederzeit gewährte sie mir bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit sachkundige und wertvolle Unterstützung.

Darüberhinaus möchte ich mich bei dem kompletten Team der Klinik für Herz-und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Magdeburg für die freundliche Zusammenarbeit bedanken.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die vielen motivierenden Worte und positiven Gedanken. Besonders möchte ich meinen Eltern, Leane und Thoralf Zacharias, und meinen Großeltern herzlich danken. Ihr habt mich jederzeit unterstützt und hinter meinen Entscheidungen gestanden. Dank eurer Unterstützung wurden mein Medizinstudium und das Anfertigen dieser Arbeit erst möglich.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meinem Mann Tilo Bielig für das Verständnis, die fortwährende Ermunterung, die stete Diskussionsbereitschaft und die tatkräftige uneingeschränkte Unterstützung beim Erstellen dieser Arbeit.

## **Ehrenerklärung**

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

**Gerinnungsfaktor Xa induziert inflammatorische Prozesse durch die Aktivierung Protease-aktivierter Rezeptoren in humanem Vorhofgewebe**

in der Arbeitsgruppe „Molekularpharmakologische Elektrophysiologie“, Bereich Pathobiochemie, der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

mit Unterstützung durch Frau Dr. A. Bukowska, Herrn Prof. Dr. A. Götte und Dr. Sönke Weinert 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, September 2016

Ines Bielig

## **Darstellung des Bildungsweges**

Name: Ines Bielig, geb. Zacharias  
Geburtsdatum: 26.03.1988  
Geburtsort: Brandenburg/Havel, Deutschland  
Staatsbürgerschaft: deutsch  
Familienstatus: verheiratet

### **Schulbildung:**

09/1994 – 07/2000      Grundschule „Geschwister-Scholl“ Rathenow  
09/2000 – 07/2007      Gymnasium „Johann-Heinrich-August-Duncker“ Rathenow  
Abschluss: Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife

### **Hochschulbildung:**

10/2007 – 11/2013      Medizinische Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität  
Magdeburg , Studium der Humanmedizin  
Abschluss: Staatsexamen  
11/2013 – 03/2014      Medizinische Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität  
Magdeburg , Immatrikulation als Promotionsstudentin

### **Berufstätigkeit:**

seit 04/2014              Klinik für Innere Medizin, AMEOS Klinikum Schönebeck  
Assistenzärztin in Weiterbildung

Magdeburg, September 2016

Ines Bielig

## **Anlagen**

### **Patienteninformation**

„Molekulare Signaltransduktion in Vorhofmyozyten sowie deren Wechselwirkung mit der Interzellulärsubstanz bei Vorhofflimmern“

Bei allen Operationen am offenen Herzen wird zumeist eine sogenannte Herz-Lungen-Maschine benötigt. Dieses Gerät übernimmt für die Dauer der Operation, bei der das Herz des Patienten zeitweise durch Medikamente stillgelegt werden muss, die Aufgabe, das Blut künstlich durch den Körper zu pumpen. Um die Herz-Lungen-Maschine während der Operation an das Herz anschließen zu können, wird ein kleiner Gewebeteil (ungefähr 5 Gramm) der rechten Herzvorkammer vom Herzen abgetrennt. Dieses kleine Gewebestück ist für die weitere Funktion des Herzens unerheblich und wird deshalb unmittelbar nach Abtragung von der rechten Herzvorkammer nicht weiter untersucht und im Anschluss vernichtet.

Unsere Untersuchung mit dem Titel: „Molekulare Signaltransduktion in Vorhofmyozyten sowie deren Wechselwirkung mit der Interzellulärsubstanz bei Vorhofflimmern“ dient dazu, aus den bei jeder Herzoperation gewonnenen Gewebestücken einzelne Eiweiße oder Botenstoffe mit unterschiedlichen chemischen und biochemischen Methoden zu bestimmen. Das Forschungsvorhaben ist Teil eines vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten „wissenschaftlichen Netzwerkes“ mehrerer Forschergruppen in Deutschland. Mit Hilfe dieses wissenschaftlichen Netzwerkes soll die Forschung über Herzrhythmusstörungen der Herzvorkammern unterstützt und vorangetrieben werden.

Die Untersuchungen in dem vorliegenden Projekt sollen helfen, Veränderungen des Herzwebes in Abhängigkeit von verschiedenen Herzerkrankungen zu erkennen. Ein spezielles Ziel dieser Untersuchung ist es, bestehende Unterschiede im Herzwewebe von Patienten mit und ohne Herzrhythmusstörungen („Vorhofflimmern“) zu messen und diese Veränderungen an den Gewebeproben zu simulieren. Die Ergebnisse sollen unter anderem innerhalb des wissenschaftlichen Forschungsnetzwerkes mit den Resultaten von Tierexperimenten anderer Universitäten verglichen werden. Auch sollen Labortechniken assoziierter Netzwerkpartner zur Untersuchung der Proben verwendet werden.

Sämtliche Gewebeuntersuchungen finden erst im Anschluss an die geplante Herzoperation statt. Die Operation und der weitere Verlauf des stationären Aufenthaltes werden durch diese Untersuchungen nicht beeinflusst. Ein Schaden bzw. auch Vorteil entsteht für den Patienten aus diesen getrennt von dem Krankenhausaufenthalt durchgeführten Laboruntersuchungen nicht. Die

erhobenen Befunde/Daten werden anonym gespeichert. Das Probenmaterial wird nach Abschluss der Untersuchungen vernichtet.

Hiermit erkläre ich mich einverstanden, an der o.g. Studie teilzunehmen. Ich habe das beiliegende Studienprotokoll gelesen und verstanden. Das Ziel der Studie, der Studienablauf sowie das Studienprotokoll, einschl. sich hieraus ergebende Fragen, sind eingehend mit mir besprochen worden. Zu der Studie habe ich keine weiteren Fragen. Ein Rücktritt von der Studie ist ohne Angabe eines Grundes jederzeit möglich.

Patientenname: \_\_\_\_\_

Geburtsdatum: \_\_\_\_\_

Datum, Ort: \_\_\_\_\_

Unterschrift des Patienten: \_\_\_\_\_

Unterschrift des Arztes: \_\_\_\_\_

## Geräte und Materialien

**Tabelle 11:** Auflistung der verwendeten Geräte.

Art/Gerätebezeichnung	Firma
Absorptionsmessgerät Sunrise	Tecan, Crailsheim, D
Dispergiergerät Ultra Turrax	Ika, Staufen, D
Elektrophoresenetzteile PowerPac Basic & HC	Bio-Rad, München, D
Elektrostimulator S88	Grass Technologies, Warwick, USA
Fotoentwickler Curix 60 processor	Agfa Health Care, Bonn, D
Gelgießstand und Blotapparatur	Bio-Rad, München, D
Mikrozentrifuge	Qualitron Systems, Michigan, USA
Mini-Zentrifuge UEC2	Uniequip, Boca Raton, Florida, USA
PCR-Cycler iCycler iQ	Bio-Rad, München, D
Rührgerät MR3002	Heidolph, Schwabach, D
Schüttler für Mikrotiterplatten MS1 Minishaker	Ika, Staufen, D
Schüttler RM5	Karl Hecht KG, Sondheim, D
Spektrometer Gene Quant	Pharmacia, Freiburg, D
Sterilbank Hera safe	Heraeus, Hamburg, D
Thermomixer Eppendorf Mixer 5432	Eppendorf, Hamburg, D
Transilluminator	Peqlab, Erlangen, D
Trockenschrank	Heraeus, Hamburg, D
Vibratom Integraslice 7550 MM	Campden, Loughborough, England
Vortex Schüttler Reax 2000	Heidolph, Schwabach, D
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hamburg, D
Zentrifuge Megafuge 20R	Heraeus, Hamburg, D

**Tabelle 12:** Auflistung der verwendeten Arbeitsmaterialien.

Art/Bezeichnung	Firma
Blottingpapier Rotilabo	Roth, Karlsruhe, D
cDNA-Synthese Kit RevertAid™ First Strand	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Filmkassette Ortho Fine Curix screens	Agfa Health Care, Bonn, D
Filterspitzen SafeGuard 100 UL	Peqlab, Erlangen, D
Filterspitzen SafeSeal-Tips Professional Line	Biozym, Hessisch Oldendorf, D
Gele Mini-Protean® TGX™ Precast Gels 12%	Bio-Rad, München, D
iCycler iQ PCR plates	Bio-Rad, München, D
Kulturmembran 0,4µm Anopore Membrane	Nunc, Wiesbaden, D
Laktatdehydrogenase-Assay	Roche, Mannheim, D
Microseal'B'Film plate sealers	Bio-Rad, München, D
Nucleo Spin RNA II Kit	Macherey-Nagel, Düren, D
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Präzisionsküvetten aus Quarzglas Suprasil QS 5,00mm	Hellma, Müllheim, D
PVDF-Membran Millipore Immobilon P	Roth, Karlsruhe, D
RNase-freie Eppendorfggefäße	Eppendorf, Hamburg, D
X-Ray Film Curix	Agfa Health Care, Bonn, D
Zellkultur Testplatte	TPP, Trasadingen, Schweiz

**Tabelle 13:** Auflistung der verwendeten Reagenzien.

Art/Bezeichnung	Firma
BCA™ Protein Assay Reagent A & BCA™ Protein Assay Reagent B	Pierce, Rockford, USA
Blockierungsreagenz Roti-Block	Roth, Karlsruhe, D
Chemilumineszenz-Reagenz Super Signal® West Pico Luminol Enhancer Solution Super Signal® West Pico Stable Peroxide Solution Super Signal® West Dura Luminol/Enhancer Solution Super Signal® West Dura Stable Peroxide Buffer	Pierce, Rockford, USA
DEPC-behandeltes Wasser	Roth, Karlsruhe, D
Dimethylsulfoxid für die Molekularbiologie	Roth, Karlsruhe, D
Elektrophoreselaufpuffer Rotiphorese 10xSDS-PAGE	Roth, Karlsruhe, D
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, D
Milchpulver (MP) Blotting grade	Roth, Karlsruhe, D
Molekulargewichtsmarker Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Probenpuffer Laemmli 2x, 3x oder 5x	Sigma-Aldrich, München, D
SDS (sodium dodecyl sulphate, Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, München, D
Strippingpuffer Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Pierce, Rockford, USA
Transferpuffer Tris-Glycin 10x Methanol, Wasser	Roth, Karlsruhe, D
Trichlormethan/Chloroform Rotipuran	Roth, Karlsruhe, D
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe, D
Tween®20 (Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaurat)	Sigma-Aldrich, München, D

**Tabelle 14:** Zusammensetzung des Lysepuffers zur Protein-Isolation (modifizierter RIPA-Puffer).

Grundpuffer (4°C):	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 5 mM EDTA 100 mM NaCl 0,5% (v/v) Triton X-100 10% (v/v) Glycerol 10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5% (v/v) NP-40	Roth, Karlsruhe, D (Proteaseinhibitorcocktail von Sigma-Aldrich, München, D)
vor Gebrauch dazugeben:	0,5% Deoxycholate (DOC), Raumtemp. 1x Proteaseinhibitorcocktail, -20°C 1 mM Sodium Vanadate (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ), -20°C 20 mM NaF, Raumtemp. 0,1 mM PMSF, 4°C 20 mM Glycerol-2-Phosphate, 4°C	
30 min Inkubation bei 4°C, 15 min bei 15.000 rpm		

**Tabelle 15:** Zusammensetzung des Transport- und Kulturmediums für Herzohren – serumfrei.

76% (v/v)	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium 1x) [+] 1g/L D-Glucose [+] Pyruvate	Invitrogen Gibco, Karlsruhe, D
20% (v/v)	HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution 1x)	
1% (v/v)	Glutamin 200 mM	
1% (v/v)	100x non essential amino acids	
1% (w/v)	OPI Media Supplement	Sigma-Aldrich, München, D
1% (v/v)	1M HEPES Puffer pH 7,4	Roth, Karlsruhe, D
0,01 µg/ml	Refobacin (Gentamicin)	Merck, Darmstadt, D
100 nM	Refludan (Lepirudin)	Pharmion, Hamburg, D

**Tabelle 16:** Auflistung der verwendeten primären Antikörper.

Antikörper	Spezies	Firma	Verdünnung
44/42 ERK	rabbit	Cell Signaling, MA, USA	1:1.000
ICAM-1	mouse	Santa Cruz, USA	1:1.000 in TBS
LOX-1	goat	R&D-Systems, D	1:1.000
PAI-1	rabbit	Santa Cruz, USA	1:300
PAR 2	mouse	Santa Cruz, USA	1:500
Phospho-ERK (p44/p42)	mouse	Cell Signaling, MA, USA	1:1.000 in TBST + 2,5% MP
Phospho-NFκBp65	rabbit	Cell Signaling, MA, USA	1:1.000 in TBST + 2,5% MP
β-Actin	mouse	Santa Cruz, USA	1:5.000

**Tabelle 17:** Auflistung der verwendeten sekundären Antikörper.

Antikörper	Firma	Verdünnung
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling, MA, USA	1:5.000 in 1xTBS
Goat-anti-rabbit IgG	Dianova, Hamburg, D	1:20.000 in 1xTBS
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling, MA, USA	1:5.000 in 1xTBS

**Tabelle 18:** Zusammensetzung der Gele unterschiedlicher Acrylamidkonzentration für die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese.

Komponente	Sammelgel			Trenngele		
	4%	10 %	12 %			
<b>Acrylamidkonzentration</b>						
Acrylamid-Bisacrylamid (30 %)	0,67 ml	5,0 ml	6,0 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	-	-			
Dest. Wasser	2,97 ml	5,93 ml	4,93 ml			
10 % Sodiumdodecylsulfat (SDS)	50 µl	150 µl	150 µl			
10 % Ammoniumperoxidisulfat (APS)	50 µl	150 µl	150 µl			
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	5 µl	15 µl	15 µl			

**Tabelle 19:** Verwendete Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.

Acrylamid-Lösung	30 % T; 29:1
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	10 % (w/v)
Elektrophoresepuffer (10x)	248 mM Tris-HCl, pH 8,3 192 mM Glycin 1 % (w/v) SDS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Tris-HCl für 4x Probenpuffer	1 M Tris-HCl, pH 6,8
4x SDS-PAGE-Probenpuffer	250 mM Tris-HCl, pH 6,8 40 % Glycerol 2 % (w/v) SDS Bromphenolblau (0,05 % w/v) Dest. Wasser 20 % β-Mercaptoethanol oder 400 mM DTT
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	
TAE (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)	0,04 M Tris, pH 8,3 0,001 M EDTA

**Tabelle 20:** Verwendete Lösungen für Western Blot und Protein-Detektion.

Blockierungslösungen	Milchpulver 5 % (w/v) in TBS 1xRotiBlock
TBS (10x) pH 7,6	200 mM Tris 1,37 M NaCl
TBST	1xTBS 0,05 % Tween 20
Tris/Glycin-Puffer (10x)	1,92 M Glycin, 250 mM Tris
Transferpuffer	1xTris/Glycin-Puffer 10 % Methanol
Laufpuffer	Rotiphorese® 1xSDS-PAGE

Ethikvotum

OTTO-VON-GUERICKE-UNIVERSITÄT MAGDEBURG  
Ethik-Kommission

der Otto-von-Guericke-Universität an der Medizinischen Fakultät  
und am Universitätsklinikum Magdeburg A.ö.R.  
Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. med. C. Huth



Universitätsklinikum • Leipziger Straße 44 • D-39120 Magdeburg

Herrn Prof. Dr. med. A. Götte  
Institut für Klinische Pharmakologie, AG Molekulare Elektrophysiologie  
Universitätsklinikum Magdeburg A.ö.R.  
Leipziger Str. 44  
39120 Magdeburg

Tel.  
(0391) 67/14314  
67/14344

Fax  
(0391) 67/14354  
67/290185

eMail  
norbert.beck@med.ovgu.de  
ethikkommission@ovgu.de

Datum

03.08.2010

Unser Zeichen: 93/10

Ätiologie-basierte Mechanismen von Vorhofflimmern  
Substudie des EUTRAF EU FP7 Antrags

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Götte,

die Ethik-Kommission der Otto-von-Guericke-Universität an der Medizinischen Fakultät und am Universitätsklinikum Magdeburg hat die übergebenen Unterlagen zur o. g. Studie überprüft, in der letzten Kommissionssitzung eingehend erörtert und ist zu der Auffassung gekommen, dass gegen die Durchführung keine ethischen Bedenken bestehen. Diese **zustimmende Bewertung** ergeht unter dem Vorbehalt gleichbleibender Gegebenheiten.

Die Verantwortlichkeit des jeweiligen Prüfwissenschaftlers / behandelnden Prüfarztes bleibt in vollem Umfang erhalten und wird durch diese Entscheidung nicht berührt. Alle zivil- oder haftungsrechtlichen Folgen, die sich ergeben könnten, verbleiben uneingeschränkt beim Projektleiter und seinen Mitarbeitern.

Beim Monitoring sind die Bestimmungen des Bundes- und Landesdatenschutzgesetzes sowie die sich aus der ärztlichen Schweigepflicht ergebenden Einschränkungen zu beachten, was eine Aushändigung kompletter Patientenakten zum Monitoring ausschließt. Ein Monitoring personen- und studienbezogener Daten wird dadurch nicht beeinträchtigt.

Mit freundlichen Grüßen

(i. A. Dr. med. Norbert Beck, Geschäftsführer)  
Prof. Dr. med. C. Huth  
Vorsitzender der Ethik-Kommission

**Ethik-Kommission**  
der Otto-von-Guericke-Universität an der Medizinischen Fakultät  
und am Universitätsklinikum Magdeburg A.ö.R.  
Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. med. C. Huth

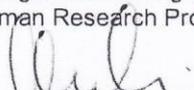
**Anlage zum Votum der Studie 93/10 vom 03.08.2010**

Zum Zeitpunkt der Bewertung der vorstehenden Studie waren folgende Damen und Herren Mitglied der Ethik-Kommission der Otto-von-Guericke-Universität an der Medizinischen Fakultät und am Universitätsklinikum Magdeburg:

Herr Prof. Dr. med. Norbert Bannert	Medizinische Fakultät / Universitätsklinikum, Zentrum für Kinderheilkunde
Frau Prof. Dr. phil. Eva Brinkschulte	Medizinische Fakultät / Universitätsklinikum, Bereich Geschichte, Ethik und Theorie der Medizin
Herr Prof. Dr.-Ing. Rolf Findeisen	Fakultät für Elektrotechnik und Informations- technik, Institut für Automatisierungstechnik
Herr Prof. Dr. med. Thomas Fischer	Medizinische Fakultät / Universitätsklinikum, Universitätsklinik für Hämatologie und Onkologie
Herr Prof. Dr. med. Christof Huth	Medizinische Fakultät / Universitätsklinikum, Universitätsklinik für Herz- und Thoraxchirurgie
Frau Assessorin Ute Klanten	Medizinische Fakultät / Universitätsklinikum, Stabsstelle Recht
Herr OA Dr. med. Werner Kuchheuser	Medizinische Fakultät / Universitätsklinikum, Institut für Rechtsmedizin
Herr Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Läuter	Medizinische Fakultät / Universitätsklinikum, Institut für Biometrie und Medizinische Informatik
Herr Prof. Dr. phil. Georg Lohmann	Fakultät Geistes-, Sozial- und Erziehungs- wissenschaften, Institut für Philosophie
Herr Prof. Dr. med. Frank Peter Meyer	Medizinische Fakultät / Universitätsklinikum, Institut für Klinische Pharmakologie

Mitglieder der Ethik-Kommission, die in eine Studie eingebunden sind, haben für die Votierung der betreffenden Studie kein Stimmrecht.

Die Ethik-Kommission der Otto-von-Guericke-Universität an der Medizinischen Fakultät und am Universitätsklinikum Magdeburg ist unter Beachtung entsprechender internationaler Richtlinien (ICH, GCP) tätig, nach Landesrecht (Hochschulmedizingesetz des Landes Sachsen-Anhalt § 1 Abs. 4, Verordnung über Ethik-Kommissionen zur Bewertung klinischer Prüfungen von Arzneimitteln - Ethik-Kom-VO LSA - vom 19.12.2005) legitimiert und beim Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte gemäß § 20 Abs. 8 des Medizinproduktegesetzes registriert. Weiterhin besteht eine Registrierung der Ethik-Kommission beim Bundesamt für Strahlenschutz nach § 28g Röntgenverordnung (EK-043/R) und § 92 Strahlenschutzverordnung (EK-046/S) sowie beim Office for Human Research Protections, reg. no. IRB00006099, Rockville, MD, U.S.A..

  
Dr. med. Norbert Beck  
Geschäftsführer der Ethik-Kommission

## **Publikationsliste**

Bukowska, A., Zacharias, I., Weinert, S., Skopp, K., Hartmann, C., Huth, C., Goette, A.: Coagulation factor Xa induces an inflammatory signalling by activation of protease-activated receptors in human atrial tissue. *Eur J Pharmacol.* 718. 114–123 (2013)

### **Poster:**

Heart Rhythm Society 2011:

Bukowska, A., Zacharias, I., Skopp, K., Huth, C., Bode-Böger, S., Goette, A.: Activated factor X influences an inflammatory and oxidative signaling by activating of protease-activated receptors in human atrial tissue (2011)

Bukowska, A., Zacharias, I., Skopp, K., Huth, C., Bode-Böger, S., Goette, A.: Rivaroxaban prevents inflammatory and oxidative effects of rapid pacing in human atrial tissue (2011)