

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Leiter: Univ.-Prof. Dr. Jens W. Fischer

Die Rolle des Protease-aktivierten Rezeptors 4 in kardialen Fibroblasten und seine Regulation durch Glukose

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Johann Jerrentrup

Düsseldorf, 2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Jens W. Fischer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Bernhard Rauch

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Kleeschulte S, Jerrentrup J, Gorski D, Schmitt J, Fender AC. Evidence for functional PAR-4 thrombin receptor expression in cardiac fibroblasts and its regulation by high glucose. Int J Cardiol, 2018;252:163-166.

Wissenschaftliche Vorträge und Poster:

Kaglin S, Jerrentrup J, Schmitt J, Fender AC. Evidence for functional PAR4 thrombin receptor expression in cardiac fibroblasts. 2nd German Pharm-Tox Summit / 83. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) und 19. Jahrestagung der Klinischen Pharmakologie (VKliPha) in Zusammenarbeit mit der AGAH, Heidelberg 3/2017.

Zusammenfassung

Diabetes mellitus ist eine der häufigsten chronischen Krankheiten weltweit und birgt über myokardiales Remodeling und diabetische Kardiomyopathie ein substantiell erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Folgeschäden [1-3]. Kardiale Fibroblasten spielen dabei über Proliferation, Migration und Produktion von extrazellulärer Matrix eine wichtige Rolle [4-8]. Hierbei ist die Beteiligung von Protease-aktivierten Rezeptoren bislang anhand von PAR-1 beschrieben worden, PAR-4 hingegen wurde in der Vergangenheit auf kardialen Fibroblasten keine Bedeutung zugeschrieben [9, 10]. Ziel meiner Arbeit war daher die erstmalige Detektion von PAR-4 auf kardialen Fibroblasten sowie die Untersuchung der Regulation von PAR-4 durch Glukose und der Beteiligung von PAR-4 an kardialen Umstrukturierungsprozessen.

Dazu kultivierte ich murine kardiale Fibroblasten in Normoglykämie (LG, 5,5 mmol) und simulierter Hyperglykämie (HG, 25 mmol). *In vivo* wurde ein Diabetes mittels Streptozotocin induziert. Die Auswirkung der Stimulation von PAR-4 auf remodeling-assoziierte Gene wurde mittels Western Blot und *real-time* PCR untersucht. Auf zellulärer Ebene wurden Proliferation, Migration und Bildung von oxidativen Stress analysiert.

Erstmalig konnte ich zeigen, dass PAR-4 von kardialen Fibroblasten exprimiert wird und sowohl *in vivo* als auch *in vitro* einer dynamischen Regulation durch Glukose unterliegt. Simulierte Hyperglykämie verstärkt dabei die PAR-4-Expression und potenziert die funktionelle Antwort auf PAR-4-Stimulation. Somit wird zum einen die Expression remodeling-assoziiierter Gene wie α -SMA, IL-6 und Periostin, zum anderen die Bildung von oxidativen Stress und Zellmigration durch Hyperglykämie induziert.

Nach diesen Erkenntnissen ist PAR-4 also über kardiale Fibroblasten an pathologischen Veränderungen des Herzens insbesondere unter diabetischen Bedingungen beteiligt. Damit eröffnet sich ein potentiell neues Therapieziel in der Behandlung von kardiovaskulären Komplikationen des Diabetes Mellitus. Inwiefern sich eine Inhibition von PAR-4 protektiv auf die kardiale Funktion auswirkt, bedarf weiterer Forschungen.

Summary

Cardiovascular diseases including diabetic cardiomyopathy and myocardial remodeling are increasingly seen in patients with diabetes mellitus type 2, one of the most common chronic diseases worldwide [1-3]. Cardiac fibroblasts act as an important regulator of the cellular components of the heart especially after injury by proliferating, migrating and producing extracellular matrix [4-8]. So far the thrombin receptor PAR-1 has been seen as the main link between thrombin and cardiac fibrosis, whereas PAR-4 has reportedly been absent in cardiac fibroblasts [9, 10]. Previous work by our working group has shown differently which is why in my dissertation the main objective was on detecting PAR-4 on cardiac fibroblasts, showing its regulation by glucose and its contribution to pathological myocardial changes.

Murine cardiac fibroblasts were cultured in low (LG, 5,5 mmol) or high (HG, 25 mmol) glucose medium. *In vivo* Diabetes was induced with streptozotocin. Gene- and proteinexpression in different glucose concentrations, with- or without stimulation by thrombin were detected via western blotting and real-time-PCR. Functional tests were performed for the analysis of proliferation, oxidative stress and migration.

My findings show that PAR-4 is not only expressed by cardiac fibroblasts but is also subject to a dynamic regulation by glucose *in vitro* and *in vivo*. Hyperglycaemia increases PAR-4 mRNA- and protein expression as well as the functional response to PAR-4-Stimulation. Remodeling associated genes like α -SMA, IL-6 and Periostin as well as cellular responses like migration and oxidative stress were elevated by hyperglycemia.

These findings identify cardiac fibroblasts as an important target cell of PAR-4 and suggest that PAR-4 plays a decisive role in pathological myocardial changes due to hyperglycemia. In diabetic patients inhibition of PAR-4 might therefore be able to limit the processes of diabetic cardiomyopathy and cardiac remodeling.

Abkürzungsverzeichnis

α SMA	<i>α-Smooth-Muscle-Actin</i>
18S	18S-ribosomaler RNA
AP	PAR-4 aktivierendes Peptid
DHE	Dihydroethidium
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DTT	Dithiothreitol
EDA	<i>alternatively spliced domain A</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetales Kälberserum
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
H ₂ DCFDA	2',7'-Dichlordihydrofluorescein-diacetat
IDF	<i>International Diabetes Foundation</i>
IL-6	Interleukin-6
KHB	Krebs-Henseleit-Puffer
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa b</i>
p300	Transkriptionellen Ko-Regulator von TGF- β
p38-MAPK	p38-Mitogenaktivierte Proteinkinase
PAR	Protease-aktivierte Rezeptor
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PKC	Proteinkinase C
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
qPCR	Quantitative Real-Time PCR
RhoGEF	<i>Rho Guanine nucleotide exchange factor</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
STZ	Streptozotocin
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary.....	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Diabetes mellitus.....	1
1.1.1 Pathophysiologischer Hintergrund	1
1.1.2 Kardiovaskuläre Komplikationen.....	2
1.1.3 Diabetische Kardiomyopathie	3
1.2 Myokardiales Remodeling.....	3
1.3 Kardiale Fibroblasten	4
1.3.1 Ursprung und Verteilung	4
1.3.2 Funktion im gesunden Herz.....	4
1.3.3 Aufgabe nach einer Verletzung.....	5
1.3.4 Beteiligung an der Entstehung von kardialer Fibrose	6
1.4 Protease-aktivierte Rezeptoren	7
1.4.1 Aktivierung	7
1.4.2 Subtypen und Funktionen	8
1.5 Mögliche Bedeutung von PAR-4 bei diabetischer Kardiomyopathie	9
1.6 Fragestellung	12
2 Material und Methodik.....	13
2.1 Geräte.....	13
2.2 Puffer und Lösungen.....	14
2.3 Substanzen	16
2.4 Verwendete Tiere.....	16
2.5 Zellkultur	17
2.5.1 Isolation kardialer Fibroblasten aus Mäuseherzen.....	17
2.5.2 Kultivierung der Zellen.....	17

2.5.3	Simulierte Hyperglykämie	18
2.5.4	Stimulation von PAR-4.....	19
2.6	Streptozotocin-induzierter Diabetes	19
2.7	Untersuchungen der Funktion auf Zellebene	20
2.7.1	Migrations- und Proliferations-Assay	20
2.7.2	Detektion von oxidativem Stress.....	20
2.7.3	Detektion der Proliferation	21
2.8	Immunologischer Nachweis von Proteinen	22
2.8.1	Denaturierende SDS-PAGE	22
2.8.2	Proteintransfer auf Nitrozellulose-Membranen	22
2.8.3	Proteindetektion mittels Western Blot.....	23
2.9	Molekulargenetische Methoden	23
2.9.1	RNA-Extraktion	23
2.9.2	Messung des RNA-Gehalts	24
2.9.3	cDNA-Synthese	24
2.9.4	Quantitative Real-Time PCR	24
2.10	Statistik	25
3	Ergebnisse	27
3.1	Nachweis von PAR-4 in kardialen Fibroblasten	27
3.2	Regulation der PAR-4-Expression durch Glukose	27
3.2.1	Verstärkte Proteinexpression durch simulierte Hyperglykämie... 27	
3.2.2	Verstärkte mRNA-Expression durch simulierte Hyperglykämie.. 28	
3.3	Potenzierung der PAR-4-vermittelten Effekte durch simulierte Hyperglykämie.....	29
3.3.1	Verstärkte Thrombin-induzierte α -SMA-Expression.....	30
3.3.2	Verstärkte Thrombin-induzierte IL-6-Expression.....	30
3.3.3	Verstärkte Thrombin-induzierte Periostin-Expression.....	31
3.4	Regulation der PAR-4-Expression <i>in vivo</i>	32
3.5	PAR-4-vermittelte Migration	33
3.5.1	Verminderte Migration durch simulierte Hyperglykämie.....	33
3.5.2	Verstärkte Migration durch PAR-4-Stimulation	34
3.6	PAR-4-vermittelte Bildung von oxidativem Stress.....	36
3.6.1	Konstanter oxidativer Stress bei kurzzeitiger PAR-4-Stimulation	36

3.6.2	Verstärkter oxidativer Stress bei anhaltender PAR-4-Stimulation in simulierter Hyperglykämie.....	37
3.7	PAR-4-vermittelte Proliferation	38
3.7.1	Verminderte Proliferation in simulierter Hyperglykämie	39
3.7.2	Verminderte Proliferation durch PAR-4-Stimulation.....	39
4	Diskussion.....	41
4.1	Überblick.....	41
4.2	PAR-4 auf kardialen Fibroblasten	41
4.3	Regulation von PAR-4 durch Glukose	42
4.4	Beteiligung von PAR-4 an Kardiomyopathie-relevanten Prozessen ..	43
4.4.1	Molekulargenetische Ebene	43
4.4.2	Zellulärer Ebene	46
4.5	Klinische Relevanz und Ausblick	48
5	Literaturverzeichnis	50
	Danksagung	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Hersteller	13
Tabelle 2: Puffer und Lösungen	14
Tabelle 3: Substanzen	16
Tabelle 4: Verwendete Primer.....	25

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Funktion von kardialen Fibroblasten.	6
Abb. 2: Aktivierung des Protease-aktivierten Rezeptors durch Thrombin.	7
Abb. 3: Signalkaskade des G-Protein-gekoppelten Rezeptors PAR-4.	9
Abb. 4: Expression von PAR-4 und Cathepsin G mRNA im Mausmodell des Myokardinfarktes.	10
Abb. 5: Versuchsansatz zum Einfluss veränderter extrazellulärer Glukosekonzentrationen.	19
Abb. 6: Einfluss der extrazellulären Glukosekonzentration auf die PAR-4-Proteinexpression in kardialen Fibroblasten.	28
Abb. 7: Einfluss der Glukosekonzentration auf die PAR-4-mRNA-Expression in kardialen Fibroblasten.	29
Abb. 8: Verstärkte Thrombin-induzierte Expression von α -SMA unter simulierter Hyperglykämie ist PAR4-abhängig.	30
Abb. 9: Verstärkte Thrombin-induzierte Expression von IL-6 unter simulierter Hyperglykämie ist PAR4-abhängig.	31
Abb. 10: Verstärkte Thrombin-induzierte Expression von Periostin unter simulierter Hyperglykämie ist PAR4-abhängig.	32
Abb. 11: Einfluss von Hyperglykämie <i>in vivo</i> auf die kardiale PAR-4-mRNA-Expression im Herzen.	33
Abb. 12: Migration von kardialen Fibroblasten unter normalen versus erhöhter Glukosekonzentration.	34
Abb. 13: Lichtmikroskopische Darstellung der Migration kardialer Fibroblasten im Wound-scratch Assay.	35
Abb. 14: PAR-4-vermittelte Migration in kardialen Fibroblasten.	36
Abb. 15: Einfluss von akuter PAR-4-Stimulation auf die Bildung von Superoxidanionen in kardialen Fibroblasten.	37

Abb. 16: Einfluss der 24h Stimulation von PAR-4 auf die Bildung von Superoxidanionen in kardialen Fibroblasten.	38
Abb. 17: Einfluss von erhöhter Glukosekonzentration auf die Proliferationsrate kardialer Fibroblasten.	39
Abb. 18: Einfluss der PAR-4-Stimulation auf die Proliferationsrate kardialer Fibroblasten.	40

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Pathophysiologischer Hintergrund

Diabetes mellitus bezeichnet eine Gruppe von Stoffwechselerkrankungen, die mit einer Erhöhung des Blutzuckerspiegels einhergehen. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation sind weltweit ca. 422 Millionen Menschen an Diabetes mellitus erkrankt (Stand 2014). Deutschland liegt laut der *International Diabetes Foundation* (IDF) mit 7,5 Millionen Diabetikern im europäischen Vergleich auf Platz 2. Die Folgen von Diabetes sind weitreichend; weltweit waren laut WHO in 2015 1,6 Millionen Todesfälle direkt mit Diabetes assoziiert. Mathers *et al.* projizierten, dass bis 2030 Diabetes mellitus als Todesursache weltweit weiter an Wichtigkeit gewinnt [11].

Die Aufnahme und Verteilung von Blutzucker wird durch das körpereigene Peptidhormon Insulin reguliert. Diese Regulation ist bei der Erkrankung Diabetes mellitus gestört. Nach WHO gibt es unterschiedliche Subtypen; Typ 1 und 2 sind die häufigsten und die Pathogenese ist weiter unten im Text erklärt. Unter Typ 3 fallen verschiedene spezifische Diabetestypen, wie beispielsweise der pankreoptive Diabetes mellitus, Typ 4 beschreibt den Gestationsdiabetes.

Dem Typ-1-Diabetes liegt ein absoluter Insulinmangel zu Grunde. Die Insulinproduzierenden β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas werden durch körpereigene Abwehrmechanismen zerstört. Diese rasch progrediente Zerstörung führt zu einem Auftritt der Krankheit im Jugendalter, weshalb diese Form früher auch Juveniler Diabetes genannt wurde. Die Patienten klagen dabei über häufiges Wasserlassen (Polyurie); starken Durst (Polydypsie), Müdigkeit und Sehstörungen. Eine kausale Behandlung des absoluten Insulinmangels ist noch nicht möglich, weshalb der Typ-1-Diabetes immer eine Insulinsubstitution benötigt.

Der deutlich häufigere Typ-2-Diabetes wird durch eine periphere Insulinresistenz verursacht. Die Muskel- und Fettzellen des Körpers können Glukose nicht mehr aufnehmen und die Konzentration im Blut steigt. Der Typ-2-Diabetes ist eine

schleichende, häufig über einen langen Zeitraum klinisch-inapparente Erkrankung, die zum einen eine genetische Komponente trägt, zum anderen auch mit einem ungesunden Lebensstil assoziiert ist. Therapieansätze sind eine Änderung des Lebensstils, orale Antidiabetika und die Insulinsubstitution.

Im Verlauf der Erkrankung kommt es letztendlich zu Folgeschäden verschiedener Organsysteme. Dabei sind insbesondere die Nieren, das Nervensystem und das kardiovaskuläre System betroffen.

1.1.2 Kardiovaskuläre Komplikationen

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind bei Patienten mit Typ-2-Diabetes die häufigste Todesursache [12, 13]. Darunter fallen einerseits Erkrankungen der zuführenden Gefäße für Herz und Gehirn, resultierend in Schlaganfällen und Herzinfarkten, andererseits auch Schädigungen der peripheren Gefäße. Dabei spielen Alter, Blutdruck, *Body Mass Index* (BMI), Nikotinabusus und Geschlecht eine wichtige Rolle. Frauen mit Typ-2-Diabetes haben beispielsweise ein bis zu 50 % höheres Risiko für eine letale kardiovaskuläre Erkrankung als Männer mit Typ-2-Diabetes [14-16].

Diabetes mellitus erhöht das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse, insbesondere koronare Herzerkrankungen und ischämische Schlaganfälle [1, 17, 18]. Als Meilenstein konnte erstmals in der *Framingham Heart Study* von 1979 gezeigt werden, dass unter Diabetikern das Risiko für koronare Herzerkrankungen gegenüber der Normalbevölkerung deutlich erhöht ist [19]. Als Erklärung der Pathogenese dient unter anderem eine, durch Hyperglykämie ausgelöste, Erhöhung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies, resultierend in vermehrtem oxidativem Stress [20]. Zusammen mit Endotheldysfunktion, Inflammation, Cholesterineinlagerungen und mikrovaskulärer Dysfunktion begünstigt diese Konstellation eine Verengung der Gefäße durch Atherosklerose [13]. Bei Verschluss der Gefäße wird der Blutfluss in das jeweilige Organ unterbrochen und es resultiert ein Infarkt. Gleichzeitig leiden über zwei Drittel aller Diabetiker an Hypertension, was wiederum ein eigenständiger kardiovaskulärer Risikofaktor ist und zur Atherosklerose beiträgt [21].

1.1.3 Diabetische Kardiomyopathie

Nach aktueller Studienlage sind bei Diabetikern allerdings auch strukturelle und funktionelle Abnormitäten des Myokards ohne Begleitung von Hypertension und koronarer Gefäßerkrankung zu finden [3, 22-24]. Dieses Phänomen wird als diabetische Kardiomyopathie bezeichnet. Sowohl für Typ-1- als auch Typ-2-Diabetes ist unabhängig von koronarer Atherosklerose und Hypertension das Risiko für Herzversagen und auch das Risiko, an Herzversagen zu sterben, erhöht [19, 25-27]. Eine Erklärung dafür ist, dass die Hyperglykämie per se zu funktionellen und strukturellen Veränderungen im Herzen führt [22, 28, 29]. Dabei spielen insbesondere kardiale Fibrose, aber auch Narben im Myokardgewebe, die ohne symptomatischen Infarkt entstanden sind, sogenannte *silent infarcts*, eine Rolle [30, 31]. Ist das funktionelle Myokardgewebe durch Fibrose und Narbengewebe so stark verändert, dass das Herz als Muskel nicht mehr genug Blut in den Kreislauf pumpen kann, resultiert dies in Herzversagen. In diesem Prozess nehmen kardiale Fibroblasten eine wichtige Position ein [28, 32, 33]. Die molekularen Mechanismen dahinter sind in humanen Herzen noch unklar, in Rattenherzen ist jedoch bereits ein Vorgang ähnlich zum myokardialen Remodeling nach Herzinfarkt beschrieben worden [4].

1.2 Myokardiales Remodeling

Remodeling beschreibt einen Vorgang, in dem physiologisch existierende Strukturen neu arrangiert werden. Myokardiales Remodeling beinhaltet strukturelle und funktionelle Veränderungen am Herzen infolge von Schädigungen [2]. Nachdem der Begriff ursprünglich als die Entwicklung nach einem Herzinfarkt beschrieben wurde, wird er inzwischen deutlich weitergefasst und umfasst auch Veränderungen die bei anderen Formen von Kardiomyopathien auftreten [5, 34].

Myokardiales Remodeling betrifft hauptsächlich zwei Zellgruppen: einerseits Kardiomyozyten, die hypertrophieren und verstärkt in Nekrose und Apoptose gehen [2, 35, 36], andererseits kardiale Fibroblasten, die verstärkt Kollagen produzieren, proliferieren, aktiviert werden und damit zur Fibrose beitragen [5-8].

Die damit verbundene verringerte Kontraktilität und Steifigkeit führen zu einem Verlust der Herzfunktion.

Unter diabetischen Bedingungen treten strukturelle Veränderungen am Herzen vermehrt auf [28, 29]. Ursächlich ist die chronische Hyperglykämie, welche einen Zustand der sterilen Inflammation und des oxidativen Stresses hervorruft [3, 24, 37-39]. Oxidativer Stress wird durch die Bildung von mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies, Glukoseautooxidation und nicht-enzymatische Glykierung von Proteinen in diabetischen Herzen verursacht [40-42]. Dies bewirkt die Aktivierung von pro-apoptischen und stress-aktivierten Signalwegen, wie beispielsweise des NF- κ B und der p38-MAPK und schadet somit der Zelle [43-45]. Gleichzeitig induzieren sowohl oxidativer Stress als auch Hyperglykämie per se eine verstärkte Inflammation [46, 47], welche wiederum fibrotische Prozesse im Herzen verstärkt [48].

1.3 Kardiale Fibroblasten

1.3.1 Ursprung und Verteilung

Kardiale Fibroblasten sind als nicht-kontraktile Zellen im Myokard, im Epikard und in den perivaskulären Regionen zu finden [49, 50]. Ein Teil der Zellen ist epikardialen Ursprungs und vollzieht eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) [51, 52]. Ein anderer Teil entwickelt sich aus Endokard und durchläuft eine endotheliale-mesenchymale Transition [53]. Unter Hyperglykämie scheint diese Entwicklungsart vermehrt aufzutreten [54].

Der Anteil der kardialen Fibroblasten an der Gesamtzellzahl im Herz scheint Spezies-abhängig stark zu variieren. In Ratten wurde kardialen Fibroblasten der zellulär größte Anteil im Herz zugesprochen [55], neuere Arbeiten von Pinto *et al.* zeigen, dass in Mäuseherzen ihr Anteil mit unter 20 % deutlich geringer ist [56].

1.3.2 Funktion im gesunden Herz

Die Hauptaufgabe von kardialen Fibroblasten ist die Aufrechterhaltung der extrazellulären Matrix (EZM) [7, 57]. Durch Produktion der EZM-Komponente über Periostin, Vimentin, Fibronectin, und Kollagen Typ I, III, V, und VI halten

kardiale Fibroblasten das Gerüst zwischen den Kardiomyozyten aufrecht [58, 59]. Über die Expression von Connexinen können kardiale Fibroblasten auch sogenannte „Gap Junctions“ ausbilden und sich darüber mit umliegenden Zellen verbinden [60, 61]. Dadurch bilden sie mit Kardiomyozyten ein funktionelles Netzwerk und tragen zur Kontraktilität des Herzens bei.

1.3.3 Aufgabe nach einer Verletzung

Nach einer Schädigung durchläuft das Herz einen adaptiven Prozess, bestehend aus Inflammation, Proliferation und Narbenbildung [62]. In der inflammatorischen Phase werden die abgestorbenen Kardiomyozyten durch mononukleäre und neutrophile Zellen entfernt [63]. Gleichzeitig wird durch die Erhöhung von pro-inflammatorischen und pro-fibrotischen Faktoren die Proliferation und Migration von kardialen Fibroblasten und deren Differenzierung zu Myofibroblasten verstärkt [64]. Myofibroblasten exprimieren *α -Smooth-Muscle-Actin* (α -SMA) [7, 65, 66] und erlangen darüber einen kontraktilen Phänotyp. Darüber hinaus produzieren sie verstärkt Matrixproteine, insbesondere Kollagen Typ I und III [58], andererseits sekretieren sie vermehrt EZM-abbauende Matrixmetalloproteasen [67]. Zusätzlich ist die Proliferation von Fibroblasten mit einer verstärkten Angiogenese assoziiert, um Sauerstoff und Nährstoffe in den Wundbereich zu transportieren [68]. Im weiteren Verlauf gehen die kardialen Fibroblasten in Apoptose und über Querverbindungen wird eine straffe kollagenreiche Narbe gebildet [69]. Die Aufgaben der kardialen Fibroblasten sind in Abbildung 1 dargestellt.

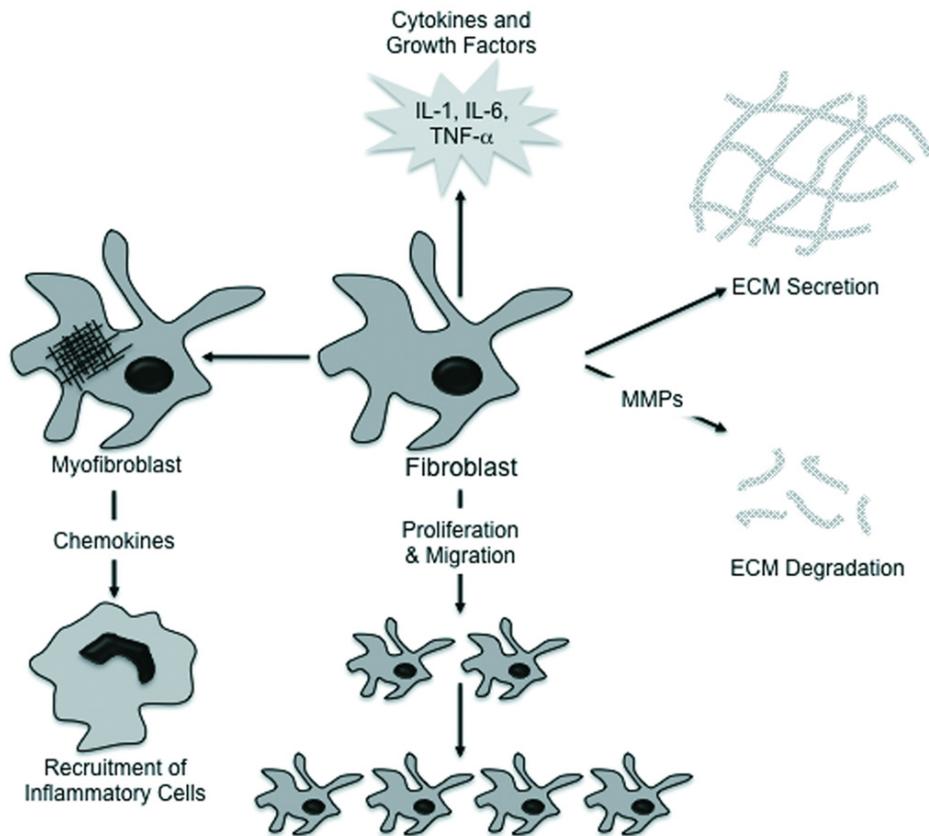


Abb. 1: Funktion von kardialen Fibroblasten. Kardiale Fibroblasten und Myofibroblasten üben eine Vielzahl an Funktionen aus, u.a. die Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren und von EZM-aufbauenden und -degradierenden Faktoren. Darüber hinaus können Fibroblasten proliferieren, migrieren und zu Myofibroblasten differenzieren, um dann verstärkt Immunzellen ins Herzgewebe zu rekrutieren. (Abbildung aus: Souders *et al.*, 2009)

1.3.4 Beteiligung an der Entstehung von kardialer Fibrose

In der direkten Antwort auf die Schädigung halten die oben genannten Veränderungen die strukturelle Integrität und die Funktion des Herzens aufrecht. Die übermäßige Produktion von EZM findet jedoch nicht nur im Bereich des Infarktes, sondern auch in entfernten Regionen des Herzens statt. Dabei spricht man von einer reaktiven Fibrose [50]. Zusätzlich bleibt bei anhaltender Schädigung die Aktivierung der kardialen Fibroblasten bestehen, wodurch Inflammation, Proliferation und Produktion der EZM persistieren [7, 49, 62, 70]. Dadurch kommt es über die Zeit zur Versteifung der EZM und zur Verschlechterung der Pumpfunktion des Herzens, bis hin zum Herzversagen.

Kardiale Fibroblasten übernehmen also eine essentielle Rolle im myokardialen Remodeling.

1.4 Protease-aktivierte Rezeptoren

1.4.1 Aktivierung

Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) sind eine Familie von G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), die durch proteolytische Spaltung des N-Terminus aktiviert werden. GPCR werden auch als heptahelikale Rezeptoren bezeichnet, da sie aus sieben, die Membran durchziehenden, Domänen gebildet werden. Das namensgebende G-Protein ist über die intrazelluläre Seite mit dem Rezeptor verbunden [71]. Bei Protease-aktivierten Rezeptoren erfolgt die Aktivierung über die Abspaltung des extrazellulären N-Terminus. Dadurch wird ein neues N-terminales Ende gebildet, das als intrinsischer Ligand (*tethered ligand*) den Rezeptor an seiner zweiten extrazellulären Schleife aktiviert [72]. Im Gegensatz zur reversiblen Aktivierung vieler klassischer GPCRs ist diese Art der Aktivierung irreversibel [73]. Neben den im nächsten Abschnitt beschriebenen physiologischen Aktivatoren der PARs können auch synthetische Peptide die PARs aktivieren. Durch strukturelle Ähnlichkeit imitieren diese den *tethered ligand* und aktivieren die PARs ohne Spaltung [74].

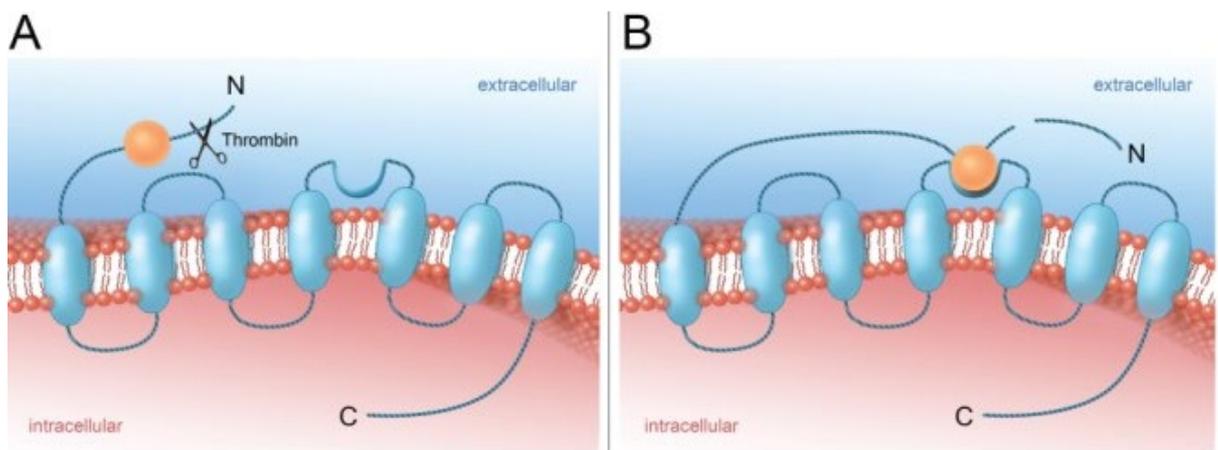


Abb. 2: Aktivierung des Protease-aktivierten Rezeptors durch Thrombin. Thrombin spaltet das extrazelluläre N-terminale Ende des Rezeptors (A). Der neue N-Terminus bindet als *tethered ligand* an die zweite extrazelluläre Schleife des Rezeptors und aktiviert diesen irreversibel (B). (Abbildung aus: Bao *et al.*, 2015)

1.4.2 Subtypen und Funktionen

Im Menschen und in der Maus sind vier verschiedene Protease-aktivierte Rezeptoren bekannt. PAR-1 ist der primäre Rezeptor für die Gerinnungsfaktoren Thrombin und aktivierter Faktor X; PAR-3 und PAR-4 werden ebenfalls durch Thrombin aktiviert [72, 75, 76], während PAR-2 neben Faktor Xa auch durch Trypsin, Tryptase und Koagulationsfaktor VIIa gespalten wird [77]. Nach neueren Erkenntnissen ist allerdings auch eine Aktivierung von PAR-2 durch supraphysiologische Thrombinkonzentrationen möglich [78].

Die Wirkungen der Protease-aktivierten Rezeptoren sind vielfältig. PAR-1 wird von zahlreichen Zellen exprimiert, darunter Blutplättchen, Endothelzellen, Tumorzellen aber auch Kardiomyozyten und kardiale Fibroblasten [10, 72, 79]. Der Rezeptor aktiviert G-Proteine vom Typ $G_{12/13}$, G_q und G_i und hat abhängig vom Zelltyp unterschiedliche Wirkungen. Über die Thrombin-vermittelte Aktivierung von Blutplättchen ist PAR-1 essentiell an der primären Hämostase beteiligt, über Proliferation, Produktion von EZM und Zytokinfreisetzung spielt er jedoch auch im vaskulären und kardialen Remodeling eine wichtige Rolle [10, 80, 81]. PAR-2 aktiviert ebenfalls Proteine vom Typ $G_{12/13}$, G_q und $G_{i/z}$ und wird von zahlreichen Zelltypen im Gastrointestinaltrakt exprimiert, wo er vom Verdauungsenzym Trypsin aktiviert wird [82]. Darüber hinaus wird PAR-2 auch von glatten Gefäßmuskelzellen und Kardiomyozyten exprimiert und am vaskulären und kardialen Remodeling beteiligt [83, 84]. Über den G_q -gekoppelten Rezeptor PAR-3 ist bisher deutlich weniger bekannt. Der Rezeptor wird in verschiedenen Geweben exprimiert, seine Funktion ist bislang jedoch nicht geklärt [85].

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Regulation und Funktion von PAR-4. Dieser Rezeptor wird durch Thrombin, Faktor Xa und der aus neutrophilen Granulozyten freigesetzten Protease Cathepsin G aktiviert [75, 86]. Über $G_{12/13}$ - und G_q -Protein-gekoppelte Signalwege wirkt PAR-4 an der Aktivierung der Blutplättchen, an der Plättchenaggregation und an vaskulärem Remodeling mit (Abb. 3) [87]. Der Rezeptor besteht aus 300 Aminosäuren und zeigt, trotz seiner strukturellen Ähnlichkeit, wichtige Unterschiede zu den anderen PARs auf. Zum einen stimmen nur drei Aminosäuren der *tethered ligand* Bindungsstelle mit den anderen PARs überein, zum anderen verfügt PAR-4 über eine weitaus

schwächere Affinität zu Thrombin als PAR-1 [72, 75, 76, 88]. Außerdem verfügt PAR-4 über die Fähigkeit, funktionell mit anderen Rezeptoren wie PAR-1 oder P2Y12 zu interagieren [86].

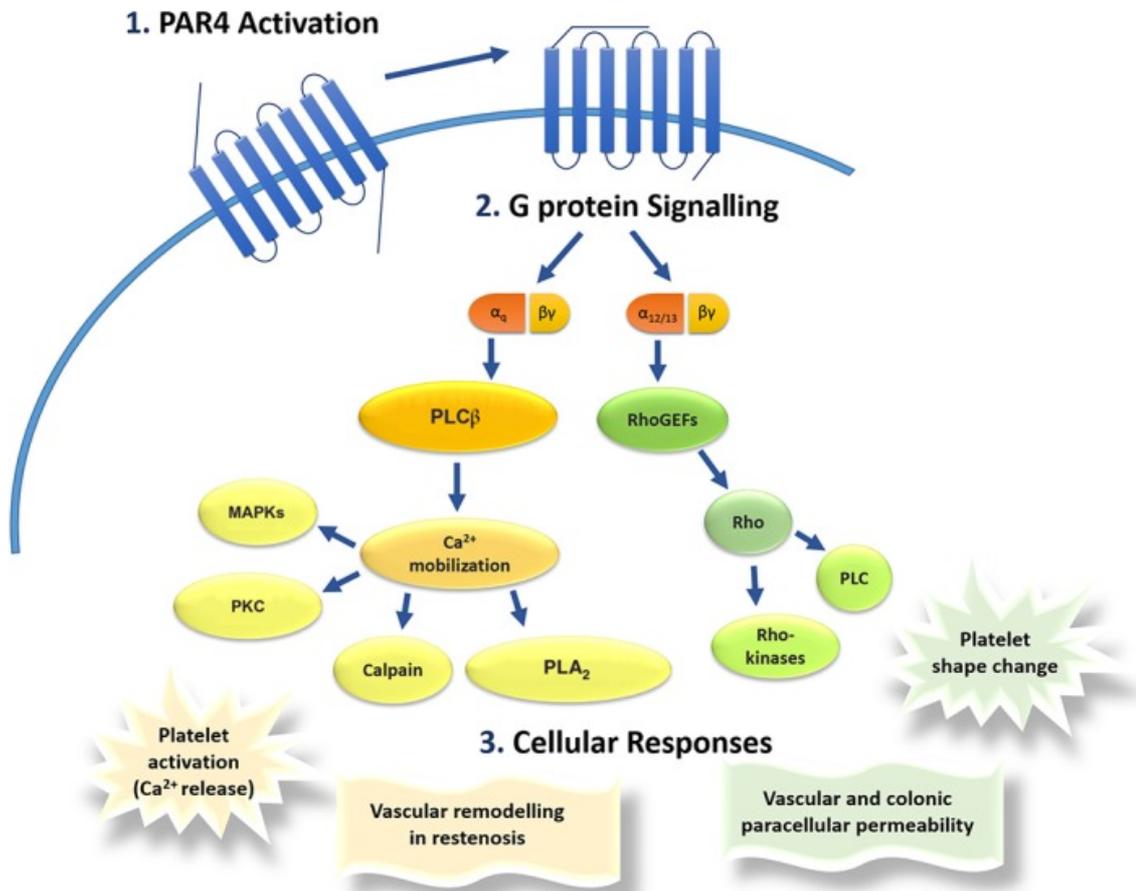


Abb. 3: Signalkaskade des G-Protein-gekoppelten Rezeptors PAR-4. Nach Aktivierung des Rezeptors gibt PAR-4 Signale über G_q- und G_{12/13}-Proteine weiter. G_q-Proteine erhöhen über die Phospholipase C (PLC) die Calciumkonzentration, was die Aktivität von calcium-regulierten Kinasen und Phosphatasen (MAPKs, PKC, Calpain und PLA₂) verstärkt, die an der Aktivierung von Blutplättchen und an vaskulärem Remodeling beteiligt sind. G_{12/13}-Proteine induzieren via RhoGEF die Aktivierung von Rho, was zu zellulären Antworten in Blutplättchen, glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen führt. (Abbildung aus: French et. al, 2016).

1.5 Mögliche Bedeutung von PAR-4 bei diabetischer Kardiomyopathie

Die Bedeutung Protease-aktivierter Rezeptoren in Bezug auf myokardiales Remodeling und diabetische Kardiomyopathie ist bislang hauptsächlich anhand

von PAR-1 erforscht [10, 80, 81]. Aufgrund Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wird allerdings auch für PAR-4 eine mögliche Rolle an pathologischen Prozessen in diabetischen Herzen postuliert [86]. Diese zeigen eine erhöhte kardiale Expression von PAR-4 im Mausmodell des Myokardinfarktes. Die Expression von Cathepsin G, ein Aktivator von PAR-4, zeigte sich ebenfalls erhöht (Abb. 5). Die Beteiligung von PAR-4 bei Remodeling Abläufen nach experimentellem Myokardinfarkt wird durch zwei Studien belegt [89, 90].

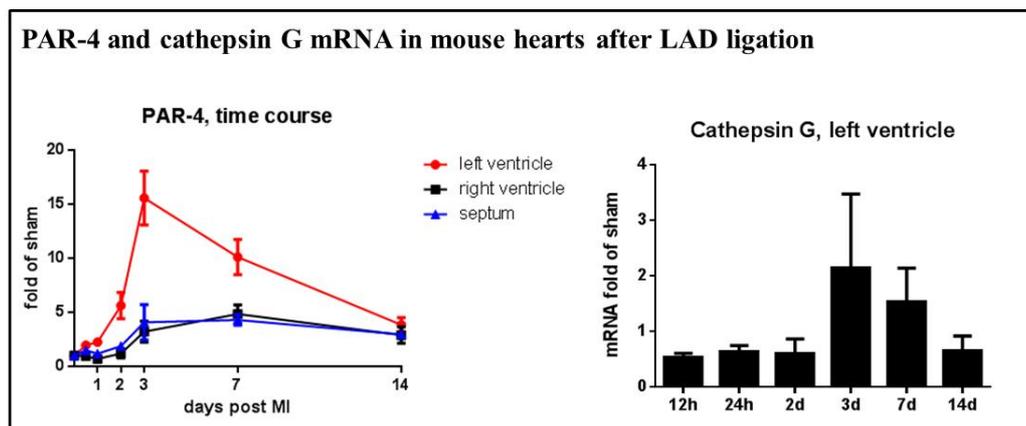


Abb. 4: Expression von PAR-4 und Cathepsin G mRNA im Mausmodell des Myokardinfarktes. In der linken Graphik ist die PAR-4-mRNA-Expression (Vielfaches der Kontrolle) 1, 2, 3, 7 und 14 Tage nach Ischämie durch Abklemmung der LAD zu sehen, rechts die Cathepsin G mRNA-Expression im linken Ventrikel (Vielfaches der Kontrolle) zu den gleichen Zeitpunkten. (unpubliziert von: A. Fender, J. Fischer)

Im Herzen wird PAR-4 neben Kardiomyozyten auch auf Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert [90, 91]. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe belegen eine verstärkte Expression von PAR-4 in glatten Gefäßmuskelzellen unter simulierter Hyperglykämie und in vivo sprechen sie dem Rezeptors eine wichtige Rolle im vaskulären Remodeling zu [20]. Pro-inflammatorische Zytokine und Redox-Stress erhöhen dabei die PAR-4-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen [20, 92].

Auf kardialen Fibroblasten jedoch, denen eine essentielle Rolle im myokardialen Remodeling zuteilwird, war bislang PAR-1 als führender Thrombinrezeptor und PAR-4 als nicht vorhanden dargestellt worden [9]. Als Zufallsbefund wurde in den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe das PAR-4 Transkript in murinen kardialen

Fibroblasten detektiert, allerdings in Zellen die unter hoher Glukosekonzentration und zusätzlicher simulierter Ischämie ausgesetzt wurden.

Ob und inwiefern PAR-4 nun grundsätzlich auf kardialen Fibroblasten exprimiert wird und wie seine Regulation durch Glukose stattfindet, war Teil meiner Studien. Da die primären Aktivatoren von PAR-4 - Thrombin und Cathepsin G - im diabetischen Zustand vermehrt gebildet werden [93-95], ist eine Beteiligung von PAR-4 an Diabetes-assoziierten Folgeerkrankungen im Herzen, insbesondere über die Funktionsmechanismen der kardialen Fibroblasten, denkbar.

1.6 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist die erstmalige Untersuchung der Expression, Regulation und Funktion von PAR-4 in murinen kardialen Fibroblasten unter dem Einfluss einer simulierten Hyperglykämie. Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Wird PAR-4 von kardialen Fibroblasten exprimiert?
2. Wird PAR-4 Glukose-abhängig reguliert?
3. Welche Konsequenzen hat diese Regulation für die funktionelle Antwort der kardialen Fibroblasten auf Thrombin-Stimulation?

2 Material und Methodik

Alle nicht weiter gekennzeichneten Materialien wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (München, Deutschland) und Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

2.1 Geräte

Für die Arbeiten wurden zusätzlich zur Grundausstattung eines pharmakologischen Labors die unten dargestellten Geräte verwendet.

Tabelle 1: Geräte und Hersteller

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Blot-Papier	Whatman-Papier	Schleicher und Schuell, Maidstone, England
Elektroblotter	PerfectBlue Semi-Dry Elektroblotter	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Gelkammer	Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Biorad, München
Gradienten-Cycler	Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Reinstwasser	MilliQ®	Merck, Darmstadt
Mikroskop	Olympus Ix50 und Olympus CK2	Olympus Optical Co. LTD., Japan
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646	Knick Elektronische Messgeräte, Berlin
Photometer	NanoDrop ND-1000 Spektrometer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen

Plattenlesegerät	Microplate Reader Model 550	Biorad, München
PVDF Western Blotting Membranes	Immobilon-P Roche	Roche Diagnostics, Erlangen
Realtime PCR Light-Cycler	7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Sterilbank	LaminAir HLB 2448 GS	Heraeus Holding, Hanau
Zentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg

2.2 Puffer und Lösungen

Alle nicht weiter gekennzeichneten Lösungen wurden von Gibco (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (München, Deutschland) und Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Tabelle 2: Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Laemmli-Puffer (4x)	125 mmol/L Tris / HCl pH 6,8 (12,5 ml) 4 % SDS (4 g) 150 mmol/L DTT (5 ml Lösung, 4 ml Aqua dest., 1 ml DTT) 35 % Glyzerol (15 g) 0,02 % Bromophenolblau ad 50 ml bidest. H ₂ O
Laufpuffer (10x)	250 mmol/L Tris 1,9 mmol/L Glycin

	1 % SDS
Sammelgel (5 %)	0,5 mol/L Tris / HCl pH 6,8 (0,625 ml) 10 % SDS (50 µl) H ₂ O (3,895 ml) 40 % Acrylamid / Bis-acrylamid 37,5:1 (375 µl) TEMED (5 µl) APS 10 % - 0,1 g/ml (50 µl)
Transferpuffer (1x)	1x Laufpuffer 20 % Methanol 0,01 % SDS
TBS (10x)	100 mmol/L Tris / HCl 1,5 mmol/L NaCl pH 7,4
TBS/T (1x)	1x TBS 0,1 % Tween 20
Trenngel (10%)	3 mol/L Tris / HCl pH 8,7 (0,975 ml) 10 % SDS (75 µl) H ₂ O (4,545 ml) 40 % Acrylamid / Bis-acrylamid 37,5:1 (1,875 ml) TEMED (5 µl) APS 10 % - 0,1 g/ml (25 µl)
Trypsin/EDTA-Lösung	10 mmol/L Tris/HCl, pH 7,5 1 mmol/L EDTA

2.3 Substanzen

Tabelle 3: Substanzen

Substanzen	Hersteller
2',7'-Dichlordihydrofluorescein-diacetat (H ₂ DCFDA)	Thermo Fisher, Darmstadt
BrdU Cell Proliferation Assay Kit	Biovision, Milpitas, CA, USA
Dihydroethidium (DHE)	Sigma-Aldrich, München
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Humanes Thrombin	American Diagnostica GmbH, Pfungstadt
Liberase™ Research Grade	Sigma-Aldrich, München
PAR-4 aktivierendes Peptid (PAR-4-AP)	Tocris Bioscience, Bristol, UK
PeqGOLD Trifast™	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
Quick Cell Proliferation Colormetric Assay Kit Plus	Biovision, Milpitas, CA, USA

2.4 Verwendete Tiere

PAR-4-defiziente Mäuse (C57BL/6J) wurden freundlicherweise von Dr. Justin Hamilton (*Australian Centre for Blood Diseases, Monash University, Australia*) zur Verfügung gestellt und in der Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gezüchtet. PAR-4-Knockout-, Wildtyp, und STZ-behandelte Mäuse im Alter von 8-10 Wochen wurden mittels CO₂ getötet und das

Herz durch Frau Prof. Fender entnommen und bearbeitet (*Projektnummer 077/11*).

2.5 Zellkultur

2.5.1 Isolation kardialer Fibroblasten aus Mäuseherzen

Die Isolation der Zellen aus den Mäuseherzen erfolgte unter der Leitung von Prof. Dr. Anke Fender mittels enzymatischem Verdau mit Liberase™ Research Grade [4, 96]. Dazu wurden die Ventrikel nach Entnahme von den Vorhöfen und den Gefäßen getrennt und in 1 mm² Stücke mit einem Skalpell zerschnitten. Daraufhin folgten drei Waschschriffe in KHB (Sigma-Aldrich, München). Die in Reinstwasser aliquotierte Liberase™ (0,83 mg pro Herz) wurde mit 50 ml KHB versetzt. Um den Verdau zu starten, wurden die Ventrikelstücke in 10 ml Liberase™ 15 Minuten lang bei 37 °C in einem Zentrifugationsröhrchen geschüttelt und danach 30 Sekunden gevortext. Der erste Überstand wurde verworfen und dieser Vorgang mit weiteren 10 ml Liberase™ wiederholt. Der zweite Überstand wurde zentrifugiert (10 Min, 400 g) und dessen Überstand verworfen. Zur Kultivierung der Zellen wurde das per Zentrifugation gewonnene Pellet in Wachstumsmedium resuspendiert und in zwei Petrischalen (60 mm) ausplattiert. Mit den restlichen Ventrikelstücken wurde der Verdau noch zweimal wiederholt, bis vier Verdaustritte abgeschlossen und jeweils die Pellets ausplattiert waren. Ein erster Mediumwechsel fand nach vier Stunden statt, danach wurde das Medium alle zwei Tage erneuert.

2.5.2 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden unter optimalen Bedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂-haltiger Atmosphäre im Brutschrank kultiviert. Das zur Kultivierung genutzte Wachstumsmedium bestand aus DMEM (Gibco, Darmstadt), 10 % FCS, und 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco, Darmstadt). Das Medium hatte entweder eine geringe (5,5 mmol/L, *low glucose*, LG) oder eine hohe Konzentration (25 mmol/L, *high glucose*, HG) an Glukose. Somit konnte schon von Passage 0 an eine Unterscheidung zwischen Zellen unter simulierter Hyperglykämie und Normoglykämie gemacht werden. Alle 48 Stunden wurde das Medium

gewechselt. Bei einer Konfluenz von 85 bis 90 % wurden die Zellen zum Wachstum in Kulturflaschen oder für die Versuche in 6-, 12-, 24- oder 96-Well-Platten passagiert. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS (Gibco, Darmstadt) gewaschen und durch Zugabe von Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst. Dieser Vorgang wurde durch Zugabe von dem Volumen entsprechenden LG- oder HG-Wachstumsmedium gestoppt. Nach Zentrifugation (5 Min, 108 g) wurde das Pellet mit Wachstumsmedium resuspendiert und in einer Dichte von 10.000/cm² ausplattiert. Um vor Versuchsbeginn den Zellzyklus der Zellen möglichst anzugleichen, wurden die Zellen 24 Stunden in serumreduzierten Medium (2 % FCS) vor inkubiert. Eine geringere Serumkonzentration oder ein kompletter Entzug waren für die Zellen schädlich. Da nach den ersten Versuchen ersichtlich war, dass eine 24 Stunden Inkubation mit HG eine vergleichbare PAR-4-Induktion wie eine dauerhafte Kultivierung in HG-Medium hervorruft, wurden für die funktionellen Versuche die Zellen zunächst in LG gehalten und erst nach der Synchronisation entweder LG oder HG ausgesetzt. Für die Versuche wurden ausschließlich Zellen der Passage 1 und 2 genutzt.

2.5.3 Simulierte Hyperglykämie

Im ersten Versuchsteil war der Schwerpunkt auf die Regulation von PAR-4 durch die extrazelluläre Glukose-Konzentration gesetzt. Die Zellen waren von Passage 0 an in LG- und HG-Zellen unterteilt. Für sechs beziehungsweise 24 Stunden wurde die Glukose-Konzentration im Medium der Zellen verändert, bevor die Zellen zur RNA-Gewinnung geerntet werden konnten. Dabei arbeitete ich mit drei verschiedenen Glukose-Konzentrationen; Eine geringe Konzentration von 5,5 mmol/L (LG), eine mittlere Konzentration von 10 mmol/L (MG) und eine hohe Konzentration von 25 mmol/L (HG). LG simulierte dabei physiologische, MG und HG unterschiedlich starke hyperglykämische Bedingungen.

Pilotversuche zeigten eine robuste Veränderung der PAR-4-Expression vor allem nach 24 Stunden. Diese Inkubationszeit wurde für alle nachfolgenden Versuche angewendet. In Abbildung 5 sind beispielhaft zwei 6-Well-Platten dargestellt.

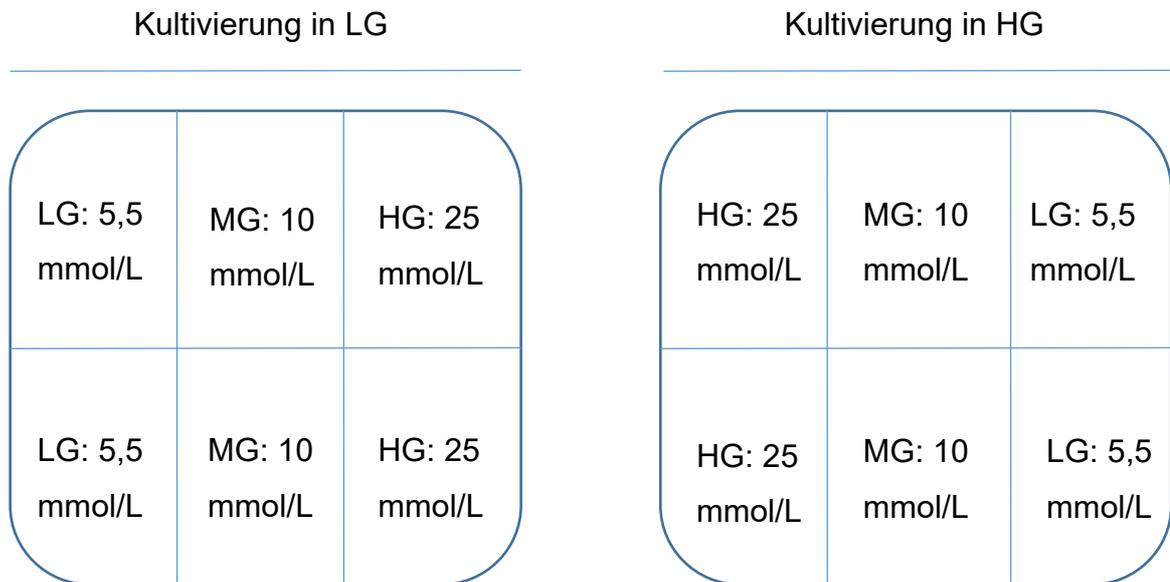


Abb. 5: Versuchsansatz zum Einfluss veränderter extrazellulärer Glukosekonzentrationen. Abgebildet sind zwei 6-Well-Platten. Links waren die Zellen von P0 an in LG gehalten, dann wurde für sechs oder 24 Stunden eine Konzentrationserhöhung in MG und HG durchgeführt. Ein Verbleib in LG diente als Kontrolle. Rechts waren die Zellen ab P0 in HG gehalten und eine sechs oder 24-stündige Konzentrationserniedrigung in MG und LG ist dargestellt.

2.5.4 Stimulation von PAR-4

Der zweite Versuchsteil untersuchte die funktionelle Auswirkung einer Stimulation von PAR-4. Dazu wurde den Zellen für 24 Stunden ein synthetisches PAR-4 aktivierendes Peptid (PAR-4-AP) in einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{mol/L}$ oder humanes Thrombin in einer Endkonzentration von 1 IU/ml hinzugegeben. Daraufhin wurden die Zellen entweder für die RNA-Extraktion in Trizol geerntet oder für die funktionellen Versuche weiterbehandelt.

2.6 Streptozotocin-induzierter Diabetes

Um die Untersuchungen der Glukose-regulierten PAR-4-Expression nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* in der Maus anzustellen, wurden mir für die Isolation kardialer Fibroblasten auch Herzen aus Mäusen mit Streptozotocin-induziertem

Diabetes bereitgestellt. Streptozotocin (STZ) ist eine diabetogene Substanz, die durch ihre toxische Wirkung einen Typ-1-Diabetes induziert. Durch den GLUT-2 Transporter gelangt STZ in die β -Zellen des Pankreas, akkumuliert dort und zerstört diese durch Sauerstoffradikalbildung [97]. Daraus resultiert, dass die Mäuse kein Insulin mehr produzieren können und eine ausgeprägte Hyperglykämie entwickeln. Ich bekam die Herzen drei Wochen nach Behandlung mit STZ bzw. ohne STZ bereitgestellt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Mäuseherzen.

2.7 Untersuchungen der Funktion auf Zellebene

2.7.1 Migrations- und Proliferations-Assay

Die Migration und Proliferation der Zellen wurde in einem klassischen *Wound-scratch Assay* untersucht [98]. Zur Vorbereitung waren die Zellen in LG- oder HG-Medium in einer Dichte von 100.000 Zellen pro Well in 6-Well-Platten ausplattiert und erreichten innerhalb 24 Stunden die 100 % Konfluenz. Dann wurde mit einer sterilen Pipettenspitze ein ca. 1 mm breiter, horizontaler Schnitt („*scratch*“) durch die Zellschicht gezogen. Die durch den *scratch* abgelösten Zellen wurden in einem Waschschrift mit PBS ausgewaschen und den Zellen das entsprechende LG- oder HG-Medium (2 % FCS) zugefügt. Um den Einfluss von PAR-4 auf Migration und Proliferation zu untersuchen, wurde das Medium mit humanen Thrombin oder PAR-4-AP versetzt. Dabei diente PBS als Kontrolle. In der darauffolgenden Zeit wurde der durch den *scratch* entstandene Spalt durch Migration und Proliferation der Zellen geschlossen. Zum Zeitpunkt 0 direkt nach dem *scratch* und zum Zeitpunkt 1 nach 24 bzw. 48 Stunden wurde der Verschluss mikroskopisch dokumentiert und die eingewanderten Zellen mit mit AxioVision (Zeiss, Version 4.8) gezählt.

2.7.2 Detektion von oxidativem Stress

Oxidativer Stress in der Zelle kann auf unterschiedliche Arten registriert werden. Ich fokussierte mich auf die intrazelluläre Detektion von H_2O_2 durch 2',7'-Dichlordihydrofluorescein-diacetat (H_2DCFDA) und zusätzlich von O_2 durch Dihydroethidium (DHE). H_2DCFDA ist ein kleines, nicht-fluoreszierendes Molekül,

welches in der Zelle zu DCFH deacetyliert wird. DCFH wird mit Hilfe von H_2O_2 zu einem fluoreszierenden Metaboliten, Dichlorofluorescein (DCF), oxidiert. DHE diffundiert in die Zelle und wird dort direkt durch O_2 zu fluoreszierendem Ethidium oxidiert [99, 100]. Die Fluoreszenz wurde im Mikrotiter-Platereader gemessen.

Der Versuchsaufbau war für beide Substanzen gleich. Zunächst wurden die serumreduzierten Zellen mit oder ohne PAR4-AP oder humanem Thrombin für 30 Minuten oder 24 Stunden stimuliert. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle mit einem zellfreien Well durchgeführt. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die serumreduzierten Zellen mit H_2DCFDA ($5 \mu\text{mol/L}$) oder DHE ($1 \mu\text{mol/L}$) lichtgeschützt im Brutschrank beladen (15 Min, 37°C). Es folgte ein erneuter Waschschrift. Im Mikrotiter-Platereader wurde die Fluoreszenz bei einer Exzitation von 485 nm und einer Emission von 535 nm für H_2DCFDA und einer Exzitation von 535 nm und einer Emission von 635 nm für DHE gemessen. Dabei wurde der *Kinetic Mode* verwendet, in dem über eine Zeitspanne von zehn Minuten alle 60 Sekunden die Fluoreszenz gemessen wird. Zur statistischen Auswertung davon nutzte ich die Fläche unter der Kurve.

Nach einigen Pilotversuchen mit H_2DCFDA , deren Ergebnisse nicht konklusiv waren, setzte ich den Schwerpunkt auf die Detektion der intrazellulären Superoxidanionen mittels DHE.

2.7.3 Detektion der Proliferation

Für die Untersuchung der Proliferation standen mir zwei Methoden zur Verfügung. Das Quick Cell Proliferation Colormetric Assay Kit Plus (Biovision, CA, USA) und das BrdU Cell Proliferation Assay Kit (Biovision, CA, USA). Im Quick Cell Assay macht man sich zu Nutze, dass in aktiven Zellen Tetrazolium von der zellulären mitochondrialen Dehydrogenase zu Formazan reduziert wird. Formazan ist im Mikrotiter-Platereader bei einer Absorption von ca. 440 nm messbar. Je aktiver die Zellen sind, desto stärker ist die Bildung von Formazan und damit die Absorption. Das BrdU Cell Assay detektiert 5-Brom-2-Desoxyuridin (BrdU), ein Pyrimidin Analogon, welches in die neu synthetisierte DNA von proliferierenden Zellen eingebaut wird, mit Hilfe eines Anti-BrdU-Antikörpers. Ein sekundärer Antikörper davon gibt die Quantität von BrdU in messbarem Farbumschlag wieder. Da das BrdU Cell Assay somit ausschließlich die

proliferativen Zellen registriert, habe ich mich für dieses entschieden. Das Assay wurde nach Herstellerangaben (Biovision, Produktnummer: K306-200) durchgeführt. Nach mehreren Optimierungsversuchen bezüglich der Zellzahl legte ich mich auf eine Dichte von 5.000 serumreduzierten Zellen/Well fest.

2.8 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Zum immunologischen Nachweis von Zielproteinen von PAR-4 nutzte ich die Methode der Proteinexpressionsanalyse mittels SDS-PAGE und Western Blot. Dabei werden zunächst im SDS-PAGE die Proteine im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe getrennt und anschließend über an Infrarotfarbstoffe gekoppelte Antikörper im Western Blot dargestellt.

2.8.1 Denaturierende SDS-PAGE

Zur Proteinauftrennung im SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und in Laemmli-Puffer lysiert [101]. Anschließend wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt und die Proteine durch fünfminütige Inkubation bei 96 °C denaturiert. SDS bildet einen Komplex mit den Proteinen und die negative Eigenladung des SDS überdeckt die Ladung der Proteine. Die denaturierten Proben wurden in einer Menge von 25 µl pro Tasche in ein Polyacrylamid-Gel gegeben. Dieses Gel bestand aus 5 %igem Sammelgel, um die Proteine aus der Probenlösung zu fokussieren, und aus 10 %igem Trenngel zur Auftrennung abhängig von der Größe. Die Fokussierung erfolgte über zehn Minuten bei einer Spannung von 100 V, die Auftrennung bei einer konstanten Spannung von 175 V über 60 Minuten. Zusätzlich zu den Proben wurde immer ein Molekulargewichtsmarker (Prestained Protein Ladder, Fermentas, St. Leon-Roth) mit aufgetragen.

2.8.2 Proteintransfer auf Nitrozellulose-Membranen

Zur Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran wurden zunächst das Gel, die Membranen und sechs Whatmanpapiere in Transferpuffer äquilibriert. Dann wurde ein Stapel aus drei Whatmanpapieren, der Membran, dem Gel und wiederum drei Whatmanpapieren gebildet. Der

Elektronentransfer erfolgte von Kathode zu Anode über 70 Minuten bei 14 V in Transferpuffer. Dazu wurde die *PerfectBlue Semi-Dry Elektroblogger*-Apparatur (Peglab, Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) genutzt.

2.8.3 Proteindetektion mittels Western Blot

Um die unspezifischen Bindungsstellen der Proteine zu blockieren, wurde nach dem Transfer die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in TBS/T + 5% Milch geblockt. Nach einem Waschschrift in TBS/T-Puffer (10 min) wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem Erstantikörper, der in einer Konzentration von 1:1000 in TBS/T verdünnt wurde, beladen. Anschließend erfolgten drei weitere Waschschrift in TBST-Puffer, um unspezifisch bindende Antikörper zu entfernen. Im Anschluss daran erfolgte über 60 Minuten bei Raumtemperatur die Kopplung an den Zweitantikörper-Infrarot-Komplex der 1:20000 in TBS/T verdünnt wurde. Nach erneutem Waschen in TBS/T erfolgte die Detektion der Proteinmenge mit Hilfe des Odyssey Infrared Imaging Systems (application software version 3.0, Li-Cor, BadHomburg). Die Intensitäten der detektierten Banden werden dabei als optische Dichte pro mm² ermittelt und auf ein konstitutiv-exprimierendes Housekeeping-Protein (β -Tubulin oder β -Actin) normiert.

2.9 Molekulargenetische Methoden

2.9.1 RNA-Extraktion

Für die quantitative Real-time-PCR wurde zunächst die RNA aus den behandelten Zellen isoliert. Alle Lösungen und Materialien wurden falls nicht anders benannt von Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (München) bezogen. Dazu wurden die Zellen in PeqGOLD Trifast™ (Peglab, Biotechnologie, Erlangen) für fünf Minuten lysiert und in Eppendorf Safe-Lock Tubes (Eppendorf, Hamburg) überführt. Daraufhin konnte das Lysat entweder bei -80 °C gelagert werden oder es folgte die direkte Weiterverarbeitung. Die Phasentrennung erfolgte durch Zugabe von 0,1 ml Chloroform. Nach kräftigem Schütteln für 15 Sekunden wurden die Tubes zur Fällung über zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation (15 Min, 12.000 g, 4 °C) wurde

zur RNA-Präzipitation die wässrige Phase in 0,25 ml Isopropanol überführt. Es folgte eine weitere Zentrifugation (45 Min, 12.000 g, 4 °C). Um die Reinheit der RNA zu erhöhen, führte ich nach Entfernen des Überstandes zwei Waschschrte durch. Dabei wurden 0,5 ml 75%iger Ethanol hinzugegeben, die Tubes gevortext und zentrifugiert (10 Min, 12.000 g, 4 °C). Nach abschließendem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet bei Raumtemperatur fünf Minuten getrocknet. Daraufhin wurde die RNA in 20 µl Reinstwasser (Milli-Q, Merck, Deutschland) resuspendiert und durch fünfminütiges Schütteln bei 60 °C das Pellet gelöst. Bis zur Weiterverarbeitung wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

2.9.2 Messung des RNA-Gehalts

Zur Messung der RNA-Konzentration nutzte ich das NanoDrop 1000 Spektrometer (Peqlab, Biotechnologie, Erlangen). Dabei konnte das 260/280 nm Absorptionsverhältnis als Maß für die Reinheit und das 260/230 nm Absorptionsverhältnis als Maß für die Proteinverunreinigung gemessen werden. Proben, die diese Qualitätskontrolle nicht bestanden, wurden nicht weiterverarbeitet.

2.9.3 cDNA-Synthese

Da RNA in der Realtime-PCR nicht vervielfältigt werden kann, musste ich diese zunächst in cDNA umschreiben. Dies geschah mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, die an Primern ansetzt und einen zur RNA komplementären Nukleotidstrang erstellt. Dazu wurden 500 ng RNA in 7 µl Reinstwasser gelöst und mit 3 µl Mastermix (Reverse Transkriptase Set, Applied Biosystems, Darmstadt) vermischt. Der Synthesevorgang fand nach Angaben des Herstellers in einem Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) statt (10 Min 25 °C, 120 Min 37 °C, 5 Min 85 °C, Lagerung bei 4 °C).

2.9.4 Quantitative Real-Time PCR

Die Quantitative Real-Time PCR (qPCR) nutzt den Mechanismus der herkömmlichen PCR, in der DNA vervielfältigt wird. Zusätzlich kann jedoch bei der qPCR mittels Fluoreszenz-Messung die Anzahl der Ausgangsmoleküle gemessen werden. Dabei werden fluoreszierende Moleküle in die doppelsträngige DNA eingebaut. Je mehr Doppelstrang-DNA eines Abschnitts

gebildet wird, desto mehr Fluoreszenz wird detektiert. In der exponentiellen Phase, in der die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen, können Rückschlüsse auf die Anfangskonzentration gezogen werden. Ich verwendete zur Analyse das QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden) am 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt). Eine endogene Kontrolle von 18S-ribosomaler RNA (18S) diente zur relativen Quantifizierung. Alle Proben wurden zur Kontrolle doppelt gemessen. Nach einer Schmelzkurvenanalyse zur Spezifikation der Primer erfolgte die Auswertung mittels $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode [102]. Als Software benutzte ich 7300 Real-Time PCR System RQ Study Software Version 1.4 und Microsoft Excel (2011).

In Tabelle 4 ist eine Auflistung der verwendeten Primer.

Tabelle 4: Verwendete Primer

Gen	Produkt	Katalognummer
18S	Mm_Rn18s_3_SG QuantiTect Primer Assay	QT02448075
PAR-4	Mm_F2r13_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00252168
<i>α-Smooth-Muscle-Actin</i> (α SMA)	Mm_Acta2_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00140119
Periostin	Mm_Postn_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00150759
Interleukin-6 (IL-6)	Mm_Il6_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00098875

2.10 Statistik

Die aufgeführten Daten dieser Arbeit sind als Mittelwerte \pm Standardfehler aus n -unabhängigen Einzelerperimenten dargestellt. Dabei wurden die Werte auf die Kontrollgruppe normiert. Zur statistischen Analyse wurde die Software Microsoft Excel™ (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) und GraphPad Prism 6.0

(GraphPad Software, San Diego, CA, USA) genutzt. In mehreren Versuchen wurde eine Varianzanalyse mittels ANOVA mit Dunnett's post-hoc Test durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von $< 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis von PAR-4 in kardialen Fibroblasten

Bislang galt PAR-4 auf kardialen Fibroblasten als nicht vorhanden [9]. Um die Expression von PAR-4 auf kardialen Fibroblasten zu ermitteln, wurden nach Isolation aus Mäuseherzen die Zellen gepaart in *low glucose* (LG, 5,5 mmol/L) bzw. *high glucose* (HG, 25 mmol/L) kultiviert. Nach 9-14 Tagen wurde mittels in Passage 1-2 mittels qPCR die PAR-4 mRNA und mittels Western Blot die Proteinexpression gemessen. Dabei konnte ich sowohl unter LG- als auch unter HG-Bedingungen PAR-4 mRNA (Abb. 7) und PAR-4 Proteine (Abb. 6) detektieren.

3.2 Regulation der PAR-4-Expression durch Glukose

3.2.1 Verstärkte Proteinexpression durch simulierte Hyperglykämie

Aus vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurde ersichtlich, dass PAR-4 in humanen glatten Gefäßmuskelzellen einer dynamischen Regulation durch Glukose unterliegt. Da ich nun in 3.1. erstmals PAR-4 auf kardialen Fibroblasten detektieren konnte, war die Analyse des potentiellen Einflusses von Glukose auf PAR-4 ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit. Die Zellen wurden wie in 3.1 beschrieben kultiviert.

Im Western Blot konnte ich nachweisen, dass die PAR-4-Proteinexpression in den HG-Zellen im Vergleich zur LG-Kontrollgruppe signifikant um ca. 3-fach erhöht ist (Abb. 6).

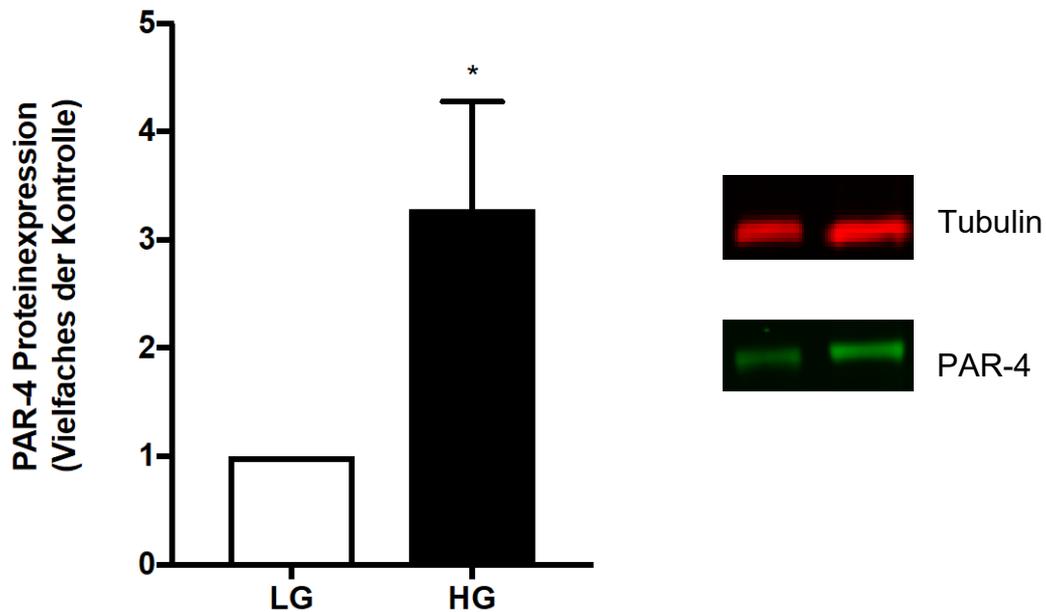


Abb. 6: Einfluss der extrazellulären Glukosekonzentration auf die PAR-4-Proteinexpression in kardialen Fibroblasten. Kardiale Fibroblasten wurden entweder in *low glucose* (LG, 5,5 mmol/L) Medium (weiße Balken) oder parallel in *high glucose* (HG, 25 mmol/L) Medium (schwarze Balken) kultiviert. Nach 24h Serum-Entzug wurde die PAR-4-Proteinexpression mittels Western Blot gemessen. Links ist die quantitative Auswertung. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus $n=3$ unabhängigen Experimenten. * $P<0.05$ vs. Kontrolle (LG). Rechts dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot mit zugehöriger β -Tubulin Kontrolle.

3.2.2 Verstärkte mRNA-Expression durch simulierte Hyperglykämie

Analog dazu konnte ich auch auf Transkriptionsebene eine glukoseregulierte PAR-4-Expression darstellen. Dort war außerdem zu beobachten, dass in den LG-Kulturen eine 6-stündige Erhöhung auf eine mittlere Glukose-Konzentration (MG, 10 mmol/L) bzw. HG (25 mmol/L) die PAR-4-mRNA stufenweise erhöhte. In den HG Kulturen konnte ein entsprechend gegensätzlicher Effekt registriert werden: Nach 6-stündiger Konversion des Mediums von HG (25 mmol/L) zu MG (10 mmol/L) oder LG (5.5 mmol/L) sank die PAR-4-Expression auf das Level der LG -Kontrollgruppe (Abb. 7).

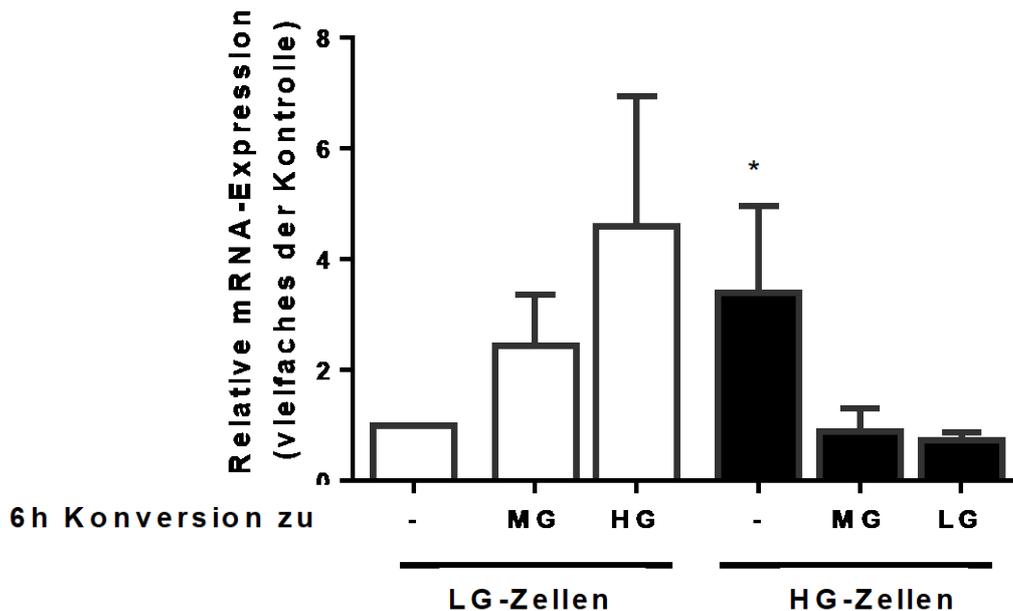


Abb. 7: Einfluss der Glukosekonzentration auf die PAR-4-mRNA-Expression in kardialen Fibroblasten. Kardiale Fibroblasten wurden entweder in *low glucose* (LG, 5,5 mmol/L) Medium (weiße Balken) oder parallel in *high glucose* (HG, 25 mmol/L) Medium (schwarze Balken) kultiviert. Nach 24h Serum-Entzug erfolgte ein 6-stündiger Wechsel zu entweder LG, HG oder MG Bedingungen (MG: *medium glucose*, 10 mmol/L), danach wurde PAR-4 mRNA Expression gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus n=4 unabhängigen Experimenten. *P<0.05 vs. Kontrolle (LG).

3.3 Potenzierung der PAR-4-vermittelten Effekte durch simulierte Hyperglykämie

Kardiale Fibroblasten spielen in der Entstehung von myokardialem Remodeling und diabetischer Kardiomyopathie eine wichtige Rolle [4-8]. Da PAR-4, wie in 3.1. und 3.2 beschrieben, von kardialen Fibroblasten exprimiert wird und durch Glukose reguliert wird, ergab sich die Frage, inwiefern PAR-4 an kardialen Remodeling und diabetischer Kardiomyopathie beteiligt ist. Dazu untersuchte ich den Einfluss einer PAR-4-Stimulation auf die Expression der remodeling-assoziierten Gene α -SMA, IL-6 und Periostin. Diese wirken über vielfältige Mechanismen an kardialen Umstrukturierungsprozessen mit [7, 66, 85, 103-108]. Hierfür wurden kardiale Fibroblasten, sowohl unter LG als auch HG Bedingungen kultiviert, für 24 Stunden mit den PAR-4 Agonisten Thrombin (1 IU/ml) und PAR-

4-AP (100 $\mu\text{mol/L}$) stimuliert und anschließend die mRNA Expression der Gene mittels qPCR detektiert.

3.3.1 Verstärkte Thrombin-induzierte α -SMA-Expression

Die Expression von α -SMA-mRNA wurde durch Stimulation von PAR-4 mit Thrombin induziert. In LG-Fibroblasten zeigte sich eine moderate Erhöhung, in HG-Fibroblasten fiel die Induktion hingegen deutlich stärker auf, um bis zu 7-fach gegenüber der Kontrolle (Abb. 8A). Dieser Versuch wurde parallel in Zellen aus PAR-4-defizienten Tieren durchgeführt, hier fiel die Thrombin-Induktion von α -SMA weg (Abb. 8B).

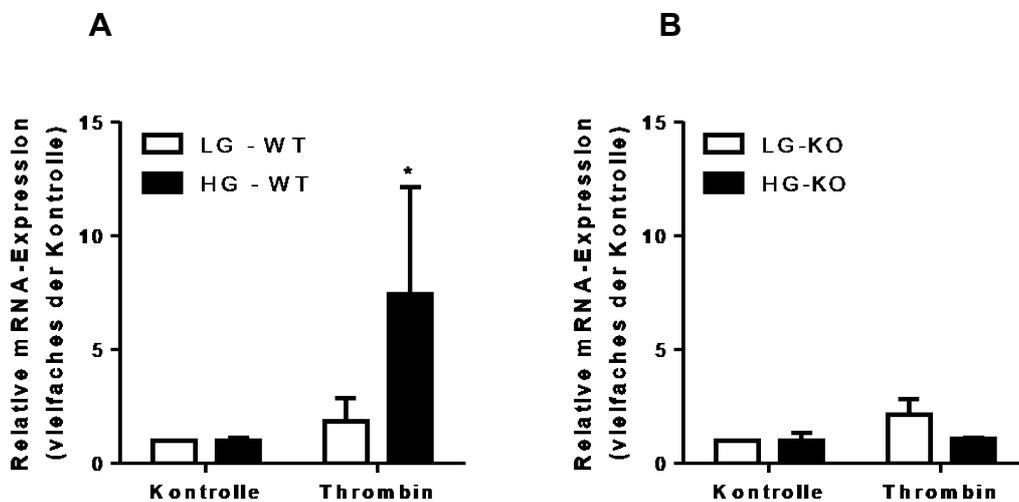


Abb. 8: Verstärkte Thrombin-induzierte Expression von α -SMA unter simulierter Hyperglykämie ist PAR4-abhängig. Kardiale Fibroblasten aus PAR-4-Wildtyp (WT) und PAR-4^{-/-} (KO) Mäusen wurden in LG (weißer Balken, 5.5 mmol/L) oder HG (schwarzer Balken, 25 mmol/L) Medien kultiviert und mit oder ohne Thrombin (1 IU/ml) stimuliert. Dargestellt ist die mRNA-Expression von α -SMA als Mittelwert \pm Standardfehler aus n=4 unabhängigen Experimenten. *P<0.05 vs. Kontrolle (LG).

3.3.2 Verstärkte Thrombin-induzierte IL-6-Expression

Parallel zur α -SMA Expression stieg auch die IL-6 mRNA-Expression unter simulierter Hyperglykämie an. Die LG-Fibroblasten zeigten nach Stimulation ebenfalls nur eine moderate Erhöhung der IL-6-Expression, während diese in HG-Fibroblasten nach Stimulation sogar bis zu 8-fach erhöht war (Abb. 9A).

Wieder zeigte sich in KO-Fibroblasten keine detektierbare Thrombin-induzierte Induktion des Zielgens (Abb. 9B).

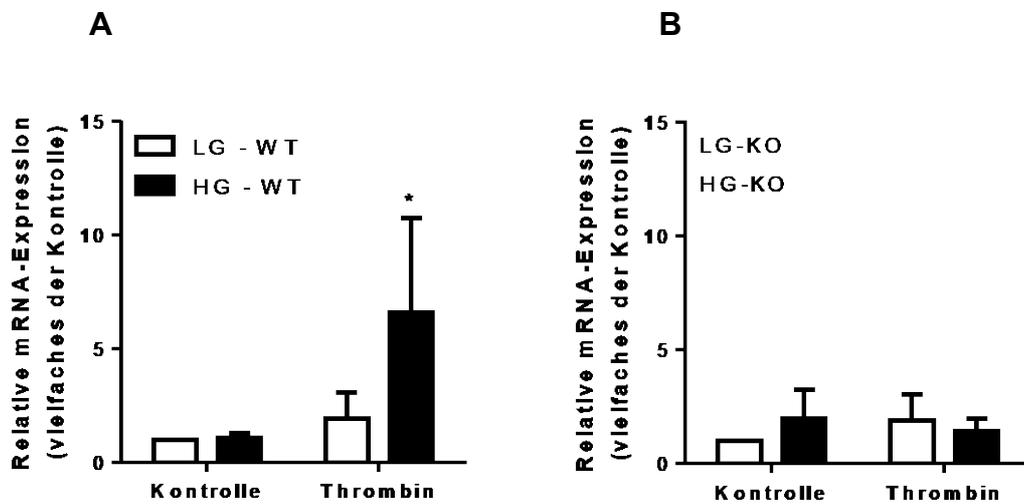


Abb. 9: Verstärkte Thrombin-induzierte Expression von IL-6 unter simulierter Hyperglykämie ist PAR4-abhängig. Kardiale Fibroblasten aus PAR-4-Wildtyp (WT) und PAR-4^{-/-} (KO) Mäusen wurden in LG (weißer Balken, 5.5 mmol/L) oder HG (schwarzer Balken, 25 mmol/L) Medien kultiviert und mit oder ohne Thrombin (1 IU/ml) stimuliert. Dargestellt ist die mRNA-Expression von IL-6 als Mittelwert ± Standardfehler aus n=4 unabhängigen Experimenten. *P<0.05 vs. Kontrolle (LG).

3.3.3 Verstärkte Thrombin-induzierte Periostin-Expression

Die mRNA-Expression von Periostin blieb in der 24 Stunden-Stimulation unter LG-Bedingungen auf dem Level der Kontrollgruppe, unter HG-Bedingungen erfolgte eine moderate Erhöhung im Sinne einer Verdopplung der Periostin-Expression (Abb. 10A). Die mRNA-Expression der PAR-4^{-/-}-Kontrollgruppe blieb in diesen Versuchen ebenfalls auf einem basalen Level (10B). Folgeversuche mit einer größeren Stichprobengruppe könnten hierbei ein eindeutigeres Ergebnis zeigen.

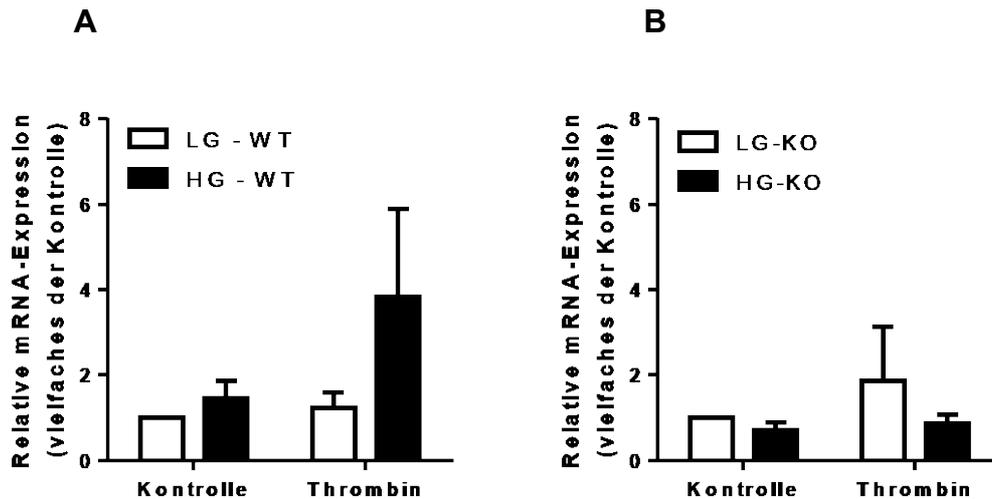


Abb. 10: Verstärkte Thrombin-induzierte Expression von Periostin unter simulierter Hyperglykämie ist PAR4-abhängig. Kardiale Fibroblasten aus PAR-4-Wildtyp (WT) und PAR-4^{-/-} (KO) Mäusen wurden in LG (weißer Balken, 5.5 mmol/L) oder HG (schwarzer Balken, 25 mmol/L) Medien kultiviert und mit oder ohne Thrombin (1 IU/ml) stimuliert. Dargestellt ist die mRNA-Expression von Periostin als Mittelwert ± Standardfehler aus n=4 unabhängigen Experimenten.

3.4 Regulation der PAR-4-Expression *in vivo*

Um die gewonnenen Erkenntnisse der *in vitro* Versuche auf ein *in vivo* Modell zu projizieren, erfolgte eine Untersuchung der PAR-4-mRNA-Expression in Herzen von Mäusen nach Behandlung mit STZ. Durch die Zerstörung der β -Zellen des Pankreas litten die Mäuse vor Entnahme der Herzen an einem iatrogen-induzierten Typ-1-Diabetes. In vergangenen Projekten der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die PAR-4-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen von STZ-induzierten Mäusen erhöht ist [20]. Ich konnte dies nun auch für kardiale Fibroblasten aus diabetischen Mäusen nachweisen, die eine deutlich höhere Expression von PAR-4-mRNA aufwiesen als kardiale Fibroblasten aus der nicht-diabetischen Kontrollgruppe (Abb. 11).

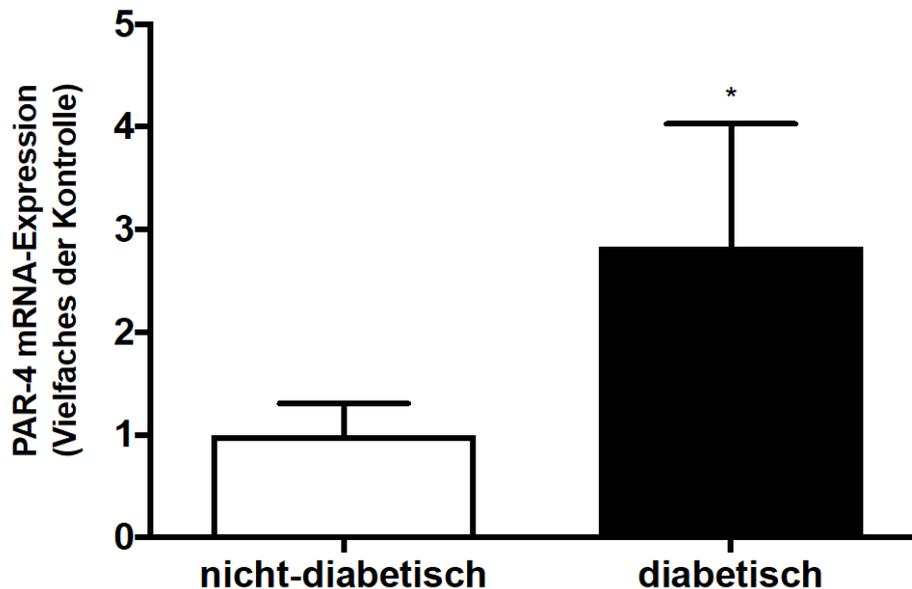


Abb. 11: Einfluss von Hyperglykämie *in vivo* auf die kardiale PAR-4-mRNA-Expression im Herzen. Kardiale Fibroblasten wurden aus STZ-behandelten Mäusen (diabetisch) und nicht-STZ-behandelten Mäusen (nicht-diabetisch) isoliert. Nach 24h Serum-Entzug wurde die PAR-4-mRNA-Expression mittels qPCR gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus $n=5$ unabhängigen Experimenten. * $P<0.05$ vs. Kontrolle (LG).

3.5 PAR-4-vermittelte Migration

Im Herz spielen kardialen Fibroblasten nach einer Verletzung eine existentielle Rolle. Es ist beschrieben worden, dass sie zum zellulären Umbau und zur Fibrose des Herzens nach Myokardinfarkt beitragen [6, 62]. Des Weiteren ist eine gestörte Wundheilung auch ein bekannte Folge von Diabetes mellitus [109]. Inwiefern PAR-4 an der Migration kardialer Fibroblasten beteiligt ist, wurde per *Wound-scratch* Assay untersucht.

3.5.1 Verminderte Migration durch simulierte Hyperglykämie

Der Versuch konnte erweisen, dass die basale Einwanderung der Fibroblasten in die simulierte Wunde in HG-Zellen im Vergleich zur LG-Kontrollgruppe erniedrigt ist. Ein ähnlicher, wenn auch schwächerer Unterschied, zeigte sich

auch in PAR-4-Knockout Zellen. Leider standen mir nur n=2 Tiere zur Verfügung, sodass eine statistische Auswertung nicht möglich war (Abb. 12).

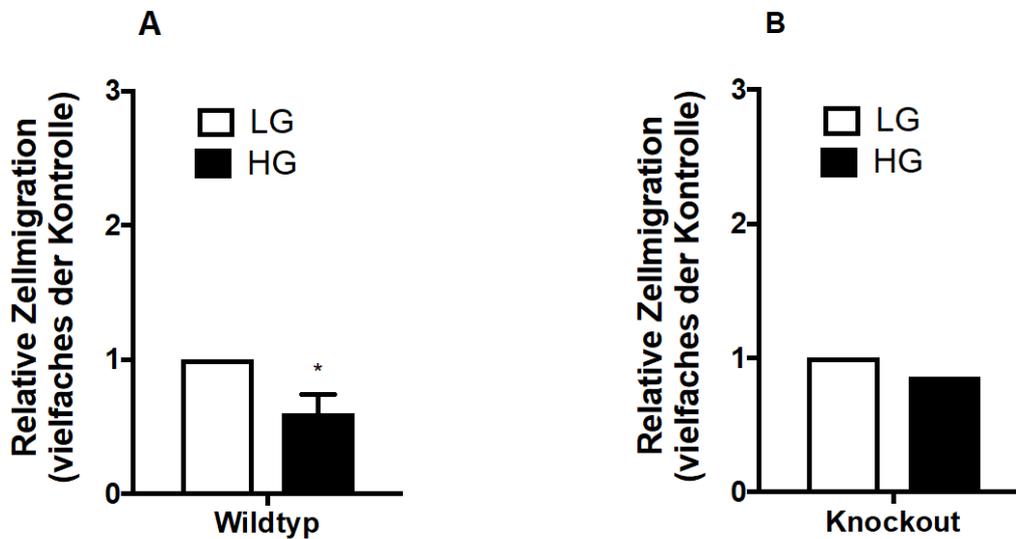


Abb. 12: Migration von kardialen Fibroblasten unter normalen versus erhöhter Glukosekonzentration. Kardiale Fibroblasten wurden aus (A) PAR-4-Wildtyp und (B) PAR-4-Knockout Mäusen in LG (weißer Balken, 5.5 mmol/L) oder HG (schwarzer Balken, 25 mmol/L) Medien kultiviert und im Wound-scratch Assay analysiert. Die Einwanderung der Zellen in den Spalt wurde nach 48 Stunden gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus n=4 unabhängigen Experimenten für WT und Mittelwerte aus n=2 unabhängigen Experimenten für KO. *P<0.05 vs. Kontrolle (LG).

3.5.2 Verstärkte Migration durch PAR-4-Stimulation

Um den Effekt der Migration PAR-4 spezifisch zu untersuchen, wurden die Zellen nach dem *scratch* für 24 Stunden mit PAR-4-AP (100 μ mol/L) oder mit humanem Thrombin (1 IU/ml) stimuliert. Zur Dokumentation wurden die Zellen zum Zeitpunkt 0 (sofort) und zum Zeitpunkt 1 (nach 48 Stunden) im Lichtmikroskop fotografiert, danach die in den der Spalt eingewanderten, bzw. die im Spalt proliferierenden, Zellen gezählt. In diesen repräsentativen Fotos ist der durch den *scratch* erzeugte Spalt in den Zellen zum Zeitpunkt 1 mit und ohne Stimulation durch PAR-4-AP oder Thrombin dargestellt. Schon in den Fotos lässt sich erkennen, dass die Migration nach Stimulation mit PAR-4-AP und Thrombin verstärkt ist (Abb. 13).

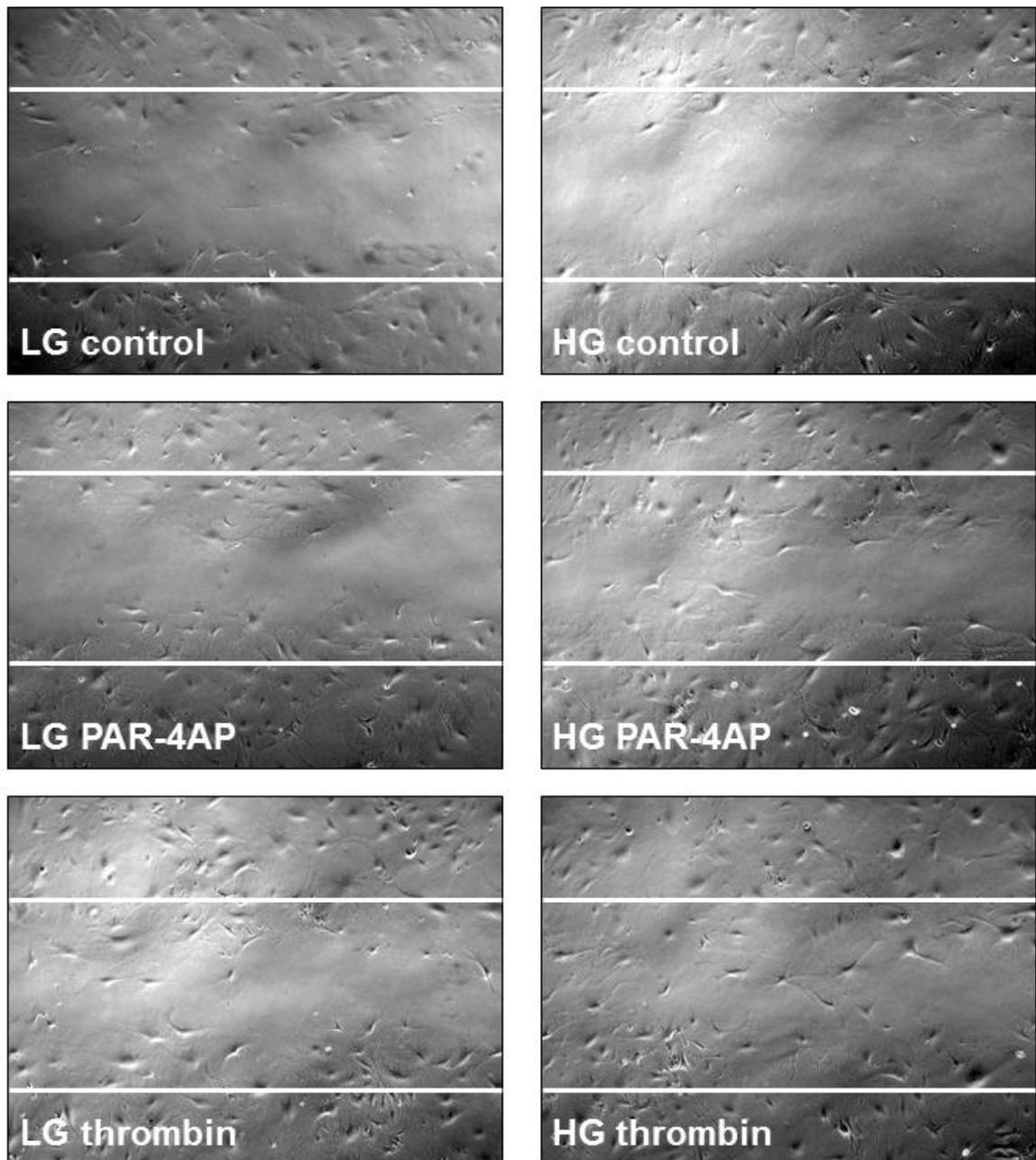


Abb. 13: Lichtmikroskopische Darstellung der Migration kardialer Fibroblasten im Wound-scratch Assay. Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen des durch den *scratch* erzeugten Spaltes zum Zeitpunkt 1 (48 Stunden). Kardiale Fibroblasten wurden in LG (5,5 mmol/L) oder in HG (25 mmol/L) Medium kultiviert. Das Medium wurden direkt nach dem *scratch* mit oder ohne PAR-4-AP (100 μ mol/L) oder humanen Thrombin (1 IU/ml) versetzt.

In der quantifizierten Auswertung ließ sich bestätigen, dass die Stimulation von PAR-4 die Einwanderung der Zellen in den Spalt deutlich verstärkt. Dies Phänomen war in HG Zellen stärker als in LG Zellen zu erkennen, dort wurde die Migration mehr als verdoppelt. (Abb. 14A). In Zellen aus PAR-4-defizienten

Mäusen war eine geringgradige Erhöhung der Migration und Proliferation nach Thrombin Stimulation in HG zu erkennen, allerdings standen mir auch hier nur n=2 Mäuseherzen zur Verfügung (Abb. 14B).

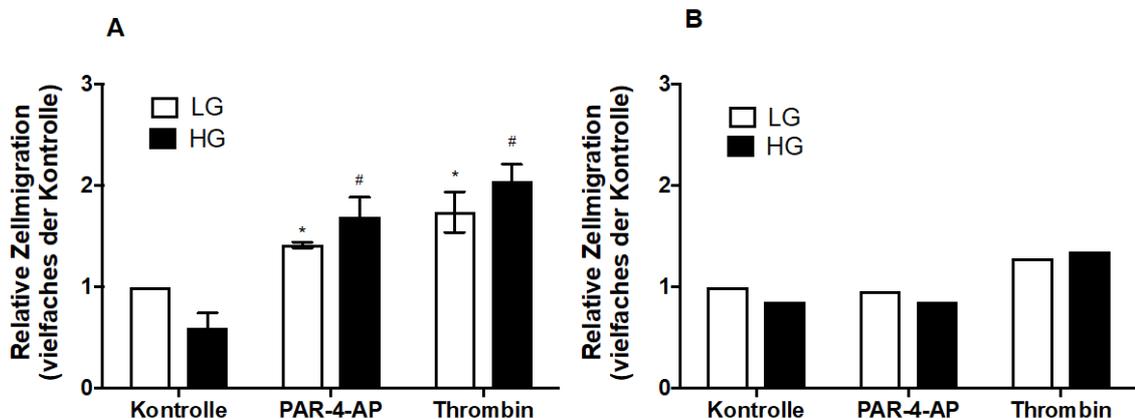


Abb. 14: PAR-4-vermittelte Migration in kardialen Fibroblasten. Kardiale Fibroblasten aus (A) PAR-4-Wildtyp (WT) und (B) PAR-4-Knockout (KO) Mäusen in LG-Medium (weißer Balken, 5.5 mmol/L) oder HG-Medium (schwarzer Balken, 25 mmol/L) kultiviert. Unmittelbar nach dem *scratch* wurde das Medium mit oder ohne PAR-4-AP (100 μ mol/L) oder humanen Thrombin (1 IU/ml) versetzt. Zu Zeitpunkt 1 (48 Stunden) wurden die in den Spalt eingewanderten Zellen gemessen und mit Zeitpunkt 0 (direkt nach dem *scratch*) verglichen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus n=4 unabhängigen Experimenten für WT und Mittelwerte aus n=2 unabhängigen Experimenten für KO. *P<0.05 vs. Kontrolle (LG), #P<0,05 vs. Kontrolle (HG).

3.6 PAR-4-vermittelte Bildung von oxidativem Stress

Oxidativer Stress trägt nach Herzinfarkt zur Verschlechterung der Herzfunktion bei [110-112]. In kardialen Fibroblasten ist oxidativer Stress insbesondere an der Differenzierung zu Myofibroblasten, bzw. Aktivierung der Fibroblasten, und der Produktion von Kollagen beteiligt [112]. Zur Quantifizierung des oxidativen Stresses nutzte ich die Fluoreszenzmessung von DHE-beladenen Zellen.

3.6.1 Konstanter oxidativer Stress bei kurzzeitiger PAR-4-Stimulation

Kardiale Fibroblasten wurden vor der Fluoreszenzmessung 30 Minuten mit PAR-4-AP (100 μ mol/L) oder humanem Thrombin (1 IU/ml) stimuliert, um den akuten Einfluss auf die Bildung von Superoxiden zu detektieren. Über dieses Zeitintervall konnte ich weder in LG noch in HG eine verstärkte intrazelluläre Superoxidbildung infolge der Stimulation feststellen (Abb. 15).

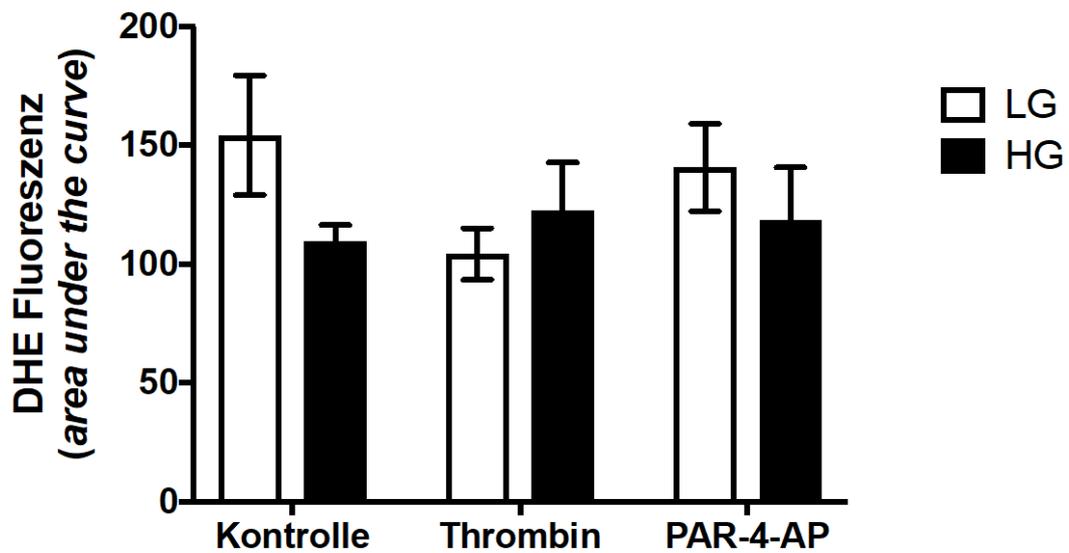


Abb. 15: Einfluss von akuter PAR-4-Stimulation auf die Bildung von Superoxidanionen in kardialen Fibroblasten. Kardiale Fibroblasten wurden in LG-Medium (weißer Balken, 5.5 mmol/L) oder HG-Medium (schwarzer Balken, 25 mmol/L) kultiviert und 30 min mit PAR-4-AP (100 $\mu\text{mol/L}$) stimuliert. Danach wurde die Bildung von Superoxidanionen mittels Fluoreszenzmessung von DHE detektiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler der *area under the curve* aus $n=4$ unabhängigen Experimenten.

3.6.2 Verstärkter oxidativer Stress bei anhaltender PAR-4-Stimulation in simulierter Hyperglykämie

Im Vergleich zur kurzzeitigen (30 min) Stimulation, konnte ich nach 24-stündiger Stimulation mit PAR-4-AP (100 $\mu\text{mol/L}$) eine Verdopplung des oxidativen Stress Markers in HG-Fibroblasten erkennen, während die LG-Fibroblasten keine Reaktion zeigten (Abb. 16).

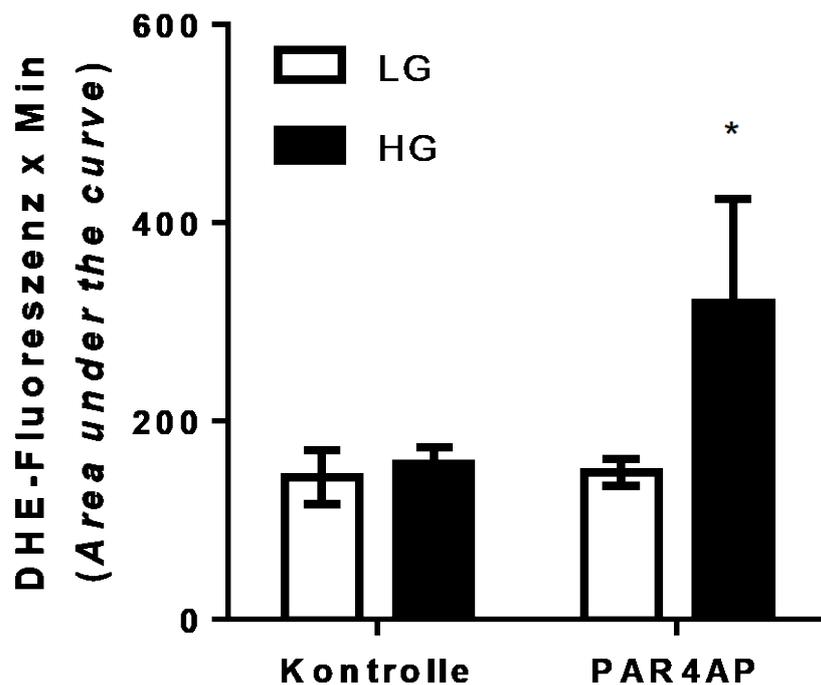


Abb. 16: Einfluss der 24h Stimulation von PAR-4 auf die Bildung von Superoxidanionen in kardialen Fibroblasten. Kardiale Fibroblasten wurden in LG-Medium (weißer Balken, 5.5 mmol/L) oder HG-Medium (schwarzer Balken, 25 mmol/L) kultiviert und 24h mit PAR-4-AP (100 μ mol/L) stimuliert. Danach wurde die Bildung von Superoxidanionen mittels Fluoreszenzmessung von DHE detektiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler der Fläche unter der Kurve aus n=4 unabhängigen Experimenten. *P<0.05 vs. Kontrolle (LG).

3.7 PAR-4-vermittelte Proliferation

Die Fibrose des Herzens geht mit einer exzessiver Produktion von extrazellulärer Matrix, Differenzierung der kardialen Fibroblasten zur Myofibroblasten, bzw. der Aktivierung der Fibroblasten und zum großen Teil auch Proliferation der kardialen Fibroblasten einher [113]. Da der Wound-scratch Assay neben Proliferation vor allem als Migrationsnachweis dient, nahm ich zusätzlich einer Messung der Proliferationsaktivität der kardialen Fibroblasten mittels BrdU-Inkorporation vor.

3.7.1 Verminderte Proliferation in simulierter Hyperglykämie

In meinen Versuchen war eine geringgradige Verminderung der Proliferationsrate in kardialen Fibroblasten in HG im Vergleich zur LG Kontrollgruppe feststellen. (Abb. 17).

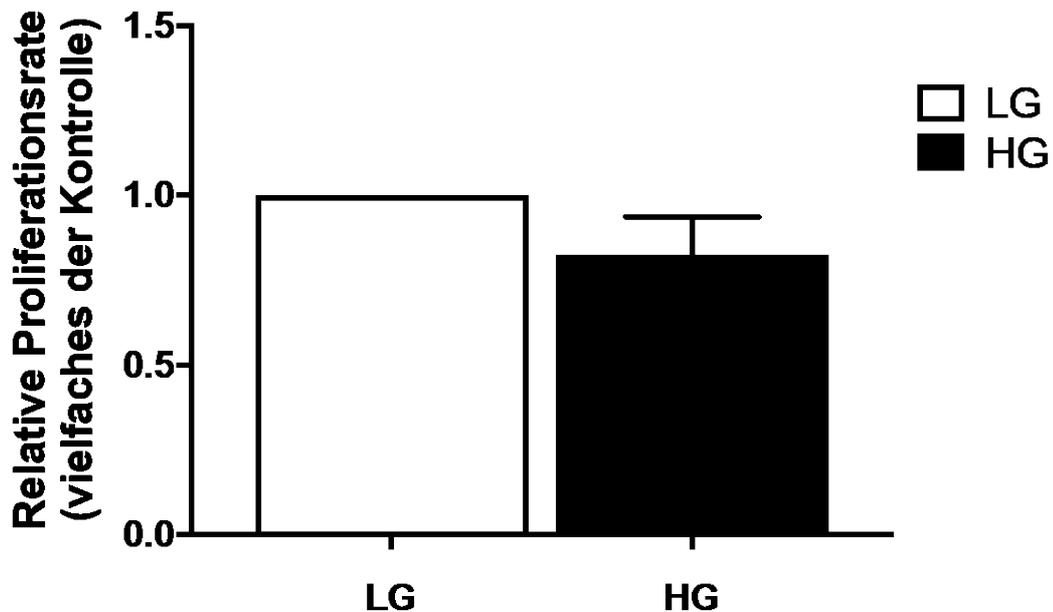


Abb. 17: Einfluss von erhöhter Glukosekonzentration auf die Proliferationsrate kardialer Fibroblasten. Kardiale Fibroblasten wurden in LG-Medium (weißer Balken, 5.5 mmol/L) oder HG-Medium (schwarzer Balken, 25 mmol/L) kultiviert und die Proliferationsrate mittels BrdU-Inkorporation gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus n=3-4 unabhängigen Experimenten.

3.7.2 Verminderte Proliferation durch PAR-4-Stimulation

Nachdem das Medium für 24 Stunden mit PAR-4-AP (100 μ mol/L) versetzt worden war, wurde erneut per BrdU-Kit die Proliferationsrate gemessen. In diesem Versuch konnte ich zeigen, dass die Proliferationsrate nach PAR-4-Stimulation im Vergleich zur Kontrollgruppe verringert ist. In LG-Fibroblasten war dies eine eher mäßige Verminderung, in HG-Fibroblasten allerdings deutlich stärker. Dort sank die Proliferationsrate auf fast die Hälfte (Abb. 18).

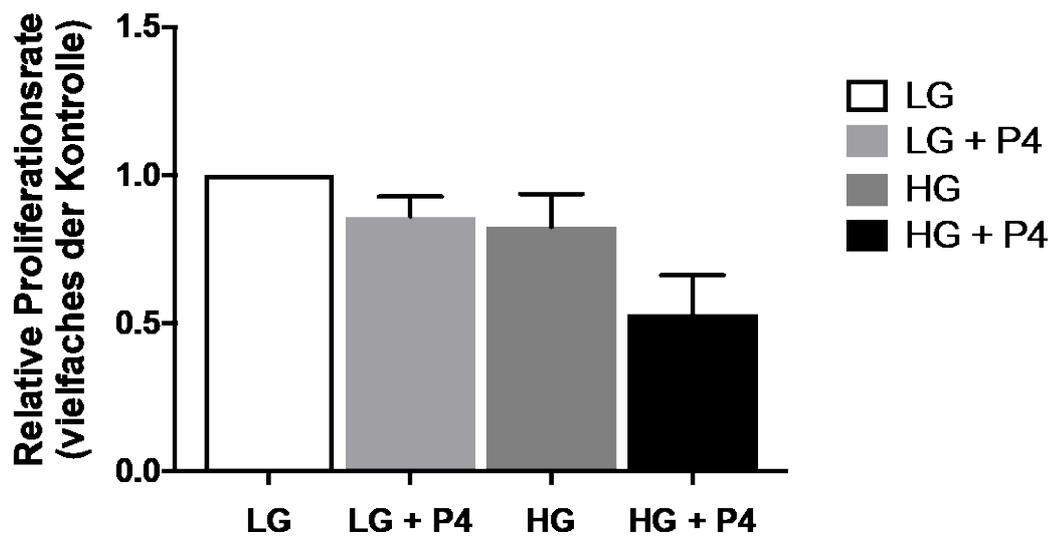


Abb. 18: Einfluss der PAR-4-Stimulation auf die Proliferationsrate kardialer Fibroblasten. Kardiale Fibroblasten wurden in LG (weißer Balken, 5.5 mmol/L) oder HG (schwarzer Balken, 25 mmol/L) Medium kultiviert und 24h mit PAR-4-AP (100 μ mol/L) stimuliert. Danach wurde die Proliferationsrate mittels BrdU-Inkorporation gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus n=3-4 unabhängigen Experimenten.

4 Diskussion

4.1 Überblick

Im diabetischen Herzen sind kardiale Fibroblasten maßgeblich an strukturellen Veränderungen im Rahmen des myokardialen Remodeling und der diabetischen Kardiomyopathie beteiligt [4-8]. PAR-1 und PAR-2 werden beide auf kardialen Fibroblasten exprimiert und als wichtige Rezeptoren in Bezug auf myokardiales Remodeling thematisiert [10, 84]. Eine Inhibition von PAR-1 wird bereits als therapeutischer Ansatz zur Kardioprotektion nach Myokardinfarkt beschrieben [114]. PAR-4 hingegen ist diesbezüglich bislang kaum erforscht worden. Ein wichtiger Grund hierfür war sicherlich, dass PAR-4 in kardialen Fibroblasten im Allgemeinen als abwesend bezeichnet worden war [9, 89].

In dieser Arbeit konnte ich nun erstmals zeigen, dass PAR-4 auf kardialen Fibroblasten der Maus exprimiert ist. Zusätzlich konnte ich darstellen, dass die funktionelle Expression des Rezeptors durch simulierte Hyperglykämie verstärkt wird, was besonders für die Entstehung von kardiovaskulären Komplikationen des Diabetes mellitus von Bedeutung sein könnte.

4.2 PAR-4 auf kardialen Fibroblasten

Hauptziel meiner Dissertation war der Nachweis der funktionellen Expression von PAR-4 auf kardialen Fibroblasten. Kardiale Fibroblasten sind durch Aktivierung, Proliferation, Migration und exzessive Produktion von EZM an myokardialem Remodeling beteiligt [5-8] und spielen eine primäre Rolle in der Entwicklung einer diabetischen Kardiomyopathie [28, 32, 33].

Bisher war PAR-4 in verschiedenen Zelltypen, beispielsweise glatten Muskelzellen, Blutplättchen oder Herzmuskelzellen, beschrieben worden [90, 91]. Auf kardialen Fibroblasten allerdings war der Rezeptor im Allgemeinen als nicht anwesend bezeichnet worden [9, 89]. Entgegen dieser Annahmen hatte unsere Arbeitsgruppe als Zufallsprodukt PAR-4-mRNA in kardialen Fibroblasten unter HG-Bedingungen detektieren können.

In meinen Versuchen konnte ich nun validieren, dass PAR-4 von kardialen Fibroblasten exprimiert wird, sowohl unter LG- als auch unter HG-Bedingungen. Frühere Arbeiten, die keine PAR-4-Expression in kardialen Fibroblasten finden konnten, nutzten allerdings zur Messung von PAR-4 entweder semi-quantitative PCR-Methoden oder die Aktivierung der Phospholipase C als Surrogat-Parameter [9, 89]. Wie einleitend beschrieben, sind neben der PLC für die Signalweiterleitung von PAR-4 bereits weitere Mechanismen bekannt [87]. Außerdem hatten Strande *et al.* kardiale Fibroblasten aus Rattenherzen isoliert [89]. In Ratten und Mäusen waren bereits Unterschiede in der Mengenverteilung von kardialen Fibroblasten im Herz festgestellt worden [115], meine Ergebnisse legen nun auch eine interspezifische Variabilität von PAR-4 in kardialen Fibroblasten nahe.

4.3 Regulation von PAR-4 durch Glukose

Ein weiterer Fokus in dieser Dissertation lag auf der Untersuchung der Regulation von PAR-4 durch Glukose. Unsere Arbeitsgruppe hatte bereits darstellen können, dass eine Erhöhung der Glukosekonzentration die PAR-4-Expression auf glatten Gefäßmuskelzellen erhöht [20, 116]. Diese Ergebnisse legten nahe, dass falls PAR-4 auf kardialen Fibroblasten exprimiert ist, auch dort eine dynamische Regulation von Glukose vorliegen könnte.

Die Expression von PAR-4 auf kardialen Fibroblasten konnte ich bereits in 3.1 zeigen. In folgenden Versuchen ließ sich sowohl auf Transkriptionsebene als auch im Immunoblot eine Induktion von PAR-4 durch simulierte Hyperglykämie feststellen. Noch dazu konnte ich darstellen, dass die Induktion dynamisch und abhängig von der Höhe der Glukosekonzentration ist. So führte eine Erhöhung der extrazellulären Glukosekonzentration von 5,5 mmol/L auf 10 mmol/L zu einer mäßigen Induktion von PAR-4, einer Erhöhung auf 25 mmol/L hingegen zu einer starken Induktion. Auch konnte ich eine Reversibilität der Induktion feststellen. Zellen die dauerhaft in HG gehalten worden waren, exprimierten nach Konversion des Mediums zu LG deutlich weniger PAR-4, ähnlich viel wie Zellen die dauerhaft in LG gehalten worden waren.

Um die Ergebnisse der Versuche in einem *in vivo* Modell zu reproduzieren, untersuchte ich die PAR-4-mRNA-Expression in Herzen aus Mäusen mit STZ-induziertem Diabetes mellitus. STZ induziert durch Zerstörung der Beta-Zellen des Pankreas einen Typ-1-Diabetes mit ausgeprägter Hyperglykämie. Dort konnte ich analog zu den *in vitro* Versuchen eine erhöhte PAR-4-mRNA-Expression in diabetischen Mäuseherzen detektieren.

4.4 Beteiligung von PAR-4 an Kardiomyopathie-relevanten Prozessen

Vorherige Daten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass eine Glukose-abhängige PAR-4 Regulation in glatten Gefäßmuskelzellen zum vaskulären Remodeling beiträgt [20, 116]. Ob und inwiefern PAR-4 an einem ähnlichen Prozess im Herzen, dem myokardialen Remodeling, beteiligt ist, habe ich in den in 3.3 beschriebenen Versuchen untersucht.

4.4.1 Molekulargenetische Ebene

Meine Ergebnisse demonstrieren, dass eine simulierte Hyperglykämie die funktionelle Antwort auf PAR-4-Stimulation deutlich verstärkt. Die mRNA-Expression der pro-fibrotischen und pro-inflammatorischen Markermoleküle α -SMA, IL-6 und Periostin, wurde durch Stimulation von PAR-4 durch Thrombin (1 IU/ml) vor allem unter HG-Bedingungen erhöht. Ich konnte eine 7-fach erhöhte α -SMA-Expression und eine 8-fach erhöhte IL-6-Expression in simulierter Hyperglykämie feststellen. Auch die Thrombin-induzierte Periostin-Expression war in simulierter Hyperglykämie erhöht, jedoch etwas moderater. Unter LG-Bedingungen war die Antwort auf Thrombin deutlich geringer. Um den Effekt PAR-4-spezifisch zu untersuchen, führte ich den Versuch simultan mit PAR-4^{-/-} Zellen durch. Die Induktion durch Stimulation blieb in den Knockout Zellen weitestgehend aus, wodurch ich bestätigen konnte, dass der Effekt PAR-4-vermittelt auftritt.

Was bedeutet diese Potenzierung der Antwortsignale von PAR-4 nun für das Herz? Dazu muss man die drei Signalmoleküle, α -SMA, IL-6 und Periostin, genauer betrachten.

α -SMA ist ein Protein, das von Myofibroblasten nach ihrer Differenzierung aus Fibroblasten exprimiert wird [66, 85, 104, 117]. Wie einleitend beschrieben, sind Myofibroblasten für die Entstehung kardialer Fibrose essentiell. Die α -SMA-Expression wird dabei einerseits durch strukturelle Veränderungen der extrazellulären Matrix, wie eine erhöhte Kollagen-IV-Konzentration, induziert [118]. Andererseits kann auch das EDA-enthaltende zelluläre Fibronectin, welches vermehrt nach Myokardinfarkt gebildet wird [119], über die Bindung von EDA an $\alpha(4),\beta(7)$ -Integrin die α -SMA-Expression erhöhen [120]. Zusätzlich wird die Differenzierung zu Myofibroblasten auch über Smad-2-Phosphorylierung durch TGF- β gefördert [121].

Die Induktion der α -SMA-Expression lässt darauf schließen, dass Hyperglykämie über PAR-4 auch ohne vaskuläre Schädigung die Differenzierung kardialer Fibroblasten zu Myofibroblasten induzieren kann. Dies deckt sich mit Ergebnissen von Bugyei-Twum *et al.*, in denen simulierte Hyperglykämie über eine erhöhte Aktivität von p300, einem transkriptionellen Ko-Regulator von TGF- β , die α -SMA-Expression induziert. Meine Ergebnisse eröffnen nun über PAR-4 einen neuen Weg, in dem Hyperglykämie an der Differenzierung von Myofibroblasten beteiligt sein könnte.

Der zweite Marker, Interleukin 6 (IL-6), ist ein Zytokin, das in verschiedenen Organsystemen Proliferation, Differenzierung, Überleben und Apoptose der Zellen reguliert. Darüber ist es an der Wirksamkeit des Immunsystems, Hämatopoese und Inflammation beteiligt [122]. Im Herz wird IL-6 von kardialen Fibroblasten ausgeschüttet [7] und wirkt als profibrotisches Zytokin [107, 108]. Dabei wird durch IL-6 zum einen die Produktion von Kollagen verstärkt, zum anderen induziert IL-6 auch die Produktion von TGF- β und ist darüber an der Differenzierung zu Myofibroblasten beteiligt [106, 107]. Insgesamt ist die Bedeutung von IL-6 in Patienten mit Herzinsuffizienz bereits so groß, dass IL-6 als möglicher prädiktiver Marker für eine 1-Jahres-Mortalität dargestellt worden ist [123].

Analog zu den Ergebnissen bezüglich α -SMA konnte ich auch eine erhöhte IL-6 Expression feststellen. Über eine PAR-4-bedingte IL-6-Induktion ist bereits in anderen Geweben berichtet worden [85, 124]. Auch konnten Zhang *et al.* in Herzen von STZ-behandelten Mäusen eine erhöhte IL-6-Konzentration

detektieren [125]. In weiterführenden Versuchen wurde gezeigt, dass IL-6 ein wichtiger Faktor in der Entstehung der kardialen Fibrose ist und eine Deletion von IL-6 eine protektive Wirkung auf das Herz hat [86, 107, 125, 126].

Neuere Studien wiederum legen jedoch auch eine protektive Funktion von IL-6 in der Zeit nach einem Myokardinfarkt dar, hierbei scheint insbesondere der akute Anstieg von IL-6 nach der Schädigung sich positiv auf die kardiale Funktion und die Infarktgröße auszuwirken [126].

Meine Ergebnisse legen nun nahe, dass die schädigende Wirkung von IL-6 durch chronische Hyperglykämie getriggert über PAR-4 verstärkt auftreten könnte. Die Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen jedoch auch eine erhöhte PAR-4-Expression nach Myokardinfarkt. Ob und inwiefern PAR-4 den protektiven Effekt von IL-6 nach Myokardinfarkt unterstützt, bedarf weiterer Untersuchungen.

Periostin, der dritte Marker, ist als extrazellulär gelegenes Protein an Migration, Proliferation und Adhäsion beteiligt [103, 105]. Die Rolle von Periostin im Herz ist noch nicht vollständig geklärt. Während es in der embryonalen Entwicklung eine wichtige Rolle spielt, scheint es unter physiologischen Bedingungen nicht anwesend zu sein [127-129]. Erst nach einer Schädigung des Myokards greift Periostin in kardiale Prozesse ein. Dabei scheint es ein notwendiger Mediator im Heilungsprozess nach Myokardinfarkt zu sein [130, 131], jedoch auch bei persistierender Erhöhung pathologische Vorgänge im Sinne des myokardialen Remodelings zu verstärken [130, 132]. Als mögliche Interaktionen in kardialen Fibroblasten sind Bindung von EZM-Proteinen, Synthese von Kollagen, Adhärenz von Fibroblasten und inflammatorischen Zellen sowie die eine Beteiligung an der Differenzierung zu Myofibroblasten beschrieben worden [131-134]. Die Produktion von Periostin wird dabei durch TGF- β induziert [59, 135].

Auch die Periostin mRNA-Expression konnte durch Stimulation von PAR-4 in simulierter Hyperglykämie gesteigert werden. Zou *et al.* hatten bereits zeigen können, dass eine simulierte Hyperglykämie die Expression von Periostin in kardialen Fibroblasten aus Ratten erhöhen konnte [136]. Als Signalwege waren dabei die Proteinkinase C, die C-Jun-N-terminale Kinase (JNK) und Signalwege, gesteuert über oxidativen Stress, benannt worden. In Versuchen von Li *et al.* konnte dargestellt werden, dass die Periostin Expression durch Angiotensin II unter anderem über den p38-MAPK Signalweg induziert werden kann [137].

French *et al.* konnten zeigen, dass auch PAR-4 über Proteinkinase C und p38-MAPK seine Signale weiterleitet [87]. Eine erhöhte Periostin-Expression in Hyperglykämie könnte also durch PAR-4 über genau diese Wege induziert werden und an myokardialen Remodeling teilhaben.

Zusammenfassend konnte ich zeigen, dass PAR-4 im diabetischen Herz über die Induktion von α -SMA, IL-6 und Periostin an kardialen Umstrukturierungsprozessen beteiligt sein könnte. Zusätzlich zeigen Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, dass sowohl PAR-4-Expression als auch Cathepsin-G-Expression nach koronarer Ischämie erhöht sind.

Sollte die koronare Ischämie nun in Hyperglykämie auftreten, könnte eine Stimulation von PAR-4 durch Cathepsin G die profibrotischen Prozesse ebenfalls potenzieren. Da koronare Ereignisse unter Diabetikern verstärkt auftreten, ist diese Erkenntnis von klinischer Relevanz.

4.4.2 Zellulärer Ebene

Um die kardialen Umstrukturierungsprozesse im diabetischen Herz auf zellulärer Ebene zu untersuchen, testete ich den Einfluss der Stimulation von PAR-4 auf oxidativen Stress, Migration und Proliferation.

Reaktive Sauerstoffspezies sind über Proliferation der kardialen Fibroblasten, Differenzierung zu Myofibroblasten und Veränderung der extrazellulären Matrix an der Entstehung kardialer Fibrose beteiligt [112, 138, 139]. Der Ursprung von reaktiven Sauerstoffspezies ist dabei vielfältig; so werden sie von Mitochondrien, der Xanthin-Oxidase, der NO-Synthase und insbesondere von NADPH-Oxidase gebildet [112].

Die Ergebnisse meiner Untersuchung zeigen eine verstärkte Bildung von Superoxidanionen in Folge einer PAR-4-Stimulation, vor allem unter HG-Bedingungen. Nach einer 24-stündigen Stimulation mit Thrombin konnte ich einen deutlichen Anstieg der Superoxidanionen detektieren - bei einer 30-minütigen Stimulation hingegen noch nicht. Der daraus resultierende profibrotische Effekt scheint also möglicherweise eher über eine Induktion der Expression von pro-oxidativen Systemen, beispielsweise über die NADPH-Oxidase, an Stelle einer direkten Aktivierung der Superoxidanionen-Produktion stattzufinden.

Einen ähnlichen Trend konnte ich bei der Untersuchung der Zellmigration detektieren. Zellmigration ist einer der wichtigsten physiologischen Funktionen von kardialen Fibroblasten [49, 96]. Mehrere Studien haben jedoch auch gezeigt, dass in kardialen Remodeling der pathologische Effekt der kardialen Fibroblasten über verstärkte Zellmigration hervorgerufen wird [62, 64].

Die Studienlage bezüglich des Effektes einer Hyperglykämie auf Zellmigration ist bislang nicht eindeutig. In einem *in vitro* Versuch von *Zhang et al.* wurde eine erniedrigte Migrationsrate der kardialen Fibroblasten unter Hyperglykämie festgestellt [140]. Abweichend sind allerdings Ergebnisse von *Fowlkes et al.*, die keinen Unterschied zwischen der Migration diabetischer und nicht-diabetischer kardialer Fibroblasten darstellen konnten [4]. Entscheidender Unterschied in den Ergebnissen von *Fowlkes et al.* könnte dabei gewesen sein, dass die *in vitro* Zellkultur sowohl diabetischer als auch nicht-diabetischer Mäuse in HG-Medium stattfand.

In meiner Arbeit konnte ich nun zeigen, dass eine Stimulation von PAR-4 den Wundverschluss von kardialen Fibroblasten insbesondere in simulierter Hyperglykämie verstärkt. Ein ähnlicher, jedoch geringerer Effekt zeigte sich in den LG-Fibroblasten. Ohne die Stimulation von PAR-4 hingegen zeigte sich unter HG-Bedingungen eine erniedrigte Migrationsrate. Dies festigt unsere Annahme, dass PAR-4 ein wichtiger Regulator der Zellmigration ist.

Wie einleitend beschrieben ist auch Proliferation eine Hauptaufgabe der kardialen Fibroblasten [49, 62, 64]. Bislang wird eine erhöhte Proliferationsrate unter diabetischen Bedingungen beschrieben [4, 141]. Zusätzlich dazu ist gezeigt worden, dass Thrombin, ein Stimulator von PAR-4, proliferative Prozesse anregt [9, 84].

Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe illustrieren, dass Thrombin unter diabetischen Bedingungen erhöht ist. Dies führte zu der Hypothese, dass eine Stimulation von PAR-4 unter HG-Bedingungen eine verstärkte Proliferation hervorrufen könnte. Überraschenderweise deuten unsere Ergebnisse jedoch auf eine erniedrigte Proliferationsrate, insbesondere in simulierter Hyperglykämie, hin. Dies deckt sich mit neueren Untersuchungsergebnissen von *Gorski et al.*, wonach Hyperglykämie allein keine verstärkte Proliferation hervorrufen konnte [96]. Die

Kombination von Hyperglykämie und vaskulärer Schädigung hingegen, könnte möglicherweise eine PAR-4-vermittelte Induktion der Proliferation bewirken.

4.5 Klinische Relevanz und Ausblick

Die Bedeutung des Protease-aktivierten Rezeptor 4 an Prozessen des kardialen Remodelings ist Gegenstand aktueller Forschung. So ist eine Beteiligung von PAR-4 an vaskulären Remodeling bereits mehrfach beschrieben worden [20, 91]. Die Ergebnisse meiner Studie weisen auf eine Beteiligung von PAR-4 auch an kardialem Remodeling, insbesondere unter diabetischen Bedingungen, hin.

Die in dieser Studie durchgeführten *in vitro* Versuche bilden jedoch zunächst die Grundlage weiterer Forschungen an PAR-4. In mehreren Versuchen ist lediglich ein Trend sichtbar, statistische Signifikanz lässt sich nicht darstellen. Eine weitere Untersuchung mit einer höheren Anzahl an Tieren wäre sinnvoll, um die Ergebnisse zu verifizieren.

Um eine genauere Darstellung der Funktionsweise von PAR-4 auch unter physiologischen Bedingungen erwirken zu können, sind *in vivo* Versuche erforderlich. Zusätzlich sind weiterführende Studien mit PAR-4-defizienten Mäusen sinnvoll, da mir nur eine geringe Anzahl an Knockout-Mäusen zur Verfügung stand. Ferner ist die Übertragbarkeit von Versuchen aus Mäusen auf humane Zellen begrenzt, sowie eine interspezifische Varianz in der Funktion von PAR-4 beschrieben [87, 115]. Um den Effekt von PAR-4 abhängiger Stimulation in simulierter Hyperglykämie auf den diabetischen Patienten zu übertragen, wären Versuche mit humanen kardialen Fibroblasten erforderlich.

PAR-4 Antagonisten wie BMS-986120 werden derzeit als antithrombotische Therapie erprobt [142]. Ob und inwiefern ein PAR-4-Antagonist darüber hinaus auch im Herz wirken kann, ist noch unklar. Dabei ist PAR-4 in kardialen Fibroblasten an vielfältigen zellulären Veränderungen wie Wundverschluss, oxidativen Stress und Expression von Genen, die in engen Zusammenhang mit kardialem Remodeling stehen, beteiligt. Insbesondere die Potenzierung der Wirkung von PAR-4 unter diabetischen Bedingungen ist von Interesse, da dies PAR-4 eine mögliche Rolle in der Entstehung der diabetischen Kardiomyopathie zuspricht. Eine Unterbrechung dieser pathologischen Umbauprozesse könnte

Auswirkungen auf die Letalität der Erkrankung Diabetes mellitus haben. Weitere Forschungen zur Wirkung, Regulation und insbesondere der Inhibition von PAR-4 sind daher dringend wünschenswert.

5 Literaturverzeichnis

1. The Emerging Risk Factors, C., *Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies*. The Lancet. **375**(9733): p. 2215-2222.
2. Cohn, J.N., R. Ferrari, and N. Sharpe, *Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling*. Journal of the American College of Cardiology, 2000. **35**(3): p. 569-582.
3. Aneja, A., et al., *Diabetic cardiomyopathy: insights into pathogenesis, diagnostic challenges, and therapeutic options*. Am J Med, 2008. **121**(9): p. 748-57.
4. Fowlkes, V., et al., *Type II diabetes promotes a myofibroblast phenotype in cardiac fibroblasts*. Life sciences, 2013. **92**(11): p. 10.1016/j.lfs.2013.01.003.
5. Swynghedauw, B., *Molecular Mechanisms of Myocardial Remodeling*. Physiological Reviews, 1999. **79**(1): p. 215-262.
6. Brown, R.D., et al., *The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005. **45**: p. 657-87.
7. Porter, K.E. and N.A. Turner, *Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling*. Pharmacology & Therapeutics, 2009. **123**(2): p. 255-278.
8. Anderson, K.R., M.G. Sutton, and J.T. Lie, *Histopathological types of cardiac fibrosis in myocardial disease*. J Pathol, 1979. **128**(2): p. 79-85.
9. Sabri, A., et al., *Protease-activated receptor-1-mediated DNA synthesis in cardiac fibroblast is via epidermal growth factor receptor transactivation: distinct PAR-1 signaling pathways in cardiac fibroblasts and cardiomyocytes*. Circ Res, 2002. **91**(6): p. 532-9.
10. Antoniak, S., R. Pawlinski, and N. Mackman, *Protease-activated Receptors and Myocardial Infarction*. IUBMB life, 2011. **63**(6): p. 383-389.
11. Mathers, C.D. and D. Loncar, *Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030*. PLOS Medicine, 2006. **3**(11): p. e442.

12. Laakso, M. and J. Kuusisto, *Insulin resistance and hyperglycaemia in cardiovascular disease development*. Nature Reviews Endocrinology, 2014. **10**: p. 293.
13. Kovacic, J.C., et al., *The Relationships Between Cardiovascular Disease and Diabetes: Focus on Pathogenesis*. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 2014. **43**(1): p. 41-57.
14. Huxley, R., F. Barzi, and M. Woodward, *Excess risk of fatal coronary heart disease associated with diabetes in men and women: meta-analysis of 37 prospective cohort studies*. Bmj, 2006. **332**(7533): p. 73-8.
15. Wannamethee, S.G., et al., *Do women exhibit greater differences in established and novel risk factors between diabetes and non-diabetes than men? The British Regional Heart Study and British Women's Heart Health Study*. Diabetologia, 2012. **55**(1): p. 80-7.
16. Lee, W.L., et al., *Impact of diabetes on coronary artery disease in women and men: a meta-analysis of prospective studies*. Diabetes Care, 2000. **23**(7): p. 962-8.
17. Sarwar, N., et al., *Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies*. Lancet, 2010. **375**(9733): p. 2215-22.
18. Low Wang, C.C., et al., *Atherosclerotic Cardiovascular Disease and Heart Failure in Type 2 Diabetes – Mechanisms, Management, and Clinical Considerations*. Circulation, 2016. **133**(24): p. 2459-2502.
19. Kannel, W.B. and D.L. McGee, *Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study*. Jama, 1979. **241**(19): p. 2035-8.
20. Pavic, G., *Bedeutung des PAR-4 Thrombinrezeptors für die diabetische Gefäßkrankung in vivo*. 2014, Heinrich-Heine-Universität.
21. Ferrannini, E. and W.C. Cushman, *Diabetes and hypertension: the bad companions*. Lancet, 2012. **380**(9841): p. 601-10.
22. Jia, G., M.A. Hill, and J.R. Sowers, *Diabetic Cardiomyopathy: An Update of Mechanisms Contributing to This Clinical Entity*. Circ Res, 2018. **122**(4): p. 624-638.
23. Boudina, S. and E.D. Abel, *Diabetic cardiomyopathy, causes and effects*. Reviews in endocrine & metabolic disorders, 2010. **11**(1): p. 31-39.
24. Asghar, O., et al., *Diabetic cardiomyopathy*. Clinical Science (London, England : 1979), 2009. **116**(Pt 10): p. 741-760.

25. Gilbert, R.E. and H. Krum, *Heart failure in diabetes: effects of anti-hyperglycaemic drug therapy*. Lancet, 2015. **385**(9982): p. 2107-17.
26. McMurray, J.J.V., et al., *Heart failure: a cardiovascular outcome in diabetes that can no longer be ignored*. The Lancet Diabetes & Endocrinology, 2014. **2**(10): p. 843-851.
27. Stratton, I.M., et al., *Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study*. Bmj, 2000. **321**(7258): p. 405-12.
28. Russo, I. and N.G. Frangogiannis, *Diabetes-associated cardiac fibrosis: Cellular effectors, molecular mechanisms and therapeutic opportunities*. J Mol Cell Cardiol, 2016. **90**: p. 84-93.
29. Regan, T.J., et al., *Evidence for cardiomyopathy in familial diabetes mellitus*. J Clin Invest, 1977. **60**(4): p. 884-99.
30. Kwong, R.Y., et al., *Incidence and Prognostic Implication of Unrecognized Myocardial Scar Characterized by Cardiac Magnetic Resonance in Diabetic Patients without Clinical Evidence of Myocardial Infarction*. Circulation, 2008. **118**(10): p. 1011-1020.
31. Turkbey, E.B., et al., *Myocardial Structure, Function and Scar in Patients with Type 1 Diabetes*. Circulation, 2011. **124**(16): p. 1737-1746.
32. Shimizu, M., et al., *Collagen remodelling in myocardia of patients with diabetes*. Journal of Clinical Pathology, 1993. **46**(1): p. 32-36.
33. Sutherland, C.G., et al., *Endomyocardial biopsy pathology in insulin-dependent diabetic patients with abnormal ventricular function*. Histopathology, 1989. **14**(6): p. 593-602.
34. Schwartz, K., et al., *Molecular Basis of Familial Cardiomyopathies*. Circulation, 1995. **91**(2): p. 532-540.
35. Tan, L.B., et al., *Cardiac myocyte necrosis induced by angiotensin II*. Circ Res, 1991. **69**(5): p. 1185-95.
36. Sharov, V.G., et al., *Evidence of cardiocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure*. The American Journal of Pathology, 1996. **148**(1): p. 141-149.
37. Liu, J.W., et al., *Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic cardiomyopathy*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **427**(3): p. 441-3.

38. Miki, T., et al., *Diabetic cardiomyopathy: pathophysiology and clinical features*. Heart Fail Rev, 2013. **18**(2): p. 149-66.
39. Huang, Z.G., et al., *Myocardial Remodeling in Diabetic Cardiomyopathy Associated with Cardiac Mast Cell Activation*. PLoS ONE, 2013. **8**(3): p. e60827.
40. Wolff, S.P. and R.T. Dean, *Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes*. Biochem J, 1987. **245**(1): p. 243-50.
41. Wolff, S.P., Z.Y. Jiang, and J.V. Hunt, *Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing*. Free Radic Biol Med, 1991. **10**(5): p. 339-52.
42. Nishikawa, T., et al., *Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage*. Nature, 2000. **404**(6779): p. 787-90.
43. Chandra, J., A. Samali, and S. Orrenius, *Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress*. Free Radic Biol Med, 2000. **29**(3-4): p. 323-33.
44. Evans, J.L., et al., *Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes*. Endocr Rev, 2002. **23**(5): p. 599-622.
45. Bojunga, J., et al., *Antioxidative treatment prevents activation of death-receptor- and mitochondrion-dependent apoptosis in the hearts of diabetic rats*. Diabetologia, 2004. **47**(12): p. 2072-2080.
46. Lukens, J.R., J.M. Gross, and T.D. Kanneganti, *IL-1 family cytokines trigger sterile inflammatory disease*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 315.
47. Talukdar, S., et al., *Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase*. Nat Med, 2012. **18**(9): p. 1407-12.
48. Van Linthout, S., K. Miteva, and C. Tschöpe, *Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells*. Cardiovascular Research, 2014. **102**(2): p. 258-269.
49. Souders, C.A., S.L.K. Bowers, and T.A. Baudino, *Cardiac Fibroblast: The Renaissance Cell*. Circulation Research, 2009. **105**(12): p. 1164-1176.
50. Krenning, G., E.M. Zeisberg, and R. Kalluri, *The Origin of Fibroblasts and Mechanism of Cardiac Fibrosis*. Journal of cellular physiology, 2010. **225**(3): p. 631-637.

51. Cai, C.L., et al., *A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells*. Nature, 2008. **454**(7200): p. 104-8.
52. Mikawa, T. and R.G. Gourdie, *Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ*. Dev Biol, 1996. **174**(2): p. 221-32.
53. Moore-Morris, T., et al., *Resident fibroblast lineages mediate pressure overload-induced cardiac fibrosis*. The Journal of Clinical Investigation, 2014. **124**(7): p. 2921-2934.
54. Widyanoro, B., et al., *Endothelial cell-derived endothelin-1 promotes cardiac fibrosis in diabetic hearts through stimulation of endothelial-to-mesenchymal transition*. Circulation, 2010. **121**(22): p. 2407-18.
55. Nag, A.C., *Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution*. Cytobios, 1980. **28**(109): p. 41-61.
56. Pinto, A.R., et al., *Revisiting Cardiac Cellular Composition*. Circ Res, 2016. **118**(3): p. 400-9.
57. van den Borne, S.W., et al., *Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts*. Nat Rev Cardiol, 2010. **7**(1): p. 30-7.
58. Eghbali, M., *Cardiac fibroblasts: function, regulation of gene expression, and phenotypic modulation*. Basic Res Cardiol, 1992. **87 Suppl 2**: p. 183-9.
59. Snider, P., et al., *Origin of Cardiac Fibroblasts and the Role of Periostin*. Circulation research, 2009. **105**(10): p. 934-947.
60. Dostal, D., S. Glaser, and T.A. Baudino, *Cardiac fibroblast physiology and pathology*. Compr Physiol, 2015. **5**(2): p. 887-909.
61. McArthur, L., et al., *Electrical consequences of cardiac myocyte: fibroblast coupling*. Biochem Soc Trans, 2015. **43**(3): p. 513-8.
62. Travers, J.G., et al., *Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens*. Circ Res, 2016. **118**(6): p. 1021-40.
63. Frangogiannis, N.G., *Regulation of the inflammatory response in cardiac repair*. Circulation research, 2012. **110**(1): p. 159-173.
64. Kawaguchi, M., et al., *Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury*. Circulation, 2011. **123**(6): p. 594-604.

65. Calderone, A., et al., *Scar myofibroblasts of the infarcted rat heart express natriuretic peptides*. J Cell Physiol, 2006. **207**(1): p. 165-73.
66. Kong, P., P. Christia, and N.G. Frangogiannis, *The Pathogenesis of Cardiac Fibrosis*. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 2014. **71**(4): p. 549-574.
67. Jugdutt, B.I., *Remodeling of the myocardium and potential targets in the collagen degradation and synthesis pathways*. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord, 2003. **3**(1): p. 1-30.
68. Ren, G., et al., *Morphological characteristics of the microvasculature in healing myocardial infarcts*. J Histochem Cytochem, 2002. **50**(1): p. 71-9.
69. Chen, W. and N.G. Frangogiannis, *Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair*. Biochimica et biophysica acta, 2013. **1833**(4): p. 945-953.
70. Ivey, M.J. and M.D. Tallquist, *Defining the Cardiac Fibroblast: A New Hope*. Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society, 2016. **80**(11): p. 2269-2276.
71. Lundstrom, K., *Structural biology of G protein-coupled receptors*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2005. **15**(16): p. 3654-3657.
72. Vu, T.K., et al., *Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation*. Cell, 1991. **64**(6): p. 1057-68.
73. Coughlin, S.R., *How the protease thrombin talks to cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11023-7.
74. Macfarlane, S.R., et al., *Proteinase-activated receptors*. Pharmacol Rev, 2001. **53**(2): p. 245-82.
75. Xu, W.F., et al., *Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6642-6.
76. Ishihara, H., et al., *Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans*. Nature, 1997. **386**(6624): p. 502-6.
77. Cottrell, G.S., et al., *Protease-activated receptor 2: activation, signalling and function*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 6): p. 1191-7.

78. Mihara, K., et al., *Thrombin-Mediated Direct Activation of Proteinase-Activated Receptor-2: Another Target for Thrombin Signaling*. Mol Pharmacol, 2016. **89**(5): p. 606-14.
79. Zigler, M., et al., *PAR-1 and thrombin: the ties that bind the microenvironment to melanoma metastasis*. Cancer Res, 2011. **71**(21): p. 6561-6.
80. Lee, H. and J.R. Hamilton, *Physiology, pharmacology, and therapeutic potential of protease-activated receptors in vascular disease*. Pharmacol Ther, 2012. **134**(2): p. 246-59.
81. Hung, D.T., et al., *Cloned platelet thrombin receptor is necessary for thrombin-induced platelet activation*. J Clin Invest, 1992. **89**(4): p. 1350-3.
82. Déry, O., et al., *Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases*. American Journal of Physiology - Cell Physiology, 1998. **274**(6): p. C1429-C1452.
83. Bono, F., I. Lamarche, and J.M. Herbert, *Induction of vascular smooth muscle cell growth by selective activation of the proteinase activated receptor-2 (PAR-2)*. Biochemical and biophysical research communications, 1997. **241**(3): p. 762-764.
84. Sabri, A., et al., *Signaling Properties and Functions of Two Distinct Cardiomyocyte Protease-Activated Receptors*. Circulation Research, 2000. **86**(10): p. 1054-1061.
85. Asokanathan, N., et al., *Activation of protease-activated receptors (PARs)-1 and -2 promotes alpha-smooth muscle actin expression and release of cytokines from human lung fibroblasts*. Physiological Reports, 2015. **3**(2): p. e12295.
86. Fender, A.C., et al., *Protease-Activated Receptor PAR-4: An Inducible Switch between Thrombosis and Vascular Inflammation?* Thromb Haemost, 2017. **117**(11): p. 2013-2025.
87. French, S.L. and J.R. Hamilton, *Protease-activated receptor 4: from structure to function and back again*. British Journal of Pharmacology, 2016. **173**(20): p. 2952-2965.
88. Kahn, M.L., et al., *Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin*. The Journal of Clinical Investigation, 1999. **103**(6): p. 879-887.
89. Strande, J.L., et al., *Inhibiting Protease-Activated Receptor 4 Limits Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Rat Hearts by Unmasking*

Adenosine Signaling. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2008. **324**(3): p. 1045-1054.

90. Kolpakov, M.A., et al., *Protease-Activated Receptor 4 Deficiency Offers Cardioprotection after Acute Ischemia Reperfusion Injury*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2016. **90**: p. 21-29.
91. Bretschneider, E., et al., *Evidence for functionally active protease-activated receptor-4 (PAR-4) in human vascular smooth muscle cells*. British Journal of Pharmacology, 2001. **132**(7): p. 1441-1446.
92. Hamilton, J.R., A.G. Frauman, and T.M. Cocks, *Increased expression of protease-activated receptor-2 (PAR2) and PAR4 in human coronary artery by inflammatory stimuli unveils endothelium-dependent relaxations to PAR2 and PAR4 agonists*. Circ Res, 2001. **89**(1): p. 92-8.
93. Ceriello, A., et al., *Hyperglycemia-induced thrombin formation in diabetes. The possible role of oxidative stress*. Diabetes, 1995. **44**(8): p. 924-8.
94. Tripodi, A., et al., *Hypercoagulability in patients with type 2 diabetes mellitus detected by a thrombin generation assay*. J Thromb Thrombolysis, 2011. **31**(2): p. 165-72.
95. Zou, F., et al., *Regulation of cathepsin G reduces the activation of proinsulin-reactive T cells from type 1 diabetes patients*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e22815.
96. Gorski, D.J., et al., *Cardiac fibroblast activation and hyaluronan synthesis in response to hyperglycemia and diet-induced insulin resistance*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 1827.
97. Chatzigeorgiou, A., et al., *The use of animal models in the study of diabetes mellitus*. In Vivo, 2009. **23**(2): p. 245-58.
98. Ermler, S., *Thrombin- vermittelte Regulation der Protease- aktivierten Rezeptoren und des Sphingosin-1-Phosphat-Signalsystems*, in *Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät*. 2011, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Düsseldorf.
99. Elbim, C. and G. Lizard, *Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations*. Cytometry Part A, 2009. **75A**(6): p. 475-481.
100. Carter, W.O., P.K. Narayanan, and J.P. Robinson, *Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells*. J Leukoc Biol, 1994. **55**(2): p. 253-8.

101. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
102. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-408.
103. Gillan, L., et al., *Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is a ligand for alpha(V)beta(3) and alpha(V)beta(5) integrins and promotes cell motility*. *Cancer Res*, 2002. **62**(18): p. 5358-64.
104. Hinz, B., et al., *Alpha-Smooth Muscle Actin Expression Upregulates Fibroblast Contractile Activity*. *Molecular Biology of the Cell*, 2001. **12**(9): p. 2730-2741.
105. Lindner, V., et al., *Vascular injury induces expression of periostin: implications for vascular cell differentiation and migration*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(1): p. 77-83.
106. Ma, F., et al., *Macrophage-Stimulated Cardiac Fibroblast Production of IL-6 Is Essential for TGF β /Smad Activation and Cardiac Fibrosis Induced by Angiotensin II*. *PLoS ONE*, 2012. **7**(5): p. e35144.
107. Meléndez, G.C., et al., *Interleukin-6 Mediates Myocardial Fibrosis, Concentric Hypertrophy and Diastolic Dysfunction in Rats*. *Hypertension*, 2010. **56**(2): p. 225-231.
108. Sarkar, S., et al., *Influence of cytokines and growth factors in ANG II-mediated collagen upregulation by fibroblasts in rats: role of myocytes*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. **287**(1): p. H107-17.
109. Tsourdi, E., et al., *Current aspects in the pathophysiology and treatment of chronic wounds in diabetes mellitus*. *Biomed Res Int*, 2013. **2013**: p. 385641.
110. Hill, M.F. and P.K. Singal, *Right and left myocardial antioxidant responses during heart failure subsequent to myocardial infarction*. *Circulation*, 1997. **96**(7): p. 2414-20.
111. Kinugawa, S., et al., *Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction in mice: role of oxidative stress*. *Circ Res*, 2000. **87**(5): p. 392-8.
112. Murdoch, C.E., et al., *NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure*. *Cardiovasc Res*, 2006. **71**(2): p. 208-15.

113. Herum, K.M., et al., *The Soft- and Hard-Heartedness of Cardiac Fibroblasts: Mechanotransduction Signaling Pathways in Fibrosis of the Heart*. Journal of Clinical Medicine, 2017. **6**(5): p. 53.
114. Sonin, D.L., et al., *Protease-Activated Receptor 1 Inhibition by SCH79797 Attenuates Left Ventricular Remodeling and Profibrotic Activities of Cardiac Fibroblasts*. Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics, 2013. **18**(5): p. 460-475.
115. Banerjee, I., et al., *Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse*. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 2007. **293**(3): p. H1883-H1891.
116. Dangwal, S., et al., *High glucose enhances thrombin responses via protease-activated receptor-4 in human vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(3): p. 624-33.
117. Porter, K.E. and N.A. Turner, *Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling*. Pharmacol Ther, 2009. **123**(2): p. 255-78.
118. Naugle, J.E., et al., *Type VI collagen induces cardiac myofibroblast differentiation: implications for postinfarction remodeling*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(1): p. H323-30.
119. Knowlton, A.A., et al., *Rapid expression of fibronectin in the rabbit heart after myocardial infarction with and without reperfusion*. Journal of Clinical Investigation, 1992. **89**(4): p. 1060-1068.
120. Kohan, M., et al., *EDA-containing cellular fibronectin induces fibroblast differentiation through binding to alpha4beta7 integrin receptor and MAPK/Erk 1/2-dependent signaling*. Faseb j, 2010. **24**(11): p. 4503-12.
121. Dobaczewski, M., C. Gonzalez-Quesada, and N.G. Frangogiannis, *The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2010. **48**(3): p. 504-511.
122. Kamimura, D., K. Ishihara, and T. Hirano, *IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 2003. **149**: p. 1-38.
123. Haugen, E., et al., *Increased interleukin-6 but not tumour necrosis factor-alpha predicts mortality in the population of elderly heart failure patients*. Experimental & Clinical Cardiology, 2008. **13**(1): p. 19-24.

124. Yiu, W.H., et al., *Tissue Kallikrein Mediates Pro-Inflammatory Pathways and Activation of Protease-Activated Receptor-4 in Proximal Tubular Epithelial Cells*. PLoS ONE, 2014. **9**(2): p. e88894.
125. Zhang, Y., et al., *Deletion of interleukin-6 alleviated interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy of mice through affecting TGF β 1 and miR-29 pathways*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 23010.
126. Müller, J., et al., *Interleukin-6-dependent phenotypic modulation of cardiac fibroblasts after acute myocardial infarction*. Basic Res Cardiol, 2014. **109**(6): p. 014-0440.
127. Kern, C.B., et al., *Immunolocalization of chick periostin protein in the developing heart*. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2005. **284**(1): p. 415-23.
128. Kruzynska-Frejtag, A., et al., *Periostin (an osteoblast-specific factor) is expressed within the embryonic mouse heart during valve formation*. Mech Dev, 2001. **103**(1-2): p. 183-8.
129. Norris, R.A., et al., *Periostin Regulates Collagen Fibrillogenesis and the Biomechanical Properties of Connective Tissues*. Journal of Cellular Biochemistry, 2007. **101**(3): p. 695-711.
130. Minicucci, M.F., et al., *Periostin as a modulator of chronic cardiac remodeling after myocardial infarction*. Clinics, 2013. **68**(10): p. 1344-1349.
131. Shimazaki, M., et al., *Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction*. The Journal of Experimental Medicine, 2008. **205**(2): p. 295-303.
132. Oka, T., et al., *Genetic manipulation of periostin expression reveals a role in cardiac hypertrophy and ventricular remodeling*. Circ Res, 2007. **101**(3): p. 313-21.
133. Zhao, S., et al., *Periostin expression is upregulated and associated with myocardial fibrosis in human failing hearts*. Journal of Cardiology. **63**(5): p. 373-378.
134. Snider, P., et al., *Periostin Is Required for Maturation and Extracellular Matrix Stabilization of Noncardiomyocyte Lineages of the Heart*. Circulation research, 2008. **102**(7): p. 752-760.
135. Horiuchi, K., et al., *Identification and Characterization of a Novel Protein, Periostin, with Restricted Expression to Periosteum and Periodontal*

Ligament and Increased Expression by Transforming Growth Factor β .
Journal of Bone and Mineral Research, 1999. **14**(7): p. 1239-1249.

136. Zou, P., et al., *[High glucose increases periostin expression and the related signal pathway in adult rat cardiac fibroblasts]*. Sheng Li Xue Bao, 2010. **62**(3): p. 247-54.
137. Li, L., et al., *Angiotensin II increases periostin expression via Ras/p38 MAPK/CREB and ERK1/2/TGF- β 1 pathways in cardiac fibroblasts*. Cardiovascular Research, 2011. **91**(1): p. 80-89.
138. Cheng, T.H., et al., *Involvement of reactive oxygen species in angiotensin II-induced endothelin-1 gene expression in rat cardiac fibroblasts*. J Am Coll Cardiol, 2003. **42**(10): p. 1845-54.
139. Siwik, D.A., P.J. Pagano, and W.S. Colucci, *Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **280**(1): p. C53-60.
140. Zhang, X., et al., *Effects of elevated glucose levels on interactions of cardiac fibroblasts with the extracellular matrix*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2007. **43**(8-9): p. 297-305.
141. Tokudome, T., et al., *Direct effects of high glucose and insulin on protein synthesis in cultured cardiac myocytes and DNA and collagen synthesis in cardiac fibroblasts*. Metabolism, 2004. **53**(6): p. 710-5.
142. Wong, P.C., et al., *Blockade of protease-activated receptor-4 (PAR4) provides robust antithrombotic activity with low bleeding*. Sci Transl Med, 2017. **9**(371).

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Anke Fender bedanken, die mir als Betreuerin nicht nur in wissenschaftlichen Fragen helfen konnte, sondern auch als motivierende Stütze gerade in den schwierigen Phasen der Experimente jederzeit zur Seite stand. Sie hat mich für das wissenschaftliche Arbeiten gewinnen können und ich denke nicht zuletzt wegen ihrer fachlichen und menschlichen Unterstützung gerne an die Zeit im Labor zurück.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Prof. Dr. Jens Fischer für die Möglichkeit bedanken, unter seiner Leitung am Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie der HHU in Düsseldorf diese Dissertation anzufertigen.

Auch allen weiteren Mitarbeitern des Instituts möchte ich einen Dank aussprechen, da mir jeder einzelne jederzeit bei Fragen zur Verfügung stand und ich zahlreiche wertvolle Tipps zum experimentellen Arbeiten erhielt. Insbesondere gilt dabei mein Dank an Anne Petz, Marcel Abrams und Sonja Kleeschulte, ohne die die Isolation der Zellen nicht annähernd so gut gelungen wäre.