

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik

Tübingen

Abteilung Innere Medizin III

Schwerpunkt: Kardiologie und Angiologie

**Korrelation von Serumapoptosemarkern mit  
thrombozytären Apoptosemarkern und deren Einfluss  
auf die myokardiale Regeneration nach akutem  
ST-Hebungsinfarkt**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Olma, Carolin**

**2022**

Dekan: Professor Dr. rer. nat. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Geisler

2. Berichterstatter: Professor Dr. N. Doll

Tag der Disputation: 21.11.2022

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis .....	VIII
1 Einleitung .....	1
1.1 Pathophysiologie der Atherosklerose .....	1
1.2 Epidemiologie des Myokardinfarkts .....	2
1.3 Akutes Koronarsyndrom .....	4
1.4 Reperfusionsschaden .....	5
1.5 Thrombozyten.....	7
1.5.1 Allgemeines .....	7
1.5.2 Sekretorische Granula der Thrombozyten .....	7
1.5.3 Die Rolle der Thrombozyten bei der Atherosklerose.....	8
1.5.4 Die Rolle der Thrombozyten bei der Hämostase .....	9
1.6 Apoptose.....	10
1.6.1 Der intrinsische Signalweg der Apoptose .....	11
1.6.2 Der extrinsische Signalweg der Apoptose .....	12
1.7 Die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 .....	14
1.7.1 Signalwege bei Bindung von SDF-1 an CXCR4/CXCR7 .....	15
1.7.2 Die Achse SDF-1/CXCR4/CXCR7 und deren Rolle bei der KHK	16
1.8 Die thrombozytären Apoptosemarker .....	17
1.8.1 TMRE.....	17
1.8.2 Annexin V .....	18
1.9 Serumapoptosemarker .....	20
1.9.1 TNF-Familie .....	20

1.9.2	TNF $\alpha$ .....	20
1.9.3	TNF RI und TNF RII.....	21
1.9.4	TRAIL.....	23
1.9.5	Fas-Rezeptor und sFasL .....	24
2	Hintergrund und Zielsetzung dieser Arbeit.....	26
3	Material und Methoden .....	27
3.1	Patientencharakteristika und Blutentnahme.....	27
3.2	Herstellung von thrombozytenreichem Plasma.....	28
3.3	Induktion und Detektion der thrombozytären Apoptose .....	29
3.4	Messung der Chemokine CXCR4 und CXCR7 .....	29
3.5	FACS Analyse .....	30
3.6	Bioplex Messungen der Serumapoptosemarker .....	31
3.7	Erhebung der LVEF im Verlauf mittels MRT .....	32
3.8	Darstellung des myokardialen Ödems und des Infarktareals.....	32
3.9	Statistische Analyse.....	33
4	Ergebnisse.....	34
4.1	Korrelation des Fas-Rezeptors mit den thrombozytären Apoptosemarkern TMRE und Annexin V .....	34
4.2	Korrelation von sFasL mit den thrombozytären Apoptosemarkern TMRE und Annexin V .....	37
4.3	Korrelation von TNF $\alpha$ mit den thrombozytären Apoptosemarkern TMRE und Annexin V .....	38
4.4	Korrelation von TNF RI mit den thrombozytären Apoptosemarkern TMRE und Annexin V .....	39
4.5	Korrelation von TNF RII mit den thrombozytären Apoptosemarkern TMRE und Annexin V .....	41

4.6	Korrelation von TRAIL mit den thrombozytären Apoptosemarkern TMRE und Annexin V .....	42
4.7	Korrelation der Serumapoptosemarker mit den thrombozytären Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 .....	43
4.8	Evaluation der Serumapoptosemarker in Bezug auf die myokardiale LV-Funktion, myokardiales Ödem und den Infarktgrößenverlauf .....	45
4.8.1	Vergleich der Serumapoptosemarker mit der baseline LVEF zu Beginn der Hospitalisation.....	45
4.8.2	Vergleich der Serumapoptosemarker mit dem Verlauf der LVEF .....	47
4.8.3	Vergleich der Serumapoptosemarker mit dem myokardialen Ödem .....	49
4.8.4	Vergleich der Serumapoptosemarker mit Myocardial Salvage ...	51
4.8.5	Vergleich der Serumapoptosemarker mit dem Verlauf der Infarktgröße .....	54
5	Diskussion .....	57
5.1	Diskussion der Methoden .....	57
5.1.1	Patientenkollektiv, Basischarakteristika, Blutentnahme .....	57
5.1.2	Analyse mittels FACS .....	58
5.1.3	Bioplex .....	59
5.1.4	Kardiale Bildgebung mittels MRT .....	59
5.2	Diskussion der Ergebnisse .....	60
5.2.1	Detektion der Apoptose mit TMRE und Annexin V und Zusammenhang mit den Serumapoptosemarkern .....	60
5.2.2	Evaluation der Serumapoptosemarker in Bezug auf LV-Funktion, deren Verlauf und der Infarktgröße .....	62
5.2.3	Limitationen.....	65
6	Zusammenfassung .....	67

7	Literaturverzeichnis.....	68
8	Erklärung zum Eigenanteil.....	86
9	Liste der Veröffentlichungen.....	87
10	Danksagung.....	88

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Häufigste Todesursachen 2017 .....	3
Abbildung 2: Apoptosewege.....	14
Abbildung 3: Verlust der Lipidasymmetrie während der Apoptose .....	19
Abbildung 4: Signalwege nach Aktivierung von TNF RI .....	23
Abbildung 5: Korrelation des Fas-Rezeptors in pg/ml mit den thrombozytären Apoptosemarkern .....	34
Abbildung 6: Prinzip des relativen Überlebenspotentials der TZ: Quotient MFI TMRE ruhende TZ/stimulierte TZ .....	35
Abbildung 7: Prinzip des relativen Überlebenspotentials der TZ: Quotient MFI Annexin V ruhende TZ/stimulierte TZ .....	36
Abbildung 8: Korrelation des Fas-Rezeptors mit dem relativen thrombozytären Überlebenspotential.....	36
Abbildung 9: Korrelation von sFasL mit den thrombozytären Apoptosemarkern .....	37
Abbildung 10: Korrelation von sFasL mit dem relativen thrombozytären Überlebenspotential.....	38
Abbildung 11: Korrelation von TNF $\alpha$ mit den thrombozytären Apoptosemarkern .....	38
Abbildung 12: Korrelation von TNF $\alpha$ mit dem relativen thrombozytären Überlebenspotential.....	39
Abbildung 13: Korrelation von TNF RI mit den thrombozytären Apoptosemarkern .....	40
Abbildung 14: Korrelation von TNF RI mit dem relativen thrombozytären Überlebenspotential.....	40
Abbildung 15: Korrelation von TNF RII mit den thrombozytären Apoptosemarkern .....	41
Abbildung 16: Korrelation von TNF RII mit dem relativen thrombozytären Überlebenspotential.....	42
Abbildung 17: Korrelation von TRAIL mit den thrombozytären Apoptosemarkern .....	42
Abbildung 18: Korrelation von TRAIL mit dem relativen thrombozytären Überlebenspotential.....	43
Abbildung 19: Korrelation TNF RI mit CXCR4 .....	44
Abbildung 20: Vergleich von TNF RI und TRAIL kleiner/gleich dem Median bzw. größer als der Median mit der baseline LVEF (%) .....	47

Abbildung 21: Vergleich von sFasL kleiner/gleich dem Median bzw. größer als der Median mit $\Delta$ LVEF .....	49
Abbildung 22: Vergleich Fas-Rezeptor kleiner/gleich dem Median bzw. größer als der Median mit dem myokardialen Ödem (%) der LVMM (g).....	51
Abbildung 23: Vergleich von Fas-Rezeptor und TNF RI kleiner/gleich dem Median bzw. größer als der Median mit Myocardial Salvage.....	53
Abbildung 24: Vergleich des Serumapoptosemarkers TNF RII kleiner/gleich dem Median bzw. größer als der Median mit dem Verlauf der Infarktgröße .....	55



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Basischarakteristika .....	28
Tabelle 2:	Korrelationen der Serumapoptosemarker und der Rezeptoren CXCR4/CXCR7 .....	44
Tabelle 3:	Mediane der jeweiligen Serumapoptosemarker .....	45
Tabelle 4:	Vergleich der Serumapoptosemarker kleiner/gleich dem Median bzw. größer als der Median mit der baseline LVEF (%) .....	46
Tabelle 5:	Vergleich der Serumapoptosemarker kleiner/gleich dem Median bzw. größer als der Median mit $\Delta$ LVEF .....	48
Tabelle 6:	Vergleich der Serumapoptosemarker kleiner/gleich dem Median bzw. größer als der Median mit dem myokardialen Ödem (%) LVMM .....	50
Tabelle 7:	Vergleich der Serumapoptosemarker kleiner/gleich dem Median bzw. größer als der Median mit Myocardial Salvage....	53
Tabelle 8:	Vergleich der Serumapoptosemarker kleiner/gleich dem Median bzw. größer als der Median mit dem Verlauf der Infarktgröße .....	55

## Abkürzungsverzeichnis

AAR	Area at risk
ACS	Acute coronary syndrome
ADP	Adenosindiphosphat
AP	Angina pectoris
APAP-1	Apoptotic protease activating factor 1
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body-Mass-Index
BMS	Bare metal stent
BNP	Brain natriuretic peptide
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of differentiation
Ced	Cell death gene
CXCR4/7	C-X-C chemokine receptor type 4/7
DAPT	Duale Plättchenhemmung
DcR	Decoy receptor
DES	Drug eluting stent
DGK	Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislauf- forschung e.V.
DISC	Death-inducing signaling complex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	Death receptor
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESC	European Society of Cardiology
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FADD	Fas-associated death domain protein
FasR	Fas-Rezeptor
FIS	Finale Infarktgröße

GDP	Guanosindiphosphat
GP	Glykoprotein
HDL	High-density lipoprotein
IAP	Instabile Angina pectoris
JNK	c-Jun-N-terminale Kinasen
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low-density lipoprotein
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LV-Funktion	Linksventrikuläre Funktion
LVMM	Linksventrikuläre Muskelmasse
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MRNA	Messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
NSTEMI	Nicht-ST-Hebungsinfarkt
OCS	Open canalicular system
PAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS-Ca <sup>2+</sup>	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Calcium
PCI	Percutaneous coronary intervention
PDGF	Platelet-derived growth factor
PF4	Platelet factor 4
PRP	Thrombozytenreiches Plasma
PS	Phosphatidylserin
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand 1
RIP	Receptor interacting protein
ROS	Reactive oxygen species
SDF-1	Stromal cell– derived factor-1
SDT	Signal decay time
(S)FasL	(soluble) Fas ligand

SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
STEMI	ST-Hebungs-Myokardinfarkt
STNFR	Soluble tumor necrosis factor receptor
TF	Tissue factor
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
TMRE	Tetramethylrhodaminethylester
TNF	Tumor necrosis factor
TNF RI/II	Tumor necrosis factor receptor I/II
TRADD	TNF-R1-associated death domain protein
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TZ	Thrombozyten
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecules
5-HT	5- Hydroxytryptamin

# 1 Einleitung

## 1.1 Pathophysiologie der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist ein wichtiger Baustein der Pathogenese des akuten Myokardinfarkts. Durch Risikofaktoren wie Rauchen, Diabetes mellitus, erhöhtem Blutdruck oder erhöhtem Low-density Lipoprotein (LDL) kommt es zu einer endothelialen Dysfunktion im Gefäßsystem. Diese führt zur Permeabilitätssteigerung und Einwanderung von Thrombozyten, Leukozyten und LDL. Insgesamt bildet sich ein inflammatorisches und adhäsives Milieu an der Intima aus, welches durch die Ausschüttung von Zytokinen, vasoaktiven Molekülen und Wachstumsfaktoren aufrechterhalten wird. Besonders anfällig hierfür sind hämodynamisch turbulente Arterienaufzweigungen oder Bifurkationen (Abschnitt vgl. (Russell; Ross 1999)).

Insgesamt setzt sich eine Kaskade an Vorgängen in Gang. So kommt es durch die Endothelzellen zur erhöhten Ausschüttung von monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) was zur vermehrten Monozytenrekrutierung führt (Wiesner et al. 2013). Auch die Ausschüttung von vascular cell adhesion molecules (VCAM-1) verstärkt die Einwanderung von Monozyten und Makrophagen zusätzlich (Geisler & Bhatt 2004). Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) bewirkt zudem eine erhöhte Expression von sogenannten Scavenger-Rezeptoren auf aktivierten Makrophagen, die wiederum zur Aufnahme von oxidiertem LDL führen und somit die Umwandlung in Schaumzellen ermöglichen. Durch den Wachstumsfaktor platelet-derived growth factor (PDGF) wandern glatte Muskelzellen aus der Media in die Intima des Gefäßes und bilden extrazelluläre Matrix, die die Gefäßwand immer mehr verdickt und die typischen Plaques der Atherosklerose ausbildet (Geisler & Bhatt 2004).

Die glatten Muskelzellen werden zudem durch Matrix-/Metalloproteinasen in die Intima gelockt, diese weisen dann lokal bei instabilen Plaques eine erhöhte Konzentration auf (Galis et al. 1994). Insgesamt bildet sich also ein nekrotischer Kern aus, der unter anderem aus apoptotisch zugrunde gegangenen Makrophagen

besteht. (Gonzalez & Trigatti 2017). Der Gewebefaktor, tissue factor (TF), ein Transmembranprotein mit Kofaktor VII/VIIa, welches die Gerinnungskaskade in Gang setzt, findet sich auch schon in frühen Stadien von atherosklerotischen Läsionen (Hatakeyama et al. 1997). TF wird kontinuierlich in perivaskulärem Gewebe exprimiert und findet sich in glatten Muskelzellen und Fibroblasten der Adventitia (Flössel et al. 1994; Fleck et al. 1990; Drake et al. 1989). Unter physiologischen Bedingungen wird er weder vom Endothel noch von zirkulierenden Zellen gebildet. Bei der Atherosklerose kommt es jedoch durch Plaqueruptur TF getriggert zur Thrombose und im Falle der Koronararterien zur Myokardischämie (Owens & Mackman 2012).

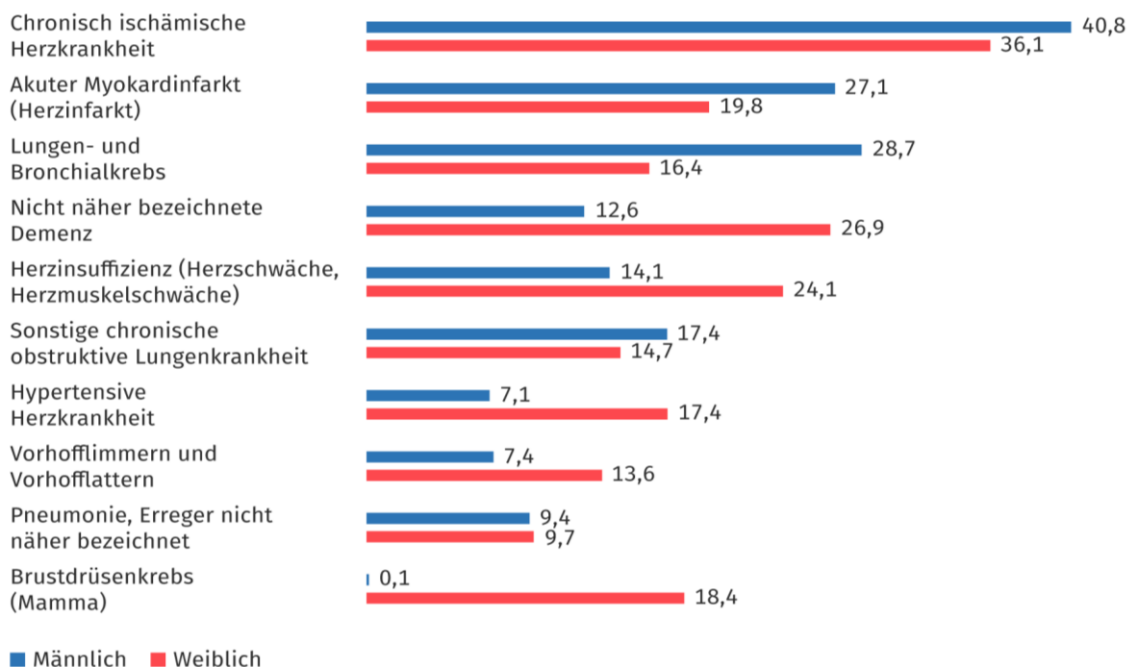
## **1.2 Epidemiologie des Myokardinfarkts**

Im Jahr 2017 war der akute Myokardinfarkt nach der chronisch ischämischen Herzkrankheit auf Rang zwei der häufigsten Todesursachen in Deutschland. Dabei waren rund 27 100 Männer und rund 19 800 Frauen betroffen, eine graphische Darstellung hiervon ist der Abbildung 1 zu entnehmen (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2019 a). Insgesamt starben also 46 966 Menschen im Jahr 2017 (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2019 b) am Herzinfarkt. Und auch in Zukunft wird es zu einer steten Zunahme der Herzinfarktfälle kommen. So zeigen Vorausberechnungen (Grundlage ist das Bundes-Gesundheitssurvey 1998, das Augsburger Herzinfarktregister und die 9. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung) eine deutliche Erhöhung der Inzidenzfälle pro Jahr. Die Zahl der Herzinfarkte wird im Jahr 2050 um über 100 000 Fälle mehr bei der männlichen Bevölkerung und um über 92 000 Fälle mehr bei der weiblichen Bevölkerung im Vergleich zur Erhebung im Ausgangsjahr 1998 steigen. Zusätzlich steigt, dank der guten Akutversorgung, auch die Zahl der Herzinfarktträger was insgesamt zukünftig zu einem hohen kardiologischen Patientenaufkommen führen wird, was eine große Herausforderung für das deutsche Gesundheitssystem darstellen wird (Abschnitt vgl.(Wiesner et al. 2002)).

Laut dem deutschen Herzbericht 2017 ist die Zahl an KHK-bedingten Aufnahmen ins Krankenhaus seit dem Jahr 2000 abnehmend. Die Zahl der vollstationär mit KHK behandelten Patienten sank von 1995 bis 2016 um 17,9 %, bei den 65- bis Unter-75-Jährigen sogar um 39 %. Zwei Drittel der Herzinfarkte 2015 betrafen in Deutschland Männer, deren Prognose immer noch schlechter ist als die der Frauen. Eindrucksvoll ist die Abnahme der Sterbeziffer. Während im Jahr 1990 noch 85.625 Menschen an einem Herzinfarkt starben, ist im Jahr 2015 ein Rückgang der absoluten Zahl auf 49.210 Menschen zu verzeichnen (Deutsche Gesellschaft für Kardiologie 2018 a). Laut dem Präsidenten der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie Hugo Katus sind unter anderem ein verbessertes Notarzt-System, strukturelle und therapeutische Maßnahmen in den Krankenhäusern und eine Verminderung der „Pforte-Ballon-Zeit“ für diese Reduktion der Herzinfarkt mortalität maßgeblich mitverantwortlich (Deutsche Gesellschaft für Kardiologie 2018 b).

### Häufigste Todesursachen 2017

in Tsd.



**Abbildung 1:** Häufigste Todesursachen 2017  
Statistisches Bundesamt (Destatis), 2019

### 1.3 Akutes Koronarsyndrom

Der Ausdruck akutes Koronarsyndrom beinhaltet klinische Symptome wie den Brustschmerz, die mit einer akuten kardialen Ischämie einhergehen und umfasst neben dem akuten Myokardinfarkt, der weiter in einen ST-Hebungsinfarkt (STEMI) und Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI) unterteilt werden kann, auch die instabile Angina pectoris (IAP). Der NSTEMI und die instabile AP haben einen ähnlichen pathophysiologischen Ursprung und präsentieren sich auch klinisch ähnlich, unterscheiden sich aber entscheidend in ihrer Schwere. Ein NSTEMI kann diagnostiziert werden, wenn es tatsächlich zur Myozytennekrose mit Freiwerden des herzspezifischen Enzyms Troponin I oder T kommt. Bei der instabilen AP kommt es zu keiner Nekrose und damit auch zu keiner Freisetzung von Troponin, sondern zur myokardialen Ischämie (Abschnitt vgl. (Kumar & Cannon 2009)). Die Leitlinien der European Society of Cardiology (ESC) definieren den STEMI als Anstieg und/oder Abfall der kardialen Biomarker mit mindestens einem der folgenden Zeichen von Ischämie: neue ST-Strecken-Veränderungen, neuer Linksschenkelblock, Auftreten einer pathologischen Q-Zacke oder ein bildgebender Nachweis des Kardiomyozytenverlusts und letztendlich die koronarangiographische Bestätigung eines intrakoronaren Thrombus (Ahmed et al. 2016; Steg et al. 2012).

Bei der Therapie des akuten Myokardinfarkts spielt die Wiedereröffnung des verschlossenen Koronargefäßes eine entscheidende Rolle. Vor allem beim STEMI muss dies so bald wie nur möglich geschehen. In der neuen Leitlinie des ESC von 2017 wurde der Begriff der „Pforte-Ballon-Zeit“ verlassen. Stattdessen soll nun innerhalb von 90 Minuten nach der Ableitung eines EKGs durch medizinisches Fachpersonal in dem ein ST-Hebungsinfarkt festgestellt werden konnte, eine perkutane Koronarintervention (PCI) angestrebt werden. D.h. die Zeit bis zur Reperfusion sollte 90 Minuten nicht überschreiten. Für die Patienten, die sich schon in einem Krankenhaus mit Herzkatheterlabor befinden, sollte eine Zeit von unter 60 Minuten durchgesetzt werden. Ist die Durchführung einer PCI erst ab über 120 Minuten nach Diagnose eines STEMI realisierbar, sollte eine



fibrinolytische Therapie begonnen werden (Abschnitt vgl. (Tubaro 2018)). Für die PCI ist ein Gefäßzugang über die A. radialis, dem der A. femoralis aufgrund niedrigerer Komplikationsrate überlegen (Valgimigli et al. 2015). Statt bare metal stents (BMS) sollten drug eluting stents (DES) verwendet werden (Sabate et al. 2016). Bei einer Mehrgefäßerkrankung sollten auch andere Koronararterien, die primär nicht für den Infarkt verantwortlich waren, einer kompletten Revaskularisation zugeführt werden, am besten im Rahmen des initialen Krankenhausaufenthalts. Eine Ausnahme stellen Patienten mit kardiogenem Schock bei Aufnahme dar, diese sollten sofort eine komplette Revaskularisation erhalten (Smits et al. 2017; Wald et al. 2013; Engstrom et al. 2015). Heparin wird weiterhin periprozedural zur Antikoagulation verabreicht, hierbei wurde in der ESC- Leitlinie 2017 der Nutzen von Enoxaparin durch die ATOLL Studie (Montalescot et al. 2011) und die Metaanalyse von Silvain et al. aufgewertet. Unfraktioniertes Heparin besitzt jedoch immer noch einen höheren Empfehlungsgrad (Tubaro 2018). Nach erfolgter PCI spielt die duale Plättchenhemmung (DAPT) für die weitere Therapieplanung eine wichtige Rolle. Beim STEMI wird die Einnahme eines potenten P2Y12-Inhibitors wie Ticagrelor oder Prasugrel mit Acetylsalicylsäure für in der Regel 12 Monate empfohlen (Neumann et al. 2018). Je nach individuellem Ischämie- und Blutungsrisiko oder Zusatzindikationen des Patienten kann die Dauer der DAPT verkürzt oder verlängert werden (Neumann et al. 2018). Die Auswahl des Stents hat laut aktualisierten Leitlinien keinen Einfluss mehr auf die Dauer der DAPT (Neumann et al. 2018).

## **1.4 Reperfusionsschaden**

Die therapeutisch wiederhergestellte Perfusion im akut verschlossenen Gefäß kann paradoxerweise nicht nur eine vorteilhafte Wirkung im Myokard erzielen. Der Schaden besteht konkret aus Kardiomyozyten, die vor der Durchführung der Reperfusion noch lebensfähig waren (Piper et al. 1998). Studien an Tieren ergaben, dass bis zu 50% der endgültigen Infarktgröße durch den Reperfusionsschaden zustande kommt (Yellon & Hausenloy 2007). Auf zellulärer Ebene kommt es zur anaeroben Glykolyse im ischämischen Myokard, was zu einer raschen

Abnahme des intrazellulären pH-Werts und einer Verminderung der Troponin C-Sensitivität gegenüber Phosphofruktokinase und  $\text{Ca}^{2+}$  führt, was wiederum Verlust von Kontraktilität und Schwellen der Zelle verursacht (Sanada et al. 2011). Außerdem kommt es durch den ATP-Mangel zur Inaktivierung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, der ATP abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$  Aufnahme und der aktiven  $\text{Ca}^{2+}$  Exkretion, was insgesamt zu einer  $\text{Ca}^{2+}$  Überladung der Zelle führt (Sanada et al. 2011). Kommt es zur Reperfusion werden viele Substrate wie Glucose, freie Fettsäuren oder Sauerstoff wiederangeliefert, die für die Prävention eines weiteren ischämischen Zellschadens wichtig sind, aber gleichzeitig auch den Reperfusionsschaden unterhalten (Sanada et al. 2011). Durch Normalisierung des pHs kommt es durch den hohen  $\text{H}^+$  Gradient getriggert zum  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Austausch und damit zum massiven  $\text{Na}^+$  Einstrom in die Zelle. Dieser unphysiologische  $\text{Na}^+$  Gradient führt zur Umkehr der Arbeitsweise des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Austauschers, welcher  $\text{Na}^+$  dann aus der Zelle schafft, während es intrazellulär zur  $\text{Ca}^{2+}$  Akkumulation kommt (Schafer et al. 2001). Durch die Normalisierung des pHs kommt es zudem zum Wegfall der Hemmung der Protease Calpain, zur Hyperkontraktur der Myozyten und zur Änderung der mitochondrialen Permeabilität. Insgesamt verschlimmert sich so also der myokardiale Schaden schon während der frühen Reperfusionsphase (Inserate et al. 2011). Des Weiteren führt die Reoxygenierung zur Aktivierung der Xanthinoxidase durch  $\text{Ca}^{2+}$ - sensitive Proteasen (Kitakaze 2010) und der mitochondrialen Atmungskette. Es kommt in der Folge zum aeroben Stoffwechsel und so zum massiven Anfall von reactive oxygen species (ROS) und zur Ausbildung von Superoxid und Hydrogenperoxid (Granger & Kviety 2015). Diese Vorgänge resultieren in einer Aktivierung von inflammatorischen Kaskaden mit Zytokinfreisetzung und Apoptose, zum direkten Schaden an DNA und Proteinen und zur Zerstörung der Zellintegrität. Der Kardiomyozyt stirbt (Sanada et al. 2011).

## 1.5 Thrombozyten

### 1.5.1 Allgemeines

Thrombozyten (TZ) sind kernlose Zellen, die sich im Knochenmark von den Megakaryozyten abschnüren. Ihre Lebensdauer bei der Zirkulation im Blut beträgt ca. 10 Tage. Dabei bilden sie eine bikonvexe Scheibe mit 2,5 µm Durchmesser aus. Im Zytoplasma der TZ befinden sich Mitochondrien, Glykogenpartikel, Lysosomen und Speichergranula, die bei der Blutstillung entleert werden. Die Beseitigung von alten TZ geschieht durch Makrophagen mittels Phagozytose in der Leber und Milz (Abschnitt vgl. (Lüllmann-Rauch & Paulsen 2012)).

### 1.5.2 Sekretorische Granula der Thrombozyten

Thrombozyten (TZ) sind mit verschiedenen Granula beladen, die sie auf bestimmte Stimuli hin sezernieren und die sie so befähigen mit anderen zirkulierenden Zellen zu kommunizieren. Die Exozytose geschieht unter Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran mit den Chaperon-Proteinen Rab27a und Munc13-4. Diese Fusion wird zusätzlich durch unterschiedliche soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor (SNARE) Proteine reguliert ((Abschnitt vgl. (Manne et al. 2017))). Es gibt drei unterschiedliche Typen von sekretorischen Granula:  $\alpha$ -Granula, dichte Granula und Lysosomen. Davon stellen die  $\alpha$ -Granula mit 50-80 Granula pro Thrombozyt den größten Anteil dar. Mit deren Hilfe und der Hilfe des open canalicular system (OCS) kann der TZ seine Oberfläche bei Aktivierung um das Zwei- bis Vierfache vergrößern (Blair & Flaumenhaft 2009; White & Clawson 1980).  $\alpha$ -Granula beinhalten lösliche Proteine oder Rezeptoren die bei der Exozytose auf der Thrombozytenmembran verbleiben wie z.B.  $\alpha_{IIb}\beta_3$  oder GP VI, die die Aktivierung der TZ und Verstärkung der Aggregation bewirken (Blair & Flaumenhaft 2009). Zudem beinhalten sie wichtige Faktoren für die Gerinnung: Faktor V, XI, XII und das Thrombinvorläufermolekül Prothrombin (Golebiewska & Poole 2015). Um ein Gleichgewicht zwischen Hämostase und Fibrinolyse zu garantieren und eine pathologische Thrombose unter

physiologischen Bedingungen zu verhindern, beinhalten die  $\alpha$ -Granula auch anti-koagulatorische Substanzen wie tissue factor pathway inhibitor (TFPI), Protein S, Protease nexin-2 (Amyloid  $\beta$ -A4 Protein), Plasmin und sein inaktives Vorläufermolekül Plasminogen. So werden aktivierte Gerinnungsfaktoren inhibiert oder auch Fibrinolyse gestartet (Blair & Flaumenhaft 2009; Golebiewska & Poole 2015).

Ein weiterer Bestandteil der  $\alpha$ -Granula ist das P-Selektin welches bei Thrombozytenaktivierung auf die Plasmamembran transferiert wird (Gawaz et al. 2005; Merten & Thiagarajan 2004). Die Expression ist bei der koronaren Herzkrankheit, beim Myokardinfarkt, Schlaganfall und der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (PAVK) erhöht (Gawaz et al. 2005; Merten & Thiagarajan 2004). Ebenso moderiert P-Selektin die Interaktion der Plättchen mit Leukozyten, was zusammenfassend ein prothrombogenes, inflammatorisches Milieu schafft (Gawaz et al. 2005; Merten & Thiagarajan 2004).

Die dichten Granula beinhalten ADP, ATP, GDP, 5-HT, Pyrophosphat, Magnesium und Calcium. Zusammen mit gebildetem Thromboxan  $A_2$  kommt es so zu einem positiven Feedback-Mechanismus, der die Thrombozytenaggregation aufrecht erhält (Golebiewska & Poole 2015).

Die letzte Form von Granula sind Lysosomen, deren Aufgabe im Vergleich zu der der anderen Granula weniger verstanden ist. Sie haben einen sauren pH und beinhalten hydrolytische Enzyme wie beispielsweise Glykosidasen, Proteasen und Kollagenasen (Rendu & Brohard-Bohn 2001; Ciferri et al. 2000). So können sie scheinbar an der Regulation der Thrombusformation und an der Umgestaltung der extrazellulären Matrix mitwirken (Rendu & Brohard-Bohn 2001; Ciferri et al. 2000).

### **1.5.3 Die Rolle der Thrombozyten bei der Atherosklerose**

Auch bei der Initiation der Atherosklerose spielen Thrombozyten eine Rolle. Vom Endothel aktivierte Thrombozyten interagieren durch verschiedene Mechanismen mit Leukozyten. Leukozyten binden sich an adhärente Blutplättchen über eine Interaktion zwischen P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) und P-

Selektin und zwischen Mac-1- ( $\alpha_M\beta_2$ ) und GPIb $\alpha$  und zudem noch über andere Rezeptoren an die Plättchenmembran. Dieser Vorgang führt bei den Monozyten zur Sekretion von diversen Chemokinen, Zytokinen und prokoagulatorischem TF, zur Heraufregulation von Adhäsionsrezeptoren und zur eigenen Differenzierung zu Makrophagen. So entsteht durch die Plättchen-Monozyten-Interaktion am Endothel des Gefäßes ein für die atheromatöse Plaquebildung förderliches Milieu. Dieses inflammatorische Milieu kann ebenso zu Atherothrombose führen (Abschnitt vgl. (Gawaz et al. 2005)). Zudem zeigen einige Daten, dass TZ an der Atheroskleroseprogression beim Menschen beteiligt sind. So ist beispielsweise bei kardiovaskulären Erkrankungen eine veränderte Plättchenantwort durch entweder erhöhte prokoagulatorische Stimuli oder eine Verminderung von antiaggregatorischen Substanzen zu finden (Willoughby et al. 2002). Bei erhöhter systemischer Plättchenaktivität konnte außerdem eine beschleunigte Zunahme der Intima- und Mediadicke der Arteria carotis communis bei Typ 2 Diabetikern nachgewiesen werden (Fateh-Moghadam et al. 2005). Außerdem finden sich Platelet Factor 4 (PF4) und noch weitere von den TZ ausgehende Chemokine und Wachstumsfaktoren in den atherosklerotischen Plaques des Menschen (Pitsilos et al. 2003; Coppinger et al. 2004).

Insgesamt sind TZ also eine wichtige Schaltstelle für Inflammation, Thrombose und Atherogenese, da es durch die chronische Inflammation am Endothel der Gefäße zur Ausbildung von atherosklerotischen Läsionen und somit schlimmstenfalls zur Atherothrombose kommt (Gawaz et al. 2005).

#### **1.5.4 Die Rolle der Thrombozyten bei der Hämostase**

Bei der Atherosklerose der Koronarien kann es nach jahrelangem ereignisfreiem Überleben plötzlich zu einer lebensbedrohlichen Plaqueruptur mit Thrombose kommen. Dies erklärt sich durch die unterschiedliche Zusammensetzung und somit Thrombogenität der Plaques. Lipidreiche, weiche Plaques sind vulnerabler als harte, kollagenreiche, von einer dicken fibrösen Kappe bedeckte Plaques. Auch ein durch Makrophagen induziertes inflammatorisches Milieu und das

Fehlen von stabilisierenden glatten Muskelzellen erhöht die Rupturgefahr (Abschnitt vgl. (Zhou et al. 1999)). Kommt es nun zur Ruptur der Plaque werden thrombogene Komponenten exponiert und die Gerinnungskaskade sowie Thrombusformation aktiviert (Shah 2003). Zu Beginn steht die Interaktion des von Wilbrand Faktors der freigelegten extrazellulären Matrix mit dem Glykoprotein Ib-V-IX Komplex, der das Einfangen der Thrombozyten an den Ort des Geschehens ermöglicht (Varga-Szabo et al. 2008). Dieser Komplex besteht aus den vier Glykoprotein-Untereinheiten GPIb alpha, GPIb beta, GPIX und GPV, die je eine variable Anzahl an Leucin-reichen repeats aufweisen. Treten hier pathologische Veränderungen auf, kommt es zum Bernard-Soulier-Syndrom mit vermehrter Blutungsneigung (Clemetson & Clemetson 1995). Anschließend kann das GPVI der Thrombozyten an Kollagen binden, was zur weiteren Plättchenaktivierung führt und durch lokal freigesetztes Thrombin, ADP und Thromboxan A<sub>2</sub> verstärkt wird. Dabei kommt es zur Hochregulation der hochaffinen Zelladhäsionsmoleküle Integrin  $\beta_1$  und  $\beta_2$ , die eine feste Thrombusbildung ermöglichen (Nieswandt et al. 2011). Die darauffolgende Thrombozytenaggregation wird durch Bindung von gelöstem Fibrinogen an Integrin  $\alpha IIb\beta_3$  (auch GP IIb/IIIa genannt), welches sich auf der Thrombozytenoberfläche befindet, bewirkt (Arya et al. 2003). Eine weitere Aktivierung der Thrombozyten geschieht durch die in der Leber gebildete Serinprotease Thrombin, die durch Bindung an die G-Protein-gekoppelten Protease-aktivierten Rezeptoren zur Aggregation und Thrombusformation beiträgt (Jarvis et al. 2003; Martorell et al. 2008).

## 1.6 Apoptose

Die Akutmaßnahmen beim STEMI beinhalten eine rasche Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes durch PCI sowie thrombolytische Therapie um den ischämischen Schaden möglichst gering zu halten (Yellon & Hausenloy 2007). Durch diese Rekanalisierung kommt es durch den wiederhergestellten Blutfluss im ischämischen Myokard jedoch zusätzlich zu einem Reperfusionsschaden. Dieser führt zum Zelltod durch Nekrose und Apoptose (Mocanu et al. 2000). Außerdem umgeben viele apoptotische Zellen das infarzierte Gewebe (Saraste et

al. 1997). Apoptose wurde erstmals von Kerr 1979 als ein kontrollierter Abbau von Zellen beschrieben, der zusammen mit der Mitose die Zellzahl in Geweben reguliert. Hierbei kann der Zelltod durch eine Vielzahl von physiologischen oder pathologischen Stimuli initiiert oder inhibiert werden. Unser heutiges Verständnis von Apoptose beim Menschen leitet sich unter anderem von Untersuchungen am Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* aus der Gruppe der Rhabditiden ab (Horvitz 1999). Hierbei zeigte sich der "programmierte Zelltod" bei der Entwicklung des adulten Fadenwurms aus 1090 somatischen Zellen, von denen immer 131 Zellen während der Ausreifung apoptotisch zugrunde gingen. Dieser Vorgang zeigte eine bemerkenswerte Genauigkeit und Unveränderlichkeit zu bestimmten Entwicklungsstadien. Horvitz et al. identifizierten die Steuerung der Apoptose durch die Gene *ced-3*, *ced-4* (proapoptotisch) und *ced-9* (antiapoptotisch). *Ced-3* initiiert mit seinem Effektorprotein bei *Caenorhabditis elegans* die Apoptose, welches den Caspasen beim Menschen homolog ist (Hengartner 1999). Auf zellulärer Ebene kommt es zu charakteristischen Veränderungen wie Schrumpfung der Zelle und Pyknose (Kerr et al. 1972). Das Zytoskelett der Zelle wird durch Aspartat-spezifische Proteasen gespalten, was zum Kollaps der subzellulären Bestandteile sowie zu einem Abfall des Mitochondrienmembranpotentials führt (Hotchkiss et al. 2009). Die Zellorganellen werden in sog. apoptotic bodies von der Plasmamembran abgeschnürt und bei erhaltener Integrität ohne inflammatorische Reaktion von Makrophagen phagozytiert (Elmore 2007).

### **1.6.1 Der intrinsische Signalweg der Apoptose**

Der intrinsische Weg ist ein vom Mitochondrium abhängiger Weg, der durch intrazelluläre, also nicht rezeptorvermittelte, Signale Apoptose einleitet. Trigger können z.B. Strahlung, Toxine, Hypoxie, Hyperthermie und freie Radikale sein. Auch der Wegfall von bestimmten Wachstumsfaktoren, Zytokinen oder Hormonen kann zur fehlenden Hemmung des Zelluntergangs und somit zur Apoptose der Zelle führen. Dabei kommt es zur Änderung des Membranpotentials des Mitochondriums, was durch eine Permeabilitätsänderung der äußeren Mitochondrienmembran gesteuert wird. Hier spielen die vielzähligen Proteine der Bcl-2

Familie eine große Rolle, die sich in proapoptotische (z.B. Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad) und antiapoptotische (z.B. Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS) Proteine unterteilen lassen (Abschnitt vgl. (Elmore 2007)).

In einer gesunden Zelle zirkuliert Bax zwischen dem Zytosol und der äußeren Mitochondrienmembran umher und hat dabei immer wieder Kontakt mit dem antiapoptotischen Bcl-XL oder Bcl-2 (Edlich et al. 2011). Dieses Äquilibrium wird durch BH3-only-Proteine wie beispielsweise Puma oder Bad gestört, die als „Sensoren für zellulären Stress“ angesehen werden. Es kommt zur Akkumulation von Bax an der äußeren Mitochondrienmembran, der Exposition eines neuen N-terminalen Epitops (6A7) und somit zur Initiation der Apoptose durch Erhöhung der Membranpermeabilität (Edlich et al. 2011; Soriano & Scorrano 2011). Folglich kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C, Smac/DIABLO und der Serinprotease HtrA2/Omi aus dem intermembranösen Raum in das Zytosol der Zelle (Saelens et al. 2004). Cytochrom C bindet apoptotic protease activating factor 1 (APAF1), es bildet sich ein Apoptosom durch Oligomerisierung und führt zur Aktivierung und Rekrutierung von Procaspase 9, die dissoziiert und die Kaskade durch Spaltung von Caspase 3 in Gang setzt (Zou et al. 1999). Die ebenso freigesetzten Proteine Smac/DIABLO und HtrA2/Omi führen zur Neutralisierung von inhibitor of apoptosis (IAP) und verstärken die katalytische Aktivität des Apoptosoms deutlich (Hill et al. 2004; Suzuki et al. 2001).

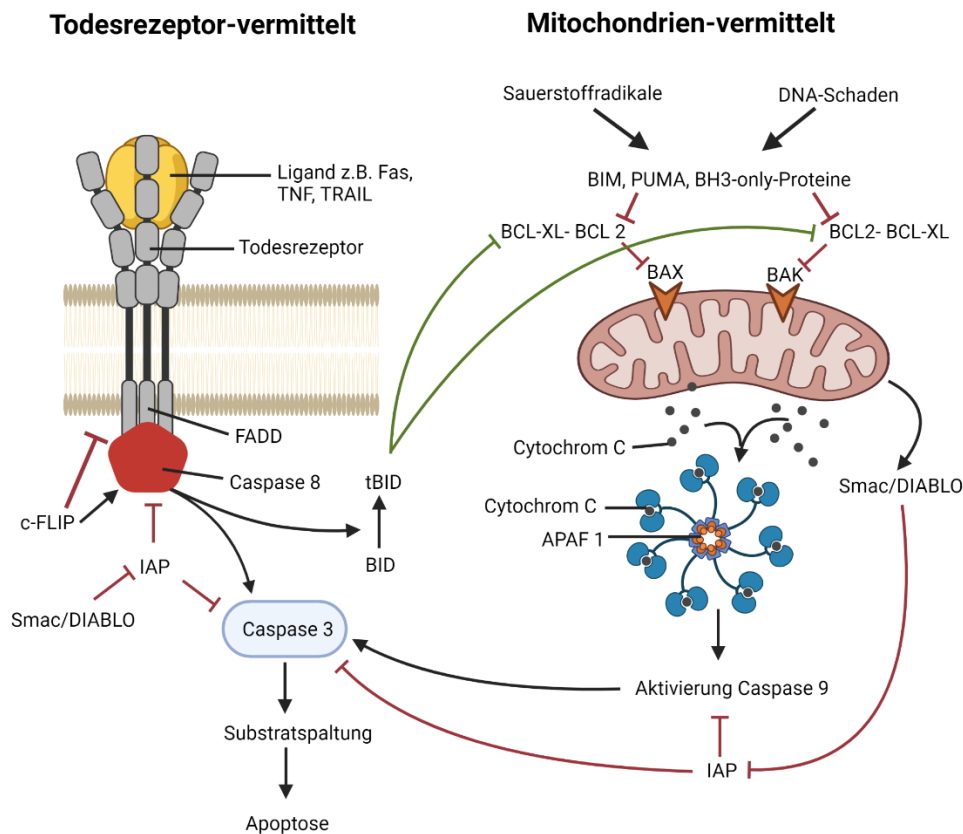
### **1.6.2 Der extrinsische Signalweg der Apoptose**

Der extrinsische Signalweg wird über transmembranöse Rezeptoren vermittelt, die der TNF Familie angehören (Locksley et al. 2001). Diese tumor necrosis factor (TNF) Rezeptoren besitzen eine homologe cysteinreiche extrazelluläre Domäne und eine aus rund 80 Aminosäuren bestehende zytoplasmatische Todesdomäne, die bei Bindung eines Liganden das Signal nach intrazellulär weitergibt (Ashkenazi & Dixit 1998). Die am besten untersuchten Rezeptoren sind die Todesrezeptoren CD95 (auch Apo oder Fas1 genannt) mit Ligand CD95 (auch FasL genannt) und TNF R1 (auch CD120a oder p55 genannt) mit den Liganden TNF $\alpha$  oder Lymphotoxin  $\alpha$  (Ashkenazi & Dixit 1998). Bindet nun beispielsweise mem-



brangebundenes Fas an seinen Rezeptor kommt es zur Konformationsänderung und Ausbildung eines sogenannten death-inducing signaling complex (DISC). Dieser beinhaltet das fas-associated death domain protein (FADD) und die Caspasen 8 und 10, die durch autoproteolytische Prozessierung ihre aktive Proteaseaktivität aufnehmen und so Apoptose einleiten können (Wajant 2002). Sobald Caspase 8 aktiviert ist, setzt sich die Apoptosekaskade in Gang und die Exekutionsphase der Zelle wird vollzogen (Elmore 2007). Der extrinsische Weg über Rezeptoren kann jedoch auch moduliert werden. Das cytoplasmatische FLICE Protein FLIP (cFLIP) ist ein potenter Inhibitor und hemmt die Aktivierung über CD95L und tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) indem es mit DISC interferiert (Kavuri et al. 2011; Wachter et al. 2004). Kontrovers diskutiert wird die Tatsache ob und in welchem Maße es eine Verbindung zwischen den beiden Signalwegen der Apoptose gibt. Auf molekularer Ebene kommt es zur Proteolyse von BID (antiapoptotisches Protein des intrinsischen Weges) zu tBID durch Caspase 8, welche DISC und somit dem extrinsischen Weg angehört. Das tBID wiederum fördert den mitochondrialen Apoptoseweg. Im Prinzip benötigt der extrinsische Weg die Hilfe des intrinsischen Weges, wenn beispielsweise das Signal zu schwach ist oder die Barriere der IAP auf die Effektorcaspasen 3 und 7 zu hoch ist und eine Hemmung der IAP durch Smac/DIABLO benötigt wird (Abschnitt vgl (Roy & Nicholson 2000)).

Eine Übersicht über beide Signalwege der Apoptose gibt Abbildung 2.



FAS  $\triangleq$  Fas Ligand; TNF  $\triangleq$  Tumor necrosis factor; TRAIL  $\triangleq$  TNF-related apoptosis-inducing ligand; cFLIP  $\triangleq$  cellular FLICE inhibitory protein; FLICE  $\triangleq$  FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme; FADD  $\triangleq$  Fas-associated death domain; IAP  $\triangleq$  inhibitor of apoptosis proteins; SMAC/DIABLO  $\triangleq$  Second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI; (t)BID  $\triangleq$  (truncated) BH3 interacting-domain death agonist; BIM  $\triangleq$  BCL-2 interacting mediator of cell death; PUMA  $\triangleq$  p53 upregulated modulator of apoptosis; BAX  $\triangleq$  Bcl-2-associated X protein; BAK  $\triangleq$  Bcl-2 homologous antagonist/killer; APAF1  $\triangleq$  apoptotic protease activating factor 1

#### Abbildung 2: Apoptosewege

Nachgebildet mit Erlaubnis von (Hotchkiss et al. 2009), Copyright Massachusetts Medical Society

## 1.7 Die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7

Chemokine gehören zur Familie der Zytokine und beinhalten eine große Zahl an Liganden, die an eine kleinere Anzahl von Rezeptoren binden (Zlotnik & Yoshie 2000; Yoshie et al. 2001). Die am besten untersuchte Funktion der Chemokine ist die Regulation der Zellmigration im Körper. Sie spielen zudem eine Schlüsselrolle bei vielen Krankheiten mit autoimmuner Genese, Infektionskrankheiten wie HIV/AIDS und bei Inflammation generell. Auch bei Krebs und Metastasierung sind sie beteiligt (Müller et al. 2001; Zlotnik et al. 2006). Mehrere

Chemokinliganden können an den selben Rezeptor, einen sogenannten C-X-C chemokine receptor (CXCR) binden, der G-Protein-gekoppelt ist (Zlotnik et al. 2006). Das Chemokin stromal cell– derived factor-1 (SDF-1 oder CXCL12) bindet an seine Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 (Balabanian et al. 2005). CXCR4 ist auf den Zellen des Immunsystems und des zentralen Nervensystems sowie auf unterschiedlichen Endothelzellpopulationen weit verbreitet und sorgt dort für die Migration von ruhenden Leukozyten und hämatopoetischen Progenitorzellen bei Bindung des zugehörigen Liganden (Zou et al. 1998; Feil & Augustin 1998). CXCR7 ist ein kürzlich neu entdeckter Chemokinrezeptor, der auf vielen Tumorzelllinien, auf aktivierten Endothelzelllinien und auf fetalen Leberzellen exprimiert wird (Burns et al. 2006). Die mRNA des Rezeptors wurde in Herz, Milz und Nieren gefunden (Heesen et al. 1998). CXCR7 ist zudem unabdingbar für die Resistenz von mesenchymalen Stammzellen gegen oxidativen Stress (Liu et al. 2010). Außerdem sind CXCR4 und CXCR7 auf Thrombozyten von gesunden Menschen sowie bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung exprimiert. Ihre Expression korreliert zudem mit der ihres Liganden SDF-1 (Rath et al. 2015).

### **1.7.1 Signalwege bei Bindung von SDF-1 an CXCR4/CXCR7**

SDF-1 ist ein Chemokin, welches eine große Rolle beim Homing von CD34+ Stammzellen spielt und auch Zellbewegungen maßgeblich beeinflussen kann. Bei einer Gewebsverletzung wird es in wesentlichem Maße von adhärennten Blutplättchen gebildet. SDF-1 lockt dann CD34+ Zellen an, vermittelt deren Adhäsion im peripheren Gefäßsystem und deren anschließende Differenzierung zu Endothelprogenitorzellen. So kann es entscheidend zur vaskulären und myokardialen Regeneration beitragen (Abschnitt vgl. (Stellos et al. 2008)). Die Signaltransduktion nach Ligandenbindung geschieht über die Komplexbildung von CXCR4 mit der G-Protein Untereinheit G $\alpha$ i, die so aktiviert wird und die Adenylatcyclase inhibiert. Durch den so herbeigeführten Abfall des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) kommt es zur Mobilisation des intrazellulären Calciums. G $\alpha$ i ist eine Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins G $\alpha\beta\gamma$  (Sun et al. 2010; Levoe et al. 2009). Bei Dissoziation der Untereinheit von G $\alpha\beta\gamma$  werden

unterschiedliche Signalwege in Gang gesetzt, die Effektorproteine wie ERK1/2, MAPK, JNK und Akt zum Ziel haben (Lee et al. 2007; Lu et al. 2009; Princen et al. 2003; Roland et al. 2003). Es kommt folglich zu, mit Chemotaxis einhergehenden Veränderungen, wie zytoskelettalem Umbau, Aktin-Polymerisation, Bildung von Pseudopodien, Integrin-assoziiierter Adhäsion an Endothelzellen oder Proliferation (Levoye et al. 2009; Sun et al. 2010).

Die Rolle von CXCR7 ist bisher noch nicht in allen Details verstanden. Alleine scheint dieser Rezeptor die G-Protein abhängigen Signalwege bei Ligandenbindung nicht initiieren zu können. Trotzdem führt die Bindung von SDF-1 zu einer Konformationsänderung des Rezeptors (Levoye et al. 2009). Levoye et al. konnten zudem zeigen, dass sich aus CXCR4 und CXCR7 Rezeptorheterodimere bilden, die die Signalbildung über SDF-1 modulieren können. So führt die CXCR7 Expression zu einer Konformationsänderung des vorgebildeten CXCR4/Gi-Protein-Komplexes und somit zu einer Beeinträchtigung der Aktivierung der Gi-Protein-abhängigen Antwort und Calciummobilisation (Levoye et al. 2009). Dadurch kommt es zur Erleichterung der SDF-1 vermittelten Wirkung (Rath et al. 2015).

### **1.7.2 Die Achse SDF-1/CXCR4/CXCR7 und deren Rolle bei der KHK**

Thrombozyten sind bei Thrombose, Inflammation, Immunabwehr und regenerativen Mechanismen beteiligt. Ihre Aktivierung resultiert in prokoagulatorischer Aktivität und Apoptose, was ihre Lebenszeit und ihren potentiellen Einfluss auf pathophysiologische Prozesse einschränkt (Leytin 2012). Chatterjee et al. fanden heraus, dass eine SDF-1 bzw. CXCR4 abhängige Translokation von CXCR7 das Überleben von aktivierten Thrombozyten und deren Apoptose modulieren kann. So konnte SDF-1 eine aktivitätsinduzierte Apoptose in vitro verhindern, was anhand von erniedrigtem Level an gebundenem Annexin V, der Caspase 3 Aktivität und persistierendem mitochondrialen Membranpotential bei mit SDF-1 vorbehandelten Thrombozyten zu sehen war. Genauer gesagt bewirkt das Binden von SDF-1 die Internalisierung von CXCR4, was ebenso mit einer Ubiquitinierung und anschließender Translokation von CXCR7 auf die Thrombozytenoberfläche verbunden ist. Es kommt zu einem antiapoptotischen Effekt und somit zum

verlängerten Überleben der Thrombozyten, da mehr CXCR7 auf der Oberfläche zu finden sind (Abschnitt vgl. (Chatterjee et al. 2014)).

Die Achse SDF-1/CXCR4/CXCR7 spielt bei der KHK und dem Myokardinfarkt eine wichtige Rolle. Nach einer akuten Myokardischämie steuert die erhöhte SDF-1 Expression der Thrombozyten das Einwandern von endothelialen Progenitorzellen und damit auch regenerative Mechanismen (Rath et al. 2015; Hu et al. 2007; Zhang et al. 2008). SDF-1 kann Angiogenese in Gang setzen und führt so zur Neovaskularisation im ischämischen Gewebe in vivo da vermehrt endotheliale Vorläuferzellen angelockt werden (Yamaguchi et al. 2003). Auch mit dem klinischen Bild korreliert SDF-1. So haben Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS) im Vergleich zu denen mit stabiler KHK ein erhöhtes SDF-1 Level auf ihren Thrombozyten (Stellos et al. 2011; Stellos et al. 2009). Nach einem akuten Myokardinfarkt zeigen Patienten mit erhöhtem Blutplättchen- SDF-1 eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) im Gegensatz zu Patienten, die kein erhöhtes SDF-1 aufweisen. Analog verhält es sich bei der Größe der Infarktnarbe nach dem Ereignis (Geisler et al. 2012). Auch die CXCR7 Expression auf Thrombozyten ist bei Patienten mit ACS im Vergleich zu denen mit stabiler KHK erhöht. Ebenso ist eine Verbesserung der LVEF nach ACS bei Patienten mit einer höheren CXCR7 Oberflächenexpression assoziiert (Rath et al. 2014). Für den Rezeptor CXCR4 konnte zudem ein prognostischer Wert gefunden werden. So zeigte sich, dass kontinuierlich niedrige CXCR4 Level mit Studienendpunkten wie einem tödlichen Myokardinfarkt oder anderen Todesursachen assoziiert sind. Erhöhte Werte zeigten dementsprechend ein signifikant besseres ereignisfreies Überleben an (Rath et al. 2014).

## **1.8 Die thrombozytären Apoptosemarker**

### **1.8.1 TMRE**

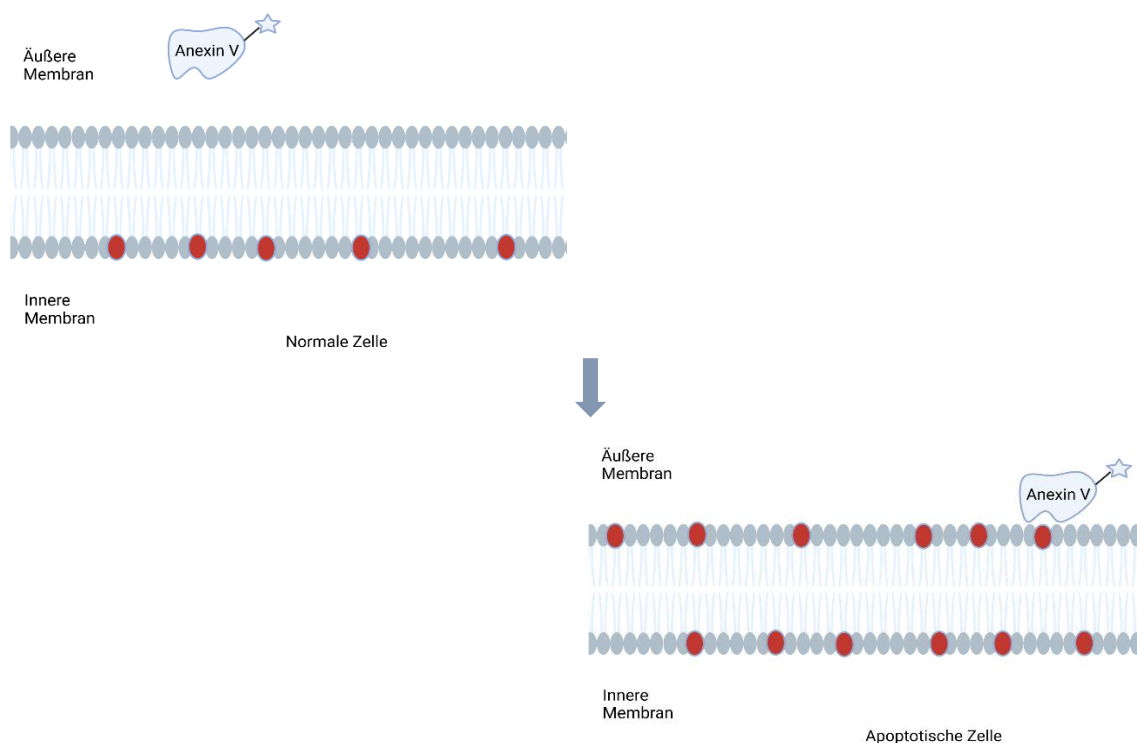
Tetramethylrhodaminethylester (TMRE) ist ein lipophiler positiv geladener Stoff mit dessen Hilfe das Membranpotential über der inneren Mitochondrienmembran

( $\Delta\Psi$ ) bestimmt werden kann. Aufgrund seiner chemischen Eigenschaften reichert sich TMRE innerhalb der mitochondrialen Matrix und der intakten inneren Mitochondrienmembran an und kann dabei mit maximaler Fluoreszenzintensität gemessen werden (Scaduto & Grotyohann 1999). Es konnte bereits gezeigt werden, dass TMRE für die Identifizierung von nicht-apoptotischen, vitalen Zellen in einer Probe verwendet werden kann. Die Färbung mit TMRE beeinflusst zudem weder die Proliferation noch die Lebensdauer der Zellen (Barteneva et al. 2014). Man kann sagen je negativer  $\Delta\Psi$  ist, desto mehr akkumuliert auch das Kation TMRE (Perry et al. 2011). Kommt es jedoch zur Depolarisation wird das Innere des Mitochondriums weniger negativ und es kommt zur verminderten Anreicherung des Stoffes (Perry et al. 2011). Eine Depolarisation, wie sie auch bei der Apoptose vorkommt, führt zu einem drastischen Abfall von  $\Delta\Psi$ , TMRE verlässt das Mitochondrium und verteilt sich im Zytosol der Zelle. Die Fluoreszenzintensität nimmt folglich ab (Scaduto & Grotyohann 1999).

### **1.8.2 Annexin V**

Über Annexin V wurde erstmals von Bohn und Kollegen berichtet, die es placental protein 4 nannten, da sie das Protein aus der menschlichen Plazenta isolierten. Reutelingsperger et al. isolierten es ebenfalls, jedoch aus der Wand eines Nabelschnurgefäßes und bezeichneten es aufgrund der gerinnungshemmenden Wirkung als vascular-anticoagulant- $\alpha$  (Inaba et al. 1984; Reutelingsperger et al. 1985). Nach Sequenzierung der humanen Annexin-V-cDNA erhielt das Protein seinen Namen aufgrund seiner Homologie zur Annexinproteinfamilie (Maurer-Fogy et al. 1988; Iwasaki et al. 1987; Kaplan et al. 1988). Vitale Zellen halten unter Ruhebedingungen eine asymmetrische Verteilung unterschiedlicher Phospholipide zwischen dem inneren und äußeren Teil der Plasmamembran aufrecht (Bretscher 1972). Wie auch in Abbildung 3 dargestellt bleibt Phosphatidylserin (PS) normalerweise durch die Aktivität sogenannter ATP-abhängigen Flippasen auf der inneren Membran lokalisiert (van Engeland et al. 1998; Nagata et al. 2016). Der apoptotische Zelltod geht mit einer Änderung der Plasmamembranstruktur durch Oberflächenexposition von PS einher, während die Integrität der

Membran bestehen bleibt. Dieser Vorgang ist Cytochrom C abhängig (Cooper 2000; Ashkenazi & Dixit 1998; Schoenwaelder et al. 2009; Dasgupta et al. 2010; Martin et al. 1995). Oberflächenexponiertes PS kann dann durch seine Affinität für Annexin V, einem Phospholipid-Bindungsprotein, nachgewiesen werden. Annexin V bindet in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  das PS (van Engeland et al. 1998). Bei Thrombozyten dient das exponierte PS darüber hinaus auch dem Nachweis der Aktivierung der Zelle. PS als thrombogenes Phospholipid führt hier auch zur Bildung des Prothrombinase-Komplexes, der für die Thrombinbildung notwendig ist (Munzer et al. 2014). Außerdem ist PS das Ziel des Tenase Komplexes der aus Faktor VIIIa, IXa und  $\text{Ca}^{2+}$  gebildet wird (Cooper 2000; Zwaal et al. 1977). Der Tenase Komplex führt zur erhöhten Gerinnungsneigung der Plättchen und ist damit ein wichtiger Bestandteil der Thrombozytenaktivierung (Dasgupta et al. 2010; Solum 1999).



*Normale Zellen halten die Asymmetrie der Plasmamembran aufrecht. PS (rote Kreise) in der inneren Plasmamembran ist dem Zytosol zugewandt. Während der Apoptose wird PS in der äußeren Membran exponiert. Hapten markiertes Annexin V kann in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  mit hoher Affinität an PS binden.*

**Abbildung 3:** Verlust der Lipidasymmetrie während der Apoptose (Abb. vgl. (van Engeland et al. 1998))

## 1.9 Serumapoptosemarker

### 1.9.1 TNF-Familie

Die tumor necrosis factor (TNF) Familie bestehend aus 29 Rezeptoren, die durch 19 unterschiedliche, zu TNF- $\alpha$  homologe Liganden, gebunden werden können haben vielschichtige Aufgaben im menschlichen Körper. Ausnahmslos alle Mitglieder der TNF-Familie bewirken inflammatorische Vorgänge, zum Teil durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Aggarwal et al. 2012). Einige spielen zudem eine Rolle für die Proliferation von hämatopoetischen Zellen, beispielsweise durch Aktivierung von mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen), andere wirken bei der Apoptose mit (Bhardwaj & Aggarwal 2003; Gaur & Aggarwal 2003). Von einer Mitbeteiligung an Differenzierung und Morphogenese wurde auch berichtet (Aggarwal et al. 2012). TNF  $\alpha$  ist jedoch auch in Zusammenhang mit Autoimmunkrankheiten, Krebs oder Stoffwechselerkrankungen zu sehen. Zusammenfassend findet man also potenziell schädliche und nützliche Effekte (Aggarwal 2003).

### 1.9.2 TNF $\alpha$

TNF $\alpha$  gibt es in sekretorischer und membrangebundener Form mit einem molekularen Gewicht von jeweils 17 und 26 kD. Die sekretorische Form, welche als aktive Form gilt, wird aus der membrangebundenen Form durch das TNF-converting enzyme gebildet. TNF $\alpha$  ist ein ubiquitär vorkommendes Zytokin, das von vielen Zellen wie Lymphozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen freigesetzt werden kann. Die biologische Aktivität von TNF $\alpha$  entfaltet sich über seine zwei Rezeptoren TNF RI und TNF RII. TNF RI ist auf den meisten Zelloberflächen zu finden, während TNF RII hauptsächlich auf endothelialen und hämatopoetischen Zelllinien exprimiert wird (Abschnitt vgl. (Tian et al. 2015)).

Auch das Myokard ist mit Rezeptoren für TNF $\alpha$  ausgestattet. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine erhöhte Aktivierung der TNF $\alpha$  Rezeptoren zelluläre

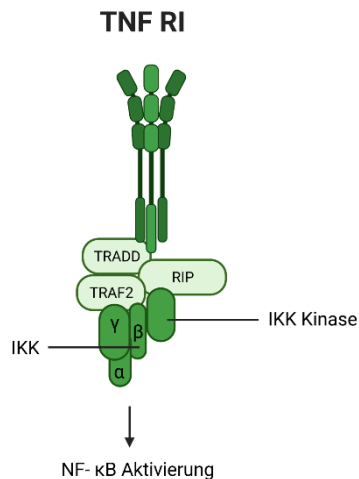


Prozesse induziert, die zum Remodeling des linken Ventrikels mit folglich veränderter Myozytengröße und -lebensfähigkeit sowie zu Veränderungen in der Myokardstruktur bzw. -zusammensetzung bei bestehender Herzinsuffizienz beitragen (Bradham et al. 2002). Experimentelle Studien brachten zudem Induktion von TNF $\alpha$  mit linksventrikulärer Dilatation und Pumpdysfunktion in Verbindung (Bradham et al. 2002). Nach einem akuten Myokardinfarkt zeigen sich laut Fahim et al. nach 48 Stunden signifikant erhöhte TNF $\alpha$  Werte vor allem bei Patienten mit Anzeichen für eine beginnende Herzinsuffizienz. So könnte man schlussfolgern, dass TNF $\alpha$  einerseits einen frühen Marker für Myokardschädigung darstellt, da es nach Ischämie frühzeitig ansteigt und andererseits als Indikator für die Schwere eines Myokardinfarkts angesehen werden kann (Fahim et al. 2004). Auch eine Korrelation zwischen Infarktgröße und TNF $\alpha$  Konzentration ist bereits beschrieben worden, da es durch die Inflammation nach Infarkt zur vermehrten Zytokinsynthese kommt, die zu einer Myokardfibrose führen kann (Halawa et al. 1999).

### **1.9.3 TNF RI und TNF RII**

Über die Rezeptoren TNF RI und TNF RII entfaltet TNF $\alpha$  seine vielfältigen Wirkungen (Locksley et al. 2001). Je nach Rezeptortyp kommt es zu unterschiedlichen komplexen Signalantworten bei Ligandenbindung (Richter et al. 2012). Während TNF RI sowohl durch die membrangebundene als auch durch die lösliche Form von TNF $\alpha$  aktiviert werden kann, wird TNF RII nur durch membrangebundenes TNF $\alpha$  effektiv aktiviert, obwohl lösliches TNF $\alpha$  auch mit hoher Affinität gebunden werden könnte (Grell et al. 1995). Beide Rezeptoren besitzen unterschiedliche, sich teilweise überlappende Signalwege (Naudé et al. 2011). Bei Aktivierung von TNF RI durch TNF $\alpha$  kommt es zur Rekrutierung von TRADD (TNF-R1-associated death domain protein). Anschließend schließen sich andere Effektorproteine wie FADD/MORT1 (FAS-associated death domain protein), TRAF2 (TNFR-associated factor 2) und RIP (receptor interacting protein) dem Proteinkomplex an und interagieren auch direkt mit TRADD (Boldin et al. 1995; Chinnaiyan et al. 1995; Hsu et al. 1996a; Hsu et al. 1996b; Hsu et al. 1995; Rothe

et al. 1995; Rothe et al. 1994; Stanger et al. 1995). In der Folge wird der NF- $\kappa$ B-Signalweg initiiert und bewirkt eine effiziente Aktivierung von Caspasen was zur Apoptose führen kann (Naudé et al. 2011). Dies ist in Abbildung 4 dargestellt. Im Gegensatz dazu kann TNF RII, dem die Todesdomäne fehlt, durch den klassischen und nicht-klassischen NF- $\kappa$ B-Weg zytoprotektive Funktionen einleiten (Rauert et al. 2010; Naudé et al. 2011). Insgesamt herrscht eine Art „crosstalk“ zwischen den beiden Rezeptoren, die durch unterschiedliche Signalwege eine sensible Balance zwischen Zelltod und Zellerhalt aufrechterhalten (Naudé et al. 2011). Beide Rezeptoren liegen auch in löslicher, zirkulierender Form vor. Diese wird aus der membrangebundenen Form durch Abgabe von Exosomen oder durch alternatives Spleißen von mRNA-Transkripten gebildet, was zum Verlust der transmembranösen und zytoplasmatischen Domänen führt (Levine 2008). Es wurde gezeigt, dass lösliche TNF $\alpha$ -Rezeptoren (sTNF R) gut mit zirkulierendem TNF $\alpha$  korrelieren, der aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit einen weniger zuverlässigen Marker für eine Messung darstellt (Beutler et al. 1985; Bocci 1991). Neben anderen zirkulierenden Apoptosemarkern ist sTNF RI bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt erhöht (Ueland et al. 2005; Valgimigli et al. 2005). Zudem zeigt die Höhe an sTNF RI im Blutplasma eine positive Korrelation mit dem endgültigen Ausmaß der Infarktausdehnung nach STEMI (Nilsson et al. 2013). Auch die Bestimmung eines Ausgangswertes des sTNF RI Spiegels nach akutem Myokardinfarkt kann weitere wichtige prognostische Informationen bei Patienten liefern, die durch fortbestehende Inflammation eventuell eine Herzinsuffizienz entwickeln (Ueland et al. 2005). Zusammenfassend kann sTNF RI also als Prädiktor für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz und für die Gesamtmortalität angesehen werden. (Ueland et al. 2005; Valgimigli et al. 2005). Auch bei stabiler KHK sind erhöhte Konzentrationen an zirkulierendem TNF RI und auch TNF RII mit einem steigenden Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse und Mortalität verbunden (Carlsson et al. 2018).



*TNF RI*  $\triangleq$  Tumor necrosis factor receptor 1; *TRADD*  $\triangleq$  TNF-R1-associated death domain protein; *RIP*  $\triangleq$  receptor interacting protein; *TRAF2*  $\triangleq$  TNFR-associated factor 2; *IKK*  $\triangleq$  I $\kappa$ B kinase; *NF- $\kappa$ B*  $\triangleq$  Nuclear Factor-kappa B

**Abbildung 4:** Signalwege nach Aktivierung von TNF RI  
(Abb. vgl. (Devin et al. 2000))

#### 1.9.4 TRAIL

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand auch Apo 2-Ligand genannt ist ebenfalls ein Mitglied der TNF-Familie. Damit gehört TRAIL zur Subgruppe der death receptor (DR) ligand family. Das Protein findet sich ebenfalls in löslicher Form oder in membrangebundener Form. TRAIL bindet an mindestens fünf Rezeptoren. Zwei davon, DR4 (TRAIL R1) und DR5 (TRAIL R2) sind transmembranöse Rezeptoren mit zyttoplasmatischen Todesdomänen, die das Signal ins Zellinnere überleiten (Abschnitt vgl. (Dimberg et al. 2013)). Bei zwei weiteren Rezeptoren handelt es sich um sogenannte Decoy-Rezeptoren DcR1 (TRAIL R3) und DcR2 (TRAIL R4), die TRAIL zwar binden können, jedoch das Signal nicht weiter leiten, da sie keine funktionelle Todesdomäne besitzen (Kischkel et al. 2000). Zudem bindet TRAIL noch schwach an den fünften Rezeptor Osteoprotegerin, der ebenfalls kein Signal weiterleitet (Dimberg et al. 2013).

TRAIL kann in besonderer Weise in unterschiedlichen Tumorzelllinien Apoptose auslösen und verschont dabei gesunde Zellverbände (MacFarlane 2003). Zudem ist die durch TRAIL ausgelöste Apoptose, im Gegensatz zu der durch konventionelle Verfahren der Tumorthherapie ausgelöste Apoptose, nicht im gleichen Maße

vom Tumorsuppressorprotein p53 abhängig, das in mehr als der Hälfte der Tumoren mutiert ist (Hollstein et al. 1994; Dimberg et al. 2013). Obwohl die Interaktion der Zelle mit TRAIL durch p53-Aktivierung durch Hochregulierung von DR4 verstärkt wird, kann TRAIL sogar Apoptose in Zellen induzieren, in denen p53 deletiert ist (Ashkenazi et al. 1999). Des Weiteren kann über den Rezeptor DcR2 (TRAIL R4) der pro-survival Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B stimuliert werden und somit die Synthese von antiapoptotischen Proteinen (Degli-Esposti et al. 1997). Diese und noch weitere Eigenschaften machen TRAIL zum Gegenstand intensiver Krebsforschung. So wurden bereits rekombinantes humanes TRAIL und Antikörper, die gegen DR4 (TRAIL R1) und DR5 (TRAIL R2) gerichtet sind, klinisch getestet (Miguel et al. 2016).

TRAIL spielt jedoch auch bei kardiovaskulären Erkrankungen eine Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass TRAIL dabei auch prognostischen Wert hat (Osmancik et al. 2013). So wurden niedrige Konzentrationen an löslichem TRAIL als starker unabhängiger Prädiktor für eine schlechte Prognose bei Patienten mit ACS identifiziert (Osmancik et al. 2013). Bei erniedrigten TRAIL-Werten zum Zeitpunkt der Entlassung des Patienten findet sich im Verlauf eine erhöhte Inzidenz von plötzlichem Herztod und Herzinsuffizienz (Secchiero et al. 2009). Auch die Schwere eines akuten ischämischen Schlaganfalls ist eher mit niedrigen Serum-TRAIL-Werten assoziiert (Kang et al. 2015).

### **1.9.5 Fas-Rezeptor und sFasL**

Der transmembranöse Rezeptor Fas/APO-1 (FasR) gehört ebenfalls zur TNF-Familie und ist zusammen mit seinem Bindungspartner FasL eine wichtige Schaltstelle für den programmierten Zelltod und führt bei Aktivierung durch membranständigen Fas ligand (FasL) oder soluble Fas ligand (sFasL) zur Apoptose (Suda et al. 1993). Das Zytokin FasL zeigt zu 25-30% homologe Sequenzen mit anderen Proteinen der TNF-Familie wie z.B. TNF $\alpha$  und TRAIL, wobei hierbei die größte Ähnlichkeit an der C-terminalen extrazellulären Ektodomäne für die Rezeptorbindung besteht (Locksley et al. 2001). Die lösliche Form von FasL entsteht über proteolytische Prozessierung durch Metalloproteinasen

(Schneider et al. 1998). Auch FasR besitzt eine lösliche Variante und kann so membrangebundenen FasL neutralisieren und Apoptose inhibieren (Cheng et al. 1994). FasR wird in den meisten Zellen des Körpers exprimiert, einschließlich der Kardiomyozyten, wohingegen FasL hauptsächlich in Immunzellen wie Makrophagen exprimiert wird, die sich auch in instabilen atherosklerotischen Plaques ansammeln (Shimizu et al. 2002).

Zusätzlich konnte zudem eine Expression von FasL auf endothelialen Zellen festgestellt werden. Bei Messungen der Intima-Media-Dicke bei Patienten mit Hypertonie ergab sich eine positive Korrelation mit dem Alter, high-density lipoprotein-cholesterol, dem systolischen Blutdruck und sFasL. Dies zeigt, dass sFasL auch bei der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt ist (Abschnitt vgl. (Okura et al. 2002)).

Bei der Pathogenese des akuten Myokardinfarkts und der instabilen Angina pectoris ist das FasR/FasL System folglich ebenso mitbeteiligt. So sind die Plasmaspiegel von sFasL bei einer Studie von Shimizu et al. bei Aufnahme von Patienten mit akutem Myokardinfarkt und instabiler Angina pectoris im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen signifikant erhöht. Nach drei Stunden konnte ein Abnehmen des Spiegels gemessen werden. Bei Patienten mit akutem Infarkt erhöhten sich die sFasL Werte nach erfolgter PCI jedoch erneut (Abschnitt vgl. (Shimizu et al. 2002)). Auch bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit zeigt sich eine Assoziation von sFasL mit dem Ausmaß der angiographisch darstellbaren Obstruktion der Koronararterien. Eine Bestimmung von sFasL im Blutserum könnte demnach als Surrogatparameter für die schwere KHK dienen (Sahinarslan et al. 2012).

## 2 Hintergrund und Zielsetzung dieser Arbeit

Da die Größe des nekrotischem Herzgewebes nach einem akuten Myokardinfarkt unter anderem auch vom Ausmaß der Apoptoseprozesse abhängt, stellt sich die Frage inwieweit Apoptosemarker auch einen prognostischen Wert für die Herzfunktion besitzen (Osmancik et al. 2013). So wurden für Patienten mit ACS bereits gut etablierte Marker etabliert, die prognostischen Wert haben wie das brain natriuretic peptide (BNP) oder das kardiale Troponin (Guidez et al. 2012; Mueller et al. 2012). Die Marker Fas in seiner löslichen Form und TRAIL wurden in einem Kollektiv von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz und bei älteren Patienten mit kardiovaskulärer Erkrankung in diesem Zusammenhang ebenfalls bereits untersucht (Niessner et al. 2009; Volpato et al. 2011). Dabei waren in diesem Kollektiv niedrige Konzentrationen an löslichem TRAIL mit einer eher schlechteren Prognose assoziiert.

Bei ACS Patienten konnte ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Expression des Markers CXCR7 auf Thrombozyten und einer Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion gezeigt werden (Chatterjee et al. 2015; Rath et al. 2014).

Das Ziel dieser Arbeit ist es nun die Korrelation der Serumapoptosemarker mit thrombozytären Apoptosemarkern und deren Einfluss auf die myokardiale Regeneration in einem Patientenkollektiv mit der Diagnose eines akuten ST-Hebungsinfarktes zu evaluieren. Dabei werden folgende Punkte untersucht:

1. Evaluation der Serumapoptosemarker an einem Kollektiv von STEMI-Patienten
2. Untersuchung der Korrelation zwischen Serumapoptosemarkern und thrombozytären Apoptosemarkern
3. Einfluss der Serumapoptosemarker auf Infarktgröße und auf die linksventrikuläre Ejektionsfraktion im Verlauf von sechs Monaten
4. Einfluss der Serumapoptosemarker auf die Erholung der Myokardfunktion nach akutem Myokardinfarkt

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Patientencharakteristika und Blutentnahme

In der kardiologischen Abteilung der Medizinischen Klinik Tübingen wurde 89 Patienten 24 bis 48 Stunden nach dem akuten Ereignis eines ST-Hebungs-Myokardinfarktes (STEMI) eine Blutprobe für diese prospektive Kohortenstudie entnommen. Dabei galt mindestens ein Troponinwert oberhalb der 99. Perzentile als Beweis für eine Myokardverletzung mit anschließender Nekrose, wenn dies mit der entsprechenden infarkttypischen Klinik einherging (Thygesen et al. 2012). Bei ST-Streckenhebungen in zwei benachbarten EKG Ableitungen wurde ein STEMI diagnostiziert (Ibanez et al. 2018). Die Blutproben wurden sofort auf die thrombozytären Oberflächenmarker CXCR7 und CXCR4 hin untersucht. Zudem wurde per Durchflusszytometrie die mittlere Fluoreszenzintensität nach TMRE und Annexin V Färbung gemessen. Anschließend wurde das Serum dieser Blutproben für die Messung der Apoptosemarker Fas-Rezeptor, sFasL, TNF $\alpha$ , TNF RI, TNF RII und TRAIL zurückgelegt. Nachfolgende Analysen der Serumapoptosemarker wurden für 38 Patienten durchgeführt, von denen auch sequenzielle Daten der Magnetresonanztomographie (MRT) verfügbar waren. Hierbei wurde die linksventrikuläre Funktion der Patienten mittels MRT ermittelt. Es wurde einmal zu Beginn des Krankenhausaufenthaltes und noch einmal im Verlauf sechs Monate nach dem STEMI-Ereignis eine MRT durchgeführt, um eine etwaige Verbesserung oder Verschlechterung der Herzfunktion feststellen zu können.

Alle Patienten willigten schriftlich ein. Die Ethikkommission der Universität Tübingen genehmigte diese Studie (462/2018BO2). Diese Arbeit ist im Einklang mit den Regelungen der guten klinischen Praxis sowie der Deklaration von Helsinki (World Medical Association declaration of Helsinki, ICH harmonized tripartite guideline, Directive 2001/20/EC of the European Parliament and of the Council).

Basischarakteristika der Patienten finden sich in Tabelle 1. Bei 22 der 38 Probanden konnte keine vorherige medikamentöse Therapie eruiert werden.

Patientencharakteristika		
Anzahl	38	
Männer	32 (84,2%)	
Frauen	6 (15,8%)	
Alter (Mittelwert $\pm$ SD)	60 (60,3 $\pm$ 12,3)	
Kardiovaskuläre Risikofaktoren (n = 38)		
	Ja	Nein
Bluthochdruck	25 (65,8%)	13 (34,2%)
Hyperlipidämie	12 (31,6%)	26 (68,4%)
Diabetes mellitus	8 (21,1%)	30 (78,9%)
Nikotinabusus	16 (42,1%)	20 (52,6%) Ex: 2 (5,3%)
Positive Familienanamnese	9 (23,7%)	29 (76,3%)
Medikation bei Aufnahme (n = 16)		
	Ja	Nein
Acetylsalicylsäure	5 (31,25%)	11 (68,75%)
Clopidogrel	2 (12,5%)	14 (87,5%)
Ticagrelor	0 (0%)	16 (100%)
Prasugrel	1 (6,3%)	15 (93,8%)
Orale Antikoagulation	0 (0%)	16 (100%)
ACE Hemmer	4 (25,0%)	12 (75,0%)
Angiotensin II Rezeptor Blocker	2 (12,5%)	14 (87,5%)
Kalzium Kanal Blocker	4 (25,0%)	12 (75,0%)
Beta Blocker	8 (50,0%)	8 (50,0%)
Diuretikum (Thiazid, Schleifendiuretikum)	4 (25,0%)	12 (75,0%)
Kaliumsparendes Diuretikum	1 (6,3%)	15 (93,8%)
Statin	7 (43,8%)	9 (56,3%)

*n*: Anzahl der Probanden; *SD*: Standardabweichung

**Tabelle 1:** Basischarakteristika

### 3.2 Herstellung von thrombozytenreichem Plasma

Nach der Blutentnahme mit einer S-Monovette mit 7,5 ml Z-Gel wurde das gewonnene Blut direkt in ein für die Zentrifugation geeignetes Cellstar- Rörchen gegeben. Anschließend wurde die Probe für eine Dauer von 20 Minuten mit 1000 Umdrehungen pro Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert, um die festen von den flüssigen Blutbestandteilen zu trennen. Das so entstandene, überstehende Blutplasma ist ein thrombozytenreiches Plasma (PRP) welches in ein weiteres Cellstar-Rörchen abpipettiert wurde. Um Verunreinigungen des PRP zu vermeiden wurden dabei 2 ml der unteren Phase des PRP im vorherigen Rörchen belassen und nicht mittransferiert. Zur Bestimmung der Thrombozytenzahl wurden



10 µl des PRP mit 90 µl phosphatgepufferter Salzlösung mit Calcium (PBS-Ca<sup>2+</sup>) verdünnt, in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben und dann mit einem automatischen Hämatologie-Analysegerät gemessen. So wurde das PRP Volumen berechnet, welches ca. 10<sup>6</sup> Thrombozyten enthält. Diese Menge wurde jeweils in vier Röhrchen gefüllt. Anschließend wurde das so hergestellte PRP unter Hinzugabe der anderen Teststoffe inkubiert.

### **3.3 Induktion und Detektion der thrombozytären Apoptose**

Um die Thrombozytenapoptose zu bestimmen wurden die Proben in zwei Gruppen aufgeteilt. Die eine wurde mit Thrombin inkubiert, wohingegen die andere Gruppe so belassen wurde. Das verwendete Thrombin war lyophilisiert und musste vor Hinzugabe mit 2000 µl PBS- Ca<sup>2+</sup> verdünnt werden. 5 µl dieser Thrombinlösung wurde zu zwei der vier Proben hinzugegeben. Damit jedes Röhrchen ein Volumen von 50 µl enthält, wurde je nach vorher bestimmtem Volumen von PRP noch PBS-Ca<sup>2+</sup> und dementsprechend auch nachfolgende Agentien hinzugegeben. So konnte die gleiche Konzentration an Thrombozyten in jeder Probe sichergestellt werden. Alle vier Proben wurden anschließend in Dunkelheit 60 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Hinzugabe von 5 µl Tetramethylrhodaminethylester (TMRE) in eine der mit Thrombin aktivierten Proben und in eine der unbehandelten. Das verwendete TMRE wurde in hochkonzentrierter Form vom Hersteller geliefert. Es erfolgte zunächst eine Verdünnung von 10 µl TMRE durch 990 µl PBS- Ca<sup>2+</sup>. Zeitgleich wurden 4 µl von Annexin V zu den verbliebenen zwei Proben hinzugegeben. Alle Proben wurden danach für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert und nochmals je 400 µl PBS- Ca<sup>2+</sup> hinzugegeben. Daraufhin erfolgte die Messung mittels fluorescence-activated cell sorting (FACS).

### **3.4 Messung der Chemokine CXCR4 und CXCR7**

Zur Vorbereitung der Messung wurden 5g Paraformaldehyd mit 400 ml PBS verdünnt, um so unter Hinzugabe von 40 ml Natriumhydroxid eine 1%ige

Paraformaldehydlösung herzustellen. Bei 65°C entstand dann unter Rühren eine klare Flüssigkeit. Um den pH auf 1,4 zu senken wurde nach Abkühlen der Flüssigkeit entsprechend Salzsäure hinzugegeben und alles durch 0,2 µm Membranfilter filtriert. Diese Schritte wurden unter einer Abzugshaube in dunkler Umgebung durchgeführt.

Um die Expression der Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 auf den Thrombozyten zu bestimmen wurde allen Patienten in einer CPDA-S-Monovette Vollblut abgenommen. Davon wurden 20 µl entnommen, mit 980 µl PBS verdünnt und in ein Cellstar-Röhrchen gefüllt. Je 35 µl dieser Lösung und zusätzliche 5 µl PBS zur weiteren Verdünnung wurden in zwei Falcon Röhrchen gefüllt. Anschließend erfolgte die Hinzugabe von 5 µl des thrombozytenspezifischen Markers Cluster of Differentiation 42b (CD42b) und von 5 µl CXCR4 in das erste Röhrchen sowie analog von 5 µl CD42b und 5 µl CXCR7 in das zweite Röhrchen. Die Lösungen der Röhrchen wurde anschließend per Vortex gemischt und 30 Minuten im Dunklen inkubiert.

Von der oben beschriebenen bereits vorbereiteten 1%igen Paraformaldehydlösung wurde nach 30 Minuten jeweils 300 µl in die zwei Röhrchen zu der Lösung hinzugegeben um die Inkubation zu beenden. Es folgte die Messung von CXCR4 und CXCR7 mittels FACS.

### **3.5 FACS Analyse**

Das verwendete FACS Calibur™ Flow Cytometer 342975 Gerät von Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg, Germany umfasst zwei Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen. Der blaue Argonlaser hat eine Wellenlänge von  $\lambda = 488$  nm und der rote Laser  $\lambda = 633$  nm. Das Gerät besitzt zudem Streulichtdetektoren, der sogenannte forward scatter misst das Streulicht, das in derselben Ebene des Lasers liegt (Vorwärtsstreulicht) und der side scatter, misst das Streulicht, das im 90° Winkel von der Zelle abgelenkt wird (Seitwärtsstreulicht). Das Vorwärtsstreulicht stellt das relative Volumen der Zelle dar, während das Seitwärtsstreulicht die Zellkomplexität, wie beispielsweise Granulierung widerspiegelt. Das emittierte Fluoreszenzlicht der Zelle wird je nach Wellenlänge und Fluoreszenzfarbstoff auf

die Detektoren, auch Photomultiplier genannt, die im 90° Winkel zum eintreffenden Laserlicht stehen verteilt. Dabei wurden folgende Detektoren verwendet, die das entstehende Fluoreszenzsignal quantifizieren können:

FL1:  $\lambda = 530$  nm; Fluorescein (FITC)

FL2:  $\lambda = 585$  nm; R-Phycoerythrin/Propidium Iodide (PE/PI)

FL3:  $\lambda > 670$  nm; Peridinin-Chlorophyll (PerCP)

FL4:  $\lambda = 661$  nm; Allophycocyanin (APC)

### **3.6 Bioplex Messungen der Serumapoptosemarker**

Die Messung der Serumapoptosemarker Fas-Rezeptor, sFasL, TNF $\alpha$ , TNF RI, TNF RII und TRAIL wurde mittels Bio-Plex Pro Assay auf einem Bio-Plex-200-System (BioRad) durchgeführt und quantifiziert. Dieses Prinzip fußt auf den folgenden Elementen.

Das System enthält fluoreszenzgefärbte Mikrokügelchen sog. beads, die jeweils einen anderen Farbcode aufweisen, um die simultane Differenzierung von mehreren unterschiedlichen Molekülen in der gleichen Suspension ermöglichen zu können. An jedem Kügelchen sind kovalent definierte Antikörper gebunden, die gegen bestimmte Zytokine gerichtet sind. In diesem Falle Antikörper, die gegen die entsprechenden Serumapoptosemarker gerichtet sind. Die so gekoppelten beads reagieren mit dem Biomarker in der Probe. Nach einer Reihe von Auswaschschritten mithilfe der Vacuum Manifold Technik, einem Vakuumverteiler, werden ungebundene Proteine entfernt. Danach wird ein biotinylierter Detektionsantikörper zugegeben um eine Art „Sandwich-Formation“ zu erzeugen. Bevor dann endgültig gemessen werden kann, muss ein Streptavidin-Phycoerythrin Konjugat zugegeben werden, dabei bindet Streptavidin an Biotin. Phycoerythrin dient als fluoreszierender Indikator oder Reporter. Das emittierte Fluoreszenzlicht trifft dann auf die dafür vorgesehenen Photomultiplier. Die Konzentration des an die beads gebundenen Serumapoptosemarkers ist dann direkt proportional zur mittleren Fluoreszenz des Fluoreszenzindikators.

So ist der simultane Nachweis von bis zu 100 verschiedenen Molekülen in einer Vertiefung der 96-Mikrotiterplatte möglich. Das System beinhaltet dafür ein spezielles Durchflusszytometer mit zwei Lasern und zugehöriger Optik um die Messung der verschiedenen Moleküle, die an die Oberfläche der beads gebunden sind durchführen zu können. Die so erhobenen Fluoreszenzwerte werden dann von einem Prozessor digital verarbeitet.

### **3.7 Erhebung der LVEF im Verlauf mittels MRT**

Jeder Patient erhielt zum Anfang seines Krankenhausaufenthaltes, also im Schnitt drei Tage nach STEMI eine Bildgebung zur Messung der LVEF mittels MRT. Für die Untersuchung mussten die Patienten in einem stabilen kardiorespiratorischen Zustand sein. Die MRT wurde an einem 1,5 Tesla Scanner (Modell: Magnetom Avanto der Firma Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) durchgeführt. Um die Entwicklung der LVEF nachzuvollziehen erfolgte nach sechs Monaten nochmals eine Kontrolle. Die Darstellung des Myokards wurde unter Verwendung der steady-state-free-precession Sequenz durchgeführt, die eine gute Abgrenzbarkeit der linksventrikulären Wand bietet und so eine präzise Berechnung ihrer Funktion ermöglicht (Grebe et al. 2004). In Expirationsstellung wurden EKG-getriggert Schnittbilder im Kurzachsenschnitt, im transversalen Langachsenschnitt (Zweikammerblick) und im horizontalen Langachsenschnitt (Vierkammerblick) angefertigt. Mit Hilfe der Analyse-Software (cvi42 von Circle Cardiovascular Imaging Inc., Calgary, AB, Canada) erfolgte die manuelle Konturierung des Endokards zur Bestimmung der enddiastolischen und endsystolischen Volumina des linken Ventrikels und damit der LV-Funktion.

### **3.8 Darstellung des myokardialen Ödems und des Infarktareals**

Das myokardiale Ödem wurde mittels MRT in der sogenannten dual-contrast fast spin-echo Technik mit T2 Mapping angefertigt. Dabei wurde die Signalverfallszeit (signal decay time, SDT) von gesunden Kontrollprobanden gemessen und das 97,5 % Quantil als Grenzwert festgesetzt. Werte über oder gleich diesem Quantil

galten dann als pathologisch (Krumm et al. 2016). Die SDT für das myokardiale Ödem wurde im 16 Segmente Modell der American Heart Association (Cerqueira et al. 2002) ausgewertet. Bei Hinweisen für ein Ödem wurde der Anteil der auffälligen Segmente in Prozent an der Gesamtmasse des Myokards angegeben. Die Darstellung des Infarktareals erfolgte durch periphervenöse Injektion von 0,15 mmol/kg KG Gadobutrol (Gadovist, Bayer Healthcare, Leverkusen, Germany) mit Hilfe des late gadolinium enhancement (Krumm et al. 2016), was ebenfalls mit der Analyse-Software ausgewertet wurde.

### **3.9 Statistische Analyse**

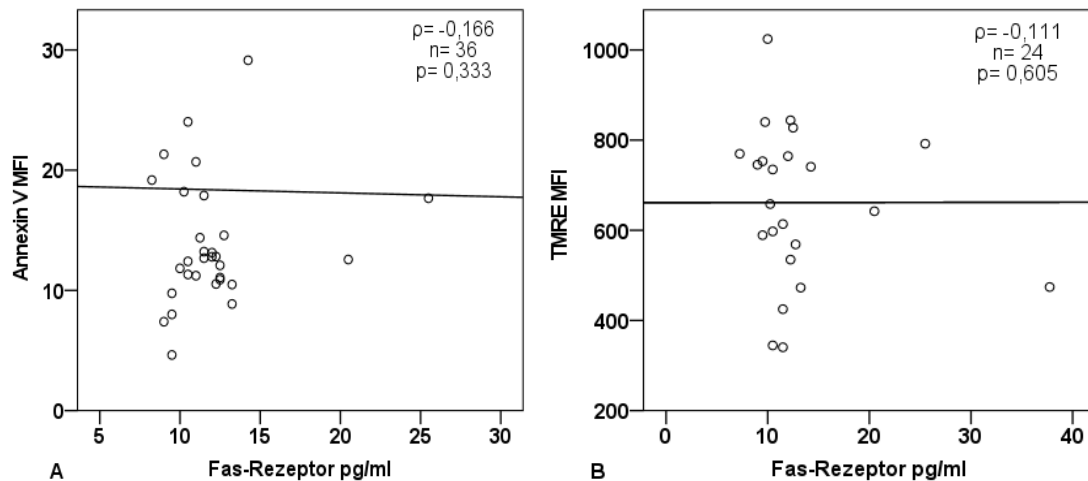
Für die statistische Auswertung wurde das Programm SPSS® Statistics Version 24.0 von IBM® verwendet. Um Korrelationen zwischen Serumapoptosemarkern und thrombozytären Apoptosemarkern zu untersuchen, wurde aufgrund der fehlenden Linearität und der fehlenden Normalverteilung sowie der Stabilität gegenüber Ausreißern, der Spearman Rangkorrelationskoeffizient ( $\rho$ ) bestimmt und eine graphische Darstellung anhand von Streudiagrammen gewählt. Nicht-parametrische Daten, wie beispielsweise der Verlauf der LVEF in Zusammenhang mit den betrachteten Serumapoptosemarkern wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests verglichen und jeweils anhand von Boxplots durch den Median und den Interquartilsabstand mit dem unteren und oberen Quartil visuell dargestellt. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  festgelegt.

## 4 Ergebnisse

Bei 38 Patienten mit der Diagnose eines STEMI wurden sechs Serumapoptosemarker gemessen: Fas-Rezeptor, sFasL, TNF $\alpha$ , TNFRI, TNFRII, TRAIL. Zusätzlich erfolgte sowohl die Messung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der mit TMRE und Annexin V vorbehandelten Thrombozyten, als auch die der mit CXCR7 und CXCR4 Färbung vorbehandelten. Zusätzlich wurde die linksventrikuläre Ejektionsfraktion unmittelbar nach STEMI mittels MRT bestimmt, was als Ausgangswert betrachtet werden kann. Sechs Monate später erfolgte die erneute Bildgebung mittels MRT mit der wiederholten Bestimmung der LVEF als Verlaufswert.

### 4.1 Korrelation des Fas-Rezeptors mit den thrombozytären Apoptosemarkern TMRE und Annexin V

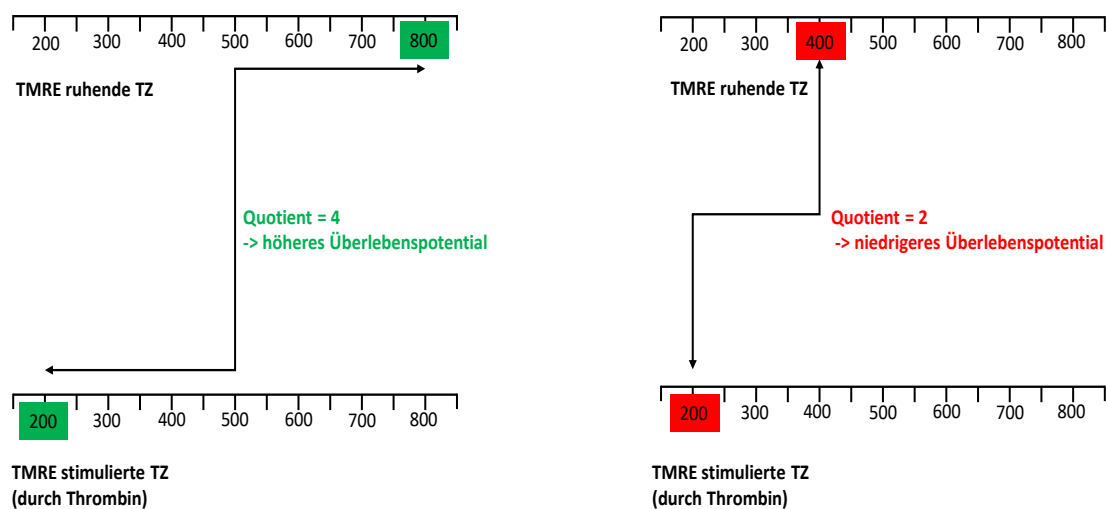
Es ergibt sich keine signifikante Korrelation zwischen Annexin V ( $\rho = 0,333$ ) bzw. TMRE ( $\rho = 0,605$ ) und dem Fas-Rezeptor wie auch Abbildung 5 zu entnehmen ist.



MFI: mittlere Fluoreszenzintensität;  $\rho$ : Spearmans Rangkorrelationskoeffizient; n: Größe der Stichprobe; p: Signifikanzniveau

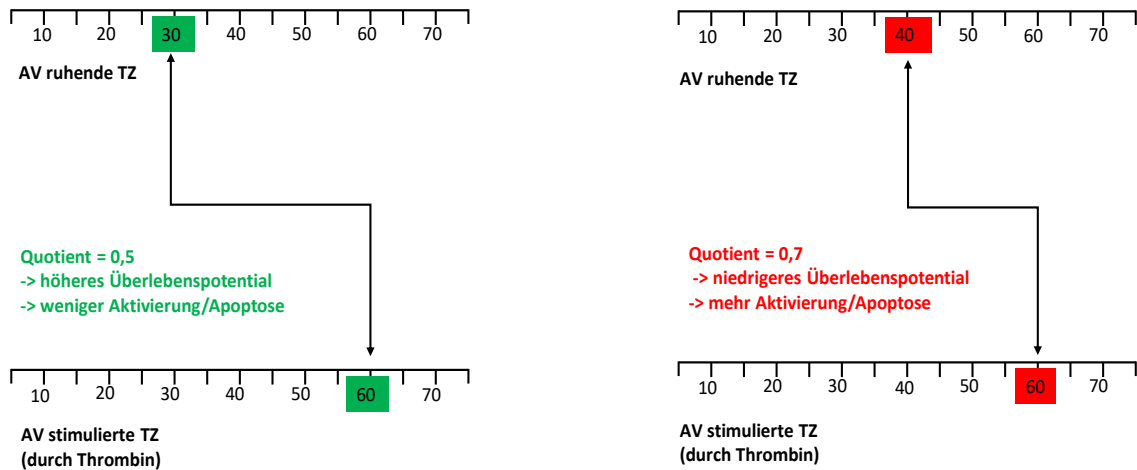
**Abbildung 5:** Korrelation des Fas-Rezeptors in pg/ml mit den thrombozytären Apoptosemarkern  
A: Korrelation mit Annexin V  
B: Korrelation mit TMRE

Die mittlere Fluoreszenzintensität der mit TMRE und Annexin V gefärbten Blutplättchen, wurde einmal unter Ruhebedingungen und einmal unter vollständig aktivierten, durch Thrombin stimulierten Bedingungen gemessen. Unter der hier verwendeten Dosis von Thrombin sollte es bei einer signifikanten Anzahl an Thrombozyten zur Apoptose kommen. Diese zwei Werte wurden dann zueinander ins Verhältnis gesetzt und ergeben das sogenannte relative Überlebenspotential (Messung durch TMRE sowie durch Annexin V). Ein hoher Wert dieses Verhältnisses ergibt bei Messung durch TMRE ein hohes Überlebenspotential, ein niedriger Wert ergibt dementsprechend ein niedriges Überlebenspotential. Genau umgekehrt verhält sich dies bei Messungen mithilfe von Annexin V. Ein hoher Wert signalisiert hier wenig Überlebenspotential und somit mehr apoptotisch zugrunde gegangene Thrombozyten. Das Ausmaß der Apoptose bzw. des Überlebens kann in dieser Form besser abgeleitet werden als bei der Erhebung absoluter Werte für TMRE und Annexin V, die selbst bei gesunden Probanden sehr variabel und individuell unterschiedlich sein können. Zur weiteren Veranschaulichung des eben erklärten Prinzips dienen folgende Abbildungen 6 und 7.



TMRE: Tetramethylrhodaminethylester

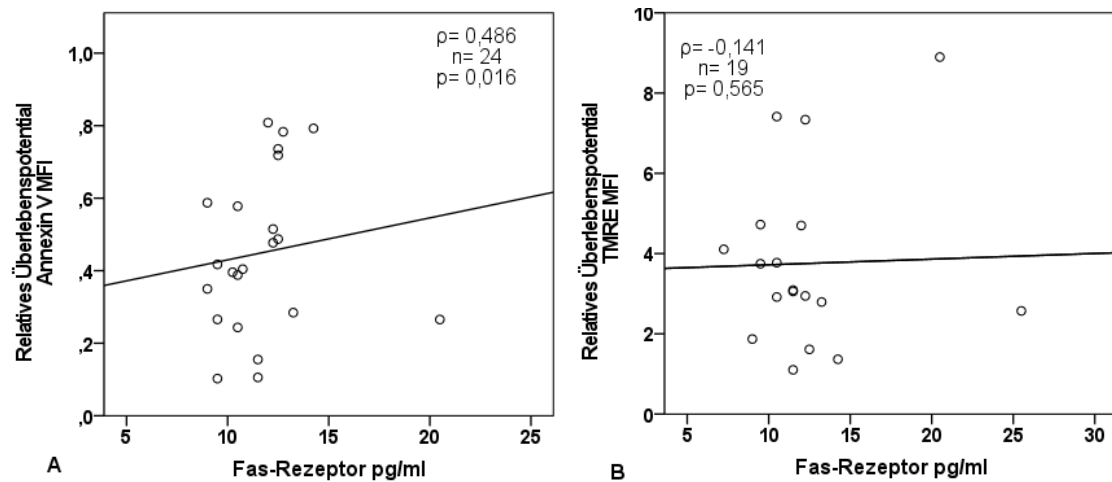
**Abbildung 6:** Prinzip des relativen Überlebenspotentials der TZ: Quotient MFI TMRE ruhende TZ/stimulierte TZ; modifiziert nach (Rath et al. 2018)



AV: Annexin V

**Abbildung 7:** Prinzip des relativen Überlebenspotentials der TZ: Quotient MFI Annexin V ruhende TZ/stimulierte TZ; modifiziert nach (Rath et al. 2018)

Bei der relativen thrombozytären Apoptose der Blutplättchen gemessen durch Annexin V ergibt sich eine signifikante Korrelation zum Serumapoptosemarker Fas-Rezeptor ( $\rho=0,486$ ,  $p=0,016$ ,  $n=24$ ) siehe auch Abbildung 8. Bei der entsprechenden Messung anhand von TMRE ergibt sich keine Korrelation.



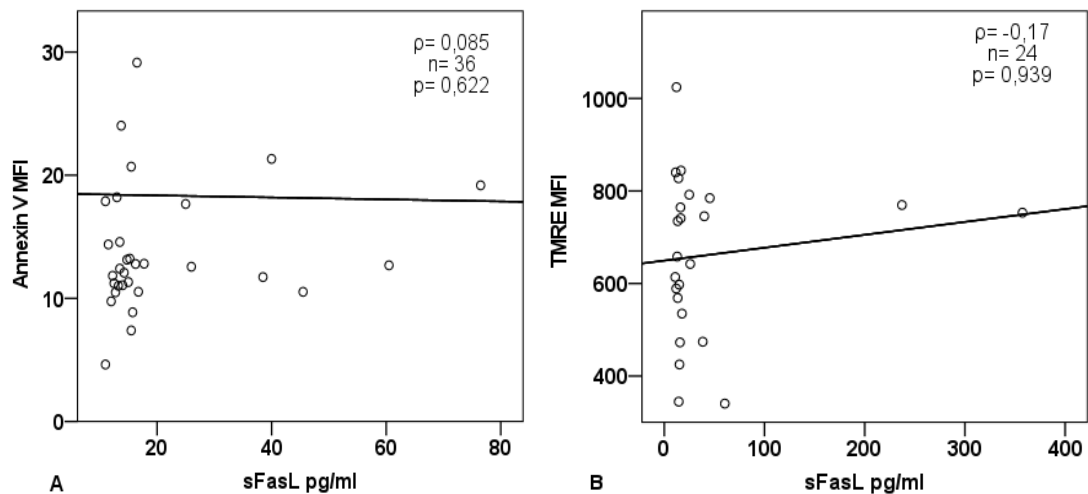
MFI: mittlere Fluoreszenzintensität;  $\rho$ : Spearmans Rangkorrelationskoeffizient;  $n$ : Größe der Stichprobe;  $p$ : Signifikanzniveau

**Abbildung 8:** Korrelation des Fas-Rezeptors mit dem relativen thrombozytären Überlebenspotential  
 A: Relatives Überlebenspotential Annexin V: Quotient MFI Annexin V ruhende TZ/ stimulierte TZ  
 B: Relatives Überlebenspotential TMRE: Quotient MFI TMRE ruhende TZ/ stimulierte TZ



## 4.2 Korrelation von sFasL mit den thrombozytären Apoptosemarkern TMRE und Annexin V

Es ergibt sich keine signifikante Korrelation zwischen mit Annexin V ( $p= 0,622$ ) bzw. TMRE ( $p= 0,939$ ) behandelten Thrombozyten und dem Apoptosemarker sFasL. Abbildung 9 veranschaulicht dies.



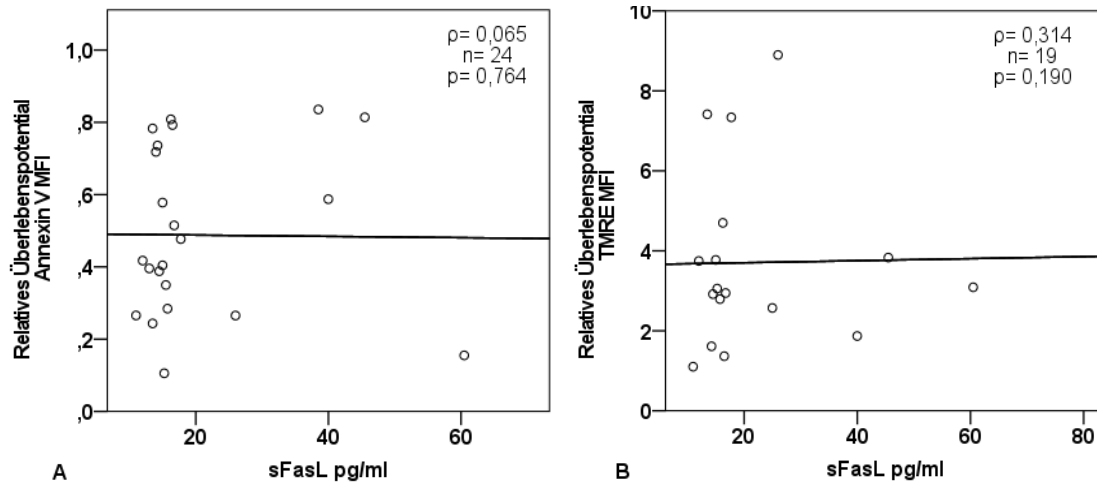
MFI: mittlere Fluoreszenzintensität;  $\rho$ : Spearmans Rangkorrelationskoeffizient;  $n$ : Größe der Stichprobe;  $p$ : Signifikanzniveau

**Abbildung 9:** Korrelation von sFasL mit den thrombozytären Apoptosemarkern

A: Korrelation mit Annexin V

B: Korrelation mit TMRE

Auch eine Korrelation von sFasL mit dem relativen Überlebenspotential der Thrombozyten zeigt keinen signifikanten Zusammenhang was auch Abbildung 10 zu entnehmen ist.



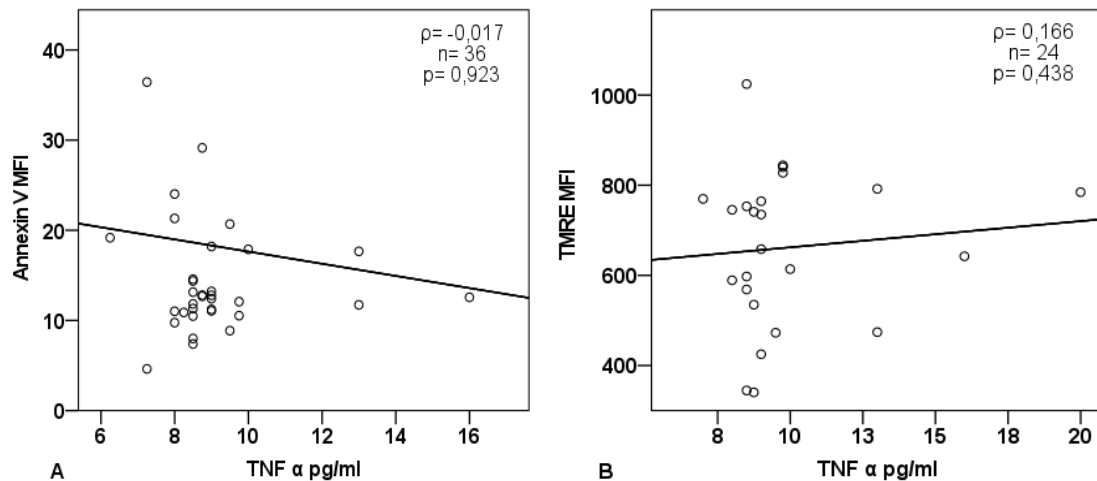
MFI: mittlere Fluoreszenzintensität;  $\rho$ : Spearmans Rangkorrelationskoeffizient; n: Größe der Stichprobe; p: Signifikanzniveau

**Abbildung 10:** Korrelation von sFasL mit dem relativen thrombozytären Überlebenspotential

A: Relatives Überlebenspotential Annexin V: Quotient MFI Annexin V ruhende TZ/ stimulierte TZ

B: Relatives Überlebenspotential TMRE: Quotient MFI TMRE ruhende TZ/ stimulierte TZ

### 4.3 Korrelation von TNF $\alpha$ mit den thrombozytären Apoptosemarkern TMRE und Annexin V



MFI: mittlere Fluoreszenzintensität;  $\rho$ : Spearmans Rangkorrelationskoeffizient; n: Größe der Stichprobe; p: Signifikanzniveau

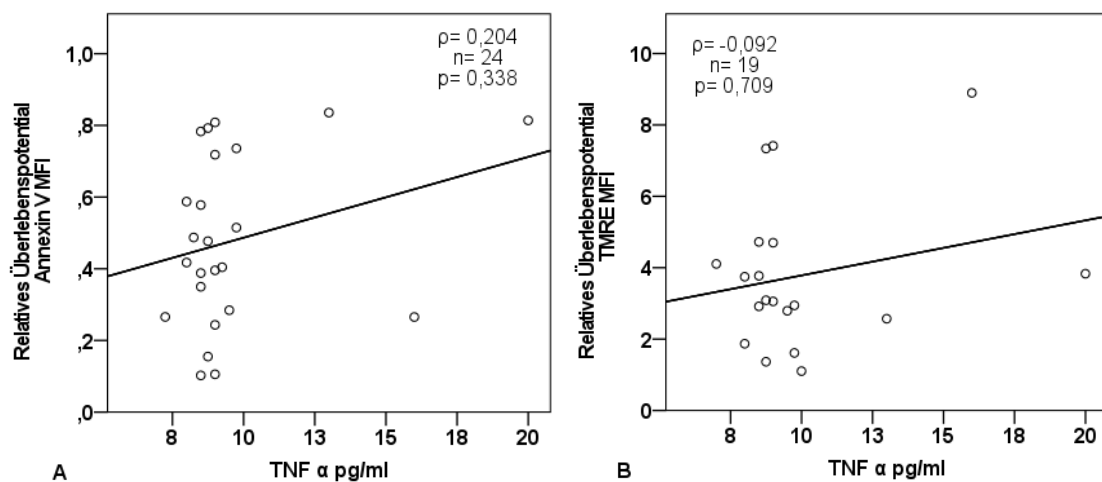
**Abbildung 11:** Korrelation von TNF  $\alpha$  mit den thrombozytären Apoptosemarkern

A: Korrelation mit Annexin V

B: Korrelation mit TMRE

Es zeigt sich keine signifikante Korrelation zwischen Annexin V ( $p=0,923$ ) bzw. TMRE ( $p=0,438$ ) und dem Serumapoptosemarker TNF  $\alpha$  siehe auch obige Abbildung 11.

Auch die Korrelation von TNF  $\alpha$  mit den thrombozytären Apoptosemarkern, gemessen durch Annexin V ( $p=0,338$ ) und TMRE ( $p=0,709$ ) und deren Aussagekraft für die thrombozytäre Apoptose, ergibt keine Signifikanz in der beobachteten STEMI-Kohorte, wie auch in Abbildung 12 graphisch dargestellt.



MFI: mittlere Fluoreszenzintensität;  $\rho$ : Spearmans Rangkorrelationskoeffizient;  $n$ : Größe der Stichprobe;  $p$ : Signifikanzniveau

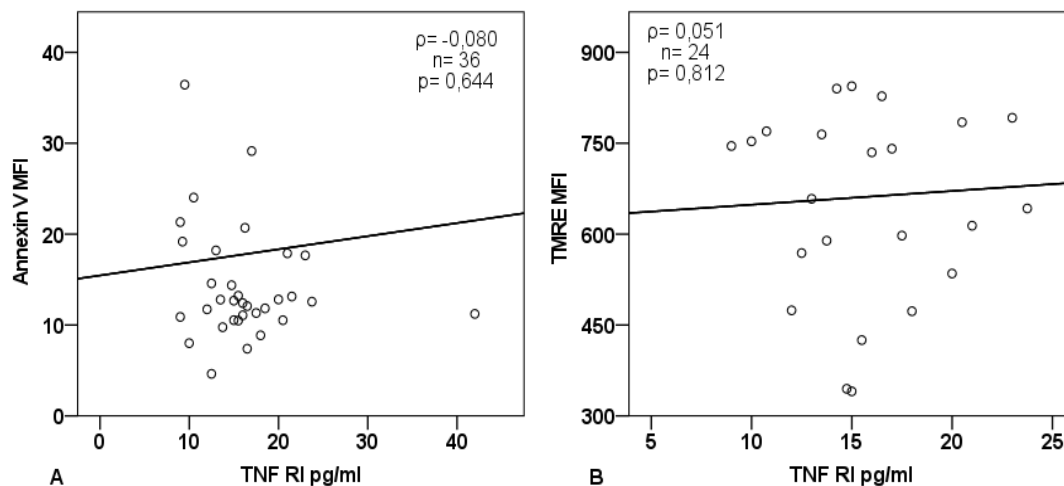
**Abbildung 12:** Korrelation von TNF  $\alpha$  mit dem relativen thrombozytären Überlebenspotential

A: Relatives Überlebenspotential Annexin V: Quotient MFI Annexin V ruhende TZ/ stimulierte TZ

B: Relatives Überlebenspotential TMRE: Quotient MFI TMRE ruhende TZ/ stimulierte TZ

#### 4.4 Korrelation von TNF RI mit den thrombozytären Apoptosemarkern TMRE und Annexin V

Auch beim nächsten Serumapoptosemarker, dem TNF Rezeptor I, ergibt sich nach Prüfung durch Spearman keine Korrelation zu den thrombozytären Apoptosemarkern Annexin V ( $p=0,644$ ) und TMRE ( $p=0,812$ ) und auch keine Signifikanz. Dies zeigt auch Abbildung 13.



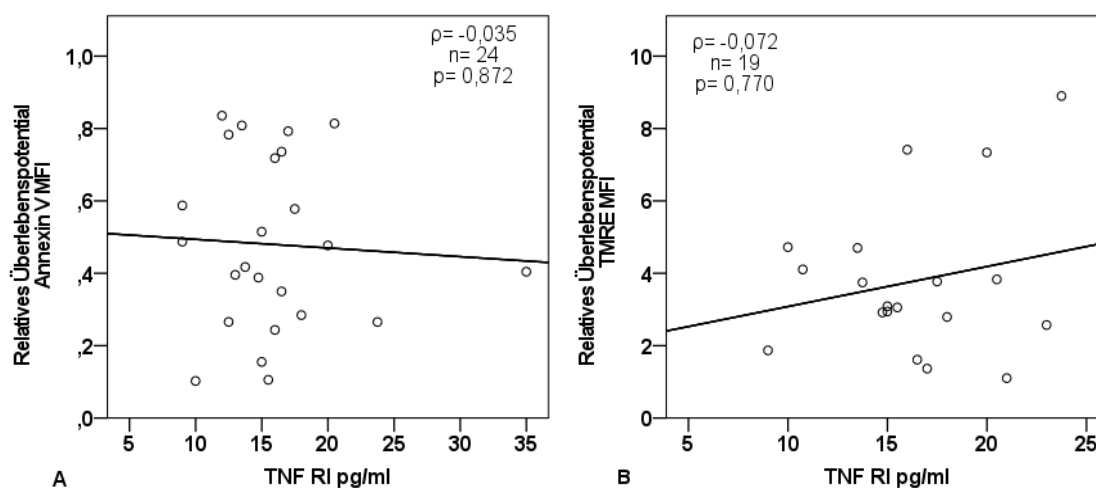
MFI: mittlere Fluoreszenzintensität;  $\rho$ : Spearmans Rangkorrelationskoeffizient;  $n$ : Größe der Stichprobe;  $p$ : Signifikanzniveau

**Abbildung 13:** Korrelation von TNF RI mit den thrombozytären Apoptosemarkern

A: Korrelation mit Annexin V

B: Korrelation mit TMRE

Auch die Prüfung des Ausmaßes des thrombozytären Überlebens durch Annexin V und TMRE, ergibt für TNF RI keine Korrelation und Signifikanz. Dies bestätigen auch folgende Streudiagramme der Abbildung 14.



MFI: mittlere Fluoreszenzintensität;  $\rho$ : Spearmans Rangkorrelationskoeffizient;  $n$ : Größe der Stichprobe;  $p$ : Signifikanzniveau

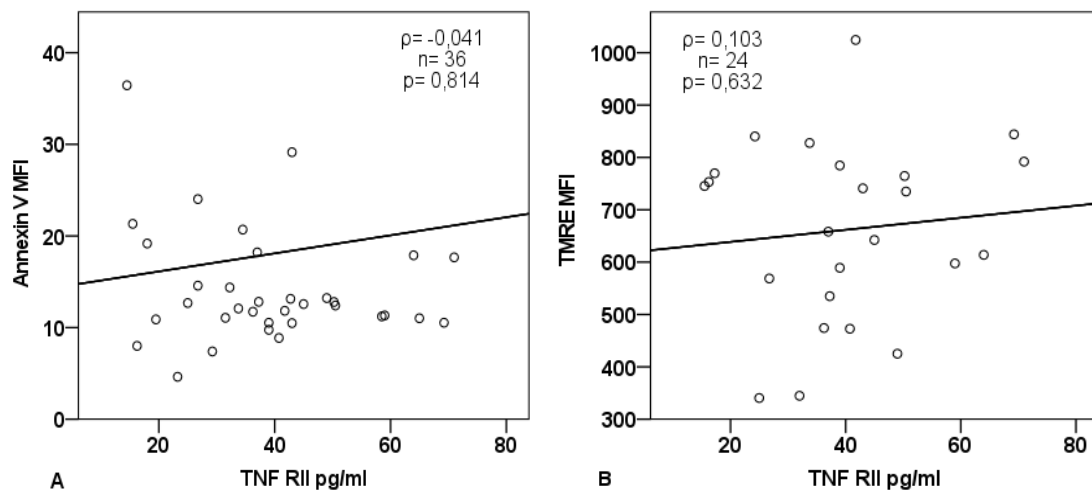
**Abbildung 14:** Korrelation von TNF RI mit dem relativen thrombozytären Überlebenspotential

A: Relatives Überlebenspotential Annexin V: Quotient MFI Annexin V ruhende TZ/ stimulierte TZ

B: Relatives Überlebenspotential TMRE: Quotient MFI TMRE ruhende TZ/ stimulierte TZ

## 4.5 Korrelation von TNF RII mit den thrombozytären Apoptosemarkern TMRE und Annexin V

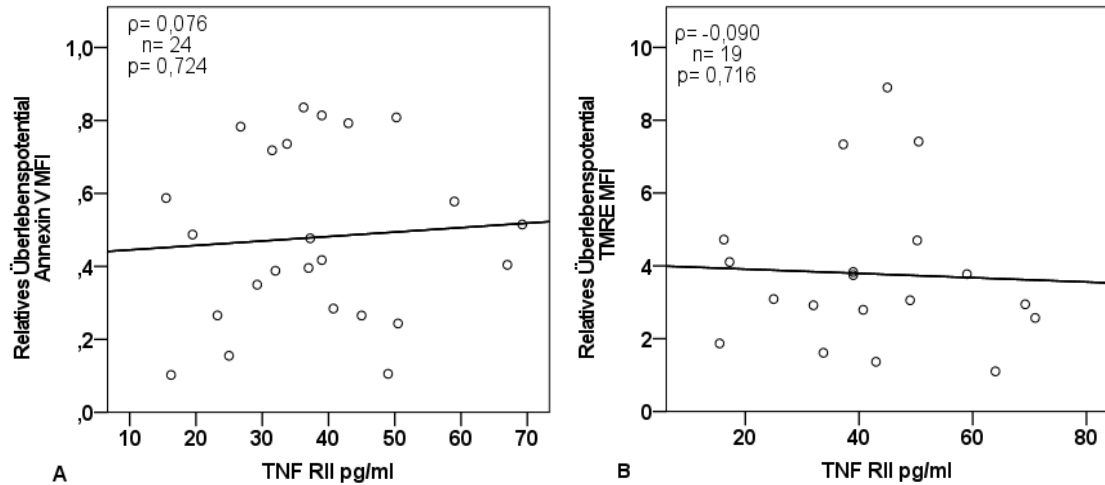
Wie auch folgender Abbildung 15 zu entnehmen ist, zeigt sich keine signifikante Korrelation zwischen Annexin V ( $p=0,814$ ) bzw. TMRE ( $p=0,632$ ) und dem TNF Rezeptor II.



MFI: mittlere Fluoreszenzintensität;  $\rho$ : Spearmans Rangkorrelationskoeffizient;  $n$ : Größe der Stichprobe;  $p$ : Signifikanzniveau

**Abbildung 15:** Korrelation von TNF RII mit den thrombozytären Apoptosemarkern  
A: Korrelation mit Annexin V  
B: Korrelation mit TMRE

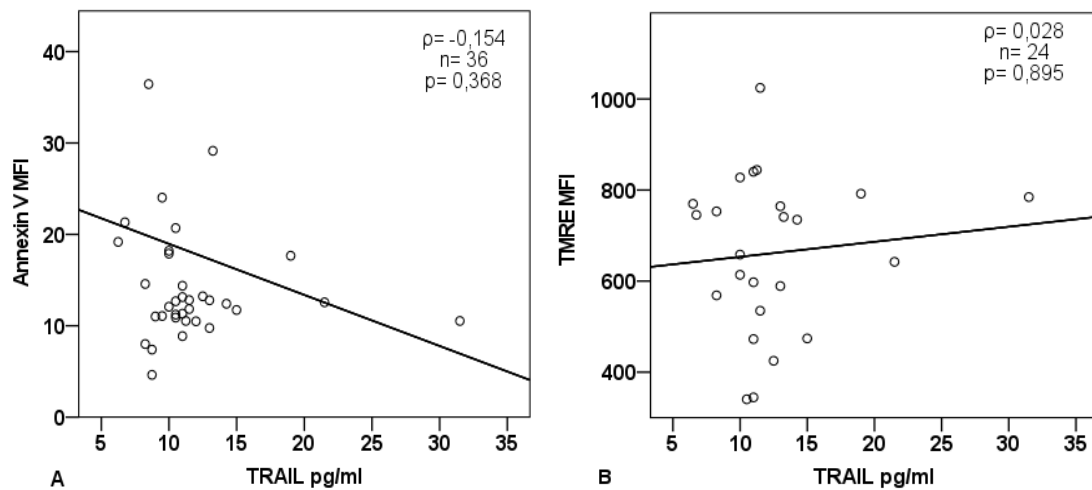
Auch die Korrelation von TNF Rezeptor II mit der relativen thrombozytären Apoptose und Überlebenspotential, gemessen durch Annexin V ( $p=0,724$ ) und TMRE ( $p=0,716$ ), ergibt keine Signifikanz bei den hier untersuchten STEMI Patienten, siehe auch Abbildung 16.



MFI: mittlere Fluoreszenzintensität;  $\rho$ : Spearmans Rangkorrelationskoeffizient; n: Größe der Stichprobe; p: Signifikanzniveau

**Abbildung 16:** Korrelation von TNF RII mit dem relativen thrombozytären Überlebenspotential  
 A: Relatives Überlebenspotential Annexin V: Quotient MFI Annexin V ruhende TZ/ stimulierte TZ  
 B: Relatives Überlebenspotential TMRE: Quotient MFI TMRE ruhende TZ/ stimulierte TZ

#### 4.6 Korrelation von TRAIL mit den thrombozytären Apoptosemarkern TMRE und Annexin V

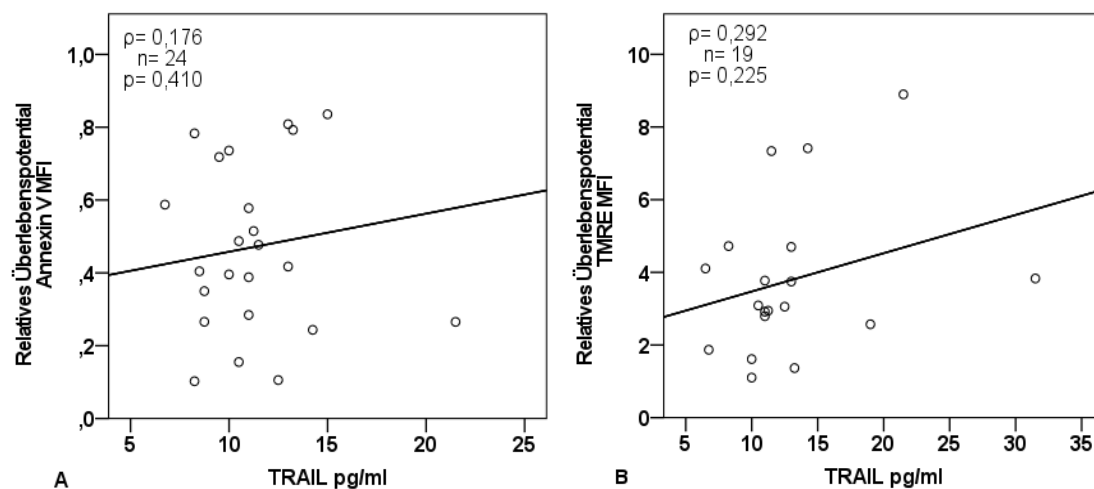


MFI: mittlere Fluoreszenzintensität;  $\rho$ : Spearmans Rangkorrelationskoeffizient; n: Größe der Stichprobe; p: Signifikanzniveau

**Abbildung 17:** Korrelation von TRAIL mit den thrombozytären Apoptosemarkern  
 A: Korrelation mit Annexin V  
 B: Korrelation mit TMRE

Es ergibt sich keine signifikante Korrelation zwischen Annexin V ( $p=0,368$ ) bzw. TMRE ( $p=0,895$ ) und dem Apoptosemarker TRAIL. Dies zeigt auch obige Abbildung 17.

Der Serumapoptosemarker TRAIL korreliert ebenfalls nicht mit dem relativen thrombozytären Überlebenspotential, gemessen anhand der Marker Annexin V ( $p=0,410$ ) und TMRE ( $p=0,225$ ), siehe auch Abbildung 18.



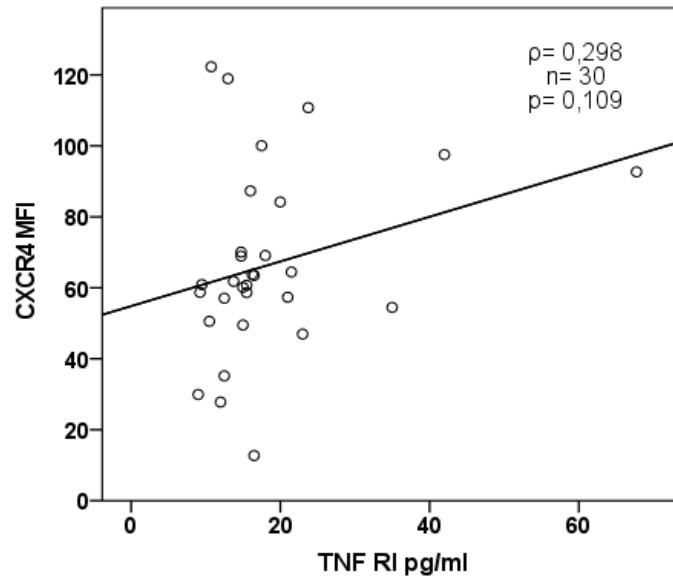
MFI: mittlere Fluoreszenzintensität;  $\rho$ : Spearmans Rangkorrelationskoeffizient;  $n$ : Größe der Stichprobe;  $p$ : Signifikanzniveau

**Abbildung 18:** Korrelation von TRAIL mit dem relativen thrombozytären Überlebenspotential  
A: Relatives Überlebenspotential Annexin V: Quotient MFI Annexin V ruhende TZ/ stimulierte TZ  
B: Relatives Überlebenspotential TMRE: Quotient MFI TMRE ruhende TZ/ stimulierte TZ

#### 4.7 Korrelation der Serumapoptosemarker mit den thrombozytären Rezeptoren CXCR4 und CXCR7

Die statistische Auswertung eines etwaigen Zusammenhangs zwischen den sechs Serumapoptosemarkern und der thrombozytären Expression der SDF-1 Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 ergibt keine Korrelation und auch keine Signifikanz in der hier untersuchten Kohorte an STEMI-Patienten. CXCR4 und CXCR7 wurden hierbei 24 Stunden nach STEMI gemessen. Es ergab sich keinerlei signifikante Korrelation der gemessenen Parameter. Dies ist auch folgender

graphischer Darstellung am Beispiel eines Streudiagramms des Serumapoptosemarkers TNF RI und des Rezeptorproteins CXCR4 zu entnehmen.



MFI: mittlere Fluoreszenzintensität;  $\rho$ : Spearmans Rangkorrelationskoeffizient; n: Größe der Stichprobe; p: Signifikanzniveau

**Abbildung 19:** Korrelation TNF RI mit CXCR4

Die vollständigen Korrelationen zwischen allen sechs Serumapoptosemarkern und den thrombozytären Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 sind Tabelle 2 zu entnehmen:

	FasR	sFasL	TNF $\alpha$	TNF RI	TNF RII	TRAIL
<b>CXCR4</b>	$\rho=-0,117$	$\rho=-0,122$	$\rho=-0,024$	$\rho=0,298$	$\rho=0,140$	$\rho=0,102$
	$\rho=0,537$	$\rho=0,521$	$\rho=0,901$	$\rho=0,109$	$\rho=0,461$	$\rho=0,593$
	n=30	n=30	n=30	n=30	n=30	n=30
<b>CXCR7</b>	$\rho=-0,042$	$\rho=0,112$	$\rho=0,152$	$\rho=0,286$	$\rho=0,207$	$\rho=0,142$
	$\rho=0,822$	$\rho=0,548$	$\rho=0,414$	$\rho=0,119$	$\rho=0,264$	$\rho=0,445$
	n=31	n=31	n=31	n=31	n=31	n=31

$\rho$ : Spearmans Rangkorrelationskoeffizient; n: Größe der Stichprobe; p: Signifikanzniveau

**Tabelle 2:** Korrelationen der Serumapoptosemarker und der Rezeptoren CXCR4/CXCR7



## 4.8 Evaluation der Serumapoptosemarker in Bezug auf die myokardiale LV-Funktion, myokardiales Ödem und den Infarktgrößenverlauf

Zur statistischen Auswertung wurde zunächst jeweils der Median jedes Serumapoptosemarkers gebildet. Diese sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Serumapoptosemarker	FasR	sFasL	TNF $\alpha$	TNFR I	TNFR II	TRAIL
Median (pg/ml)	11,5	15,0	8,75	15,5	37,0	10,5

*Tabelle 3: Mediane der jeweiligen Serumapoptosemarker*

Anschließend wurde jeder Serumapoptosemarker mit der LV-Funktion zu Beginn des Krankenhausaufenthalts und der LV-Funktion nach sechs Monaten verglichen. Die kardiale Ödembildung als Parameter für die Größe des myocardium at risk (durch den Infarkt gefährdetes Myokard) sowie der Verlauf der Infarktgröße mittels late gadolinium enhancement wurden anschließend ebenfalls in Relation zu den Serumapoptosemarkern gebracht. Es erfolgte zudem die Bestimmung des Myocardial Salvage, was sich aus vorher genannten Werten als Ausdruck des Anteils an gerettetem Myokard berechnen lässt (Deutsche Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und Kreislaufforschung e.V. 2013). Diese Messungen erfolgten mittels MRT. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde anhand des Mann-Whitney-U-Tests überprüft. Für  $n > 30$  gilt hierbei die asymptotische Signifikanz, für  $n < 30$  die exakte Signifikanz.

### 4.8.1 Vergleich der Serumapoptosemarker mit der baseline LVEF zu Beginn der Hospitalisation

In direktem zeitlichem Zusammenhang zum STEMI, im Mittel drei Tage nach dem Herzinfarkt, wurde mittels MRT bei allen Patienten ein Ausgangswert der linksventrikulären Ejektionsfraktion (baseline LVEF) in Prozent bestimmt. Die entsprechenden 25%/50%/75% Perzentilen dieser Werte wurden mit zwei Gruppen

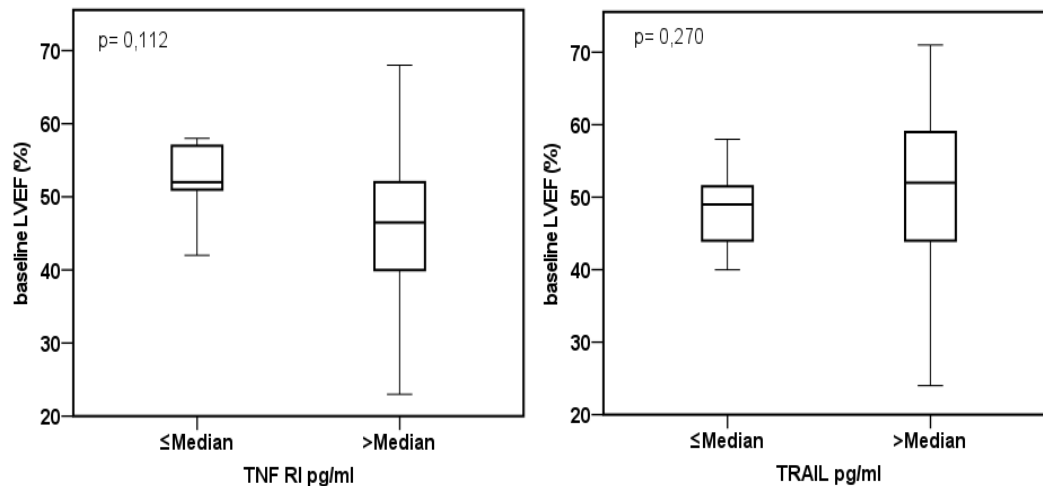
jedes Serumapoptosemarkers verglichen und sind untenstehender Tabelle 4 zu entnehmen. Dabei finden sich bei jedem Marker in der ersten Gruppe die Werte, die kleiner/gleich ihrem Median sind und in der zweiten Gruppe die, die größer als ihr Median sind.

Serumapoptosemarker	n≤Median	n>Median	Für n ≤Median	Für n >Median	p
			Baseline LVEF (%) Perzentilen: 25% 50% 75%	Baseline LVEF (%) Perzentilen: 25% 50% 75%	
Fas-Rezeptor	18	11	43,5 50,0 56,2	44,0 52,0 58,0	0,580
sFasL	14	15	43,0 49,0 56,75	44,0 51,0 57,0	0,621
TNFα	15	14	44,0 51,0 56,0	43,0 51,0 61,25	0,880
TNF RI	15	14	49,0 52,0 57,0	39,75 46,5 53,75	0,112
TNF RII	13	16	46,50 51,0 57,5	41,0 51,0 56,0	0,714
TRAIL	15	14	42,0 49,0 52,0	44,0 52,0 61,0	0,270

*n*: Größe der Stichprobe; *LVEF*: linksventrikuläre Ejektionsfraktion; *p*: Signifikanzniveau

**Tabelle 4:** Vergleich der Serumapoptosemarker kleiner/gleich dem Median bzw. größer als der Median mit der baseline LVEF (%)

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen aller sechs Serumapoptosemarker in Bezug auf die baseline LVEF gefunden werden. Zur Veranschaulichung dieser Tatsache folgt die graphische Darstellung der ermittelten Werte am Beispiel der Marker TNF RI und TRAIL.



LVEF: linksventrikuläre Ejektionsfraktion; p: Signifikanzniveau

**Abbildung 20:** Vergleich von TNF RI und TRAIL kleiner/gleich dem Median bzw. größer als der Median mit der baseline LVEF (%)

#### 4.8.2 Vergleich der Serumapoptosemarker mit dem Verlauf der LVEF

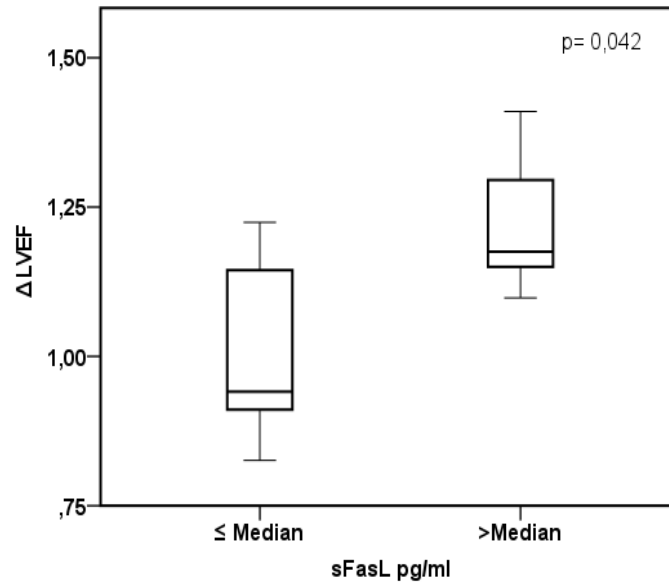
Aus der mittels MRT erhobenen LVEF im Follow-Up nach sechs Monaten und zum Anfang der Hospitalisation wurde das Verhältnis  $\Delta$  (Delta) LVEF durch Division gebildet (LVEF Follow-Up/LVEF baseline) und mit dem jeweiligen Median des Serumapoptosemarker in Relation gebracht. Ob ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (in der ersten Gruppe sind Serumapoptosemarker kleiner/gleich ihrem Median, in der zweiten Gruppe sind Serumapoptosemarker größer als ihr Median) besteht, wurde anhand des Mann-Whitney-U-Tests geprüft. Die erhobenen Werte für  $\Delta$  LVEF sind mit der 25%, 50% und 70% Perzentile aufgelistet. Bei einer Verschlechterung der LVEF ergibt sich ein niedrigerer Wert von  $\Delta$  LVEF, bei Verbesserung ein höherer Wert. Alle ermittelten Werte sind folgender Tabelle 5 zu entnehmen.

Serumapoptosemarker	n≤Median	n>Median	Für n≤Median	Für n>Median	p
			ΔLVEF Perzentilen: 25% 50% 75%	ΔLVEF Perzentilen: 25% 50% 75%	
Fas-Rezeptor	11	5	1,08 1,15 1,20	0,87 1,19 1,35	0,827
sFasL	7	9	0,91 0,94 1,20	1,14 1,17 1,33	<b>0,042</b>
TNFα	9	7	1,12 1,17 1,29	0,91 1,08 1,19	0,142
TNF RI	8	8	1,11 1,15 1,21	0,91 1,14 1,27	0,878
TNF RII	9	7	0,91 1,15 1,20	1,08 1,19 1,29	0,351
TRAIL	9	7	0,93 1,15 1,20	1,08 1,19 1,29	0,470

*n*: Größe der Stichprobe; LVEF: linksventrikuläre Ejektionsfraktion; Δ: Delta; *p*: Signifikanzniveau

**Tabelle 5:** Vergleich der Serumapoptosemarker kleiner/gleich dem Median bzw. größer als der Median mit Δ LVEF

Es zeigt sich für beide Gruppen des Serumapoptosemarkers sFasL in Bezug auf Δ LVEF ein signifikanter Unterschied (für  $n=7 \leq \text{Median}$ ; [25 %-75 %-Perzentile: 0,91/1,20]; für  $n=9 > \text{Median}$ ; [25 %-75 %-Perzentile: 1,14/1,33];  $p=0,042$ ). Dies wird in folgendem Boxplot-Diagramm (Abbildung 21) graphisch veranschaulicht.



$\Delta$ : Delta; LVEF: linksventrikuläre Ejektionsfraktion; p: Signifikanzniveau

**Abbildung 21:** Vergleich von sFasL kleiner/gleich dem Median bzw. größer als der Median mit  $\Delta$ LVEF

#### 4.8.3 Vergleich der Serumapoptosemarker mit dem myokardialen Ödem

Die area at risk (AAR) des Myokards ist als der Teil des Herzgewebes definiert, der während des Gefäßverschlusses beim STEMI ischämisch wird und damit gefährdet ist (Lowe et al. 1978). Dabei bildet sich pathophysiologisch ein myokardiales Ödem aus, welches mithilfe einer T2 gewichteten Aufnahme mit der MRT detektiert werden kann (Abdel-Aty et al. 2009; Higgins et al. 1983). Außerdem kann so eine akute von einer chronischen Schädigung unterschieden werden (Abdel-Aty et al. 2004). Dieses T2 Mapping wurde in drei Kurzachsenschnitten: basal, mitventrikulär und apikal aufgenommen (Krumm et al. 2016). Dabei werden Aufnahmen erzeugt, die durch die transversale Relaxation der Protonen Zustandekommen (Montant et al. 2015). Kommt es zum myokardialen Ödem und damit erhöhtem Wassergehalt im Gewebe und auch freiem Wasser, dann verlängert sich auch die transversale Relaxationszeit (Higgins et al. 1983; Knight et al. 1991). Die Ödeme weisen in diesen Bildern eine hohe Signalintensität auf (Montant et al. 2015).

Die Signalzerfallszeit (Signal Decay Time, SDT) beruht hauptsächlich auf der T2 Relaxationszeit (Krumm et al. 2016). Hier wurde das obere 97,5 % Quantil der SDT gesunder Probanden, welche bei einer Zeit von 64,5 ms lag, als Grenzwert

für die weiteren Auswertungen bestimmt. Werte  $\geq 65$  ms wurden demzufolge bei der Ödembildgebung als pathologisch gewertet. Das gefundene Ödem wurde dann im 16 Segmente Modell der American Heart Association ausgewertet (Cerqueira et al. 2002) und anschließend dessen Anteil an der linksventrikulären Muskelmasse (LVMM) des Herzens bestimmt. Die LVMM (g) wurde dabei mittels Scheibchensummationsmethode mit manueller Konturierung von 8-15 Kurzachsenschnitten unter Aussparung der Papillarmuskeln identifiziert (Armstrong et al. 2012; Vogel-Claussen et al. 2006).

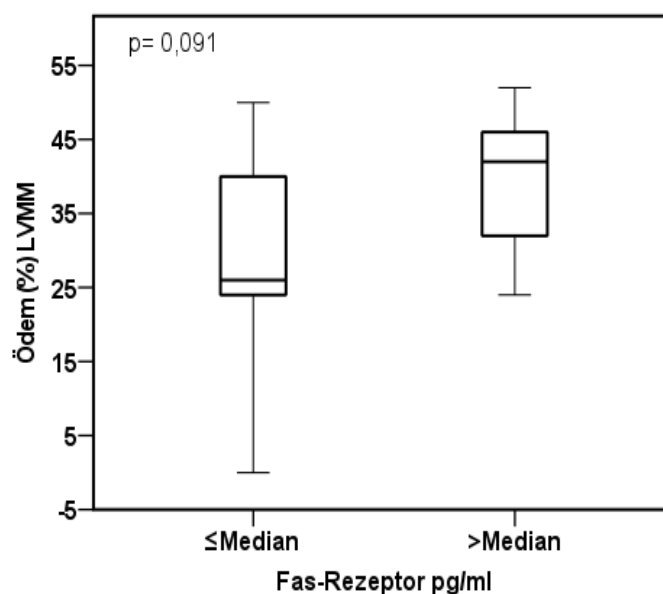
In untenstehender Tabelle 6 finden sich die hierfür ermittelten Werte:

Serumapoptosemarker	n $\leq$ Median	n $>$ Median	Für n $\leq$ Median	Für n $>$ Median	p
			Ödem (%) LVMM Perzentilen: 25% 50% 75%	Ödem (%) LVMM Perzentilen: 25% 50% 75%	
Fas-Rezeptor	15	10	24,0 26,0 40,0	30,0 42,0 47,5	0,091
sFasL	13	12	25,0 32,0 45,0	24,0 33,0 44,5	0,936
TNF $\alpha$	12	13	23,0 29,0 39,0	24,0 40,0 46,0	0,320
TNF RI	11	14	22,0 26,0 40,0	25,5 38,0 47,0	0,149
TNF RII	11	14	22,0 30,0 44,0	24,0 34,0 47,0	0,609
TRAIL	13	12	24,0 40,0 45,0	24,0 32,0 44,5	0,979

n: Größe der Stichprobe; p: Signifikanzniveau

**Tabelle 6:** Vergleich der Serumapoptosemarker kleiner/gleich dem Median bzw. größer als der Median mit dem myokardialen Ödem (%) LVMM

In Abbildung 22 folgt die exemplarische Darstellung des Markers Fas-Rezeptor ( $p= 0,091$ ) in Bezug auf das myokardiale Ödem in Prozent der linksventrikulären Muskelmasse.



LVMM: linksventrikuläre Muskelmasse (g); p: Signifikanzniveau

**Abbildung 22:** Vergleich Fas-Rezeptor kleiner/gleich dem Median bzw. größer als der Median mit dem myokardialen Ödem (%) der LVMM (g)

#### 4.8.4 Vergleich der Serumapoptosemarker mit Myocardial Salvage

Myocardial Salvage steht für den Anteil des Myokards, der durch therapeutische Maßnahmen nach einem Herzinfarkt gerettet werden kann und dient so ebenfalls als Indikator für den Nutzen dieser (Bøtker et al. 2012). Myocardial Salvage wird durch Subtraktion der finalen Infarktgröße (FIS) von der area at risk (AAR), also des anfangs gefährdeten Myokardareals berechnet (Bøtker et al. 2012). Wie die AAR per MRT bestimmt wurde, ist im vorhergehenden Kapitel erläutert worden.

$$\text{Myocardial Salvage} = \text{AAR} - \text{FIS}$$

FIS wurde ebenfalls mittels MRT gemessen. Dabei wurde den Patienten 0,15 mmol/kg KG Gadobutrol als Kontrastmittel (Gadovist, Bayer Healthcare, Leverkusen, Germany) über eine periphere Venenverweilkanüle verabreicht. Die resultierenden Bilder wurden durch Einsatz einer segmentierten Inversion-Recovery-Gradientenecho-Pulssequenz 10 Minuten nach Kontrastmittelinjektion

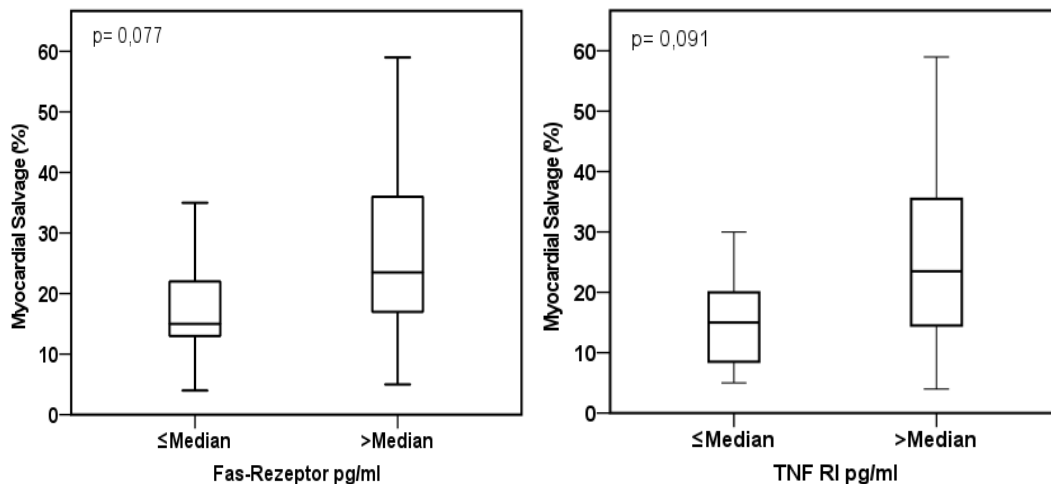
in Atemanhaltetechnik angefertigt. Beim Herzinfarkt kommt es zum Zusammenbruch der Zellmembranen. Das injizierte Gadobutrol verteilt sich dann auch dort wo früher intakte Zellen waren (Kellman & Arai 2012). Zusätzlich kommt es zur vermehrten Bildung von extrazellulärem Gewebe, wo sich das Kontrastmittel ebenfalls anreichert (Kellman & Arai 2012). Außerdem entsteht durch die verminderte Durchblutung und den fibrotischen Umbau des Herzgewebes eine verlängerte An- und Abflutungskinetik des Gadoliniums innerhalb des Herzmuskels. Man spricht vom late gadolinium enhancement des Infarktareals (Arheden et al. 1999; Mahrholdt et al. 2002). Um die Infarktgröße letztendlich zu bestimmen, wurden die Bereiche in T1 Gewichtung identifiziert, die sich mehr als 5 Standardabweichungen von der mittleren Signalintensität unterscheiden (Flett et al. 2011). Anschließend wurde die Masse des infarzierten Myokards in Verhältnis zur Gesamtmasse des Myokards gebracht und in Prozent angegeben. Die folgende Tabelle 7 enthält die Werte der Perzentilen des Myocardial Salvage für beide Gruppen der Serumapoptosemarker.



Serumapoptosemarker	n≤Median	n>Median	Für n≤Median	Für n>Median	p
			Myocardial Salvage Perzentilen: 25% 50% 75%	Myocardial Salvage Perzentilen: 25% 50% 75%	
Fas-Rezeptor	13	10	9,5 15,0 22,5	15,5 23,5 36,25	0,077
sFasL	11	12	6,0 18,0 35,0	14,25 16,5 25,25	0,833
TNFα	11	12	5,0 16,0 23,0	14,0 21,5 35,0	0,235
TNF RI	11	12	6,0 15,0 22,0	14,25 23,5 35,75	0,091
TNF RII	11	12	6,0 16,0 30,0	13,25 17,50 32,75	0,880
TRAIL	12	11	14,25 19,0 33,75	11,0 17,0 26,0	0,608

n: Größe der Stichprobe; p: Signifikanzniveau

**Tabelle 7:** Vergleich der Serumapoptosemarker kleiner/gleich dem Median bzw. größer als der Median mit Myocardial Salvage



p: Signifikanzniveau

**Abbildung 23:** Vergleich von Fas-Rezeptor und TNF RI kleiner/gleich dem Median bzw. größer als der Median mit Myocardial Salvage(in % des gesamten Myokards)

Zur Veranschaulichung der gefundenen Werte siehe obige graphische Darstellung der Serumapoptosemarker Fas-Rezeptor ( $p= 0,077$ ) und TNF RI ( $p= 0,091$ ) im Bezug zu Myocardial Salvage (Abbildung 23).

#### **4.8.5 Vergleich der Serumapoptosemarker mit dem Verlauf der Infarktgröße**

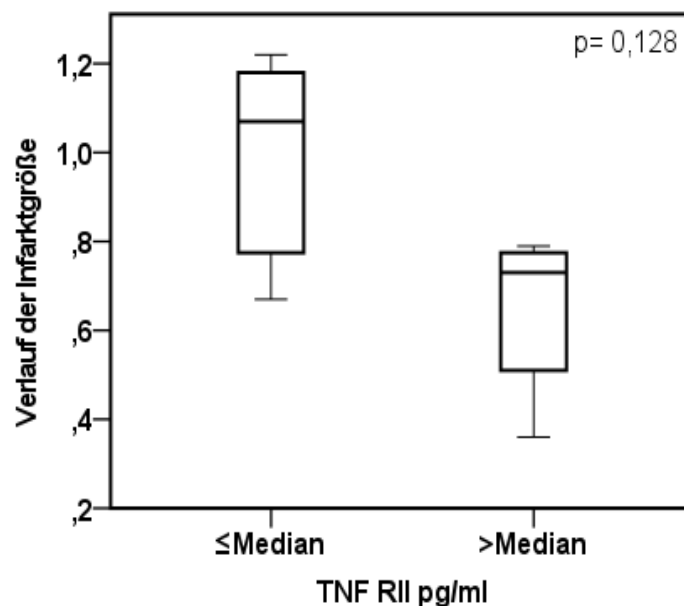
Um den Verlauf der Infarktgröße nachzuvollziehen wurde diese im Mittel drei Tage nach dem STEMI und erneut nach sechs Monaten in der MRT-Bildgebung bestimmt und in Prozent zur Gesamtmasse des Myokards angegeben. Die ermittelten Werte wurden anschließend ins Verhältnis gesetzt (Follow-Up/Baseline). Wie im vorhergehenden Kapitel zu Myocardial Salvage beschrieben, wurde der Infarkt im Herzgewebe mithilfe des Kontrastmittels Gadobutrol (Gadovist, Bayer Healthcare, Leverkusen, Germany) in einer Dosis von 0,15 mmol pro kg Körpergewicht dargestellt. Das bereits erwähnte Prinzip hierbei beruht auf verzögertem An- und Abfluten des Kontrastmittels durch den erhöhten Anteil an extrazellulärer Matrix (Doltra et al. 2013). Dieser entsteht durch die zelluläre Nekrose, Lyse sowie das kardiale Ödem was auf den Infarkt folgt (Doltra et al. 2013). Die erhöhte Menge an Kontrastmittel kann dann durch T1-gewichtete Bildgebung durch late enhancement ungefähr 10 bis 30 Minuten nach Kontrastmittelgabe nachgewiesen werden und somit auch das vom Infarkt betroffene Myokard (Doltra et al. 2013).

Hier folgt Tabelle 8, welche die Messwerte kleiner oder gleich dem jeweiligen Median der Serumapoptosemarker und Werte größer als der jeweilige Median unterscheidet und dann jeweils mit dem Verlauf der Infarktgröße der STEMI Patienten vergleicht.

Serumapoptosemarker	n≤Median	n>Median	Für	Für	p
			n≤Median	n>Median	
			Infarktgröße	Infarktgröße	
			Perzentilen:	Perzentilen:	
			25%	25%	
			50%	50%	
			75%	75%	
Fas-Rezeptor	9	5	0,53 0,73 1,14	0,69 0,79 1,47	0,518
sFasL	7	7	0,39 1,07 1,53	0,69 0,76 0,86	0,805
TNFα	7	7	0,67 0,79 1,07	0,63 0,76 1,53	0,710
TNF RI	6	8	0,68 0,79 1,11	0,45 0,77 1,43	0,950
TNF RII	7	7	0,69 1,07 1,22	0,39 0,73 0,79	0,128
TRAIL	7	7	0,69 1,07 1,22	0,63 0,73 0,79	0,209

n: Größe der Stichprobe; p: Signifikanzniveau

**Tabelle 8:** Vergleich der Serumapoptosemarker kleiner/gleich dem Median bzw. größer als der Median mit dem Verlauf der Infarktgröße



p: Signifikanzniveau

**Abbildung 24:** Vergleich des Serumapoptosemarkers TNF RII kleiner/gleich dem Median bzw. größer als der Median mit dem Verlauf der Infarktgröße (Quotient Infarktgröße im Follow-Up/ Infarktgröße Baseline je in % des Gesamtmyokards)

Eine exemplarische graphische Darstellung in obiger Abbildung 24 finden hier die Werte des TNF RII im Vergleich zum Verlauf der Infarktgröße ( $\rho = 0,128$ ). Zudem zeigte sich für die TNF Rezeptoren I und II eine negative Korrelation mit dem Verlauf der Infarktgröße, die jedoch nicht signifikant war ( $\rho = -0,330$ ,  $p = 0,249$  und  $\rho = -0,354$ ,  $p = 0,215$ ).

## 5 Diskussion

In dieser Studie wurde 38 Patienten mit der Diagnose STEMI Vollblut entnommen, diese wurde auf die thrombozytären Oberflächenmarker CXCR4 und CXCR7 sowie auf die sechs Serumapoptosemarker Fas-Rezeptor, sFasL, TNF  $\alpha$ , TNF RI, TNF RII und TRAIL mittels Bioplex untersucht. Zudem wurde eine kardiale MRT Bildgebung während der Hospitalisation und nochmals nach sechs Monaten durchgeführt.

Es wurde zunächst untersucht, ob sich zwischen den sechs Serumapoptosemarkern und den thrombozytären Markern Annexin V und TMRE eine Korrelation finden lässt. Ergebnis dieser Studie ist, dass zwischen allen sechs Serumapoptosemarkern und der Externalisierung von Phosphatidylserin (gemessen durch Annexin V Bindung) sowie der mitochondrialen Depolarisation (gemessen durch Fluoreszenz des TMRE) der Thrombozyten keine signifikante Korrelation besteht. Doch bei der relativen thrombozytären Apoptose gemessen durch Annexin V und dem Fas-Rezeptor ergibt sich in der hier untersuchten STEMI-Kohorte durchaus eine signifikante Korrelation.

Das wesentliche Ergebnis bei der Auswertung der MRT Daten ergibt eine signifikante Korrelation von sFasL und  $\Delta$  LVEF. Der Serumapoptosemarker sFasL könnte somit als Parameter für den Verlauf der linksventrikulären Ejektionsfraktion nach einem Herzinfarkt herangezogen werden.

### 5.1 Diskussion der Methoden

#### 5.1.1 Patientenkollektiv, Basischarakteristika, Blutentnahme

Das Patientenkollektiv dieser Studienkohorte kann als repräsentative Stichprobe von STEMI Patienten angesehen werden. Studienabbrüche bzw. fortwährende Studienteilnahme geschahen per Zufall sowie ohne besonderes Muster. Die meisten Abbrüche entstanden jedoch durch Ablehnung der MRT Bildgebung durch die Studienteilnehmer. Ähnliche Patientenkollektive mit hoher Validität sind

analog auch anderen Studien zu entnehmen (Nilsson et al. 2013; Hortmann et al. 2017). Insgesamt wurde 89 Patienten mit STEMI Blut abgenommen, davon wurden 38 Patienten in diese Studie eingeschlossen, da die Serumapoptosemarker nur dann bestimmt worden sind, wenn auch MRT Bildgebung vorhanden war. Die Basischarakteristika der Patienten wurden anhand von eingespeisten Arztbriefen oder Anamneseprotokollen, die durch den aufnehmenden Arzt angefertigt worden sind aus der elektronischen Patientenakte des klinikinternen EDV-Systems übernommen. Bei Unstimmigkeiten bei den Daten erfolgte die Kontaktaufnahme zum niedergelassenen ärztlichen Kollegen oder zum Patienten selbst. Insgesamt wurden die Daten zweimal überprüft.

Die Blutentnahme erfolgte nach Zustimmung des Patienten im Rahmen des Eingriffs während der PCI. Dies gewährleistete eine standardisierte Abnahme durch die im Herzkatheterlabor festgelegten Abläufe.

### **5.1.2 Analyse mittels FACS**

Die Analyse von Parametern mit dem FACS Gerät (FACSCalibur™ Flow Cytometer, Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg, Germany) ist eine gut etablierte und innovative Methode für die Klärung von wissenschaftlichen Fragestellungen. Auch in der Abteilung für Kardiologie und Kreislauferkrankungen, der Klinik für Innere Medizin III, findet diese Methode in vielen Studien häufige Anwendung (Rath et al. 2019; Borst et al. 2018; Chatterjee et al. 2017; Vogel et al. 2016). Diese Routine bedingt eine hohe Expertise des Laborpersonals und stellt damit eine hohe Qualität der Messergebnisse sicher. Die Messung der CXCR4 und CXCR7 Expression der Thrombozyten sowie die Messung der thrombozytären Apoptose wurde in dieser Studie mittels FACS durchgeführt. Jede Messung erfolgte mit den gleichen Geräteeinstellungen, so konnte diese bei Fehlmessung auch unter gleichen Bedingungen wiederholt werden. Auf die Einhaltung von gängigen Gerätestandards und die regelmäßige Qualitätssicherung wurde ebenfalls geachtet (Oldaker 2007; Perfetto et al. 2006).

### **5.1.3 Bioplex**

Um mehrere Serumapoptosemarker in der Probe eines Patienten zu bestimmen, wurde das Bio-Plex™ 200 System (der Firma BioRad) verwendet. Durch die Multiplexanalytik können zeitsparend mehrere Proteine gleichzeitig quantifiziert werden. Ebenso vorteilhaft ist, dass nur eine kleine Menge der zu untersuchenden Probe benötigt wird. Das Prinzip hierbei beruht auf dem eines Sandwich-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) einer hochsensitiven, reproduzierbaren Standardmethode (Voller et al. 1978). Zur Validierung und Kalibrierung sind nach Herstellerangaben automatisierte Protokolle über die Bio-Plex Manager Software durchgeführt und gespeichert worden. Diese wurden unter Verwendung einer Wartungs-, Kalibrierungs- und Validierungsplatte (maintenance, validation, calibration; MCV), die die dafür erforderlichen Mikrokügelchensätze und -lösungen beinhaltet, durchgeführt (Bio-Rad Laboratories 2013). Die Durchführung der Messungen erfolgte mit den kommerziell verfügbaren Kits der Firma Bio-Rad.

### **5.1.4 Kardiale Bildgebung mittels MRT**

Die Bildgebung mit MRT ist derzeit der Goldstandard für die Bestimmung der Infarktgröße (Schulz-Menger et al. 2013), selbst kleinste subendokardiale Infarkte in der Größe von 1g können so dargestellt werden (Kim et al. 2009) und das mit guter Präzision (Wagner et al. 2003). Auch für die Quantifizierung der LVEF stellt die MRT den Goldstandard dar (Grothues et al. 2002). Aufgrund ihrer Nicht-Invasivität, guten Reproduzierbarkeit, hohen zeitlichen und räumlichen Auflösung wird sie immer mehr für die Beurteilung der Herzfunktion verwendet (Baksi & Pennell 2013). Eine Beurteilung der LVEF durch die einfache, günstigere und gut verfügbare transthorakale Echokardiographie ist ebenfalls möglich (Huttin et al. 2015). Nachteile hierbei sind jedoch die hohe Untersucherabhängigkeit und die fehlende Möglichkeit die Infarktgröße genau zu bestimmen. Deshalb wurde in dieser Studie der MRT der Vorzug gegeben, um so die bestmögliche Qualität bei der Bestimmung der Parameter sicherzustellen.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 Detektion der Apoptose mit TMRE und Annexin V und Zusammenhang mit den Serumapoptosemarkern

In dieser Studie wurde die Apoptose der Blutplättchen durchflusszytometrisch durch die Stoffe TMRE und Annexin V nachgewiesen.

Das lipophile und positiv geladene TMRE gibt die höchste Fluoreszenzintensität ab, wenn es sich in den intakten Membranen des vitalen Mitochondriums bei stabilem Membranpotential ( $\Delta\Psi$ ) anreichern kann. Kommt es zum Abfall des Membranpotentials, zur Depolarisation (wie es auch bei der Apoptose der Fall ist), verteilt sich TMRE im Zytosol und seine Fluoreszenzintensität nimmt ab (Scaduto & Grotyohann 1999). Dieser Fluoreszenzabfall kann dann mit dem FACS Gerät gemessen werden. Ebenso kann eine höhere Fluoreszenzintensität ein vermehrtes Überleben der Thrombozyten signalisieren, was jedoch vorsichtig zu interpretieren ist (Perry et al. 2011). Der Ausgangswert der Fluoreszenz von TMRE bei ruhenden Thrombozyten ist aufgrund der mitochondrialen Atmung und von plättchenspezifischen Gegebenheiten je nach Individuum unterschiedlich. Um die erhaltenen Werte zu verifizieren sollte eine komplementäre Messung durchgeführt werden (Perry et al. 2011).

Thrombin als bekannter Blutgerinnungsinitiator kann auch Apoptose von Thrombozyten auslösen. Dafür wurde in dieser Studie eine ausreichend hohe Konzentration an Thrombin sichergestellt, da es sonst lediglich zur Plättchenaktivierung käme (Leytin et al. 2007). Dann wurden die TMRE MFI Werte von ruhenden Thrombozyten ins Verhältnis zu den MFI Werten von durch Thrombin stimulierten Thrombozyten gesetzt. Ersteres spiegelt den aktuellen Vitalitätszustand der Thrombozyten wider, während letzteres die noch vorhandene Fluoreszenz nach maximaler durch Thrombin getriggelter Apoptose und so gleichzeitig das minimale Überleben zeigt. Ein hohes Verhältnis des TMRE der ruhenden TZ zu dem TMRE der durch Thrombin behandelten, stellt ein hohes relatives Überlebenspotential dar. Ein niedriger Wert dieses Verhältnisses stellt auch ein niedriges relatives Überlebenspotential dar.



Über den gut etablierten Marker Annexin V ist ebenfalls ein indirekter Hinweis auf zelluläre Apoptose möglich. Annexin V bindet an, bei apoptotischen Zellen exponiertes, Phosphatidylserin (Dachary-Prigent et al. 1993). PS wird jedoch wie in der Einleitung beschrieben bei Thrombozyten auch bei Aktivierung exponiert (Nagata et al. 2016). Es kommt dabei unter anderem zur Bildung des Tenase Komplexes, der die Gerinnungsneigung der Thrombozyten durch Vorantreiben der Thrombinbildung erhöht und somit zu deren Aktivierung beiträgt (Zwaal et al. 1977; Cooper 2000; Bevers et al. 1982). Die PS-Externalisierung kann also sowohl ein Zeichen für die Einleitung der Apoptose, als auch für die Aktivierung der Thrombozyten sein (Zhang et al. 2007; Kile 2014). Dies wäre ein Grund weshalb Messungen der zellulären Apoptose anhand von TMRE und Annexin V nicht immer übereinstimmen könnten. Ebenso ist die selektive Messung von Apoptose anhand von Annexin V dementsprechend nicht möglich. Die Messungen durch Annexin V sollten also als Mischung aus apoptotischen Thrombozyten und aktivierten Thrombozyten angesehen werden.

Analog zur Bildung des relativen Überlebenspotentials von TMRE wurde auch hier das Verhältnis der Annexin V MFI von reinen, ruhenden TZ und der Annexin V MFI von Thrombin stimulierten TZ gebildet. Unter der Verwendung einer angemessen hohen Thrombindosis (1U/ml), die so zu einer signifikanten Anzahl an apoptotischen Thrombozyten führen kann, kann das ermittelte Ergebnis dieses Verhältnisses grob als Prozentsatz der maximalen Apoptose interpretiert werden. Da bei Messung von Annexin V nicht zwischen Apoptose und Aktivierung unterschieden werden kann, ist zumindest in den mit Thrombin vorbehandelten Proben zu erwarten, dass nahezu alle Thrombozyten apoptotisch zugrunde gehen. Ein hohes Verhältnis des Annexin V der ruhenden TZ zu dem Annexin V der durch Thrombin behandelten, stellt ein niedriges relatives Überlebenspotential dar, also eine vermehrte thrombozytäre Apoptose. Ein niedriger Wert dieses Verhältnisses stellt dementsprechend ein hohes relatives Überlebenspotential dar und damit wenig Apoptose.

In dieser Studie ergab sich keine Korrelation zwischen den Serumapoptosemarkern und den mit Annexin V oder TMRE gefärbten ruhenden Thrombozyten der

STEMI Kohorte. Nur beim Verhältnis der ruhenden zu den durch Thrombin stimulierten TZ gemessen durch Annexin V, als Marker für das Ausmaß der thrombozytären Apoptose und dem löslichen Fas-Rezeptor ergibt sich eine signifikante positive Korrelation. Dies deckt sich mit einer anderen Studie aus Tübingen über membrangebundenes FasL das an der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten exprimiert wird und zellspezifisch und konzentrationsabhängig Apoptose induzieren kann (Schleicher et al. 2015). Diese aktivierten Thrombozyten könnten möglicherweise unter anderem auch löslichen Fas Rezeptor in den Kreislauf abgeben, was eine Erklärung für die obige Korrelation darstellen könnte.

### **5.2.2 Evaluation der Serumapoptosemarker in Bezug auf LV-Funktion, deren Verlauf und der Infarktgröße**

In dieser Studienpopulation zeigte sich nur beim Marker sFasL ein signifikanter Zusammenhang mit dem Verlauf der LV-Funktion bei den STEMI Patienten. Die Messungen von Fas-Rezeptor, TNF  $\alpha$ , TNF RI, TNF RII, TRAIL ergaben keinen signifikanten Zusammenhang mit der LV-Funktion. Bei hohen Werten des Serumapoptosemarkers sFasL (größer gleich dem Median) ergab sich hier eine signifikante Verbesserung der LV-Funktion. Bei Werten kleiner als der Median ergab sich dementsprechend eher eine Verschlechterung der LV-Funktion. Es ist bereits gezeigt worden, dass bei Patienten mit STEMI und instabiler Angina pectoris die sFasL Messwerte im Blut bei Aufnahme signifikant erhöht sind und sFasL somit in der Pathogenese des Myokardinfarktes eine wichtige Rolle spielt (Shimizu et al. 2002). Nilsson et al. berichteten jedoch von einem fehlenden signifikanten Zusammenhang zwischen sFasL, sFas und der LV-Funktion in der von ihnen untersuchten Studienpopulation von 46 Patienten. Die Messungen hierfür fanden jeweils fünf Tage und vier Monate nach dem STEMI statt. Auch bei Oscmancik et al. zeigten sich dementsprechende Ergebnisse. Dort waren die bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom gemessenen sFas-Serumspiegel nach sechs Monaten nicht mit der Prognose des Patienten assoziiert (Osmancik et al. 2013). Auch in einer weiteren Studie von Szymanowski fand sich keine Korrelation von sFasL mit der nach fünf Tagen und vier Monaten gemessenen LVEF bei

STEMI Patienten. Dort korrelierte aber der lösliche TNFR I signifikant negativ (gemessen vor der Koronarangiographie und nach 24 Stunden) mit der LV-Funktion nach vier Monaten (Szymanowski 2015). Dieses Ergebnis konnten die hier erhobenen Daten nicht bestätigen.

Bei Szymanowski zeigte sich zudem eine positive Korrelation von TNF RI nach 24 Stunden mit der Infarktgröße nach vier Monaten. sFasL und der Fas-Rezeptor hingegen zeigten dabei keine signifikanten Korrelationen. In dem hier untersuchten Kollektiv ließ sich kein signifikanter Zusammenhang aller untersuchten Serumapoptosemarker mit der Infarktgröße feststellen.

Eine Studie von Nilsson et. al untersuchte ebenfalls lösliche Apoptosemarker bei STEMI-Patienten, deren mögliche Korrelation untereinander, den Zusammenhang mit der Infarktgröße und verglich diese mit Parametern der linksventrikulären Funktion. Dabei ergab sich ähnlich wie bei Szymanowski eine positive signifikante Korrelation zwischen der Infarktgröße (nach vier Monaten) und den TNF Rezeptoren I und II sowie eine negative Korrelation dieser Rezeptoren mit der LVEF nach vier Monaten (Nilsson et al. 2013). In dieser Studie konnten wir diese Daten jedoch nicht vollends bestätigen. Hier zeigte sich aber ebenfalls ein negativer Zusammenhang von TNF RI und TNF RII mit dem Verlauf der Infarktgröße, der bei unserer Stichprobe aber nicht signifikant war. Aufgrund der hier deutlich geringeren Größe der Stichprobe (n=14) ist dieses Ergebnis insgesamt schwierig zu interpretieren. Die Werte der anderen Serumapoptosemarker zeigten keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Verlauf der Infarktgröße der Patienten. Andere Studien zeigten ebenfalls keinen Zusammenhang, beispielsweise zwischen dem löslichen Fas-Rezeptor und der Infarktgröße. Auch bei Nilsson et al. zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem sFas-Rezeptor, sFasL und der Infarktgröße. Interessanterweise ergab sich dabei jedoch die Beobachtung, dass die Werte des Fas-Rezeptors 24 Stunden nach PCI signifikant höher waren als die bei Aufnahme (Teringova et al. 2018; Nilsson et al. 2013). Hier wurde dieser Wert jedoch nur einmal bestimmt.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die sFas-Spiegel bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt signifikant höher sind, jedoch nicht mit der Infarktgröße, der

LV-Funktion oder der Prognose korrelieren. Somit bleibt die Rolle der Fas-vermittelten Apoptose und des hier gefundenen Zusammenhangs von sFasL und der LV-Funktion noch immer unklar. SFas-Spiegel scheinen jedoch als prognostische Marker bei Patienten mit verschiedenen Formen von Herzinsuffizienz hilfreich zu sein. Die prognostische Bedeutung von sFas wurde bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie und dekompensierter und kompensierter Herzinsuffizienz bereits nachgewiesen (Kawakami et al. 1998; Niessner et al. 2009; Tsutomoto et al. 2001). Höhere sFas-Konzentrationen waren zudem mit einer Klinik-einweisung aufgrund von Herzinsuffizienz oder einem höheren Sterberisiko verbunden (Teringova & Tousek 2017).

Insgesamt wird weiterhin intensiv an Biomarkern geforscht die in Zusammenhang mit einem Myokardinfarkt messbar sind. Der bereits sehr gut etablierte Marker wie das kardiale Troponin, als direktes Produkt des Myozytenschadens, ist der Goldstandard zur Diagnose eines Myokardinfarkts. Dennoch werden weitere Biomarker benötigt die vor allem einen Ausblick auf die Prognose erlauben oder sogar der Prävention dienen könnten (Wu et al. 2020). Es ist weiter zu untersuchen ob hierfür sFas ein möglicher Marker sein könnte.

Akgül et al. konnten beispielsweise für STEMI-Patienten mit hohem BNP und high sensitive Troponin T bei Aufnahme eine erhöhte Sterblichkeit und damit die Notwendigkeit einer engmaschigeren Nachbetreuung aufzeigen. In Bezug auf den Gensini-Score konnte hier kein signifikanter Zusammenhang mit den Werten von BNP, CK-MB und high sensitive Troponin T gefunden werden.

Der Gensini-Score bildet die Schwere der atherosklerotischen Veränderungen der Herzkranzgefäße ab und wird während der PCI erhoben. Hierbei werden je nach Schweregrad der Lumeneinengung der Koronararterien Punkte vergeben (1 Punkt für eine Stenose von  $\leq 25\%$ , 2 Punkte für eine Stenose von 26-50%, 4 Punkte für eine Stenose von 51-75%, 8 Punkte für eine Stenose von 76-90%, 16 Punkte für eine Stenose von 91-99% und 32 Punkte für totale Okklusion). Dieser Punktwert wird mit einem Wert multipliziert, der die Bedeutung der Stenose je nach versorgtem Myokardgebiet bewertet. Eine Stenose der A. coronaria sinistra

beispielsweise wird hierbei mit dem höchsten Wert von 5 versehen (Abschnitt vgl. (Avci et al. 2016)).

Es ist weiter zu untersuchen ob Serumapoptosemarker einen Hinweis auf die Schwere einer Koronarstenose geben könnten. Eine Erhöhung des jeweiligen Markers könnte dann, wenn andere Bedingungen ebenfalls zutreffen, die prompte Therapie mittels PCI nach sich ziehen.

Nach einem Myokardinfarkt sollten die Patienten identifiziert werden, die im kurzen Verlauf eine erhöhte Krankenhausmortalität und ebenfalls ein erhöhtes Risiko für das Wiederauftreten von ischämischen Ereignissen im weiteren Lebensverlauf haben. Dabei kann bei Ersterem der sog. TIMI Risikoscore direkt nach Aufnahme in einer Klinik zur frühen Risikostratifizierung nach dem Ereignis verwendet werden. Hierbei werden acht Parameter verwendet, die mit einer erhöhten Mortalität verbunden sind (Alter, Vorerkrankungen wie Diabetes mellitus, systolischer Blutdruck, Herzfrequenz, Einordnung in der Killip-Klassifikation, Gewicht, ST-Hebung/Linksschenkelblock, Zeit bis zur Reperfusion). Ein erhöhter Score geht mit einer erhöhten 30-Tage-Mortalität einher (Abschnitt siehe (Morrow et al. 2000)). Zur Abschätzung der weiteren Prognose nach MI gilt nach Empfehlung der American College of Cardiology Foundation/American Heart Association die Erhebung der LVEF kurz vor oder nach der Entlassung aus dem Krankenhaus (O’Gara et al. 2013). Bei Patienten mit linksventrikulärer systolischer Dysfunktion zeigte sich nach sechs und zwölf Monaten eine erhöhte Mortalität (Nicolosi et al. 1996; Burns et al. 2002; Zaret et al. 1995). In dieser Studie konnte ein Zusammenhang zwischen sFasL und dem Verlauf der LV-Funktion gezeigt werden. Je höher sFasL desto günstiger war der Verlauf der LVEF für die Patienten. So könnte beispielsweise die Bestimmung von sFasL zur weiteren Risikostratifizierung bei Herzinfarktpatienten beitragen.

### **5.2.3 Limitationen**

Insgesamt ist in dieser Studie mit einer Fallzahl von 38 Patienten, deren Serumapoptosemarker bestimmt worden sind, eine relativ kleine Fallzahl beleuchtet

worden. Ein großer Anteil der Patienten lehnte zudem eine Bildgebung mittels MRT ab, sodass sich die Bestimmung des Einflusses der Serumapoptosemarker auf das Überleben der Thrombozyten und somit auf funktionelle Parameter wie die linksventrikuläre Ejektionsfraktion und die Infarktgröße schwierig gestaltete. Das Follow-Up wurde sechs Monate nach Entlassung durchgeführt. Eine etwaige Veränderung der gemessenen kardialen Parameter über diesen Zeitpunkt hinaus konnte nicht mehr abgebildet werden, hierfür wäre ein weiteres Follow-Up nötig. Andere Einflüsse auf die Herzfunktion wie beispielsweise Medikation mit Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und deren Einfluss auf das kardiale Remodeling oder sportliche Betätigung nach dem Herzinfarkt wurden nicht erhoben.

Zudem wurden nur Patienten eingeschlossen, die einen STEMI erlitten haben. Eine gesunde Kontrollgruppe zur besseren Einschätzung des physiologisch vorkommenden Ausmaßes an Serumapoptosemarkern und akut durch den Myokardinfarkt bewirkte Veränderungen konnten so nicht abgebildet werden. Auch etwaige Begleiterkrankungen, die die Lebensdauer der Thrombozyten zusätzlich beeinflussen könnten wurden nicht erfasst.

## 6 Zusammenfassung

In dieser Studie konnten wir zeigen, dass der Fas-Rezeptor mit dem relativen Überlebenspotential der Thrombozyten signifikant positiv korreliert. Die anderen Serumapoptosemarker korrelierten nicht mit den thrombozytären Apoptosemarkern. Die Messungen von sFasL haben einen positiven Zusammenhang mit dem Verlauf der linksventrikulären Funktion bei STEMI Patienten ergeben. Die anderen Serumapoptosemarker korrelierten nicht mit dem Verlauf der linksventrikulären Funktion, der myokardialen Regeneration oder der Infarktgröße.

In der kardiologischen Abteilung der Medizinischen Klinik Tübingen wurde 89 Patienten 24 bis 48 Stunden nach dem akuten Ereignis eines ST-Hebungs-Myokardinfarktes eine Blutprobe für diese Kohortenstudie entnommen. Anschließend wurde das Serum dieser Blutproben für die Messung der Apoptosemarker Fas-Rezeptor, sFasL, TNF $\alpha$ , TNF RI, TNF RII und TRAIL zurückgelegt. Nachfolgende Analysen der Serumapoptosemarker wurden für 38 Patienten durchgeführt, von denen auch die linksventrikuläre kardiale Funktion mittels MRT erhoben wurde. Hierfür wurde einmal zu Beginn des Krankenhausaufenthaltes und noch einmal im Verlauf sechs Monate nach dem STEMI-Ereignis eine MRT durchgeführt, um eine etwaige Verbesserung oder Verschlechterung der Herzfunktion feststellen zu können. Ebenso wurde so die Infarktgröße gemessen.

Die Studienergebnisse deuten an, dass bestimmte Serumapoptosemarker in Zusammenhang mit dem Thrombozytenüberleben stehen. Zudem besteht ein Zusammenhang mit der linksventrikulären kardialen Funktion. Thrombozyten können über Chemokine, Zytokine und Wachstumshormone in Interaktion mit Endothelzellen oder Immunzellen treten. Ein besseres Überleben dieser, kann entzündliche Prozesse die bei der Atherosklerose, der Plaquestabilisierung und demzufolge auch bei der koronaren Herzkrankheit eine Rolle spielen, beeinflussen. Inwieweit dies prognostischen Wert hat, insbesondere bezüglich der Regeneration des Herzmuskels, muss durch weitere Studien mit größerer Studienpopulation untersucht werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abdel-Aty, H, Cocker, M, Meek, C, Tyberg, JV, Friedrich, MG (2009). Edema as a very early marker for acute myocardial ischemia: a cardiovascular magnetic resonance study. *Journal of the American College of Cardiology* 53, 1194–1201.
- Abdel-Aty, H, Zagrosek, A, Schulz-Menger, J, Taylor, AJ, Messroghli, D, Kumar, A, Gross, M, Dietz, R, Friedrich, MG (2004). Delayed enhancement and T2-weighted cardiovascular magnetic resonance imaging differentiate acute from chronic myocardial infarction. *Circulation* 109, 2411–2416.
- Aggarwal, BB (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature reviews. Immunology* 3, 745–756.
- Aggarwal, BB, Gupta, SC, Kim, JH (2012). Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 119, 651–665.
- Ahmed, N, Carberry, J, Teng, V, Carrick, D, Berry, C (2016). Risk assessment in patients with an acute ST-elevation myocardial infarction. *Journal of Comparative Effectiveness Research* 5, 581–593.
- Akgül, G, Degirmenci, E, Aktas, C, Eren, SH, Demirtas, Y (2018). Early Prognostic Values of Cardiac Biomarkers in STEMI patients that underwent Percutaneous Coronary Intervention. *Anatolian Journal of Emergency Medicine*, 13–17.
- Arheden, H, Saeed, M, Higgins, CB, Gao, DW, Bremerich, J, Wyttenbach, R, Dae, MW, Wendland, MF (1999). Measurement of the distribution volume of gadopentetate dimeglumine at echo-planar MR imaging to quantify myocardial infarction: comparison with 99mTc-DTPA autoradiography in rats. *Radiology* 211, 698–708.
- Armstrong, AC, Gidding, S, Gjesdal, O, Wu, C, Bluemke, DA, Lima, JA (2012). LVM Assessed by Echocardiography and Cardiac Magnetic Resonance, Cardiovascular Outcomes, and Medical Practice. *JACC. Cardiovascular imaging* 5, 837–848.
- Arya, M, López, JA, Romo, GM, Cruz, MA, Kasirer-Friede, A, Shattil, SJ, Anvari, B (2003). Glycoprotein Ib-IX-mediated activation of integrin alpha(IIb)beta(3): effects of receptor clustering and von Willebrand factor adhesion. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 1, 1150–1157.
- Ashkenazi, A, Dixit, VM (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science (New York, N.Y.)* 281, 1305–1308.
- Ashkenazi, A, Pai, RC, Fong, S, Leung, S, Lawrence, DA, Marsters, SA, Blackie, C, Chang, L, McMurtrey, AE, Hebert, A, DeForge, L, Koumenis, IL, Lewis, D, Harris, L, Bussiere, J, Koeppen, H, Shahrokh, Z, Schwall, RH (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *The Journal of clinical investigation* 104, 155–162.
- Avcı, A., Fidan, S., Tabakçı, M.M., Toprak, C., Alizade, E., Acar, E., Bayam, E., Tellice, M., Naser, A., Kargın, R. (2016): Association between the Gensini Score and Carotid Artery Stenosis. *Korean circulation journal* 46.



- Baksi, AJ, Pennell, DJ (2013). T1 mapping in heart failure: from technique to prognosis, toward altering outcome. *Circulation. Cardiovascular imaging* 6, 861–863.
- Balabanian, K, Lagane, B, Infantino, S, Chow, KYC, Harriague, J, Moepps, B, Arenzana-Seisdedos, F, Thelen, M, Bachelier, F (2005). The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *The Journal of biological chemistry* 280, 35760–35766.
- Barteneva, NS, Ponomarev, ED, Tsytsykova, A, Armant, M, Vorobjev, IA (2014). Mitochondrial staining allows robust elimination of apoptotic and damaged cells during cell sorting. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 62, 265–275.
- Beutler, BA, Milsark, IW, Cerami, A (1985). Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 135, 3972–3977.
- Bevers, EM, Comfurius, P, Rijn, Jan L. M. L. Van, Hemker, HC (1982). Generation of Prothrombin-Converting Activity and the Exposure of Phosphatidylserine at the Outer Surface of Platelets. *European journal of biochemistry* 122, 429–436.
- Bhardwaj, A, Aggarwal, BB (2003). Receptor-mediated choreography of life and death. *Journal of clinical immunology* 23, 317–332.
- Bio-Rad Laboratories (2013). Bio-Plex Pro™ Cytokine, Chemokine, and Growth Factor Assays. Instruction Manual.
- Blair, P, Flaumenhaft, R (2009). Platelet  $\alpha$ -granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood reviews* 23, 177–189.
- Bocci, V (1991). Interleukins. *Clinical pharmacokinetics and practical implications. Clinical pharmacokinetics* 21, 274–284.
- Boldin, MP, Varfolomeev, EE, Pancer, Z, Mett, IL, Camonis, JH, Wallach, D (1995). A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *The Journal of biological chemistry* 270, 7795–7798.
- Borst, O, Münzer, P, Alnaggar, N, Geue, S, Tegtmeyer, R, Rath, D, Droppa, M, Seizer, P, Heitmeier, S, Heemskerk, JWM, Jennings, LK, Storey, RF, Angiolillo, DJ, Rocca, B, Spronk, H, Cate, H ten, Gawaz, M, Geisler, T (2018). Inhibitory mechanisms of very low-dose rivaroxaban in non-ST-elevation myocardial infarction. *Blood Adv* 2, 715–730.
- Bøtker, HE, Kaltoft, AK, Pedersen, SF, Kim, WY (2012). Measuring myocardial salvage. *Cardiovasc Res* 94, 266–275.
- Bradham, WS, Bozkurt, B, Gunasinghe, H, Mann, D, Spinale, FG (2002). Tumor necrosis factor-alpha and myocardial remodeling in progression of heart failure: a current perspective. *Cardiovasc Res* 53, 822–830.
- Bretscher, MS (1972). Asymmetrical Lipid Bilayer Structure for Biological Membranes. *Nature New Biology* 236, 11.
- Burns, JM, Summers, BC, Wang, Y, Melikian, A, Berahovich, R, Miao, Z, Penfold, MET, Sunshine, MJ, Littman, DR, Kuo, CJ, Wei, K, McMaster, BE, Wright, K, Howard, MC, Schall, TJ (2006). A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *The Journal of Experimental Medicine* 203, 2201–2213.

- Burns, RJ, Gibbons, RJ, Yi, Q, Roberts, RS, Miller, TD, Schaer, GL, Anderson, JL, Yusuf, S (2002). The relationships of left ventricular ejection fraction, end-systolic volume index and infarct size to six-month mortality after hospital discharge following myocardial infarction treated by thrombolysis. *Journal of the American College of Cardiology* 39.
- Carlsson, AC, Ruge, T, Kjoller, E, Hilden, J, Kolmos, HJ, Sajadieh, A, Kastrup, J, Jensen, GB, Larsson, A, Nowak, C, Jakobsen, JC, Winkel, P, Gluud, C, Arnlöv, J (2018). 10-Year Associations Between Tumor Necrosis Factor Receptors 1 and 2 and Cardiovascular Events in Patients With Stable Coronary Heart Disease: A CLARICOR (Effect of Clarithromycin on Mortality and Morbidity in Patients With Ischemic Heart Disease) Trial Substudy. *Journal of the American Heart Association* 7.
- Cerqueira, MD, Weissman, NJ, Dilsizian, V, Jacobs, AK, Kaul, S, Laskey, WK, Pennell, DJ, Rumberger, JA, Ryan, T, Verani, MS (2002). Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart. A statement for healthcare professionals from the Cardiac Imaging Committee of the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association. *Circulation* 105, 539–542.
- Chatterjee, M, Rath, D, Gawaz, M (2015). Role of chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 for platelet function. *Biochemical Society transactions* 43, 720–726.
- Chatterjee, M, Rath, D, Schlotterbeck, J, Rheinlaender, J, Walker-Allgaier, B, Annaggar, N, Zdanyte, M, Muller, I, Borst, O, Geisler, T, Schaffer, TE, Lammerhofer, M, Gawaz, M (2017). Regulation of oxidized platelet lipidome: implications for coronary artery disease. *European heart journal* 38, 1993–2005.
- Chatterjee, M, Seizer, P, Borst, O, Schönberger, T, Mack, A, Geisler, T, Langer, HF, May, AE, Vogel, S, Lang, F, Gawaz, M (2014). SDF-1 $\alpha$  induces differential trafficking of CXCR4-CXCR7 involving cyclophilin A, CXCR7 ubiquitination and promotes platelet survival. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28, 2864–2878.
- Cheng, J, Zhou, T, Liu, C, Shapiro, JP, Brauer, MJ, Kiefer, MC, Barr, PJ, Mountz, JD (1994). Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science (New York, N.Y.)* 263, 1759–1762.
- Chinnaiyan, AM, O'Rourke, K, Tewari, M, Dixit, VM (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505–512.
- Ciferri, S, Emiliani, C, Guglielmini, G, Orlacchio, A, Nenci, GG, Gresele, P (2000). Platelets release their lysosomal content in vivo in humans upon activation. *Thrombosis and haemostasis* 83, 157–164.
- Clemetson, KJ, Clemetson, JM (1995). Platelet GPIb-V-IX complex. Structure, function, physiology, and pathology. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 21, 130–136.
- Cooper, G.M. (2000). Structure of the Plasma Membrane. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 689.
- Coppinger, JA, Cagney, G, Toomey, S, Kislinger, T, Belton, O, McRedmond, JP, Cahill, DJ, Emili, A, Fitzgerald, DJ, Maguire, PB (2004). Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood* 103, 2096–2104.

- Dachary-Prigent, J, Freyssinet, JM, Pasquet, JM, Carron, JC, Nurden, AT (1993). Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation: a flow cytometry study showing a role for free sulfhydryl groups. *Blood* 81, 2554–2565.
- Dasgupta, SK, Argaiz, ER, Mercado, JEC, Maul, HOE, Garza, J, Enriquez, AB, Abdel-Monem, H, Prakasam, A, Andreeff, M, Thiagarajan, P (2010). Platelet senescence and phosphatidylserine exposure. *Transfusion* 50, 2167–2175.
- Degli-Esposti, MA, Dougall, WC, Smolak, PJ, Waugh, JY, Smith, CA, Goodwin, RG (1997). The Novel Receptor TRAIL-R4 Induces NF- $\kappa$ B and Protects against TRAIL-Mediated Apoptosis, yet Retains an Incomplete Death Domain. *Immunity* 7, 813–820.
- Deutsche Gesellschaft für Kardiologie (2018 a). Deutscher Herzbericht 2017: Kardiologische Versorgung auf hohem Niveau – Zuletzt leichte Anstiege bei Krankheitszahlen – Regionale Unterschiede bei der Sterblichkeit – Unterschiedliche Risiken von Frauen und Männern, 1–6.
- Deutsche Gesellschaft für Kardiologie (2018 b). Deutscher Herzbericht 2017: Immer weniger Herzinfarkt-Tote dank Fortschritten der modernen Herz-Medizin. Presstext DGK 01/2018, 1–3.
- Deutsche Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und Kreislaufforschung e.V. (2013). Kardiale Magnetresonanztomographie und Prognose nach STEMI – Ergebnisse einer deutschlandweiten multizentrischen Studie. Presstext DGK 04/2013.
- Devin, A, Cook, A, Lin, Y, Rodriguez, Y, Kelliher, M, Liu, Z-g (2000). The Distinct Roles of TRAF2 and RIP in IKK Activation by TNF-R1: TRAF2 Recruits IKK to TNF-R1 while RIP Mediates IKK Activation. *Immunity* 12, 419–429.
- Dimberg, LY, Anderson, CK, Camidge, R, Behbakht, K, Thorburn, A, Ford, HL (2013). On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics. *Oncogene* 32, 1341.
- Directive 2001/20/EC of the European Parliament and of the Council of 4 April 2001 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the member states relating to the implementation of good clinical practice in the conduct of clinical trials on medicinal products for human use. *Medical ethics & bioethics: journal of the Institute of Medical Ethics & Bioethics* (2002); 9, 12–19.
- Doltra, A, Amundsen, BH, Gebker, R, Fleck, E, Kelle, S (2013). Emerging Concepts for Myocardial Late Gadolinium Enhancement MRI. *Current Cardiology Reviews* 9, 185–190.
- Drake, TA, Morrissey, JH, Edgington, TS (1989). Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *The American journal of pathology* 134, 1087–1097.
- Edlich, F, Banerjee, S, Suzuki, M, Cleland, MM, Arnoult, D, Wang, C, Neutzner, A, Tjandra, N, Youle, RJ (2011). Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* 145, 104–116.
- Elmore, S (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic pathology* 35, 495–516.
- Engstrom, T, Kelbaek, H, Helqvist, S, Hofsten, DE, Klovgaard, L, Holmvang, L, Jorgensen, E, Pedersen, F, Saunamaki, K, Clemmensen, P, Backer, O de, Ravkilde, J, Tilsted, H-H, Villadsen, AB, Aaroe, J, Jensen, SE, Raungaard, B,

- Kober, L (2015). Complete revascularisation versus treatment of the culprit lesion only in patients with ST-segment elevation myocardial infarction and multivessel disease (DANAMI-3-PRIMULTI): an open-label, randomised controlled trial. *Lancet* (London, England) 386, 665–671.
- Fahim, MR, Halim, SM, Kamel, I (2004). Tumor necrosis factor alpha in patients with acute myocardial infarction. *The Egyptian journal of immunology* 11, 31–37.
- Fateh-Moghadam, S, Li, Z, Ersel, S, Reuter, T, Htun, P, Plöckinger, U, Bocksch, W, Dietz, R, Gawaz, M (2005). Platelet degranulation is associated with progression of intima-media thickness of the common carotid artery in patients with diabetes mellitus type 2. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25, 1299–1303.
- Feil, C, Augustin, HG (1998). Endothelial Cells Differentially Express Functional CXC-Chemokine Receptor-4 (CXCR-4/Fusin) under the Control of Autocrine Activity and Exogenous Cytokines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 247, 38–45.
- Fleck, RA, Rao, LV, Rapaport, SI, Varki, N (1990). Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody. *Thrombosis research* 59, 421–437.
- Flett, AS, Hasleton, J, Cook, C, Hausenloy, D, Quarta, G, Ariti, C, Muthurangu, V, Moon, JC (2011). Evaluation of techniques for the quantification of myocardial scar of differing etiology using cardiac magnetic resonance. *JACC. Cardiovascular imaging* 4, 150–156.
- Flössel, C, Luther, T, Müller, M, Albrecht, S, Kasper, M (1994). Immunohistochemical detection of tissue factor (TF) on paraffin sections of routinely fixed human tissue. *Histochemistry* 101, 449–453.
- Galis, ZS, Sukhova, GK, Lark, MW, Libby, P (1994). Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* 94, 2493–2503.
- Gaur, U, Aggarwal, BB (2003). Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochemical pharmacology* 66, 1403–1408.
- Gawaz, M, Langer, H, May, AE (2005). Platelets in inflammation and atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 115, 3378–3384.
- Geisler, T, Bhatt, DL (2004). The role of inflammation in atherothrombosis: current and future strategies of medical treatment. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 10, RA308-16.
- Geisler, T, Fekecs, L, Wurster, T, Chiribiri, A, Schuster, A, Nagel, E, Miller, S, Gawaz, M, Stellos, K, Bigalke, B (2012). Association of platelet-SDF-1 with hemodynamic function and infarct size using cardiac MR in patients with AMI. *European journal of radiology* 81, e486-90.
- Golebiewska, EM, Poole, AW (2015). Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood reviews* 29, 153–162.
- Gonzalez, L, Trigatti, BL (2017). Macrophage Apoptosis and Necrotic Core Development in Atherosclerosis: A Rapidly Advancing Field with Clinical Relevance to Imaging and Therapy. *The Canadian journal of cardiology* 33, 303–312.

- Granger, DN, Kvietys, PR (2015). Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept☆. *Redox Biology* 6, 524–551.
- Grebe, O, Kestler, HA, Merkle, N, Wöhrle, J, Kochs, M, Höher, M, Hombach, V (2004). Assessment of left ventricular function with steady-state-free-precession magnetic resonance imaging. *Zeitschrift für Kardiologie* 93, 686–695.
- Grell, M, Douni, E, Wajant, H, Lohden, M, Clauss, M, Maxeiner, B, Georgopoulos, S, Lesslauer, W, Kollias, G, Pfizenmaier, K, Scheurich, P (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83, 793–802.
- Grothues, F, Smith, GC, Moon, JCC, Bellenger, NG, Collins, P, Klein, HU, Pennell, DJ (2002). Comparison of interstudy reproducibility of cardiovascular magnetic resonance with two-dimensional echocardiography in normal subjects and in patients with heart failure or left ventricular hypertrophy. *The American journal of cardiology* 90, 29–34.
- Guidez, T, Marechaux, S, Pincon, C, Lamour, H, Barrailler, S, Decourcelle, V, Braun, S, Bouabdallaoui, N, Bauchart, J-J, Auffray, JL, Hennache, B, Juthier, F, Vincentelli, A, Asseman, P, van Belle, E, Ennezat, PV (2012). Addition of B-type natriuretic peptide to the GRACE score to predict outcome in acute coronary syndrome: a retrospective (development) and prospective (validation) cohort-based study. *Emergency medicine journal : EMJ* 29, 274–279.
- Halawa, B, Salomon, P, Jolda-Mydlowska, B, Zysko, D (1999). Levels of tumor necrosis factor (TNF-alpha) and interleukin 6 (IL-6) in serum of patients with acute myocardial infarction. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej* 101, 197–203.
- Hatakeyama, K, Asada, Y, Marutsuka, K, Sato, Y, Kamikubo, Y, Sumiyoshi, A (1997). Localization and activity of tissue factor in human aortic atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 133, 213–219.
- Heesen, M, Berman, MA, Charest, A, Housman, D, Gerard, C, Dorf, ME (1998). Cloning and chromosomal mapping of an orphan chemokine receptor: mouse RDC1. *Immunogenetics* 47, 364–370.
- Hengartner, MO (1999). Programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Recent progress in hormone research* 54, 213-22; discussion 222-4.
- Higgins, CB, Herfkens, R, Lipton, MJ, Sievers, R, Sheldon, P, Kaufman, L, Crooks, LE (1983). Nuclear magnetic resonance imaging of acute myocardial infarction in dogs: alterations in magnetic relaxation times. *The American journal of cardiology* 52, 184–188.
- Hill, MM, Adrain, C, Duriez, PJ, Creagh, EM, Martin, SJ (2004). Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *The EMBO journal* 23, 2134–2145.
- Hollstein, M, Rice, K, Greenblatt, MS, Soussi, T, Fuchs, R, Sorlie, T, Hovig, E, Smith-Sorensen, B, Montesano, R, Harris, CC (1994). Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic acids research* 22, 3551–3555.
- Hortmann, M, Robinson, S, Mohr, M, Haenel, D, Mauler, M, Stallmann, D, Reinöhl, J, Duerschmied, D, Peter, K, Bode, C, Ahrens, I (2017). Circulating HtrA2 as a novel biomarker for mitochondrial induced cardiomyocyte apoptosis and ischemia-reperfusion injury in ST-segment elevation myocardial infarction. *International journal of cardiology* 243, 485–491.

- Horvitz, HR (1999). Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer research* 59, 1701s-1706s.
- Hotchkiss, RS, Strasser, A, McDunn, JE, Swanson, PE (2009). Cell Death in Disease: Mechanisms and Emerging Therapeutic Concepts. *N Engl J Med* 361, 1570–1583.
- Hsu, H, Huang, J, Shu, HB, Baichwal, V, Goeddel, DV (1996a). TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* 4, 387–396.
- Hsu, H, Shu, HB, Pan, MG, Goeddel, DV (1996b). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84, 299–308.
- Hsu, H, Xiong, J, Goeddel, DV (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81, 495–504.
- Hu, X, Dai, S, Wu, W-J, Tan, W, Zhu, X, Mu, J, Guo, Y, Bolli, R, Rokosh, G (2007). Stromal Cell-Derived Factor-1 $\alpha$  Confers Protection Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: Role of the Cardiac Stromal Cell-Derived Factor-1 $\alpha$ -CXCR4 Axis. *Circulation* 116, 654–663.
- Huttin, O, Petit, M-A, Bozec, E, Eschalier, R, Juillière, Y, Moulin, F, Lemoine, S, Selton-Suty, C, Sadoul, N, Mandry, D, Beaumont, M, Felblinger, J, Girerd, N, Marie, P-Y (2015). Assessment of Left Ventricular Ejection Fraction Calculation on Long-axis Views From Cardiac Magnetic Resonance Imaging in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Medicine* 94.
- Ibanez, B, James, S, Agewall, S, Antunes, MJ, Bucciarelli-Ducci, C, Bueno, H, Caforio, ALP, Crea, F, Goudevenos, JA, Halvorsen, S, Hindricks, G, Kastrati, A, Lenzen, MJ, Prescott, E, Roffi, M, Valgimigli, M, Varenhorst, C, Vranckx, P, Widimsky, P (2018). 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal* 39, 119–177.
- ICH harmonized tripartite guideline: Guideline for Good Clinical Practice. (2001) *Journal of postgraduate medicine* 47, 45–50.
- Inaba, N, Sato, N, Ijichi, M, Fukazawa, I, Nito, A, Takamizawa, H, Luben, G, Bohn, H (1984). The immunocytochemical location of two membrane-associated placental tissue proteins in human and cynomolgus monkey placentae. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 5, 75–85.
- Inserte, J, Barba, I, Poncelas-Nozal, M, Hernando, V, Agullo, L, Ruiz-Meana, M, Garcia-Dorado, D (2011). cGMP/PKG pathway mediates myocardial postconditioning protection in rat hearts by delaying normalization of intracellular acidosis during reperfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology* 50, 903–909.
- Iwasaki, A, Suda, M, Nakao, H, Nagoya, T, Saino, Y, Arai, K, Mizoguchi, T, Sato, F, Yoshizaki, H, Hirata, M (1987). Structure and expression of cDNA for an inhibitor of blood coagulation isolated from human placenta: a new lipocortin-like protein. *Journal of biochemistry* 102, 1261–1273.
- Jarvis, GE, Atkinson, BT, Frampton, J, Watson, SP (2003). Thrombin-induced conversion of fibrinogen to fibrin results in rapid platelet trapping which is not

- dependent on platelet activation or GPIb. *British Journal of Pharmacology* 138, 574–583.
- Kang, YH, Park, M-G, Noh, K-H, Park, HR, Lee, HW, Son, SM, Park, K-P (2015). Low serum TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) levels are associated with acute ischemic stroke severity. *Atherosclerosis* 240, 228–233.
- Kaplan, R, Jaye, M, Burgess, WH, Schlaepfer, DD, Haigler, HT (1988). Cloning and expression of cDNA for human endonexin II, a Ca<sup>2+</sup> and phospholipid binding protein. *The Journal of biological chemistry* 263, 8037–8043.
- Kavuri, SM, Geserick, P, Berg, D, Dimitrova, DP, Feoktistova, M, Siegmund, D, Gollnick, H, Neumann, M, Wajant, H, Leverkus, M (2011). Cellular FLICE-inhibitory protein (cFLIP) isoforms block CD95- and TRAIL death receptor-induced gene induction irrespective of processing of caspase-8 or cFLIP in the death-inducing signaling complex. *The Journal of biological chemistry* 286, 16631–16646.
- Kawakami, H, Shigematsu, Y, Ohtsuka, T, Okayama, H, Hayashi, Y, Hara, Y, Kodama, K, Hamada, M, Hiwada, K (1998). Increased circulating soluble form of Fas in patients with dilated cardiomyopathy. *Japanese circulation journal* 62, 873–876.
- Kellman, P, Arai, AE (2012). Cardiac imaging techniques for physicians: Late enhancement. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 36, 529–542.
- Kerr, JFR, Wyllie, AH, Currie, AR (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer* 26, 239–257.
- Kile, BT (2014). The role of apoptosis in megakaryocytes and platelets. *British journal of haematology* 165, 217–226.
- Kim, HW, Farzaneh-Far, A, Kim, RJ (2009). Cardiovascular magnetic resonance in patients with myocardial infarction: current and emerging applications. *Journal of the American College of Cardiology* 55, 1–16.
- Kischkel, FC, Lawrence, DA, Chuntharapai, A, Schow, P, Kim, KJ, Ashkenazi, A (2000). Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 12, 611–620.
- Kitakaze, M (2010). How to mediate cardioprotection in ischemic hearts--accumulated evidence of basic research should translate to clinical medicine. *Cardiovascular drugs and therapy* 24, 217–223.
- Knight, RA, Ordidge, RJ, Helpern, JA, Chopp, M, Rodolosi, LC, Peck, D (1991). Temporal evolution of ischemic damage in rat brain measured by proton nuclear magnetic resonance imaging. *Stroke* 22, 802–808.
- Krumm, P, Martirosian, P, Rath, D, Zitzelsberger, T, Ruff, CA, Klumpp, BD, Nikolaou, K, Gawaz, M, Geisler, T, Schick, F, Kramer, U (2016). Signal decay mapping of myocardial edema using dual-contrast fast spin-echo MRI. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 44, 186–193.
- Kumar, A, Cannon, CP (2009). Acute Coronary Syndromes: Diagnosis and Management, Part I. *Mayo Clinic Proceedings* 84, 917–938.
- Lee, RL, Westendorf, J, Gold, MR (2007). Differential role of reactive oxygen species in the activation of mitogen-activated protein kinases and Akt by key receptors on B-lymphocytes: CD40, the B cell antigen receptor, and CXCR4. *Journal of cell communication and signaling* 1, 33–43.

- Levine, SJ (2008). Molecular mechanisms of soluble cytokine receptor generation. *The Journal of biological chemistry* 283, 14177–14181.
- Levoye, A, Balabanian, K, Baleux, F, Bachelier, F, Lagane, B (2009). CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood* 113, 6085–6093.
- Leytin, V (2012). Apoptosis in the anucleate platelet. *Blood reviews* 26, 51–63.
- Leytin, V, Allen, DJ, Lyubimov, E, Freedman, J (2007). Higher thrombin concentrations are required to induce platelet apoptosis than to induce platelet activation. *British journal of haematology* 136, 762–764.
- Liu, H, Xue, W, Ge, G, Luo, X, Li, Y, Xiang, H, Ding, X, Tian, P, Tian, X (2010). Hypoxic preconditioning advances CXCR4 and CXCR7 expression by activating HIF-1 $\alpha$  in MSCs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 401, 509–515.
- Locksley, RM, Killeen, N, Lenardo, MJ (2001). The TNF and TNF receptor super-families: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487–501.
- Lowe, JE, Reimer, KA, Jennings, RB (1978). Experimental infarct size as a function of the amount of myocardium at risk. *The American journal of pathology* 90, 363–379.
- Lu, D-Y, Tang, C-H, Yeh, W-L, Wong, K-L, Lin, C-P, Chen, Y-H, Lai, C-H, Chen, Y-F, Leung, Y-M, Fu, W-M (2009). SDF-1 $\alpha$  up-regulates interleukin-6 through CXCR4, PI3K/Akt, ERK, and NF-kappaB-dependent pathway in microglia. *European journal of pharmacology* 613, 146–154.
- Lüllmann-Rauch, R, Paulsen, F (2012). *Taschenlehrbuch Histologie*. 10 Tabellen. 4., vollständig überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- MacFarlane, M (2003). TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicology letters* 139, 89–97.
- Mahrholdt, H, Wagner, A, Judd, RM, Sechtem, U (2002). Assessment of myocardial viability by cardiovascular magnetic resonance imaging. *European heart journal* 23, 602–619.
- Manne, BK, Xiang, SC, Rondina, MT (2017). Platelet secretion in inflammatory and infectious diseases. *Platelets* 28, 155–164.
- Martin, SJ, Reutelingsperger, CP, McGahon, AJ, Rader, JA, van Schie, RC, LaFace, DM, Green, DR (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *The Journal of Experimental Medicine* 182, 1545–1556.
- Martorell, L, Martínez-González, J, Rodríguez, C, Gentile, M, Calvayrac, O, Badimon, L (2008). Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis. *Thrombosis and haemostasis* 99, 305–315.
- Maurer-Fogy, I, Reutelingsperger, CPM, Pieters, J, Bodo, G, Stratowa, C, Hauptmann, R (1988). Cloning and expression of cDNA for human vascular anticoagulant, a Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipid-binding protein. *European journal of biochemistry* 174, 585–592.
- Merten, M, Thiagarajan, P (2004). P-selectin in arterial thrombosis. *Zeitschrift für Kardiologie* 93, 855–863.
- Miguel, D de, Lemke, J, Anel, A, Walczak, H, Martinez-Lostao, L (2016). Onto better TRAILs for cancer treatment. *Cell Death and Differentiation* 23, 733–747.



- Mocanu, MM, Baxter, GF, Yellon, DM (2000). Caspase inhibition and limitation of myocardial infarct size: protection against lethal reperfusion injury. *British Journal of Pharmacology* 130, 197–200.
- Montalescot, G, Zeymer, U, Silvain, J, Boullenger, B, Cohen, M, Goldstein, P, Ecollan, P, Combes, X, Huber, K, Pollack, C, JR, Benezet, J-F, Stibbe, O, Filippi, E, Teiger, E, Cayla, G, Elhadad, S, Adnet, F, Chouihed, T, Gallula, S, Greffet, A, Aout, M, Collet, J-P, Vicaut, E (2011). Intravenous enoxaparin or unfractionated heparin in primary percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction: the international randomised open-label ATOLL trial. *Lancet (London, England)* 378, 693–703.
- Montant, P, Sigovan, M, Revel, D, Douek, P (2015). MR imaging assessment of myocardial edema with T2 mapping. *Diagnostic and Interventional Imaging* 96, 885–890.
- Morrow, DA, Antman, EM, Charlesworth, A, Cairns, R, Murphy, SA, Lemos, JA de, Giugliano, RP, McCabe, CH, Braunwald, E (2000). TIMI Risk Score for ST-Elevation Myocardial Infarction: A Convenient, Bedside, Clinical Score for Risk Assessment at Presentation. *Circulation* 102, 2031–2037.
- Mueller, M, Celik, S, Biener, M, Vafaie, M, Schwoebel, K, Wollert, KC, Januzzi, JL, Katus, HA, Giannitsis, E (2012). Diagnostic and prognostic performance of a novel high-sensitivity cardiac troponin T assay compared to a contemporary sensitive cardiac troponin I assay in patients with acute coronary syndrome. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society* 101, 837–845.
- Müller, A, Homey, B, Soto, H, Ge, N, Catron, D, Buchanan, ME, McClanahan, T, Murphy, E, Yuan, W, Wagner, SN, Barrera, JL, Mohar, A, Verástegui, E, Zlotnik, A (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50–56.
- Munzer, P, Borst, O, Walker, B, Schmid, E, Feijge, MAH, Cosemans, Judith M E M, Chatterjee, M, Schmidt, E-M, Schmidt, S, Towhid, ST, Leibrock, C, Elvers, M, Schaller, M, Seizer, P, Ferlinz, K, May, AE, Gulbins, E, Heemskerk, JWM, Gawaz, M, Lang, F (2014). Acid sphingomyelinase regulates platelet cell membrane scrambling, secretion, and thrombus formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 34, 61–71.
- Nagata, S, Suzuki, J, Segawa, K, Fujii, T (2016). Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. *Cell Death and Differentiation* 23, 952–961.
- Naudé, PJW, den Boer, JA, Luiten, PGM, Eisel, ULM (2011). Tumor necrosis factor receptor cross-talk. *The FEBS journal* 278, 888–898.
- Neumann, F-J, Byrne, RA, Gawaz, M, Hoffmeister, HM, Schäfer, A, Trenk, D, Massberg, S (2018). Kommentar zu der Leitlinienaktualisierung (2017) der ESC zur dualen antithrombozytären Therapie (DAPT) bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit. *Kardiologie* 12, 250–261.
- Nicolosi, GL, Latini, R, Marino, P, Maggioni, AP, Barlera, S, Franzosi, MG, Geraci, E, Santoro, L, Tavazzi, L, Tognoni, G, Vecchio, C, Volpi, A (1996). The prognostic value of pre-discharge quantitative two-dimensional echocardiographic measurements and the effects of early lisinopril treatment on left ventricular structure and function after acute myocardial infarction in the GISSI-3 Trial. *Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico. European heart journal* 17.

- Niessner, A, Hohensinner, PJ, Rychli, K, Neuhold, S, Zorn, G, Richter, B, Huls-  
mann, M, Berger, R, Mortl, D, Huber, K, Wojta, J, Pacher, R (2009). Prognos-  
tic value of apoptosis markers in advanced heart failure patients. *European  
heart journal* 30, 789–796.
- Nieswandt, B, Pleines, I, Bender, M (2011). Platelet adhesion and activation me-  
chanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *Journal of thrombosis  
and haemostasis : JTH* 9 Suppl 1, 92–104.
- Nilsson, L, Szymanowski, A, Swahn, E, Jonasson, L (2013). Soluble TNF Recept-  
ors Are Associated with Infarct Size and Ventricular Dysfunction in ST-Eleva-  
tion Myocardial Infarction. *PLoS ONE* 8.
- O'Gara, PT, Kushner, FG, Ascheim, DD, Casey, DE, Chung, MK, Lemos, JA de,  
Ettinger, SM, Fang, JC, Fesmire, FM, Franklin, BA, Granger, CB, Krumholz,  
HM, Linderbaum, JA, Morrow, DA, Newby, LK, Ornato, JP, Ou, N, Radford,  
MJ, Tamis-Holland, JE, Tommaso, CL, Tracy, CM, Woo, YJ, Zhao, DX (2013).  
2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of ST-Elevation Myocardial  
Infarction. *Circulation* 127.
- Okura, T, Watanabe, S, Jiang, Y, Nakamura, M, Takata, Y, Yang, Z-H, Kohara,  
K, Kitami, Y, Hiwada, K (2002). Soluble Fas ligand and atherosclerosis in hy-  
pertensive patients. *Journal of hypertension* 20, 895–898.
- Oldaker, TA (2007). Quality control in clinical flow cytometry. *Clinics in laboratory  
medicine* 27, 671-85, viii.
- Osmancik, P, Teringova, E, Tousek, P, Paulu, P, Widimsky, P (2013). Prognostic  
Value of TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) in Acute Coronary  
Syndrome Patients. *PLoS ONE* 8.
- Owens, AP, Mackman, N (2012). Sources of Tissue Factor that contribute to  
Thrombosis after Rupture of an Atherosclerotic Plaque. *Thrombosis research*  
129, S30-3.
- Perfetto, SP, Ambrozak, D, Nguyen, R, Chattopadhyay, P, Roederer, M (2006).  
Quality assurance for polychromatic flow cytometry. *Nature protocols* 1, 1522–  
1530.
- Perry, SW, Norman, JP, Barbieri, J, Brown, EB, Gelbard, HA (2011). Mitochond-  
rial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage  
guide. *BioTechniques* 50, 98–115.
- Piper, HM, Garcia-Dorado, D, Ovize, M (1998). A fresh look at reperfusion injury.  
*Cardiovascular research* 38, 291–300.
- Pitsilos, S, Hunt, J, Mohler, ER, Prabhakar, AM, Poncz, M, Dawicki, J, Khalapyan,  
TZ, Wolfe, ML, Fairman, R, Mitchell, M, Carpenter, J, Golden, MA, Cines, DB,  
Sachais, BS (2003). Platelet factor 4 localization in carotid atherosclerotic  
plaques: correlation with clinical parameters. *Thrombosis and haemostasis*  
90, 1112–1120.
- Princen, K, Hatse, S, Vermeire, K, Clercq, E de, Schols, D (2003). Evaluation of  
SDF-1/CXCR4-induced Ca<sup>2+</sup> signaling by fluorometric imaging plate reader  
(FLIPR) and flow cytometry. *Cytometry. Part A : the journal of the International  
Society for Analytical Cytology* 51, 35–45.
- Rath, D, Chatterjee, M, Borst, O, Müller, K, Langer, H, Mack, AF, Schwab, M,  
Winter, S, Gawaz, M, Geisler, T (2015). Platelet surface expression of stromal  
cell-derived factor-1 receptors CXCR4 and CXCR7 is associated with clinical

- outcomes in patients with coronary artery disease. *Journal of thrombosis and haemostasis*: JTH 13, 719–728.
- Rath, D, Chatterjee, M, Borst, O, Müller, K, Stellos, K, Mack, AF, Bongartz, A, Bigalke, B, Langer, H, Schwab, M, Gawaz, M, Geisler, T (2014). Expression of stromal cell-derived factor-1 receptors CXCR4 and CXCR7 on circulating platelets of patients with acute coronary syndrome and association with left ventricular functional recovery. *European heart journal* 35, 386–394.
- Rath D, Chatterjee M, Meyer L, Tekath N, Olma C, Krumm P, Adams C, Borst O, Müller K, Droppa M, Nikolaou K, Riethmüller J, Gawaz M, Geisler T. Relative survival potential of platelets is associated with platelet CXCR4/CXCR7 surface exposure and functional recovery following STEMI. *Atherosclerosis*. 2018 Nov; 278:269-277. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.10.008. Epub 2018 Oct 6. PMID: 30342381
- Rath, D, Ungern-Sternberg, Sv, Heinzmann, D, Sigle, M, Monzien, M, Horstmann, K, Schaeffeler, E, Winter, S, Müller, K, Grogga-Bada, P, Zdanyte, M, Borst, O, Zerneck, A, Gawaz, M, Martus, P, Schwab, M, Geisler, T, Seizer, P (2019). Platelet surface expression of cyclophilin A is associated with increased mortality in patients with symptomatic coronary artery disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*.
- Rauert, H, Wicovsky, A, Müller, N, Siegmund, D, Spindler, V, Waschke, J, Kneitz, C, Wajant, H (2010). Membrane Tumor Necrosis Factor (TNF) Induces p100 Processing via TNF Receptor-2 (TNFR2)\*. *The Journal of biological chemistry* 285, 7394–7404.
- Rendu, F, Brohard-Bohn, B (2001). The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 12, 261–273.
- Reutelingsperger, CP, Hornstra, G, Hemker, HC (1985). Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord. *European journal of biochemistry* 151, 625–629.
- Richter, C, Messerschmidt, S, Holeiter, G, Tepperink, J, Osswald, S, Zappe, A, Branschädel, M, Boschert, V, Mann, DA, Scheurich, P, Krippner-Heidenreich, A (2012). The Tumor Necrosis Factor Receptor Stalk Regions Define Responsiveness to Soluble versus Membrane-Bound Ligand. *Molecular and Cellular Biology* 32, 2515–2529.
- Roland, J, Murphy, BJ, Ahr, B, Robert-Hebmann, V, Delauzun, V, Nye, KE, Devaux, C, Biard-Piechaczyk, M (2003). Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling. *Blood* 101, 399–406.
- Ross, R (1999). Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *N Engl J Med* 340, 115–126.
- Rothe, M, Sarma, V, Dixit, VM, Goeddel, DV (1995). TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science (New York, N.Y.)* 269, 1424–1427.
- Rothe, M, Wong, SC, Henzel, WJ, Goeddel, DV (1994). A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 78, 681–692.
- Roy, S, Nicholson, DW (2000). Cross-Talk in Cell Death Signaling. *The Journal of Experimental Medicine* 192, f21-6.
- Russell, R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease.

- Sabate, M, Brugaletta, S, Cequier, A, Iniguez, A, Serra, A, Jimenez-Quevedo, P, Mainar, V, Campo, G, Tespili, M, den Heijer, P, Bethencourt, A, Vazquez, N, van Es, GA, Backx, B, Valgimigli, M, Serruys, PW (2016). Clinical outcomes in patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated with everolimus-eluting stents versus bare-metal stents (EXAMINATION): 5-year results of a randomised trial. *Lancet (London, England)* 387, 357–366.
- Saelens, X, Festjens, N, Vande Walle, L, van Gurp, M, van Loo, G, Vandenamele, P (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23, 2861–2874.
- Sahinarslan, A, Boyaci, B, Kocaman, SA, Topal, S, Ercin, U, Okyay, K, Bukan, N, Yalçın, R, Cengel, A (2012). The Relationship of Serum Soluble Fas Ligand (sFasL) Level with the Extent of Coronary Artery Disease. *The International Journal of Angiology : Official Publication of the International College of Angiology, Inc* 21, 29–34.
- Sanada, S, Komuro, I, Kitakaze, M (2011). Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 301, H1723-41.
- Saraste, A, Pulkki, K, Kallajoki, M, Henriksen, K, Parvinen, M, Voipio-Pulkki, LM (1997). Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 95, 320–323.
- Scaduto, RC, Grotyohann, LW (1999). Measurement of Mitochondrial Membrane Potential Using Fluorescent Rhodamine Derivatives. *Biophysical Journal* 76, 469–477.
- Schafer, C, Ladilov, Y, Inserte, J, Schafer, M, Haffner, S, Garcia-Dorado, D, Piper, HM (2001). Role of the reverse mode of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovascular research* 51, 241–250.
- Schleicher, RI, Reichenbach, F, Kraft, P, Kumar, A, Lescan, M, Todt, F, Göbel, K, Hilgendorf, I, Geisler, T, Bauer, A, Olbrich, M, Schaller, M, Wesselborg, S, O'Reilly, L, Meuth, SG, Schulze-Osthoff, K, Gawaz, M, Li, X, Kleinschnitz, C, Edlich, F, Langer, HF (2015). Platelets induce apoptosis via membrane-bound FasL. *Blood* 126, 1483–1493.
- Schneider, P, Holler, N, Bodmer, JL, Hahne, M, Frei, K, Fontana, A, Tschopp, J (1998). Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *The Journal of Experimental Medicine* 187, 1205–1213.
- Schoenwaelder, SM, Yuan, Y, Josefsson, EC, White, MJ, Yao, Y, Mason, KD, O'Reilly, LA, Henley, KJ, Ono, A, Hsiao, S, Willcox, A, Roberts, AW, Huang, DCS, Salem, HH, Kile, BT, Jackson, SP (2009). Two distinct pathways regulate platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant function. *Blood* 114, 663–666.
- Schulz-Menger, J, Bluemke, DA, Bremerich, J, Flamm, SD, Fogel, MA, Friedrich, MG, Kim, RJ, Knobelsdorff-Brenkenhoff, F von, Kramer, CM, Pennell, DJ, Plein, S, Nagel, E (2013). Standardized image interpretation and post processing in cardiovascular magnetic resonance: Society for Cardiovascular Magnetic Resonance (SCMR) board of trustees task force on standardized post

- processing. *Journal of cardiovascular magnetic resonance : official journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance* 15, 35.
- Secchiero, P, Corallini, F, Ceconi, C, Parrinello, G, Volpato, S, Ferrari, R, Zauli, G (2009). Potential Prognostic Significance of Decreased Serum Levels of TRAIL after Acute Myocardial Infarction. *PLOS ONE* 4, e4442.
- Shah, PK (2003). Mechanisms of plaque vulnerability and rupture. *Journal of the American College of Cardiology* 41, 15S-22S.
- Shimizu, M, Fukuo, K, Nagata, S, Suhara, T, Okuro, M, Fujii, K, Higashino, Y, Mogi, M, Hatanaka, Y, Ogihara, T (2002). Increased plasma levels of the soluble form of fas ligand in patients with acute myocardial infarction and unstable angina pectoris. *Journal of the American College of Cardiology* 39, 585–590.
- Smits, PC, Abdel-Wahab, M, Neumann, F-J, Boxma-de Klerk, BM, Lunde, K, Schotborgh, CE, Piroth, Z, Horak, D, Wlodarczak, A, Ong, PJ, Hambrecht, R, Angeras, O, Richardt, G, Omerovic, E (2017). Fractional Flow Reserve-Guided Multivessel Angioplasty in Myocardial Infarction. *The New England journal of medicine* 376, 1234–1244.
- Solum, NO (1999). Procoagulant Expression in Platelets and Defects Leading to Clinical Disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 2841–2846.
- Soriano, ME, Scorrano, L (2011). Traveling Bax and Forth from Mitochondria to Control Apoptosis. *Cell* 145, 15–17.
- Stanger, BZ, Leder, P, Lee, TH, Kim, E, Seed, B (1995). RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* 81, 513–523.
- Statistisches Bundesamt (Destatis) (2019 a). Häufigste Todesursachen 2017. URL: [www.destatis.de](http://www.destatis.de) (Thematische Recherche: Gesellschaft und Umwelt - Gesundheit - Todesursachen- Dokumentart: Grafik 2 von 3) (Aufruf am 12.08.2019).
- Statistisches Bundesamt (Destatis) (2019 b). Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Sterbefälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen insgesamt 2017. URL: [www.destatis.de](http://www.destatis.de) (Thematische Recherche: Gesellschaft und Umwelt - Gesundheit - Todesursachen- Dokumentart: Tabelle - Anzahl der Gestorbenen durch Herz-Kreislauserkrankungen)). (Aufruf am 13.08.2019).
- Steg, PG, James, SK, Atar, D, Badano, LP, Blomstrom-Lundqvist, C, Borger, MA, Di Mario, C, Dickstein, K, Ducrocq, G, Fernandez-Aviles, F, Gershlick, AH, Giannuzzi, P, Halvorsen, S, Huber, K, Juni, P, Kastrati, A, Knuuti, J, Lenzen, MJ, Mahaffey, KW, Valgimigli, M, van 't Hof, A, Widimsky, P, Zahger, D (2012). ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *European heart journal* 33, 2569–2619.
- Stellos, K, Bigalke, B, Langer, H, Geisler, T, Schad, A, Kögel, A, Pfaff, F, Stakos, D, Seizer, P, Müller, I, Htun, P, Lindemann, S, Gawaz, M (2009). Expression of stromal-cell-derived factor-1 on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndrome and correlates with the number of CD34+ progenitor cells. *European heart journal* 30, 584–593.
- Stellos, K, Langer, H, Daub, K, Schoenberger, T, Gauss, A, Geisler, T, Bigalke, B, Mueller, I, Schumm, M, Schaefer, I, Seizer, P, Kraemer, BF, Siegel-Axel,

- D, May, AE, Lindemann, S, Gawaz, M (2008). Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34+ cells to endothelial progenitor cells. *Circulation* 117, 206–215.
- Stellos, K, Ruf, M, Sopova, K, Kiliyas, A, Rahmann, A, Stamatelopoulos, K, Jorbenadze, R, Geisler, T, Gawaz, M, Bigalke, B (2011). Plasma levels of stromal cell-derived factor-1 in patients with coronary artery disease: effect of clinical presentation and cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis* 219, 913–916.
- Suda, T, Takahashi, T, Golstein, P, Nagata, S (1993). Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75, 1169–1178.
- Sun, X, Cheng, G, Hao, M, Zheng, J, Zhou, X, Zhang, J, Taichman, RS, Pienta, KJ, Wang, J (2010). CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis and Cancer Progression. *Cancer metastasis reviews* 29, 709–722.
- Suzuki, Y, Imai, Y, Nakayama, H, Takahashi, K, Takio, K, Takahashi, R (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Molecular cell* 8, 613–621.
- Szymanowski, A (2015). Detection of apoptosis in patients with coronary artery disease : Assessment of temporal patterns and potential sources.
- Teringova, E, Kozel, M, Knot, J, Kocka, V, Benesova, K, Tousek, P (2018). Relationship between TRAIL and Left Ventricular Ejection Fraction in Patients with ST-Elevation Myocardial Infarction Treated with Primary Percutaneous Coronary Intervention. *BioMed Research International* 2018.
- Teringova, E, Tousek, P (2017). Apoptosis in ischemic heart disease. *Journal of Translational Medicine* 15.
- Thygesen, K, Alpert, JS, Jaffe, AS, Simoons, ML, Chaitman, BR, White, HD, Katus, HA, Apple, FS, Lindahl, B, Morrow, DA, Chaitman, BA, Clemmensen, PM, Johanson, P, Hod, H, Underwood, R, Bax, JJ, Bonow, RO, Pinto, F, Gibbons, RJ, Fox, KA, Atar, D, Newby, LK, Galvani, M, Hamm, CW, Uretsky, BF, Steg, PG, Wijns, W, Bassand, J-P, Menasche, P, Ravkilde, J, Ohman, EM, Antman, EM, Wallentin, LC, Armstrong, PW, Januzzi, JL, Nieminen, MS, Gheorghide, M, Filippatos, G, Luepker, RV, Fortmann, SP, Rosamond, WD, Levy, D, Wood, D, Smith, SC, Hu, D, Lopez-Sendon, J-L, Robertson, RM, Weaver, D, Tendera, M, Bove, AA, Parkhomenko, AN, Vasilieva, EJ, Mendis, S (2012). Third universal definition of myocardial infarction. *European heart journal* 33, 2551–2567.
- Tian, M, Yuan, Y-C, Li, J-Y, Gionfriddo, MR, Huang, R-C (2015). Tumor necrosis factor- $\alpha$  and its role as a mediator in myocardial infarction: A brief review. *Chronic Diseases and Translational Medicine* 1, 18–26.
- Tsutamoto, T, Wada, A, Maeda, K, Mabuchi, N, Hayashi, M, Tsutsui, T, Ohnishi, M, Fujii, M, Matsumoto, T, Yamamoto, T, Takayama, T, Kinoshita, M (2001). Relationship between plasma levels of cardiac natriuretic peptides and soluble Fas: plasma soluble Fas as a prognostic predictor in patients with congestive heart failure. *Journal of cardiac failure* 7, 322–328.
- Tubaro, M (2018). ESC 2017 STEMI Guidelines: a step forward for a better cure. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother* 4, 133–135.
- Ueland, T, Kjekshus, J, Froland, SS, Omland, T, Squire, IB, Gullestad, L, Dickstein, K, Aukrust, P (2005). Plasma levels of soluble tumor necrosis factor

- receptor type I during the acute phase following complicated myocardial infarction predicts survival in high-risk patients. *Journal of the American College of Cardiology* 46, 2018–2021.
- Valgimigli, M, Ceconi, C, Malagutti, P, Merli, E, Soukhomovskaia, O, Francolini, G, Cicchitelli, G, Olivares, A, Parrinello, G, Percoco, G, Guardigli, G, Mele, D, Pirani, R, Ferrari, R (2005). Tumor necrosis factor-alpha receptor 1 is a major predictor of mortality and new-onset heart failure in patients with acute myocardial infarction: the Cytokine-Activation and Long-Term Prognosis in Myocardial Infarction (C-ALPHA) study. *Circulation* 111, 863–870.
- Valgimigli, M, Gagnor, A, Calabro, P, Frigoli, E, Leonardi, S, Zaro, T, Rubartelli, P, Briguori, C, Ando, G, Repetto, A, Limbruno, U, Cortese, B, Sganzerla, P, Lupi, A, Galli, M, Colangelo, S, Ierna, S, Ausiello, A, Presbitero, P, Sardella, G, Varbella, F, Esposito, G, Santarelli, A, Tresoldi, S, Nazzaro, M, Zingarelli, A, Cesare, N de, Rigattieri, S, Tosi, P, Palmieri, C, Brugaletta, S, Rao, SV, Heg, D, Rothenbuhler, M, Vranckx, P, Juni, P (2015). Radial versus femoral access in patients with acute coronary syndromes undergoing invasive management: a randomised multicentre trial. *Lancet (London, England)* 385, 2465–2476.
- Van Engeland, M, Nieland, LJW, Ramaekers, FCS, Schutte, B, Reutelingsperger, CPM (1998). Annexin V-Affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31, 1–9.
- Varga-Szabo, D, Pleines, I, Nieswandt, B (2008). Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28, 403–412.
- Vogel, S, Rath, D, Borst, O, Mack, A, Loughran, P, Lotze, MT, Neal, MD, Billiar, TR, Gawaz, M (2016). Platelet-derived high-mobility group box 1 promotes recruitment and suppresses apoptosis of monocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 478, 143–148.
- Vogel-Claussen, J, Finn, JP, Gomes, AS, Hundley, GW, Jerosch-Herold, M, Pearson, G, Sinha, S, Lima, JAC, Bluemke, DA (2006). Left ventricular papillary muscle mass: relationship to left ventricular mass and volumes by magnetic resonance imaging. *Journal of computer assisted tomography* 30, 426–432.
- Voller, A, Bartlett, A, Bidwell, DE (1978). Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *Journal of clinical pathology* 31, 507–520.
- Volpato, S, Ferrucci, L, Secchiero, P, Corallini, F, Zuliani, G, Fellin, R, Guralnik, JM, Bandinelli, S, Zauli, G (2011). Association of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand with total and cardiovascular mortality in older adults. *Atherosclerosis* 215, 452–458.
- Wachter, T, Sprick, M, Hausmann, D, Kerstan, A, McPherson, K, Stassi, G, Bröcker, E-B, Walczak, H, Leverkus, M (2004). cFLIPL inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated NF-kappaB activation at the death-inducing signaling complex in human keratinocytes. *The Journal of biological chemistry* 279, 52824–52834.
- Wagner, A, Mahrholdt, H, Holly, TA, Elliott, MD, Regenfus, M, Parker, M, Klocke, FJ, Bonow, RO, Kim, RJ, Judd, RM (2003). Contrast-enhanced MRI and routine single photon emission computed tomography (SPECT) perfusion imaging for detection of subendocardial myocardial infarcts: an imaging study. *The Lancet* 361, 374–379.

- Wajant, H (2002). The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* (New York, N.Y.) 296, 1635–1636.
- Wald, DS, Morris, JK, Wald, NJ, Chase, AJ, Edwards, RJ, Hughes, LO, Berry, C, Oldroyd, KG (2013). Randomized trial of preventive angioplasty in myocardial infarction. *The New England journal of medicine* 369, 1115–1123.
- White, JG, Clawson, CC (1980). The surface-connected canalicular system of blood platelets--a fenestrated membrane system. *The American journal of pathology* 101, 353–364.
- Wiesner, G, Grimm, J, Bittner, E (2002). Vorausberechnungen des Herzinfarktgeschehens in Deutschland Zur Entwicklung von Inzidenz und Prävalenz bis zum Jahre 2050 : Zur Entwicklung von Inzidenz und Prävalenz bis zum Jahre 2050. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 45, 438–445.
- Wiesner, P, Tafelmeier, M, Chittka, D, Choi, S-H, Zhang, L, Byun, YS, Almazan, F, Yang, X, Iqbal, N, Chowdhury, P, Maisel, A, Witztum, JL, Handel, TM, Tsimikas, S, Miller, YI (2013). MCP-1 binds to oxidized LDL and is carried by lipoprotein(a) in human plasma. *Journal of lipid research* 54, 1877–1883.
- Willoughby, S, Holmes, A, Loscalzo, J (2002). Platelets and cardiovascular disease. *European journal of cardiovascular nursing : journal of the Working Group on Cardiovascular Nursing of the European Society of Cardiology* 1, 273–288.
- World Medical Association declaration of Helsinki (1997). Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. *JAMA* 277, 925–926.
- Wu, Y, Pan, N, An, Y, Xu, M, Tan, L, Zhang, L (2020). Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Myocardial Infarction. *Frontiers in cardiovascular medicine* 7, 617277.
- Yamaguchi, J-i, Kusano, KF, Masuo, O, Kawamoto, A, Silver, M, Murasawa, S, Bosch-Marce, M, Masuda, H, Losordo, DW, Isner, JM, Asahara, T (2003). Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 107, 1322–1328.
- Yellon, DM, Hausenloy, DJ (2007). Myocardial reperfusion injury. *The New England journal of medicine* 357, 1121–1135.
- Yoshie, O, Imai, T, Nomiya, H (2001). Chemokines in immunity. *Advances in immunology* 78, 57–110.
- Zaret, BL, Wackers, FJ, Terrin, ML, Forman, SA, Williams, DO, Knatterud, GL, Braunwald, E (1995). Value of radionuclide rest and exercise left ventricular ejection fraction in assessing survival of patients after thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: results of Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) phase II study. The TIMI Study Group. *Journal of the American College of Cardiology* 26.
- Zhang, D, Fan, G-C, Zhou, X, Zhao, T, Pasha, Z, Xu, M, Zhu, Y, Ashraf, M, Wang, Y (2008). Over-expression of CXCR4 on mesenchymal stem cells augments myoangiogenesis in the infarcted myocardium. *Journal of molecular and cellular cardiology* 44, 281–292.
- Zhang, H, Nimmer, PM, Tahir, SK, Chen, J, Fryer, RM, Hahn, KR, Iciek, LA, Morgan, SJ, Nasarre, MC, Nelson, R, Preusser, LC, Reinhart, GA, Smith, ML,



- Rosenberg, SH, Elmore, SW, Tse, C (2007). Bcl-2 family proteins are essential for platelet survival. *Cell Death and Differentiation* 14, 943–951.
- Zhou, J, Chew, M, Ravn, HB, Falk, E (1999). Plaque pathology and coronary thrombosis in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum* 230, 3–11.
- Zlotnik, A, Yoshie, O (2000). Chemokines. *Immunity* 12, 121–127.
- Zlotnik, A, Yoshie, O, Nomiyama, H (2006). The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome biology* 7, 243.
- Zou, H, Li, Y, Liu, X, Wang, X (1999). An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *The Journal of biological chemistry* 274, 11549–11556.
- Zou, Y-R, Kottmann, AH, Kuroda, M, Taniuchi, I, Littman, DR (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393, 595.
- Zwaal, RFA, Comfurius, P, Deenen, L. L. M. Van (1977). Membrane asymmetry and blood coagulation. *Nature* 268, 358.

## 8 Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde in der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik, Abteilung Innere Medizin III, unter Betreuung durch Herrn Prof. Dr. med. Tobias Geisler verfasst. Die Konzeption dieser Studie erfolgte durch mich in enger Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. med. Tobias Geisler und Herrn PD Dr. med. Dr. med. univ. Dominik Rath. Die Publikation in der Zeitschrift "Atherosclerosis" in der weite Teile dieser Arbeit veröffentlicht wurden, ist durch Herrn PD Dr. med. Dr. med. univ. Dominik Rath als Erstautor und Prof. Dr. med. Tobias Geisler als korrespondierender Autor angefertigt worden.

Die Messungen der Serumapoptosemarker mittels Bioplex wurden im Forschungslabor des Universitätsklinikums Tübingen durch Frau Ingrid Eppe sorgfältig und mit großer Erfahrung durchgeführt.

Die durchflusszytometrischen Messungen von TMRE, Annexin V, CXCR4 sowie CXCR7 wurden von Frau Lydia Laptev durchgeführt.

Die MRT Daten zur LVEF sowie Messungen zur Infarktgröße sind durch Herrn PD Dr. Patrick Krumm, Oberarzt der Abteilung für diagnostische und interventionelle Radiologie, freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden.

Die statistische Auswertung des Datensatzes und die Erstellung der Diagramme erfolgte nach Anleitung durch PD Dr. med. Dr. med. univ. Dominik Rath durch mich eigenständig. Die Literaturrecherche wurde ebenfalls selbstständig durch mich durchgeführt. Die Erhebung der Basischarakteristika sowie das Nachverfolgen der STEMI-Patienten gehörte zu meinem Zuständigkeitsbereich. Diese Daten standen dann auch anderen Doktoranden der Arbeitsgruppe zur Verfügung.

Ich versichere hiermit, die hier vorliegende Dissertationsschrift selbstständig verfasst und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 01.10.2021

## 9 Liste der Veröffentlichungen

Weite Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Rath D, Chatterjee M, Meyer L, Tekath N, Olma C, Krumm P, Adams C, Borst O, Müller K, Droppa M, Nikolaou K, Riethmüller J, Gawaz M, Geisler T. Relative survival potential of platelets is associated with platelet CXCR4/CXCR7 surface exposure and functional recovery following STEMI. *Atherosclerosis*. 2018 Nov; 278:269-277. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.10.008. Epub 2018 Oct 6. PMID: 30342381

## 10 Danksagung

Mein vornehmlicher Dank gilt Prof. Dr. Tobias Geisler und die Möglichkeit als Mitglied seiner Arbeitsgruppe eine Promotionsarbeit zu verfassen.

Ich danke auch PD Dr. med. Dr. med. univ. Dominik Rath als Betreuer dieser Arbeit. Ohne seine Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank für die Hilfe bei der statistischen Auswertung, für die große Geduld bei der Beantwortung meiner Fragen über einen langen Zeitraum und für das Korrekturlesen der schriftlichen Ausführungen.

Ich möchte mich auch bei den Mitarbeiterinnen im Forschungslabor des Universitätsklinikums Tübingen für die sorgfältige Durchführung der Messungen bedanken.

Außerdem gilt mein Dank meiner Mutter sowie meinem Mann, ohne eure Motivation und Hilfe wäre diese Arbeit nie beendet worden. Ihr seid mein Fels in der Brandung.

Danke liebe Lina, dass du mir in schwierigen Zeiten stets gut zugeredet hast und du deine wertvollen Erfahrungen im Studium und beim Verfassen einer Dissertation an mich weitergegeben hast.