

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Universität Würzburg  
Direktor: Prof. Dr. med. G. Ertl

**Chemokinrezeptorexpression auf humanen Monozyten vor und nach  
perkutaner Koronarangiographie mit Stentimplantation**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Friederike Heléne Hittler

aus Mühlacker

Würzburg, Dezember 2013

Referent: Prof. Dr. med. A. Schäfer

Korreferent: Prof. Dr. med. K. Schuh

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2014

Die Promovendin ist Ärztin

## Inhalt

1	Einleitung.....	6
1.1	Epidemiologische Bedeutung kardiovaskulärer Erkrankungen .....	6
1.2	Therapie der koronaren Herzkrankheit.....	7
1.2.1	Perkutane Koronarintervention .....	8
1.2.2	In-Stent Restenose .....	8
1.3	Monozyten.....	9
1.3.1	Monozytenmarker .....	10
1.3.2	Heterogenität .....	10
1.3.3	Funktion von Monozyten im Immunsystem und in der Atherosklerose .....	12
1.4	Chemokine und Chemokinrezeptoren .....	15
1.4.1	Einteilung.....	15
1.4.2	Aufgaben .....	18
1.5	Atherosklerose .....	19
1.5.1	Pathogenese.....	20
1.5.2	Monozytenmigration in der Atherosklerose.....	21
1.5.3	CXCR4, CX3CR1, CCR2 und Atherosklerose.....	22
1.6	Neointima .....	24
1.6.1	Pathogenese.....	24
2	Material und Methoden .....	29
2.1	Patienten .....	29
2.1.1	Patientenkollektiv .....	29
2.2	Gewinnung mononukleärer Zellen .....	29
2.2.1	Blutentnahme.....	29
2.2.2	Ficoll-Gradient mit Erylyse .....	29

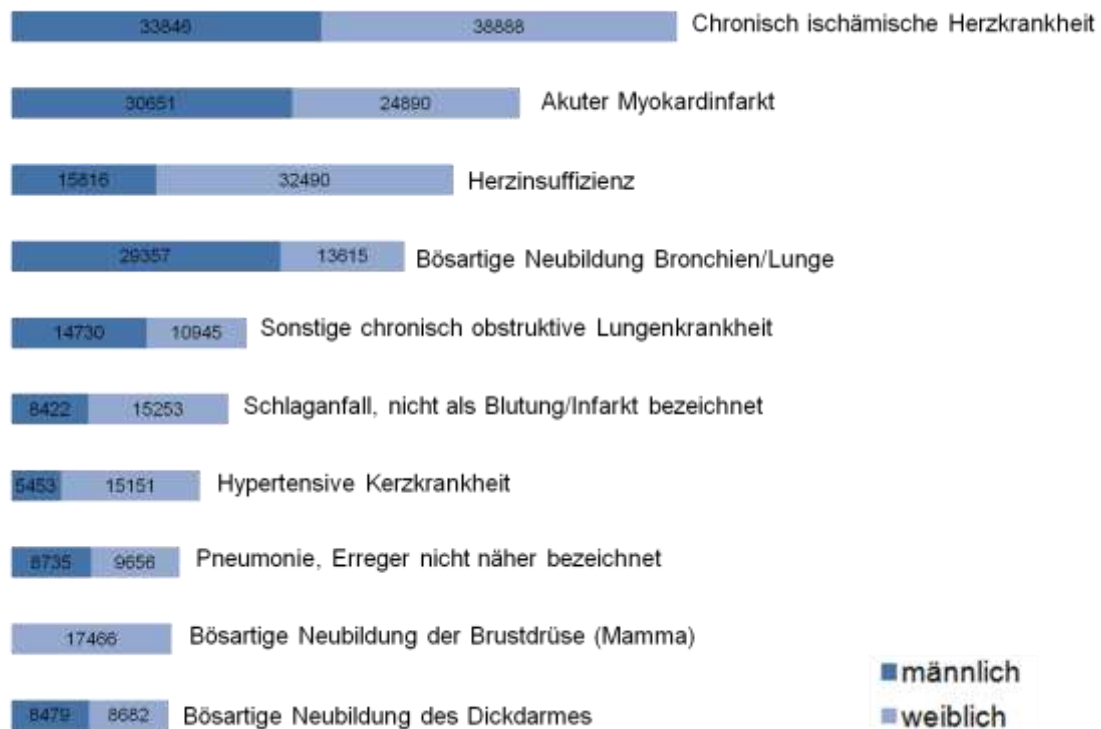
2.3	Durchflusszytometrie.....	31
2.3.1	Allgemeines .....	31
2.3.2	Vorbereitung zur FACS-Färbung .....	34
2.3.3	Färbung .....	35
2.3.4	Durchflusszytometrische Messung .....	36
2.3.5	Auswertung der erhobenen Rohdaten .....	36
2.4	Subgruppeneinteilung anhand patientenbezogener Daten .....	37
2.4.1	Individuelle Parameter .....	37
2.4.2	Hämatologische Parameter .....	37
2.4.3	Serumparameter.....	37
2.4.3.1	Lipidwerte und CRP .....	37
2.4.3.2	Gegenüberstellung aller erhobener Daten .....	37
2.4.4	Statistik.....	38
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Ergebnisse der patientenbezogenen Datenanalyse.....	39
3.2	Ergebnisse der FACS-Analysen.....	43
3.2.1	CXCR4 auf humanen Monozyten .....	43
3.2.1.1	Dynamik der Gesamtpopulation vor und nach PCI .....	43
3.2.1.2	CXCR4-Expression einzelner Subgruppen: Myokardinfarkt und Angina pectoris.....	46
3.2.2	CX3CR1 auf humanen Monozyten .....	48
3.2.2.1	Dynamik der Gesamtpopulation vor und nach PCI .....	48
3.2.2.2	CX3CR1-Dynamik einzelner Subgruppen: Zustand nach Revaskularisierung .....	49
3.2.2.3	Dynamik der Gesamtpopulation vor und nach PCI .....	51
3.2.2.4	CCR2-Dynamik einzelner Subgruppen .....	53

4	Diskussion .....	55
5	Zusammenfassung .....	71
6	Literaturverzeichnis.....	73

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologische Bedeutung kardiovaskulärer Erkrankungen

Nach der internationalen Klassifikation von Krankheiten ICD-10 zählt die koronare Herzkrankheit mit chronischer und akuter kardialer Ischämie neben dem Schlaganfall und der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit zu den häufigsten Manifestationen kardiovaskulärer Erkrankungen. Obwohl ein Rückgang von Inzidenz und Mortalität der koronaren Herzkrankheit in Westeuropa und den USA gezeigt werden konnte, bleibt sie die Haupttodesursache in Deutschland und weltweit<sup>1-4</sup>.



**Abbildung 1: Todesursachen in Deutschland 2010 in Zahlen (nach Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland 2010. Gesundheit 2011; Fachserie 12 Reihe 4: 1).**

In Deutschland konnte 2010 fast jeder zweite Todesfall (41,1 %) auf kardiovaskuläre Ursachen zurückgeführt werden, weltweit waren sie für mehr

als 20 % der Todesfälle verantwortlich, sowohl in Ländern mit niedrigem oder mittlerem als auch mit hohem Einkommensniveau<sup>5,6</sup>. Daten der Framingham-Heart-Studie konnten zeigen, dass 50 % aller Männer und 30 % aller Frauen im mittleren Alter in den USA prädisponiert sind, an der koronaren Herzkrankheit und ihren Folgen zu erkranken<sup>7</sup>. Dies wird in zunehmendem Ausmaß auch Auswirkungen auf den gesundheitsökonomischen Sektor haben. Mit 35,4 Mrd. Euro oder 15,8 % Gesamtkostenanteil stand die Gruppe der kardiovaskulären Erkrankungen bereits 2002 auf Platz eins der Krankheitskosten der einzelnen Krankheitsklassen in Deutschland<sup>8</sup>. Kardiovaskuläre Erkrankungen werden durch die Zunahme von Patienten mit Adipositas oder Diabetes Mellitus Typ 2 weiter an Bedeutung gewinnen<sup>9</sup>. Das beeindruckende epidemiologische und gesundheitsökonomische Ausmaß dieser Erkrankung begründet den Wunsch, Pathophysiologie und Genese der Erkrankung grundlegend zu verstehen, um gezielte spezifische Behandlungsmöglichkeiten definieren zu können. Hierzu gehören die Detektion und Primärprävention kardiovaskulärer Risikofaktoren sowie die pharmakologische und interventionelle Sekundärprävention manifest erkrankter Patienten. Das pathophysiologische Korrelat kardiovaskulärer Erkrankungen kann in der Atherosklerose gefunden werden<sup>10</sup>.

## **1.2 Therapie der koronaren Herzkrankheit**

Gemäß den DGK-Leitlinien zur Behandlung der chronischen koronaren Herzkrankheit<sup>11</sup> stehen drei sich ergänzende Therapieoptionen zur Verfügung:

- die medikamentöse Therapie
- die chirurgische Therapie im Sinne einer koronaren Bypass-Operation zur Überbrückung stenosierender Gefäßabschnitte
- die perkutanen interventionellen Verfahren am Nativgefäß, meist in Form einer perkutanen Koronarintervention mit Stentimplantation (PCI).

### 1.2.1 Perkutane Koronarintervention

Andreas Grüntzig gelang am 16. September 1977 die erste Durchführung einer perkutanen transluminalen Koronarangioplastie mittels Ballondilatation (PTCA) mit Erfolg versprechendem Ergebnis<sup>12</sup>. Die Methode konnte in den Folgejahren modifiziert und optimiert werden und einen hohen Bedeutungszuwachs verzeichnen. Neun Jahre nach der ersten Intervention durch Grüntzig konnte mit der Implantation von Bare-Metal-Stents (BMS) nach Ballonangioplastie die erste große Verbesserung hinsichtlich einer Reduzierung des Restenosierungsprozesses post interventionem gefunden werden<sup>13,14</sup>. Weitere 14 Jahre später gelang mit der Entwicklung von Medikamenten-beschichteten Stents eine Herabsetzung der In-Stent-Restenoserate und damit eine zusätzliche Optimierung der Methode<sup>15</sup>. Weitere Entwicklungen wie zum Beispiel die Einführung von Führungsdrähten in Monorail-Technik, die Beschichtung der Katheter mit Hydrogel zur verbesserten Gleitfähigkeit oder die Miniaturisierung der Instrumente bei Flexibilitätszunahme verbesserten die interventionellen Bedingungen in großem Maße, sodass die Zahl der Koronarinterventionen im Herzkatheterlabor bis heute einen kontinuierlichen Zuwachs verzeichnet - heute wird die Indikation zur perkutanen Koronarintervention weitaus häufiger gestellt als die zur Bypass-Operation<sup>16</sup>.

### 1.2.2 In-Stent Restenose

Die perkutanen Verfahren zur Revaskularisierung umfassen heute zu 80-90 % eine Stentimplantation nach Ballondilatation, diese ist gemäß der aktuellen Leitlinien einer reinen Ballonangioplastie (PTCA) vorzuziehen<sup>17</sup>. Die Begründung hierfür liegt in der höheren Restenoserate nach PTCA (31-42 %), die hauptsächlich auf elastisches Recoiling und narbige Gefäßwandschrumpfung zurückgeführt werden kann<sup>18</sup>. Durch Stent-Implantation gelingt es, diesen zwei Prozessen entgegenzuwirken und dadurch eine Reduktion der Restenoserate zu erreichen: Randomisierte Vergleichsstudien (STRESS, BENESTENT, BENESTENT II) beschrieben eine Reduzierung der Restenoserate auf 16-32 % nach Stentimplantation mit BMS im Follow-Up<sup>13,14,19</sup>. Trotz Reduktion der Stenosierungsprozesse im Vergleich



zur PTCA stellt die In-Stent-Restenose weiterhin ein vorherrschendes Problem der interventionellen Therapie dar. Sie ist weitestgehend Folge eines überschießenden, entzündlichen Wachstumsprozesses nach Gefäßwandverletzung mit Intimahyperplasie und Lumenverlust, genannt Neointimahyperplasie (siehe 1.6)<sup>18,20</sup>. Durch die Einführung von mit immunmodulierenden Medikamenten (Tacrolimus, Sirolimus, Paclitaxel) beschichteten Stents [Drug-Eluting Stents (DES)] gelang es, diesem inflammatorischen Prozess entgegenzuwirken, konsekutiv sank die Restenoserate auf unter 10%<sup>21-23</sup>. Problematisch in der DES-Therapie bleibt allerdings der unspezifische, generell entzündungshemmende Ansatz, der eine suffiziente Reendothelialisierung erschwert und eine erhöhte Stent-Thrombose-Rate begünstigt. Dadurch erforderlich ist eine längere antithrombozytäre Therapie der mittels DES-gestenteten Patienten, die sich vor allem bei älteren Patienten mit mehreren Komorbiditäten und damit verbunden höherem Blutungsrisiko nachteilig auswirkt. Wünschenswert wäre die Entwicklung eines Pharmakons, das gezielt in den neointimalen Inflammationsprozess eingreift und damit eine Reduktion der Stent-Thrombosierung bewirken kann. Dafür muss ein umfassendes Verständnis für die Pathogenese der Neointimabildung geschaffen werden. Eine grundlegende Rolle hierbei könnte die Chemokinrezeptor-vermittelte Monozyten-Gefäß-Interaktion post interventionem spielen. Untersuchungen auf diesem Gebiet sollen die ursächlich wirkenden molekularen Mechanismen im gestenteten Gefäß klären, sodass spezifische therapeutische Targets zur Restenoseprävention definiert werden können.

### **1.3 Monozyten**

Monozyten sind frei im Gefäßsystem zirkulierende Blutzellen leukozytären Ursprungs mit einem charakteristischen nierenförmigen Zellkern. Mit einer Größe von bis zu 20 µm sind humane Monozyten die größten Zellen der menschlichen Leukozytenpopulation<sup>24</sup>. Der Monozytenanteil an der Gesamtleukozytenzahl beträgt etwa 5-10 %<sup>25</sup>. Als Teil des angeborenen Immunsystems entspringen Monozyten der myeloischen Zellreihe des

Knochenmarks und reifen abhängig von spezifischen Wachstumsfaktoren heran, die wichtigste Rolle scheint hierbei Macrophage-Colony stimulating Factor (als synonyme Bezeichnung gelten M-CSF, CD115 oder Csf-1) zu spielen<sup>24</sup>. Hauptmerkmal der Monozyten ist ihre ausgeprägte Plastizität mit der Fähigkeit, sich abhängig von unterschiedlichen Stimuli zu unterschiedlichen mononukleären Zellen zu entwickeln. Nach einer Zirkulationsszeit von circa einem bis drei Tagen<sup>26</sup> verlassen sie das Gefäßsystem und differenzieren sich mediatorabhängig zu Makrophagen (via M-CSF) oder dendritischen Zellen (via GM-CSF und IL-4)<sup>27,28</sup>. Monozyten zählen neben den Lymphozyten zu den peripheren mononukleären Zellen des blutbildenden Systems (PBMC). Neueste Erkenntnisse widersprechen der bisherigen Annahme, Monozyten seien rein im Blut befindliche stets zirkulierende Zellen. Swirski et. al. konnten im Mausmodell zeigen, dass die Milz ein Reservoir an Monozyten vorhält und damit als Monozyten-Speicherorgan betrachtet werden kann<sup>29</sup>.

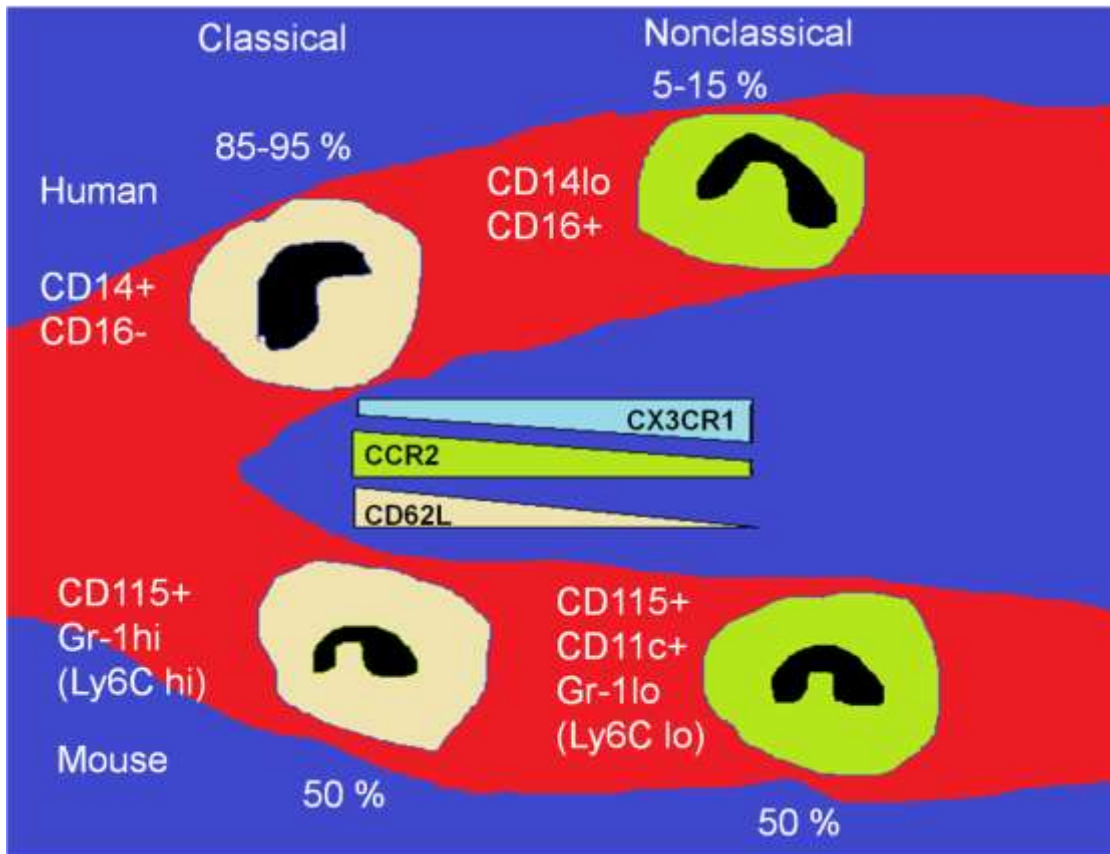
#### 1.3.1 Monozytenmarker

Das transmembranäre Glykoprotein CD14 gilt als klassischer Monozytenmarker. Zusammen mit MD-2 und TLR4 bildet CD14 den transmembranären Lipopolysaccharidrezeptor (LPS-Rezeptor) zur Erkennung bakterieller Oberflächenproteine<sup>30</sup>. CD14 wird in hoher Anzahl von Monozyten/Makrophagen auf der Zelloberfläche exprimiert, Granulozyten zeigen eine sehr geringe und andere Zellen des blutbildenden Systems keine CD14-Expression<sup>31</sup>, CD14 eignet sich somit zur Differenzierung von Monozyten zu anderen Zellen des blutbildenden Systems. CD16 wurde als weiterer Monozytenmarker einer bestimmten Monozyten-Subpopulation beschrieben<sup>32</sup>.

#### 1.3.2 Heterogenität

Entgegen ursprünglicher Annahmen handelt es sich bei Monozyten um eine Zellpopulation großer Heterogenität. Anhand phänotypischer Merkmale wie der Ausbildung spezifischer Oberflächenrezeptorprofile, der Zellgröße oder der Granularität lassen sich zwei große Subpopulationen unterscheiden, Übergangsformen zwischen diesen kommen vor. Gemäß der von Ziegler-Heitbrock et. al. 2010 vorgeschlagenen „Nomenclature of blood monocytes“

teilen sich die humanen Subpopulationen auf in klassische Monozyten mit hoher CD14- und keiner CD16-Expression ( $CD14^{++}CD16^{-}$ ), nicht-klassische Monozyten mit geringer CD14 und hoher CD16-Expression ( $CD14^{+}CD16^{++}$ ) und intermediäre Monozyten ( $CD14^{++}CD16^{+}$ ). Die humane Monozytenpopulation besteht zu über 92 % aus klassischen Monozyten, während die nicht-klassischen Monozyten einen dementsprechend relativ kleinen Anteil ausmachen<sup>33</sup>. Klassische Monozyten sind größer als nicht-klassische und zeigen eine höhere Granularität<sup>34</sup>. Im Mausmodell verhält sich die Verteilung klassisch zu nicht-klassisch in etwa 1:1<sup>33</sup>, desweiteren finden sich hier andere Oberflächenmarker: Ziegler-Heitbrock et. al. schlagen in ihrer Nomenklatur vor, die Einteilung muriner Monozyten anhand der Marker Gr1/Ly6C für CD14 und CD43 für CD16 in klassische und nicht-klassische Monozyten zu treffen<sup>35</sup>. Bei Gr1/Ly6C handelt es sich um murine Glykoproteine, die an der Zelloberfläche von Lymphozyten exprimiert werden<sup>36</sup>. Andere Gruppen charakterisieren Mausmonozyten in zwei Gruppen anhand des Gr1/Ly6C – Profils (klassisch: Gr1/Ly6C<sup>high</sup> nicht-klassisch: Gr1/Ly6C<sup>low</sup>) ohne Berücksichtigung von CD43<sup>28,33</sup>. Auch die Chemokinrezeptoren CCR2 und CX3CR1 zeigen bei der Charakterisierung von murinen Monozytensubspezies ein spezifisches Expressionsmuster, das in der Theorie mit dem Bewusstsein über Limitationen dieses Vorgehens auf den Menschen übertragen wird – in der Praxis bleibt das humane Expressionsmuster weitestgehend noch zu untersuchen. Während klassische Monozyten CCR2<sup>high</sup>CX3CR1<sup>low</sup> exprimieren, verhalten sich nichtklassische Monozyten mit Expression von CCR2<sup>low</sup>CX3CR1<sup>high</sup> invers<sup>33,37</sup>, einige Gruppen beschreiben anstatt CCR2<sup>low</sup>CX3CR1<sup>high</sup> ein Expressionsmuster von CCR2<sup>high</sup>CX3CR1<sup>high</sup><sup>28,38</sup>. Wie beschrieben ist die Kongruenz von murinen und humanen Monozyten nicht durchgängig gegeben, weswegen Untersuchungen an der Maus zwar einen modellhaften Einblick in die Plastizität der Monozytenspezies gewähren können, jedoch durch weitere investigative Bemühungen am humanen Modell ergänzt werden sollten. In der Pathophysiologie der Atherosklerose und Neointimabildung konnten bei den morphologisch unterschiedlichen Subpopulationen auch jeweils funktionelle Unterschiede beschrieben werden.



**Abbildung 2: Einteilung der Monozytensubpopulationen (nach Gautier EL, Jakubzick C, Randolph G. Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 1412-1418).**

### 1.3.3 Funktion von Monozyten im Immunsystem und in der Atherosklerose

Als zirkulierende Zellen besitzen Monozyten die Fähigkeit, auf einen Entzündungsstimulus hin in inflammatorisches Gewebe einzuwandern. Im subendothelialen Gewebe differenzieren sich Monozyten zu Makrophagen oder dendritischen Zellen<sup>27</sup>. Monozyten und ihre Differenzierungsformen sind integrale Bestandteile des angeborenen Immunsystems und bilden das mononukleär-phagozytäre System (MPS)<sup>34</sup>. Die Aufgaben des MPS umfassen Phagozytose, Antigenpräsentation und Immunmodulation. Die Phagozytose steht am Anfang vieler Immunreaktionen und steht in engem Zusammenhang mit der konsekutiv erfolgenden Antigenpräsentation. Auf ihrer Oberfläche tragen

Monozyten/ Makrophagen sogenannte „Pattern recognition Receptors“ (PRR) zur Erkennung von exogenen und endogenen Pathogenen (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs und danger-associated molecular patterns, DAMPs)<sup>43,44</sup>. Zu den PRRs zählen unter anderem der LPS-Rezeptor, Toll-Like-Rezeptoren<sup>39</sup> und Scavenger-Rezeptoren<sup>40</sup>. Nach Detektion eines PAMPs/DAMPs kommt es rezeptorvermittelt zur Phagozytose des Pathogens. Das ingestierte Material wird im Endolysosom deaktiviert<sup>41</sup> und exogene Antigene werden mittels proteolytischer Fragmentspaltung einer Antigenprozessierung unterzogen. Die Präsentation des prozessierten Antigenepitops an der Makrophagenoberfläche erfolgt via MHC-Klasse-II-Rezeptoren<sup>42</sup>. Die Antigenpräsentation bewirkt eine Stimulierung des spezifischen Immunsystems via CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit konsekutiver Aktivierung der spezifischen zellulären und humoralen Immunantwort<sup>43</sup>. Der Antigenerkennung an den PRRs folgt eine Makrophagenaktivierung mit Produktion toxischer Substanzen (Stickoxid (NO), Wasserstoffperoxid, Superoxidanionen) sowie antimikrobieller Peptide und Enzymen zur direkten Pathogenelimination<sup>44</sup> und eine Ausschüttung proinflammatorischer Substanzen wie reaktiver Oxygenspezies (ROS), Komplementfaktoren, Prostaglandinen, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), proteolytischen Enzymen und Zytokinen (IL-6, IL-10, IL1  $\beta$ , TNF-  $\alpha$ )<sup>45</sup> zur Immunmodulation des angehenden Entzündungsprozesses. Dies mündet in einer Reaktionskaskade, die sich selbst verstärkt und die lokale unspezifische sowie die systemische spezifische Immunantwort beeinflusst und reguliert. Die Aufgaben des Monozyten unter homöostatischen Bedingungen sind unklar, diskutiert wird eine Rolle im Erneuerungsprozess von Gewebsmakrophagen und dendritischen Zellen<sup>46</sup>, außerdem könnten sie an der Abräumung von Toxinen oder totem Zellmaterial beteiligt sein<sup>45</sup>. Im murinen Atherosklerosemodell konnte den klassischen- und nicht-klassischen Monozyten-Unterformen eine gewisse Funktionsspezifität nachgewiesen werden: Beide Subformen zeigen Migration in atherosklerotische Läsionen, die klassischen Monozyten in weit höherem Ausmaß, weswegen ihnen eine zentrale Rolle in der Entstehung der Atherosklerose zugesprochen wird<sup>33,47</sup>. Während die klassischen Monozyten im myokardialen

Heilungsprozess nach Myokardinfarkt primär phagozytierende Aufgaben wie die Abräumung von Zelldebris oder Toxinen übernehmen und bereits in den ersten Stunden auf einen inflammatorischen Stimulus hin ins Myokard migrieren, finden sich nicht-klassischen Monozyten in späteren Entzündungsstadien (nach fünf bis sieben Tagen)<sup>48</sup>. Neueste Studien beschreiben, dass hohe humane klassische Monozytenspiegel als positiver Prädiktor für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse herangezogen werden können<sup>49</sup>. Dahingegen wird nicht-klassischen Monozyten eine koordinierende Aufgabe bei der Angiogenese und dem Gewebeneuaufbau zugeschrieben, damit scheinen sie einen wesentlichen Anteil an der Wiederherstellung der Geweberegeneration einzunehmen<sup>48</sup>. Daher werden klassische Monozyten auch immer häufiger als „inflammatorisch“ bezeichnet, während nicht-klassische Monozyten auch als „patrouillierende“ Monozyten benannt werden. Der Grund für diese Bezeichnung nicht-klassischer Monozyten liegt an ihrem Verhalten auf luminalem Endothel kleiner Gefäße unabhängig von der Richtung des Blutstromes hin-und herzuwandern, zu „patrouillieren“. Dies geschieht Adhäsionsmolekül-vermittelt (LFA-1) und mittels CX3CR1. Die genaue Bedeutung dieses Prozesses ist noch unklar, könnte aber bei der Initialisierung atherosklerotischer Plaques von Bedeutung sein<sup>28,33</sup>. Nicht-klassische Monozyten sind in der Lage, in lymphatische und nicht-lymphatische Gewebe unter homöostatischen Bedingungen einzutreten, sie werden in atherosklerotischen Plaques in weit geringerer Anzahl gefunden als klassische Monozyten. Die Einwanderung in die Plaques erfolgt CCR5-vermittelt, in den Plaques entwickeln sie eine CD11-Expression, einem Marker für dendritische Zellen<sup>50</sup>. Interessanterweise fand sich im humanen Modell ein Hinweis, dass nicht-klassische Monozyten, obwohl sie atherosklerotische Plaques in wesentlich geringerem Ausmaß infiltrieren, besonders wichtig für den Cholesterintransport in Plaques unter stark hyperlipidämischen Bedingungen sein könnten<sup>51</sup>.

## 1.4 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Chemokine sind kleine (8-14 kDa), zytokinähnliche Moleküle, die durch Interaktion mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Chemokinrezeptoren) chemotaktisch wirken<sup>52,53</sup>.

### 1.4.1 Einteilung

Die Entdeckung erster Chemokine Ende der achtziger Jahre des 20. Jahrhunderts stieß auf großes investigatives Interesse, sodass in den Folgejahren zahlreiche neue Chemokine und Chemokinrezeptoren identifiziert werden konnten. Heute sind ungefähr 50 humane Chemokine und 21 zugehörige Chemokinrezeptoren bekannt<sup>54</sup>. Die Benennung der neu entdeckten Proteine und Rezeptoren erfolgte zunächst uneinheitlich. Diese unsystematische Einteilung wurde 2000 von Rossi und Zlotnik überarbeitet, anhand struktureller Merkmale konnte eine bis heute gültige systematische Nomenklatur gefunden werden<sup>52,53</sup>. Die Einteilung der humanen Chemokinsubklassen richtet sich dabei nach ihrer Aminosäuresequenz. Chemokine tragen insgesamt vier Cysteinreste (C). Das Verhältnis des ersten Cysteinrests am N-terminalen Ende zum Folgenden bestimmt die Einteilung in 4 distinkte Subtypen: Erstens, CC-Chemokine, die Cysteinreste liegen direkt nebeneinander, zweitens CXC-Chemokine, ein anderer Aminosäurerest liegt zwischen den zwei Cysteinresten, drittens ein CX3C-Chemokin mit drei intermediären Aminosäureresten, viertens C-Chemokine, diese besitzen keine weiteren Cysteinreste. Zur weiteren Einteilung folgt ein „L“ (für „Ligand“) oder ein „R“ zur Beschreibung des zugehörigen Rezeptors<sup>55</sup>. Chemokine liegen in löslicher Form vor, die einzige Ausnahme bildet CX3CL1, das in membrangebundener sowie löslicher Form vorliegen kann<sup>56</sup>.

**Tabelle 1**

<b>CXC, CC, C und CX3C Chemokin-/ Chemokinrezeptorfamilien</b>				
Systematischer Name	Chemokinrezeptor	Menschlicher Ligand	Maus-Ligand	menschliches Chromosom
<b>CXC - Familie</b>				
CXCL1	CXCR2 > CXCR1	GRO $\alpha$ /MGSA $\alpha$	GRO/KC?	4q12-q13
CXCL2	CXCR2	GRO $\beta$ /MGSA $\beta$	GRO/KC?	4q12-q13
CXCL3	CXCR2	GRO $\gamma$ /MGSA $\gamma$	GRO/KC?	4q12-q13
CXCL4	Unknown	PF4	PF4	4q12-q13
CXCL5	CXCR2	ENA-78	LIX?	4q12-q13
CXCL6	CXCR1, CXCR2	GCP-2	C $\alpha$ -3	4q12-q13
CXCL7	CXCR2	NAP-2	Unknown	4q12-q13
CXCL8	CXCR1, CXCR2	IL-8	Unknown	4q12-q13
CXCL9	CXCR3	Mig	Mig	4q21.21
CXCL10	CXCR3	IP-10	IP-10	4q21.21
CXCL11	CXCR3	I-TAC	Unknown	4q21.21
CXCL12	CXCR4	SDF1 $\alpha/\beta$	SDF-1	10q11.1
CXCL13	CXCR5	BLC/BCA-1	BLC/BCA-2	4q21
CXCL14	Unknown	BRAK/bolekine	BRAK	Unknown
(CXCL15)	Unknown	Unknown	Lungkine	Unknown
<b>C - Familie</b>				
XCL1	XCR1	Lymphotactin/SCM-1 $\alpha$ /ATAC	Lymphotactin	1q23
XCL2	XCR1	SCM-1 $\beta$	Unknown	1q23
<b>CX3CL - Familie</b>				
CX3CL1	CX3CR1	Fraktalkin	Neurotactin	16q13
<b>CC-Familie</b>				
CCL1	CCR8	I-309	TCA-3, P500	17q11.2
CCL2	CCR2	MCP-1/MCAF	JE?	17q11.2
CCL3	CCR1, CCR5	MIP-1 $\alpha$ /LD78 $\alpha$	MIP-1 $\alpha$	17q11.2
CCL4	CCR5	MIP-1 $\beta$	MIP-1 $\beta$	17q11.2
CCL5	CCR1, CCR3, CCR5	RANTES	RANTES	17q11.2
(CCL6)	Unknown	Unknown	C10, MRP-1	
CCL7	CCR1, CCR2, CCR3	MCP-3	MARC?	17q11.2
CCL8	CCR3	MCP2	MCP-2?	17q11.2
(CCL9/10)	Unknown	Unknown	MRP-2, CCF18 MIP-1 $\gamma$	
CCL11	CCR3	Eotaxin	Eotaxin	17q11.2
(CCL12)	CCR2	Unknown	MCP-5	17q11.2
CCL13	CCR2, CCR3	MCP-4	Unknown	17q11.2
CCL14	CCR1	HCC-1	Unknown	17q11.2
CCL15	CCR1, CCR3	HCC-2/Lkn/MIP-1 $\delta$	Unknown	17q11.2
CCL16	CCR1	HCC4-LEC	LCC-1	17q11.2
CCL17	CCR4	TARC	TARC	16q13
CCL18	Unknown	DC-CK1/PARC AMAC-1	Unknown	17q11.2
CCL19	CCR7	MIP-3 $\beta$ /ELC/exodus-3	MIP3 $\beta$ /LARC/exodus-1	9p13
CCL20	CCR6	MIP-3 $\beta$ /LARC/exodus-3	MIP3 $\alpha$ /LARC/exodus-1	2q33-q37
CCL21	CCR7	6Ckine/SLC/exodus-2	6Ckine/SLC/exodus-2/TCA-4	9p13
CCL22	CCR4	MDC/STCP-1	ABCD-1	16q13
CCL23	CCR1	MPIF-1	Unknown	17q11.2
CCL24	CCR3	MPIF-2/Eotaxin-2	Unknown	7q11.23
CCL25	CCR9	TECK	TECK	19p13.2
CCL26	CCR3	Eotaxin-3	Unknown	7q11.23
CCL27	CCR10'	CRACK/ILC	ALP/CTACK/ILC Eskine	9p13

**Einteilung der Chemokine und Chemokinrezeptoren nach Zlotnik et al. 2000 (nach Zlotnik, A. & Yoshie, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. Immunity 12, 121-127 (2000)).**



Chemokinrezeptoren tragen sieben Transmembranhelices und werden an der Zelloberfläche exprimiert. Sie gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, Rezeptor-Liganden-Interaktion führt zu einer Konformationsänderung des G-Proteins<sup>57</sup>. Konsekutiv kommt es zur Aktivierung intrazellulärer Mediatoren wie Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase, Proteinkinase B oder Phospholipase C und damit zur Auslösung intrazellulärer Reaktionskaskaden, die die Chemokinwirkung vermitteln<sup>58</sup>. Die Bindung eines Chemokins an einen Rezeptor ist nicht spezifisch, innerhalb der einzelnen Subgruppen zeigen die meisten Chemokine bezüglich ihres Bindungsverhaltens eine gewisse Promiskuität. Es fällt auf, dass Chemokine, die an die gleichen Rezeptoren binden, auch auf demselben Chromosom lokalisiert sind (sog. „Cluster-Chemokine“). Zum Beispiel sind CCL2, CCL7, CCL8, CCL12 und CCL13 auf Chromosom 17q11.2 codiert, für alle ist eine Bindungsaffinität gegenüber CCR2 beschrieben. „Nicht-Cluster“-Chemokine haben eine einzigartige chromosomale Lokalisation und zeigen sich nicht promiskuitiv in ihrem Bindungsverhalten. Zu ihnen gehört zum Beispiel CX3CL1 (chromosomale Lokalisation 16q13) mit CX3CR1 und CXCL12 (10q11.1) mit CXCR4. Lange Zeit galt CXCR4 als einziger Rezeptor für CXCL12, Balabanian et al konnten jedoch 2005 zeigen, dass mit CXCR7 ein weiterer CXCL12-Rezeptor vorliegt<sup>59</sup>. Dieser scheint keine klassischen chemotaktischen Eigenschaften mit Leukozytenrekrutierung aufzuweisen, sondern als Scavenger-Rezeptor an der Modulation des CXCL12-Gradienten beteiligt zu sein<sup>60</sup>. Interessanterweise konnte weiterhin gezeigt werden, dass der als ursprünglich wenig promiskuitiv geltende CXCR4-Rezeptor neben CXCL12 eine Bindung mit dem Zytokin Migratory Inhibitory Factor (MIF) eingeht, das strukturell nicht zu den Chemokinen gezählt werden kann<sup>61</sup>, aber durch die CXCR4-Affinität eine distinkte Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose und der Neointimahyperplasie zu spielen scheint<sup>56,62</sup>. Eine weitere Besonderheit des CXCR4-Rezeptors liegt in seinem Aktivierungsverhalten; nach Ligand-Rezeptor-Interaktion kommt es zur Rezeptor-Internalisierung mit konsekutiver intrazellulärer Signaltransduktion<sup>63</sup>. Neben der strukturellen Einteilung ergibt sich eine weitere, funktionelle Klassifikationsmöglichkeit der Chemokine in

„inflammatorische“ und „homöostatische“ Chemokine. Die inflammatorische Spezies wird durch Zytokinsekretion (TNF, INFgamma), mikrobielle Faktoren oder Trauma getriggert, durch die Abhängigkeit von Triggerfaktoren ist ihr Vorkommen zeitlich begrenzt. Homöostatische Chemokine werden unabhängig sezerniert und koordinieren kontinuierlich die basal notwendigen Migrationsschritte des Immunsystems<sup>57</sup>.

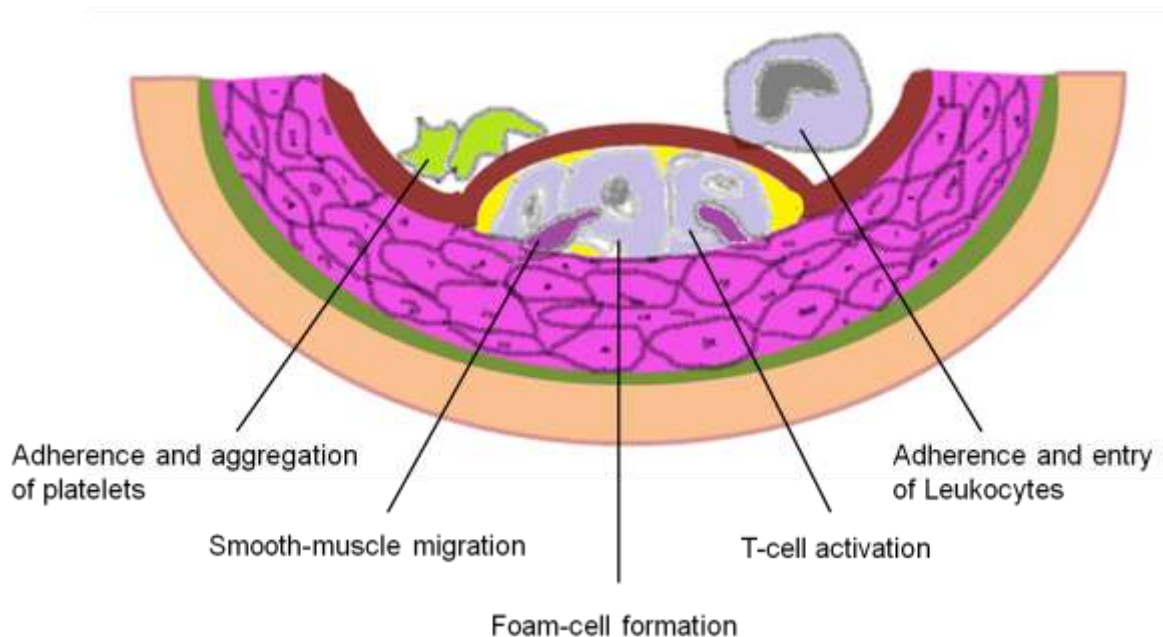
#### 1.4.2 Aufgaben

Chemokine und ihre Rezeptoren sind für das Zusammenwirken und die Funktion des Immunsystems von grundlegender Bedeutung. Sie regulieren die gerichtete Migration naiver und reifer Leukozyten in inflammatorisch aktive Gebiete, sie steuern T- und B-Zell-Reifung, sie beeinflussen die kontinuierliche Erneuerung der primären und sekundären lymphatischen Organe und sie steuern den Tropismus und das Homing von Leukozytensubpopulationen und spielen dadurch eine elementare Rolle in der Initiierung und Potenzierung von Immunantworten<sup>23,51,58</sup>. Durch ihre Rolle im Immunsystem werden Chemokine und ihre Rezeptoren Teil akuter und chronischer Inflamationsprozesse (zum Beispiel Sepsis<sup>64</sup>, HIV<sup>65</sup>, Atherosklerose<sup>66</sup>) und tragen zur Pathogenese von Autoimmunerkrankungen bei (zum Beispiel Psoriasis<sup>67</sup>, rheumatoide Arthritis<sup>58</sup>). Auch in der Pathogenese maligner Erkrankungen, vornehmlich bei Metastasierungsprozessen, spielen Chemokine eine grundlegende Rolle<sup>58</sup>. Chemokine und Chemokinrezeptoren spielen eine essentielle Rolle bei der Einwanderung von Monozyten aus dem Blutstrom in periphere Gewebe<sup>64</sup>. Die Rolle der Chemokinrezeptoren CXCR4 (Liganden CXCL12, MIP) CX3CR1 (Ligand CX3CL1) und CCR2 (Liganden CCL2, CCL7, CCL8 und CCL13) bei der gerichteten Migration humaner Monozyten aus dem Blutstrom sind Teil dieser Arbeit. Dabei richtet sich der Fokus einerseits auf das Chemokinrezeptorprofil humaner peripherer Monozyten unter atherosklerotischen Grundbedingungen und andererseits auf die Dynamik dieses Profils nach PCI, wenn der postinterventionelle Entzündungsstimulus greift und die Neointimabildung beginnt. Im Folgenden sollen die bisher

bekanntesten Funktionen dieser Chemokinrezeptoren in Interaktion mit peripheren Monozyten in Atherosklerose und Neointimabildung kurz beleuchtet werden.

## 1.5 Atherosklerose

Atherosklerose ist eine wesentliche pathophysiologische Grundlage kardiovaskulärer Erkrankungen, die koronare Herzkrankheit ist definiert als die Manifestation der Atherosklerose in den Koronargefäßen. Atherosklerotische Läsionen (sog. Plaques) sind asymmetrische, fokal-vasale Intimaverdickungen mit der Potenz zu Wachstum und Ruptur. Makrophagen, B- und T-Zellen finden sich im Kern der atherosklerotischen Plaques. Umgeben sind sie von nicht-ingestierten Fettpartikeln und nekrotisiertem Zellmaterial. Glattmuskuläre Zellen hypertrophieren und säumen den Plaquekern ein. Eine kollagenreiche Matrix umgibt schließlich die äußerste Plaqueschicht<sup>68</sup>.



**Abbildung 3: Querschnitt durch ein Gefäß mit atherosklerotischem Plaque: im Zentrum sammeln sich Schaumzellen und T-Zellen, an der Endotheloberfläche adhären Thrombozyten, Leukozyten migrieren ins Plaque. (nach Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med 340, 115-126 (1999)).**

Während Atherosklerose in den Anfangsjahren kardiovaskulärer Forschung hauptsächlich als Folge eines vasalen Lipidakkumulationsprozesses verstanden wurde, ist man sich heute einer wesentlich komplizierteren Pathogenese bewusst: Nach aktuellem Stand der Forschung handelt es sich bei der Atherosklerose um einen komplexen, hochspezifischen systemisch-inflammatorischen Krankheitsprozess, der sich, wenn einmal begonnen, selbst aufrecht erhält und verstärkt im Sinne eines Circulus vitiosus<sup>68-70</sup>.

### 1.5.1 Pathogenese

Nach aktuellem Erkenntnisstand steht die endotheliale Dysfunktion mit konsekutiver Endothelaktivierung am Anfang des atherosklerotischen Prozesses<sup>71</sup>. Als luminale Gefäßbarriere sind an das Endothel substantiell regulatorische Aufgaben gestellt, dazu gehören die Kontrolle von Zelladhäsionsmechanismen zur Leukozytenrekrutierung, die Gewährleistung selektiver Permeabilität sowie die Regulation des Hämostase-Thrombolyse-Gleichgewichts und der Gefäßweite. Um diesen Aufgaben gerecht zu werden, reguliert gesundes Endothel die Sekretion und Bereitstellung endothelialer und subendothelialer Faktoren und Komponenten im Sinne eines Gleichgewichts. Zu den genannten Faktoren gehören Leukozytenadhäsionsmoleküle (Integrine, Selektine, Chemokine), Vasodilatoren (NO, Bradykinin, Prostacyclin), Vasokonstriktoren (Endothelin, Angiotensin 2), Plättchenaggregationsinhibitoren (NO, Prostacyclin), Radikalfänger und Antioxidantien (NO, Makrophagen)<sup>71,72</sup>. Exogene und endogene Faktoren können dieses sensible Gleichgewicht beeinflussen und die endotheliale Integrität herabsetzen bis hin zum Funktionsverlust. Diese Faktoren umfassen zum Beispiel inadäquate Scherkräfte am Endothel, Freisetzung vasoaktiver Substanzen (Angiotensin 2), ein Übermaß an oxidiertem LDL-Cholesterin (oxLDL) und freie Radikale. Diese schädigenden Faktoren stehen in Zusammenhang mit den sogenannten kardiovaskulären Risikofaktoren: Zu den wichtigsten kardiovaskulären Risikofaktoren zählen neben Alter und Geschlecht Adipositas, arterielle Hypertonie, Diabetes Mellitus, Hyperlipidämie (Gesamt-Cholesterin, LDL-Cholesterin), Nikotinabusus, und genetische Prädisposition<sup>55,73</sup>. Befindet sich

das Endothel im Ungleichgewicht, lagern sich Thrombozyten an und schütten Adhäsionsproteine (Fibrinogen, P-Selectin, vWF) und proinflammatorische Substanzen (CXCL12, CCL5, IL1 $\beta$ , CD40L) aus. Zytokine wie IL1 $\beta$  oder CD40L bewirken die endotheliale Expression von Integrinen zur Leukozytenadhäsion (VCAM-1, ICAM-1) und die Ausschüttung beziehungsweise Expression von Chemokinen wie CCL2 oder CX3CL1<sup>74,75</sup>. Dies führt zur Leukozytenmigration nach subendothelial. Monozyten treten M-CSF vermittelt in den Plaque ein und differenzieren sich zu Makrophagen. Scavenger-Rezeptor-vermittelt phagozytieren sie oxLDL, Endotoxine und Zelldetritus. Die extrazellulären Toll-Like-Rezeptoren (TLR2, TLR4) vermitteln eine Makrophagen-Aktivierung, diese schütten daraufhin proinflammatorische Substanzen (IL1 $\beta$ , IL6, IL8, CCL2) aus<sup>64</sup>. Sie werden zu fettstapelnden Schaumzellen, um schließlich abzusterben<sup>69</sup>. Mit den Monozyten wandern B- und T-Zellen ein, dabei ist das Verhalten der Lymphozytenpopulation in der Atherogenese heterogen und nicht abschließend geklärt: aktuelle Studien weisen auf ein uneinheitliches Verhalten der B-Zell-Subpopulationen mit protektiven sowie aggravierenden Mechanismen hin<sup>10</sup>. Durch Ausschüttung von Zytokinen (INF $\gamma$ , TNF, IL-1) kommt es zur weiteren Aktivierung glattmuskulärer und endothelialer Zellen (IL-6, IL-1)<sup>69</sup> und damit letztlich zur Progression des atherosklerotischen Prozesses<sup>68</sup>, hierbei scheinen vornehmlich Th1-Zellen beteiligt zu sein, während Th2-Zellen durch Ausschüttung von TGF und IL-10 einen hemmenden Einfluss zugesprochen wird<sup>76</sup>. Der ursprüngliche Versuch des Gefäßes, die Homöostase wieder herzustellen, mündet in einer Entzündungsreaktion, die die Ausschüttung weiterer inflammatorischer Substanzen aus dem Endothel, aus adhärennten Thrombozyten und aus immunkompetenten Zellen bedingt. Damit dienen die immunologischen Mechanismen zu Beginn zwar der Wiederherstellung des endothelialen Gleichgewichts, führen aber letztlich zur Selbstverstärkung und Aggravierung des Gesamtprozesses.

#### 1.5.2 Monozytenmigration in der Atherosklerose

Die Rekrutierung von Monozyten und deren Transformation zu Makrophagen stellt einen essentiellen Teil des atherogenetischen Prozesses dar. Die initiale

Bindung des Monozyten ans aktivierte Endothel führt zu einer Abschwächung seiner Flussgeschwindigkeit und wird als „Rolling“ bezeichnet. Chemokine, die vom Endothel, glattmuskulären Zellen und Thrombozyten auf entzündliche Stimuli hin (Zytokine, Scherkräfte, oxLDL) sezerniert werden<sup>66</sup>, induzieren über monozytäre Chemokinrezeptoren eine feste Bindung des Monozyten ans Endothel („Activation“ und „Arrest“) und steuern die Transmigration und Chemotaxis zum Plaque<sup>64</sup>. Vermittelt werden die Adhäsionschritte auf struktureller Ebene durch Integrine und Selektine [L-Selektin, VLA4, LFA-1, PSGL-1 (monozytäre Domäne) und ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin, P-Selektin, (Endotheloberfläche, Plättchen)<sup>28,66,77,78</sup>] sowie durch Chemokinrezeptoren wie zum Beispiel CCR2, CX3CR1 und CXCR4 und CCR5 mit seinen Liganden CCL5, CCL1 und CCL3<sup>52</sup>. CCR5 scheint eine zentrale Funktion vor allem in der Progression fortgeschrittener Plaques einzunehmen, CCR5 wird auf Monozyten exprimiert und vermittelt CCL5-abhängig den Monozyten-„Arrest“ am atherosklerotisch geschädigten Endothel sowie die Diapedese ins Subendothel<sup>50,79</sup>. Weiterhin wird dem Ligand/Rezeptorpaar CCL5/CCR5 eine wichtige Rolle in der Monozytenrekrutierung der Neointimagenese zugesprochen. CCL5 wird nach Gefäßverletzung durch Thrombozyten freigesetzt und auf Endothelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert, eine Antagonisierung oder ein Knockout der CCL5/CCR5-Achse führt zur deutlichen Abnahme der Neointimagenese und Makrophageninfiltration<sup>79-81</sup>. Als berühmteste Rolle von CCR5 gilt sicherlich seine Funktion als HIV-Korezeptor beim Virus-Entry in T-Helferzellen<sup>82</sup>. Um dem methodischen Umfang gerecht zu werden, wurde die Rolle von CCR5 in dieser Arbeit nicht untersucht, wegen seiner essentiellen Rolle in der Atherosklerose und der Neointimagenese wäre eine weitere Untersuchung von CCR5 in Folgestudien jedoch als höchst interessant einzuordnen.

### 1.5.3 CXCR4, CX3CR1, CCR2 und Atherosklerose

Nach dem aktuellen Stand der Forschung nehmen die Chemokinrezeptoren CXCR4, CX3CR1 und CCR2 mit ihren Liganden eine zentrale Rolle in der Zellrekrutierung in Atherogenese und Neointimabildung ein, wobei die genauen

Zusammenhänge und Mechanismen noch weitgehend unbekannt sind. Im atherosklerotischen Mausmodell führt eine Defizienz von CCR2 oder CX3CR1 zur deutlichen Reduktion atherosklerotischer Plaques<sup>83-86</sup>, Menschen mit einem Polymorphismus für CX3CR1 zeigen eine deutliche Abnahme des kardiovaskulären Risikos<sup>87-89</sup>. Die CCR2/CCL2-Achse scheint eine zentrale Rolle bei der Rekrutierung klassischer Monozyten aus dem Knochenmark zu atherosklerotisch geschädigtem Endothel einzunehmen. Dort ist für CCR2/CCL2 bei der Monozyten-Transmigration eine regulatorische, proatherogenetische Wirkung beschrieben<sup>28,33,90</sup>. CX3CL1 wird auf atherosklerotisch geschädigten Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Schaumzellen muriner und humaner Dignität gefunden, nicht aber in gesundem Gewebe. Für CX3CL1 ist eine direkte Wirkung als Adhäsionsmolekül am Endothel beschrieben, seine Eigenschaft, in membrangebundener Form vorzuliegen, scheint dafür zu prädisponieren<sup>66</sup>. Neueste Erkenntnisse konnten *in vivo* eine Monozyten-Endothelbindung über monozytäres CX3CR1 zeigen<sup>91</sup>. Die CX3CR1/CX3CL1-Interaktion am Monozyten scheint weiterhin essentiell für das Überleben im Subendothel sowie für die Differenzierung zu Makrophagen in atherosklerotischen Plaques zu sein<sup>33,92</sup>. Klassische, CCR2<sup>high</sup>CX3CR1<sup>low</sup> exprimierende Monozyten werden in einer größeren Anzahl in atherosklerotische Plaques rekrutiert als nichtklassische, CCR2<sup>low</sup>CX3CR1<sup>high</sup> exprimierende Monozyten<sup>90</sup>. Nicht klassische Monozyten differenzieren sich in Plaques häufiger zu CD11c-positiven Zellen<sup>90</sup>. Das Patrouillieren nicht-klassischer Monozyten auf dem Endothel ist CX3CR1-abhängig<sup>33</sup>. Interessanterweise zeigt sich der Eintritt klassischer Monozyten ins Subendothel neben CCR2- und CCR5- auch CX3CR1-abhängig, während der Eintritt nicht-klassischer Monozyten nicht CX3CR1-abhängig sondern CCR5-abhängig zu sein scheint<sup>50,90</sup>. Die Bedeutung von CXCL12/CXCR4 in der Atherosklerose wird kontrovers diskutiert. Während einige Gruppen von einer atheroprotektiven Wirkung ausgehen<sup>93,94</sup>, legen Ergebnisse anderer Gruppen eine proinflammatorische Rolle nahe<sup>95</sup>. Interessanterweise ist die CXCR4-Expression auf Monozyten erniedrigt bei Patienten mit Angina Pectoris verglichen mit Gesunden<sup>93</sup>, dabei ist CXCL12 stark exprimiert auf

Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Makrophagen des atherosklerotischen Plaques im Vergleich zum Gesunden<sup>96</sup>. Auch MIF als atypischem Chemokinrezeptorliganden wird eine Rolle in der Leukozytenrekrutierung via CXCR4 zugesprochen, die MIF-Hochregulation auf Endothelzellen und glatten Muskelzellen erfolgt dabei interessanterweise CCL2-abhängig sowie durch oxLDL<sup>50</sup>.

## **1.6 Neointima**

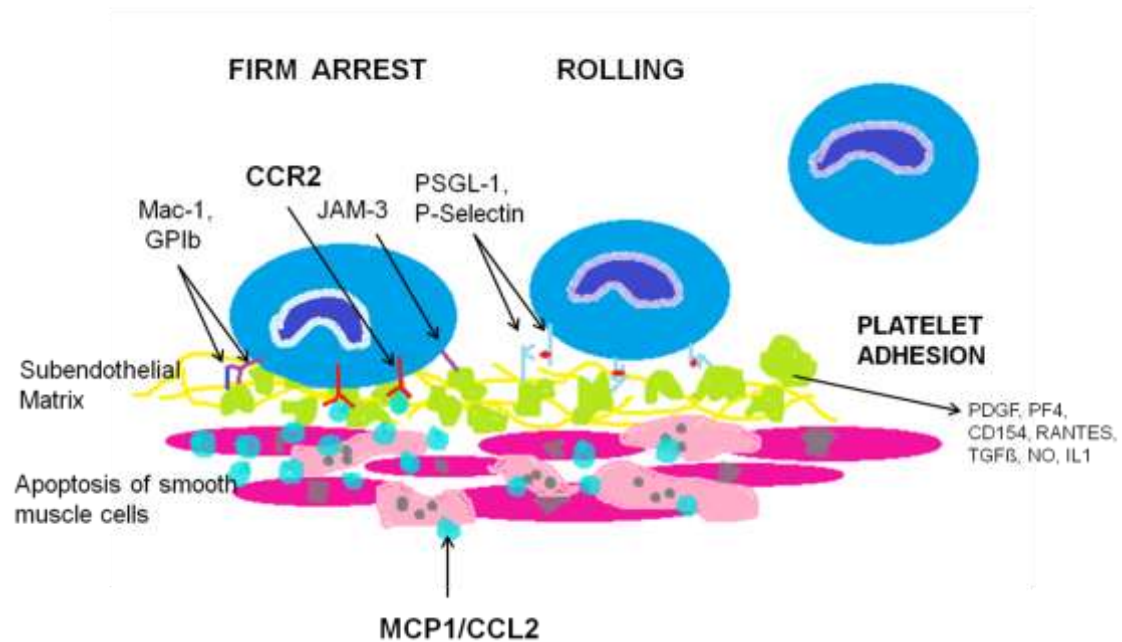
Neointima bezeichnet das Gewebe, das sich an der Stelle mechanischer Gefäßverletzung wie beispielsweise nach Stentimplantation bildet. Neointimahyperplasie nach Stenting stellt die pathophysiologische Grundlage der In-Stent-Restenose dar. Sie ist Folge eines ungewollten, überschießenden Inflamationsprozesses, der sich, ähnlich der Atherosklerose, im Sinne eines kaskadenartigen, autokrinen und parakrinen Stimulationsprozess selbst verstärkt und aufrecht erhält. Neointimahyperplasie kommt nach jeder Stentimplantation vor, sodass nach jeder PCI die Potenz zur Restenosierung gegeben ist<sup>62</sup>.

### **1.6.1 Pathogenese**

Die molekularen Zusammenhänge in der Neointimagenese sind weit weniger eingehend erforscht als in der Atherogenese. Die chemokinabhängige Zellrekrutierung scheint auch hier maßgeblich an der Progression des inflammatorischen Prozesses beteiligt zu sein. Die Chemokinrezeptoren CXCR4, CCR2 und CX3CR1 scheinen alle zu dieser Aggravation der überschießenden Immunantwort beizutragen, wobei die exakten Mechanismen und Zusammenhänge noch genauer untersucht werden müssen. Schober und Weber unterscheiden in der Neointimabildung eine akute und eine chronische Phase<sup>62</sup>. Die Akutphase umfasst die ersten 24 Stunden nach Stentimplantation. Direkt post Interventionem kommt es zur Endotheldenudation mit Exposition extrazellulärer Matrix und konsekutiver Plättchenadhäsion [via GP1b $\alpha$  an vWF, GPIV an Kollagen (initial) und via GPIV-Signalling mit Integrinaktivierung (fest)]



sowie zur massiven Apoptose glattmuskulärer Zellen (SMC) im Intimabereich<sup>97</sup>. Ähnlich der Initialphase der Atherogenese folgt der akuten Gefäßverletzung eine Leukozytenrekrutierung maßgeblich monozytärer Zellen. Deren initiale Bindung erfolgt nicht, wie in der Atherosklerose, an aktiviertes Endothel, sondern an die ans Subendothel adhären und aktivierten Thrombozyten<sup>62</sup>. Das Monozyten-Rolling wird dabei über thrombozytäres P-Selectin und monozytäres PSGL-1 vermittelt. Für die weiteren Schritte der Monozytenrekrutierung wie Aktivierung, Arrest, und Transmigration ins Subendothel sind Chemokine von zentraler Bedeutung. Klassische Bindungsproteine wie VCAM-1, VLA-1, LFA-1, die in der Monozytenrekrutierung in der Atherogenese als Hauptakteure dienen, scheinen in der Akutphase der Neointimagenese keine Rolle zu spielen. Thrombozytäres CCL2 nimmt eine Schlüsselrolle in der Initiierung der festen Bindung an den CCR2-exprimierenden Monozyten ein [via Mac-1 (monozytäre Domäne) und GP1bα sowie JAM-3 (thrombozytäre Domäne)]<sup>62</sup>, dabei wird CCL2 nach Gefäßverletzung innerhalb von vier Stunden auf Plättchen und SMC hochreguliert und fällt nach drei bis vier Tagen wieder auf die Basiskonzentration ab<sup>98</sup>. Da CCL2 stimulierend auf die Rekrutierung endothelialer Progenitorzellen wirkt, könnte diesem Chemokin ein zumindest teilweise gefäßprotektiver Effekt zugeschrieben werden<sup>98</sup>.



**Abbildung 4: Akutphase der Neointimagenese. Die Monozyteneinwanderung ist CCR2-abhängig, CCL2 wird auf Plättchen exprimiert. (nach Schober, A. & Weber, C. Mechanisms of monocyte recruitment in vascular repair after injury. *Antioxid Redox Signal* 7, 1249-1257 (2005)).**

Nach etwa 24 Stunden beginnt die chronische Phase der Neointimagenese<sup>62</sup>. Sie ist charakterisiert durch Akkumulation glatter Muskelzellen, chronische Monozytenrekrutierung und Reendothelialisierung der Gefäßläsion<sup>62</sup>. Die Monozytenrekrutierung findet in der chronischen Phase nicht thrombozytär vermittelt, sondern SMC- und Endothelzell-abhängig statt<sup>62</sup>. Neointimale SMCs tragen durch übermäßige Proliferation zum Restenosierungsprozess bei. Sie scheinen aus Knochenmarks-Progenitorzellen zu stammen und werden CXCR4/CXCL12-abhängig rekrutiert<sup>67</sup>. Monozyten differenzieren sich im Subendothel MIF-abhängig zu Makrophagen und unterhalten die SMC-Proliferation durch Ausschüttung von Zytokinen wie TGF-β, IL-1β, IL-8, TNFα<sup>62</sup>. Während die Bedeutung der CXCL12/CXCR4-Achse in der Atherogenese kontrovers diskutiert wird, scheint der Achse in der Neointimagenese demnach eine aggravierende Eigenschaft zugesprochen werden zu können. Dies basiert nach aktuellem Stand der Forschung maßgeblich auf der CXCL12-abhängigen

SMC-Rekrutierung<sup>97,99</sup>. Nach aktuellem Stand der Forschung steigen die CXCL12-Plasmalevel innerhalb eines Tages nach Gefäßverletzung signifikant an<sup>99</sup>, und auch MIF zeigt sich stark exprimiert auf Makrophagen und Endothelzellen neointimaler Läsionen<sup>62</sup>, dies spricht für eine grundlegende Rolle der Liganden und korrespondierender Rezeptoren in der chronischen Neointimagenese. Während auf die proinflammatorische Funktion der CX3CL1/CX3CR1-Achse in der Atherogenese bereits einige Studien hindeuten konnten<sup>84,85,100</sup>, besteht zur Definition der Achsenfunktion während der Neointimagenese noch deutlicher Forschungsbedarf. Ergebnisse genetischer Studien sowie Experimente am Knock-out-Modell deuten auf eine grundlegende Bedeutung der Achse in der Neointimagenese hin<sup>101,102</sup>. Molekularbiologische Tierstudien legen eine vornehmliche Bedeutung von CX3CR1/CX3CL1 im chronischen Inflamationsprozess der Neointimahyperplasie nahe: Gezeigt wurde, dass CX3CL1 auf Zytokinstimulus hin (  $\text{INF}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ ) auf neointimalen SMCs<sup>98</sup> und Endothelzellen<sup>67</sup> exprimiert wird. Diese Exprimierung erfolgt nach der Akutphase und scheint die chronische CX3CR1-abhängige Monozytenrekrutierung unter gestörten Reendothelialisierungsverhältnissen zu begünstigen<sup>62</sup>.

**Im Rahmen dieser Dissertation sollen daher folgende Fragestellungen untersucht werden:**

Inwiefern unterscheidet sich das CXCR4-, CX3CR1- und CCR2-Oberflächenprofil auf peripheren humanen Monozyten vor und 24 Stunden nach perkutaner Koronarintervention mit Stentimplantation?

Inwiefern steht das CXCR4-, CX3CR1- und CCR2-Oberflächenprofil vor und nach perkutaner Koronarintervention mit Stentimplantation auf peripheren humanen Monozyten im Zusammenhang mit Patienteneigenschaften wie dem kardiovaskulären Risikoprofil, der medizinischen Vorgeschichte oder laborchemischen Parametern?

Besteht eine Korrelation zwischen Patienteneigenschaften wie dem kardiovaskulären Risikoprofil, der medizinischen Vorgeschichte oder laborchemischen Parametern?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patienten**

#### 2.1.1 Patientenkollektiv

Die Studie erfolgte bei 31 Patienten, die im Zeitraum zwischen Februar und August 2010 eine elektive, perkutane Koronarintervention am Universitätsklinikum Würzburg erhielten. Im Rahmen dieser Koronarangiographie wurde bei dem genannten Patientenkollektiv eine signifikante oder kritische Stenose in mindestens einem Herzkranzgefäß erkannt und durch eine Ballonkatheterdilatation sowie nachfolgender Stentimplantation (PCI) im betroffenen Bereich behandelt. Die Studie wurde nach den Prinzipien der Deklaration von Helsinki 2008 und den Regularien der Ethik-Kommission Würzburg durchgeführt. Die Patienten wurden über den wissenschaftlichen Hintergrund der Blutentnahme aufgeklärt und erklärten sich einverstanden, an der Studie teilzunehmen, die Blutentnahme erfolgte im Rahmen regelmäßiger Routinekontrollen.

### **2.2 Gewinnung mononukleärer Zellen**

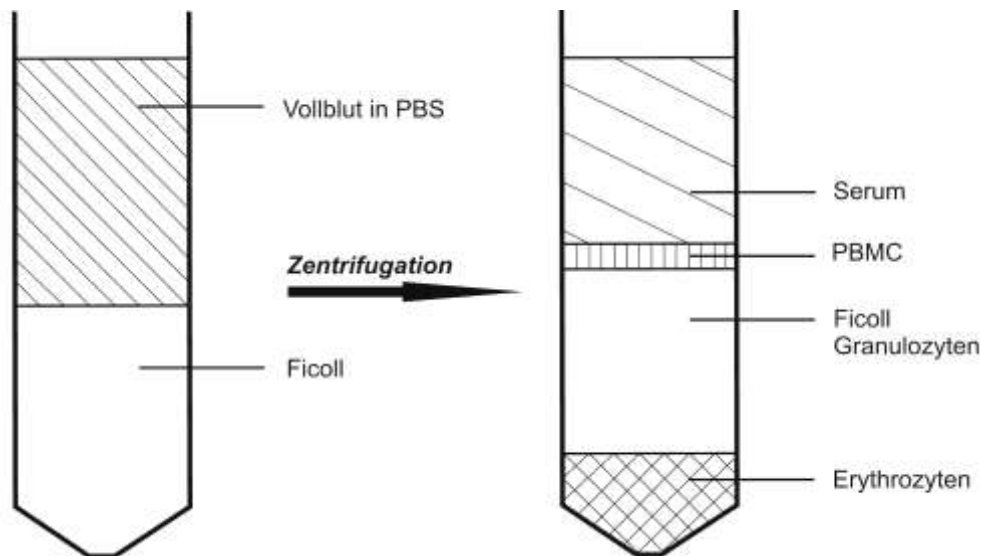
#### 2.2.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte vor der geplanten elektiven Koronarintervention nach Einverständnis des Patienten sowie am Folgetag nach PCI. Es wurden je 15 ml EDTA-Vollblut abgenommen.

#### 2.2.2 Ficoll-Gradient mit Erylyse

Die Separation peripherer mononukleärer Zellen (PBMC) von Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten kann durch eine isopyknische Zentrifugation mittels Ficoll-Gradienten erreicht werden. Ficoll hat als Polysaccharidlösung mit einer Dichte von  $1,077 \text{ g/cm}^3$  die Eigenschaft, die unterschiedlich dichten Zellpopulationen peripheren Blutes in Phasen zu trennen. Während

Erythrozyten aufgrund ihrer höheren Dichte (Dichtebereich 1,090-1,110 g/cm<sup>3</sup>) die Ficollphase passieren, dringen Granulozyten (Dichtebereich 1,075-1,096 g/cm<sup>3</sup>) in sie ein und verbleiben in ihr. Mononukleären Zellen (mittlere Dichte 1,065 g/cm<sup>3</sup>) ist ein Eindringen in die Ficollphase aufgrund ihrer geringen Dichte nicht möglich und sie verbleiben als Interphase zwischen Plasma (mittlere Dichte 1,026 g/cm<sup>3</sup>) und Ficoll<sup>77,103,104</sup>.



**Abbildung 5: Ficoll-Dichtegradient vor und nach Zentrifugation, zu sehen ist die charakteristische Schichtbildung, die eine Separation der PBMC ermöglicht.**

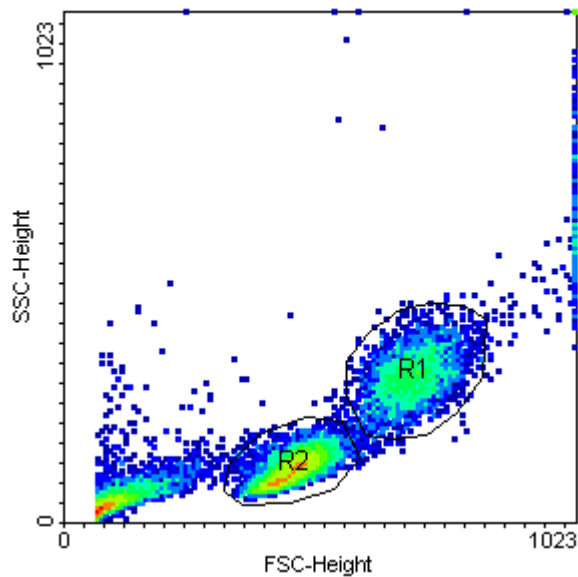
Die Gewinnung der mononukleären Zellen fand unter der Clean Bench statt. 12,5 ml des vom Patienten gewonnenen Vollblutes in EDTA wurden mit sterilem PBS (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) im Verhältnis 1:1 verdünnt und auf 20 ml Ficoll (PAA, Pasching, Österreich) vorsichtig, ohne jegliche Mischung der beiden Lösungen, aufgetragen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt mit 900 G, 35 Minuten, 20°C, ohne Bremse oder Beschleunigung. Alle Zentrifugationsschritte dieser Arbeit erfolgten an einer Eppendorf-Zentrifuge 5810 R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die Interphase wurde abgenommen, in ein 50 ml Blue Cap (Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland) überführt und mit Hanks-Puffer [Hanks balanced salt solution (

Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA), 1% FCS (Gibco, Eggenstein, Deutschland) 2mM EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); 4°C] auf 50 ml aufgefüllt. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (200 G, 20°C, 10 Minuten, keine Bremse oder Beschleunigung) und der Überstand abgesaugt. Zum Absaugen des Überstandes wurde hier sowie nach allen folgenden Waschschrinen eine Vakuumpumpe genutzt. Das beim Zentrifugieren entstandene Pellet wurde in 1 ml Hanks-Puffer resuspendiert und zur Erylyse mit 1 ml Red blood cell lysis solution (Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland) in 9 ml Aqua ad injectabilia (Serag-Wiessner, Naila, Deutschland) 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Inkubation wurde mit Hanks-Puffer auf 50 ml aufgefüllt und zentrifugiert (300 G, 4°C, 10 Minuten, volle Bremse und Beschleunigung). Der Überstand wurde abgesaugt, mit 10 ml Hanks-Puffer resuspendiert und der weiteren Analytik hinzugeführt.

## **2.3 Durchflusszytometrie**

### **2.3.1 Allgemeines**

Bei der Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) handelt es sich um eine in den sechziger Jahren entwickelte Methode, die es ermöglicht, Zellpopulationen oder Einzelzellen nach bestimmten Eigenschaften zu charakterisieren<sup>105</sup>. Bei einem kontinuierlichen Zellfluss ist es im Durchflusszytometer möglich, mittels eines in verschiedenen Wellenbereichen emittierenden Lasers sowie konsekutiv angeordneten, detektierenden Photodioden Zellpopulationen zu charakterisieren. Im Forewards Scatter (Vorwärtsstreulicht, FSC) wird die Zellgröße bestimmt, während im Sidewards Scatter (Seitwärtsstreulicht, SSC) die Granularität der Zellen detektiert wird. Dies beruht auf dem Prinzip, dass sich die Lichtbeugung/ Lichtreflexion des vom Laser ausgesandten Lichts jeweils proportional zur Zellgröße/ Zellgranularität verhält. Der hierzu verwendete Laser arbeitet im Wellenbereich von 488 nm. FSC und SSC eignen sich, um unterschiedliche Zellpopulationen zunächst nur anhand ihrer Zellmorphologie zu unterscheiden (Abbildung 6).

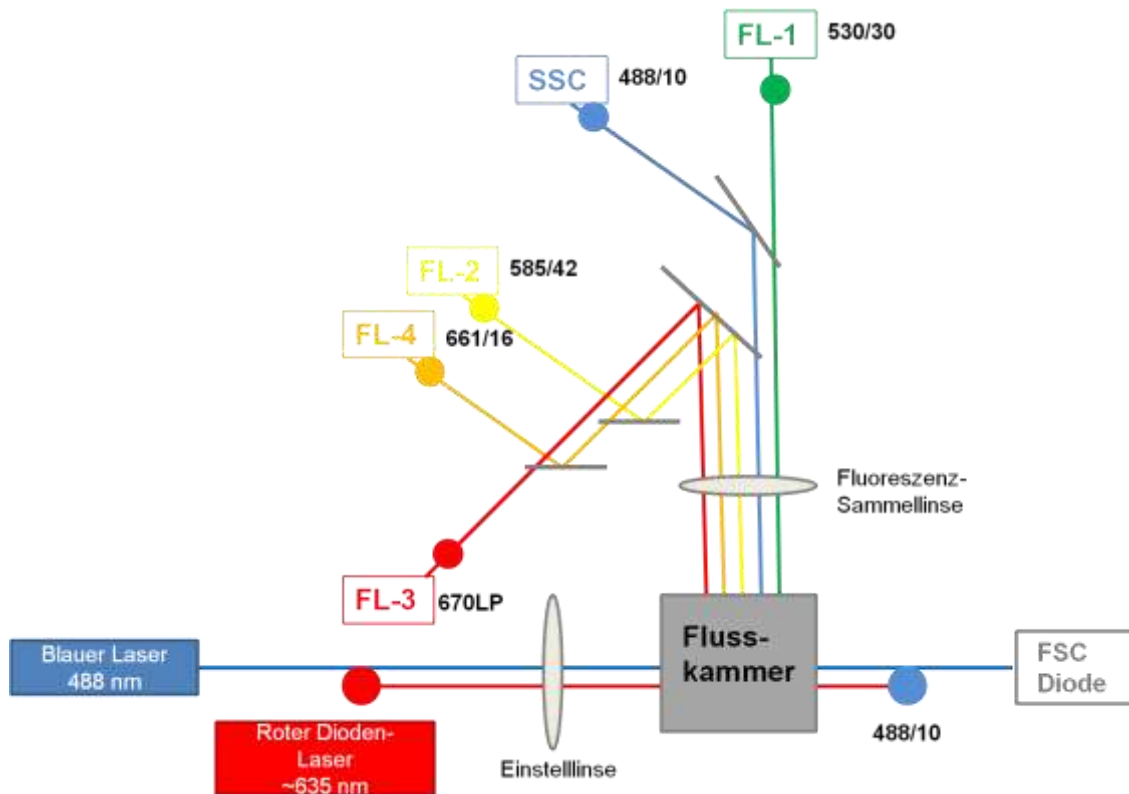


**Abbildung 6: Density-Plot nach PBMC-Zytometrie, aufgetragen nach FSC und SSC. Es zeigt sich eine typische Morphologie nach Ficoll-Gradient der PBMC. Anhand FSC und SSC lässt sich nach morphologischen Kriterien zwischen der ‚kleineren‘ Lymphozyten und ‚größeren‘ sowie ‚granulierteren‘ Monozytenpopulation unterscheiden. Es finden sich R1: Monozytenpopulation; R2: Lymphozytenpopulation.**

Neben der Charakterisierung morphologischer Merkmale der Zellpopulation durch das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht erfolgte eine Untersuchung bestimmter Oberflächenrezeptoren von Monozyten mittels fluorochromgelabelter Antikörper, die spezifisch an einen Oberflächenrezeptor binden. Typisch ist das Verhalten der Fluorochrome, ein spezifisches Emissions-/Absorbptionsmuster zu zeigen. Nach Anregung durch Licht einer spezifischen Wellenlänge kann somit die jeweils spezifische Fluoreszenzemission von einer Photodiode erfasst werden. Die durchflusszytometrische Untersuchung der Chemokinrezeptorexpression auf der Monozytenoberfläche erfolgte mittels direkt gelabelter, spezifischer Antikörper gegen CD14, CCR2, CXCR4 und CX3CR1. Die jeweiligen Isotypenkontrollen wurden mitgeführt. Der spezifische Antikörper zum Nachweis von CD14 mit seinem Isotypen IgG1 Negative Control war FITC-gelabelt (ABD Serotec, Düsseldorf, Germany). Die Antikörper gegen CCR2 und CXCR4 waren APC-gelabelt, ebenso der korrespondierende Isotyp IgG Isotype Control (R&D Systems, Minneapolis, USA). Der CX3CR1-



Antikörper und der zugehörige Isotyp IgG2Bk Isotype Control waren Alexa647-gelabelt (Biolegend, San Diego, USA).



**Abbildung 7: Das Absorptionsoptimum von FITC liegt mit 488 nm im Bereich des blauen, das von APC und Alexa 647 mit 620-650 und 635 nm im Bereich des roten Lichtspektrums. FITC hat ein Emissionsspektrum von 500-575 nm (Messung in FL1), bei APC beträgt das Emissionsmaximum 660-670 nm, bei Alexa647 668 nm (Messung in FL4). (nach BD FACSCalibur flow cytometer Instruction Manual, optical path configuration, BD Online Database ).**

Es ergaben sich bezüglich der Fluoreszenz zwei wesentliche Parameter: die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) und die Rezeptorpositivität der Gesamtzellpopulation. Die mittlere Fluoreszenzintensität kann als „Leuchtstärke“ der Fluoreszenzantikörper betrachtet werden und gilt damit als Maß für die Rezeptorexpression der zu detektierenden Oberflächenrezeptoren. Die Rezeptorpositivität ist Ausdruck des relativen Anteils Rezeptor-tragender

Zellen an der Gesamtpopulation. Zur Kalibrierung der Einzelproben erfolgte eine Relativierung der MFI/ Rezeptorpositivität mittels Isotypenkontrolle.

### 2.3.2 Vorbereitung zur FACS-Färbung

**Zellzahl bestimmen.** Die in 10 ml Hanks-Puffer resuspendierten Zellen (2.2.2.) wurden zur Vorbereitung der FACS-Messung mit Hilfe der Neubaur-Zählkammer (Precicolor HBG, Giessen-Lutzellinden, Deutschland) in den großen äußeren Quadranten ausgezählt. Zur Quantifizierung der in Hanks gelösten Zellen ergab sich folgende Gleichung: Gesamtzellzahl=Anzahl der gezählten Zellen/4 (Mittelwert der Quadranten)\*10 (Verdünnungsfaktor)\*10000/ml (Kammerfaktor)\*10ml (Volumen der Zellsuspension). In einem 1 ml Safelock-Tube (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurden 25 µl der Zellsuspension in 100 µl Hanks-Puffer suspendiert. Diese Lösung wurde mit Trypanblau (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) im Verhältnis 1:1 verdünnt, davon wurden 10 µl auf die Neubaur-Zählkammer gegeben. Trypanblau färbt tote Zellen blau, lebende Zellen bleiben ungefärbt<sup>106,107</sup>. Lebende Zellen, die sich im Gegensatz zu den toten, blau gefärbten Zellen oder Zellschrott als ungefärbt und klar begrenzt darstellen, wurden unter dem Lichtmikroskop bei 35-facher Vergrößerung ausgezählt.

**Fc-Block.** Antikörper binden mit ihrer Fab-Domäne an spezifische Rezeptoren, die Fc-Domäne bindet an Fc-Rezeptoren, die von Phagozyten als Oberflächenproteine exprimiert werden<sup>108,109</sup>. Um ein durch Fc-Bindung generiertes unspezifisches Signal in der Durchflusszytometrie zu reduzieren, wurde ein Fc-Rezeptor-Block durchgeführt. Dazu wurde die Zellsuspension mit FcR-blocking Medium (Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland) inkubiert. Die für die FACS-Analyse benötigte Zellmenge von 4,2 Millionen Zellen wurde aus dem 50 ml Blue Cap in ein 15 ml Blue Cap überführt und mit Hanks-Puffer auf 10 ml aufgefüllt. Es erfolgte ein Waschschrift ( 300 G, 4°C, 10 Minuten, volle Bremse und Beschleunigung).Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet wurde in 90 µl Hanks-Puffer resuspendiert und mit 10 µl Fc-blocking Medium inkubiert (10 Minuten, 4°C). Nach Inkubation wurde die Lösung in 14 ml lauwarmem Facs-Puffer [500 ml PBS, 1% Glucose (Sigma-Aldrich, St. Louis,

USA), 5% BSA Fraktion V (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); 4°C] gleichmäßig verdünnt, in ein 50 ml Blue Cap überführt und mit weiteren 14 ml FACS-Puffer verdünnt, sodass sich in 28 ml FACS-Puffer 4,2 Millionen Zellen befanden. Je 2 ml der Lösung wurden auf 14 FACS-Röhrchen (BD biosciences, Franklin Lakes, USA) verteilt, sodass sich in jedem Röhrchen 300.000 Zellen befanden. Es erfolgte ein Waschschrift (300 G, 4°C, 10 Minuten, volle Bremse und Beschleunigung), dann wurde vorsichtig ohne Alteration der Pellets der Überstand bis auf ca. 100 µl abgesaugt.

### 2.3.3 Färbung

Es erfolgte eine Einfach- sowie eine Doppelfärbung mit den unter 2.3.1 beschriebenen Antikörpern mit jeweiliger Isotypenkontrolle. Es wurde eine ungefärbte Leerprobe sowie eine mit Propidiumiodid (PI) (Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland) versetzte Probe mitgeführt. PI interkaliert mit Nukleinsäuren in Zellen, deren Plasmamembranintegrität durch apoptotische oder nekrotische Prozesse beeinträchtigt ist und dient so als Farbstoff zur Markierung toter Zellen in der Durchflusszytometrie. An Nukleinsäuren gebundenes PI zeigt ein Emissionsmaximum bei 608 nm<sup>110,111</sup>. Es wurden 6 µl PI 25 Minuten vor der durchflusszytometrischen Analyse in der dafür vorgesehen Probe suspendiert.

**Einfachfärbung.** Es erfolgte die Zugabe von je 10 µl IsoAPC/ CCR2/ CXCR4-Antikörper, 1,5 µl IsoAlexa/ CX3CR1-Antikörper und 1,5 µl IsoFitc/ CD14-Antikörper in die dafür vorgesehen Röhrchen aus 2.3.2.2. Die Inkubation erfolgte für den FITC-gelabelten Antikörper über 15 Minuten, für die APC- und Alexa-gelabelten Antikörper über 35 Minuten. Nach der Inkubation wurden die Proben mit 2 ml FACS-Puffer versetzt und bei 300 G, 4°C für 10 Minuten zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand vorsichtig ohne Alteration der Pellets bis auf ca. 100 µl abgesaugt.

**Doppelfärbung.** Zu mit IsoAPC-/ IsoAlexa- oder CCR2-/CXCR4-/CX3CR1-Antikörper gefärbten Proben wurde in einem zweiten Inkubationsschritt je 1,5 µl IsoFITC- oder CD14- Antikörper hinzugegeben, es wurde 15 Minuten lichtgeschützt bei 4°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Zugabe von 2 ml

FACS-Puffer, danach wurde bei 300 G, 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und im Anschluss der Überstand ohne Alteration der Pellets bis auf ca. 100 µl abgesaugt. Die zur Analyse vorbereiteten Zellen wurden in 600 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden bis zur FACS-Analyse lichtgeschützt auf Eis gelagert.

#### 2.3.4 Durchflusszytometrische Messung

Die durchflusszytometrische Messung (FACS-Messung) erfolgte an einem FACS-Kalibur (BD biosciences, Franklin Lakes, USA) bei mittlerer Flussrate. Anhand der morphologischen Kriterien wurde um die Zielpopulation im FSC/SSC-DotPlot ein Gate gesetzt, das zur besseren Identifizierung der Zellen während der Messung diente. Gemessen wurden die einfach und doppelt gefärbten Proben mit Antikörpern gegen CD14, CCR2, CXCR4, CX3CR1, CCR2/CD14, CXCR4/CD14, CX3CR1/CD14. Die genaue Kalibrierung der Proben erfolgte durch Einstellung des Durchflusszytometers auf die Leeraufnahme und die Isotypen. Die Isotypenwerte wurden so ausgerichtet, dass sich eine mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von ca. 3-5 einstellte und sich die gesamte Population abbildete. Der Endpunkt eines Messvorgangs wurde bei 25.000 registrierten Counts definiert.

#### 2.3.5 Auswertung der erhobenen Rohdaten

Die Auswertung der Rohdaten auf mittlere Fluoreszenzintensität und Rezeptorpositivität der Monozytenpopulation, Leerwert und Lebend-Tot-Diskrimination erfolgte mittels WinMDI2.9. Anhand morphologischer Merkmale wurde im FSC/SSC-Densityplot um die Monozytenpopulation ein Gate gesetzt (siehe Abbildung 6). Die durch das Gating als monozytär definierte Zellpopulation wurde weiter auf mittlere Fluoreszenzintensität und Prozent rezeptorpositiver Monozyten im Dotplot untersucht.

## 2.4 Subgruppeneinteilung anhand patientenbezogener Daten

### 2.4.1 Individuelle Parameter

Individuelle Daten zu kardiovaskulärem Risikoprofil (Alter, Geschlecht, Adipositas ( $\text{BMI} \geq 30$ ), bekannte Hyperlipidämie, bekannte Erkrankung an Diabetes mellitus Typ 2, Nikotinabusus, bekannte arterielle Hypertonie, positive Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen), medizinischer Vorgeschichte und zur Medikation bei Aufnahme wurden anamnestisch erhoben und mit den Befunden aus den Entlassbriefen des aktuellen stationären Aufenthaltes in Kongruenz gebracht.

### 2.4.2 Hämatologische Parameter

Aus der in EDTA gepufferten Patientenblutprobe wurden 0,5 ml abpipettiert, daraus wurde mit Hilfe eines Sysmex XT 2000iV (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) maschinell ein Differentialblutbild für jeden Patienten erstellt. Die dabei erhobenen Messwerte gingen in die Auswertung mit ein.

### 2.4.3 Serumparameter

#### 2.4.3.1 *Lipidwerte und CRP*

Im Rahmen des Routinelabors bei Aufnahme wurde das Lipidprofil (Gesamt-Cholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin) der Patienten ermittelt sowie der CRP-Wert bestimmt.

#### 2.4.3.2 *Gegenüberstellung aller erhobener Daten*

Die Gegenüberstellung aller erhobener Daten erfolgte auf drei verschiedenen Ebenen: Zunächst wurde die Dynamik der Chemokinrezeptor-Expression und – Positivität der Gesamtpopulation vor und nach PCI verglichen. Zum Zweiten wurden Unterschiede der Rezeptordynamik verschiedener Patientensubgruppen, die anhand der patientenbezogenen Datenerhebung festgelegt wurden, analysiert. Zum Dritten wurden Korrelationen zwischen den verschiedenen Patientensubgruppen detektiert.

#### 2.4.4 Statistik

Die Daten wurden mittels SPSS, Herstellerversion 18, statistisch ausgewertet und werden im Folgenden, wenn nicht anders gekennzeichnet, als Median [IQR 25. Perzentil; 75. Perzentil] dargestellt.

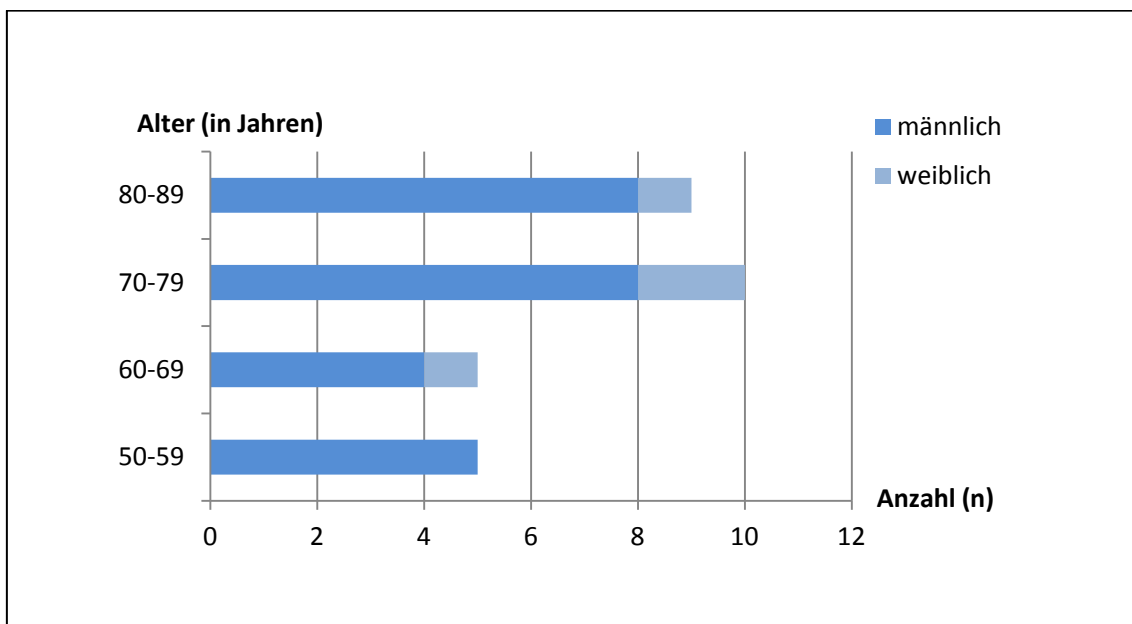
Die Analyse der durchflusszytometrischen Ergebnisse wurde hierzu aufgrund des Stichprobencharakters und der unter statistischen Gesichtspunkten eher kleinen Gruppengröße der Studienpopulation mit einem nicht-parametrischen Test für verbundene Stichproben, dem Wilcoxon-Test, analysiert. Eine orientierende Prüfung möglicher Korrelationen unter den kardiovaskulären Risikofaktoren und weiteren Merkmalen wie Alter, Angina pectoris, Z.n. Myokardinfarkt wurde mittels Spearman Rank Test durchgeführt. Die einzelnen Subgruppenanalysen bezogen auf die durchflusszytometrischen Ergebnisse und die übrigen Laborergebnisse (Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Triglyzeride, CRP, z.B. Vergleich der MFI-Werte für einen bestimmten Chemokinrezeptor in der Gruppe der Patienten mit bekannter KHK vs. Patienten ohne vorbekannte KHK) erfolgten mit einem nicht-parametrischen Test für unverbundene Stichproben, dem Mann-Whitney-U Test.

Als signifikant wurde jeweils ein  $p < 0,05$  gewertet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Ergebnisse der patientenbezogenen Datenanalyse

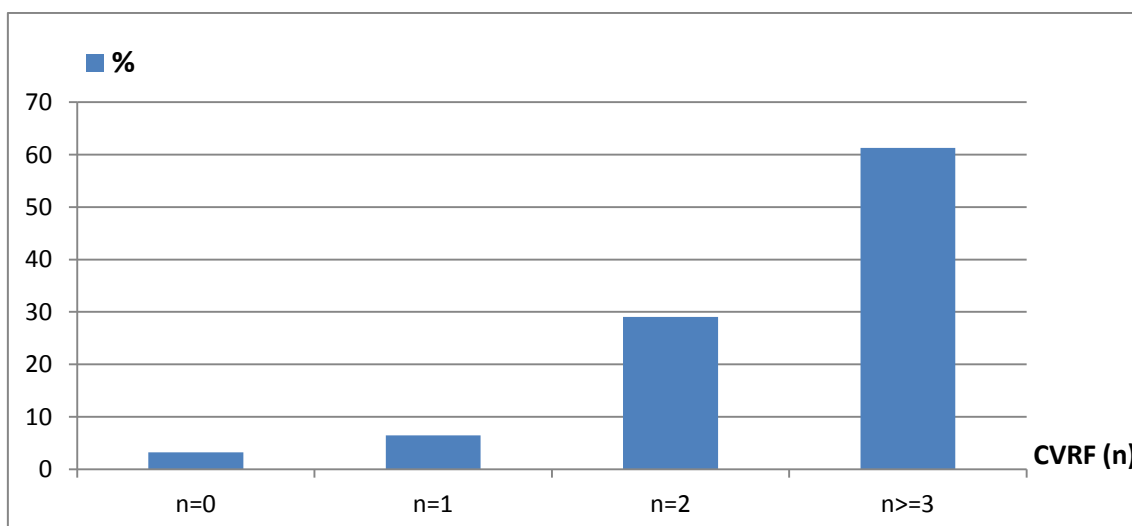
Untersucht wurden insgesamt 62 Vollblutproben von 31 Patienten, bei denen elektiv eine PCI durchgeführt wurde. Der Großteil der Probanden (81 %) war männlichen Geschlechts, der Altersdurchschnitt betrug 72 Jahre. Der jüngste Proband war 55, der älteste 85 Jahre alt.



**Abbildung 8: Alters-und Geschlechterverteilung der untersuchten Population. Die Mehrheit der Probanden war männlichen Geschlechts. Die jüngsten Patienten befanden sich in der fünften Lebensdekade. Die meisten Patienten befanden sich in der siebten Lebensdekade.**

Ein großer Teil der Untersuchten war bereits kardiovaskulär vorerkrankt. Anamnestisch beschrieben rund die Hälfte der Patienten (52 %) typische, pectanginöse Beschwerden. Bei über der Hälfte der Patienten (61 %) war eine KHK vorbekannt. Es ergab sich eine positive Korrelation zwischen pectanginösen Beschwerden und vorbekannter KHK ( $p < 0,05$ ). Circa ein Viertel der Probanden (26 %) hatte bereits einen Myokardinfarkt in der Vorgeschichte erlitten. Entsprechend nahmen zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme über die Hälfte der Patienten regelmäßig Blocker des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (ACE-Hemmer, AT1-Hemmer) und Beta-Blocker ein (74 % und 68 %).

Knapp die Hälfte der Patienten (48 %) hatte sich bereits zu einem früheren Zeitpunkt einer perkutanen Koronarintervention mit Stentimplantation unterzogen. Nur ein Patient hatte keine kardiovaskulären Risikofaktoren. Zwei der Patienten wiesen einen und neun der Patienten wiesen zwei kardiovaskuläre Risikofaktoren auf. Die Mehrheit der Patienten (61 %, n=19) zeigte ein deutlich erhöhtes Risikoprofil mit drei oder mehr positiven Risikofaktoren. Fast alle Probanden litten an Bluthochdruck (90 %). Rund ein Drittel der Patienten konnte eine positive Familienanamnese bezüglich kardiovaskulärer Erkrankungen (32 %), eine Erkrankung an Diabetes mellitus (35 %) oder einen Nikotinabusus (32 %) vorweisen. Für Details und Zusammenfassung siehe Abbildung 9 und Tabelle 2.



**Abbildung 9: Anzahl positiver kardiovaskulärer Risikofaktoren (CVRF, [n]) in Bezug zur Gesamtpopulation (%). Mehr als 60 % der Patienten hatte 3 oder mehr positive kardiovaskuläre Risikofaktoren.**



**Tabelle 2**

<b>Patientencharakteristika</b>	
Gesamtzahl (n)	31
Geschlecht männlich/weiblich (n); männlich%	26/5; 81
Altersdurchschnitt (in Jahren)	72
<b>Kardiovaskuläre Risikofaktoren</b>	
Arterielle Hypertonie (%)	90
Hyperlipoproteinämie (%)	68
Diabetes Mellitus (%)	35
Nikotinabusus (%)	32
positive Familienanamnese (%)	32
Adipositas (BMI $\geq$ 30) (%)	26
<b>Anamnese</b>	
Angina Pectoris (%)	52
vorbekannte KHK (%)	61
Z.n. Myokardinfarkt (%)	26
Z.n. Koronarstentimplantation (%)	48
<b>Medikamente bei Aufnahme</b>	
ASS (%)	74
Beta-Blocker (%)	68
RAS-Blocker (%)	74
Statin (%)	55

Im Differentialblutbild zeigte sich bezüglich des absoluten Monozytenanteils nach PCI ein tendenziell höherer Wert [vor PCI: 600/ $\mu$ l (460; 870); nach PCI: 750/ $\mu$ l (IQR 550; 940);  $p=0,06$ ; n.s.] ohne dass eine statistische Signifikanz erreicht wurde. Hinsichtlich des relativen Monozytenanteils zeigte sich vor und nach PCI keine Dynamik [vor PCI 9% (8; 11); nach PCI 9% (IQR 8; 11), n.s.]. Zwei der Differentialblutbilder nach PCI mussten aufgrund Hämolyse verworfen werden. Es konnten nur 28 der 31 eingesandten Proben in die CRP-Analyse miteinbezogen werden. Der CRP-Spiegel betrug 0,24 mg/dl im Median (IQR 0,13; 0,55) und war damit normwertig. Bei rund zwei Dritteln der Patienten (67,74 %) war eine Hyperlipoproteinämie bei Aufnahme vorbeschrieben, knapp

über die Hälfte (54,84 %) der Gesamtpopulation wurde medikamentös mit Statinen behandelt. Der Median des Gesamtcholesterins betrug 181 mg/dl (IQR 162; 195), der des LDL-Cholesterins 98 mg/dl (IQR 86; 114), der der Triacylglyceride (TAG) 135 mg/dl (IQR 90; 185) und der des HDL-Cholesterins 48 mg/dl (IQR 37; 60). (siehe Tabelle 3).

**Tabelle 3**

<b>CRP und Lipide</b>	
CRP (mg/dl)	0,24 (0,13; 0,55)
Gesamtcholesterin (mg/dl)	181 (162; 195)
LDL-Cholesterin (mg/dl)	98 (86; 114)
Triglyzeride (mg/dl)	135 (90; 185)
HDL-Cholesterin (mg/dl)	48 (37; 60)

***CRP-Spiegel und Lipidwerte bei Aufnahme im Median (IQR).***

In der statistischen Auswertung ergab sich eine Korrelation zwischen Statin-Einnahme und LDL-Cholesterinspiegeln sowie HDL-Cholesterinspiegel. Patienten, die Statine einnahmen, hatten einen signifikant geringeren LDL-Cholesterinspiegel ( $p < 0,05$ ) sowie einen signifikant höheren HDL-Cholesterinspiegel ( $p < 0,05$ ). Es ergab sich keine Korrelation für die Statin-Einnahme und den Gesamtcholesterinspiegel oder den Triglyzeridspiegel. Desweiteren ergab sich eine Korrelation zwischen Statin-Einnahme und dem CRP-Spiegel. Patienten, die Statine einnahmen, hatten einen signifikant geringeren CRP-Spiegel ( $p < 0,05$ ). Für Details siehe Tabelle 4.

**Tabelle 4**

	Statin		p-Wert
	nein	ja	
LDL-Cholesterin (mg/dl)	109 (95;114)	89 (75;105)	0,029
HDL-Cholesterin (mg/dl)	41 (37;50)	57 (42; 61)	0,036
Gesamtcholesterin (mg/dl)	180 (167;195)	182 (156;195)	0,625
Triglyzeride (mg/dl)	136 (119; 185)	122 (87;173)	0,493
CRP (mg/dl)	0,42 (0,20; 1,36)	0,17 (0,10; 0,38)	0,033

**Vergleich von Patienten, die Statine einnehmen, mit Patienten, die keine Statine einnehmen und Korrelation zu Lipid- und CRP-Werten im Median (IQR).**

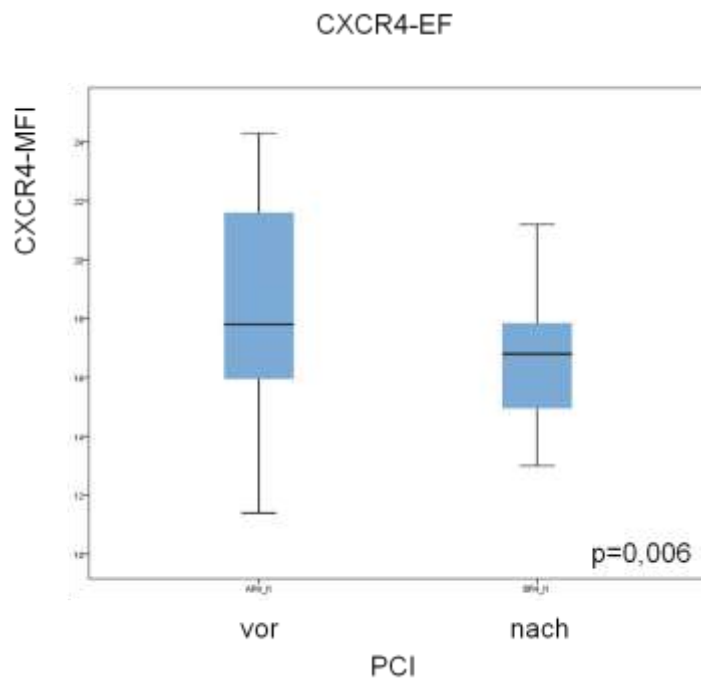
## 3.2 Ergebnisse der FACS-Analysen

### 3.2.1 CXCR4 auf humanen Monozyten

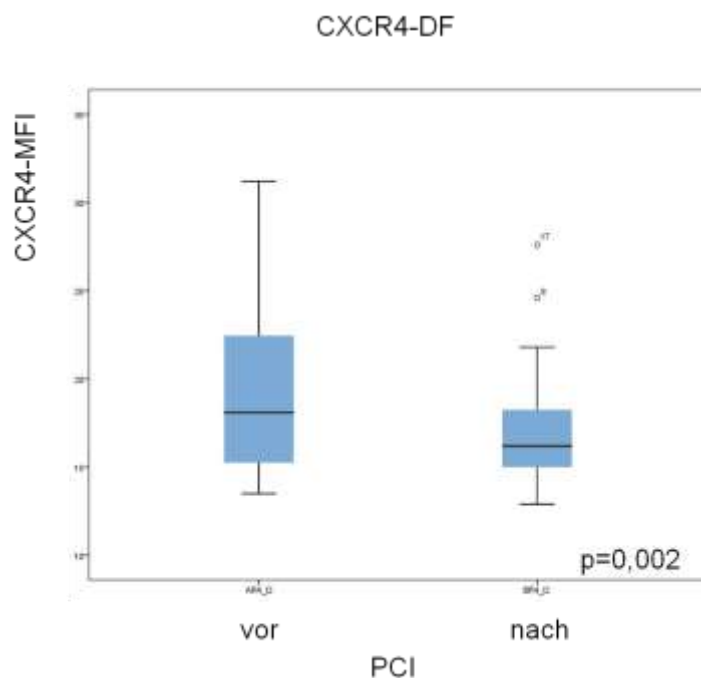
#### 3.2.1.1 Dynamik der Gesamtpopulation vor und nach PCI

Die CXCR4-Expression und –Positivität auf den Monozyten der Gesamtpopulation zeigte nach PCI eine signifikante Abnahme in Einzelfärbung und Doppelfärbung.

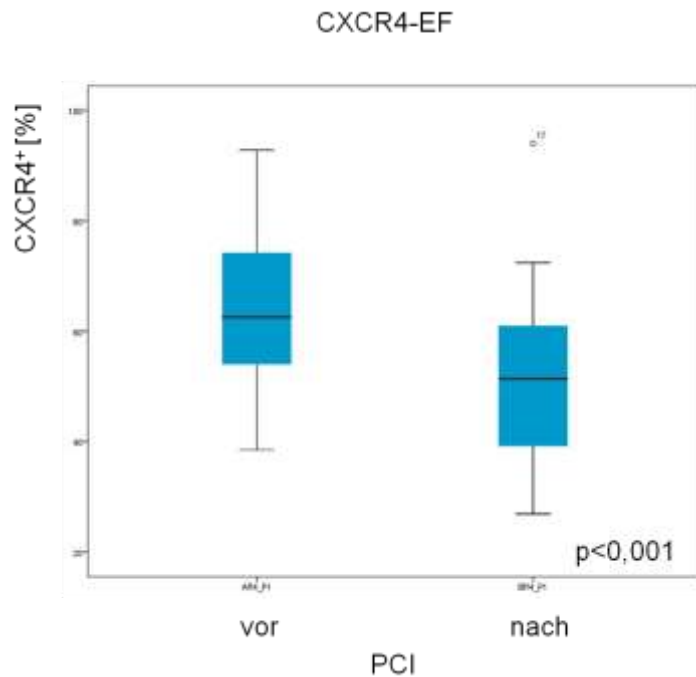
Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CXCR4, die, wie bereits beschrieben, als Maß für die Rezeptorexpression herangezogen werden kann, betrug im Median in der Einzelfärbung vor PCI 17,80 [IQR 15,70; 22,50] und nach PCI 16,80 [14,90; 17,90],  $p=0,006$ ; siehe Abbildung 10. In der Doppelfärbung vor PCI betrug sie 18,10 [15,00; 22,70] und nach PCI 16,20 [14,80; 18,60],  $p=0,002$ ; siehe Abbildung 11. Die Prozentzahl der CXCR4-positiven Population betrug in der Einzelfärbung vor PCI 62,56 [53,76; 75,87] und nach PCI 51,41 [38,53; 61,02],  $p<0,001$ ; siehe Abbildung 12. In der Doppelfärbung vor PCI betrug sie 75,90 [62,68; 85,29] und nach PCI 61,15 [53,68; 69,87],  $p=0,001$ ; siehe Abbildung 13.



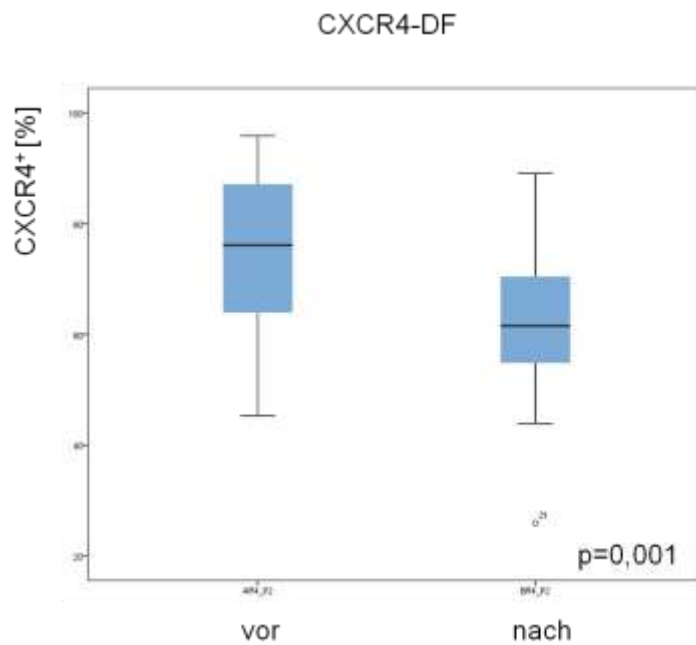
**Abbildung 10: CXCR4-Expression auf humanen Monozyten vor und nach PCI in der Einzelfärbung. Es ergab sich eine signifikante Abnahme der Rezeptorexpression.**



**Abbildung 11: CXCR4-Expression auf humanen Monozyten vor und nach PCI in der Doppelfärbung (CXCR4/CD14). Es ergab sich eine signifikante Abnahme der Rezeptorexpression.**



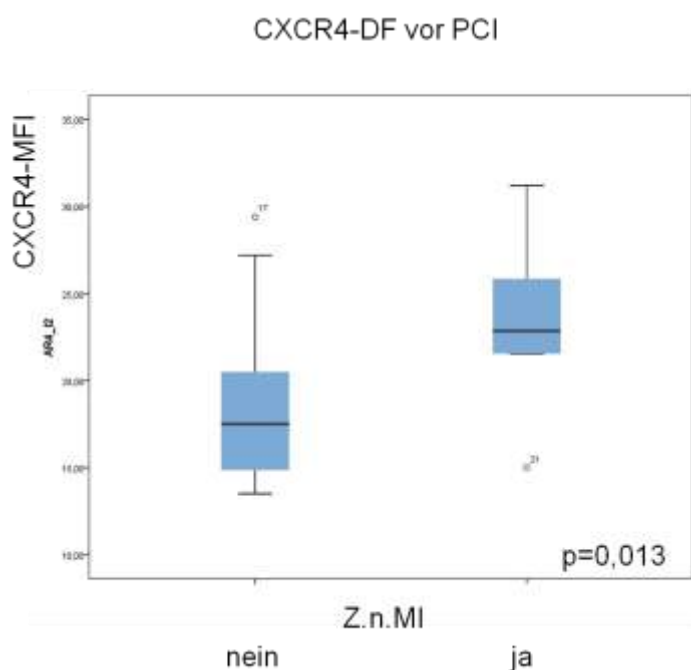
**Abbildung 12: Prozentzahl CXCR4-positiver Monozyten vor und nach PCI in der Einzelfärbung. Es ergab sich eine signifikante Abnahme der rezeptorpositiven Zellen.**



**Abbildung 13: Prozentzahl CXCR4-positiver Zellen vor und nach PCI in der Doppelfärbung. Es ergab sich eine signifikante Abnahme der rezeptorpositiven Zellen.**

### 3.2.1.2 CXCR4-Expression einzelner Subgruppen: Myokardinfarkt und Angina pectoris

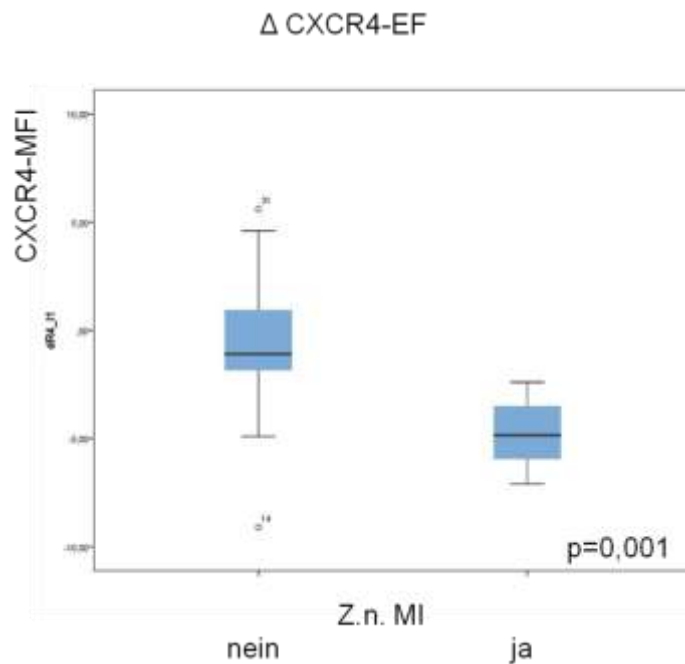
Patienten mit Zustand nach länger zurückliegendem Myokardinfarkt zeigten basal (vor PCI) eine signifikant höhere CXCR4-Expression im Vergleich mit Patienten ohne stattgehabten Myokardinfarkt in der Doppelfärbung (22,85 [21,55; 25,85] vs. 17,50 [14,80; 20,90],  $p=0,013$ ; siehe Abbildung 14). Dies spricht für eine höhere CXCR4-Rezeptordichte auf peripheren Monozyten bei Patienten mit stattgehabtem Myokardinfarkt. Die entsprechenden Ergebnisse für die Einzelfärbung waren knapp nicht signifikant (22,55 [17,45; 23,35] vs. 17,00 [15,50; 19,50],  $p=0,060$ ).



**Abbildung 14: Patienten mit stattgehabtem Myokardinfarkt zeigten in der Doppelfärbung vor PCI eine signifikant höhere Rezeptorexpression als Patienten ohne stattgehabten Myokardinfarkt.**

Die Rezeptorexpression zeigte nach Stenting in beiden Gruppen (stattgehabter Myokardinfarkt ja/nein) einen Rückgang, wobei die Abnahme in der Gruppe der Patienten mit Zustand nach Myokardinfarkt signifikant höher war in Einzelfärbung (-4,85 [-5,95; -3,50] vs. -1,10 [-1,90; 1,30],  $p=0,001$ ; siehe Abbildung 15) und Doppelfärbung (-3,55 [-9,50; -2,30] vs. -1,80[-3,50; 1,20],  $p=0,043$ ). Angina Pectoris gilt als klinisches Korrelat zu intermittierender

Myokardischämie, ein Myokardinfarkt geht mit persistierender Myokardischämie einher. Patienten, die anamnestisch pectanginöse Beschwerden beschrieben hatten, zeigten eine knapp signifikant höhere Abnahme der CXCR4-Expression nach PCI verglichen mit Patienten ohne AP-Symptomatik in der Doppelfärbung (-3,25 [-6,20; -1,75] vs. -1,50 [-2,00; 1,20],  $p=0,041$ ). Dies folgt dem oben beschriebenen Muster bei Myokardinfarkt.

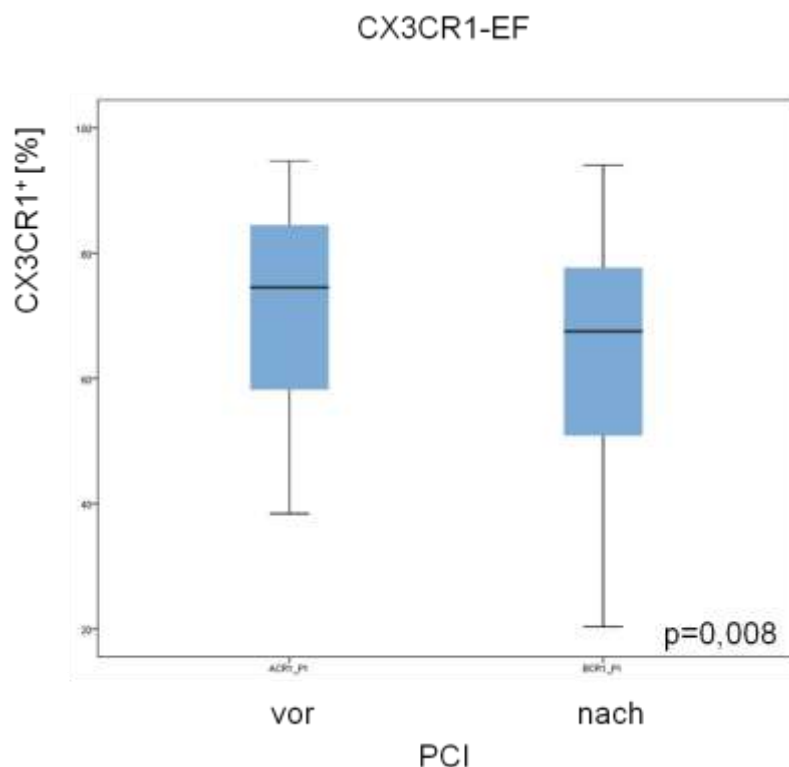


**Abbildung 15:** In den Subgruppen mit kardio-ischämischer Vorgeschichte (stattgehabter Myokardinfarkt, bekannte Angina pectoris) zeigte sich eine signifikant größere Abnahme der CXCR4-Expression nach PCI. Abbildung 20 veranschaulicht dieses Verhalten für die Einzelfärbung nach PCI in der Subgruppenanalyse mit/ohne stattgehabten Myokardinfarkt.

### 3.2.2 CX3CR1 auf humanen Monozyten

#### 3.2.2.1 Dynamik der Gesamtpopulation vor und nach PCI

Der Anteil CX3CR1-positiver Monozyten nahm nach Stenting in der Einzelfärbung signifikant ab, in der Doppelfärbung ergab sich kein signifikanter Unterschied (n.s.). Für die CX3CR1-Expression vor und nach PCI ergab sich ebenso kein signifikanter Unterschied. Die Prozentzahl CX3CR1-positiver Zellen betrug in der Einzelfärbung vor PCI 74,52 [57,74; 85,69] und nach PCI 67,53 [50,39; 78,90],  $p=0,008$ ; siehe Abbildung 16. In der Doppelfärbung vor PCI betrug sie 75,03 [61,17; 82,70], nach PCI betrug sie 66,49 [50,03; 82,86],  $p=0,12$  (n.s.). Die CX3CR1-Expression betrug im Median in der Einzelfärbung vor PCI 19,10 [15,80; 22,50] und nach PCI 18,40 [15,70; 20,20],  $p=0,64$  (n.s.). In der Doppelfärbung vor PCI betrug sie 17,20 [15,00; 19,20] und nach PCI 16,40 [13,80; 19,60],  $p=0,62$  (n.s.).

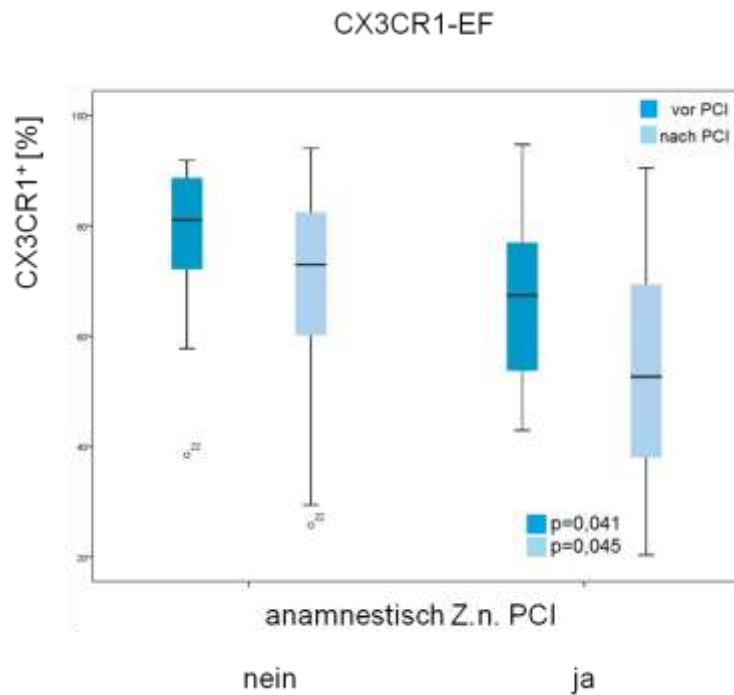


**Abbildung 16: Die Prozentzahl CX3CR1-positiver Monozyten nahm nach PCI signifikant ab in der Einzelfärbung.**

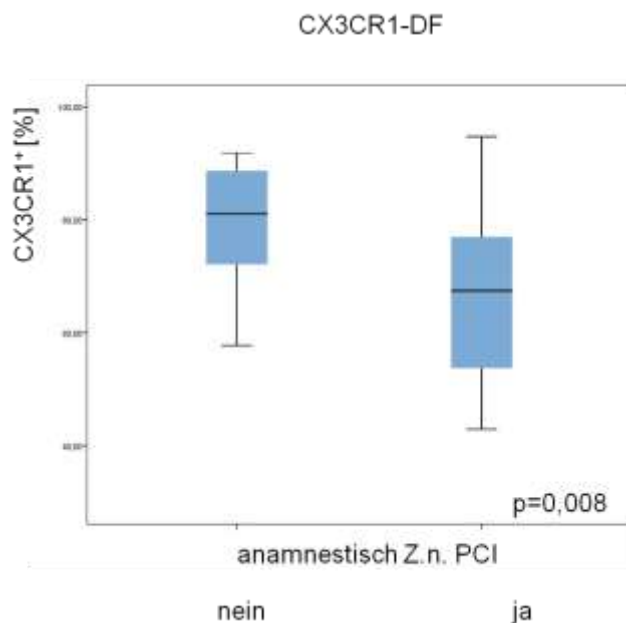


### 3.2.2.2 CX3CR1-Dynamik einzelner Subgruppen: Zustand nach Revaskularisierung

Die basale Populationsgröße (vor PCI) CX3CR1-positiver Monozyten war bei Patienten mit Zustand nach bereits vorhergehend stattgehabter PCI signifikant kleiner als in der Kontrollgruppe. Dies zeigte sich in Einzelfärbung (67,42 [52,74; 78,15] vs. 81,06 [72,14; 88,67],  $p=0,041$ ; siehe Abbildung 17) und Doppelfärbung (64,41 [56,83; 78,01] vs. 78,05 [73,37; 87,22],  $p=0,008$ ; siehe Abbildung 18). Auch nach PCI blieb die CX3CR1-positive Population in der Einzelfärbung bei Patienten mit vorhergehend stattgehabter PCI knapp signifikant kleiner [52,64 [37,24; 71,19] vs. 72,93 [60,17; 82,44],  $p=0,045$ ; siehe Abbildung 17). Für die Doppelfärbung rezeptorpositiver Monozyten nach PCI im beschriebenen Subgruppenvergleich ergab sich kein signifikantes Ergebnis (55,82 [ 50,03; 74,86] vs. 71,19 [50,09; 84,25],  $p=0,247$ ).



**Abbildung 17:** Bei Patienten, die sich bereits vorhergehend einer PCI unterzogen hatten, war die Populationsgröße CX3CR1-positiver Monozyten sowohl basal als auch nach Intervention signifikant kleiner in der Einzelfärbung.



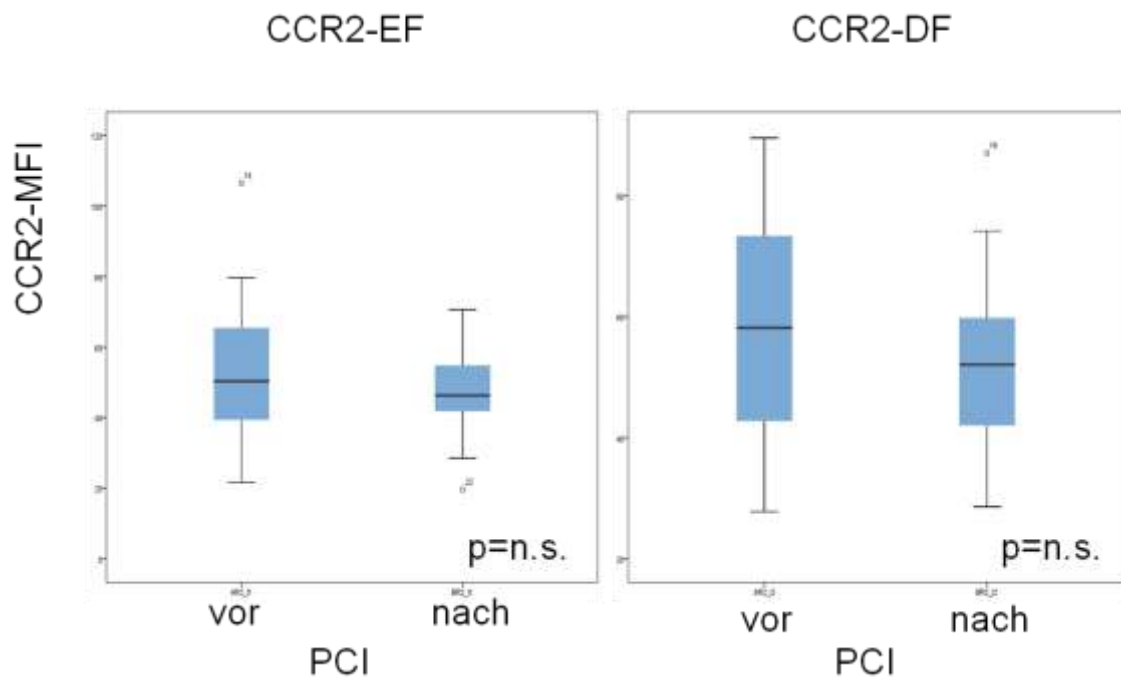
**Abbildung 18:** Bei Patienten, die sich bereits vorhergehend einer PCI unterzogen hatten, war die Populationsgröße CX3CR1-positiver Monozyten auch in der Doppelfärbung vor PCI signifikant kleiner als bei Patienten, die sich bis dato noch keiner PCI unterzogen hatten.

## CCR2 auf humanen Monozyten

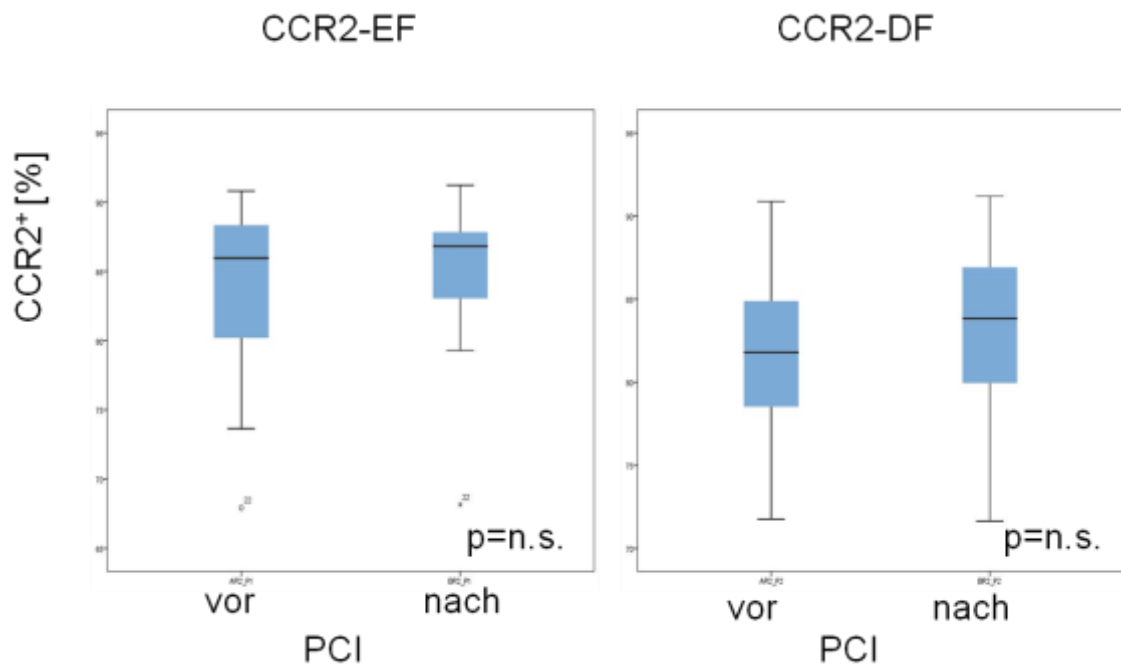
### 3.2.2.3 *Dynamik der Gesamtpopulation vor und nach PCI*

Für die CCR2-Expression und Positivität vor und nach PCI in Einzel- und Doppelfärbung ergab sich kein signifikanter Unterschied.

Die CCR2-Expression betrug in der Einzelfärbung vor PCI 50,40 [37,90; 69,00] und nach PCI 46,30 [40,80; 55,10],  $p=0,15$  (n.s.). In der Doppelfärbung vor PCI betrug sie 58,20 [41,30; 73,50] und nach PCI 52,10 [41,60; 60,60],  $p=0,20$  (n.s.). Die Prozentzahl CCR2-positiver Zellen betrug in der Einzelfärbung vor PCI 85,96 [79,85; 88,61] und nach PCI 86,82 [82,90; 87,99],  $p=0,12$  (n.s.). In der Doppelfärbung vor PCI betrug die Populationsgröße CCR2-positiver Zellen 81,63 [78,79; 84,49], nach PCI betrug sie 83,57 [78,59; 86,52]  $p=0,1$  (n.s.).



**Abbildung 19:** Es ergaben sich keine signifikanten Änderungen hinsichtlich der CCR2-Expression auf Monozyten vor und nach PCI.



**Abbildung 20:** Es ergaben sich keine signifikanten Änderungen hinsichtlich der CCR2-positiven Population vor und nach PCI.

### 3.2.2.4 CCR2-Dynamik einzelner Subgruppen

In den einzelnen Subgruppen ergaben sich für die CCR2-Expression und -Positivität vornehmlich nicht-signifikante Unterschiede. Ein knapp signifikanter Unterschied betraf die Gruppe „Adipositas“, hier konnte eine reduzierte CCR2-Expression im Vergleich zu nicht-Adipösen in der Einzelfärbung vor PCI gezeigt werden (56,00 [41,50; 76,30] vs. 41,10 [37,30; 47,15],  $p=0,030$ ). Andere knapp-signifikante Ergebnisse ergaben sich in einzelnen Färbungen der Gruppe „stattgehabte PCI“, hier kann jedoch in Zusammenschau kein zusammenhängender Trend erkannt werden. Übersicht der Werte siehe Tabelle 5 und Tabelle 6.

**Tabelle 5**

Subgruppe	MFI-CCR2 Einzelfärbung							MFI-CCR2 Doppelfärbung						
	Subgruppe negativ			Subgruppe positiv			p-Wert	Subgruppe negativ			Subgruppe positiv			p-Wert
	Median	P-25	P-75	Median	P-25	P-75		Median	P-25	P-75	Median	P-25	P-75	
AP	A 50,4	41,3	58,7	52,3	37,6	76,0	1,000a	A 58,2	44,3	74,7	55,7	39,0	73,4	,654a
	B 46,1	40,8	54,6	46,3	41,1	55,7	,922a	B 56,3	46,9	63,7	46,6	41,2	57,3	,093a
BMI>30	A 56,0	41,5	76,3	41,1	37,3	47,2	,030a	A 58,8	44,3	75,2	50,7	36,2	64,3	,145a
	B 49,4	43,0	56,3	42,5	37,8	45,6	,067a	B 52,7	42,5	63,0	49,5	37,8	56,9	,295a
DM	A 49,8	39,1	60,3	54,8	37,9	76,3	,730a	A 55,3	39,0	72,7	58,2	49,6	73,5	,611a
	B 50,2	41,9	55,7	45,5	40,6	49,4	,583a	B 47,6	41,2	58,5	52,7	46,9	63,0	,359a
FA	A 45,6	37,9	69,0	55,5	41,3	58,7	,755a	A 52,7	40,0	59,7	72,0	47,5	75,2	,186a
	B 45,5	40,6	56,3	47,7	42,9	51,4	,950a	B 56,0	41,6	60,6	46,8	42,5	56,3	,441a
Gen	A -1,4	-4,6	1,9	2,0	-0,7	4,2	,159a	A -9,6	-20,7	-0,5	-1,3	-10,6	5,9	,280a
	B 0,0	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	,195a	B -0,2	-0,3	0,0	0,0	-0,2	0,1	,235a
HLP	A 45,4	40,9	56,4	54,8	37,9	69,0	,519a	A 55,7	40,0	59,7	58,2	46,5	74,7	,393a
	B 44,8	42,9	55,1	46,3	40,6	54,6	,983a	B 54,5	45,2	57,8	48,5	41,6	60,6	,755a
KHK	A 46,3	36,1	72,3	54,8	41,3	61,9	,562a	A 45,4	39,0	58,1	59,7	51,8	74,7	,071a
	B 54,1	43,8	56,3	45,5	40,6	49,4	,120a	B 47,6	42,1	56,5	56,3	41,4	61,0	,389a
Z.n. MI	A 45,6	37,2	58,7	59,2	46,7	79,5	,158a	A 51,8	40,0	70,4	72,0	56,2	78,0	,067a
	B 46,3	43,0	55,1	43,5	37,9	53,8	,386a	B 52,1	41,4	61,0	54,8	45,9	58,5	,877a
Nik	A 50,4	41,3	61,9	49,1	37,9	79,4	,755a	A 58,6	46,5	70,7	55,5	40,0	75,2	,950a
	B 49,1	43,4	55,1	43,5	39,3	54,6	,201a	B 56,3	42,5	61,0	46,8	40,7	56,0	,186a
RAS-Block	A 49,9	35,9	67,2	50,4	40,9	69,0	,842a	A 48,6	40,8	67,2	58,6	41,3	73,5	,550a
	B 51,3	42,7	55,5	45,5	40,8	55,1	,520a	B 54,1	44,6	64,0	52,1	41,4	60,6	,740a
Revask	A 49,8	39,1	72,3	54,8	37,9	61,9	,953a	A 47,0	39,0	58,1	70,4	58,2	75,2	,030a
	B 54,1	44,6	57,7	43,0	39,3	46,3	,014a	B 50,3	42,1	58,8	56,3	40,7	61,0	,711a
RR	A 49,2	26,1	55,4	52,6	39,4	72,3	,422a	A 58,8	33,7	75,2	57,8	42,8	73,4	,975a
	B 42,9	36,5	55,1	46,3	41,9	55,5	,503a	B 45,2	40,7	57,0	52,4	42,1	60,8	,462a
Statin	A 48,0	35,0	69,0	54,8	41,3	56,4	,922a	A 55,0	41,3	70,7	58,8	44,3	73,5	,710a
	B 47,7	43,4	59,0	46,1	40,6	53,5	,399a	B 52,4	40,2	63,0	52,1	45,2	57,5	,984a

**Tabelle 6**

rezeptorpositive Zellen [%]-CCR2								rezeptorpositive Zellen [%]-CCR2								
Einzelfärbung								Doppelfärbung								
Subgruppe	Subgruppe negativ			Subgruppe positiv			p-Wert	Subgruppe negativ			Subgruppe positiv			p-Wert		
	Median	P-25	P-75	Median	P-25	P-75		Median	P-25	P-75	Median	P-25	P-75			
AP	A	86,0	79,8	89,1	86,1	80,2	87,4	,953a	A	83,8	79,7	85,5	79,9	77,8	83,0	,066a
	B	87,4	85,0	89,3	85,8	81,1	87,1	,119a	B	85,5	82,1	87,6	81,3	78,1	85,2	,086a
BMI>30	A	86,0	82,4	89,1	82,9	79,1	86,9	,317a	A	82,7	79,1	85,5	77,5	72,7	82,4	,054a
	B	87,2	85,3	89,0	84,1	81,4	86,1	,100a	B	84,5	79,7	87,2	80,2	77,0	84,2	,060a
DM	A	85,2	79,8	88,0	86,6	82,4	88,6	,583a	A	80,9	77,8	84,1	83,2	79,7	85,5	,317a
	B	85,9	82,2	87,6	87,2	85,0	90,0	,244a	B	82,8	78,8	85,7	86,5	76,7	88,0	,338a
FA	A	86,0	79,2	88,6	86,2	84,1	88,1	,546a	A	82,7	79,1	84,5	80,6	77,1	83,6	,633a
	B	87,0	82,4	88,0	86,4	85,3	87,2	,983a	B	83,7	78,4	86,5	82,9	79,7	86,0	,917a
Gen	A	86,3	84,1	89,3	86,0	79,9	88,1	,584a	A	83,2	80,2	87,3	81,3	78,8	84,3	,480a
	B	86,0	85,3	88,0	86,8	82,9	87,7	,897a	B	82,8	82,1	83,7	84,0	78,6	86,5	,548a
HLP	A	83,5	79,9	86,3	86,5	83,3	89,1	,393a	A	81,2	78,8	84,3	81,6	79,1	84,5	,663a
	B	86,9	85,3	88,0	86,4	82,4	87,7	,755a	B	82,6	78,6	86,6	83,6	81,8	86,0	,917a
KHK	A	85,8	79,5	87,7	86,0	80,5	89,1	,617a	A	79,3	75,6	84,2	82,7	79,7	84,5	,191a
	B	86,1	80,1	88,7	86,8	85,0	88,0	,535a	B	83,2	78,5	85,7	84,5	79,0	86,6	,765a
Z.n. MI	A	86,0	79,9	88,6	86,4	81,8	88,0	,774a	A	81,6	77,1	85,5	81,3	79,4	83,8	,1000a
	B	86,8	82,4	89,3	86,6	84,1	87,8	,982a	B	83,6	78,6	86,5	83,6	78,7	86,4	,982a
Nik	A	86,0	82,4	88,6	84,6	79,9	86,6	,519a	A	81,6	78,8	84,5	81,9	79,7	83,2	,819a
	B	87,2	82,4	89,3	85,3	83,2	86,8	,173a	B	84,5	81,8	86,5	81,3	78,6	85,4	,287a
RAS-Block	A	84,3	81,2	85,8	86,5	79,9	89,3	,145a	A	79,4	76,4	81,5	82,7	78,8	85,5	,110a
	B	87,1	83,2	88,4	86,4	82,9	88,0	,740a	B	82,5	78,1	85,8	83,7	79,0	86,6	,492a
Revask	A	86,1	81,6	87,9	86,0	79,8	89,1	,892a	A	80,9	77,8	84,1	82,7	79,1	85,5	,520a
	B	86,4	81,3	89,0	86,8	85,0	87,7	,892a	B	83,2	80,2	86,2	84,5	78,4	87,2	,1000a
RR	A	80,5	79,2	90,6	86,0	81,1	88,3	,826a	A	82,7	78,8	86,6	81,3	78,7	84,4	,729a
	B	85,3	80,0	86,8	86,9	83,1	88,5	,256a	B	79,0	78,4	79,7	84,1	80,2	86,6	,140a
Statin	A	86,1	82,4	89,4	86,0	79,8	86,7	,297a	A	83,0	78,8	85,5	81,1	78,8	83,6	,653a
	B	86,5	82,4	87,7	86,8	85,0	89,0	,653a	B	82,5	78,4	85,9	85,4	79,7	86,5	,336a

**Subgruppenvergleich der CCR2-MFI und –Positivität. (Abkürzungen: AP=Angina pectoris, BMI>30=Adipositas, DM=Diabetes mellitus, FA=positive Familienanamnese, Gen=Geschlecht, HLP= Hyperlipidämie, KHK= koronare Herzkrankheit, Z.n. MI=Zustand nach Myokardinfarkt, Nik=Nikotinabusus, RAS-Block=Einnahme von ACE-Hemmern oder Sartanen, Revask=vormalig stattgehabte PCI, RR=arterielle Hypertonie, Statin=Einnahme von Statinen, A=vor PCI, B=nach PCI; P-25=25. Perzentil, P-75=75. Perzentil)**

## 4 Diskussion

Als zentrales Charakteristikum in der Pathogenese der Atherosklerose und Neointimahyperplasie findet sich eine überschießende, sich selbst verstärkende Inflamationsreaktion des Endothels und Subendothels. Dieser Entzündungsvorgang ist das Resultat multipler Ereignisse, die einer komplexen Dynamik folgen. Molekularbiologisch betrachtet wird dieser Prozess unterhalten durch eine Vielzahl von Zellen und Molekülen. Zentraler Bestandteil jeder Inflamationsreaktion ist die Einwanderung immunkompetenter Zellen ins Entzündungsareal. Die molekularen Mechanismen bei der Einwanderung immunkompetenter Zellen in der Atherosklerose und Neointimahyperplasie sind bislang nicht vollständig geklärt. Mit der Einführung der Stenttechnik Ende der achtziger wurden die kardiologisch-interventionellen Verfahren und die Therapie der KHK revolutioniert und verbessert. Die In-Stent-Restenose ist dabei noch heute der wesentliche limitierende Faktor für einen langfristigen Therapieerfolg. Durch die Entwicklung Medikamenten-beschichteter Stents konnte die Restenoserate gesenkt werden<sup>112</sup>, der vermehrte Einsatz von DES brachte jedoch auch die Nachteile dieser Technik zum Vorschein: die Beschichtung der DES erfolgt klassischerweise mit Immunmodulatoren (zum Beispiel Sirolimus oder Paclitaxel)<sup>113</sup>, die eine nicht-selektive, generelle Hemmung der Gefäßantwort, insbesondere natürlich der Zellproliferation, bewirken. Dadurch kommt es auch zu einer Hemmung der eigentlich gewünschten Reendothelialisierung, was die Ursache der nach DES-Implantation beobachteten erhöhten Rate an Stentthrombosen darstellen könnte<sup>112,114-116</sup>. Um dieser Komplikation Rechnung zu tragen, muss nach DES-Implantation eine duale antithrombozytäre Therapie in der Regel für 12 Monate erfolgen, deutlich länger also als nach der Implantation unbeschichteter Stents (Bare-Metal-Stents oder BMS). Die behandelten Patienten gehören typischerweise zur höheren Altersgruppe mit einer größeren Anzahl an Komorbiditäten, die längerfristige gerinnungshemmende Therapie führt zusätzlich zu einem erhöhten Blutungsrisiko. Optimal wäre daher die Entwicklung eines DES mit Hemmung der entzündlichen Gefäßantwort nach PCI mittels einer spezifisch wirkenden Substanz. Zur Entwicklung eines solchen

Pharmakons müssen die molekularimmunologischen Zusammenhänge am Gefäßbett nach Stentimplantation im Detail ergründet sein. Monozyten nehmen sowohl in der Atherogenese als auch in der Neointimabildung nach Stentimplantation eine zentrale Rolle ein. Eng verknüpft mit der monozytären Funktion bei Plaquebildung und Intimahyperplasie ist die Interaktion mit Chemokinen und deren Chemokinrezeptoren. In der vorliegenden Arbeit wurden monozytäre Oberflächen-Chemokinrezeptor-Muster untersucht, die für die Progression der überschießenden Immunreaktion in Neointimahyperplasie und Atherosklerose von Bedeutung sein könnten. Dafür wurde eine humane Studienpopulation herangezogen, alle Studienteilnehmer litten an manifester Atherosklerose.

Beim Vergleich der erhobenen patientenbezogenen Daten fiel eine positive Korrelation zwischen vorbekannter KHK und Stenting sowie zwischen vorbekannter KHK und pectanginösen Beschwerden auf. Dies ist insofern stimmig, als dass Patienten mit pectanginösen Beschwerden eher einer kardiologischen Abklärung mit konsekutiver Diagnosefindung zugeführt werden, und eine häufig angewandte Therapieoption der manifesten KHK im Stenting besteht. Es zeigte sich zudem bei Patienten mit Statineinnahme ein signifikant geringerer LDL-Cholesterinspiegel und ein signifikant höherer HDL-Cholesterinspiegel. Dies steht in Kongruenz mit dem gewollten Statineffekt. Für die Statineinnahme und den Gesamt-Cholesterinspiegel ergab sich keine signifikante Korrelation. Interessanterweise stand die Statineinnahme in Korrelation mit dem CRP-Spiegel. Patienten, die Statine einnahmen hatten einen signifikant geringeren CRP-Spiegel. Dies steht in Kongruenz zu Ergebnissen anderer Studien, wo eine Statin-Einnahme trotz Normolipidämie zur Reduktion des CRP-Spiegels und damit vermutlich zur Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse geführt hatte<sup>117</sup> – zumal ein erhöhtes CRP als positiver Vorhersagewert für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse gilt<sup>118-122</sup>.

Mit der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studie konnte erstmalig gezeigt werden, dass der Chemokinrezeptor CXCR4 auf der Oberfläche peripherer, humaner Monozyten vor und nach PCI einer spezifischen Dynamik



unterliegt: die CXCR4-Positivität und –Expression peripherer Monozyten zeigte nach PCI eine signifikante Abnahme. Die Reduktion positiver Zellen könnte für eine deutliche Rekrutierung CXCR4-exprimierender Monozyten zum inflammatorischen Fokus im Stent-Bereich innerhalb der ersten 24 Stunden post interventionem sprechen. Die Abnahme der CXCR4-Expression ist vermutlich Korrelat der CXCR4-typischen Ligand-Rezeptor-Interaktion mit Rezeptorinternalisierung<sup>63</sup> auf peripheren Monozyten nach postinterventioneller Aktivierung der Rezeptor-Ligand-Achse. Studien anderer Gruppen konnten die Bedeutung der CXCR4-CXCL12-Achse nach Gefäßverletzung bereits im Tiermodell aufzeigen. Der Fokus richtete sich hier weitestgehend auf die Rolle in der Wiederherstellung der Gefäßintegrität nach Setzen einer Läsion durch CXCL12-abhängige Rekrutierung glattmuskulärer Progenitorzellen aus dem Knochenmark ans Gefäßbett. Der CXCL12-Plasmaspiegel ist transient erhöht in ApoE-Knockout-Mäusen 24 Stunden nach mechanischer Gefäßverletzung<sup>99</sup>, ebenso findet sich eine Apoptose-getriggerte Hochregulation von CXCL12 in glatten Muskelzellen der Media, was die Einwanderung von glattmuskulären Progenitorzellen aus dem Knochenmark in die Media aktiviert und steuert<sup>123</sup>. Ein CXCR4-Knockout oder die Applikation eines Antikörpers gegen CXCL12 reduzierte die Neointimaformation in ApoE-Knockout-Mäusen nach Gefäßverletzung und deutet damit auf eine essentielle, proinflammatorische Rolle von CXCR4/CXCL12 in der Neointimageneese im atherosklerotisch geschädigten Gefäß hin<sup>99,123</sup>. Die Reduktion der Neointimaformation nach Hemmung der CXCR4-CXCL12 Interaktion wurde hier hauptsächlich auf die verminderte Rekrutierung glattmuskulärer Progenitorzellen ans Gefäßbett zurückgeführt, interessanterweise konnte in diesen Studien keine Reduktion der Makrophageninfiltration ins neointimale Gewebe durch CXCR4/CXCL12-Hemmung gezeigt werden<sup>99,123</sup>. Der ursprünglich zur HIV-Therapie entwickelte CXCR4-Antagonist AMD3465 reduzierte die Neointima-Fläche in ApoE-Knockout-Mäusen um 59%, maßgeblich durch Reduktion von glattmuskulären Anteilen, auch hier zeigte sich der Makrophagenanteil durch die CXCR4-Hemmung unverändert<sup>124</sup>. Dahingegen beschrieben Shiba et al. im Mausmodell nach Gefäßverletzung und Gabe des Wachstumsfaktors M-CSF eine deutliche

Zunahme der Neointimaformation sowie eine Zunahme peripherer CXCR4-Mac-1-positiver Zellen<sup>125</sup>. Auch die Ergebnisse einer kürzlich publizierten Studie von Hamesch et al. konnten einen Zusammenhang zwischen CXCR4 und dem monozytären System herstellen, die Behandlung von ApoE-Knockout-Mäusen nach Gefäßverletzung mit dem spezifischen CXCR4-Antagonisten POL5551 führte zu einer signifikanten Reduktion der Neointimahyperplasie, dies geschah sowohl durch eine Reduktion glattmuskulärer Anteile als auch durch eine Reduktion der Makrophagenakkumulation im entzündlichen Areal. Sirolimus reduzierte die Neointimahyperplasie im selben Ausmaß, die Hemmung durch POL5551 führte allerdings zu einer günstigeren läsionalen Zellzusammensetzung, die durch eine Reduktion des relativen Makrophagenanteils zu einem ausgewogeneren Zellgleichgewicht und damit zu stabileren Läsionen beitrug<sup>126</sup>. Parallel zu unserer Studie ergeben sich hiermit zunehmend Hinweise auf die wesentliche Bedeutung des monozytär-phagozytären Systems und der CXCL12-CXCR4 Interaktion im Zusammenhang mit der Neointimahyperplasie. Neben CXCL12 könnte hierbei auch MIF als nicht-Chemokin-Ligand von CXCR4 involviert sein. Studien am Tiermodell konnten zeigen, dass MIF zur Neointimahyperplasie beiträgt. Eine Inhibition von MIF führt zur Reduktion der Neointimaformation, der Inflammation und der Zellproliferation<sup>127</sup>, maßgeblich durch die Abnahme der monozytenabhängigen Makrophagenakkumulation und der Makrophagen-Schaumzell-Transformation<sup>128</sup>. Durch die Abnahme des relativen Makrophagenanteils verschiebt sich das Zellgleichgewicht hin zu einem erhöhten glattmuskulären und kollagenösen Anteil, hierdurch entsteht ein stabileres Plaque<sup>128</sup>, ähnlich der Wirkung des CXCR4-Hemmers POL5551. Dies stellt einen interessanten Zusammenhang dar und untermauert die These des CXCR4-abhängigen Monozytenrecruitments, das in Zusammenschau potentiell auch via MIF erfolgen könnte. Beachtet werden muss bei Ligand-Untersuchungen allerdings das promiskuitive Bindungsverhalten von MIF beziehungsweise CXCL12. Da MIF auch an CXCR2 und CXCL12 auch an CXCR7 bindet, kann bei reinen Ligand-Untersuchungen nicht direkt auf einen einzelnen Rezeptor geschlossen werden. Da unsere Ergebnisse für eine Beteiligung von CXCR4 in der

Monozytenrekrutierung nach Stentimplantation sprechen, könnte die Ergründung der hierbei beteiligten exakten Rezeptor-Ligand-Interaktion in Folgestudien ein interessantes Forschungsthema darstellen. Weitere Untersuchungen zur CXCR4-Monozyten-Interaktion könnten Grundlage sein für die Entwicklung hochspezifischer Targets zur pharmakologischen Hemmung der neointimalen Gefäßreaktion. Jedoch muss hierbei grundsätzlich bedacht werden, dass eine systemische Hemmung der CXCR4-Achse ungünstig sein könnte, die CXCR4/CXCL12-Interaktion gilt als überlebensnotwendig, entsprechend defiziente Mäuse sterben in Utero aufgrund insuffizienter Vaskularisation, Hämatopoese und Organogenese<sup>129,130</sup>. Weiterhin gilt die Bedeutung von CXCR4 in der Atherosklerose als nicht geklärt. Es bedarf hinsichtlich dessen demnach noch weiterer investigativer Bemühungen. Für eine grundlegende Rolle von CXCR4 und seinen Liganden in der Atherosklerose spricht, dass CXCL12 im atherosklerotischen Plaque in Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Makrophagen hoch exprimiert wird - nicht aber in gesunden Gefäßen<sup>96</sup>. Weiterhin wurde kürzlich ein Genlocus auf Chromosom 10q11 in der Nähe der CXCL12-Region indentifiziert, für den ein positiver Vorhersagewert zur KHK-Suszeptibilität gezeigt wurde<sup>131-133</sup>. Studien zur genaueren Rolle dieses Genlocus beschrieben einen Single-nucleotide-repeat auf dem Risikoallel (rs1746048), der mit erhöhten CXCL12-Plasmaspiegeln und einem erhöhten Risiko für KHK einhergeht<sup>95</sup>. Ob auch der CXCR4-Monozyten-Interaktion eine grundlegende Rolle in der Atherogenese zukommt, ist bisher wenig untersucht. Subramanian et al. beschrieben die Monozytenadhäsion an die arterielle Gefäßwand im ex-vivo Tiermodell als CXCR4-abhängig<sup>134</sup>, dies steht in Kongruenz mit unseren Ergebnissen und spricht für eine CXCR4-Monozyten-Interaktion in der Atherosklerose. Wie bereits erwähnt, werden die funktionellen Zusammenhänge der CXCR4-Achse in der Atherosklerose kontrovers diskutiert. Während es einerseits Hinweise für einen atheroprotektiven Effekt der CXCR4/CXCL12-Achse gibt<sup>93,135</sup>, lassen andere Studien eher an einen aggravierenden Effekt der Achse denken<sup>93-95</sup>. Eine systemische Hemmung von CXCR4 nach PCI könnte demnach die Progression atherosklerotischer Plaques begünstigen. Im Tiermodell wurde

demnach zwar ein vorteilhafter Effekt des selektiven CXCR4-Hemmers AMD3465 auf die gewünschte Reendothelialisierung nach Gefäßverletzung im Gegensatz zu Immunmodulatoren nachgewiesen<sup>124</sup>, andererseits führte jedoch eine systemische Langzeitbehandlung mit AMD3465 zur Exazerbation Diät-induzierter Atherosklerose im ApoE-Knockout-Mausmodell, vornehmlich durch Einwanderung von neutrophilen Granulozyten<sup>94</sup>. Die bereits vorhergehend beschriebenen genetischen Studien mit neu detektiertem Genlokus auf Chromosom 10q11 sprechen ebenso für eine pro-atherosklerotische Rolle<sup>95,131-133</sup>. Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass die CXCR4-Expression auf Knochenmarks-Zellen bei älteren Wildtyp-Mäusen deutlich erhöht ist im Vergleich mit jungen Wildtyp-Mäusen. Dieses Bild ergab sich ebenso für ApoE-Knockout-Mäuse, bei den jungen, weniger CXCR4-exprimierenden ApoE-Knockouts hatte noch keine Manifestation der Atherosklerose stattgefunden<sup>136,137</sup>. Diese Dynamik könnte ein Hinweis für eine CXCR4-vermittelte Aggravation der Atherosklerose sein und einen Teil zur Erklärung der Altersabhängigkeit der Atherosklerose beitragen. Den erwähnten Studien, die für eine aggravierende Rolle von CXCR4/CXCL12 in der Atherosklerose sprechen, stehen Studien anderer Gruppen gegenüber, die an einen gegenteiligen Effekt denken lassen. Zerneck et al. konnten mit einer interessanten Studie etwa einen vornehmlich protektiven Effekt der CXCR4-CXCL12-Achse in der stabilen Atherosklerose nahe legen: MicroRNA-126 (miR-126) oder miRNA-126-tragende apoptotische endotheliale Zellfragmente im Mausmodell konnten als atheroprotektiv identifizieren werden, indem sie die CXCR4-abhängige Rekrutierung von Progenitorzellen unterstützen<sup>135</sup>. MicroRNAs spielen eine essentielle Rolle bei der posttranskriptionellen Regulierung der Genexpression<sup>138</sup>. Der durch miRNA-126 vermittelte Abbau von RGS16 führt zur autoregulatorischen CXCR4-Aktivierung und zur verstärkten endothelialen CXCL12-Produktion<sup>135</sup>. Im Gegensatz zu den kontroversen Ergebnissen aktueller Studien zur CXCR4/CXCL12-Achse legen Untersuchungen des CXCR2/CXCR4-Liganden MIF eine deutlich proinflammatorische Rolle in der Atherogenese nahe. Die Hemmung der MIF-Achse mittels MIF-Knockout oder MIF-Antikörper im murinen

Atherosklerosemodell führte zu einer Verkleinerung atherosklerotischer Läsionen mit Verringerung des Makrophagenanteils<sup>61,139</sup>. In Zusammenschau ist die Rolle des MPS in Interaktion mit CXCR4 in der Atherosklerose aktuell nicht suffizient definiert, eine atheroprogessive Wirkung von CXCR4/CXCL12/ beziehungsweise CXCR4/CXCR2/MIF muss bedacht werden. Die CXCR4-Achse trägt begünstigend zur Neointimagenese bei, weswegen eine Hemmung von CXCR4 möglicherweise eine wirksame Maßnahme zur Eindämmung der Neointimahyperplasie darstellen könnte. Die Wirkung einer systemischen Achsenhemmung sollte jedoch erst evaluiert werden, wenn nach eingehender Erforschung der komplexen Zusammenhänge der CXCR4-Wirkung in der Systemerkrankung Atherosklerose eine genauere Einordnung im molekularen Zusammenspiel zulässt. Die nicht-systemische sondern lokal-selektive Achsenhemmung mittels DES könnten heute schon einen interessanten Zugang zur Restenose-Therapie darstellen. In Zusammenschau unserer Ergebnisse und der Resultate anderer Gruppen könnte durch einen CXCR4-Hemmer neben der überschießenden Einwanderung glattmuskulärer Stammzellen auch die Einwanderung von Monozyten gehemmt werden, mit konsekutiver Reduktion der Makrophagen- und Schaumzelltransformation und konsekutiver Reduktion der In-Stent-Restenoserate bei unbeeinträchtigtter Reendothelialisierung.

Neben der Bedeutung der CXCR4-MPS-Interaktion in der Neointimagenese legt diese Arbeit eine Beteiligung des MPS im Zusammenspiel mit CXCR4 bei hypoxischer Myokardschädigung infolge fortgeschrittener Atherosklerose nahe: In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Patienten mit Zustand nach Myokardinfarkt vor PCI im peripheren Blut eine signifikant höhere CXCR4-Expression auf Monozyten aufweisen als KHK-Patienten ohne stattgehabten Myokardinfarkt. Desweiteren zeigte sich bei Patienten mit Myokardischämie (Zustand nach Myokardinfarkt oder pectanginöse Beschwerden) ein signifikant größerer Verlust der CXCR4-MFI nach PCI verglichen mit Patienten ohne Ischämie-Symptomatik. Hypothetisch ausgehend von einer protektiven Rolle der CXCR4-Achse nach Ischämie könnte die basal gesteigerte CXCR4-Expression auf Monozyten bei

stattgehabtem Myokardinfarkt Ausdruck einer generellen Hochregulation der CXCR4-Expression sein im Sinne einer „Sensibilisierung“ peripherer Monozyten. Diese Hochregulation würde nach erneutem Hypoxie-Ereignis einen schnelleren Zugriff auf CXCR4-vermittelte, protektive Signalwege erlauben. Demnach wäre der in unserer Studie gezeigte signifikant höhere Rezeptorverlust nach Stenting vermutlich auf eine PCI-induzierte Aktivierung der CXCR4-Monozyten-Interaktion zurückzuführen – ein binnen kurzer Zeit gemessener Verlust der CXCR4-Expression kann dabei einerseits Korrelat der CXCR4-typischen Rezeptorinternalisierung bei Aktivierung sein, andererseits könnte das Verhalten durch eine Abwanderung der CXCR4-Expimierenden Monozyten ins Gefäßbett zu erklären sein. Eine Kombination beider Möglichkeiten wäre ebenso denkbar. Die Rolle von CXCR4 oder CXCL12 nach Myokardinfarkt konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden. Während man zunächst von einem protektiven Mechanismus ausgeht und dies auch in einigen Studien am Tiermodell gezeigt werden konnte, lassen Ergebnisse anderer Studien gegenteilige Effekte vermuten. Hu et al. behandelten in Zellkultur gehaltene Myozyten mit CXCL12, diese zeigten sich daraufhin resistent gegen Hypoxie-Schäden. Dieser protektive Effekt konnte durch Applikation des CXCR4-Antagonisten AMD3100 gehemmt werden. Die Applikation von CXCL12 im *in vivo* Mausmodell 30 Minuten vor Koronarokklusion reduzierte die Infarktgröße, auch dieser Effekt konnte durch AMD3100 gehemmt werden<sup>140</sup>. Intrakardiale CXCL12-Injektion nach Myokardinfarkt-Induktion im Mausmodell führt zu einer Reduktion der Zelltodrate, zur verbesserten Angiogenese im hypoxischen Gewebe und schlussendlich zu einer reduzierten Narbenbildung mit verbesserter kardialer Funktion<sup>141</sup>. Damas et al. beschrieben eine Abnahme der CXCL12-Plasmalevel bei Patienten mit Angina pectoris im Vergleich mit Gesunden<sup>93</sup>, so dass CXCL12 durch Abwanderung ins betroffene Areal eine regulierende Rolle bei Plaquestabilisierung und Entzündungshemmung zugesprochen wurde. Gegenteilig zu diesen Ergebnissen führte die Hemmung von CXCR4 mit AMD3100 nach Myokardinfarkt zur reduzierten Narbenbildung und zur verbesserten kardialen Funktion im Rattenmodell. Liehn et al. fanden im CXCR4<sup>+/-</sup>-Mausmodell kleinere, stabilere Myokardnarben nach

ligationsinduziertem Myokardinfarkt, eine verringerte Neutrophilenrekrutierung und eine Verschiebung hin zur vermehrten Rekrutierung der regenerativ wirkenden Monozytensubpopulation Gr1<sup>low</sup><sup>142</sup>, am ehesten der humanen nicht-klassischen Subpopulation entsprechend<sup>33</sup>. Im selben Modell fand sich jedoch keine Verbesserung der Ventrikelfunktion vier Wochen nach Myokardinfarkt, wahrscheinlich aufgrund beeinträchtigter Koronarflussverhältnisse<sup>142</sup>. Damas et al gelang 2002 der Nachweis, dass CXCR4 auf peripheren Monozyten gesunder Patienten im Vergleich zu Patienten mit Angina Pectoris basal deutlich höher exprimiert wird<sup>93</sup>. Dies widerspricht zunächst unserer These der Hochregulation von CXCR4 beim hypoxisch Geschädigten. Es zeigte sich allerdings auch, in Kongruenz mit unseren Daten, eine Tendenz hin zur höheren CXCR4-Expression bei instabiler Angina pectoris als bei stabiler Angina pectoris. Interessanterweise ging mit der reduzierten CXCR4-Expression der kardiovaskulär Erkrankten im Vergleich zur gesunden Gruppe eine erhöhte CXCR4-mRNA-Positivität einher, vor allem in der instabilen Gruppe<sup>93</sup>. Dies spricht deutlich für eine generelle Hochregulation von CXCR4 bei kardiovaskulär Erkrankten mit Ischämiesymptomatik. Die geringere Expression von CXCR4 auf der Oberfläche der Monozyten könnte Korrelation einer ständigen Aktivierung durch Rezeptorinternalisierung oder Rekrutierung der Monozyten sein. Um dies in Zusammenschau mit unseren Ergebnissen genauer zu beleuchten, wären methodisch abgestimmte Folgestudien an größeren Studienpopulationen zur Beschreibung der Rezeptordynamik äußerst interessant. Weiterhin interessant wäre eine Untersuchung zur Herkunft der CXCR4-hoch-exprimierenden Monozyten. Es gibt Hinweise, die eine extra-myeloidale Synthese einer regenerierend wirksamen Monozytenpopulation nach Myokardinfarkt zur Diskussion stellen: Leuschner et al. gelang vor kurzem erstmals der Nachweis einer IL1 $\beta$ -abhängigen, extra-myeloidalen Monozytenbildung in der Milz nach Myokardinfarkt, mit konsekutiver Rekrutierung dieser Population ans ischämisch geschädigte Gefäßbett, wo sie regenerierende Aufgaben übernahm<sup>143</sup>. Einen äußerst interessanten Beitrag zur Bedeutung dieser splenischen Monozytenpopulation liefert dabei eine Studie aus den siebziger Jahren, die eine deutlich signifikante Zunahme der Mortalität

an ischämischer Herzkrankheit bei 740 Soldaten beschrieb, die sich im zweiten Weltkrieg einer Splenektomie unterziehen hatten müssen<sup>144</sup>. Denkbar wäre, dass die splenische Monozytenpopulation eine basal höhere CXCR4-Expression aufweist, um Signalwege bei erneuter Gewebsschädigung schneller abrufen zu können. Nach dem aktuellen Stand der Forschung kann dies allerdings nur als vage These betrachtet werden. Um deren Gehalt zu ergründen, müsste eine Charakterisierung der Oberflächenrezeptorexpression der splenischen Monozytenpopulation in der akuten und chronischen Heilungsphase nach Myokardinfarkt erfolgen. Die Hypothese der Monozyten-Aktivierung nach Myokardinfarkt setzt eine Monozyten/CXCR4-Interaktion mit Hypoxie-getriggerten Faktoren voraus. Myokardhypoxie ist ein Zustand, der durch insuffiziente Durchblutung des Myokards zustande kommt und zum myokardialen Zelltod, sowie durch Induktion von Faktoren wie Hypoxia-inducible-Factor 1 (HIF-1) oder TNF $\alpha$ , zu einer Inflammationsreaktion am Myokard führt. Bei HIF-1 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der Hypoxie-vermittelt aktiviert wird<sup>145</sup>. Die chemokinabhängige Einwanderung von Monozyten gilt als Teil der posthypoxischen Inflammationsreaktion<sup>146,147</sup>. Es ist bekannt, dass Zytokine und Chemokine nach Myokardinfarkt dabei nicht nur im infarzierten Gewebe synthetisiert werden, sondern auch in nicht geschädigten Regionen des Myokards<sup>147</sup>, dadurch kommt es zur Aktivierung protektiver Mechanismen. Dazu gehört unter anderem die HIF-1-vermittelte Präkonditionierung von Myozyten, die bei erneuten hypoxischen Ereignissen zu einer vermehrten Widerstandskraft des myokardialen Gewebes beizutragen scheint<sup>146</sup>. Weitere kardioprotektive Effekte von HIF-1 werden vermittelt über die Beeinflussung metabolischer Parameter und über die Regulierung der Angiogenese<sup>146,148-150</sup>. Interessanterweise induziert HIF-1 die Synthese von CXCL12<sup>151</sup> und MIF<sup>152</sup>. Die Interaktion von HIF-1 mit der CXCR4/CXCL-12-Achse und mit Zellen zur Wiederherstellung der Gewebeintegrität scheint nach hypoxischen Ereignissen eine wichtige Rolle zu spielen<sup>153,154</sup>. Schioppa et al. beschrieben eine durch Hypoxie induzierte HIF-1 abhängige CXCR4 Hochregulation auf humanen Monozyten in der Zellkultur<sup>155</sup>. Ähnlich der für HIF-1 beschriebenen Myozyten-Präkonditionierung könnten unsere Ergebnisse



für eine Präkonditionierung des MPS im Sinne einer CXCR4-Hochregulation auf Monozyten sprechen, diese könnte durch Hypoxie-induzierte HIF-1-Aktivierung nach hypoxischen Ereignissen, zum Beispiel nach Myokardinfarkt, erfolgen. Um diese These zu untermauern, müsste die HIF-1-Wirkung auf Monozyten nach Ischämie genauer untersucht werden. Neben HIF-1 könnte MicroRNA150 (miR-150) eine weitere Rolle bei der ischämieinduzierten CXCR4-Hochregulation auf Monozyten zukommen. Im Mausmodell konnte eine Beteiligung von MicroRNA-150 in der Regulation der CXCR4-Genexpression beschrieben werden<sup>138</sup>. Myokardhypoxie induzierte die Hemmung von miR-150, dies resultierte in einer Aktivierung des Zielgenes, was konsekutiv zur CXCR4-Hochregulation auf mononukleären Zellen führte<sup>138</sup>. Dies könnte ein Korrelat der von uns gesehenen Rezeptorhochregulation nach Myokardinfarkt darstellen. Ob der Effekt der CXCR4-Hochregulation tatsächlich zur Kardioprotektion nach erneutem hypoxischen Ereignis beiträgt, bleibt eingehend zu erforschen. Die Aufgaben der CXCR4/Monozyten-Achse nach Myokardhypoxie und in der fortgeschrittenen Atherosklerose scheinen dabei einem komplexen Muster zu folgen und werden kontrovers diskutiert<sup>156</sup>. Unsere Ergebnisse liefern einen interessanten Beitrag zur aktuellen Debatte über die Bedeutung von Monozyten und CXCR4 in Atherosklerose und Myokardischämie. Eine eindeutige Einordnung und Bewertung in Bezug auf molekulare Zusammenhänge kann aufgrund der Kontroversität der aktuellen Datenlage und der Komplexität der Zusammenhänge momentan nicht gegeben werden. Zum besseren Verständnis der Zusammenhänge sind Folgeuntersuchungen einzuleiten, die durch Untersuchung möglichst spezifischer Konditionen eine eindeutigere Einordnung der Parameter erlauben lässt. Denkbar wären zum Beispiel die Validierung unserer Ergebnisse mittels einer größeren Probandengruppe, die Charakterisierung der CXCR4-exprimierenden Monozyten nach Subpopulation oder Herkunft, sowie die Untersuchung der beteiligten Liganden. Die Kenntnis der molekularen Zusammenhänge der inflammatorischen Antwort nach Myokardinfarkt könnte in Zukunft Basis sein für die Entwicklung therapeutischer Strategien zur Verbesserung der Infarktheilung und zur Eindämmung der koronaren Herzkrankheit.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine knapp signifikante Abnahme der CX3CR1-Positivität der Monozyten der Gesamtpopulation in der Einzelfärbung nach Stenting gezeigt werden. In der Doppelfärbung ergab sich kein signifikanter Unterschied der CX3CR1-Positivität, ebenso ergab sich kein signifikanter Unterschied in Bezug zur Rezeptorexpression. Die Aussagekraft des gefundenen knapp signifikanten Ergebnisses bleibt damit zweifelhaft. Um einen eindeutigeren statistischen Aussage treffen zu können und so einen klaren Einblick in die beobachteten Zusammenhänge zu erhalten, sollte in Folgestudien eine größere Studienpopulation gewählt werden. Ebenso wäre eine methodische Berücksichtigung des CD16-Rezeptors in der Doppelfärbung sinnvoll, um etwaig zu definierende Subpopulationen differenzieren zu können.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass bei Patienten, die sich bereits vormalig einer PCI unterzogen hatten, ein signifikant geringerer Anteil CX3CR1-positiver Monozyten im humanen Blut zirkuliert als bei kardiovaskulär Erkrankten ohne bisher stattgehabte PCI. Die Rolle von CX3CR1/CX3CL1 in der Neointimagenese nach Stenting ist nicht eingehend erforscht. Die CX3CR1-Polymorphismen V249I und T280M wurden als genetische Risikofaktoren für die Entwicklung von In-Stent-Restenosen identifiziert<sup>101</sup>, dies deutet auf eine grundlegende Rolle der Achse in der Neointimagenese hin. Untermuert wird dies durch die Ergebnisse einer Tiermodellstudie, in der nach CX3CR1-Knockout eine deutlich reduzierte Neointimaformation mit Abnahme der Monozyteninvasion und der Proliferation glatter Muskelzellen gezeigt werden konnte<sup>102</sup>. Schober et al. teilen die Monozytenrekrutierung nach Gefäßverletzung in zwei Phasen, akutes und chronisches Recruitment, ein<sup>62</sup>. Das chronische Recruitment gilt als CX3CR1-abhängig<sup>62</sup>. CX3CL1 wird nach Gefäßtrauma verzögert auf glatten Muskelzellen exprimiert, durch mangelnde Reendothelialisierung mit konsekutiv chronischer luminaler Exposition und Aktivierung von glatten Muskelzellen kommt es zur anhaltenden Monozyteneinwanderung via CX3CL1/CX3CR1<sup>102,157-160</sup>. Dieses Modell passt zu unseren Beobachtungen: die signifikant kleinere basale Populationsgröße CX3CR1-positiver Monozyten bei Patienten, die sich bereits vormalig einem Stenting unterzogen hatten, kann als Korrelat chronischer

Monozytenabwanderung ins Neointimagebiet post interventionem interpretiert werden. Denkbar wäre vornehmlich eine Rekrutierung nicht-klassischer CD14+CD16++CCR2lowCX3CR1high-exprimierender Monozyten. Über die genaue Rolle der zwei großen Monozyten-Subsets nach PCI ist bisher wenig bekannt, die Ergründung der Aufgaben der einzelnen Subtypen in der Neointimagineese könnte in weiteren Studien ein interessantes Forschungsthema darstellen und zur Aufklärung der molekularen Geschehnisse am neointimalen Gefäßbett beitragen. Von Vorteil wäre die Analyse humaner Proben, da die Klassifizierung der Monozyten-Subsets verglichen mit den verschiedenen Tiermodellen andere Marker nutzt. Im Tiermodell entdeckte Zusammenhänge erlauben daher nur modellhafte Anhalte auf die humanmolekularen Zusammenhänge. In der Atherosklerose wird der Monozyten-CX3CR1/CX3CL1-Interaktion eine proinflammatorische Rolle zugeschrieben, wobei die proinflammatorische Wirkung unter anderem durch die CX3CR1/CX3CL1-vermittelte Adhäsion von Monozyten ans atherosklerotische Plaque vermittelt wird<sup>84,85,92,100</sup>. Interessant wäre demnach die Wirkung einer selektiven CX3CR1-Antagonisierung zur Restenose-therapie und Atheroskleroseprävention zu ergründen, zum Beispiel mittels des kürzlich von Dorgham et al. entwickelten CX3CL1-Analogons F1 zur kompetitiven Hemmung der CX3CR1-Wirkung<sup>161</sup>. Zhou et al. präsentierten mit der Entwicklung einer Vakzine gegen CX3CR1 einen interessanten Zugang zur systemischen CX3CR1-Antagonisierung im Tiermodell, der die Monozyteneinwanderung in atherosklerotische Plaques signifikant verringerte<sup>162</sup>. Begründet durch die Bedeutung von CX3CR1 für immunologische Prozesse sind bei systemischer Hemmung auch Nebenwirkungen an Organen zu erwarten, deren inflammatorische Prozesse positiv von CX3CR1 beeinflusst werden. Ein Beispiel hierfür findet sich etwa beim myokardialen Reparaturprozess nach Herzinfarkt, wo nicht-klassischen Monozyten eine protektive Rolle zugeschrieben wird. Die CX3CR1<sup>high</sup> exprimierende, nicht-klassische Monozytenunterart patrouilliert CX3CR1-vermittelt auf Myokardzellen und wandert in der späten (fünf oder mehr Tage) Heilungsphase nach Myokardinfarkt CX3CR1-vermittelt ins betroffene Areal ein,

wo sie heilende Aufgaben zu übernehmen scheint durch Angiogenese und Kollagenbereitstellung<sup>48,163,164</sup>. Zusammenfassend könnte durch Reduktion der CX3CR1-abhängigen Monozyteneinwanderung eine wirkungsvolle, spezifische Hemmung der chronischen Neointimahyperplasie mit konsekutiver Reduktion der In-Stent-Restenoserate und der Stent-Thromboserate erreicht werden. Auch die Atherosklerose der Koronararterien, Grundlage jeder PCI-Indikation, ließe sich durch eine Hemmung von CX3CR1 wirksam bekämpfen. Jedoch sollte wegen der vielfältigen organübergreifenden und teils nur rudimentär verstandenen Mechanismen der CX3CR1-MPS-Interaktion, wie beispielsweise bei der Myokardheilung nach Infarkt, eine lokalselektive Hemmung der CX3CR1-Wirkung direkt am Gefäß mittels DES durchgeführt werden.

Unsere Untersuchungen zeigten keine signifikanten Ergebnisse bezüglich der CCR2-Expression und -Positivität auf humanen Monozyten vor und nach Stenting. Im Vergleich der Subgruppen überwiegen bis auf einzelne, knapp signifikante Unterschiede der CCR2-Expression und –Positivität die nicht-signifikanten Ergebnisse. Von allen knapp signifikanten Ergebnissen ist am interessantesten, dass bei adipösen Patienten eine signifikant geringere CCR2-Expression in der Einzelfärbung vor PCI im Vergleich zu nicht-adipösen Patienten gefunden wurde. In der Doppelfärbung ergab sich kein signifikanter Unterschied der CCR2-Expression nach PCI, ebenso ergab sich kein signifikanter Unterschied in Bezug zur Rezeptorpositivität. Damit bleibt die Aussagekraft des gefundenen knapp signifikanten Ergebnisses unklar. Um einen eindeutige Einordnung treffen zu können und die beobachteten Expressionsmuster besser interpretieren zu können, sollte zunächst das gefundene Ergebnis in Folgestudien mit einer größeren Studienpopulation validiert werden. Weiterhin wäre ein Miteinbeziehen des CD16-Rezeptors in der Doppelfärbung sinnvoll, um die klassische von der nicht-klassischen Subpopulation differenzieren zu können, da diese sich maßgeblich in ihrer CCR2-Expression unterscheiden. Der Chemokinrezeptor CCR2 spielt eine grundlegende Rolle in der Neointimagenese, der Atherosklerose sowie im myokardialen Reparaturprozess bei KHK und nach Myokardinfarkt. So konnte in Studien anderer Gruppen zum Beispiel durch Hemmung der CCR2/CCL2-

Achse nach Gefäßverletzung eine signifikante Reduktion der neointimalen Proliferation herbeigeführt werden<sup>165-169</sup>, weswegen von einem proinflammatorischen Effekt ausgegangen wird. Ursächlich war hierbei unter anderem die Reduktion der Monozytenrekrutierung mit konsekutiv reduzierter Makrophageninfiltration<sup>166,168</sup>. In der Neointimagenese ist für CCR2 vornehmlich eine Rolle in der Akutphase innerhalb 24 Stunden nach Gefäßverletzung beschrieben. CCL2 wird hierfür auf Thrombozyten hoch exprimiert, konsekutiv kommt es zum Arrest und zur Transmigration von CCR2-exprimierenden, damit vornehmlich der klassischen Unterart zuzuordnenden, Monozyten<sup>62</sup>. Auch in der Atherosklerose scheint CCR2/CCL2 im Zusammenspiel mit dem MPS eine proinflammatorische Rolle einzunehmen, durch Hemmung von CCR2 oder CCL2 kann eine signifikante Reduktion der Inflammationsreaktion erzielt werden<sup>83,86,167,170</sup>. Diese proinflammatorische Rolle scheint vornehmlich in frühen Stadien der Atherosklerose von Bedeutung zu sein<sup>171</sup>. Auch im Heilungsprozess nach Myokardinfarkt spielen CCR2-exprimierende, sogenannte klassische Monozyten eine Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass sie bereits in der frühen Heilungsphase, also ab dem ersten Tag, in das betroffene Areal einwandern, wo sie proteolytische, phagozytotische und damit inflammatorische Aufgaben übernehmen, während nicht-klassische, CCR2-low-exprimierende Monozyten erst in den späteren Heilungsstadien (ab Tag fünf) rekrutiert werden<sup>48</sup>. Die Anwendung eines kompetitiven, selektiven CCL2-Antagonisten im murinen Modell reduzierte den Schaden nach Myokardischämie und spricht damit für eine aggravierende Rolle von CCL2/CCR2 beim myokardialen Heilungsprozess<sup>146</sup>. Dem entspricht die von Tsujioka et al beschriebene negative Korrelation zwischen der Anzahl klassischer Monozyten und der Myokardheilung beziehungsweise der linksventrikulären Funktion nach Myokardinfarkt<sup>172</sup>. Die aktuelle Studienlage spricht für eine bedeutende proinflammatorische Rolle der CCR2-MPS-Interaktion in Neointimagenese und Atherosklerose, eine Hemmung dieser Interaktion wäre zur Reduktion beider Entzündungsreaktionen dementsprechend geeignet. Dies erklärt die momentanen Bestrebungen zur Entwicklung geeigneter Möglichkeiten zur Hemmung der Achsenwirkung. Dass

in unserer Studie keine deutlich signifikanten Ergebnisse bezüglich der humanen CCR2-MPS-Interaktion erzielt werden konnten, könnte der relativ kleinen Studienpopulation zugeschrieben werden. Aufgrund der bedeutenden Rolle von CCR2 sollte der Rezeptor in Folgestudien weiter im humanen Modell untersucht werden. Um signifikante Aussagen treffen zu können, sollte dabei, wenn methodisch möglich, eine größere Population einbezogen werden.

In Zusammenschau liefern die Ergebnisse unserer Studie neue Erkenntnisse über die molekularen Zusammenhänge in der Atherosklerose, Neointimagenese und Myokardischämie. Die erstmalig beschriebene Involvierung von CXCR4 im Monozytenrecruitment nach Stenting und die Beteiligung von CX3CR1 im chronischen Monozytenrecruitment in der Neointimabildung liefern einen interessanten Anhaltspunkt für die Entwicklung neuer, selektiver Antagonisten im Kampf gegen die In-Stent-Restenose. Die vermutlich Hypoxie-bedingte Präkonditionierung von Monozyten via CXCR4-Hochregulation nach Myokardinfarkt liefert einen Einblick in das komplexe Geschehen der Infarktheilung und Hypoxiekompensation. Ausgehend von unseren Ergebnissen und den Ergebnissen anderer Gruppen scheint CXCR4 eine protektive Rolle im hypoxischen Geschehen einzunehmen. Nach Validierung dieser These mittels Folgestudien könnte auch hier ein Angriffspunkt für zukünftige Therapiestrategien gefunden werden, um hypoxisch bedingte Schäden zu reduzieren und die Infarktheilung dadurch wesentlich zu verbessern.

## 5 Zusammenfassung

Die Koronare Herzkrankheit (KHK) zählt zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland und weltweit. Die Atherosklerose der Herzkranzgefäße gilt als pathophysiologisches Korrelat der KHK. Die manifeste KHK geht mit Myokardhypoxie einher, persistierende Myokardhypoxie resultiert im Myokardinfarkt. Atherosklerose ist ein multifaktorieller, sich selbst verstärkender Inflamationsprozess, an dem multiple Zellen und Moleküle beteiligt sind. Hierzu zählen zum Beispiel das monozytär-phagozytäre System (MPS) und Chemokine sowie Chemokinrezeptoren. Auch im Regenerationsprozess nach Myokardinfarkt spielt die MPS-Chemokinrezeptor-Interaktion eine bedeutsame Rolle. Die perkutane Koronarintervention mit Stentimplantation (PCI) hat sich als geeignete Behandlungsmöglichkeit der manifesten KHK etabliert. Häufigste Komplikationsfolge der Implantation von Bare-Metal-Stents stellt die In-Stent-Restenose aufgrund einer überschießenden Inflamationsreaktion dar. Konsekutiv entwickelte Drug-Eluting-Stents sondern Immunmodulatoren zu Eindämmung der Inflamationsreaktion ab. Dadurch kommt es auch zu Eindämmung der gewollten Reendothelialisierung des Stents mit Zunahme gefürchteter Stent-Thrombosen. Ideal wäre demnach eine selektivere Hemmung der Inflamationsreaktion, die die gewünschte Reendothelialisierung nicht beeinträchtigt. Hierzu müssen die molekularbiologischen Zusammenhänge am Gefäßbett nach Stenting beleuchtet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsverhalten der Chemokinrezeptoren CXCR4, CX3CR1 und CCR2 auf Monozyten vor und nach PCI im humanen Modell untersucht, alle untersuchten Probanden litten an Atherosklerose, circa die Hälfte hatte bereits vormalig einen Myokardinfarkt erlitten. 24 Stunden nach Stenting zeigte sich eine signifikant geringere CXCR4-Expression und Positivität auf Monozyten der Gesamtpopulation. Dies ist vermutlich Korrelat einer Achsenaktivierung mittels CXCR4-typischer Rezeptorinternalisierung und mittels Abwanderung CXCR4-positiver Monozyten ins Gefäßbett und spricht für eine grundlegende Rolle der CXCR4-MPS-Interaktion nach PCI. Patienten, die bereits einen Myokardinfarkt erlitten hatten, konnten eine signifikant niedrigere CXCR4-Expression auf Monozyten aufweisen als die Vergleichsgruppe.

Weiterhin zeigten Patienten mit pectanginösen Beschwerden einen signifikant höheren Rezeptorverlust an der Oberfläche der Monozyten nach Stenting. Dies deutet auf eine grundlegende Rolle der CXCR4-MPS-Interaktion bei Myokardhypoxie hin und liefert einen Einblick in das komplexe Geschehen der Infarktheilung und Hypoxiekompensation.

Hypothetisch denkbar wäre eine protektive Rolle der CXCR4-Achse nach Ischämie, mit Hypoxie-vermittelter Präkonditionierung humaner Monozyten nach stattgehabtem Myokardinfarkt und konsekutiv basal gesteigerter CXCR4-Expression, die nach erneutem Hypoxie-Ereignis einen schnelleren Zugriff auf CXCR4-vermittelte, protektive Signalwege erlauben könnte. Patienten, die sich bereits vormals einem Stenting unterzogen hatten, konnten eine signifikant niedrigere CX3CR1-Expression auf Monozyten aufweisen. Dies steht in Kongruenz mit Ergebnissen von Tierstudien, die eine grundlegende Rolle von CX3CR1 im chronischen Monozytenrecruitment nach Gefäßverletzung beschrieben hatten. Für CCR2 ergaben sich keine relevanten Ergebnisse. Die Rolle der Interaktion der Chemokinrezeptoren CXCR4, CX3CR1 und CCR2 mit humanen Monozyten in Neointimagenese, Atherosklerose und Myokardheilung nach Infarkt ist nicht eindeutig beschrieben und wird zum Teil kontrovers diskutiert. Unsere Studie liefert interessante neue Erkenntnisse bezüglich der Beteiligung der untersuchten Rezeptoren und dem MPS bei den beschriebenen pathogenetischen Prozessen. Die erstmalig beschriebene CXCR4-MPS-Interaktion nach Stenting sowie die Hinweise auf eine Beteiligung von CX3CR1 im chronischen Monozytenrecruitment der humanen Neointimagenese liefern einen interessanten Anhaltspunkt für die Entwicklung neuer, selektiver Antagonisten im Kampf gegen die In-Stent-Restenose.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Cooper, R., *et al.* Trends and disparities in coronary heart disease, stroke, and other cardiovascular diseases in the United States: findings of the national conference on cardiovascular disease prevention. *Circulation* 102, 3137-3147 (2000).
2. Arciero, T.J., *et al.* Temporal trends in the incidence of coronary disease. *Am J Med* 117, 228-233 (2004).
3. Ergin, A., Muntner, P., Sherwin, R. & He, J. Secular trends in cardiovascular disease mortality, incidence, and case fatality rates in adults in the United States. *Am J Med* 117, 219-227 (2004).
4. Levi, F., Lucchini, F., Negri, E. & La Vecchia, C. Trends in mortality from cardiovascular and cerebrovascular diseases in Europe and other areas of the world. *Heart* 88, 119-124 (2002).
5. Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland 2010. *Gesundheit Fachserie* 12 Reihe 4, 1; 7 (2011).
6. Lopez, A.D., Mathers, C.D., Ezzati, M., Jamison, D.T. & Murray, C.J. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* 367, 1747-1757 (2006).
7. Lloyd-Jones, D.M., *et al.* Framingham risk score and prediction of lifetime risk for coronary heart disease. *Am J Cardiol* 94, 20-24 (2004).
8. Statistisches Bundesamt & Forster, T. Krankheitskostenrechnung für Deutschland. in *Wirtschaft und Statistik*, Vol. 12/ 2004 1432-1440 (Statistisches Bundesamt Deutschland, Wiesbaden, 2005).
9. Garcia de Tena, J. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 353, 429-430 (2005).
10. Hansson, G.K. & Hermansson, A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol* 12, 204-212 (2011).
11. Dietz, R. & Rauch, B. [Guidelines for diagnosis and treatment of chronic coronary heart disease. Issued by the executive committee of the German Society of Cardiology--Heart Circulation Research in cooperation with the German Society for Prevention and Rehabilitation of Cardiac Diseases and the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery]. *Z Kardiol* 92, 501-521 (2003).
12. Gruntzig, A. Transluminal dilatation of coronary-artery stenosis. *Lancet* 1, 263 (1978).
13. Serruys, P.W., *et al.* A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *N Engl J Med* 331, 489-495 (1994).
14. Fischman, D.L., *et al.* A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med* 331, 496-501 (1994).
15. Meier, B., Bachmann, D. & Luscher, T. 25 years of coronary angioplasty: almost a fairy tale. *Lancet* 361, 527 (2003).
16. E., B. Herzbericht 2010. *Kardiologie in Deutschland 2010* 23, 1-258 (2010).
17. Bonzel, T., *et al.* Percutaneous coronary interventions (PCI). *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society* 97, 513-547 (2008).
18. Erdmann, E. *klinische Kardiologie*, (Springer-Verlag, Heidelberg, 2006).
19. Serruys, P.W., *et al.* Randomised comparison of implantation of heparin-coated stents with balloon angioplasty in selected patients with coronary artery disease (Benestent II). *Lancet* 352, 673-681 (1998).
20. Welt, F.G. & Rogers, C. Inflammation and restenosis in the stent era. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 1769-1776 (2002).
21. Morice, M.-C., *et al.* A Randomized Comparison of a Sirolimus-Eluting Stent with a Standard Stent for Coronary Revascularization. *New England Journal of Medicine* 346, 1773-1780 (2002).
22. Moses, J.W., *et al.* Sirolimus-Eluting Stents versus Standard Stents in Patients with Stenosis in a Native Coronary Artery. *New England Journal of Medicine* 349, 1315-1323 (2003).

23. Luscher, T.F., *et al.* Drug-eluting stent and coronary thrombosis: biological mechanisms and clinical implications. *Circulation* 115, 1051-1058 (2007).
24. Lüllmann-Rauch, R. *Histologie*, (Thieme, Stuttgart, 2009).
25. Tacke, F. & Randolph, G.J. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* 211, 609-618 (2006).
26. Whitelaw, D.M. Observations on human monocyte kinetics after pulse labeling. *Cell Tissue Kinet* 5, 311-317 (1972).
27. Murphy, K.P. *Janeway's Immunobiology*, (Garland Sciences, New York, 2008).
28. Woollard, K.J. & Geissmann, F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol* 7, 77-86 (2010).
29. Swirski, F.K., *et al.* Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325, 612-616 (2009).
30. Park, B.S., *et al.* The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458, 1191-1195 (2009).
31. Simmons, D.L., Tan, S., Tenen, D.G., Nicholson-Weller, A. & Seed, B. Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood* 73, 284-289 (1989).
32. Passlick, B., Flieger, D. & Ziegler-Heitbrock, H.W. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74, 2527-2534 (1989).
33. Gautier, E.L., Jakubzick, C. & Randolph, G.J. Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 1412-1418 (2009).
34. Yona, S. & Jung, S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol* 17, 53-59 (2010).
35. Ziegler-Heitbrock, L., *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, e74-80 (2010).
36. Gumley, T.P., McKenzie, I.F. & Sandrin, M.S. Tissue expression, structure and function of the murine Ly-6 family of molecules. *Immunol Cell Biol* 73, 277-296 (1995).
37. Geissmann, F., Jung, S. & Littman, D.R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71-82 (2003).
38. Ziegler-Heitbrock, L. The CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 81, 584-592 (2007).
39. Doyle, S.E., *et al.* Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. *J Exp Med* 199, 81-90 (2004).
40. Greaves, D.R. & Gordon, S. The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges. *J Lipid Res* 50 Suppl, S282-286 (2009).
41. van Furth, R., *et al.* The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ* 46, 845-852 (1972).
42. Goldberg, A.L. & Rock, K.L. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* 357, 375-379 (1992).
43. Stryer, L., Berg, J. & Tymoczko, J. *Biochemie*, (Elsevier, München, 2007).
44. Murphy, K. *Janeway's Immunobiology*, (Garland Sciences, New York, 2008).
45. Auffray, C., Sieweke, M.H. & Geissmann, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27, 669-692 (2009).
46. Geissmann, F., *et al.* Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol Cell Biol* 86, 398-408 (2008).
47. Schlitt, A., *et al.* CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels. *Thromb Haemost* 92, 419-424 (2004).
48. Nahrendorf, M., *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 204, 3037-3047 (2007).
49. Berg, K.E., *et al.* Elevated CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monocytes Predict Cardiovascular Events. *Circulation. Cardiovascular genetics* 5, 122-131 (2012).
50. Zernecke, A., Shagdarsuren, E. & Weber, C. Chemokines in atherosclerosis: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 1897-1908 (2008).

51. Mosig, S., *et al.* Different functions of monocyte subsets in familial hypercholesterolemia: potential function of CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> monocytes in detoxification of oxidized LDL. *Faseb J* 23, 866-874 (2009).
52. Zlotnik, A. & Yoshie, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121-127 (2000).
53. Rossi, D. & Zlotnik, A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18, 217-242 (2000).
54. Comerford, I. & McColl, S.R. Mini-review series: focus on chemokines. *Immunol Cell Biol* 89, 183-184 (2011).
55. Wilson, P.W., Castelli, W.P. & Kannel, W.B. Coronary risk prediction in adults (the Framingham Heart Study). *Am J Cardiol* 59, 91G-94G (1987).
56. Schober, A., Bernhagen, J. & Weber, C. Chemokine-like functions of MIF in atherosclerosis. *J Mol Med (Berl)* 86, 761-770 (2008).
57. Allen, S.J., Crown, S.E. & Handel, T.M. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 25, 787-820 (2007).
58. Sallusto, F. & Baggiolini, M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nat Immunol* 9, 949-952 (2008).
59. Balabanian, K., *et al.* The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 280, 35760-35766 (2005).
60. Thelen, M. & Thelen, S. CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio? *J Neuroimmunol* 198, 9-13 (2008).
61. Bernhagen, J., *et al.* MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med* 13, 587-596 (2007).
62. Schober, A. & Weber, C. Mechanisms of monocyte recruitment in vascular repair after injury. *Antioxid Redox Signal* 7, 1249-1257 (2005).
63. Amara, A., *et al.* HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1alpha-dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J Exp Med* 186, 139-146 (1997).
64. Shalhoub, J., Falck-Hansen, M.A., Davies, A.H. & Monaco, C. Innate immunity and monocyte-macrophage activation in atherosclerosis. *J Inflamm (Lond)* 8, 9 (2011).
65. Thelen, M. & Stein, J.V. How chemokines invite leukocytes to dance. *Nat Immunol* 9, 953-959 (2008).
66. Sheikine, Y. & Hansson, G.K. Chemokines and atherosclerosis. *Annals of medicine* 36, 98-118 (2004).
67. Schober, A. Chemokines in vascular dysfunction and remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 1950-1959 (2008).
68. Hansson, G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352, 1685-1695 (2005).
69. Hansson, G.K. Atherosclerosis--an immune disease: The Anitschkov Lecture 2007. *Atherosclerosis* 202, 2-10 (2009).
70. Anitschkow, N. Über die Veränderungen der Kaninchenaorta bei experimenteller Cholesterinsteatose. *Beitr Pathol Anat.* 56, 379-404 (1913).
71. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340, 115-126 (1999).
72. Davignon, J. & Ganz, P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 109, III27-32 (2004).
73. Vita, J.A., *et al.* Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 81, 491-497 (1990).
74. Weber, C. Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime. *Circ Res* 96, 612-616 (2005).
75. Gawaz, M. & Falavero, E.J. Platelets, inflammation and cardiovascular diseases. New concepts and therapeutic implications. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 36, 129-130 (2010).
76. Libby, P., Okamoto, Y., Rocha, V.Z. & Folco, E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J* 74, 213-220 (2010).
77. Boyum, A., Lovhaug, D., Tresland, L. & Nordlie, E.M. Separation of leucocytes: improved cell purity by fine adjustments of gradient medium density and osmolality. *Scand J Immunol* 34, 697-712 (1991).

78. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I. & Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7, 678-689 (2007).
79. von Hundelshausen, P., *et al.* RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation* 103, 1772-1777 (2001).
80. Zernecke, A., *et al.* Deficiency in CCR5 but not CCR1 protects against neointima formation in atherosclerosis-prone mice: involvement of IL-10. *Blood* 107, 4240-4243 (2006).
81. Schober, A., *et al.* Deposition of platelet RANTES triggering monocyte recruitment requires P-selectin and is involved in neointima formation after arterial injury. *Circulation* 106, 1523-1529 (2002).
82. Weber, C. & Noels, H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med* 17, 1410-1422 (2011).
83. Dawson, T.C., Kuziel, W.A., Osahar, T.A. & Maeda, N. Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 143, 205-211 (1999).
84. Combadiere, C., *et al.* Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation* 107, 1009-1016 (2003).
85. Lesnik, P., Haskell, C.A. & Charo, I.F. Decreased atherosclerosis in CX3CR1<sup>-/-</sup> mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J Clin Invest* 111, 333-340 (2003).
86. Boring, L., Gosling, J., Cleary, M. & Charo, I.F. Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394, 894-897 (1998).
87. Moatti, D., *et al.* Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease. *Blood* 97, 1925-1928 (2001).
88. McDermott, D.H., *et al.* Association between polymorphism in the chemokine receptor CX3CR1 and coronary vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Circ Res* 89, 401-407 (2001).
89. McDermott, D.H., *et al.* Chemokine receptor mutant CX3CR1-M280 has impaired adhesive function and correlates with protection from cardiovascular disease in humans. *J Clin Invest* 111, 1241-1250 (2003).
90. Tacke, F., *et al.* Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 117, 185-194 (2007).
91. Stolla, M., *et al.* Fractalkine is expressed in early and advanced atherosclerotic lesions and supports monocyte recruitment via CX3CR1. *PLoS One* 7, e43572 (2012).
92. Landsman, L., *et al.* CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood* 113, 963-972 (2009).
93. Damas, J.K., *et al.* Stromal cell-derived factor-1alpha in unstable angina: potential antiinflammatory and matrix-stabilizing effects. *Circulation* 106, 36-42 (2002).
94. Zernecke, A., *et al.* Protective role of CXC receptor 4/CXC ligand 12 unveils the importance of neutrophils in atherosclerosis. *Circ Res* 102, 209-217 (2008).
95. Mehta, N.N., *et al.* The novel atherosclerosis locus at 10q11 regulates plasma CXCL12 levels. *European heart journal* 32, 963-971 (2011).
96. Abi-Younes, S., *et al.* The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques. *Circ Res* 86, 131-138 (2000).
97. Zernecke, A. & Weber, C. Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 86, 192-201 (2010).
98. Schober, A. & Zernecke, A. Chemokines in vascular remodeling. *Thromb Haemost* 97, 730-737 (2007).
99. Schober, A., Knarren, S., Lietz, M., Lin, E.A. & Weber, C. Crucial role of stromal cell-derived factor-1alpha in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 108, 2491-2497 (2003).
100. Teupser, D., *et al.* Major reduction of atherosclerosis in fractalkine (CX3CL1)-deficient mice is at the brachiocephalic artery, not the aortic root. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17795-17800 (2004).
101. Niessner, A., *et al.* Fractalkine receptor polymorphisms V249I and T280M as genetic risk factors for restenosis. *Thromb Haemost* 94, 1251-1256 (2005).

102. Liu, P., *et al.* CX3CR1 deficiency confers protection from intimal hyperplasia after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 2056-2062 (2006).
103. Noble, P.B. & Cutts, J.H. Separation of blood leukocytes by Ficoll gradient. *Can Vet J* 8, 110-111 (1967).
104. Luttmann, W. in *Der Experimentator Immunologie* 55-58 (Elsevier Spektrum Akad. Verl., Heidelberg Muenchen, 2004).
105. Herzenberg, L.A., Parks, D., Sahaf, B., Perez, O. & Roederer, M. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem* 48, 1819-1827 (2002).
106. Sigma-Aldrich. T8154 Trypan Blue Solution. in *Sigma-Aldrich Datasheet* (Sigma-Aldrich, Online Database, 2011).
107. Strober, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*, Appendix 3B (2001).
108. Fridman, W.H. Fc receptors and immunoglobulin binding factors. *Faseb J* 5, 2684-2690 (1991).
109. Murphy, K.P. *Janeway's Immunobiology*, (Garland Sciences, New York 2008).
110. Darzynkiewicz, Z., *et al.* Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 13, 795-808 (1992).
111. Tas, J. & Westerneng, G. Fundamental aspects of the interaction of propidium diiodide with nuclei acids studied in a model system of polyacrylamide films. *J Histochem Cytochem* 29, 929-936 (1981).
112. Garg, S. & Serruys, P.W. Coronary stents: current status. *J Am Coll Cardiol* 56, S1-42 (2010).
113. Serruys, P.W., Kutryk, M.J. & Ong, A.T. Coronary-artery stents. *N Engl J Med* 354, 483-495 (2006).
114. Stone, G.W., *et al.* Safety and efficacy of sirolimus- and paclitaxel-eluting coronary stents. *N Engl J Med* 356, 998-1008 (2007).
115. Finn, A.V., *et al.* Pathological correlates of late drug-eluting stent thrombosis: strut coverage as a marker of endothelialization. *Circulation* 115, 2435-2441 (2007).
116. Nakazawa, G., Vorpahl, M., Finn, A.V., Narula, J. & Virmani, R. One step forward and two steps back with drug-eluting-stents: from preventing restenosis to causing late thrombosis and nouveau atherosclerosis. *JACC. Cardiovascular imaging* 2, 625-628 (2009).
117. Rosuvastatin outcomes study JUPITER closes early due to evidence of benefit. *Cardiovascular journal of Africa* 19, 117 (2008).
118. Ridker, P.M., Hennekens, C.H., Buring, J.E. & Rifai, N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 342, 836-843 (2000).
119. Morrow, D.A. & Ridker, P.M. C-reactive protein, inflammation, and coronary risk. *The Medical clinics of North America* 84, 149-161, ix (2000).
120. Koenig, W., Lowel, H., Baumert, J. & Meisinger, C. C-reactive protein modulates risk prediction based on the Framingham Score: implications for future risk assessment: results from a large cohort study in southern Germany. *Circulation* 109, 1349-1353 (2004).
121. Pai, J.K., *et al.* Inflammatory markers and the risk of coronary heart disease in men and women. *N Engl J Med* 351, 2599-2610 (2004).
122. Boekholdt, S.M., *et al.* C-reactive protein levels and coronary artery disease incidence and mortality in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk prospective population study 1993-2003. *Atherosclerosis* 187, 415-422 (2006).
123. Zernecke, A., *et al.* SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. *Circ Res* 96, 784-791 (2005).
124. Karshovska, E., Zagorac, D., Zernecke, A., Weber, C. & Schober, A. A small molecule CXCR4 antagonist inhibits neointima formation and smooth muscle progenitor cell mobilization after arterial injury. *J Thromb Haemost* 6, 1812-1815 (2008).
125. Shiba, Y., *et al.* M-CSF accelerates neointimal formation in the early phase after vascular injury in mice: the critical role of the SDF-1-CXCR4 system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 283-289 (2007).

126. Hamesch, K., *et al.* The CXCR4 antagonist POL5551 is equally effective as sirolimus in reducing neointima formation without impairing re-endothelialisation. *Thromb Haemost* 107, 356-368 (2012).
127. Chen, Z., *et al.* Evidence for a role of macrophage migration inhibitory factor in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 709-714 (2004).
128. Schober, A., *et al.* Stabilization of atherosclerotic plaques by blockade of macrophage migration inhibitory factor after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 109, 380-385 (2004).
129. Ma, Q., *et al.* Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9448-9453 (1998).
130. Tachibana, K., *et al.* The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393, 591-594 (1998).
131. Schunkert, H., *et al.* Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nature genetics* 43, 333-338 (2011).
132. Kathiresan, S., *et al.* Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nature genetics* 41, 334-341 (2009).
133. Samani, N.J., *et al.* Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med* 357, 443-453 (2007).
134. Subramanian, P., *et al.* Lysophosphatidic acid receptors LPA1 and LPA3 promote CXCL12-mediated smooth muscle progenitor cell recruitment in neointima formation. *Circ Res* 107, 96-105 (2010).
135. Zernecke, A., *et al.* Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Science signaling* 2, ra81 (2009).
136. Shao, H., *et al.* Defective CXCR4 expression in aged bone marrow cells impairs vascular regeneration. *J Cell Mol Med* 15, 2046-2056 (2011).
137. Xu, Q., *et al.* Impaired CXCR4 expression and cell engraftment of bone marrow-derived cells from aged atherogenic mice. *Atherosclerosis* 219, 92-99 (2011).
138. Tano, N., Kim, H.W. & Ashraf, M. microRNA-150 regulates mobilization and migration of bone marrow-derived mononuclear cells by targeting Cxcr4. *PLoS One* 6, e23114 (2011).
139. Pan, J.H., *et al.* Macrophage migration inhibitory factor deficiency impairs atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 109, 3149-3153 (2004).
140. Hu, X., *et al.* Stromal cell derived factor-1 alpha confers protection against myocardial ischemia/reperfusion injury: role of the cardiac stromal cell derived factor-1 alpha CXCR4 axis. *Circulation* 116, 654-663 (2007).
141. Saxena, A., *et al.* Stromal cell-derived factor-1alpha is cardioprotective after myocardial infarction. *Circulation* 117, 2224-2231 (2008).
142. Liehn, E.A., *et al.* Double-edged role of the CXCL12/CXCR4 axis in experimental myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 58, 2415-2423 (2011).
143. Leuschner, F., *et al.* Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis. *J Exp Med* 209, 123-137 (2012).
144. Robinette, C.D. & Fraumeni, J.F., Jr. Splenectomy and subsequent mortality in veterans of the 1939-45 war. *Lancet* 2, 127-129 (1977).
145. Faber, A., *et al.* The many facets of SDF-1alpha, CXCR4 agonists and antagonists on hematopoietic progenitor cells. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2007, 26065 (2007).
146. Liehn, E.A., Postea, O., Curaj, A. & Marx, N. Repair after myocardial infarction, between fantasy and reality: the role of chemokines. *J Am Coll Cardiol* 58, 2357-2362 (2011).
147. Frangogiannis, N.G. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb Haemost* 97, 738-747 (2007).
148. Tekin, D., Dursun, A.D. & Xi, L. Hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) and cardioprotection. *Acta pharmacologica Sinica* 31, 1085-1094 (2010).
149. Loor, G. & Schumacker, P.T. Role of hypoxia-inducible factor in cell survival during myocardial ischemia-reperfusion. *Cell death and differentiation* 15, 686-690 (2008).

150. Shohet, R.V. & Garcia, J.A. Keeping the engine primed: HIF factors as key regulators of cardiac metabolism and angiogenesis during ischemia. *J Mol Med (Berl)* 85, 1309-1315 (2007).
151. Loh, S.A., *et al.* SDF-1 alpha expression during wound healing in the aged is HIF dependent. *Plastic and reconstructive surgery* 123, 65S-75S (2009).
152. Fu, H., Luo, F., Yang, L., Wu, W. & Liu, X. Hypoxia stimulates the expression of macrophage migration inhibitory factor in human vascular smooth muscle cells via HIF-1alpha dependent pathway. *BMC cell biology* 11, 66 (2010).
153. Wang, X., *et al.* Hypoxia enhances CXCR4 expression favoring microglia migration via HIF-1alpha activation. *Biochem Biophys Res Commun* 371, 283-288 (2008).
154. Ceradini, D.J., *et al.* Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 10, 858-864 (2004).
155. Schioppa, T., *et al.* Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med* 198, 1391-1402 (2003).
156. Farouk, S.S., Rader, D.J., Reilly, M.P. & Mehta, N.N. CXCL12: a new player in coronary disease identified through human genetics. *Trends Cardiovasc Med* 20, 204-209 (2010).
157. Chandrasekar, B., *et al.* Fractalkine (CX3CL1) stimulated by nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-dependent inflammatory signals induces aortic smooth muscle cell proliferation through an autocrine pathway. *Biochem J* 373, 547-558 (2003).
158. Ehret, G.B., *et al.* Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature* 478, 103-109 (2011).
159. Stemerman, M.B., *et al.* Intimal healing. The pattern of reendothelialization and intimal thickening. *Am J Pathol* 87, 125-142 (1977).
160. Reidy, M.A. A reassessment of endothelial injury and arterial lesion formation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 53, 513-520 (1985).
161. Dorgham, K., *et al.* An engineered CX3CR1 antagonist endowed with anti-inflammatory activity. *J Leukoc Biol* 86, 903-911 (2009).
162. Zhou, J.J., *et al.* DEC205-DC targeted DNA vaccines to CX3CR1 and CCL2 are potent and limit macrophage migration. *Int J Clin Exp Med* 5, 24-33 (2012).
163. Nahrendorf, M., Pittet, M.J. & Swirski, F.K. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation* 121, 2437-2445 (2010).
164. Auffray, C., *et al.* Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317, 666-670 (2007).
165. Roque, M., *et al.* CCR2 deficiency decreases intimal hyperplasia after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 554-559 (2002).
166. Schober, A., *et al.* Crucial role of the CCL2/CCR2 axis in neointimal hyperplasia after arterial injury in hyperlipidemic mice involves early monocyte recruitment and CCL2 presentation on platelets. *Circ Res* 95, 1125-1133 (2004).
167. Furukawa, Y., *et al.* Anti-monocyte chemoattractant protein-1/monocyte chemotactic and activating factor antibody inhibits neointimal hyperplasia in injured rat carotid arteries. *Circ Res* 84, 306-314 (1999).
168. Horvath, C., Welt, F.G., Nedelman, M., Rao, P. & Rogers, C. Targeting CCR2 or CD18 inhibits experimental in-stent restenosis in primates: inhibitory potential depends on type of injury and leukocytes targeted. *Circ Res* 90, 488-494 (2002).
169. Usui, M., *et al.* Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy inhibits restenotic changes (neointimal hyperplasia) after balloon injury in rats and monkeys. *Faseb J* 16, 1838-1840 (2002).
170. Gu, L., *et al.* Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Molecular cell* 2, 275-281 (1998).
171. Guo, J., *et al.* Transplantation of monocyte CC-chemokine receptor 2-deficient bone marrow into ApoE3-Leiden mice inhibits atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 447-453 (2003).
172. Tsujioka, H., *et al.* Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 54, 130-138 (2009).





## Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Andreas Schäfer danke ich für die Überlassung des Themas und für seine Unterstützung, die zum Gelingen der Arbeit grundlegend beigetragen hat.

Ein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Kai Schuh für die Übernahme des Koreferats.

Mein besonderer Dank gilt Dr. med. Christine Berliner für zahllose hilfreiche Anregungen und Diskussionen, für ihr außerordentliches Engagement während der Laborphase und ihre Unterstützung bei der Niederschrift der Arbeit.

Ein großer Dank gilt dem Team des Forschungslabors, allen voran meiner Mitlaborantin und Freundin Eva Lausenmeyer, für eine unvergesslich interessante und bereichernde Zeit.

Meinen Eltern und meiner Familie danke ich für den großen Rückhalt, den sie mir immer bieten, für ihre Geduld und ihre unendliche Herzlichkeit, die mich stets trägt.

Ein großer Dank gilt Christoph, unsere Freundschaft bereichert und beflügelt mich.

Zu guter Letzt bedanke ich mich für die Unterstützung, die mir durch das Promotionsstipendium der medizinischen Fakultät der Universität Würzburg zuteil kam.