

Aus der medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin III

Schwerpunkt: Kardiologie und Kreislauferkrankungen

Einfluss der thrombozytären SDF-1 (CXCL12)
Oberflächenexpression auf den klinischen Verlauf bei
Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Bongartz, Angela Florentina

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Gawaz

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Bitzer

Tag der Disputation: 08.01.2018

Weite Teile der vorgelegten Arbeit wurden veröffentlicht:

Rath, D., Chatterjee, M., Bongartz, A., Müller, K., Droppa, M., Stimpfle, F., Borst, O., Zuern, C., Vogel, S., Gawaz, M., Geisler, T. *Platelet surface expression of SDF-1 is associated with clinical outcomes in the patients with cardiovascular disease*. Platelets, 2016: p. 1-6

Für meine Eltern in größter Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis.....	7
2. Einleitung.....	9
2.4 Die koronare Atherosklerose	9
2.5 Die Entstehung der koronaren Atherosklerose	10
2.6 Die Pathogenese der Atherosklerose	11
2.7 Koronare Herzkrankheiten (KHK)	12
2.7.1 Definition	12
2.7.2 Die stabile Angina Pectoris (SAP).....	13
2.7.3 Das akute Koronarsyndrom (ACS).....	14
2.8 Thrombozyten	15
2.8.1 Thrombozytenbiologie.....	15
2.8.2 Das Prinzip der Hämostase	16
2.8.3 Hemmstoffe der Thrombozytenaggregation.....	18
2.9 Die CXCR4/CXCR7- SDF-1 Achse.....	20
2.9.1 Chemokine und Chemokinrezeptoren.....	20
2.9.2 SDF-1 (CXCL12).....	21
2.9.3 CXCR4	22
2.9.4 CXCR7	24
2.9.5 Einfluss der Chemokine auf die Thrombusformation <i>ex vivo</i>	25
3. Hintergrund und Zielsetzung dieser Arbeit	27
4. Material und Methoden	28
4.1 Patientencharakteristika und Blutprobenentnahme	28
4.2. Thrombozytäre Oberflächenbestimmung mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	28
4.2.1 Theoretische Grundlagen.....	28
4.2.2 Praktische Durchführung.....	29
4.3 Follow-Up.....	31
4.4 Analyse der <i>ex vivo</i> Thrombusformation unter arterieller Schergeschwindigkeit in einer Durchflusskammer	31
4.5 Statistische Analyse.....	32

5. Ergebnisse.....	34
5.1 Daten und Patientenkohorte	34
6. Diskussion	43
7. Zusammenfassung	47
8. Literaturverzeichnis	49
9. Erklärung zum Eigenanteil.....	59
10. Publikationen	60
11. Danksagung	61

1. Abkürzungsverzeichnis

ACD:	<i>All-cause death</i> (Gesamtsterblichkeit)
ACS:	<i>Acute coronary syndrome</i> (akutes Koronarsyndrom)
ADP:	Adenosindiphosphat
AMI:	<i>Acute myocardial infarction</i> (akuter Myokardinfarkt)
ANOVA:	<i>Analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
AP:	Angina Pectoris
Ca:	Calcium
CE:	<i>Combined endpoint</i> (kombinierter Endpunkt)
CI:	<i>Confidence interval</i> (Konfidenzintervall)
CK:	Creatinkinase
COX:	Cyclooxygenase
ER:	Endoplasmatisches Retikulum
EZM:	Extrazellulärmatrix
GDP:	Guanosindiphosphat
GP:	Glykoprotein
GTP:	Guanosintriphosphat
HIF-1:	Hypoxia-inducible factor-1
HR:	Hazard ratio
HSC:	Haematopoietic stem cell (hämatopoetische Stammzellen)
IAP:	Instabile Angina Pectoris
IR:	Inzidenzrate
KHK:	Koronare Herzkrankheit
MFI:	<i>Mean fluorescence intensity</i> (mittlere Fluoreszenzintensität)
MI:	<i>Myocardial infarction</i> (Myokardinfarkt)
MIF:	Makrophagenmigrationsinhibierender Faktor
MK:	Megakaryozyten
MPV:	<i>Mean platelet volume</i> (Mittleres Thrombozyten-Volumen)
mRNA:	<i>Messenger ribonucleic acid</i> (Boten-RNA)
NSTEMI:	<i>Non-ST-elevating-myocardial-infarction</i>

	(Nicht-ST-Hebungs-Myokardinfarkt)
PBS:	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzsäure)
PBSF:	<i>Pre-B-cell- growth-stimulating factor</i>
PCI:	<i>Percutaneous coronary intervention</i> (perkutane Koronarintervention)
RT:	Raumtemperatur
SAP:	Stabile Angina Pectoris
SDF-1:	<i>Stromal-derived-factor-1</i>
S.E.M.:	<i>Standard error of the mean</i> (Standardfehler)
STEMI:	<i>ST-elevating-myocardial-infarction</i> (ST-Hebungs-Myokardinfarkt)
TF:	<i>Tissue factor</i>
TGF β :	<i>Transforming growth factor β</i>
vWF:	Von-Willebrand-Faktor

2. Einleitung

„An einem Zahne...Senator Buddenbrook war an einem Zahne gestorben, hieß es in der Stadt. Aber, zum Donnerwetter, daran starb man doch nicht! Er hatte Schmerzen gehabt, Herr Brecht hatte ihm die Krone abgebrochen, und daraufhin war er auf der Straße einfach umgefallen. War dergleichen erhört?“

– Thomas Mann, Die Buddenbrooks: Verfall einer Familie; Zehnter Teil

Diesem von Thomas Mann im gleichnamigen Roman beschriebenen und später als „Buddenbrook-Syndrom“ bezeichneten Phänomen liegt ein diagnostischer Irrtum zugrunde. Die Primärursache der zahnschmerzähnlichen Beschwerden des Senators Buddenbrook war eine koronare Herzkrankheit, die bis in den Unterkiefer ausstrahlte und in der Folge für seinen Tod verantwortlich war. Dieser Sachverhalt zeigt die Signifikanz der interdisziplinären Zusammenarbeit verschiedener medizinischer Fachbereiche wie in diesem Beispiel der Zahnmedizin und der Kardiologie, um durch exakte Befunderhebung fehlerhafte Therapien auszuschließen, Folgeerkrankungen zu vermeiden und letztendlich die Mortalität herabzusetzen.

2.4 Die koronare Atherosklerose

Bei der Atherosklerose handelt es sich um eine über Jahre fortlaufende entzündlich-fibroproliferative Reaktion, die auf eine initiale Endothelschädigung zurückzuführen ist. (Ross 1979) Ihre Folgeerscheinungen wie Herzinfarkt, Herzinsuffizienz und Herzrhythmusstörungen stellen die führenden Todesursachen in den westlichen Industrienationen dar. (Scott 2004) In Deutschland leiden laut dem Robert Koch Institut 8,3 % (2012) der Bundesbevölkerung an koronarer Atherosklerose und jeder fünfte Sterbefall wird in Deutschland durch eine koronare Herzerkrankung verursacht. (Statistisches Bundesamt, Todesursachenstatistik 2003). Aufgrund dessen ist

die weiterführende Erforschung und Prävention dieser Erkrankung zur Herabsetzung von Mortalität und Morbidität von großer medizinischer Bedeutung.

2.5 Die Entstehung der koronaren Atherosklerose

Der Begriff Atherosklerose stammt ursprünglich aus dem Altgriechischen und bedeutet Arterienverkalkung, wörtlich „harte Ader“. Aufgrund des heutigen Wissensstandes umfasst die Atherosklerose allerdings nicht nur die Ablagerung von Cholesterin und Kalk in der Arterienwand. Entzündungsprozesse spielen bei der Entstehung der Atherosklerose ebenfalls eine wichtige Rolle.(Hof and von Eckardstein 2009)

Initial ist die Atherosklerose durch eine Lipideinlagerung in die Gefäßwand und resultierender Stenosierung des Gefäßes durch eine fibröse Plaque gekennzeichnet. Durch die Ruptur der instabilen Plaque kann es zur Ausbildung eines Thrombus kommen, der im weiteren Gefäßabschnitt und Endstromgebiet zu einer Sauerstoff-Unterversorgung und somit zu einem durch Ischämie bedingten Gewebsuntergang, einer hämorrhagischen Infarzierung führt.

Atherosklerotische Läsionen entstehen vor Allem an Gefäßabschnitten, an denen stärkere Turbulenzen oder veränderte Strömungsprofile fest zu stellen sind, wie z.B. an Gefäßaufzweigungen und – abgängen.(Hof and von Eckardstein 2009, von Hundelshausen and Weber 2013)

Die Atherosklerose manifestiert sich je nach betroffenem Gefäßabschnitt als Koronare Herzkrankheit (KHK), periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK, wie beispielsweise als Claudicatio intermittens) oder viszerale bzw. zerebrale Durchblutungsstörung.(Ross 1999)

Für das Entstehen einer Atherosklerose stellen arterielle Hypertonie, Diabetes Mellitus, Adipositas, Hypercholesterinämie, Nikotin Abusus sowie

Bewegungsmangel die Hauptrisikofaktoren dar. Unbeeinflussbare Faktoren wie das Alter, eine positive Familienanamnese oder das männliche Geschlecht sind ebenfalls zu berücksichtigen.(Trepels, Zeiher et al. 2004, Sandri, Gielen et al. 2008)

Die Atherosklerose ist als Unterform von der Arteriosklerose abzugrenzen, bei der es sich um eine physiologische Verhärtung der Arterie, nicht zwingend durch Plaques verursacht, im fortschreitenden Alter handelt.

2.6 Die Pathogenese der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine über Jahre fortlaufende, schleichende Erkrankung. Bereits im Kindes- und Jugendalter kann es zu einer Entwicklung der Atherosklerose von Koronargefäßen kommen, die durch sowohl genetische als auch epigenetische Faktoren bestimmt wird.(Erbel and Gorge 2014)

Nach der von Russel Ross aufgestellten „Response-to-Injury-Hypothese“ aus dem Jahr 1967, wird das atherosklerotische Geschehen durch eine Verletzung der inneren Arterienwandschicht (Intima) initiiert. Ursachen für die Verletzungen der Endothelschicht können Trauma, Bluthochdruck, mechanische Verletzungen, Viren oder biochemische Schädigung durch bakterielle Toxine sein.(Ross 1979) Durch die daraus resultierende endotheliale Dysfunktion kommt es zu einer Einlagerung von Lipiden in die Gefäßwand. Diese Ablagerungen manifestieren sich meist lokal innerhalb der ersten 2cm der linken Koronararterie bevor weitere Abschnitte betroffen sind.(Erbel and Gorge 2014) Dieser Lipidkern bildet den inflammatorischen Stimulus, welcher die Inflammationskaskade auslöst. Durch die Einlagerung von Lipiden und Lipidderivaten („low-density-lipoprotein“, LDL) werden Adhäsionsmoleküle (z.B. „vascular cell adhesion molecule“, VCAM) von Endothelzellen exprimiert. Hiermit wird die Leukodiapedese von Monozyten und T-Zellen in die Intima der Gefäßwand begünstigt. Monozyten

phagozytieren und speichern die oxidierten LDL-Partikel und differenzieren sich daraufhin in sog. Schaumzellen („Foam Cells“).

Außerdem führt die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (wie z.B. Interferon γ oder Tumor-Nekrose-Faktor α) zu einer Intensivierung der Entzündung und zu einer verstärkten Proliferation und Migration glatter Muskelzellen von der mehrschichtigen Media in die Intima der Gefäßwand.(Trepels, Zeiher et al. 2004)

Im weiteren Verlauf entwickelt sich durch dieses Geschehen eine stabile, fibröse Plaque (Atherom).(Rainger and Nash 2001) Inflammatorische Mediatoren führen zu einer Ausdünnung dieser fibrösen Plaque, deren Inhalt hauptsächlich aus glatten Muskelzellen, Kollagen und einem lipidhaltigen Kern besteht.(Libby, Tabas et al. 2014) Der Inhalt eines solchen Atheroms hat eine starke thrombogene Potenz.

Diese Veränderungen führen zu einer Verhärtung und zu einem Elastizitätsverlust der Gefäßwand.

Eine Ruptur oder Erosion der instabilen Deckplatte führt zu einer Aktivierung der Thrombozyten. Diese Thrombozytenaggregation kann sekundär in einer Gefäßthrombosierung münden. (Trepels, Zeiher et al. 2004)

2.7 Koronare Herzkrankheiten (KHK)

2.7.1 Definition

Eine koronare Herzkrankheit (KHK) bezeichnet eine chronische Erkrankung, welche durch die Manifestation der oben beschriebenen Atherosklerose in den Herzkranzgefäßen hervorgerufen wird.

Die Durchblutung des Herzmuskels wird durch die Verengung der Koronargefäße eingeschränkt und es entsteht ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot, welches als Koronarinsuffizienz

bezeichnet wird. Das Myokard wird somit bei körperlicher Belastung, psychischen Reizen (durch vegetative Funktionswandel) oder bereits im Ruhe-Zustand nicht ausreichend durchblutet. Für die KHK gibt es verschiedene klinische Erscheinungsbilder, die sich von einer stabilen Angina Pectoris bis zu einem akuten Koronarsyndrom erstrecken können.

2.7.2 Die stabile Angina Pectoris (SAP)

Die stabile Angina Pectoris ist ein durch körperliche oder psychische Belastung auslösbarer, immer wiederkehrender Thoraxschmerz, der bis in die Arme, Schulter oder den Rücken ausstrahlen kann. Ursächlich für die Beschwerden ist eine Minderversorgung des Myokards mit Blut.

Die Prävalenz der stabilen Angina Pectoris liegt bei 2-4% in den meisten europäischen Ländern.(Sechtem 2008) Charakteristischer Weise führen Ruhe oder Gabe von Nitroglycerin zur Besserung der Symptome.(Dorr 2006) Sie tritt ohne Progression und mit gleichbleibender Intensität auf. Nach der Canadian Cardiovascular Society-Klassifikation (CCS) wird die SAP in 5 Grade eingeteilt:

- 0: Stumme Ischämie
- I: Angina Pectoris (AP) bei schwerer Belastung
- II: Geringe Einschränkung der normalen körperlichen Aktivität durch AP
- III: Schwere Einschränkung der normalen körperlichen Aktivität durch AP
- IV: AP bereits in Ruhe

Für eine Prognose dieser Erkrankungen werden verschiedene Untersuchungen zur Einschätzung der Risikostratifikation durchgeführt um weitere mögliche Komplikationen zu vermeiden. Dieses Vorgehen beinhaltet eine klinische Untersuchung, die Auswertung der Reaktion auf eine

Belastungsuntersuchung, die Quantifizierung der linksventrikulären Funktion und die Begutachtung des Ausmaßes koronarer Veränderungen.

2.7.3 Das akute Koronarsyndrom (ACS)

Bei dem akuten Koronarsyndrom (ACS) handelt es sich um eine akute lebensbedrohliche Manifestation der KHK. Klinisch können die instabile Angina Pectoris (IAP), der akute Myokardinfarkt und der plötzliche Herztod unterschieden werden. (Hamm and Deutsche Gesellschaft für Kardiologie-Herz- und 2004) Ursächlich für das ACS ist eine Erosion bzw. Ruptur einer atherosklerotischen Plaque. Diese induziert die Thrombozyten-adhäsion und –aggregation mit Thrombusbildung in der Koronararterie. Ebenfalls können eine koronare Konstriktion bzw. ein Koronarspasmus oder eine flusslimitierende Koronarstenose Auslöser für das ACS sein. Im Zuge dessen kommt es zu einem Missverhältnis zwischen myokardialer Sauerstoffversorgung und myokardialem Sauerstoffbedarf. Sekundär kann das akute Koronarsyndrom mit einer Anämie, Tachykardie oder einer Hypotension einhergehen. (Holschermann, Tillmanns et al. 2006)

Der Akute Myokardinfarkt (AMI) lässt sich in zwei verschiedene, jedoch ineinander verlaufende klinische Erscheinungsbilder anhand des EKGs unterteilen:

Non-STEMI: Nicht ST-Strecken-Hebungs-Myokardinfarkt

Im EKG zeigen sich keine oder nur transiente ST-Strecken Hebungen, eine T-Wellen-Inversion oder unspezifische EKG-Veränderungen mit einer Dauer von weniger als 20 Minuten. (Bertrand, Simoons et al. 2000, Kelm and Strauer 2005) Außerdem sind laborchemische Veränderungen (Creatinkinase(CK)-Erhöhung und/oder Troponin-Erhöhungen) zu verzeichnen. Wenn kein Anstieg myokardialer Enzyme (Troponin, CK-negativ) nachweisbar ist jedoch die Schmerzintensität oder die Anfallsdauer der Beschwerden zunimmt, so

handelt es sich um eine instabile Angina Pectoris (IAP).(Holschermann, Tillmanns et al. 2006)

STEMI: ST-Strecken-Hebungsmyokardinfarkt

Der STEMI stellt in den meisten Fällen einen vollumfänglichen Verschluss der Koronararterie dar und wird durch nachfolgende EKG-Befunde charakterisiert: Eine ST-Strecken-Hebung von geringstenfalls 0,1 mV in nicht weniger als zwei zusammenhängenden Extremitäten-Ableitungen (Ableitungen I-III), eine ST-Strecken-Hebung von mindestens 0,2 mV in zwei zusammenhängenden Brustwandableitungen (Ableitung V1-V12) oder ein Linksschenkelblock, der eine Infarkt-kennzeichnende Symptomatik aufzeigt.

Als Differentialdiagnosen zum akuten Koronarsyndrom präsentieren sich kardiovaskuläre Erkrankungen (beispielsweise Myokarditis, tachykarde Rhythmusstörungen oder Aortendissektion), Pulmonale Erkrankungen (Lungenembolie, Pneumothorax, Pleuritis), Skeletterkrankungen oder Gastrointestinalerkrankungen (Akute Pankreatitis).(Hamm and Deutsche Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und 2004)

2.8 Thrombozyten

2.8.1 Thrombozytenbiologie

Thrombozyten sind kleine kernlose Zellen mit einem Längsdurchmesser von 1,5-3 μm , die sich durch die Sequestrierung von Megakaryozyten (MK) im Knochenmark entwickeln.(Ruggeri 2002) Der gesunde Erwachsene besitzt durchschnittlich ca. 200×10^9 Thrombozyten pro Liter Blut.(Kehrel 2008) Die Lebensdauer der Thrombozyten im Blut beträgt 5-11 Tage, bevor sie anschließend in Leber, Lunge und Milz durch Gewebemakrophagen abgebaut werden.(Schmidt 2007) Thrombozyten besitzen u.A. messengerRNA (mRNA), ein raues endoplasmatisches Retikulum (ER)(Ca^{2+} -Speicher), Mitochondrien, Mikrotubuli, Lysosomen, α -Granula und elektronendichte Granula.(Silbernagl

2012) Sie nehmen eine signifikante Rolle bei der Wundheilung und Blutstillung ein.(Jurk and Kehrel 2010)

2.8.2 Das Prinzip der Hämostase

Die Hämostase beschreibt Prozesse, die nach einer Gefäßverletzung durch Aktivierung von Thrombozyten und Bildung eines Gefäßwandthrombus zum Stillstand einer Blutung führen, um einem möglichen Blutverlust entgegen zu wirken und Reparaturmechanismen zu initiieren.(Alberio and Clemetson 2005) Man kann diesen Prozess in eine primäre und sekundäre Hämostase mit darauffolgender Fibrinolyse unterteilen. Bei der primären Hämostase kommt es zur Blutstillung durch die Ausbildung eines Blutplättchen-reichen Thrombus. Die sekundäre Hämostase bezeichnet die Blutgerinnung mit Ausbildung eines stabilen Fibrinnetzes.

Die primäre Hämostase lässt sich wiederum in Phasen der Adhäsion, Aktivierung und Aggregation unterteilen.

Zunächst kommt es durch eine Gefäßverletzung zur Unterbrechung der Kontinuität der Endothelbarriere und zur Exposition von Matrixbestandteilen des Subendothels.(Langer and Gawaz 2006) Anschließend interagieren der im Plasma zirkulierende und subendothelial deponierte von-Willebrand-Faktor(vWF) und der Glykoprotein(GP)-Komplex Ib/IX/V als Rezeptor auf der Thrombozyten- Oberfläche. Diese rasch entstandene Verbindung wird allerdings durch die hohen Scherkräfte in den Arteriolen schnell wieder gelöst. Somit ist es nicht möglich, eine stabile Adhäsion zu erzielen. Durch den reversiblen Kontakt der Thrombozyten entlang der geschädigten Gefäßwand spricht man von einem sog. „Rolling“. Infolgedessen werden die Thrombozyten verlangsamt und sie können nun eine irreversible Verbindung über das Glykoprotein VI (GPVI) zu dem freiliegenden Kollagen des Subendothels aufbauen. Dieser Vorgang führt zur Thrombozytenaktivierung und Transformation der Integrinrezeptoren $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Fibronogenrezeptor) und

$\alpha_2\beta_1$ (Kollagenrezeptor), welche die feste Bindung zu den Komponenten der Extrazellulärmatrix (EZM) schaffen. (Ruggeri 2002, Gawaz 2004, Siegel-Axel, Langer et al. 2006) Die Thrombozyten ändern ihre Form durch Bildung von sog. Pseudopodien. Dies führt zu einer Oberflächenvergrößerung und einem effektiven Verschluss der Gefäßläsion. (Gawaz 2004, Langer and Gawaz 2006) Die adhären, aktivierten Thrombozyten entwickeln aus Arachidonsäure das Cyclooxygenase (COX)-1-Produkt Thromboxan A_2 , welches den Aktivierungsprozess verstärkt. Außerdem kommt es dadurch zur Vasokonstriktion der Blutgefäße mit einhergehender Verlangsamung der Blutflussgeschwindigkeit. Die Konformationsänderung der Thrombozyten führt dazu, dass sich der membranständige Thrombozytenrezeptor GP IIa/IIIb nun mit dem vWF verbinden kann und sich direkt mit dem Fibronektin der Gefäßwand vernetzt. Dies ist stark Ca-abhängig. Zusätzlich wird durch die Verbindung des im Plasma vorliegenden Fibrinogens mit dem GP IIa/IIIb eine Quervernetzung und eine weitere Plättchenrekrutierung in den Thrombus erreicht. (May, Seizer et al. 2008) Folgendermaßen wird die Anheftung der Thrombozyten an die Läsion stabilisiert. Die Bildung des Plättchenthrombus und somit der Abschluss der primären Hämostase wird durch die Freisetzung von Adenosindiphosphat (ADP) autokatalytisch beschleunigt. (Gekle 2010)

Die darauffolgende sekundäre Hämostase führt zu einem dauerhaften Verschluss der Läsion durch Ausbildung eines Fibrinthrombus. Dabei wird als zentrale Reaktion das im Blut zirkulierende Fibrinogen in Fibrin umgewandelt. Die Aktivierung erfolgt kaskadenartig über die im Plasma zirkulierenden Gerinnungsfaktoren. Diese können sowohl inaktive Vorstufen von Proteinen spaltenden Enzymen sowie von Cofaktoren sein. Es lassen sich zwei verschiedene Aktivierungswege differenzieren, die jedoch eine gemeinsame Endstrecke aufweisen. Sie unterscheiden sich in der Herkunft ihrer beteiligten Phospholipoproteine. Die exogene Aktivierung erfolgt durch eine Gefäßverletzung. In diesem Fall wird das im verletzten Gewebe liegende Gewebsthromboplastin (tissue factor TF) ins Blut freigesetzt. Bei der endogenen Aktivierung hingegen kommt es zu einer Kontaktaktivierung von Faktor XII durch negativ geladene Fremdoberflächen wie z.B. freigelegte

Kollagenfasern. Die gemeinsame Endstrecke wird durch die Faktoren X und V gebildet, die mithilfe von Ca^{2+} und Phospholipiden den Prothrombin-Aktivator-Komplex darstellen. Dieser bewirkt die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin. Darauf folgend produziert Thrombin durch fibrinolytische Spaltung aus Fibrinogen das Fibrinmonomer. Eine weitere Funktion von Thrombin ist die Aktivierung des Faktors XIII, welcher durch die Quervernetzung zwischen Lysin und Glutaminresten eine kovalente Bindung der Fibrinmonomere erzeugt. Dies wird auch als Retraktionsphase bezeichnet. Eine stabile Verfestigung des Thrombus wird außerdem durch Einschluss von Blutzellen und Kontraktion der Thrombozyten herbeigeführt.

Bei einer Überproduktion von Fibrin, kann dieses über das fibrinolytische System wieder abgebaut werden. Als Hauptfaktor dessen agiert die Protease Plasmin.

2.8.3 Hemmstoffe der Thrombozytenaggregation

Bei nicht erwünschter Thrombusbildung ist es möglich, die Thrombozytenaktivierung mittels Thrombozytenaggregationshemmern zu unterbinden. Dieser Effekt kann durch unterschiedliche Wirkprinzipien erfolgen. Aspirin (Acetylsalicylsäure) vermittelt seine Reaktion durch selektive und irreversible Hemmung der Zyklooxygenase, wodurch sowohl (deutlich stärker) die Herstellung von Thromboxan A_2 in den Thrombozyten aber auch die Prostazyklinsynthese in den Endothelzellen verhindert wird. (Smith and Willis 1971, Samuelsson 1983, Collier 2011, Ricciotti and FitzGerald 2011) Ein weiterer Wirkmechanismus kann durch die ADP-Rezeptor Antagonisten beschrieben werden. Dazu gehören die Thienopyridine Ticlopidin, Clopidogrel und Prasugrel, welche das ADP Rezeptorprotein P2Y_{12} auf den Thrombozyten antagonisieren und somit eine Thrombozytenaktivierung über den Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptorkomplex verhindern. Ticlopidin unterbindet das Anheften von Fibrin an $\alpha\text{IIb}\beta_3$, jedoch konnten ebenfalls schwere Nebenwirkungen wie Neutropenie bei einem Prozent der Patienten verzeichnet werden. (Love, Biller

et al. 1998, Collier 2011) Clopidogrel konnte ein durchaus besseres Toxizitätsprofil zugewiesen werden, woraufhin es zügig große klinische Anwendung fand.(Balamuthusamy and Arora 2007) Prasugrel wird im Vergleich zu Clopidogrel eine größere antithrombotische Effektivität zugesprochen, jedoch weist es auch ein erhöhtes Blutungsrisiko auf.(Tomasello, Tello-Montoliu et al. 2011) Folglich kommt es vor Allem bei Patienten mit großer Thrombosegefahr zum Einsatz.(Collier 2011) Ticagrelor ist ein oral wirkender, reversibler Antagonist des P2Y₁₂-Rezeptors mit einer Halbwertszeit von ca. 12 Stunden.(van Giezen and Humphries 2005) Es wies gerinnungshemmende Wirkungen bei Patienten auf, die keine Reaktionen auf Clopidogrel zeigten und demonstrierte insgesamt eine bessere gerinnungshemmende Effektivität im Vergleich zu Clopidogrel in zentralen Studien.(Husted, Emanuelsson et al. 2006, Abergel and Nikolsky 2010, Ueno, Rao et al. 2010) Ticagrelor wurde jedoch auch mit einem erhöhten Blutungsrisiko, kardialen ventrikulären Pausen und Dyspnoe in Zusammenhang gebracht.(Gaglia and Waksman 2011) Bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom wies die Therapie mit Ticagrelor jedoch im Vergleich zu Clopidogrel eine signifikant reduzierte Sterblichkeitsrate auf, bedingt durch vaskuläre Ursachen, einen Myokardinfarkt oder Schlaganfall, ohne die gesamte Blutung zu steigern.(Wallentin, Becker et al. 2009)

Ebenfalls kann die Thrombozytenaggregation durch den Anti-GPIIb/IIIa-Antikörper Abciximab oder die beiden kompetitiven Antagonisten Eptifibatid und Tirofiban gehemmt werden. Abciximab ist das Antigen bindende Fragment (Fab-Fragment) eines monoklonalen IgG-Antikörpers gegen GPIIb/IIIa und wird intravenös verabreicht. Indikationen sind perkutane Koronarinterventionen, akutes Koronarsyndrom oder akuter Myokardinfarkt. Als Nebenwirkungen können ebenfalls starke Blutungen, eine Thrombozytopenie oder immunallergische Reaktionen auftreten.(De Luca, Navarese et al. 2009, Gurm, Tamhane et al. 2009, Karl Heinz Graefe 2011, Bosch, Marrugat et al. 2013)

2.9 Die CXCR4/CXCR7- SDF-1 Achse

2.9.1 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Chemokine sind Signalproteine, die zu der Familie der Chemotaxis-vermittelnden Zytokine gehören und bei der Entzündungsantwort und der Migration von Immunzellen im Gewebe eine wichtige Rolle spielen. Außerdem sind Chemokine in die Tumorprogression, Angiogenese, Metastasierung, Gewebsreparatur- und Allergiemechanismen involviert. (Salcedo and Oppenheim 2003, Rot and von Andrian 2004, Sun, Cheng et al. 2010) Es konnten bis zu 50 Chemokine identifiziert werden, welche anhand der Position des aminoterminalen Cysteinrestes in 4 Gruppen unterteilt werden können (CC, CXC, CX₃C und C Chemokine). (Thelen 2001, Ali and Lazennec 2007, Vindrieux, Escobar et al. 2009)

Die Signaltransduktion erfolgt durch Bindung der Chemokine an Chemokinrezeptoren. Dies bewirkt die Aktivierung der Rezeptoren und eine Migration der Zellen in Richtung der höchsten Konzentration (Chemotaxis). Bislang konnten 20 Chemokinrezeptoren konstatiert werden, welche über sieben transmembranäre Helixstrukturen verfügen, die über sowohl drei intrazelluläre als auch drei extrazelluläre Schleifen miteinander vernetzt sind. Außerdem weisen sie einen außerhalb der Zelloberfläche liegenden N-Terminus (Ligandenbindungsstelle) und einen C-Terminus innerhalb des Zytoplasmas auf. (Ransohoff 2009) Die Chemokinrezeptoren gehören zu den heterotrimeren G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, wobei das Heterotrimer (gr. *tri* = drei; *heteros* = verschiedene; *meros* = Teile) in inaktivem Zustand aus einer α -, β - und γ -Untereinheit besteht. Durch Bindung eines Liganden werden die Rezeptoren in einen aktiven Zustand überführt und eine Konformationsänderung erzeugt, wodurch das bisher gebundene Guanosindiphosphat (GDP) gegen Guanosintriphosphat (GTP) ausgetauscht wird und das Heterotrimer seine Stabilität verliert und in eine GTP α und eine β - Untereinheit aufgespalten wird. Die aktive α -Einheit kann somit die intrazellulären Effekte vermitteln. (Horn 2012) Chemokinrezeptoren sind meist

promiskuitiv und können mit hoher Affinität verschiedene Liganden binden, jedoch können auch umgekehrt die Chemokine mit multiplen Chemokinrezeptoren interagieren. Demgegenüber gibt es aber sowohl Rezeptoren als auch Chemokine, die nur einen spezifischen Bindungspartner besitzen.(Sun, Cheng et al. 2010, Teicher and Fricker 2010)

2.9.2 SDF-1 (CXCL12)

Stromal-derived-factor - 1 (SDF-1 oder CXCL12) ist ein CXC-Chemokin. Zunächst wurde es von Stromazelllinien des Knochenmarks abgeleitet und später als „pre-B-cell- growth-stimulating factor“ (PBSF) identifiziert. SDF-1 wird zum Großteil von Osteoblasten im Knochenmark(Jung, Wang et al. 2006), jedoch auch von einer Vielzahl anderer Gewebstypen produziert und dient der Rekrutierung von hämatopoetischen Stammzellen in Form eines wirksamen chemischen Signalstoffes.(Rath, Chatterjee et al. 2016) SDF-1 ist in die Mobilisierung und zielorientierte Wanderung der Stammzellen in ihre jeweiligen Speicher involviert und vermittelt sowohl den Fortbestand als auch die Proliferation von humanen Vorläuferzellen.(Secchiero, Celeghini et al. 2000, Wright, Maloney et al. 2005, Sun, Cheng et al. 2010) SDF-1 führt folglich dazu, dass im Bereich verletzter Gewebe Stammzellen angelockt werden und somit Organ- und Gewebereparaturmechanismen angeregt werden.(Janowski 2009) SDF-1 ist im Wesentlichen an Orten lokalisiert, an denen Thrombozyten adhären und bewirkt infolgedessen durch Herstellung eines Konzentrationsgradienten die Rekrutierung CD34 positiver Progenitorzellen und beeinflusst deren Proliferation und Differenzierung in unterschiedliche Zelltypen wie Makrophagen, Schaumzellen oder Endothelzellen.(Stellos, Seizer et al. 2010, Rath, Chatterjee et al. 2016) Experimentell konnte *in vivo* nachgewiesen werden, dass eine gesteigerte Expression von SDF-1 in ischämischem Myokard zur Kardioprotektion und zur verbesserten myokardialen Funktion nach einem Myokardinfarkt führen kann.(Abbott, Huang et al. 2004, Zaruba, Theiss et al. 2009) Während eines akuten Koronarsyndroms ist sowohl die thrombozytäre

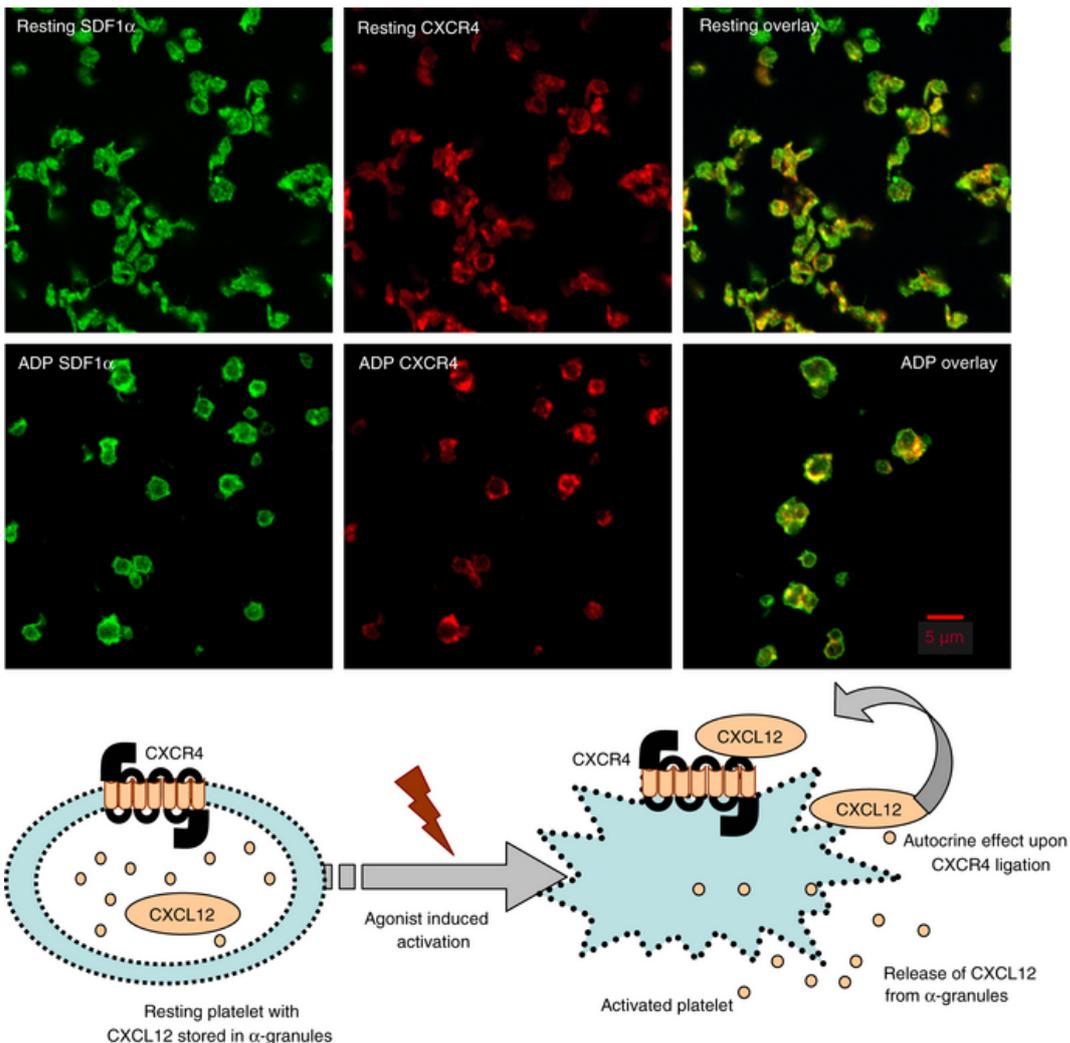
Oberflächenexpression als auch die Freisetzung von SDF-1 erhöht.(Massberg, Konrad et al. 2006) Ferner ist eine Assoziation zwischen dem im Blut zirkulierenden und dem auf Thrombozyten exprimierten SDF-1 festzustellen.(Stellos, Bigalke et al. 2009) Dennoch ist die physiologische Rolle und Regulation von SDF-1 bei peripheren Gewebsreparaturmechanismen noch nicht vollständig erschlossen und bedarf weiterer Forschung.(Kollet, Shivtiel et al. 2003)

2.9.3 CXCR4

CXCR4 ist ein Chemokinrezeptor mit sieben Transmembrandomänen, der sowohl den Liganden SDF-1 als auch das Zytokin Makrophagenmigrationsinhibierender Faktor (MIF) bindet.(Sun, Cheng et al. 2010) Der Chemokinrezeptor CXCR4 befindet sich auf der Oberfläche der Thrombozyten. Die Freisetzung von SDF-1 aus der α -Granula der aktivierten Thrombozyten entspricht folglich einem autokrinen Effekt (Abbildung 1).(Chatterjee and Gawaz 2013, Rath, Chatterjee et al. 2016)

Abbildung Nr.1

aus Chatterjee, M. and M. Gawaz, *Platelet-derived CXCL12 (SDF-1alpha): basic mechanisms and clinical implications*. J Thromb Haemost, 2013. **11**(11): p. 1954-67 zeigt im oberen Abschnitt eine konfokal mikroskopische Analyse der intrazellulären granulären Verteilung von CXCL12 und CXCR4 bei ruhenden (oben) und durch ADP aktivierten (unten) Thrombozyten. Durch die ADP-Aktivierung ist eine Peripherisierung des durch Alexa Fluor 488 in grün dargestellten CXCL12 im Vergleich zu den ruhenden Thrombozyten ersichtlich. Das durch Alexa Fluor 647 in rot dargestellte CXCR4 ist sowohl im aktivierten als auch im ruhenden Zustand an der Thrombozyten-Oberfläche lokalisiert. Der Maßstab besträgt 5 µm. Im unteren Abschnitt ist die autokrine Freisetzung von CXCL12 dargestellt.



CXCR4 wird von Zellen des Immunsystems und des zentralen Nervensystems exprimiert und vermittelt die Migration ruhender Leukozyten und Rekrutierung hämatopoetischer Vorläuferzellen (haematopoietic stem cells, HSCs) als Antwort auf seinen Liganden SDF-1. (Jazin, Soderstrom et al. 1997, Moepps, Frodl et al. 1997) Außerdem ist CXCR4 in die Angiogenese und Organogenese involviert. (Kucia, Jankowski et al. 2004) Es konnte dargestellt werden, dass Knock-Out Mäuse ohne den Chemokinrezeptor CXCR4 große Organschäden aufweisen und nicht lebensfähig sind. (Nagasawa, Hirota et al. 1996, Stellos, Ruf et al. 2011) Eine bedeutende Rolle nimmt CXCR4 ebenfalls in der Interaktion mit SDF-1 und HSCs bei Gewebsreparaturmechanismen ein. Der Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) ist ein entscheidender Vermittler der Gewebshypoxie und veranlasst eine SDF-1 Expression der ischämischen Endothelzellen in direkter Assoziation zu einem verringerten Sauerstoffdruck *in vivo*. Demnach wird während der Gewebsreparatur die SDF-1 Expression normalisiert, nachdem der Sauerstoffdruck zu Ausgangsverhältnissen zurückgekehrt ist. (Ceradini, Kulkarni et al. 2004) Infolgedessen veranlassen geringe Sauerstoffkonzentrationen eine höhere Expression von CXCR4 in verschiedenen Zelltypen. (Schioppa, Uranchimeg et al. 2003)

Weiterhin spielt CXCR4 eine große Rolle bei HIV-Infektionen, da es als Co-Rezeptor das Eindringen der HI-Viren in die menschliche Zelle unterstützt. (Simmons, Reeves et al. 2000)

2.9.4 CXCR7

Die Vermutung über die Existenz eines weiteren SDF-1 Rezeptors wurde nach der Erkenntnis, dass CXCR4 Knock-Out Mäuse nach wie vor SDF-1 binden konnten, bestärkt. Außerdem reagierten verschiedene humane Krebszelllinien, denen CXCR4 fehlte, auf einen SDF-1 Gradienten. (Burns, Summers et al. 2006) Kürzlich wurde diese Hypothese bestätigt und ein zweiter Rezeptor identifiziert und als CXCR7 bezeichnet. (Balabanian, Lagane et al. 2005) Dieser

Chemokinrezeptor mit ebenfalls sieben Transmembrandomänen wird den G-Protein gekoppelten Rezeptoren zugeordnet, an den die Liganden CXCL11 und CXCL12 binden. Die Signalweiterleitung wird jedoch nicht über G-Proteine vermittelt, ihm wird vielmehr eine Funktion als Chemokin-Speicher zugewiesen.(Thelen and Thelen 2008) CXCR7 wurde auf vielen Tumorzelllinien, neuronalen Zellen, aktivierten Endothelzellen oder fetalen Leberzellen identifiziert und es konnte eine Expression sowohl von der Plazenta als auch des Gefäßendotheliums konstatiert werden.(Nagasawa, Hirota et al. 1996, Martinez, Kapas et al. 2000, Miao, Luker et al. 2007, Tripathi, Verma et al. 2009) Eine durch CXCR7 ausgelöste gesteigerte proliferative Aktivität in Fibroblasten und die weiteren Signaleigenschaften von CXCR7 führen demgemäß zu einem vermehrten Zellwachstum und Überleben.

Bei CXCR7 Knock-Out Mäusen wurde als primäre Letalitätsursache ein Defekt des Ventrikelseptums und Fehlbildungen der Herzklappe identifiziert.(Sierro, Biben et al. 2007, Thelen and Thelen 2008) Der durch CXCR7 induzierte Einfluss auf SDF-1-vermittelte Effekte ist jedoch nach wie vor zu einem Großteil ungewiss.

2.9.5 Einfluss der Chemokine auf die Thrombusformation *ex vivo*

Die Thrombozyten-abhängige Thrombusformation hängt weitestgehend von dem Status ihrer Aktivierung und der Anzahl an zirkulierenden Plättchen ab. Dies wird entscheidend durch Chemokine wie SDF-1 und den Makrophagenmigrationsinhibierenden Faktor (macrophage migration inhibitory factor, MIF), einem Zytokin mit Chemokin-ähnlichen Eigenschaften, beeinflusst.(van der Vorst, Doring et al. 2015) SDF-1 übt einen antiapoptotischen Effekt auf die Aktivierungs-induzierte Apoptose aus und reduziert signifikant die Phosphatidylserin-Exposition. Trotz dessen konnte gezeigt werden, dass abgeleitet von aktivierten Thrombozyten SDF-1 die Thrombusformation *ex vivo* durch CXCR4 potenziert, das dem cAMP-Signalweg entgegenwirkt, welcher

ansonsten einen hemmenden Effekt auf die Thrombozytenaktivierung darstellen würde.(Rath, Chatterjee et al. 2016) Außerdem wurde kürzlich nachgewiesen, dass SDF-1 Expressionen mit Herzinsuffizienz assoziiert sind und es konnte Plasma SDF-1 Werten ein signifikant höherer prognostischer Faktor für kardiovaskuläre Erkrankungen im Vergleich zu herkömmlichen Risikofaktoren zugesprochen werden.(Subramanian, Liu et al. 2014, Ghasemzadeh, Hritani et al. 2015) Diese experimentellen und klinischen Daten lassen auf einen pro-thrombotischen Einfluss von SDF-1 schließen, welcher einen nachteiligen Einfluss auf Patienten mit kardiovaskulären Anomalien ausüben könnte. Aufgrund dessen spielt die weitere Analyse der *ex vivo* Thrombusformation eine signifikante Rolle.

3. Hintergrund und Zielsetzung dieser Arbeit

Die thrombozytäre Oberflächenexpression von SDF-1 ist während eines akuten Koronarsyndroms erhöht und spielt eine große Rolle bei der Rekrutierung hämatopoetischer Stammzellen und myokardialen Reparaturmechanismen. Die SDF-1 Effekte werden durch die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 vermittelt. Aufgrund dessen wurde die Expression von SDF-1 bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit untersucht und im Rahmen eines Follow-Ups die Auswirkung auf das klinische Langzeitergebnis ermittelt.

Folgende Fragestellungen wurden im Rahmen dieser Arbeit beantwortet:

- Welchen Einfluss hat thrombozytäres SDF-1 auf das langfristige klinische Outcome bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit?
- Welche Rolle spielt SDF-1 bei der Thrombusformation *ex vivo*?

4. Material und Methoden

4.1 Patientencharakteristika und Blutprobenentnahme

In der Abteilung für Kardiologie der Universitätsklinik Tübingen wurden während der perkutanen Koronarintervention (PCI) die Blutproben von Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit gesammelt und umgehend innerhalb einer Stunde bezüglich der Oberflächenexpression von SDF-1 mittels Zweifarben-Vollblut-Durchflusszytometrie analysiert. Alle Patienten wurden informiert und unterzeichneten eine schriftliche Einverständniserklärung. Es wurden fortlaufend 608 Patienten mit einer stabilen koronaren Herzkrankheit (n = 206) oder einem akuten Koronarsyndrom (n = 307) in die Studie inkludiert. Die Definitionen dieser Krankheitsbilder sind in der Einleitung dieser Arbeit aufgeführt (s.o.).(Rath, Chatterjee et al. 2016)

Die Studie wurde von der Ethikkommission genehmigt (270/2011BO1) und erfüllt die Richtlinien der guten klinischen Praxis und der Deklaration von Helsinki.(1997, 2001, 2002)

4.2. Thrombozytäre Oberflächenbestimmung mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

4.2.1 Theoretische Grundlagen

Die Durchflusszytometrie (FACS-Analyse = fluorescence activated cell sorter) ist ein Messverfahren zur Analyse und Sortierung von Fluoreszenz-markierten Zellen innerhalb einer Zellpopulation.(Janeway C. 2001) Sie basiert auf der Emission optischer Signale der Zelle, welche diese absondert während sie in einem Einzelzellfluss mehrere Laserstrahlen unterschiedlicher Wellenlänge passiert. Die Intensität der Fluoreszenz wird mittels Photodioden

erfasst.(Gawaz 1999) Es kann durch das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward light Scatter) im flachen Winkel das Volumen der Zelle ermittelt werden und durch ein Seitwärtsstreulicht (SSC = Sideward light Scatter), das im rechten Winkel zum Laser positioniert ist, die Komplexität einer Einzelzelle und die Größe ihres Zellkernes bestimmt werden.(Lanier and Warner 1981, Howard 2003) Ebenfalls kann die Durchflusszytometrie bei der Analyse der Oberflächenexpression eines Antigens genutzt werden.(Gawaz 1999) Die dafür notwendige Markierung der Zellen erfolgt durch eine Kopplung der Farbstoffe an spezifische Antikörper oder aber auch indirekt mittels fluoreszenzmarkierten Anti-Immunglobulinen.(Janeway C. 2001) In dieser Studie kamen die Farbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC; Emissionsmaximum bei 520 nm) und Phycoerythin (PE; Emissionsmaximum bei 680 nm) zum Einsatz.

4.2.2 Praktische Durchführung

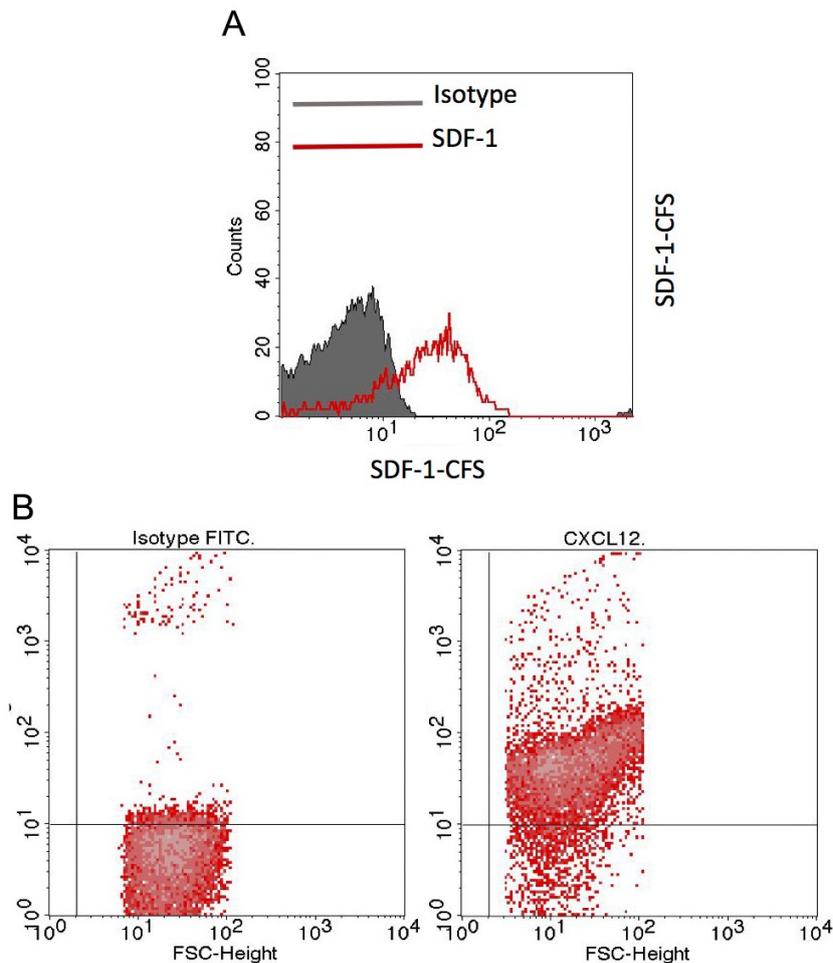
Thrombozyten wurden in Vollblut bezüglich der Oberflächenexpression von SDF-1 analysiert und mit Hilfe des Thrombozyten-spezifischen Markers GPIIb sortiert.(Rath, Chatterjee et al. 2016)

Zunächst wurde das Blut in Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin (CPDA)-Röhrchen gesammelt. Citrat dient hierbei als Hemmstoff der Gerinnung und Phosphat-Dextrose-Adenin wirkt als Energielieferant. Anschließend wurde das Vollblut 1:50 mit phosphatgepufferter Salzlösung verdünnt (PBS; Gibco) und mit den entsprechenden Antikörpern für 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert: Mouse monoclonal anti-human SDF-1-CFS (R&D systems); mouse anti-human GPIIb-PE (BD Biosciences) und der entsprechenden Isotypen-Kontrolle (mouse IgG1-FITC, mouse IgG2bPE von R&D systems). Nach der Färbung wurden die Zellen mit 0,5% Paraformaldehyd fixiert. Die Analyse der Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACS Calibur flow cytometer Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland).(Rath, Chatterjee et al. 2016) Dafür wurde zunächst eine fachgerechte Kalibrierung des FACS-Gerätes und

anschließende Kompensation nach Herstellerangaben durchgeführt um eine Überlappung der Signale der PE und FITC Antikörper zu vermindern. Als Einheit der SDF-1 Expression wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) wiedergegeben. Die Darstellung der Resultate erfolgte anhand eines Dot-Plot-Diagramms, bei dem jede gemessene Zelle als Punkt im Koordinatensystem (x-Achse = FSC; y-Achse = SSC) (Abbildung Nr. 2b) und grafisch im Histogramm (Abbildung Nr. 2a) abgebildet wurde. Im Anschluss konnte mit Hilfe eines „Gates“ durch Betrachtung eines definierten Bereiches die immunphänotypische Auswertung einer Zellpopulation, der Thrombozyten, erfolgen.

Abbildung Nr.2 A und B

Darstellung der Resultate der thrombozytären SDF-1 FACS Analyse als Dot-Plot und Histogramm



4.3 Follow-Up

Der Großteil der Patienten (n=595) wurde nach anfänglicher perkutanen Koronarintervention bezüglich der klinischer Ereignisse Tod, Myokardinfarkt (MI) und ischämischer Schlaganfall für 360 Tage nachverfolgt. Eine Minderheit der Patienten (n=13) wurde erst später in die Studie mit aufgenommen und aufgrund dessen für nur 180 Tage mitverfolgt. 47 Patienten (7,7%) gingen im Laufe des Follow-Ups verloren. Der primäre kombinierte Endpunkt bestand aus Tod, MI oder ischämischem Schlaganfall. Sekundäre Endpunkte beinhalteten das Auftreten einer der oben genannten klinischen Erscheinungsbilder. Das Follow-Up wurde durchgeführt bis einer der definierten Endpunkte eintraf. Dies erfolgte durch ein Telefon-Interview und/oder durch die Prüfung der Patientenakte bei einer Wiederaufnahme der Patienten ins Krankenhaus. (Rath, Chatterjee et al. 2016)

4.4 Analyse der *ex vivo* Thrombusformation unter arterieller Schergeschwindigkeit in einer Durchflussskammer

Vollblut gesunder Menschen wurde sowohl unbehandelt als auch unter Behandlung von rekombinantem CXCL12/SDF-1 α (rCXCL12- recombinant murine/human/feline SDF-1 α /CXCL12 von R&D systems) (1 μ g/ml) für 30 Minuten bei Raumtemperatur aufbewahrt. Dies geschah in An- bzw. Abwesenheit sowohl blockierender Antikörper gegen CXCR4 und CXCR7 (10 μ g/ml) (Mouse monoclonal anti-human CXCR4, mouse monoclonal anti-human CXCR7, R&D systems) als auch der jeweiligen IgG Kontrollen (10 μ g/ml) als Vorbehandlung für 30 Minuten bevor das rekombinante rCXCL12/rSDF-1 α addiert wurde. Darauf folgend wurde das Blut durch eine transparente Durchflussskammer (Schlitz Tiefe 50 μ m) über eine mit Kollagen beschichtete Oberfläche (Horm Collagen, Takeda, Austria GmbH, 100 μ g/ml) für 5 Minuten bei arteriellen (1700s $^{-1}$) Wand Schergewerten geleitet. Im Anschluss an die

Durchströmung wurde die Durchflussskammer für 5 Minuten mit Tyrode-Lösung durchspült und es wurden von 4 unterschiedlichen mikroskopischen Bereichen Bildaufnahmen angefertigt (Axiovert 200, Carl Zeiss, optische Darstellung 20x). Die Analyse wurde mit der Axio Vision software (Carl Zeiss) durchgeführt und die Bereiche der Thrombusformation festgelegt.

4.5 Statistische Analyse

Die gesamte statistische Analyse der klinischen Daten wurde unter Einsatz von SPSS Version 21.0 (SPSS Inc., Chicago IL) durchgeführt. Die Hazard ratio beträgt 10% vs. 15%, die Stichprobengröße (145 und 145), Alpha (0.05, zweiseitig) und die „Power“ beziffert sich auf 85%. Kontinuierliche Variablen werden als Mittelwerte mit einer Mittelwertdifferenz und einem Konfidenzintervall (CI) von 95% dargestellt. Kategoriale Variablen werden mit einem relativen Risiko und 95% CI aufgeführt. Die Cox-Regressionsanalyse beschreibt einen Vergleich der Assoziation hoher vs. niedriger thrombozytärer Oberflächenexpressionen von SDF-1 (viertes Quartil vs. erstes bis drittes Quartil) mit dem primär kombinierten Endpunkt und allen sekundären Endpunkten nach Einbeziehung der epidemiologischen Faktoren, welche das klinische Ergebnis beeinflussen. Die zeitabhängige Kovarianzanalyse wurde genutzt um die proportionale Risikoannahme des Modells zu überprüfen. Kumulatives ereignisfreies Überleben des primären und sekundären Endpunktes wurde mittels Kaplan-Meier Kurven dargestellt. Der Log-Rank-Test diente der Analyse der Überlebenszeit von Patienten mit SDF-1 Expressionen im vierten Quartil im Vergleich zu Patienten mit SDF-1 Expressionen im ersten bis dritten Quartil.(Rath, Chatterjee et al. 2016)

Die statistische Analyse der Thrombusformation *ex vivo* erfolgte mit Hilfe der GraphPad Prism software unter Durchführung eines einfachen Student t-Tests um zwei Gruppen gegenüber zu stellen und einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem Dunnett post-hoc Test um mehrere Gruppen zu

vergleichen. Die Daten werden als Mittelwert \pm S.E.M. (Standardfehler) der gesamten mit einem Thrombus bedeckten Oberfläche (Thrombus Reichweite) oder der durchschnittlichen Thrombus-Fläche (Thrombus Größe) präsentiert.(Rath, Chatterjee et al. 2016)

5. Ergebnisse

5.1 Daten und Patientenkohorte

Im Rahmen dieser Studie wurde konsekutiv bei 608 Patienten mit koronarer Herzkrankheit die thrombozytäre Oberflächenexpression von SDF-1 ermittelt und die Patientenkohorte in folgenden Untergruppen untersucht:

- SDF-1 viertes Quartil (SDF-1 4th quartile)
- SDF-1 erstes bis drittes Quartil (SDF-1 1st-3rd quartile)

Die Patientencharakteristika umfassen das Alter und Geschlecht, kardiovaskuläre Risikofaktoren, sowie die Medikation bei Aufnahme und werden in Tabelle Nr.1 dargestellt. Die Tabelle Nr.2 zeigt die Anzahl und die Kategorien der klinischen Ereignisse.(Rath, Chatterjee et al. 2016)

Tabelle Nr. 1

Basischarakteristika der Patienten mit thrombozytären SDF-1 Konzentrationen im vierten Quartil im Vergleich zum ersten bis dritten Quartil.(Rath, Chatterjee et al. 2016)

Charakteristik	SDF-1 erstes bis drittes Quartil (n=456)	SDF-1 viertes Quartil (n=152)	p (Signifikanz)
Geschlecht (männlich)	320 (70.2%) [RR (männlich/weiblich) 1.004, 95% CI 0.908-1.110]	105 (69,1%) [RR (männlich/weiblich) 0.988, 95% CI 0.730-1.337]	0.846
Alter (Jahre)	68.6 (Mittelwertdifferenz 2.377, 95% CI 0.117-4.639)	66.2 (Mittelwertdifferenz 2.377, 95% CI 0.117-4.639)	0.039

Ergebnisse

Kardiovaskuläre Risikofaktoren			
Arterielle Hypertonie	365 (80.0%) [RR (nein/ja) 1.091, 95% CI 0.979-1.215]	129 (84.9%) [RR (nein/ja) 0.744, 95% CI 0.488-1.132]	0.153
Hyperlipoproteinämie	254 (55.7%) [RR (nein/ja) 0.975, 95% CI 0.888-1.071]	81 (53.3%) [RR (nein/ja) 1.078, 95% CI 0.815-1.424]	0.600
Diabetes mellitus Typ II	141 (30.9%) [RR (nein/ja) 1.041, 95% CI 0.940-1.152]	52 (34.2%) [RR (nein/ja) 0.889, 95% CI 0.665-1.188]	0.429
Raucher	175 (38.4%) [RR (nein/ja) 1.071, 95% CI 0.972-1.180]	68 (44.7%) [RR 0.818 (nein/ja), 95% CI 0.619-1.080]	0.157
Vorhofflimmern	89 (19.5%) [RR (nein/ja) 1.015, 95% CI 0.903-1.142]	31 (20.4%) [RR (nein/ja) 0.965, 95% CI 0.679-1.344]	0.795
LVEF% normal	216 (47.4%)	64 (42.3%)	0.159
LVEF% leichte Einschränkung	132 (28.9%)	38 (25.1%)	
LVEF% moderate Einschränkung	71 (15.6%)	31 (20.5%)	
LVEF% schwere Einschränkung	35 (7.7%)	18 (11.9%)	
LVEF% unbekannt	3 (0.7%)	1 (0.7%)	
Serum-Kreatinin (mg/dl)	1.04 (Mittelwertdifferenz -0.041, 95% CI -0.184-0.102)	1.08 (Mittelwertdifferenz -0.041, 95% CI -0.184-0.102)	0.577
Medikamente bei Aufnahme			
Acetyl Salicyl Säure	254 (55.7%) [RR (nein/ja) 0.975, 95% CI 0.889-1.069]	79 (52.0%) [RR (nein/ja) 1.081, 95% CI 0.817-1.431]	0.585
Clopidogrel	56 (12.3%) [RR (nein/ja) 0.980, 95% CI 0.856-1.122]	17 (11.2%) [RR (nein/ja) 1.065, 95% CI 0.685-1.658]	0.777
Prasugrel	8 (1.8%) [RR (nein/ja) 1.037, 95% CI 0.720-1.494]	3 (2.0%) [RR (nein/ja) 0.901, 95% CI 0.340-2.390]	0.837
Ticagrelor	22 (4.8%) [RR (nein/ja) 0.886, 95% CI 0.747-1.051]	4 (2.6%) [RR (nein/ja) 1.628, 95% CI 0.654-4.054]	0.263

Ergebnisse

Orale Antikoagulantien	34 (7.5%) [RR (nein/ja) 1.093, 95% CI 0.902-1.342]	15 (9.9%) [RR (nein/ja) 0.790, 95% CI 0.506-1.235]	0.318
ACE (Angiotensin- konversionsenzym) Hemmer	184 (40.4%) [RR (nein/ja) 1.121, 95% CI 1.019-1.233]	77 (50.7%) [RR (nein/ja) 0.712, 95% CI 0.539-0.940]	0.016
AT1 Blocker (Angiotensin II Rezeptor Antagonisten)	88 (19.3%) [RR (nein/ja) 0.918, 95% CI 0.826-1.020]	21 (13.8%) [RR (nein/ja) 1.342, 95% CI 0.889-2.027]	0.148
Betablocker	256 (56.1%) [RR (nein/ja) 1.050, 95% CI 0.958-1.150]	91 (59.9%) [RR (nein/ja) 0.861, 95% CI 0.646-1.147]	0.303
Statine	215 (47.1%) [RR (nein/ja) 1.045, 95% CI 0.953-1.145]	77 (50.7%) [RR (nein/ja) 0.875, 95% CI 0.662-1.157]	0.348
Gruppen			
ACS (Akutes Koronarsyndrom)	231 (50.7%) [RR (stable CAD/ACS) 1.018, 95% CI 0.922-1.124]	76 (50.0%) [RR (stable CAD/ACS) 0.946, 95% CI 0.690-1.296]	0.729
Stable CAD (stabile koronare Herzkrankheit)	157 (34.4%) [RR (stable CAD/ACS) 1.018, 95% CI 0.922-1.124]	49 (32.2%) [RR (stable CAD/ACS) 0.946, 95% CI 0.690-1.296]	

Es konnte eine Tendenz, jedoch kein signifikanter Unterschied der Ausgangs-SDF-1-Werte für den primären kombinierten Endpunkt (ja/nein) 33.8/30.5 (Mittelwertdifferenz -3.31, 95% CI - 7.12 - 0.50; $p = 0.088$) festgestellt werden. Des Weiteren gab es keine signifikanten Unterschiede der Ausgangs-SDF-1 Werte für den sekundären Endpunkt Gesamtsterblichkeit (tot/lebend) 34.2/30.7 (Mittelwertdifferenz -3.51, 95% CI - 8.02 - 0.99; $p = 0.126$), Schlaganfall (ja/nein) 33.8/30.8 (Mittelwertdifferenz -2,94, 95% CI - 14.24 - 8.38, $p = 0.577$) und Myokardinfarkt (ja/nein) 33.9/30.7 (Mittelwertdifferenz -3.22, 95% CI - 8.74 - 2.29, $p = 0.246$), aufgezeichnet in Tabelle Nr. 2.(Rath, Chatterjee et al. 2016)

Tabelle Nr. 2

Darstellung der Ereignisse und der Inzidenzrate (Incident rate, IR) / 100 Personenjahre (person years, PY) der gesamten Kohorte (n = 561) und die dazugehörigen thrombozytären SDF-1 Werte (n = 47 sind im Laufe des Follow-ups verloren gegangen).(Rath, Chatterjee et al. 2016)

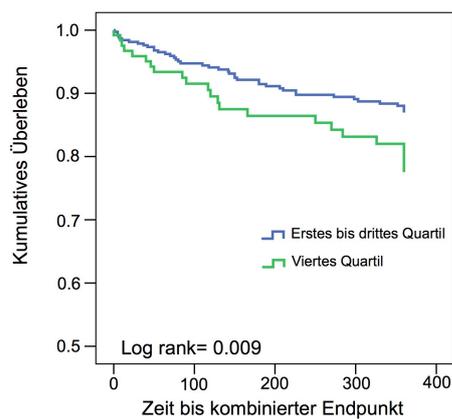
Variablen	Anzahl der Ereignisse (SDF-1 erstes bis drittes Quartil vs. viertes Quartil)	SDF-1 Mittelwerte (mean values) in Kategorien	IR/100 PY (SDF-1 erstes bis drittes Quartil vs. viertes Quartil)	p für Mittelwerte (mean values)
Kombinierter Endpunkt	72 (45/27)	33.8/30.5 (ja/nein) (Mittelwert-differenz -3.31, 95% CI -7.12 - 0.50)	10.6/19.4	0.088
Gesamtsterblichkeit	33 (19/14)	34.2/30.7 (tot/lebend) (Mittelwert-differenz -3.51, 95% CI -8.02 - 0.99)	4.5/10.1	0.126
Myokardinfarkt	43 (29/14)	33.9/30.7 (ja/nein) (Mittelwert-differenz -3.22, 95% CI -8.74 - 2.29)	6.9/10.1	0.246
Schlaganfall	11 (6/5)	33.8/30.8 (ja/nein) (Mittelwert-differenz -2.94, 95% CI -14.24 - 8.38)	1.4/3.6	0.577

Indessen zeigten Patienten mit SDF-1 Ausgangswerten über dem dritten Quartil ein signifikant schlechteres ereignisfreies Überleben im Vergleich zu Patienten mit niedrigeren SDF-1 Ausgangswerten (erstes bis drittes Quartil) (log rank 0.009 für den primären kombinierten Endpunkt und log rank 0.016 bezüglich des sekundären Endpunktes Tod).(Rath, Chatterjee et al. 2016) (Abbildung Nr.3 A und B)

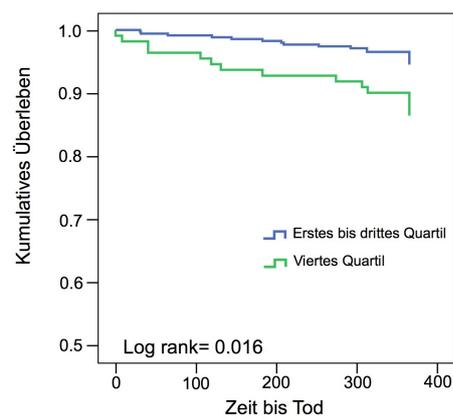
Abbildung Nr. 3

A Die Kaplan-Meier Kurve zeigt das kumulative Überleben (kombinierter Endpunkt Tod und/oder Myokardinfarkt und/oder Schlaganfall) stratifiziert nach den thrombozytären SDF-1 Werten des vierten Quartils vs. dem ersten bis dritten Quartil (Anzahl unter Risiko: blau = erstes bis drittes Quartil, grün = viertes Quartil).(Rath, Chatterjee et al. 2016)

B Die Kaplan-Meier Kurve zeigt das kumulative Überleben (sekundärer Endpunkt Gesamtsterblichkeit) stratifiziert nach den thrombozytären SDF-1 Werten des vierten Quartils vs. dem ersten bis dritten Quartil (Anzahl unter Risiko: blau = erstes bis drittes Quartil, grün = viertes Quartil).(Rath, Chatterjee et al. 2016)



Unter Risiko	422	396	369	359
Unter Risiko	139	126	119	115



Unter Risiko	422	415	396	392
Unter Risiko	139	134	129	128

A

B

Für den sekundären Endpunkt Myokardinfarkt konnten keine signifikanten Unterschiede der SDF-1-Ausgangswerte verzeichnet werden. Für den sekundären Endpunkt Schlaganfall wurde aufgrund zu geringer Fallzahlen keine Überlebensanalyse durchgeführt.(Rath, Chatterjee et al. 2016)

Die multivariate Cox-Regressionsanalyse zeigte jedoch, dass SDF-1 Werte im vierten Quartil mit dem primären kombinierten Endpunkt [Hazard ratio (HR) 2.09 (95% CI 1.26 - 3.47), $p = 0.005$] und dem sekundären Endpunkt Gesamtsterblichkeit [HR 2.90 (95% CI 1.40 - 6.00), $p = 0.004$] unabhängig assoziiert sind (Tabelle Nr.3).(Rath, Chatterjee et al. 2016)

Tabelle Nr. 3

Cox Regressionsanalyse für den primären kombinierten Endpunkt Tod, Myokardinfarkt und/oder Schlaganfall (combined endpoint, CE) und den sekundären Endpunkt Gesamtsterblichkeit (all-cause death, ACD) als abhängige Variablen und klinische Faktoren als Kovariaten der gesamten Patientenkohorte kardiovaskulärer Patienten.(Rath, Chatterjee et al. 2016) (HR = Hazard ratio; p = Signifikanz)

Variable	HR (CE) (95% CI)	HR (ACD) (95% CI)	p (CE)	p (ACD)
Alter	1.05 (1.02-1.07)	1.08 (1.04-1.13)	0.001	<0.001
Geschlecht (männlich/weiblich)	1.29 (0.77-2.15)	1.18 (0.55-2.50)	0.150	0.385
LVEF% Kategorie	1.35 (1.07-1.71)	1.63 (1.14-2.31)	0.011	0.007
Serum-Kreatinin	1.01 (0.72-1.41)	0.70 (0.29-1.68)	0.971	0.426
Arterielle Hypertonie (nein/ja)	0.88 (0.42-1.85)	0.71 (0.23-2.18)	0.595	0.551
Diabetes mellitus Typ II (nein/ja)	1.45 (0.88-2.41)	1.84 (0.86-3.97)	0.148	0.118
ASS	2.37	2.54	0.003	0.039

Ergebnisse

(nein/ja)	(1.33-4.22)	(1.05-6.13)		
Clopidogrel (nein/ja)	1.01 (0.50-2.02)	0.79 (0.27-2.34)	0.651	0.668
ACE Hemmer (nein/ja)	0.84 (0.51-1.39)	1.00 (0.47-2.12)	0.194	0.993
Grund für die Aufnahme (andere, stabile CAD, ACS)	1.45 (1.02-2.06)	1.42 (0.86-2.34)	0.040	0.172
SDF-1 (Erstes bis drittes Quartil vs. viertes Quartil)	2.09 (1.26-3.47)	2.90 (1.40-6.00)	0.005	0.004

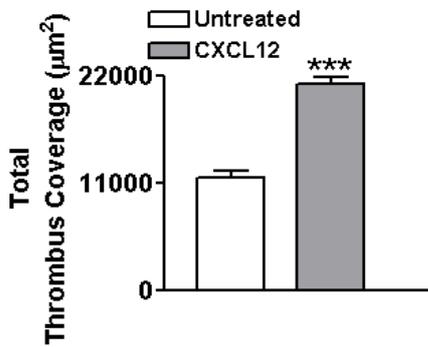
SDF-1/CXCL12 übt einen pro-thrombotischen Effekt *ex vivo* aus

Es konnte beobachtet werden, dass Blut, welches mit rSDF-1 (1µg/ml) behandelt wurde und über eine mit Kollagen beschichtete Oberfläche geleitet wurde eine bedeutend erhöhte ($p < 0.001$) Thrombusformation und eine vergrößerte Gesamtreichweite des Thrombus aufwies (Abbildung Nr. 4 A). In der Anwesenheit blockierender anti-CXCR4 Antikörper, jedoch nicht bei anti-CXCR7 oder IgG Kontrollen, wurde der steigernde Effekt von rSDF-1 auf die Thrombusformation signifikant ($p < 0.05$) reduziert (Abbildung Nr. 4 B und 5). Gegenwärtiger Beweis ist zufolge bisheriger Beobachtungen das Potential von SDF-1 entweder von einer autokrinen (ausgehend von aktivierten Thrombozyten), parakrinen oder externen Quelle, die Thrombusformation zu fördern.

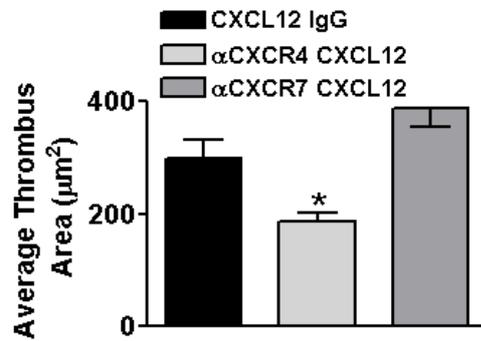
Abbildung Nr. 4

A Das Balkendiagramm zeigt eine signifikant (**p<0.001) vergrößerte Gesamtfläche des Thrombus nach Durchströmung mit Vollblut, welches mit rekombinantem SDF-1 behandelt wurde im Vergleich zu unbehandeltem Vollblut.

B Das Balkendiagramm veranschaulicht eine signifikant (*p<0.05) reduzierte Durchschnittsthrombus-Fläche in Anwesenheit blockierender CXCR4 Antikörper im Vergleich zu mit rSDF-1 behandeltem Vollblut nachdem es über eine mit Kollagen beschichtete Oberfläche geleitet wurde. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± S.E.M. ausgehend vom Blut drei gesunder Spender.



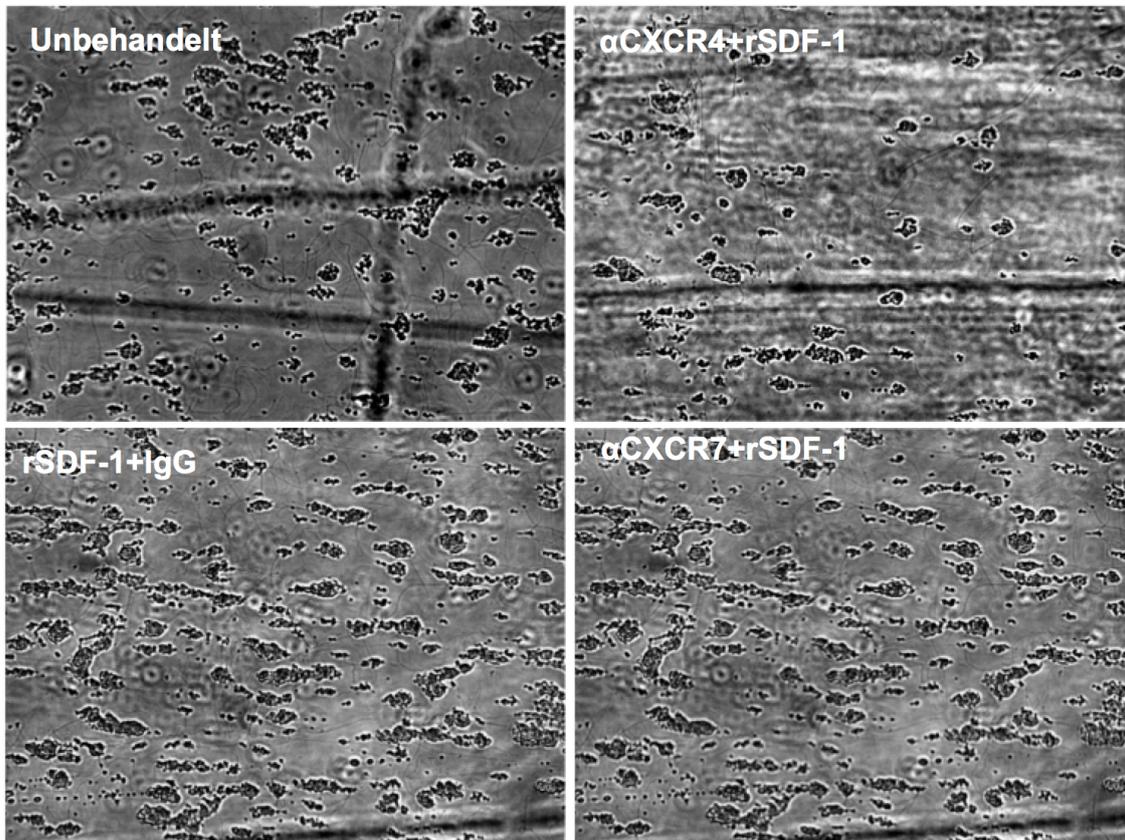
A



B

Abbildung Nr. 5

Phasenkontrastbilder der Oberflächenbedeckung des Thrombus unbehandelter Blutproben gesunder Probanden auf einer mit Kollagen beschichteten Oberfläche und folgend die Behandlung mit Rekombinant SDF-1 in An- bzw. Abwesenheit blockierender Antikörper gegen CXCR4 oder CXCR7 mit Bezug auf die IgG Kontrolle.



6. Diskussion

Die zentralen Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass (1) die Ausgangswerte von SDF-1 Oberflächenexpressionen auf Thrombozyten bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit, die Tod, einen Myokardinfarkt und/oder einen Schlaganfall erleiden sich nicht signifikant unterscheiden. (2) Hohe Ausgangswerte der SDF-1 Oberflächenexpressionen auf Thrombozyten (über dem dritten Quartil) signifikant und unabhängig mit dem Endpunkt Tod, Myokardinfarkt und/ oder Schlaganfall und dem einzelnen Ereignis Tod assoziiert sind.(Rath, Chatterjee et al. 2016) (3) Mit rSDF-1 behandeltes Blut eine signifikant erhöhte Thrombusformation *ex vivo* zeigt.

SDF-1 (CXCL12) ist einer der wichtigsten chemischen Lockstoffe für Stamm- und Vorläuferzellen und ist somit essentiell für sowohl die zielgerichtete Wanderung (Migration, Speicherung und Entstehung) als auch den Transport (Mobilisierung) von CD34+ Vorläuferzellen entsprechend zum Knochenmark oder peripheren Blut.(Aiuti, Webb et al. 1997, Peled, Grabovsky et al. 1999, Yamaguchi, Kusano et al. 2003, Petit, Goichberg et al. 2005, Stellos, Bigalke et al. 2009) Nachweise vergangener Jahre konnten zeigen, dass aktivierte Thrombozyten SDF-1 exprimieren und freisetzen.(Chatterjee, Huang et al. 2011) SDF-1 nimmt eine zentrale Rolle bei der Transformation von zirkulierenden Monozyten in multipotente Stammzellen ein, mit der Kapazität sich in mesenchymale oder endotheliale Zelllinien zu differenzieren.(Seta, Okazaki et al. 2013) Somit wird die Entwicklung von Monozyten zu Makrophagen und Schaumzellen durch SDF-1 begünstigt und beschreibt das proinflammatorische Potential dieses Chemokins, da hierdurch die Zellstruktur der atherosklerotischen Plaque aber auch die Vulnerabilität beeinflusst werden könnten.(Rath, Chatterjee et al. 2016) Diese vielzähligen Effekte von SDF-1 auf die Monozytenfunktion, das Überleben und die Differenzierung werden durch jeweils einen oder beide CXCR Rezeptoren CXCR4/CXCR7 vermittelt.(Chatterjee, von Ungern-Sternberg et al. 2015) Thrombozyten sind die Hauptquelle von SDF-1 und die thrombozytäre SDF-1 Expression ist bei

Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom im Vergleich zu Patienten mit einer stabilen Angina Pectoris erhöht.(Stellos, Bigalke et al. 2009) Durch den Chemokinrezeptor CXCR4 kann SDF-1 einen autokrinen Effekt auf Thrombozyten ausüben, die Kalzium Mobilisierung vermitteln und eine Freisetzungs- und Aggregations-Reaktion hervorrufen durch eine erhöhte Thromboxan A₂ Produktion.(Kraemer, Borst et al. 2010, Kraemer, Schmidt et al. 2011, Chatterjee and Gawaz 2013, Walsh, Harper et al. 2015) Wir beobachteten, dass sich *ex vivo* durch die Supplementation von rekombinantem SDF-1 die Thrombusformation bei dynamischen arteriellen Strömungszuständen über eine mit Kollagen beschichtete Oberfläche verstärkte. Dieser steigernde Effekt von SDF-1 anhand einer externen Aktivierung wurde primär durch den autokrinen Effekt mittels CXCR4 vermittelt.(Walsh, Harper et al. 2015) Diese Erkenntnis betont die kritische Rolle von SDF-1, indem es den günstigen Effekten welche SDF-1 zunächst zugeschrieben wurden, eine Stammzell-anziehende Umgebung zu schaffen und somit zu Gewebsreparaturmechanismen und funktioneller Wiederherstellung beizutragen, entgegenwirkt und demgegenüber die Thrombose und Hämostase beeinflusst. Für SDF-1 konnte nachgewiesen werden, dass es verstärkt in glatten Muskelzellen, Endothelzellen, Makrophagen und atherosklerotischen Plaques exprimiert wird, jedoch nicht in normalen Blutgefäßen. Dies demonstriert den direkten Effekt, die Thrombozytenaktivierung zu veranlassen und verdeutlicht die Rolle von SDF-1 bezüglich der Pathogenese im Rahmen der Atherosklerose.(Abi-Younes, Sauty et al. 2000) Kürzlich erwiesen sich Plasma Konzentrationen von SDF-1 als starker unabhängiger Prädiktor für unerwünschte kardiovaskuläre Ereignisse bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit, außerdem konnten SDF-1 Konzentrationen mit Herzinsuffizienz in Zusammenhang gebracht werden.(Subramanian, Liu et al. 2014)

Diese vielseitigen Effekte von SDF-1 bei kardiovaskulären Pathologien sind jedoch weiterhin zu diskutieren, da gezeigt werden konnte, dass eine hohe Oberflächenexpression von SDF-1 auf Thrombozyten mit einer verbesserten Erholung des Myokards nach einem Myokardinfarkt assoziiert ist.(Geisler,

Fekecs et al. 2012) Diese Erkenntnis konnte mit experimentellen Daten bestätigt werden, indem ein bifunktionelles Protein entwickelt wurde, welches aus einer SDF-1-Domäne und einer Glykoprotein VI (GPVI)-Domäne besteht und eine hohe Bindungsaffinität zu dem SDF-1 Rezeptor CXCR4 aufweist. SDF-1-GPVI löst die Chemotaxis CXCR4-positiver Zellen aus, erhält das Zell-Überleben, verbessert die endotheliale Differenzierung von Knochenmarkszellen (bone marrow cells, BMCs) und zeigt einen proangiogenen Effekt auf. In einem Maus Modell eines Myokardinfarkts führt die Anwendung des bifunktionellen Proteins zu einer verstärkten Rekrutierung von BMCs, einer erhöhten kapillären Dichte, einer reduzierten Infarktgröße und zu einem Schutz der kardialen Funktion.(Ziegler, Elvers et al. 2012, Schesny, Monaghan et al. 2014, Rath, Chatterjee et al. 2016) Außerdem konnten bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit Zellen festgestellt werden, die sich für das progenitorzellspezifische CD34-Antigen, aber auch für das thrombozytenspezifische CD42b-Antigen positiv erwiesen. Dabei wird vermutet, dass es sich um Zellaggregationen zirkulierender Progenitorzellen und Thrombozyten handelt, welche darüberhinaus in der Gesamtzahl der CD34/CD42b-positiven Zellaggregationen in Bezug auf die Gesamtpopulation der CD34-positiven Zellen bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom im Vergleich zu Patienten mit einer stabilen Angina Pectoris signifikant erhöht sind.(Stellos, Bigalke et al. 2013) Hierdurch konnte eine Interaktion der Progenitorzellen und Thrombozyten bei Patienten mit einer KHK verdeutlicht werden. Es ist jedoch unklar, ob dies auf einen mittels SDF-1 auf Thrombozyten aktivierten Reparaturmechanismus hindeutet. Die Vermutung eines protektiven Effekts von SDF-1 konnte mit folgender Erkenntnis untermauert werden, indem hohe Werte (über dem Median) der Expression des SDF-1-Rezeptors CXCR7 auf Thrombozyten einen vorteilhaften Einfluss auf die Erholung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF%) nach einem akuten Koronarsyndrom aufweisen. Zudem korreliert das CXCR7 auf Thrombozyten positiv und signifikant mit dem thrombozytären SDF-1.(Rath, Chatterjee et al. 2014) Jedoch konnte keine Assoziation hoher CXCR7 Werte mit den klinischen Ereignissen Tod und Myokardinfarkt gezeigt werden.(Rath, Chatterjee et al.

2015) In Übereinstimmung mit unseren aktuellen Ergebnissen scheint diese Kontroverse sogar noch ausgeprägter für thrombozytäres SDF-1 zu sein. Hohe SDF-1 Werte auf Thrombozyten sind nicht mit einem positiven klinischen Langzeitergebnis assoziiert und beeinflussen vielmehr das klinische Ergebnis in einer negativen Weise.(Rath, Chatterjee et al. 2016) Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit kürzlich gewonnenen Erkenntnissen, dass endomyokardiale Expressionen von SDF-1 bei entzündlichen Kardiomyopathien erhöht sind und positiv mit myokardialer Fibrose assoziiert sind. Weiterhin konnten endomyokardiale SDF-1 Expressionen als unabhängiger Prädiktor für Mortalität in nicht-ischämischen Kardiomyopathien identifiziert werden.(Zuern, Walker et al. 2015)

Zusammenfassend kann durch Thrombozyten freigesetztes SDF-1 das Gleichgewicht zwischen vaskulärer Regeneration bzw. Gewebsreparatur in der Akutphase eines kardiovaskulären Ereignisses und auf der anderen Seite vaskuläre Inflammation bzw. Thromboseprogression im Rahmen eines chronischen Geschehens bestimmt werden und bleibt weiterhin Gegenstand kontroverser Diskussionen. Es konnte nun jedoch erstmals ein klinischer Hinweis geliefert werden, dass hohe Oberflächenexpressionen von SDF-1 auf Thrombozyten auf das klinische Langzeitergebnis bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit einen negativen Einfluss nehmen.(Rath, Chatterjee et al. 2016)

7. Zusammenfassung

SDF-1 ist als CXC Chemokin in die Rekrutierung hämatopoetischer Stammzellen in Form eines wirksamen chemischen Signalstoffes involviert. Demnach spielt es eine zentrale Rolle bei Entzündungsreaktionen und vaskulären Gewebsreparaturmechanismen. SDF-1 wird auf aktivierten Thrombozyten exprimiert. Zuvor konnte gezeigt werden, dass die SDF-1 Oberflächenexpression auf Thrombozyten bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom erhöht ist und mit einer Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF%) nach einem Myokardinfarkt assoziiert ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde von 608 Patienten mit koronarer Herzkrankheit die Oberflächenexpression von SDF-1 auf Thrombozyten mittels einer FACS Messung untersucht und die Patienten bezüglich der Endpunkte Tod, Myokardinfarkt und Schlaganfall für 360 Tage nachverfolgt. Außerdem wurde die Analyse der Thrombusformation *ex vivo* mit rekombinantem SDF-1 unter arterieller Schergeschwindigkeit in einer Durchflussskammer durchgeführt. Die Auswertung der ermittelten Ergebnisse erfolgte in Bezug auf die Patientencharakteristika.

Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Ausgangswerten der thrombozytären SDF-1 Oberflächenexpression über dem dritten Quartil ein signifikant schlechteres ereignisfreies Überleben im Vergleich zu Patienten mit Ausgangswerten im ersten bis dritten Quartil aufwiesen. Die multivariate Cox-Regressionsanalyse verdeutlichte, dass SDF-1 Expressionen über dem dritten Quartil unabhängig mit dem primären kombinierten Endpunkt und dem sekundären Endpunkt Gesamtsterblichkeit assoziiert waren. Ferner konnte ein signifikanter Einfluss von rSDF auf die Thrombusformation *ex vivo* beobachtet werden.

Letztendlich wird die Rolle von SDF-1 bezüglich der Geweberegeneration auf der einen Seite und der Verstärkung der Thrombose und Fibrose auf der anderen Seite kontrovers diskutiert. Nun konnte jedoch erstmals in einer

klinischen Studie der Nachweis geliefert werden, dass hohe SDF-1 Oberflächenexpressionen auf Thrombozyten das klinische Langzeitergebnis bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit negativ beeinflussen.

8. Literaturverzeichnis

(1997). "World Medical Association Declaration of Helsinki. Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects." Cardiovasc Res **35**(1): 2-3.

(2001). "ICH Harmonised Tripartite Guideline: Guideline for Good Clinical Practice." J Postgrad Med **47**(3): 199-203.

(2002). "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." Med Etika Bioet **9**(1-2): 12-19.

Abbott, J. D., Y. Huang, D. Liu, R. Hickey, D. S. Krause and F. J. Giordano (2004). "Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury." Circulation **110**(21): 3300-3305.

Abergel, E. and E. Nikolsky (2010). "Ticagrelor: an investigational oral antiplatelet treatment for reduction of major adverse cardiac events in patients with acute coronary syndrome." Vasc Health Risk Manag **6**: 963-977.

Abi-Younes, S., A. Sauty, F. Mach, G. K. Sukhova, P. Libby and A. D. Luster (2000). "The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques." Circ Res **86**(2): 131-138.

Aiuti, A., I. J. Webb, C. Bleul, T. Springer and J. C. Gutierrez-Ramos (1997). "The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood." J Exp Med **185**(1): 111-120.

Alberio, L. and K. J. Clemetson (2005). "[Platelet inhibition and activation. Mechanisms and clinical implications]." Herz **30**(3): 176-180.

Ali, S. and G. Lazennec (2007). "Chemokines: novel targets for breast cancer metastasis." Cancer Metastasis Rev **26**(3-4): 401-420.

Balabanian, K., B. Lagane, S. Infantino, K. Y. Chow, J. Harriague, B. Moepps, F. Arenzana-Seisdedos, M. Thelen and F. Bachelierie (2005). "The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes." J Biol Chem **280**(42): 35760-35766.

Balamuthusamy, S. and R. Arora (2007). "Hematologic adverse effects of clopidogrel." Am J Ther **14**(1): 106-112.

Bertrand, M. E., M. L. Simoons, K. A. Fox, L. C. Wallentin, C. W. Hamm, E. McFadden, P. J. de Feyter, G. Specchia and W. Ruzyllo (2000). "Management of acute coronary syndromes: acute coronary syndromes without persistent ST segment elevation; recommendations of the Task Force of the European Society of Cardiology." Eur Heart J **21**(17): 1406-1432.

Bosch, X., J. Marrugat and J. Sanchis (2013). "Platelet glycoprotein IIb/IIIa blockers during percutaneous coronary intervention and as the initial medical treatment of non-ST segment elevation acute coronary syndromes." Cochrane Database Syst Rev **11**: CD002130.

Burns, J. M., B. C. Summers, Y. Wang, A. Melikian, R. Berahovich, Z. Miao, M. E. Penfold, M. J. Sunshine, D. R. Littman, C. J. Kuo, K. Wei, B. E. McMaster, K. Wright, M. C. Howard and T. J. Schall (2006). "A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development." J Exp Med **203**(9): 2201-2213.

Ceradini, D. J., A. R. Kulkarni, M. J. Callaghan, O. M. Tepper, N. Bastidas, M. E. Kleinman, J. M. Capla, R. D. Galiano, J. P. Levine and G. C. Gurtner (2004). "Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1." Nat Med **10**(8): 858-864.

Chatterjee, M. and M. Gawaz (2013). "Platelet-derived CXCL12 (SDF-1alpha): basic mechanisms and clinical implications." J Thromb Haemost **11**(11): 1954-1967.

Chatterjee, M., Z. Huang, W. Zhang, L. Jiang, K. Hultenby, L. Zhu, H. Hu, G. P. Nilsson and N. Li (2011). "Distinct platelet packaging, release, and surface expression of proangiogenic and antiangiogenic factors on different platelet stimuli." Blood **117**(14): 3907-3911.

Chatterjee, M., S. N. von Ungern-Sternberg, P. Seizer, F. Schlegel, M. Buttcher, N. A. Sindhu, S. Muller, A. Mack and M. Gawaz (2015). "Platelet-derived CXCL12 regulates monocyte function, survival, differentiation into macrophages and foam cells through differential involvement of CXCR4-CXCR7." Cell Death Dis **6**: e1989.

Coller, B. S. (2011). "Historical perspective and future directions in platelet research." J Thromb Haemost **9 Suppl 1**: 374-395.

De Luca, G., E. Navarese and P. Marino (2009). "Risk profile and benefits from Gp IIb-IIIa inhibitors among patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated with primary angioplasty: a meta-regression analysis of randomized trials." Eur Heart J **30**(22): 2705-2713.

Dorr, R. (2006). "[Chronic stable angina pectoris. A comparison of diagnostic pathways]." Herz **31**(9): 827-835.

Erbel, R. and G. Gorge (2014). "[New insights in pathogenesis and etiology of coronary artery disease]." Dtsch Med Wochenschr **139 Suppl 1**: S4-8.

Gaglia, M. A., Jr. and R. Waksman (2011). "Overview of the 2010 Food and Drug Administration Cardiovascular and Renal Drugs Advisory Committee meeting regarding ticagrelor." Circulation **123**(4): 451-456.

Gawaz, M. (1999). Das Blutplättchen. Stuttgart New York, Georg Thieme Verlag.

Gawaz, M. (2004). "Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium." Cardiovasc Res **61**(3): 498-511.

Geisler, T., L. Fekecs, T. Wurster, A. Chiribiri, A. Schuster, E. Nagel, S. Miller, M. Gawaz, K. Stellos and B. Bigalke (2012). "Association of platelet-SDF-1 with hemodynamic function and infarct size using cardiac MR in patients with AMI." Eur J Radiol **81**(4): e486-490.

Gekle, M. (2010). Physiologie, Georg Thieme Verlag.

Ghasemzadeh, N., A. W. Hritani, C. De Staercke, D. J. Eapen, E. Veledar, H. Al Kassem, M. Khayata, A. M. Zafari, L. Sperling, C. Hooper, V. Vaccarino, K. Mavromatis and A. A. Quyyumi (2015). "Plasma stromal cell-derived factor 1 α /CXCL12 level predicts long-term adverse cardiovascular outcomes in patients with coronary artery disease." Atherosclerosis **238**(1): 113-118.

Gurm, H. S., U. Tamhane, P. Meier, P. M. Grossman, S. Chetcuti and E. R. Bates (2009). "A comparison of abciximab and small-molecule glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: a meta-analysis of contemporary randomized controlled trials." Circ Cardiovasc Interv **2**(3): 230-236.

Hamm, C. W. and K. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und (2004). "[Guidelines: acute coronary syndrome (ACS). 1: ACS without persistent ST segment elevations]." Z Kardiol **93**(1): 72-90.

Hof, D. and A. von Eckardstein (2009). "[Risk factors in atherosclerotic coronary heart disease]." Ther Umsch **66**(4): 253-259.

Holschermann, H., H. Tillmanns and C. Bode (2006). "[Pathophysiology of acute coronary syndrome]." Hamostaseologie **26**(2): 99-103.

Horn, F. (2012). Biochemie des Menschen. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag.

Howard, M. C. (2003). Practical flow cytometry, A John Wiley & Sons, inc.
Husted, S., H. Emanuelsson, S. Heptinstall, P. M. Sandset, M. Wickens and G. Peters (2006). "Pharmacodynamics, pharmacokinetics, and safety of the oral

reversible P2Y₁₂ antagonist AZD6140 with aspirin in patients with atherosclerosis: a double-blind comparison to clopidogrel with aspirin." Eur Heart J **27**(9): 1038-1047.

Janeway C., T. P., Walport M., Shlomchik M. (2001). Immunobiology. New York, Garland Publishing.

Janowski, M. (2009). "Functional diversity of SDF-1 splicing variants." Cell Adh Migr **3**(3): 243-249.

Jazin, E. E., S. Soderstrom, T. Ebendal and D. Larhammar (1997). "Embryonic expression of the mRNA for the rat homologue of the fusin/CXCR-4 HIV-1 co-receptor." J Neuroimmunol **79**(2): 148-154.

Jung, Y., J. Wang, A. Schneider, Y. X. Sun, A. J. Koh-Paige, N. I. Osman, L. K. McCauley and R. S. Taichman (2006). "Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts; a possible mechanism for stem cell homing." Bone **38**(4): 497-508.

Jurk, K. and B. E. Kehrel (2010). "[Pathophysiology and biochemistry of platelets]." Internist (Berl) **51**(9): 1086, 1088-1092, 1094.

Karl Heinz Graefe, W. L., Heinz Bönisch (2011). Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie, Thieme.

Kehrel, B. E. (2008). "[Platelets: biochemistry and physiology]." Hamostaseologie **28**(5): 289-298.

Kelm, M. and B. E. Strauer (2005). "[Acute coronary syndrome: unstable angina and myocardial infarction]." Internist (Berl) **46**(3): 265-274.

Kollet, O., S. Shivtiel, Y. Q. Chen, J. Suriawinata, S. N. Thung, M. D. Dabeva, J. Kahn, A. Spiegel, A. Dar, S. Samira, P. Goichberg, A. Kalinkovich, F. Arenzana-Seisdedos, A. Nagler, I. Hardan, M. Revel, D. A. Shafritz and T. Lapidot (2003). "HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34⁺ stem cell recruitment to the liver." J Clin Invest **112**(2): 160-169.

Kraemer, B. F., O. Borst, E. M. Gehring, T. Schoenberger, B. Urban, E. Ninci, P. Seizer, C. Schmidt, B. Bigalke, M. Koch, I. Martinovic, K. Daub, T. Merz, L. Schwanitz, K. Stellos, F. Fiesel, M. Schaller, F. Lang, M. Gawaz and S. Lindemann (2010). "PI3 kinase-dependent stimulation of platelet migration by stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)." J Mol Med (Berl) **88**(12): 1277-1288.

Kraemer, B. F., C. Schmidt, B. Urban, B. Bigalke, L. Schwanitz, M. Koch, P. Seizer, M. Schaller, M. Gawaz and S. Lindemann (2011). "High shear flow induces migration of adherent human platelets." Platelets **22**(6): 415-421.

- Kucia, M., K. Jankowski, R. Reza, M. Wysoczynski, L. Bandura, D. J. Allendorf, J. Zhang, J. Ratajczak and M. Z. Ratajczak (2004). "CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion." J Mol Histol **35**(3): 233-245.
- Langer, H. and M. Gawaz (2006). "[The role of platelets for the pathophysiology of acute coronary syndromes]." Hamostaseologie **26**(2): 114-118.
- Lanier, L. L. and N. L. Warner (1981). "Paraformaldehyde fixation of hematopoietic cells for quantitative flow cytometry (FACS) analysis." J Immunol Methods **47**(1): 25-30.
- Libby, P., I. Tabas, G. Fredman and E. A. Fisher (2014). "Inflammation and its resolution as determinants of acute coronary syndromes." Circ Res **114**(12): 1867-1879.
- Love, B. B., J. Biller and M. Gent (1998). "Adverse haematological effects of ticlopidine. Prevention, recognition and management." Drug Saf **19**(2): 89-98.
- Martinez, A., S. Kapas, M. J. Miller, Y. Ward and F. Cuttitta (2000). "Coexpression of receptors for adrenomedullin, calcitonin gene-related peptide, and amylin in pancreatic beta-cells." Endocrinology **141**(1): 406-411.
- Massberg, S., I. Konrad, K. Schurzinger, M. Lorenz, S. Schneider, D. Zohlnhoefer, K. Hoppe, M. Schiemann, E. Kennerknecht, S. Sauer, C. Schulz, S. Kerstan, M. Rudelius, S. Seidl, F. Sorge, H. Langer, M. Peluso, P. Goyal, D. Vestweber, N. R. Emambokus, D. H. Busch, J. Frampton and M. Gawaz (2006). "Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo." J Exp Med **203**(5): 1221-1233.
- May, A. E., P. Seizer and M. Gawaz (2008). "Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(3): s5-10.
- Miao, Z., K. E. Luker, B. C. Summers, R. Berahovich, M. S. Bhojani, A. Rehemtulla, C. G. Kleer, J. J. Essner, A. Nasevicius, G. D. Luker, M. C. Howard and T. J. Schall (2007). "CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(40): 15735-15740.
- Moepps, B., R. Frodl, H. R. Rodewald, M. Baggiolini and P. Gierschik (1997). "Two murine homologues of the human chemokine receptor CXCR4 mediating stromal cell-derived factor 1alpha activation of Gi2 are differentially expressed in vivo." Eur J Immunol **27**(8): 2102-2112.
- Nagasawa, T., S. Hirota, K. Tachibana, N. Takakura, S. Nishikawa, Y. Kitamura, N. Yoshida, H. Kikutani and T. Kishimoto (1996). "Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1." Nature **382**(6592): 635-638.

Peled, A., V. Grabovsky, L. Habler, J. Sandbank, F. Arenzana-Seisdedos, I. Petit, H. Ben-Hur, T. Lapidot and R. Alon (1999). "The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow." J Clin Invest **104**(9): 1199-1211.

Petit, I., P. Goichberg, A. Spiegel, A. Peled, C. Brodie, R. Seger, A. Nagler, R. Alon and T. Lapidot (2005). "Atypical PKC-zeta regulates SDF-1-mediated migration and development of human CD34+ progenitor cells." J Clin Invest **115**(1): 168-176.

Rainger, G. E. and G. B. Nash (2001). "Cellular pathology of atherosclerosis: smooth muscle cells prime cocultured endothelial cells for enhanced leukocyte adhesion." Circ Res **88**(6): 615-622.

Ransohoff, R. M. (2009). "Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology." Immunity **31**(5): 711-721.

Rath, D., M. Chatterjee, A. Bongartz, K. Muller, M. Droppa, F. Stimpfle, O. Borst, C. Zuern, S. Vogel, M. Gawaz and T. Geisler (2016). "Platelet surface expression of SDF-1 is associated with clinical outcomes in the patients with cardiovascular disease." Platelets: 1-6.

Rath, D., M. Chatterjee, O. Borst, K. Muller, H. Langer, A. F. Mack, M. Schwab, S. Winter, M. Gawaz and T. Geisler (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." J Thromb Haemost **13**(5): 719-728.

Rath, D., M. Chatterjee, O. Borst, K. Muller, K. Stellos, A. F. Mack, A. Bongartz, B. Bigalke, H. Langer, M. Schwab, M. Gawaz and T. Geisler (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." Eur Heart J **35**(6): 386-394.

Ricciotti, E. and G. A. FitzGerald (2011). "Prostaglandins and inflammation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **31**(5): 986-1000.

Ross, R. (1979). "The pathogenesis of atherosclerosis." Mech Ageing Dev **9**(5-6): 435-440.

Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." N Engl J Med **340**(2): 115-126.

Rot, A. and U. H. von Andrian (2004). "Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells." Annu Rev Immunol **22**: 891-928.

Ruggeri, Z. M. (2002). "Platelets in atherothrombosis." Nat Med **8**(11): 1227-1234.

Salcedo, R. and J. J. Oppenheim (2003). "Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses." Microcirculation **10**(3-4): 359-370.

Samuelsson, B. (1983). "From studies of biochemical mechanism to novel biological mediators: prostaglandin endoperoxides, thromboxanes, and leukotrienes. Nobel Lecture, 8 December 1982." Biosci Rep **3**(9): 791-813.

Sandri, M., S. Gielen and G. Schuler (2008). "[Prevention of coronary artery disease]." Internist (Berl) **49**(2): 154-161.

Schesny, M. K., M. Monaghan, A. H. Bindermann, D. Freund, M. Seifert, J. A. Eble, S. Vogel, M. P. Gawaz, S. Hinderer and K. Schenke-Layland (2014). "Preserved bioactivity and tunable release of a SDF1-GPVI bi-specific protein using photo-crosslinked PEGda hydrogels." Biomaterials **35**(25): 7180-7187.

Schioppa, T., B. Uranchimeg, A. Sacconi, S. K. Biswas, A. Doni, A. Rapisarda, S. Bernasconi, S. Sacconi, M. Nebuloni, L. Vago, A. Mantovani, G. Melillo and A. Sica (2003). "Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia." J Exp Med **198**(9): 1391-1402.

Schmidt, R. F. L., F. (2007). Physiologie des Menschen, Springer Berlin Heidelberg.

Scott, J. (2004). "Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease." Curr Opin Genet Dev **14**(3): 271-279.

Secchiero, P., C. Celeghini, G. Cutroneo, A. Di Baldassarre, R. Rana and G. Zauli (2000). "Differential effects of stromal derived factor-1 alpha (SDF-1 alpha) on early and late stages of human megakaryocytic development." Anat Rec **260**(2): 141-147.

Sechtem, U. (2008). "[Therapy of chronic stable angina]." Internist (Berl) **49**(1): 57-66; quiz 67-58.

Seta, N., Y. Okazaki, H. Miyazaki, T. Kato and M. Kuwana (2013). "Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 is required for the transformation of circulating monocytes into multipotential cells." PLoS One **8**(9): e74246.

Siegel-Axel, D., H. Langer, S. Lindemann and M. Gawaz (2006). "[Role of platelets in atherosclerosis and inflammation]." Med Klin (Munich) **101**(6): 467-475.

Sierro, F., C. Biben, L. Martinez-Munoz, M. Mellado, R. M. Ransohoff, M. Li, B. Woehl, H. Leung, J. Groom, M. Batten, R. P. Harvey, A. C. Martinez, C. R. Mackay and F. Mackay (2007). "Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(37): 14759-14764.

- Silbernagl, S. (2012). Taschenatlas der Physiologie. Stuttgart, Thieme.
- Simmons, G., J. D. Reeves, S. Hibbitts, J. T. Stine, P. W. Gray, A. E. Proudfoot and P. R. Clapham (2000). "Co-receptor use by HIV and inhibition of HIV infection by chemokine receptor ligands." Immunol Rev **177**: 112-126.
- Smith, J. B. and A. L. Willis (1971). "Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets." Nat New Biol **231**(25): 235-237.
- Stellos, K., B. Bigalke, O. Borst, F. Pfaff, A. Elskamp, S. Sachsenmaier, R. Zachmann, K. Stamatelopoulos, T. Schonberger, T. Geisler, H. Langer and M. Gawaz (2013). "Circulating platelet-progenitor cell coaggregate formation is increased in patients with acute coronary syndromes and augments recruitment of CD34+ cells in the ischaemic microcirculation." Eur Heart J **34**(32): 2548-2556.
- Stellos, K., B. Bigalke, H. Langer, T. Geisler, A. Schad, A. Kogel, F. Pfaff, D. Stakos, P. Seizer, I. Muller, P. Htun, S. Lindemann and M. Gawaz (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." Eur Heart J **30**(5): 584-593.
- Stellos, K., M. Ruf, K. Sopova, A. Kiliyas, A. Rahmann, K. Stamatelopoulos, R. Jorbenadze, T. Geisler, M. Gawaz and B. Bigalke (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**(2): 913-916.
- Stellos, K., P. Seizer, B. Bigalke, K. Daub, T. Geisler and M. Gawaz (2010). "Platelet aggregates-induced human CD34+ progenitor cell proliferation and differentiation to macrophages and foam cells is mediated by stromal cell derived factor 1 in vitro." Semin Thromb Hemost **36**(2): 139-145.
- Subramanian, S., C. Liu, A. Aviv, J. E. Ho, P. Courchesne, P. Muntendam, M. G. Larson, S. Cheng, T. J. Wang, N. N. Mehta and D. Levy (2014). "Stromal cell-derived factor 1 as a biomarker of heart failure and mortality risk." Arterioscler Thromb Vasc Biol **34**(9): 2100-2105.
- Sun, X., G. Cheng, M. Hao, J. Zheng, X. Zhou, J. Zhang, R. S. Taichman, K. J. Pienta and J. Wang (2010). "CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression." Cancer Metastasis Rev **29**(4): 709-722.
- Teicher, B. A. and S. P. Fricker (2010). "CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer." Clin Cancer Res **16**(11): 2927-2931.
- Thelen, M. (2001). "Dancing to the tune of chemokines." Nat Immunol **2**(2): 129-134.

Thelen, M. and S. Thelen (2008). "CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio?" J Neuroimmunol **198**(1-2): 9-13.

Tomasello, S. D., A. Tello-Montoliu and D. J. Angiolillo (2011). "Prasugrel for the treatment of coronary thrombosis: a review of pharmacological properties, indications for use and future development." Expert Opin Investig Drugs **20**(1): 119-133.

Trepels, T., A. M. Zeiher and S. Fichtlscherer (2004). "[Acute coronary syndrome and inflammation. Biomarkers for diagnostics and risk stratification]." Herz **29**(8): 769-776.

Tripathi, V., R. Verma, A. Dinda, N. Malhotra, J. Kaur and K. Luthra (2009). "Differential expression of RDC1/CXCR7 in the human placenta." J Clin Immunol **29**(3): 379-386.

Ueno, M., S. V. Rao and D. J. Angiolillo (2010). "Elinogrel: pharmacological principles, preclinical and early phase clinical testing." Future Cardiol **6**(4): 445-453.

van der Vorst, E. P., Y. Doring and C. Weber (2015). "MIF and CXCL12 in Cardiovascular Diseases: Functional Differences and Similarities." Front Immunol **6**: 373.

van Giezen, J. J. and R. G. Humphries (2005). "Preclinical and clinical studies with selective reversible direct P2Y₁₂ antagonists." Semin Thromb Hemost **31**(2): 195-204.

Vindrieux, D., P. Escobar and G. Lazennec (2009). "Emerging roles of chemokines in prostate cancer." Endocr Relat Cancer **16**(3): 663-673.

von Hundelshausen, P. and C. Weber (2013). "[Chronic inflammation and atherosclerosis]." Dtsch Med Wochenschr **138**(37): 1839-1844.

Wallentin, L., R. C. Becker, A. Budaj, C. P. Cannon, H. Emanuelsson, C. Held, J. Horrow, S. Husted, S. James, H. Katus, K. W. Mahaffey, B. M. Scirica, A. Skene, P. G. Steg, R. F. Storey, R. A. Harrington, P. Investigators, A. Freij and M. Thorsen (2009). "Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes." N Engl J Med **361**(11): 1045-1057.

Walsh, T. G., M. T. Harper and A. W. Poole (2015). "SDF-1alpha is a novel autocrine activator of platelets operating through its receptor CXCR4." Cell Signal **27**(1): 37-46.

Wright, L. M., W. Maloney, X. Yu, L. Kindle, P. Collin-Osdoby and P. Osdoby (2005). "Stromal cell-derived factor-1 binding to its chemokine receptor CXCR4 on precursor cells promotes the chemotactic recruitment, development and survival of human osteoclasts." Bone **36**(5): 840-853.

Yamaguchi, J., K. F. Kusano, O. Masuo, A. Kawamoto, M. Silver, S. Murasawa, M. Bosch-Marce, H. Masuda, D. W. Losordo, J. M. Isner and T. Asahara (2003). "Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization." Circulation **107**(9): 1322-1328.

Zaruba, M. M., H. D. Theiss, M. Vallaster, U. Mehl, S. Brunner, R. David, R. Fischer, L. Krieg, E. Hirsch, B. Huber, P. Nathan, L. Israel, A. Imhof, N. Herbach, G. Assmann, R. Wanke, J. Mueller-Hoecker, G. Steinbeck and W. M. Franz (2009). "Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction." Cell Stem Cell **4**(4): 313-323.

Ziegler, M., M. Elvers, Y. Baumer, C. Leder, C. Ochmann, T. Schonberger, T. Jurgens, T. Geisler, B. Schlosshauer, O. Lunov, S. Engelhardt, T. Simmet and M. Gawaz (2012). "The bispecific SDF1-GPVI fusion protein preserves myocardial function after transient ischemia in mice." Circulation **125**(5): 685-696.

Zuern, C. S., B. Walker, M. Sauter, M. Schaub, M. Chatterjee, K. Mueller, D. Rath, S. Vogel, R. Tegtmeyer, P. Seizer, T. Geisler, R. Kandolf, F. Lang, K. Klingel, M. Gawaz and O. Borst (2015). "Endomyocardial expression of SDF-1 predicts mortality in patients with suspected myocarditis." Clin Res Cardiol **104**(12): 1033-1043.

9. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik Tübingen Innere Medizin III – Kardiologie und Kreislauferkrankungen unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Gawaz durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Gawaz, Herrn Dominik Rath/Betreuer und Herrn Tobias Geisler.

Die Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Madhumita Chatterjee) von mir eigenständig durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte unter Supervision von Herrn Dominik Rath, Frau Madhumita Chatterjee und Herrn Tobias Geisler. Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurden von Madhumita Chatterjee durchgeführt.

Ich versichere, die Dissertation selbstständig verfasst zu haben (kritische Revision durch Prof. Dr. Gawaz, Dominik Rath, Tobias Geisler, Karin Müller, Michal Droppa, Fabian Stimpfle, Oliver Borst, Christine Zuern, Sebastian Vogel) und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 03.08.2017

10. Publikationen

1. Rath, D., Chatterjee, M., **Bongartz, A.**, Müller, K., Droppa, M., Stimpfle, F., Borst, O., Zuern, C., Vogel, S., Gawaz, M., Geisler, T. *Platelet surface expression of SDF-1 is associated with clinical outcomes in the patients with cardiovascular disease.* **Platelets**, 2016: p. 1-6

2. Rath, D., Chatterjee, M., Borst, O., Müller, K., Stellos, K., Mack, A.F., **Bongartz, A.**, Bigalke, B., Langer, H., Schwab, M., Gawaz, M., Geisler, T., 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. **Eur Heart J**, 2014. 35(6): p. 386-94.

11. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Meinrad Paul Gawaz, Leiter des Deutschen Herzkompetenz Zentrums in Tübingen für die Überlassung des äußerst spannenden Themas und die Möglichkeit meine Dissertation unter seiner Leitung zu realisieren, bedanken.

Herrn Dr. Dominik Rath danke ich für die angenehme Betreuung, Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit.

Auch möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors für Kardiologie und Kreislauferkrankungen in Tübingen und besonders bei Madhumita Chatterjee für die freundliche Arbeitsatmosphäre, ihre Einarbeitung und tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung meiner Versuche und wertvollen Anregungen bedanken und die dazu beigetragen haben, dass ich dieses Thema mit Freude bearbeiten konnte.

Meinen Eltern möchte ich ganz besonders herzlich für Ihre uneingeschränkte, liebevolle Unterstützung und Ermutigung sowohl während des Studiums als auch darüber hinaus danken.

Außerdem bedanke ich mich bei Marius Böttcher für seine mitfühlende Zuwendung und die unvergleichbare Motivation in den letzten Zügen meiner Arbeit.