

Aus der Klinik für Kardiologie und Angiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité Campus Mitte –  
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle von inaktivem Rhomboid-Protein 2 (iRhom2) im akuten  
Myokardinfarkt

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Phillip van Dijck

aus Berlin

Datum der Promotion: 17.09.2021

# Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	4
Abbildungsverzeichnis.....	5
Abkürzungsverzeichnis.....	6
Abstrakt.....	8
1. Einleitung.....	10
1.1. Definitionen: Koronare Herzerkrankung und akutes Koronarsyndrom.....	10
1.2. Komplikationen des akuten Myokardinfarkts.....	11
1.3. Grundlagen des kardialen Remodeling.....	12
1.4. Inflammation als Ursprung des Remodelings.....	14
1.5. Monozyten-Subpopulationen im akuten Myokardinfarkt.....	18
1.6. Inaktives Rhomboid Protein 2 (iRhom2).....	20
2. Fragestellung.....	23
3. Materialien.....	24
3.1. Geräte.....	24
3.2. Chemikalien.....	25
3.3. Verbrauchsmaterialien.....	25
3.4. Kits und kommerzielle Fertigreagenzien.....	25
3.5. Durchflusszytometrie-Antikörper.....	26
3.6. TaqMan®-Sonden.....	26
3.7. Pufferlösungen.....	26
3.8. Software.....	26
4. Methodik.....	27
4.1. Studiendesign und Studienpopulation.....	27
4.2. Blutentnahme.....	28
4.3. Methoden zur Isolation von Monozyten aus Vollblut.....	28
4.4. Methoden zur Quantifizierung der Monozyten-Subpopulationen.....	31
4.5. Methoden zur Quantifizierung der Genexpression.....	32
4.6. Statistische Analyse.....	36

5.	Ergebnisse .....	37
5.1.	Basischarakteristika der Studienpopulation .....	37
5.2.	Laborparameter .....	39
5.3.	mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten .....	39
5.4.	mRNA-Expression von TACE in Monozyten .....	41
5.5.	mRNA-Expression von TNF- $\alpha$ in Monozyten .....	42
5.6.	TNF- $\alpha$ Konzentration im Serum .....	43
5.7.	Absolute Monozytenzahl.....	44
5.8.	Monozyten-Subpopulationen .....	45
5.9.	Korrelationen.....	47
6.	Diskussion.....	55
6.1.	mRNA-Expression von iRhom2, TACE und TNF- $\alpha$ .....	57
6.2.	Serum-TNF- $\alpha$ .....	59
6.3.	Monozyten-Subpopulationen .....	60
6.4.	Schlussfolgerungen .....	63
6.5.	Ausblick .....	63
6.6.	Limitationen der Studie .....	66
	Literaturverzeichnis.....	67
	Eidesstattliche Versicherung .....	83
	Lebenslauf.....	84
	Publikationsliste .....	84
	Danksagung.....	86

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Geräte .....	24
<b>Tabelle 2:</b> Chemikalien .....	25
<b>Tabelle 3:</b> Verbrauchsmaterialien .....	25
<b>Tabelle 4:</b> Kits und kommerzielle Lösungen .....	25
<b>Tabelle 5:</b> Durchflusszytometrie-Antikörper .....	26
<b>Tabelle 6:</b> TaqMan-Sonden .....	26
<b>Tabelle 7:</b> Pufferlösungen .....	26
<b>Tabelle 8:</b> Software .....	26
<b>Tabelle 9:</b> Pipettierschema RT-Mastermix (10 µl) für eine Probe nach Vorgabe des Herstellers.....	34
<b>Tabelle 10:</b> Temperaturprofil für Reverse Transkription nach Vorgabe des Kit-Herstellers..	34
<b>Tabelle 11:</b> Basischarakteristika der Studienpopulation .....	38
<b>Tabelle 12:</b> Laborparameter im Gruppenvergleich mit Signifikanzniveaus .....	39
<b>Tabelle 13:</b> Relative mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten in der AMI-, sCAD- und Kontroll-Gruppe .....	40
<b>Tabelle 14:</b> Relative mRNA-Expression von TACE und TNF- $\alpha$ in Monozyten in AMI-, sCAD- und Kontroll-Gruppe.....	41
<b>Tabelle 15:</b> Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in der AMI-, sCAD- und Kontroll-Gruppe .....	43
<b>Tabelle 16:</b> Relativer Anteil der Monozyten-Subpopulationen an der Monozytengesamtpopulation in AMI-, sCAD- und Kontroll-Gruppe.....	47
<b>Tabelle 17:</b> Korrelation – relative mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten vs. Serum-CRP und Serum-IL-6 an Tag 1 und 3 nach AMI (n = 50) .....	50
<b>Tabelle 18:</b> Korrelation – relative mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten vs. Anteil zirkulierender klassischer- und nicht-klassischer Monozyten an Tag 1 und Tag 3 nach AMI	51
<b>Tabelle 19:</b> Korrelation – relative mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten vs. Gehalt an Monozyten und Leukozyten im Blut an Tag 1 und Tag 3 nach AMI .....	52
<b>Tabelle 20:</b> Korrelation – Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration vs. Gehalt an Leukozyten, Lymphozyten, sowie Monozyten im Blut an Tag 1 und Tag 3 nach AMI .....	53
<b>Tabelle 21:</b> Korrelation – Anteil zirkulierender intermediärer Monozyten vs. Serum-CRP und Serum-IL-6 an Tag 1 und Tag 3 nach AMI .....	54

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung der Rolle von iRhom2 beim Reifungsprozess von TACE .....	22
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung des Prinzips der Ficoll-Dichte-Zentrifugation .....	29
<b>Abbildung 3:</b> Schematische Darstellung der Isolation humaner Monozyten mit dem MACS®-Monozyten-Isolations-Kit von Miltenyi Biotec .....	30
<b>Abbildung 4:</b> Exemplarische Darstellung der Gating-Strategie zur Differenzierung der Monozyten-Subpopulationen mittels Durchflusszytometrie.....	32
<b>Abbildung 5:</b> Relative mRNA-Expression iRhom2 in Monozyten .....	40
<b>Abbildung 6:</b> Relative mRNA-Expression TACE in Monozyten.....	41
<b>Abbildung 7:</b> Relative mRNA-Expression von TNF- $\alpha$ in Monozyten.....	42
<b>Abbildung 8:</b> Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration.....	43
<b>Abbildung 9:</b> Absolute Monozytenzahl im Blut.....	44
<b>Abbildung 10:</b> Klassische Monozyten .....	45
<b>Abbildung 11:</b> Intermediäre Monozyten.....	46
<b>Abbildung 12:</b> Nicht-klassische Monozyten.....	46
<b>Abbildung 13:</b> Streudiagramm – relative mRNA-Expression TACE vs. iRhom2 in zirkulierenden Monozyten aller Studienteilnehmer (in der AMI-Gruppe am Tag 1) .....	47
<b>Abbildung 14:</b> Streudiagramm – relative mRNA-Expression TACE vs. iRhom2 in zirkulierenden Monozyten an Tag 3 nach AMI .....	48
<b>Abbildung 15:</b> Streudiagramm – relative mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten vs. Serum-TNF- $\alpha$ aller Studienteilnehmer (in der AMI-Gruppe Tag 1) .....	49
<b>Abbildung 16:</b> Streudiagramm – relative mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten vs. Serum-TNF- $\alpha$ an Tag 1 nach AMI .....	49
<b>Abbildung 17:</b> Streudiagramm – relative mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten vs. Serum-TNF- $\alpha$ an Tag 3 nach AMI .....	50
<b>Abbildung 18:</b> Streudiagramm – Anteil zirkulierender intermediärer Monozyten an Tag 1 vs. relative mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten an Tag 3 nach AMI.....	51
<b>Abbildung 19:</b> Streudiagramm – relative mRNA-Expression von TACE vs. TNF- $\alpha$ in Monozyten aller Studienteilnehmer (in der AMI-Gruppe an Tag 1) .....	52

## Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
°C	Grad Celsius
Δ	Differenz
ACS	Akutes Koronarsyndrom
AMI	Akuter Myokardinfarkt
AP	Angina pectoris
AP-S	Angina pectoris Symptomatik
aPTT	Partielle Thromboplastinzeit
BMI	Body-Mass-Index
CABG	Coronary artery bypass grafting
CCS	Chronisches Koronarsyndrom
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementärer DNA-Strang
CK	Creatin-Kinase
CRP	C-reaktives Protein
Ct	Cycle Threshold
d	Tag
DES	Drug eluting stent
dl	Deziliter
DPBS	Dubeccos Phosphatgepufferte Salzlösung
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EKG	Elektrokardiogramm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESC	European Society of Cardiology
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FSC	Forward scatter
g	Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HDL	High Density Lipoprotein
IDDM	Insulinabhängiger Diabetes mellitus
IL	Interleukin
INR	International Normalized Ratio
IQA	Interquartilsabstand
iRhom2	Inaktives Rhomboid-Protein 2
kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzerkrankung
L	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
LV	Linksventrikulär
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
Ly6C	Lymphocyte antigen 6 complex, locus C1
M	Mittelwert
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
mg	Milligramm

Min.	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
MMP	Matrix-Metalloproteasen
mTNF- $\alpha$	Membrangebundener Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
Muscle-Brain	MB
n	Anzahl
ng	Nanogramm
NIDDM	Nicht-insulinabhängiger Diabetes mellitus
nm	Nanometer
NSTEMI	Nicht-ST-Hebungs-Myokardinfarkt
NT-proBNP	N-terminal pro-B-type natriuretic peptide
p	p-Wert
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PCI	Perkutane koronare Intervention
pg	Pikogramm
PTCA	Perkutane transluminale coronare Angioplastie
qPCR	Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion
r	Pearson-Produkt-Moment-Korrelation
RCT	Randomisiert kontrollierte Studie
ROS	Sauerstoffradikale
RPL19	Ribosomales Protein L19
rpm	Rounds per minute
r <sub>s</sub>	Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten
RT	Reverse Transkriptase / Reverse Transkription
RT-qPCR	Quantitative Echtzeit-Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
sCAD	Stable coronary artery disease
SD	Standardabweichung
SSC	Side scatter
STEMI	ST-Hebungs-Myokardinfarkt
sTNF- $\alpha$	Löslicher Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
TACE	TNF alpha converting Enzyme
TGL	Triglyceride
TIA	Transitorische ischämische Attacke
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
TNFR1	TNF-Rezeptor Typ 1
TNFR2	TNF-Rezeptor Typ 2
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
U	Units
vs.	Versus

## Abstrakt

**Hintergrund:** Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) wird infolge eines akuten Myokardinfarktes (AMI) vermehrt freigesetzt und spielt eine relevante Rolle bei der Entstehung von ungünstigen kardialen Remodeling im Verlauf. Die Interaktion zwischen dem vor kurzem bekannt gewordenen inaktiven Rhomboid-Protein 2 (iRhom2) und des TNF-alpha converting enzyme (TACE) ist essentiell für die Abspaltung von löslichem TNF- $\alpha$  von der Zelloberfläche myeloischer Zellen. Wir nehmen daher an, dass die mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten infolge eines AMI ansteigt.

**Methoden:** Aus dem peripheren Blut von 50 Patienten mit AMI (NSTEMI, n = 16; STEMI, n = 34) wurden innerhalb von 24 Stunden (Tag 1) nach Krankenhausvorstellung sowie 3 Tage danach Monozyten mittels des MACS-Isolations-Kits isoliert. Anschließend wurde die mRNA der Monozyten extrahiert und die mRNA-Expression von iRhom2, TACE und TNF- $\alpha$  mit quantitativer Echtzeit-Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) quantifiziert. Zudem wurde an Tag 1 und Tag 3 nach AMI die TNF- $\alpha$ -Konzentration im Serum erhoben und die Monozyten-Subpopulationen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Als Vergleichsgruppen dienten 50 Patienten mit koronarer Herzerkrankung (KHK) sowie 25 junge, gesunde Probanden.

**Ergebnisse:** Von Tag 1 zu Tag 3 nach AMI zeigte sich ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten sowie der TNF- $\alpha$ -Konzentration im Serum ( $p = 0.012$  bzw.  $p < 0.001$ ). Das mRNA-Expressionsniveau an Tag 3 nach AMI war ähnlich dem von Patienten mit KHK. Die iRhom2-Expression in Monozyten war 3 Tage nach AMI positiv mit der mRNA-Expression von TACE ( $r = 0.72, p < 0.001$ ), der Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration ( $r = 0.33, p = 0.019$ ) und dem Anteil zirkulierender intermediärer Monozyten ( $r = 0.37, p = 0.009$ ) assoziiert.

**Schlussfolgerung:** Infolge eines AMI steigt die iRhom2-mRNA-Expression parallel zu der Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration und dem Anteil intermediärer Monozyten im Blut an und erreicht jeweils Level vergleichbar mit denen von Patienten mit manifester KHK. Diese Beobachtungen suggerieren, dass iRhom2 über die Modulation der TNF- $\alpha$ -Sekretion in myeloischen Zellen an den potentiell schädlichen inflammatorischen Prozessen nach einem AMI beteiligt ist und daher als neuartiges therapeutisches Target in Frage kommt.

## Abstract

**Purpose:** Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) is released by immune cells in the course of acute myocardial infarction (AMI) and involved in impaired recovery of myocardial function and adverse cardiac remodeling. The interaction of recently discovered inactive rhomboid protein 2 (iRhom2) with the TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE) is required for proper shedding of soluble TNF- $\alpha$  from the cell surface of immune cells. We hypothesized that iRhom2 expression increases in monocytes of patients with AMI.

**Methods:** Monocytes were MACS-sorted from peripheral blood from 50 patients with AMI (NSTEMI, n = 16; STEMI n = 34) at the day of admission (day 1) and 3 days after admission as well as from 50 patients with stable coronary artery disease (CAD), and 25 young and healthy volunteers as comparison groups. mRNA was isolated from sorted monocytes and expression levels of iRhom2, TACE and TNF- $\alpha$  were evaluated by real-time quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR). TNF- $\alpha$  protein levels were assessed in the serum. Levels of circulating classical, intermediate and non-classical monocyte subsets were determined by flow cytometry.

**Results:** There was a significant increase of iRhom2 mRNA expression in monocytes and TNF- $\alpha$  levels in the serum at day 3 after AMI compared to day 1 (p=0.012 and p<0.001, respectively). Expression levels on day 3 were similar to those observed in patients with stable CAD. The increased iRhom2 expression in monocytes on day 3 was associated with increased levels of TACE mRNA expression (r=0.72, p<0.001), elevated serum TNF- $\alpha$  levels (r=0.33, p=0.019) and higher levels of circulating intermediate monocytes (r=0.37, p=0.009).

**Conclusions:** Following AMI, iRhom2 expression in monocytes increases in parallel to TNF- $\alpha$  in the serum and levels of intermediate monocytes in the blood, reaching levels found in individuals with manifest CAD. These findings suggest that iRhom2 contributes to the potentially harmful inflammatory processes during AMI via regulation of TNF- $\alpha$  and may therefore serve as a potential therapeutic target.

## 1. Einleitung

### 1.1. Definitionen: Koronare Herzerkrankung und akutes Koronarsyndrom

Als koronare Herzerkrankung (KHK) bezeichnet man die Manifestation der Arteriosklerose an den Koronararterien des Herzens. Die Arteriosklerose ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Arterien, die zur Einengung des Lumens der betroffenen Gefäße und in der Folge zu einer Minderperfusion (Ischämie) des Herzmuskels mit konsekutivem Ungleichgewicht zwischen Sauerstoff-Angebot und Sauerstoff-Bedarf führen kann.<sup>1</sup> In Abhängigkeit vom Ausprägungsgrad der Perfusionseinschränkung tritt ein solches Missverhältnis erst bei vermehrter Herzarbeit, zum Beispiel unter körperlicher Belastung, oder bereits in Ruhe auf.<sup>2</sup> Typische klinische Korrelate des myokardialen Sauerstoffmangels sind der retrosternale Brustschmerz, Angina pectoris (AP) genannt, oder auch Luftnot (Dyspnoe).

Die KHK wird in das chronische Koronarsyndrom (CCS) und das akute Koronarsyndrom (ACS) unterteilt. Der Terminus der stabilen KHK wurde mit der aktuellen *European Society of Cardiology* (ESC)-Leitlinie 2019 verlassen und durch das CCS ersetzt, um der Dynamik der Erkrankung hinsichtlich arteriosklerotischen Plaqueveränderungen im Verlauf Rechnung zu tragen und um dem Eindruck eines allzeit stabilen oder nicht veränderbaren Zustandes entgegenzuwirken.<sup>3</sup>

Klinisch wichtig ist darüber hinaus die klinische Unterscheidung zwischen der stabilen und instabilen AP. Während ein symptomatischer Sauerstoffmangel am Herzen (Myokardischämie) bei der stabilen AP reversibel und typischerweise erst durch körperliche oder auch psychische Belastung auslösbar und reproduzierbar ist, tritt die instabile AP bereits in Ruhe oder unter minimaler Belastung auf.<sup>2</sup> Bei der stabilen AP bessern sich die anfallsartigen und meist nur wenige Minuten andauernden Beschwerden infolge körperliche Ruhe oder der Applikation von Vasodilatoren wie Nitroglycerin. Bei der instabilen AP lässt sich auf diese Weise hingegen keine sichere Besserung der Symptomatik erreichen und sie stellt einen per Definition lebensbedrohlichen Zustand dar. Die instabile AP kann aus einer initial stabilen AP-Symptomatik (AP-S) hervorgehen.

Gemeinsam mit dem Myokardinfarkt und plötzlichen Herztod gehört die instabile AP zu der Gruppe der akuten Koronarsyndrome, welche den stabilen Phasen des CCS gegenüberstehen.

In Abgrenzung zum akuten Myokardinfarkt (AMI) kommt es bei der instabilen AP zu keinem irreversiblen Untergang von Kardiomyozyten (Myokardnekrose) und somit nicht zu einem Anstieg von Biomarkern (wie z.B. Troponin) einer Myokardnekrose im Blut. Ischämie-typische Elektrokardiogramm (EKG)-Veränderungen können während des Anfalls auftreten, aber auch fehlen. Die temporär ischämische Stoffwechsellage der instabilen AP kann sich entweder stabilisieren oder in einen dauerhaft ischämischen Zustand mit Myokardnekrose und somit einem AMI übergehen.

Der AMI ist definiert als eine regionale Myokardnekrose infolge eines anhaltenden Verschlusses einer oder mehrerer Koronararterien. Im klinischen Setting kann die Diagnose gestellt werden, wenn sich diagnostische Hinweise auf den Untergang von Herzmuskelgewebe in Verbund mit dem Auftreten infarkt-typischer Symptome ergeben.<sup>4</sup> Leitsymptom des AMI ist die AP-S. Eine Schmerzausstrahlung in den linken Arm, Kiefer oder Schmerzen im Epigastrium sind möglich. Zusätzlich können Luftnot und vegetative Begleitsymptome wie Kaltschweißigkeit, Übelkeit sowie Angst auftreten. Grundsätzlich gilt es jedoch zu beachten, dass ein Infarkt auch ohne typische Symptome ablaufen kann (stummer Infarkt), z.B. bei Patienten mit einem Diabetes mellitus.<sup>4</sup> Häufig stellt ein AMI die klinische Erstmanifestation einer KHK dar.<sup>5</sup>

Pathophysiologisch kommt es in der Mehrzahl der Fälle zur Ruptur eines instabilen, arteriosklerotischen Plaque mit intraluminaler Thrombus-Bildung, der die Koronararterie verlegt und den Blutfluss distal der Ruptur limitiert.<sup>6</sup> Es kommt zur Ischämie des distal des Verschlusses gelegenen Myokardareals mit möglicher Myokardnekrose.<sup>4</sup>

Es wird der ST-Hebungs-Myokardinfarkt (STEMI) von dem Nicht-ST-Hebungs-Myokardinfarkt (NSTEMI) anhand des vorliegenden elektrokardiographischen Befundes unterschieden. Während es beim STEMI zu einer Hebung der ST-Strecke oder einem neu aufgetretenen Linksschenkelblock im EKG kommt, zeigen sich beim NSTEMI keine oder unspezifische elektrokardiographische Veränderungen wie ST-Senkungen, transiente ST-Hebungen und/oder T-Wellen-Veränderungen.<sup>7</sup> Pathologisches Korrelat der ST-Strecken-Hebungen ist die transmurale Ausdehnung eines Infarktes.

## 1.2. Komplikationen des akuten Myokardinfarkts

Obwohl die Fortschritte in der akuten und langfristigen Therapie des AMI zu einer deutlichen Reduktion der Todesraten geführt haben, zählt der AMI weiterhin zu den häufigsten

Todesursachen weltweit.<sup>4,8,9</sup> In Deutschland stellt die KHK gemeinsam mit dem AMI sowohl bei Männern als auch bei Frauen die häufigste Todesursache dar.<sup>10</sup>

Patienten, die einen Herzinfarkt überleben, sind darüber hinaus einem deutlich erhöhten Risiko für das Auftreten von weiteren schwerwiegenden kardiovaskulären Komplikationen wie Herzrhythmusstörungen, erneuten Myokardinfarkten, Schlaganfällen sowie der Entwicklung einer Herzinsuffizienz ausgesetzt.<sup>11-13</sup> Dabei stellt die Herzinsuffizienz die zahlenmäßig häufigste Komplikation nach einem AMI dar und ist gleichzeitig einer der bedeutendsten Faktoren hinsichtlich der Prognose betroffener Patienten.<sup>14</sup> Etwa 30-45% der Patienten mit AMI entwickeln im Anschluss an das Ereignis eine Herzinsuffizienz, deren Ursache im sogenannten kardialen bzw. ventrikulären Remodeling liegt.<sup>11</sup> Obwohl die Mortalität der Patienten mit Herzinsuffizienz infolge eines AMI in den letzten Jahrzehnten durch gezielte therapeutische Maßnahmen wie der Perkutanen transluminalen coronaren Angioplastie (PTCA)/Stentimplantation oder dem Einsatz von Angiotensinkonversionsenzym (ACE)-Hemmern und Beta-Blockern<sup>8,15</sup> reduziert werden konnte, bleibt insbesondere die längerfristige Sterblichkeit hoch und die Herzinsuffizienz eine häufige und ernstzunehmende Komplikation mit hoher Krankheitslast.<sup>11</sup> Ein Umstand, der die Notwendigkeit neuartiger spezifischer Therapien verdeutlicht.

### 1.3. Grundlagen des kardialen Remodeling

Durch den Untergang von Kardiomyozyten und dem Verlust kontraktiler Einheiten kommt es nach dem AMI zu einem plötzlichen Anstieg der hämodynamischen Belastung des Herzens.<sup>16</sup> In der Folge werden eine Vielzahl von neurohumoralen, molekularen, zellulären und interstitiellen Prozessen in Gang gesetzt, die im Verlauf zu tiefgreifenden Veränderungen der ventrikulären Topographie und Architektur führen können.<sup>16-18</sup> Diese Umbauprozesse werden unter dem Begriff des kardialen Remodelings zusammengefasst und beschreiben die strukturelle Veränderung des Herzens hinsichtlich Größe, Masse, Form und Funktion.<sup>19,20</sup>

Erste Veränderungen am Herzen treten in der Regel bereits in den ersten Stunden<sup>21</sup> nach einem AMI auf und schreiten in den darauffolgenden Wochen und Monaten bis zu zwei Jahre nach dem Ereignis voran.<sup>22,23</sup> Betroffen sind sowohl das Infarktareal selbst als auch, mit etwas Verzögerung, die übrigen Areale des Herzens.<sup>24-26</sup> Die initialen morphologischen Folgen umfassen die Ausdünnung, Dehnung und Vernarbung des infarzierten Areals, was zu einer Dilatation der Ventrikel führen kann.<sup>27,28</sup> Dieser Prozess wird als Infarktausbreitung bezeichnet.<sup>29</sup>

Am Ende dieses Prozesses steht der Verlust der elliptischen Herzform hin zu einer zunehmend dilatierten sphärischen Form, eine reduzierte linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) sowie eine reduzierte diastolische Füllung des Herzens.<sup>30,31</sup>

Während die initiale Phase des Remodelings bis zu einem gewissen Grad eine kompensatorische Wirkung erfüllt und die Funktion des Herzens nach einem Infarkt stabilisiert bzw. aufrechterhält, kommt es bei einem progressiven Umbau zunehmend zu maladaptiven Effekten, welche die Pumpfunktion des Herzens einschränken und zu einer manifesten linksventrikulären Dysfunktion führen können.<sup>22,26,32,33</sup>

Insbesondere das Ausmaß der linksventrikulären Dilatation stellt noch vor der Reduktion der Ejektionsfraktion den wichtigsten Prädiktor hinsichtlich des langfristigen Überlebens von Patienten nach einem AMI dar.<sup>18,22,32,33</sup> Sie ist mit einer progressiven linksventrikulären Dysfunktion, malignen ventrikulären Arrhythmien sowie einer schlechteren Überlebensrate assoziiert.<sup>18,22,23,32</sup> Ein Umstand, der die kritische Bedeutung des Remodelings unterstreicht.

Auf zellulärer Ebene sind sowohl die Myozyten als auch die nicht-myozytären Zellen und Kompartimente des Herzens involviert.<sup>19</sup> Seitens der Myozyten sind die Umbauprozesse zunächst vom Verlust funktioneller Einheiten durch Nekrose und Apoptose geprägt.<sup>19</sup> Bei den verbleibenden vitalen Myozyten kommt es zu strukturellen Anpassungen wie Hypertrophie infolge gesteigerter Druckbelastung und zur Zell-Elongierung infolge einer verstärkten Volumenbelastung des Herzens.<sup>34</sup> Im nicht-myozytären Kompartiment dominieren Inflammation, Bindegewebeabbau, Kollagensynthese und Fibroblastenproliferation, was zu Narbenbildung, interstitieller Fibrose sowie einer Reorganisation und Auflockerung des interstitiellen Bindegewebes führt.<sup>20,27</sup>

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Phase des kardialen Remodelings zu einer Reihe von ungünstigen hämodynamischen und strukturellen Veränderungen am Herzen führt, die in einer kardialen Dysfunktion resultieren können. Insbesondere das Ausmaß der linksventrikulären Dilatation ist dabei von prognostischer Bedeutung.<sup>32</sup> Gemeinsam sind die Umbauprozesse unmittelbar an der Entstehung sowie Progression von Herzinsuffizienzen beteiligt und haben wesentlichen Einfluss auf die Prognose von Patienten nach einem AMI.<sup>16,20,33</sup> Der Entwicklung neuer Therapiekonzepte zur Begrenzung von ungünstigem kardialen Remodeling kommt daher auch in Zukunft eine wichtige Bedeutung zu.

## 1.4. Inflammation als Ursprung des Remodelings

Infolge der Freisetzung intrazellulärer Bestandteile aus nekrotischen und geschädigten Myozyten wird das angeborene Immunsystem aktiviert und eine intensive inflammatorische Reaktion ausgelöst.<sup>35</sup>

Es kommt zur Freisetzung von zahlreichen Zytokinen, Chemokinen und Hormonen durch Leukozyten, Endothelzellen, Kardiomyozyten und Fibroblasten sowie zur konsekutiven Migration und Akkumulation verschiedener Leukozyten im Myokard.<sup>36</sup> Das Resultat ist eine komplexe sterile Entzündung, an deren Ende die Abheilung des Gewebes Schadens sowie der Ersatz des nekrotischen Areals durch kollagenes Narbengewebe steht.<sup>37</sup>

Für einen optimalen Heilungsprozess ist eine angemessene, lokal begrenzte und rechtzeitige Initiierung sowie Auflösung des Entzündungsprozesses entscheidend.<sup>38</sup> Umgekehrt führt eine überschießende oder verlängerte Entzündungsreaktion zu einer unzureichenden Abheilung, langfristigen Gewebeschäden, erhöhten Zellverlusten, der Ausbildung von minderwertigem Narbengewebe.<sup>39-41</sup> Auch die örtliche Ausbreitung der Entzündungsprozesse auf das nicht infarzierte Myokard kann den Gewebeschaden vergrößern und sich nachteilig auf die Herzfunktion im Verlauf auswirken.<sup>41,42</sup> Zustände chronischer, exzessiver und örtlich ausgebreiteter Inflammation stellen daher eine wichtige Ursache für das Auftreten von ungünstigem und progressivem Remodeling dar.<sup>36,38</sup>

Eine Fülle an wissenschaftlicher Evidenz deutet mittlerweile darauf hin, dass proinflammatorische Zytokine eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Funktion und Struktur des Herzens spielen. Bereits 1996 postulierten Seta et al. die sogenannte „Zytokin-Hypothese“, wonach die Progression der Herzinsuffizienz zumindest in Teilen das Resultat von Zytokin-Wirkungen in der Zirkulation und am Herzen darstellt.<sup>43</sup>

Eines der Schlüssel-Zytokine ist dabei Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ). TNF- $\alpha$  ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches von nahezu allen Zellen des Körpers in Reaktion auf Stress freigesetzt werden kann.<sup>44</sup> Aufmerksam wurde man auf TNF- $\alpha$  in Zusammenhang mit der Herzinsuffizienz, als sich zeigte, dass TNF- $\alpha$  bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz in erhöhten Konzentrationen im Serum vorkommt und diese Patientenpopulation folglich Zeichen einer systemischen Inflammation aufweist.<sup>45-47</sup> Auch im Myokard konnten bei bestehender Herzinsuffizienz erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentrationen nachgewiesen werden, während es im gesunden Herzen nicht wesentlich vorliegt.<sup>48</sup>

Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass die TNF- $\alpha$ -Konzentration im Serum mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz korreliert<sup>49</sup> und gleichzeitig einen unabhängigen Prädiktor für die Mortalität und Prognose herzinsuffizienter Patienten darstellt.<sup>50-52</sup>

Tierexperimentelle Studien zur kausalen Untersuchung dieser Zusammenhänge zeigten, dass sich durch die Gabe ausreichend hoher Konzentrationen von TNF- $\alpha$  sowohl peripher als auch intrakardial die für eine Herzinsuffizienz typischen Veränderungen, einschließlich Hypertrophie, Fibrose, Ventrikeldilatation, Wandverdünnung und kontraktile Dysfunktion hervorrufen lassen.<sup>53-56</sup> Verschiedene Mausmodelle mit gezielter kardialer Überexpression von TNF- $\alpha$  resultierten ebenfalls in Abhängigkeit vom Ausmaß der Überexpression in unterschiedlich schnell auftretender und unterschiedlich schwer ausgeprägter linksventrikulärer Dysfunktion aufgrund von Remodelingprozessen.<sup>54,56,57</sup> Diese Erkenntnisse unterstützen die Gültigkeit der Zytokinhypothese und deuten darauf hin, dass TNF- $\alpha$  eine pathophysiologisch relevante Rolle beim Remodeling sowie der Entstehung von Herzinsuffizienzen zukommt.

Die Myokardischämie stellt gemeinsam mit der mechanischen Dehnung des Herzmuskelgewebes die beiden potentesten Trigger für die Freisetzung von TNF- $\alpha$  durch kardiale Gewebekompartimente dar.<sup>58</sup> Eine weitere wichtige Quelle für Zytokine stellen ins Myokard eingewanderte Leukozyten dar.<sup>59</sup>

TNF- $\alpha$  hat diverse Wirkungen auf nahezu alle Zellen, die vom Gewebeschaden infolge eines AMI betroffen und an den Reparaturmechanismen im Herzmuskel beteiligt sind.<sup>37</sup> Effekte entfaltet TNF- $\alpha$  über die Bindung und Aktivierung der beiden Zelloberflächenrezeptoren TNF-Rezeptor Typ 1 (TNFR1) und TNF-Rezeptor Typ 2 (TNFR2).<sup>44</sup> Beide Rezeptoren finden sich an der Zelloberfläche der meisten Zellen des Herzens, einschließlich der Kardiomyozyten selbst.<sup>60</sup> Während TNF- $\alpha$  im gesunden Herzen nicht wesentlich exprimiert wird<sup>58</sup>, ist es im Rahmen eines AMI eines der ersten Zytokine, die lokal freigesetzt werden und in erhöhten Konzentrationen sowohl im geschädigten als auch intakten Myokard nachweisbar sind.<sup>39,44,55,61</sup> Parallel dazu kommt es zu einem systemischen Anstieg von peripherem TNF- $\alpha$  im Serum.<sup>62-66</sup>

Während TNF- $\alpha$  genau wie die Entzündungsreaktion insgesamt in einem kurzfristigen und selbstlimitierenden Rahmen eine adaptive, sich günstig auswirkende Antwort auf den Gewebeschaden darstellt und der Heilung dient, kommt es bei einer langfristigen und übermäßigen Zytokin-Freisetzung zunehmend zu maladaptiven und dysfunktionalen Effekten auf das Herz.<sup>40</sup>

So scheinen geringe TNF- $\alpha$ -Konzentrationen protektive Effekte zu haben, während hohe Konzentrationen eher schädliche Wirkungen auf das Myokard entfalten können.<sup>67</sup>

Die Stimulation von Kardiomyozyten durch TNF- $\alpha$  hat zahlreiche Effekte auf die Funktion und Struktur der Zellen, die beim kardialen Remodeling von Bedeutung sind. Hierzu gehören erhöhte Zellverluste durch eine Steigerung der Apoptoserate<sup>68-70</sup>, Hypertrophie<sup>71</sup> sowie eine Abnahme der Kontraktilität von Kardiomyozyten<sup>72,73</sup>.

Neben den Myozyten wird auch die extrazelluläre Matrix (ECM) des Herzens durch TNF- $\alpha$  beeinflusst. TNF- $\alpha$  aktiviert Kollagen-abbauende Matrix-Metalloproteasen (MMP) einerseits und hemmt die Kollagensynthese andererseits.<sup>74</sup> Dies führt zu einer Auflockerung des kollagenen Bindegewebes, welches die Myozyten umgibt und zusammenhält, und in der Folge Veränderungen in der Architektur des Herzens verursachen kann.<sup>75</sup>

Verschiedene Studien an Mausmodellen, die kardiales TNF- $\alpha$  überexprimierten, führten zu progressiver linksventrikulärer Dilatation und ergaben, dass die vermehrte MMP-Aktivierung durch TNF- $\alpha$  und der daraus resultierende Kollagen-Abbau in Teilen dafür verantwortlich war.<sup>53,54,57,76</sup> Hierzu passen auch die Erkenntnisse von Ono et al., die im Tiermodell (Ratten) feststellten, dass die Konzentration von TNF- $\alpha$  in der Ventrikelwand nach AMI mit dem enddiastolischen linksventrikulären Durchmesser und somit dem Ausmaß der Kammerdilatation korrelierte.<sup>61</sup> Ein Mausmodell ohne TNF- $\alpha$ -Produktion führte hingegen zu einer geringeren Expression von MMPs im Vergleich zum Wildtyp und entwickelten eine signifikant geringere linksventrikuläre Dilatation infolge eines AMI.<sup>77</sup>

Neben Konzentration und Wirkdauer von TNF- $\alpha$ , spielen auch die Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 eine wichtige Rolle dabei, ob das Zytokin eher schädliche oder protektive Wirkungen auf das Myokard entfaltet. So konnte man im Mausmodell zeigen, dass TNF- $\alpha$  in Abhängigkeit vom gebundenen TNF- $\alpha$ -Rezeptor zu entgegengesetzten Effekten hinsichtlich Inflammation, Remodeling und ventrikulärer Dysfunktion nach einem AMI führen kann. Während die Stimulation von TNFR1 durch TNF- $\alpha$  all diese Prozesse verschlechterte, zeigten Mäuse mit ausschließlicher TNFR2-Expression und Stimulation einen signifikant günstigeren Verlauf hinsichtlich des kardialen Remodelings.<sup>78-80</sup> Ungünstiges, linksventrikuläres Remodeling durch TNF- $\alpha$  scheint daher am ehesten über die Bindung an TNFR1 vermittelt zu werden.

Zusammengenommen verdeutlichen diese Erkenntnisse, dass TNF- $\alpha$  nach einem AMI zu Ventrikeldilatation, Ausdünnung der Infarkt Narbe sowie Fibrosierung der Ventrikel beiträgt.<sup>55,76,81</sup> Die prä- oder postischämische, pharmakologische oder genetische Inhibition von TNF- $\alpha$  in diversen Tiermodellen des AMI oder der Herzinsuffizienz führte umgekehrt zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße<sup>82-87</sup>, weniger Nekrose<sup>88</sup>, verbesserter kardialer Funktion<sup>87,89</sup>, verbesserten linksventrikulären Drücken<sup>89</sup> sowie Überleben<sup>90</sup>.

Es ist darüber hinaus beschrieben, dass erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentrationen im Serum kardiales Remodeling unabhängig von hämodynamischen Veränderungen infolge eines AMI bewirken können und daher pathophysiologisch relevant sind. So konnte in einem Herztransplantationsmodell der Ratte gezeigt werden, dass ein zusätzlich ins Abdomen transplantiertes und an den Koronararterien ligiertes Herz morphologische und funktionelle Auswirkungen auf das räumlich von ihm entfernte thorakale Herz hatte; das vom Infarkt nicht direkt betroffene thorakale Herz zeigte ebenfalls typische Zeichen des kardialen Remodelings. Diese Veränderungen am Herzen gingen mit einem signifikanten Anstieg von TNF- $\alpha$  sowohl im Serum als auch im Gewebe des eigentlich gesunden Herzens einher. Die negativen Effekte von TNF- $\alpha$  auf das thorakale Herz konnten durch die Gabe eines TNF- $\alpha$ -Antagonisten aufgehoben werden.<sup>91</sup>

Zusammenfassend lässt sich ableiten, dass eine anhaltende und/oder exzessive TNF- $\alpha$ -Freisetzung infolge eines AMI im Rahmen kardialer Inflammation sowohl durch die Beeinflussung der Myozyten selbst als auch durch seine Effekte auf die restlichen Kompartimente des Herzens eine relevante Rolle bei der Entstehung und Progression von linksventrikulären Remodeling einnimmt. Aufgrund der tragenden Rolle kardialer Inflammation nach AMI könnte die therapeutische Beeinflussung ausgewählter inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  Möglichkeiten bieten, kardiale Reparaturprozesse zu optimieren und das Auftreten von ungünstigem Remodeling sowie die Entstehung einer Herzinsuffizienz zu verhindern.

Dass eine therapeutische Beeinflussung des kardialen Remodelings einen positiven Effekt auf die langfristige Prognose eines Patienten nach AMI haben kann, zeigt bereits heute der Einsatz von ACE-Hemmern sowie einigen Beta-Blockern, welche nachweislich die pathologischen Umbauprozesse positiv beeinflussen und sogar rückgängig machen können.<sup>92-100</sup>

## 1.5. Monozyten-Subpopulationen im akuten Myokardinfarkt

Monozyten stellen einen phänotypisch und funktional heterogenen Zelltyp dar, der als Teil des angeborenen Immunsystems wichtige Schutzfunktionen gegenüber Pathogenen sowie bei der Regulation von Immunantworten einnimmt. Beim Menschen werden drei Subpopulationen anhand der Expression der zellulären Oberflächenproteine *Cluster of differentiation* (CD)14 und CD16 unterschieden.

Eine seit 2010 bestehende Nomenklatur unterteilt Monozyten dementsprechend in klassische (CD14<sup>++</sup>, CD16<sup>-</sup>), intermediäre (CD14<sup>++</sup>, CD16<sup>+</sup>) und nicht-klassische (CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>++</sup>) Monozyten.<sup>101</sup>

Während die klassischen Monozyten mit einem Anteil von 80-90% die größte Gruppe der Monozyten im Blut darstellen, liegt der Anteil der CD16-positiven Monozyten gemeinsam bei etwa 10-20%.<sup>101,102</sup>

Im Gegensatz zum Menschen werden im Tiermodell der Maus lediglich zwei Subpopulationen anhand der Expression des Markers *lymphocyte antigen 6 complex, locus C1* (Ly6C) unterschieden: Ly6C-high- oder Ly6C-low-Monozyten.<sup>103,104</sup> Vorausgegangene Untersuchungen zu Abstammung, Transkriptom und Genexpression der beiden Monozyten-Subpopulationen erlauben die Annahme, dass die Ly6C-low-Monozyten der Maus den nicht-klassischen Monozyten des Menschen ähneln, während die Ly6C-high-Subpopulation am ehesten mit den klassischen und intermediären Monozyten vergleichbar sind.<sup>101-105</sup>

Aus funktioneller Sicht gelten die Ly6C-high-Monozyten der Maus gemeinhin als pro-inflammatorische Subpopulation. Ly6C-high-Monozyten infiltrieren früh entzündete Gewebe, wo sie große Mengen pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  freisetzen und zum Gewebeabbau beitragen.<sup>106,107</sup> Ly6C-low-Monozyten haben intravasal hingegen eher eine patrouillierende Funktion und bilden vornehmlich anti-inflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-10. Im Gewebe sind sie insbesondere an der Abheilung von Gewebeschäden beteiligt.<sup>106,107</sup>

Beim Menschen ist die funktionale Einteilung entsprechend ihres inflammatorischen Potentials bislang weniger eindeutig definiert. Klassische Monozyten haben insbesondere eine phagozytische Funktion, bilden ROS und setzen in Reaktion auf eine Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) IL-10 frei.<sup>102,107-109</sup> Intermediäre Monozyten gelten als Subpopulation mit hohem inflammatorischen Potential, da sie nach LPS-Stimulation die größten Mengen pro-

inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sezernieren.<sup>108,110,111</sup> Im Gegensatz dazu setzen nicht-klassische Monozyten TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  vor allem nach Kontakt mit Viren sowie RNA- und DNA-Fragmenten frei.<sup>111</sup>

Im Rahmen eines AMI steigt die Anzahl der Monozyten im Blut signifikant an und erreicht nach etwa 2 bis 3 Tagen ein Maximum.<sup>112,113</sup> Monozyten sind neben den Neutrophilen die ersten Immunzellen, die das infarzierte Myokard infiltrieren<sup>114,115</sup> und repräsentieren während der ersten zwei Wochen den dominierenden Zelltyp.<sup>116,117</sup> Im Myokard differenzieren die Monozyten zu gewebständigen Makrophagen und sind an wichtigen Prozessen wie Phagozytose, Angiogenese und ECM-Degradierung beteiligt.<sup>101,118</sup>

Die Zellzahlen der verschiedenen Monozyten-Subpopulationen scheinen nach einem AMI bestimmten Dynamiken zu folgen. Eine erste Studie zu diesem Thema stellte eine zweiphasige Rekrutierung mit einem frühen Anstieg der absoluten Anzahl von klassischen Monozyten im Blut und einem Gipfel dieser Zunahme am 3. Tag ( $\pm 0,8$  d) nach dem Ereignis fest.<sup>119</sup> Hingegen war die Anzahl an CD16-positiven Monozyten zum Zeitpunkt des AMI noch gering und stieg erst im Verlauf kontinuierlich bis Tag 5 ( $\pm 2,9$  d) an; danach blieben diese bis Tag 12 auf stabilem Niveau erhöht. In dieser Studie wurde innerhalb der CD16-positiven Monozyten nicht zwischen intermediären und nicht-klassischen Monozyten unterschieden. In einer nachfolgenden Studie haben Tapp et al. diese Unterscheidung vorgenommen.<sup>120</sup> Hier erreichte die Anzahl der klassischen und intermediären Monozyten im Blut bereits innerhalb der ersten 24 Stunden einen Gipfel und behielt diesen bis zum etwa dritten Tag nach dem Ereignis bei, bevor die Anzahl der intermediären Monozyten bis Tag 7 wieder abnahm. Dabei war der Anstieg der intermediären Monozyten besonders prominent. Während die Zahl zirkulierender intermediärer und klassischer Monozyten nach AMI anstieg, blieb die Anzahl der nicht-klassischen Monozyten weitestgehend unverändert.<sup>120</sup> Die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Studien zeigen, dass die genaue Dynamik und Rolle der einzelnen Monozyten-Subpopulationen beim AMI noch nicht umfassend erforscht ist.

In der Maus lässt sich eine biphasische Rekrutierung der Monozyten-Subpopulationen infolge eines experimentell induzierten AMI nachweisen: In der ersten Phase wandern vornehmlich inflammatorische Ly6C-high-Monozyten ins Myokard ein und differenzieren zu inflammatorischen M1-Makrophagen. Die Einwanderung von Ly6C-high-Monozyten erreicht am etwa 3. Tag nach AMI einen Gipfel. Diese erste Phase ist geprägt von Proteolyse, Phagozytose sowie der Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IL-1 und daher inflammatorischer Natur.

In der darauffolgenden zweiten Phase dominieren ab Tag 4 Ly6C-low-Monozyten die Prozesse, während die Inflammation im Myokard zunehmend abklingt. Die Anzahl der Ly6C-low-Monozyten erreicht am etwa 7. Tag nach AMI einen Höhepunkt. Im Gewebe differenzieren sie zu anti-inflammatorischen M2-Makrophagen. Diese zweite Phase hat funktionell einen eher reparativen, anti-inflammatorischen Charakter. Eine ähnliche Kinetik der Monozyten-Subpopulationen findet sich gleichzeitig im peripheren Blut wieder.<sup>117</sup>

Die koordinierte Rekrutierung von Monozyten in zwei Phasen ist für einen zügigen Heilungsprozess und die Ausbildung einer stabilen Infarkt Narbe von großer Bedeutung.<sup>114</sup> Tierstudien, in denen das Myokard infiltrierende Makrophagen entfernt wurden, zeigten signifikant schlechtere Heilungstendenzen und klinische Outcomes.<sup>121,122</sup> Hingegen kann eine gesteigerte oder andauernde Präsenz von inflammatorischen Monozyten auch schädigende Wirkungen auf das Herz entfalten und den Heilungsprozess durch dysregulierte Inflammation, Gewebeerstörung und Fibrose stören.<sup>123</sup> Insbesondere eine verlängerte inflammatorische sowie eine verkürzte reparative zweite Phase scheinen einen maladaptiven Prozess darzustellen und können daher für das Auftreten von Remodeling prädisponierend sein.<sup>123,124</sup> In mehreren Mausmodellen konnte die Reduktion der Einwanderung von Ly6C-high-Monozyten sowohl ins ischämische als auch nicht-ischämische Myokard Parameter des linksventrikulären Remodeling nachweislich reduzieren.<sup>125-129</sup> Infolge der Abwesenheit inflammatorischer Monozyten war die Aktivität von MMPs sowie die Expression von TNF- $\alpha$  im Infarktgebiet signifikant geringer<sup>126,129</sup>, was das reduzierte Remodeling in Teilen pathophysiologisch erklären könnte.

Obwohl Monozyten und Makrophagen für die Abheilung eines Infarkts unabdingbar sind, verdeutlichen diese Ergebnisse, dass insbesondere die inflammatorischen Monozyten zu dysregulierter Inflammation und einer beeinträchtigten Infarktheilung beitragen können. Es könnte daher therapeutisch sinnvoll sein, die Akkumulation inflammatorischer Monozyten und Zytokine im Myokard zu limitieren, um ungünstiges kardiales Remodeling nach einem AMI abzuschwächen.

## 1.6. Inaktives Rhomboid Protein 2 (iRhom2)

Vor der Freisetzung von löslichem TNF- $\alpha$  (sTNF- $\alpha$ ) wird das Zytokin zunächst als ein transmembranes Protein (mTNF- $\alpha$ ) an der Zelloberfläche exprimiert. Für die Abspaltung seiner Ektodomäne ist die Metalloprotease *TNF-alpha converting Enzyme* (TACE, ADAM17)

erforderlich.<sup>130,131</sup> Das dabei entstehende sTNF- $\alpha$  ist primär für die vielen biologischen Effekte des Zytokins verantwortlich, indem es seine Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 bindet.<sup>132</sup>

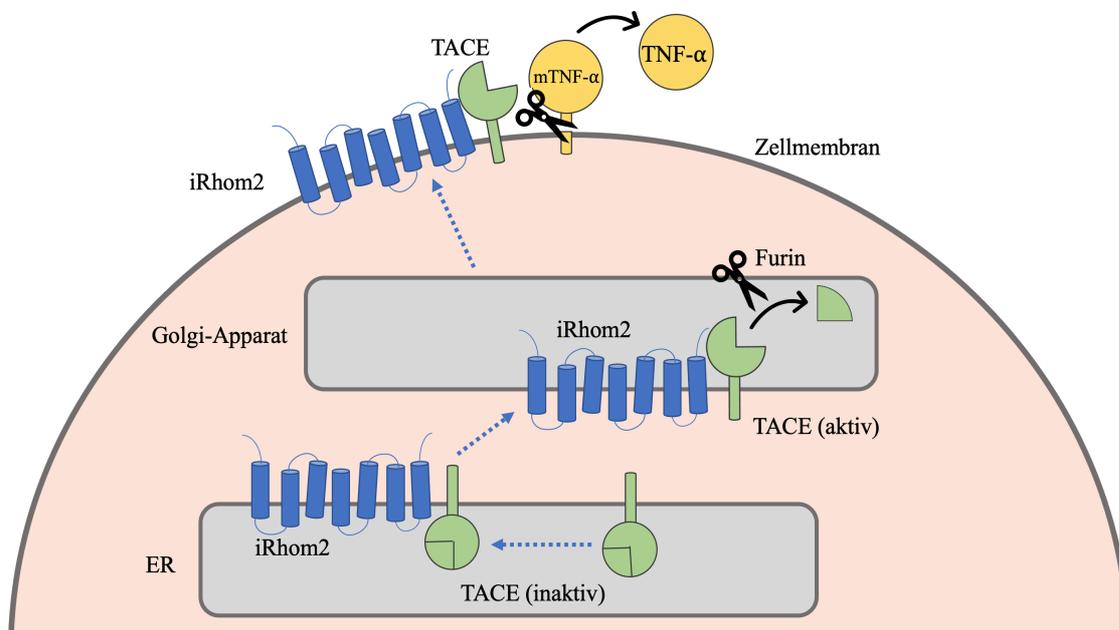
TACE wird im endoplasmatischen Retikulum (ER) als inaktives Proenzym synthetisiert. Damit TACE in seine biologisch aktive Form überführt wird, muss es in den Golgi-Apparat transportiert werden, wo seine Pro-Domäne durch die *Furin-Type-Pro-Protein-Convertase* (Furin) abgespalten wird.<sup>133</sup> Das aktivierte TACE wird dann weiter zur Zelloberfläche transferiert, wo es seine Substrate wie TNF- $\alpha$  durch Abspaltung der Ektodomäne freisetzt.<sup>134</sup>

Mittlerweile ist bekannt, dass die erst vor einigen Jahren erstmals beschriebene Pseudoprotease inaktives Rhomboid Protein 2 (iRhom2), ein katalytisch inaktives Mitglied aus der Familie der Rhomboid-Proteasen, eine entscheidende Rolle bei diesem Prozess spielt. iRhom2 ist hauptsächlich im ER sowie im Golgi-Apparat lokalisiert.<sup>134,135</sup> Im ER bindet iRhom2 inaktives TACE und ist für den Transfer in den Golgi-Apparat mitverantwortlich.<sup>130,136</sup> iRhom2 wird primär in Leukozyten und insbesondere in Makrophagen exprimiert, während es in allen anderen Zellen lediglich in vergleichsweise geringen Mengen vorkommt.<sup>130,136</sup> In Reaktion auf inflammatorische Stimuli können iRhom2 und TACE innerhalb kurzer Zeit aktiviert werden und die Freisetzung von TNF- $\alpha$  und somit eine Entzündungsreaktion initiieren.<sup>137</sup>

Aufgrund dieser Funktion weisen iRhom2-defiziente Mäuse spezifische inflammatorische Veränderungen auf. So zeigen sie nach Stimulation mit LPS nahezu keinen Anstieg von TNF- $\alpha$  im Serum während andere pro-inflammatorische Zytokine weiterhin in normalen Konzentrationen freigesetzt werden.<sup>130,135</sup> Ursächlich für die fehlende TNF- $\alpha$  Freisetzung ist dabei die ausbleibende Abspaltung des Zytokins von der Zelloberfläche durch TACE. Anders als beim Wildtyp findet sich in Abwesenheit von iRhom2 keinerlei TACE an der Zelloberfläche von Makrophagen. Gleichzeitig ist die Konzentration von mTNF- $\alpha$  signifikant höher. Durch den Verlust von iRhom2 gelangt das im ER gebildete TACE nicht mehr in den Golgi-Apparat, weshalb die Aktivierung von TACE ausbleibt und es nicht weiter zu seinem Wirkort, der Zelloberfläche, transportiert werden kann.<sup>130,135</sup> Die Ergebnisse der Mausversuche zeigen, dass iRhom2 unmittelbar für den Reifungsprozess von TACE erforderlich ist und nur in Anwesenheit von iRhom2 die TACE-abhängige Abspaltung von mTNF- $\alpha$  in Immunzellen stattfinden kann. Neben TNF- $\alpha$  ist TACE auch für die Abspaltung weiterer Substrate verantwortlich. Insbesondere die Freisetzung von Liganden des *epidermal growth factor receptor* (EGFR) wie TGF- $\alpha$  sind von TACE abhängig.<sup>131,138</sup> Mäusen ohne TACE fehlen diese Liganden und waren im Modell nicht

lebensfähig.<sup>138</sup> iRhom2-defiziente Mäuse sind hingegen lebensfähig und phänotypisch normal, da die Reifung von TACE in den nicht-myeloischen Zellen durch ein zweites inaktives Mitglied der Rhomboid-Proteasen-Familie, iRhom1, kompensiert wird.<sup>139</sup> Das mit iRhom2 eng verwandte iRhom1 wird in allen somatischen Zellen mit Ausnahme myeloischer Zellen in großen Mengen exprimiert.<sup>140</sup> Während die Aktivierung von TACE in fast allen Zellen durch die Koexpression von iRhom1 und iRhom2 gesichert ist, ist die Funktion von TACE in myeloischen Zellen aufgrund der Abwesenheit von iRhom1 nur von iRhom2 abhängig.<sup>136</sup> Dadurch kann die Abspaltung der EGFR-Liganden – aber auch von TNF- $\alpha$  – durch TACE in allen übrigen Zellen des Körpers auch ohne iRhom2 aufrechterhalten werden und es ergeben sich keine im Überleben beeinträchtigten Phänotypen, wie man sie bei einem genetischen Knock-Out von TACE beobachtet.<sup>131</sup> Mäuse ohne iRhom1 sterben hingegen nach wenigen Wochen und zeigen schwere Schäden in verschiedenen Geweben.<sup>136</sup> Die Existenz und physiologische Relevanz der iRhom2/TACE/TNF $\alpha$ -Signalachse konnte auch in menschlichen Zellen nachgewiesen werden.<sup>140</sup>

Im Hinblick auf inflammatorische Erkrankungen stellt die Modulation von iRhom2 eine neuartige Möglichkeit zur immunzell-spezifischen Blockade der TACE-abhängigen TNF- $\alpha$  Freisetzung dar, bei der die wichtigen physiologische Funktionen von TACE in nicht-myeloischen Zellen erhalten bleiben.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Rolle von iRhom2 beim Reifungsprozess von TACE. TACE wird im ER als inaktives Proenzym synthetisiert. Im Golgi-Apparat erfolgt die Aktivierung von TACE nach Abspaltung seiner Pro-Domäne durch Furin. Aktives TACE spaltet an der Zelloberfläche u.a. membrangebundenes TNF- $\alpha$  und überführt es somit in seine lösliche Form. iRhom2 bindet TACE im ER und ist für den Transport von TACE in den Golgi-Apparat unmittelbar erforderlich. Abbildung modifiziert nach Adrain et al.<sup>134</sup>

## 2. Fragestellung

iRhom2 spielt eine entscheidende Rolle bei der Freisetzung des inflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  durch Immunzellen wie Monozyten und Makrophagen.<sup>130,135,136</sup> TNF- $\alpha$  ist ein zentraler Bestandteil der inflammatorischen Reaktion nach einem AMI und infolgedessen in erhöhten Konzentrationen in Blut und Myokard nachweisbar.<sup>41,44,63,141</sup> Monozyten und Makrophagen sind an den Entzündungs-, Heilungs- und Umbauprozessen im ischämischen Herz beteiligt und setzen große Mengen an TNF- $\alpha$  frei.<sup>110,114,118</sup> Zahlreiche Studien konnten belegen, dass TNF- $\alpha$  unter bestimmten Bedingungen schädliche Wirkungen auf das Myokard ausübt, ungünstiges kardiales Remodeling verursacht und mit dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse im Verlauf assoziiert ist.<sup>141,142</sup> Bisher existieren keine etablierten therapeutischen Ansätze, die auf eine Begrenzung der schädlichen Wirkung von TNF- $\alpha$  nach einem AMI abzielen.

Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist nicht untersucht, wie die iRhom2-Expression im Rahmen eines AMI reguliert ist. Primäres Ziel dieser Pilotstudie war es deshalb zu untersuchen, ob es nach einem AMI zu Veränderungen in der Genexpression von iRhom2 in Monozyten kommt und ob es Assoziationen zu weiteren Determinanten kardialer Inflammation gibt. Die erlangten Ergebnisse sollen als Basis für weiterführende Studien zur Evaluierung des Effektes einer Modulation von iRhom2 auf das kardiale Remodeling und kardiovaskuläre Folgeereignisse nach einem AMI dienen.

### **Primärer Endpunkt:**

1. Evaluation der Expression von iRhom2 in Monozyten nach einem AMI (Tag 1 vs. Tag 3)

### **Sekundäre Endpunkte:**

2. Vergleich der Expression von iRhom2 in Monozyten zwischen Patienten mit AMI, KHK sowie gesunden jungen Kontrollen
3. Evaluation der Expression von TNF- $\alpha$  und TACE in Monozyten sowie der Konzentration von TNF- $\alpha$  im Serum nach einem AMI (Tag 1 vs. Tag 3)
4. Evaluation der Assoziation zwischen der Expression von iRhom2, TACE und TNF- $\alpha$  in Monozyten sowie der Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration nach einem AMI (Tag 1 vs. Tag 3)

5. Evaluation der Assoziation zwischen der Expression von iRhom2 in Monozyten und den Monozyten-Subpopulationen im Blut nach einem AMI (Tag 1 vs. Tag 3)
6. Evaluation der Dynamik der Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration und relativen Anteile der Monozyten-Subpopulationen nach einem AMI (Tag 1 vs. Tag 3)

**Hypothese:**

Die Expression von iRhom2 in Monozyten steigt infolge eines AMI an.

### 3. Materialien

#### 3.1. Geräte

**Tabelle 1:** *Geräte*

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
QuadroMACS Separator	Miltenyi Biotec
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec
NanoDrop™ 2000	Thermo Scientific™
CyAn™ ADP Flow Cytometer	Beckman Coulter, Inc.
QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System	Applied Biosystems™
DM IL Lichtmikroskop	Leica Microsystem
Zählkammer Neubauer	Hecht-Assistent®
Hämozytometer Deckgläser	Hecht-Assistent®
Mastercycler 5333 PCR Thermal Cycler 96 Well	Eppendorf
Centrifuge 5415 R	Eppendorf
Centrifuge 5417 C	Eppendorf
Centrifuge 5810 R	Eppendorf
Research plus-Pipetten 10 $\mu$ l, 20 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 200 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l	Eppendorf
Research Pro elektronische Pipette	Eppendorf
Pipettierhelfer accu-jet	Brand
Pipettierhelfer Pipetboy acu	Integra Biosciences
Vibrationsmischer Vortex-Genie 2	Scientific Industries SI™
Eisbad	neoLab
Eismaschine	Scotsman Ice Systems
Kühlschrank, 4°C	Liebherr
Gefrierschrank, -20 °C	Liebherr
Gefrierschrank, -80 °C	Liebherr

### 3.2. Chemikalien

**Tabelle 2: Chemikalien**

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Carl Roth
Ethanol $\geq 99,5\%$	Carl Roth
Bovines Serumalbumin Fraktion V	Carl Roth
Aqua ad Injectabilia	B. Braun
UltraPure™ DNase/RNase freies destilliertes Wasser	Invitrogen™

### 3.3. Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
VACUETTE® Blutentnahmeröhrchen (Natriumcitrat, EDTA, Heparin)	Greiner Bio-One International
Flügelkanüle	Greiner Bio-One International
HOLDEX® Einweghalter	Greiner Bio-One International
Konische Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Falcon™
40 $\mu\text{m}$ Cell Strainer	Falcon™
Serologische Einwegpipetten (10ml, 25ml)	Falcon™
Rundbodenröhrchen	Sarstedt
Eppendorf Safe-Lock Tubes (0,5ml, 1,5ml, 2,0ml)	Eppendorf
epT.I.P.S.-Pipettenspitzen (10 $\mu\text{l}$ , 20 $\mu\text{l}$ , 200 $\mu\text{l}$ , 1000 $\mu\text{l}$ )	Eppendorf
SurPhob SafeSeal® Filterspitzen (20 $\mu\text{l}$ , 100 $\mu\text{l}$ )	Biozym Scientific
SafeSeal-Tips Premium Filterspitzen (100 $\mu\text{l}$ )	Biozym Scientific
LS Trennsäule	Miltenyi Biotec
MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems™
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems™
Vasco® Nitril weiß Untersuchungshandschuhe	B. Braun

### 3.4. Kits und kommerzielle Fertigreagenzien

**Tabelle 4: Kits und kommerzielle Lösungen**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Ficoll® Paque Plus	GE Healthcare
RNeasy Mini Kit	QIAGEN
Pan Monocyte Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit mit RNase Inhibitor	Applied Biosystems™
TaqMan™ Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems™

### 3.5. Durchflusszytometrie-Antikörper

**Tabelle 5:** *Durchflusszytometrie-Antikörper*

Antigen	Flouorchrom	Klon	Hersteller
CD86 (human)	PE	IT2.2	BioLegend
CD14 (human)	Pacific Blue™	M5E2	BioLegend
CD16 (human)	APC	3G8	BioLegend
CD11b (human)	PE/Cy7	ICRF44	BioLegend

### 3.6. TaqMan®-Sonden

**Tabelle 6:** *TaqMan-Sonden*

Gen	Assay ID	Hersteller
iRhom2	Hs01078106_m1	Applied Biosystems™
TACE	Hs01041915_m1	Applied Biosystems™
TNF- $\alpha$	Hs01113624_g1	Applied Biosystems™
RPL-19	Hs02338565_gH	Applied Biosystems™

### 3.7. Pufferlösungen

**Tabelle 7:** *Pufferlösungen*

Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
Dubecco's phosphatgepufferte Salzlösung ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg (DPBS)		Gibco™
MACS-Puffer	DPBS pH 7.2 0.5% Bovine Serum Albumin 2 mM EDTA	

### 3.8. Software

**Tabelle 8:** *Software*

Software	Hersteller
Summit V4.4	Beckman Coulter, Inc.
NanoDrop 2000/2000c Software V1.6	Thermo Scientific™
QuantStudio Software V1.3	Applied Biosystems™
Microsoft® Excel 2016	Microsoft Corporation
Microsoft® Word 2016	Microsoft Corporation
SPSS Statistics 25	IBM

## 4. Methodik

### 4.1. Studiendesign und Studienpopulation

Im Zeitraum von Juni 2015 bis Februar 2017 wurden Studienteilnehmer in der Medizinischen Klinik für Kardiologie und Angiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin am Campus Mitte rekrutiert und in folgende drei Studiengruppen unterteilt:

1. Akuter Myokardinfarkt (n = 50)
2. Stabile koronare Herzerkrankung (n = 50)
3. Junge und gesunde Kontrollen (n = 25)

Die Akuter-Myokardinfarkt-Gruppe (AMI-Gruppe) setzt sich aus insgesamt 50 Patienten mit STEMI oder NSTEMI entsprechend der Definition der ESC zusammen.<sup>7,8</sup> Für die Stabile-Koronare-Herzerkrankung-Gruppe (sCAD-Gruppe) wurden 50 Patienten mit stabiler KHK ebenfalls entsprechend der Definition der ESC rekrutiert.<sup>143</sup> Hierfür wurde die entsprechende Leitlinie aus dem Jahr 2013 herangezogen, da die gegenwärtige Leitlinie aus dem Jahr 2019 zum Zeitpunkt der Patientenrekrutierung noch nicht existierte. Folglich wurde die Patientengruppe als Stabile-Koronare-Herzerkrankung-Gruppe und nicht, entsprechend der aktuellen Leitlinie, nach dem neuen Terminus des chronischen Koronarsyndroms benannt. Als weitere Kontrollgruppe wurden 25 junge und gesunde Probanden in die Studie eingeschlossen.

Die Diagnosen STEMI, NSTEMI (AMI-Gruppe) und stabile koronare Herzerkrankung (sCAD-Gruppe) wurden jeweils mittels Koronarangiographie bestätigt. Patienten der AMI-Gruppe wurden innerhalb von 24 Stunden nach Krankenhausaufnahme in die Studie eingeschlossen. Patienten der sCAD-Gruppe innerhalb von 24 Stunden nach der Koronarangiographie.

Zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses erfolgte jeweils eine symptomorientierte Anamnese, eine klinische Untersuchung sowie eine Blutentnahme. Bei Probanden der AMI-Gruppe erfolgte am dritten Tag nach Studieneinschluss eine weitere Blutentnahme.

Ausschlusskriterien waren die Notwendigkeit einer kardiopulmonalen Reanimation, hämodynamisch relevante, interventionspflichtige Koronarstenosen bei Patienten mit sCAD, Fieber, akute oder chronische Infektionen, rheumatische oder nicht-rheumatische Autoimmunerkrankungen, Immunsuppression, hochgradige akute oder chronische Niereninsuffizienz (GFR < 30 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>), hochgradige Aortenklappen-Stenosen,

maligne Erkrankungen sowie Schlaganfälle oder Operationen in den letzten 30 Tagen vor Studieneinschluss.

Alle Studienteilnehmer waren mindestens 18 Jahre alt und haben in Anschluss an eine Aufklärung schriftlich in die Studienteilnahme eingewilligt. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin bewilligt (EA1/246/14).

## 4.2. Blutentnahme

Jedem Studienteilnehmer wurden pro Zeitpunkt 30 ml Blut per peripherer Venenpunktion zur Untersuchung im Labor entnommen und in Röhrchen mit EDTA als Antikoagulanzen aufgefangen. Sechs weitere Milliliter wurden zur Bestimmung der folgenden laborchemischen Parameter mit Hilfe etablierter Standardmethoden abgenommen: Kreatinin, Harnstoff, Myoglobin, Troponin, Creatin-Kinase (CK), *Muscle-Brain type* CK (CK-MB), Lactatdehydrogenase (LDH), *N-terminal pro-B-type natriuretic peptide* (NT-proBNP), C-reaktives Protein (CRP), IL-6, TNF- $\alpha$ , Thyreoidea-stimulierendes Hormon (TSH), *Low Density Lipoprotein* (LDL), *High Density Lipoprotein* (HDL), Gesamtcholesterin, Triglyceride (TGL), großes Blutbild, *Quick*, Partielle Thromboplastinzeit (aPTT) und *International Normalized Ratio* (INR). Die Analyse dieser Werte erfolgte durch das Labor Berlin – Charité Vivantes Services GmbH.

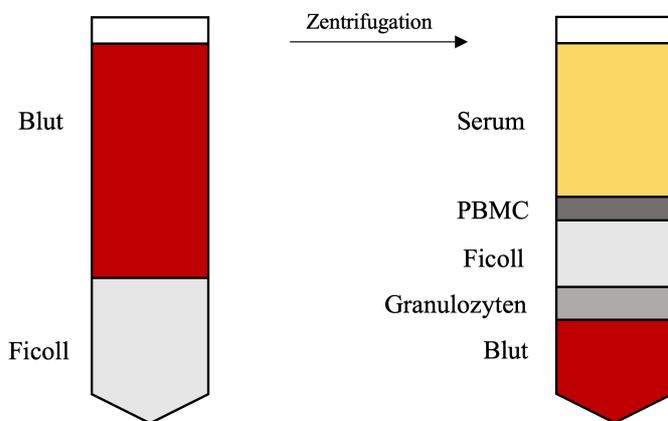
## 4.3. Methoden zur Isolation von Monozyten aus Vollblut

### 4.3.1. Dichtegradientenzentrifugation

Die Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC), also Monozyten und Lymphozyten, aus Vollblut erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Als Trennlösung wurde *Ficoll-Paque PLUS* verwendet. Die Methode beruht auf den Dichteunterschieden zellulärer Bestandteile des Blutes, aufgrund derer sich die verschiedenen Zellpopulationen bei Zentrifugation in separaten Phasen sammeln und getrennt isoliert werden können (siehe Abbildung 2).<sup>144</sup> Es wurden je 3 ml *Ficoll*-Trennlösung auf vier 15 ml Falcon-Röhrchen verteilt und pro Röhrchen 7 ml Blut auf die Trennlösung geschichtet, ohne dass sich die beiden Phasen miteinander vermischten. Die gefüllten Röhrchen wurden anschließend bei 160 g für 14 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Beendigung wurden jeweils 2 ml der obersten Plasma-Phase abpipettiert und verworfen.

Danach wurden die Röhrchen bei 400 g für weitere 15 Minuten zentrifugiert und anschließend der PBMC haltige Leukozytenfilm (*Buffy-Coat*) vorsichtig aus allen 4 Röhrchen mit einer Pipette

aspiriert und in einem 15 ml Falcon-Röhrchen gesammelt. Das Röhrchen mit der PBMC-Suspension wurde anschließend mit Dulbecco's phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS) bis 15 ml aufgefüllt und bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das gewonnene Zellpellet erneut in 15 ml DPBS resuspendiert. Dieser Waschschrift dient der Entfernung von Thrombozyten und erhöht die Reinheit der isolierten PBMC. Der Waschschrift wurde zwei weitere Male wiederholt. Nach Ablauf der letzten Zentrifugation wurde das PBMC-Pellet in 5 ml DPBS resuspendiert. Es wurden 20 µl dieser Suspension zur Zellzählung unter dem Lichtmikroskop mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer entnommen. Durchschnittlich wurden circa 30.000.000 PBMC aus 30 ml Blut pro Studienteilnehmer gewonnen.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Prinzips der Ficoll-Dichte-Zentrifugation

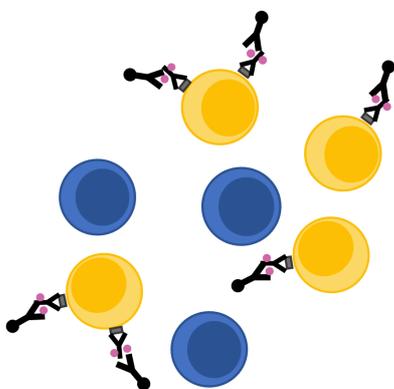
#### 4.3.2. MACS<sup>®</sup>-Monozytenisolation

Zur Isolation von Monozyten aus der PBMC-Suspension wurde das humane *Pan Monocyte Isolation Kit* der Firma *Miltenyi Biotec* verwendet. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der negativen Selektion, folglich dem Entfernen von nicht-monozytären Zellen. Dafür werden Lymphozyten, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen und basophile Granulozyten mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern zunächst indirekt magnetisch markiert und durchlaufen anschließend eine Säule in einem starken magnetischen Feld. Während die Lymphozyten aufgrund ihrer magnetischen Markierung im Magnetfeld der Säule gehalten werden, durchlaufen Monozyten die Säule ungehindert und können in einem Röhrchen aufgefangen und unverändert isoliert werden (siehe Abbildung 3).

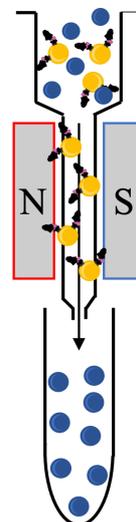
Zunächst wurden 20 ml MACS-Puffer entsprechend des Herstellerprotokolls angesetzt (siehe Tabelle 7). Zur Beseitigung von Zellklumpen, welche die Trennsäulen verstopfen könnten, wurde die PBMC-Suspension auf einen mit MACS-Puffer befeuchteten 40µm *Cell-Strainer* gegeben und

in einem 50 ml Falcon-Röhrchen aufgefangen. Um die PBMC von der wässrigen Phase zu trennen wurde das Filtrat bei 300 g für 10 Minuten erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde nach Abschluss abpipetiert und verworfen. Anschließend wurden die Zellen gemäß des Herstellerprotokolls indirekt magnetisch markiert. Dafür wurde das Zellpellet zunächst in 30 µl *MACS-Puffer* pro  $10^7$  Zellen resuspendiert und mit 10 µl *FcR-Blocking-Reagent* pro  $10^7$  Zellen sowie 10 µl *Biotin-Antibody Cocktail* pro  $10^7$  Zellen für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden dem Ansatz weitere 30 µl *MACS-Puffer* pro  $10^7$  Zellen sowie 20 µl *Anti-Biotin MicroBeads* pro  $10^7$  Zellen hinzugefügt und für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Eine *LS-Trennsäule* wurde im magnetischen Feld (*QuadroMACS™ Separator*) platziert und durch Zugabe von 3 ml *MACS-Puffer* vorbehandelt. Die markierte Zellsuspension wurde dann auf die Trennsäule pipettiert. Die Trennsäule wurde drei Mal mit je 3 ml *MACS-Puffer* gewaschen, um die nicht-markierten Monozyten auszuspülen und in einem 15 ml Falcon-Röhrchen aufzufangen. Es wurden 20 µl der gewonnenen Monozyten-Suspension zur erneuten Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer entnommen. Im Mittel wurden auf diese Weise etwa 7.000.000 Monozyten aus einer Blutprobe isoliert. Die mittels Durchflusszytometrie bestimmte Reinheit der gewonnenen Monozyten-Suspension lag bei über 90%.

1.) Magnetische Markierung



2.) Magnetische Separation



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Isolation humaner Monozyten mit dem *MACS®-Monozyten-Isolations-Kit* von Miltenyi Biotec

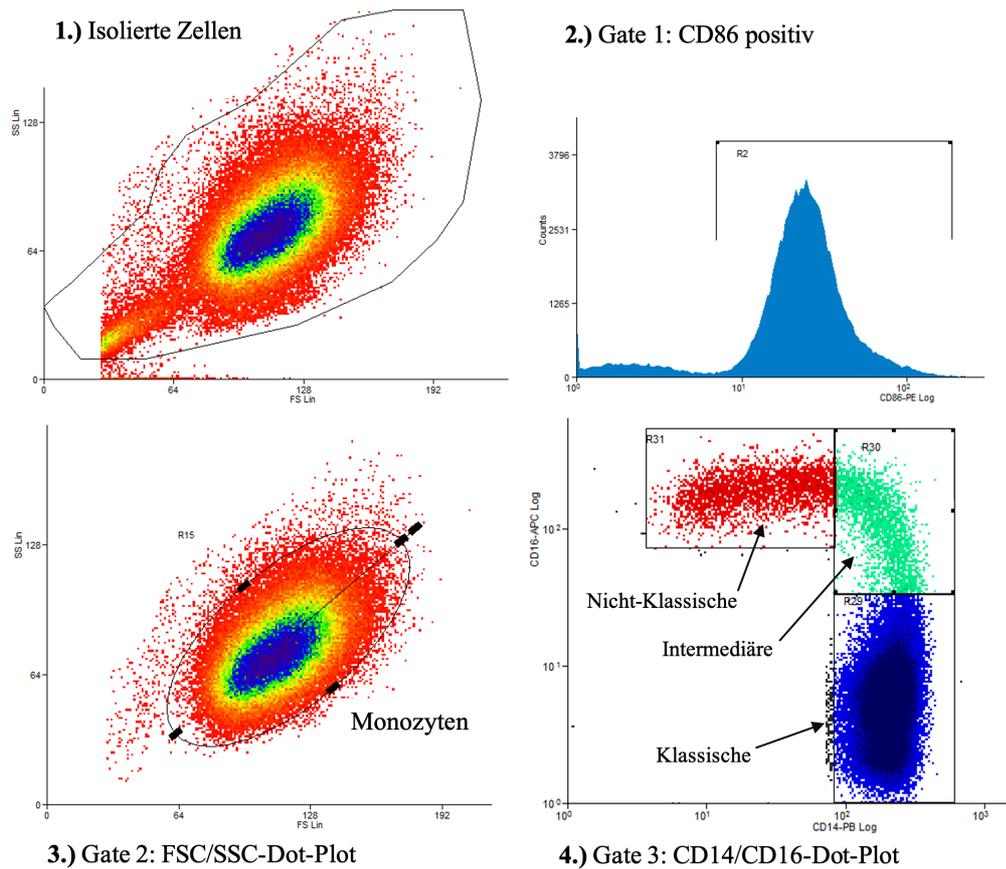
Lymphozyten, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen und basophile Granulozyten (gelb dargestellt) werden mittels monoklonaler Antikörper indirekt magnetisch markiert (1.) und durchlaufen anschließend gemeinsam mit den nicht markierten Monozyten (blau dargestellt) eine Säule in einem magnetischen Feld (2.). Die Monozyten können die Säule durchlaufen und in einem Röhrchen aufgefangen werden. Modifiziert nach Miltenyi Biotec.<sup>145</sup>

## 4.4. Methoden zur Quantifizierung der Monozyten-Subpopulationen

### 4.4.1. Durchflusszytometrie

Zur Identifizierung und Quantifizierung der verschiedenen Monozyten-Subpopulationen wurde die Expression der Oberflächenmoleküle CD86, CD14, CD16 und CD11b auf den isolierten Zellen mittels Durchflusszytometer bestimmt. 200 µl der Monozyten-Suspension wurden entnommen und mit folgenden Fluorochrom-konjugierten Antikörpern für 15 Minuten bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert: 1 µl CD86, PE; 2 µl CD14, PB; 1 µl CD16, APC; 5 µl CD11b, PECy7. Anschließend wurde die Zelllösung mit 2 ml DPBS gewaschen, 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das zurückbleibende Zellpellet wurde in 400 µl DPBS resuspendiert und mittels Durchflusszytometer unter Verwendung der Software *Summit™ 4.4* vermessen. Um die Monozyten-Subpopulationen zu quantifizieren wurde eine *Gating*-Strategie modifiziert nach Zawada et al.<sup>109</sup> angewandt (siehe Abbildung 4): Zunächst wurden alle erfassten Zellen im *Forward-Scatter* (FSC) / *Side-Scatter* (SSC)-*Dot-Plot* ausgewählt. Diese Zellen wurden in ein CD86-Histogramm geplottet (*Gate 1*). *Gate 1* erlaubt die Identifizierung und isolierte Erfassung von Monozyten als CD86-positive Zellen. Durch die Gegenüberstellung von CD86-positiven Zellen zu allen erfassten Zellen kann die relative Reinheit der isolierten Monozyten bestimmt werden. Als nächstes wurden alle CD86-positiven Zellen in einem zweiten FSC/SSC-*Dot-Plot* dargestellt und anhand ihrer monozytenspezifischen örtlichen Verteilung im *Dot-Plot* ausgewählt (*Gate 2*). Die Zellen, die sowohl CD86-positiv (*Gate 1*) waren, als auch dem monozytenspezifischen Verteilungsmuster in *Gate 2* entsprachen, wurden als Monozyten definiert. Zur Differenzierung der drei Monozyten-Subpopulationen wurden die Monozyten in einem *Dot-Plot* nach CD14/CD16-Positivität dargestellt (*Gate 3*). Entsprechend der Expression von CD14 und CD16 ermöglicht diese Darstellung eine Aufteilung in die drei definierten Subpopulationen: CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> (klassische), CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> (intermediäre) und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> (nicht-klassische). Um zwischen CD14-positiven (intermediäre und klassische) und -negativen Zellen (nicht-klassische) zu unterscheiden, wurde im CD14/CD16-*Dot-Plot* auf der CD14-Achse links der klassischen Monozyten eine vertikale Linie gezogen. Dieses Verfahren folgte den etablierten Methoden von Zawada et al. und Ziegler-Heitbrock et al. und erlaubt die Bestimmung der relativen Anteile der drei Monozyten-Subpopulationen an der Monozytengesamtpopulation.<sup>109,146</sup>

Die oben beschriebene Auswertung der Monozyten-Subpopulationen-Messung erfolgte durch zwei unabhängige, verblindete Auswerter. Aus beiden Analysen wurde für jede Monozyten-Subpopulation jeweils der Mittelwert gebildet.



**Abbildung 4:** Exemplarische Darstellung der Gating-Strategie zur Differenzierung der Monozyten-Subpopulationen mittels Durchflusszytometrie

Alle erfassten Zellen werden im FSC/SSC-Dot-Plot ausgewählt (1.) und in einem Histogramm nach CD86-Positivität dargestellt (2.). CD86-positive Zellen werden in einem FSC/SSC-Dot-Plot dargestellt und anhand ihrer monozytenspezifischen örtlichen Verteilung im Dot-Plot ausgewählt (3.). Zur Differenzierung der drei Monozyten-Subpopulationen werden die mittels Gate 1 und Gate 2 identifizierte Monozyten in einem Dot-Plot nach CD14/CD16-Positivität dargestellt (4.). *Abkürzungen.* CD, cluster of differentiation; FSC/SSC, Forward-Scatter/Side-Scatter.

## 4.5. Methoden zur Quantifizierung der Genexpression

### 4.5.1. Ribonukleinsäure (RNA)-Isolation

Zur Isolation der RNA aus den isolierten Monozyten wurde das *RNeasy Mini Kit* von *Qiagen* verwendet. Die Anwendung erfolgte entsprechend des Herstellerprotokolls. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Nach Isolation der Monozyten wurden jeder Probe in Abhängigkeit von der gewonnenen Zellzahl 350  $\mu$ l (bei  $< 5.000.000$  Zellen) oder 700  $\mu$ l (bei  $> 5.000.000$  Zellen) *RLT-Puffer* zur Zelllyse zugegeben. Anschließend wurden die Proben bis zur Weiterverarbeitung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Zur RNA-Isolation wurden die gesammelten Proben auf Eis aufgetaut und mit 1 Volumen (350  $\mu$ l oder 700  $\mu$ l) 70%-igem Ethanol homogenisiert. Anschließend wurde das Lysat in ein *RNeasy-Spin-Column* pipettiert und bei 21°C mit 12.000 *rounds per minute* (rpm) für 20 Sekunden zentrifugiert.

Dieser Schritt lädt die RNA auf die im *Spin-Column* befindliche Membran. Das *Spin-Column* wurde vorher in einem 2 ml *Collection-Tube* platziert. Das im *Collection-Tube* aufgefangene Eluat wurde verworfen. Anschließend wurden 700  $\mu$ l *RW1-Puffer* in das *Spin-Column* pipettiert und dieses bei 12.000 rpm für 20 Sekunden (21°C) zentrifugiert, um die Membran zu waschen. Das Eluat wurde erneut verworfen. Im nächsten Waschschrift wurden 500  $\mu$ l *RPE-Puffer* in das *Spin-Column* gegeben und abermals bei 12.000 rpm für 20 Sekunden (21°C) zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, wobei dieses Mal für 2 Minuten bei 12.000 rpm (21°C) zentrifugiert wurde. Das *Spin-Column* wurde dem *Collection-Tube* entnommen, in einem neuen 2 ml *Collection-Tube* platziert und für 1 Minute bei 12.000 rpm (21°C) zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Um die isolierte und gereinigte RNA nun aus der Membran zu lösen und aufzufangen wurde das *Spin-Column* in ein 1,5 ml *Collection-Tube* gesetzt und 15  $\mu$ l RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert. Nach Ablauf von 5 Minuten Inkubationszeit wurden die Röhren bei 12.000 rpm für 20 Sekunden (21°C) zentrifugiert. Es wurden weitere 15  $\mu$ l RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert und nach Ablauf weiterer 5 Minuten Inkubationszeit bei 12.000 rpm für 1 Minute (21°C) zentrifugiert.

#### 4.5.2. Konzentrationsbestimmung der Ribonukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung der RNA-Lösung wurde das Spektralphotometer *NanoDrop™ 2000* von *ThermoFisher Scientific* verwendet. Für die Vermessung wurde 1  $\mu$ l pro Probe verwendet. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über die Messung der Extinktion/Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $A_{260}$ ). Die Bewertung der Reinheit der isolierten RNA erfolgte anhand der Verhältnisse der Absorption bei 260 nm zu 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) und 260 nm zu 230 nm ( $A_{260}/A_{230}$ ). Die Reinheit gibt Aufschluss über eventuelle Kontaminationen mit Proteinen oder Chemikalien während der RNA-Extraktion. Während bei  $A_{260}/A_{280}$  ein Wert von 2 im Allgemeinen als „rein“ gilt, liegt dieser Wert bei  $A_{260}/A_{230}$  zwischen 1.8 und 2.2.

Nur Proben mit ausreichend hoher Konzentration und entsprechender Reinheit wurden für die Bestimmung der Genexpression verwendet. Nach der Vermessung wurden die RNA-Proben bei - 80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

### 4.5.3. Reverse Transkription

Die Reverse Transkription (RT) ist die Umschreibung von RNA in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) durch die RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase). Dieser Schritt ist notwendig, da RNA im Gegensatz zu cDNA nicht direkt in die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als Matrize eingesetzt werden kann. Erst nach der Umschreibung in cDNA können spezifische Teile der DNA in der PCR amplifiziert werden.

Für die RT wurde das *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* inklusive eines *RNase-Inhibitors* von *Applied Biosystems* verwendet. Die Anwendung erfolgte entsprechend des Protokolls des Herstellers. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Zunächst wurde das erforderliche Volumen des *RT-Mastermix* entsprechend der Anzahl der Proben/Reaktionen berechnet und hergestellt (siehe Tabelle 9). Pro Probe wurden je 10 µl des Mastermix in ein 0,5 ml Röhrchen pipettiert

**Tabelle 9:** Pipettierschema RT-Mastermix (10 µl) für eine Probe nach Vorgabe des Herstellers

Reagenz	Volumen (µl)
10 x RT Buffer	2,0
10 x RT Random Primers	2,0
25 x dNTP Mix (100 mM)	0,8
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µL)	1,0
Nuclease-freies Wasser	3,2
RNase-Inhibitor (20 U/µl)	1,0

Im nächsten Schritt wurden 500 ng RNA in einem separaten Röhrchen bis zu einem Gesamtvolumen von 10 µl mit Nuclease-freiem Wasser aufgefüllt. Diese RNA-Proben wurden anschließend in jeweils eines der vorbereiteten Röhrchen mit 10 µl Mastermix gegeben und vermischt. Das Reaktionsvolumen betrug somit jeweils 20 µl. Der Thermozykler wurde mit den Proben beladen und nach dem vom Hersteller vorgegebenen Temperaturprofil programmiert (siehe Tabelle 10). Nach Beendigung des Programms wurde die hergestellte cDNA bis zur quantitativen *Real-time-PCR* (qPCR) bei - 20°C gelagert.

**Tabelle 10:** Temperaturprofil für Reverse Transkription nach Vorgabe des Kit-Herstellers

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3
Temperatur (°C)	25	37	85
Zeit	10 Min.	120 Min.	5 Min.

#### 4.5.4. Quantitative Real-time PCR (TaqMan®-PCR)

Die qPCR ist eine Methode zur Amplifikation und Quantifizierung ausgewählter Zielgene. Sie beruht auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die zuvor hergestellten cDNA-Matrizen werden dabei mit Hilfe von Oligonukleotiden (Primern) in mehreren aufeinanderfolgenden PCR-Zyklen durch die DNA-Polymerase exponentiell vervielfältigt und das Ausmaß der Amplifikation anhand von Fluoreszenzsignalen in Echtzeit (engl. *real-time*) detektiert. Dabei nimmt die Fluoreszenz proportional zur Menge des PCR-Produkts (Zielgen) zu. Die Detektion in Echtzeit unterscheidet dieses Verfahren von der konventionellen PCR.

Für die Entstehung der Fluoreszenz-Signale wurden *TaqMan Minor Groove Binder (MGB)-Sonden* der Firma *Applied Biosystems* verwendet. TaqMan-Sonden sind genspezifische Oligonukleotidsonden, die stromabwärts der Primer an die zu amplifizierende Sequenz binden. An dem 5'-Ende dieser Sonden befindet sich ein Fluoreszenzmolekül, der sogenannte Reporter. Am 3'-Ende liegt ein sogenannter *Quencher*, welcher das Fluoreszenzsignal des Reporters unterdrückt, solange sich beide in einem Zustand räumlicher Nähe befinden. Das zugrunde liegende physikalische Phänomen nennt sich Förster-Resonanzenergietransfer (FRET). Nachdem sich Primer und TaqMan-Sonde an ihre Zielsequenzen angelagert haben, synthetisiert die *Taq-DNA-Polymerase* anhand der Primer und der cDNA-Matrize neue DNA-Stränge. Jedes Mal, wenn die Polymerase eine der genspezifischen TaqMan-Sonden erreicht, wird diese durch die 5'-Nukleaseaktivität der *Taq-DNA-Polymerase* gespalten. Diese Spaltung trennt den *Quencher* vom Reporter, sodass das Fluoreszenzsignal des Reporters nicht länger unterdrückt wird und detektiert werden kann. Da die TaqMan-Sonde dabei komplett entfernt wird, wird die DNA-Synthese durch die *Taq-DNA-Polymerase* weiter fortgesetzt. Mit jedem Zyklus erhöht sich so die Menge der freigesetzten Fluoreszenzmoleküle. Die Zunahme des Fluoreszenzsignals ist dabei proportional zur PCR-Produktmenge und lässt somit Rückschlüsse auf die Expression des Zielgenes zu.

Mit Hilfe der qPCR wurde die Genexpression von iRhom2, TACE und TNF- $\alpha$  in Monozyten bestimmt. Es wurden entsprechende Sonden sowie *TaqMan-Gene-Expression-Master-Mix* der Firma *Applied Biosystems*, verwendet (siehe Tabelle 6). Im Rahmen dieser Genexpressionsstudie erfolgte eine relative Quantifizierung der Zielsequenzen. Hierbei wird die Expression des Zielgens auf die Expression eines in der Zelle konstant exprimierten und nicht regulierten Referenz-Gens, dem sogenannten *Housekeeping-Gen*, normalisiert. Die Expression wird folglich nicht absolut, sondern in Relation zum *Housekeeping-Gen* bestimmt. Als *Housekeeping-Gen* wurde Ribosomales Protein L19 (RPL19) verwendet.

Zur Auswertung wurde der *Cycle Threshold* (Ct)-Wert jeder Probe verwendet. Er stellt die Zyklusnummer dar, bei der das Fluoreszenzsignal eines Gens zum ersten Mal signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Je niedriger der Ct-Wert für ein Gen ausfällt, desto mehr Kopien des Gens liegen in einer Probe vor. Um die relative Expression zu erhalten wurde die arithmetische Formel  $2^{-\Delta\Delta CT}$  ( $\Delta Ct = Ct(\text{Zielgen}) - Ct(\text{Referenz-Gen})$ ) angewandt. Die  $\Delta\Delta CT$ -Methode erlaubt die Normalisierung der Genexpression gegenüber dem *Housekeeping-Gen* RPL19.

Von jeder cDNA-Probe wurden Doppelwerte mittels Real-time PCR bestimmt. Proben, bei denen die Doppelwerte um mehr als 0,5 Ct-Werte voneinander abwichen wurden erneut vermessen. Bei jedem Experiment wurde zusätzlich eine Negativkontrolle (Aqua) mitgeführt, um eine Kontamination der Reaktion mit Fremd-DNA auszuschließen.

#### 4.6. Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Statistik-Software *SPSS Version 25.0* von *SPSS Inc.*. Ergebnisse sind als arithmetischer Mittelwert ( $M$ )  $\pm$  Standardabweichung ( $SD$ ) für normalverteilte Daten oder als Median mit Interquartilsabstand (IQA = 25. - 75. Perzentile) für nicht-normalverteilte Daten dargestellt. Kategoriale Daten sind als absolute Zahlen mit entsprechenden Prozentangaben (%) angegeben. Die Normalverteilung der Daten wurde anhand der Schiefe und Kurtosis (Exzess) sowie analytisch anhand des Shapiro-Wilk-Tests geprüft. Signifikanzberechnungen erfolgten bei verbundenen Stichproben mit Hilfe des Wilcoxon-Tests bei nicht-normalverteilten Stichproben. Unverbundene Stichproben, die nicht normalverteilt waren, wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests verglichen. Normalverteilte Stichproben wurden mittels T-Test für entweder verbundene oder unverbundene Stichproben analysiert. Ein  $p$ -Wert  $< 0.05$  wurde als statistisch signifikant erachtet. Korrelationen zwischen Parametern wurden bei unzureichender Linearität im Streudiagramm mittels Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten ( $r_s$ ) bestimmt, bei gegebener Linearität ohne Ausreißer mittels Pearson-Produkt-Moment-Korrelation ( $r$ ). Korrelationskoeffizienten von  $|r| \approx 0,1$  wurden als schwacher Zusammenhang,  $|r| \approx 0,3$  als mittlerer Zusammenhang und  $|r| \approx 0,5$  als starker Zusammenhang gewertet.<sup>147</sup> Zur Veranschaulichung wurden ausgewählte Daten in Tabellen oder Diagrammen dargestellt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Basischarakteristika der Studienpopulation

Tabelle 11 zeigt die Basischarakteristika der Studienteilnehmer, unterteilt nach der jeweiligen Studiengruppe zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses. Insgesamt wurden im Rahmen der Studie die Daten von 125 Probanden erhoben. Je 50 Patienten mit AMI oder sCAD sowie 25 junge und gesunde Probanden als zusätzliche Kontrollgruppe. Der Anteil weiblicher Teilnehmer betrug in der AMI-Gruppe 28%, in der sCAD-Gruppe 14% und in der Kontrollgruppe 44%. Während das mittlere Alter der Patienten mit AMI 55 Jahre betrug, lag das der Patienten mit sCAD bei 69,5 Jahren und in der Kontroll-Gruppe bei 22,8 Jahren. Der jüngste Proband mit AMI war zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses 33 Jahre alt, während der älteste Proband mit AMI 85 Jahre alt war. 32% der Probanden mit AMI hatten die Diagnose NSTEMI und 68% die Diagnose STEMI. 98% der AMI-Gruppe gaben zum Aufnahmezeitpunkt eine typische AP-S an. In der sCAD-Gruppe berichteten lediglich 42% der Probanden, situativ unter AP-S zu leiden. Die zahlenmäßig häufigsten kardiovaskulären Risikofaktoren bei Probanden mit AMI und sCAD stellten die arterielle Hypertonie (58% vs. 70%), die Hyperlipoproteinämie (58% vs. 40%) sowie insbesondere in der AMI-Gruppe der Nikotinabusus (52%) dar. Probanden der Kontrollgruppen wiesen den Einschlusskriterien entsprechend weder Vorerkrankungen noch bekannte kardiovaskuläre Risikofaktoren auf. Der durchschnittliche *Body-Mass-Index* (BMI) war sowohl in der AMI-Gruppe (28,6 kg/m<sup>2</sup>) als auch in der sCAD-Gruppe (27,1 kg/m<sup>2</sup>) im übergewichtigen Bereich. Während bei Patienten mit sCAD gemäß der Einschlusskriterien kein angiologischer Interventionsbedarf bestand, wurde bei 49 Patienten mit Herzinfarkt eine Stentimplantation oder Ballondilatation durchgeführt. Bei einem Patienten mit AMI ergaben sich im Rahmen der Koronarangiographie keine sinnvollen Interventionsmöglichkeiten. Bei 82% der Patienten mit AMI wurde im Rahmen des Ereignisses die Erstdiagnose einer KHK gestellt. Tabelle 12 zeigt die erhobenen Laborparameter in den jeweiligen Studiengruppen mit den entsprechenden Signifikanzniveaus im Gruppenvergleich.

**Tabelle 11: Basischarakteristika der Studienpopulation**

<b>Charakteristika</b>	<b>AMI (d1) n = 50</b>	<b>sCAD n = 50</b>	<b>Kontrollen n = 25</b>
Alter, <i>M</i> (Spannweite)	55 (33-85)	69,5 (44-84)	22,8 (19-27)
Geschlecht, n (%)	männlich	36 (72,0)	43 (86,0)
	weiblich	14 (28,0)	7 (14,0)
BMI (kg/m <sup>2</sup> ), <i>M</i> ( <i>SD</i> )	28,6 ± 5,8	27,1 ± 4,1	22,22 ± 2,6
NSTEMI, n (%)	16 (32,0)	-	-
STEMI, n (%)	34 (68,0)	-	-
<b>Kardiovaskuläre Risikofaktoren</b>			
IDDM, n (%)	3 (6,0)	2 (4,0)	-
NIDDM, n (%)	5 (10,0)	3 (6,0)	-
Arterielle Hypertonie, n (%)	29 (58,0)	35 (70,0)	-
Hyperlipoproteinämie, n (%)	29 (58,0)	20 (40,0)	-
Raucher, n (%)	26 (52,0)	4 (8,0)	-
Positive Familienanamnese, n (%)	11 (22,0)	1 (2,0)	-
<b>Kardiovaskuläre Anamnese</b>			
vorausgehendes ACS, n (%)	6 (12,0)	7 (14,0)	-
vorausgehende PCI, n (%)	8 (16,0)	24 (48,0)	-
vorausgehende CABG, n (%)	0	6 (12,0)	-
vorausgehende TIA, n (%)	1 (2,0)	1 (2,0)	-
<b>Herzkatheter-Befunde</b>			
Erstdiagnose KHK, n (%)	41 (82,0)	17 (34,0)	-
1-Gefäß-KHK, n (%)	22 (44,0)	23 (46,0)	-
2-Gefäß-KHK, n (%)	11 (22,0)	13 (26,0)	-
3-Gefäß-KHK, n (%)	17 (34,0)	14 (28,0)	-
Hauptstammeteiligung, n (%)	2 (4,0)	1 (2,0)	-
PTCA, n (%)	49 (98,0)	-	-
DES, n (%)	46 (92,0)	-	-

*Anmerkung.* Angabe der Daten als Mittelwerte (*M*) ± Standardabweichung (*SD*) oder absolute Zahlen mit zugehörigen Prozenten (%). *Abkürzungen.* BMI, Body-Mass-Index; NSTEMI, Nicht-ST-Hebungsinfarkt; STEMI, ST-Hebungsinfarkt; IDDM, insulinabhängiger Diabetes mellitus; NIDDM, nicht-insulinabhängiger Diabetes mellitus; ACS, Akutes Koronarsyndrom; PCI, Perkutane koronare Intervention; CABG, coronary artery bypass grafting; TIA, transitorische ischämische Attacke; PTCA, perkutane transluminale Koronarangioplastie; DES, drug eluting stent.

## 5.2. Laborparameter

**Tabelle 12:** Laborparameter im Gruppenvergleich mit Signifikanzniveaus

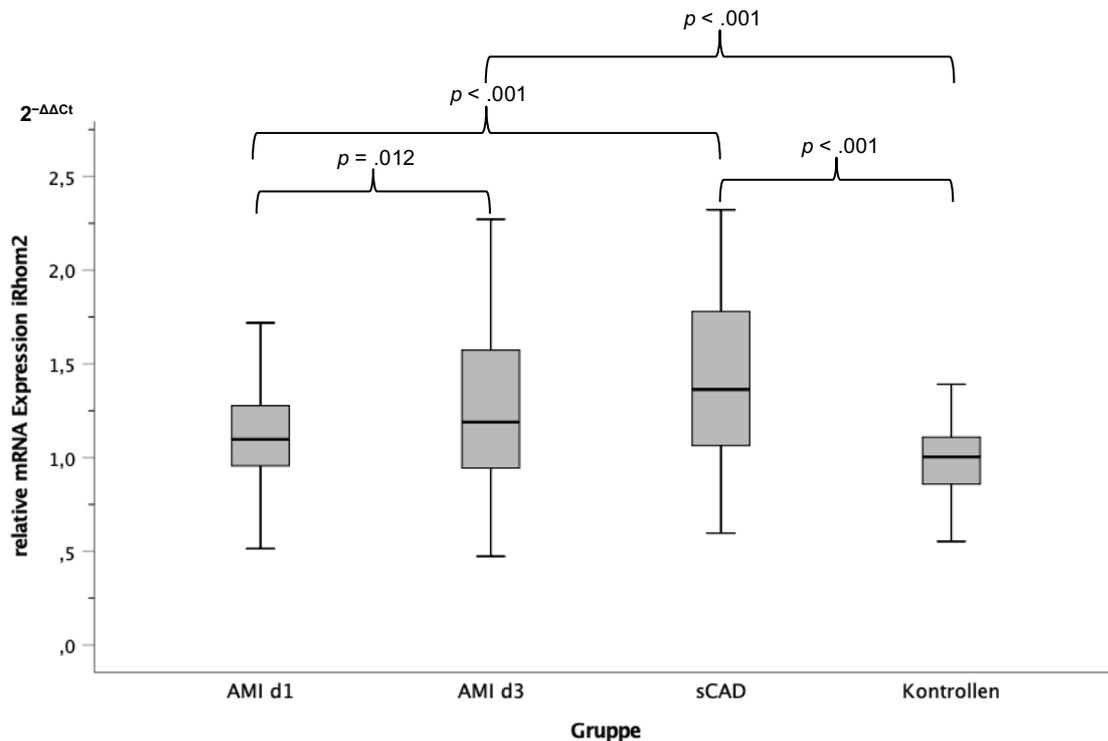
Parameter	AMI d1	AMI d3	sCAD	Kontrollen	p-Wert; AMI d1 vs. sCAD	p-Wert; AMI d1 vs. d3	p-Wert; AMI d1 vs. Kontrollen
<b>Leukozyten, *10<sup>3</sup>/μL</b>	11,83 (9,43-14,70)	9,92 (7,99-11,58)	7,39 (6,34-8,73)	5,32 (4,74-6,26)	<b>&lt; .001</b>	<b>&lt; .001</b>	<b>&lt; .001</b>
<b>CRP, mg/L</b>	5,30 (2,00-12,30)	19,50 (11,60-41,80)	2,20 (1,20-5,60)	0,70 (0,40-1,50)	<b>.001</b>	<b>&lt; .001</b>	<b>&lt; .001</b>
<b>IL-6, ng/L</b>	16,95 (10,50-31,10)	11,95 (7,40-19,20)	9,45 (7,30-14,30)	1,40 (1,40-2,00)	<b>&lt; .001</b>	<b>.007</b>	<b>&lt; .001</b>
<b>Troponin, ng/L</b>	1052,00 (419,00-4403,00)	1233,50 (439,00-2068,00)	14,00 (8,00-20,00)	2,90 (2,90-5,00)	<b>&lt; .001</b>	<b>.001</b>	<b>&lt; .001</b>
<b>CK, U/L</b>	593,00 (265,00-1242,00)	181,00 (127,00-311,00)	88,50 (58,00-121,00)	142,00 (91,00-203,00)	<b>&lt; .001</b>	<b>&lt; .001</b>	<b>&lt; .001</b>
<b>CK-MB, U/L</b>	72,50 (39,00-145,60)	22,05 (15,20-28,80)	16,10 (12,80-20,90)	17,40 (16,40-21,00)	<b>&lt; .001</b>	<b>&lt; .001</b>	<b>&lt; .001</b>
<b>NT-Pro- BNP, ng/L</b>	642,00 (212,00-1359,00)	569,50 (308,00-1411,00)	206,00 (80,00-763,00)	26,00 (8,00-53,00)	<b>.004</b>	<b>.273</b>	<b>&lt; .001</b>
<b>Kreatinin, mg/dl</b>	0,84 (0,77-0,93)	0,86 (0,77-1,01)	1,01 (0,89-1,16)	0,83 (0,76-0,86)	<b>&lt; .001</b>	<b>.021</b>	<b>.455</b>
<b>Cholesterin gesamt, mg/dl</b>	187,50 (167,0-224,0)	175,00 (156,0-197,0)	169,00 (139,0-208,0)	169,00 (150,0-194,0)	<b>.017</b>	<b>&lt; .001</b>	<b>.020</b>
<b>HDL, mg/dl</b>	41,50 (33,00-47,00)	38,50 (34,00-45,00)	46,50 (38,00-57,00)	60,00 (53,00-69,00)	<b>.006</b>	<b>.965</b>	<b>&lt; .001</b>
<b>LDL, mg/dl</b>	127,00 (109,00-164,00)	114,00 (91,00-132,00)	103,00 (70,00-142,00)	97,00 (81,00-111,00)	<b>.002</b>	<b>&lt; .001</b>	<b>&lt; .001</b>
<b>TGL, mg/dl</b>	139,50 (92,00-175,00)	142,00 (113,00-181,00)	119,50 (89,00-183,00)	75,00 (56,00-112,00)	<b>.378</b>	<b>.491</b>	<b>.001</b>

*Anmerkung.* Angabe der Daten in Medianen mit Interquartilsabstand und Signifikanzniveaus im Gruppenvergleich.  
*Abkürzungen.* CRP, C-reaktives Protein; IL-6, Interleukin-6; CK, Creatinkinase; CK-MB, Creatinkinase Muscle-Brain type; NT-Pro-BNP, N-terminales pro brain natriuretic peptid; HDL, High Density Lipoprotein; LDL, Low Density Lipoprotein; TGL, Triglyceride.

## 5.3. mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten

Die mRNA-Expression von iRhom2, TACE und TNF- $\alpha$  in Monozyten wurde mittels qPCR bestimmt. Die n-fache mRNA-Expression wurde in Bezug zu der jungen und gesunden Kontrollgruppe berechnet. Abbildung 5 zeigt die relative mRNA-Expression von iRhom2 in den jeweiligen Studiengruppen. In der AMI-Gruppe kam es von Tag 1 zu Tag 3 zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Expression von iRhom2 in Monozyten um 14,52 % ( $p = .012$ ).

Die iRhom2-Expression bei Patienten mit sCAD war signifikant höher als in der AMI-Gruppe an Tag 1 ( $p < .001$ ) (siehe Tabelle 13). An Tag 3 nach AMI fand sich hingegen kein statistisch relevanter Unterschied hinsichtlich der iRhom2-Expression im Vergleich zur sCAD-Gruppe. Die iRhom2-Expression der AMI Gruppe unterschied sich an Tag 1 nicht signifikant von der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 13). An Tag 3 war die mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten in der AMI-Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe ( $p < .001$ ). Die sCAD-Gruppe zeigte eine signifikant höhere iRhom2-Expression als die Kontrollprobanden ( $p < .001$ ).



**Abbildung 5:** Relative mRNA-Expression iRhom2 in Monozyten

Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten in den jeweiligen Studiengruppen. Auf der Y-Achse ist die n-fache mRNA-Expression ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) normalisiert auf die Expressionslevel von RPL-19 und in Bezug zur Kontrollgruppe aufgetragen, auf der X-Achse die Gruppen: AMI an Tag 1 und Tag 3,  $n=50$ ; sCAD,  $n=50$ ; Kontrollen,  $n=25$ ; oberer Whisker, Maximum ohne Ausreißer; unterer Whisker, Minimum ohne Ausreißer. *Abkürzungen.* AMI, akuter Myokardinfarkt; sCAD, stabile koronare Herzerkrankung; d, Tag; n, Anzahl.

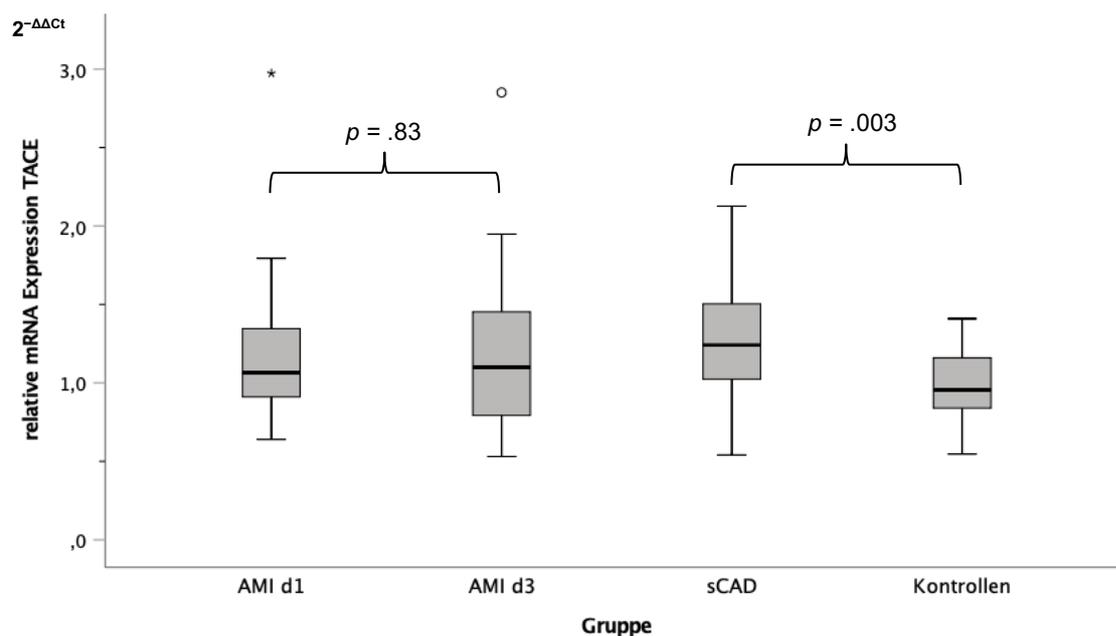
**Tabelle 13:** Relative mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten in der AMI-, sCAD- und Kontroll-Gruppe

Gruppen	relative mRNA-Expression iRhom2	p-Wert	p-Wert	p-Wert	p-Wert
		AMI d1 vs. sCAD	AMI d3 vs. sCAD	AMI d1 vs. Kontrollen	AMI d3 vs. Kontrollen
AMI d1	1.095 ± 0.26				
AMI d3	1.254 ± 0.44				
sCAD	1.41 ± 0.45	< .001	.09	.21	< .001
Kontrollen	1.00 ± 0.21				

*Anmerkung.* Angabe der Daten als Mittelwerte ± Standardabweichung mit Signifikanzniveaus im Gruppenvergleich; zur Vergleichbarkeit wurden die Gruppen auf das Expressionsniveau der Kontrollen normalisiert. *Abkürzungen.* AMI, akuter Myokardinfarkt; sCAD, stabile koronare Herzerkrankung; d, Tag.

#### 5.4. mRNA-Expression von TACE in Monozyten

Abbildung 6 und Tabelle 14 zeigen die relative mRNA-Expression von TACE in den jeweiligen Studiengruppen. Von Tag 1 zu Tag 3 nach einem AMI zeigte sich eine geringe, statistisch nicht signifikante, Zunahme der mRNA-Expression von TACE in Monozyten. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der mRNA-Expression von TACE zwischen AMI-Patienten an Tag 1 und Tag 3 und der sCAD- und Kontrollgruppe. Die TACE-Expression war in der sCAD-Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe ( $p = .003$ ).



**Abbildung 6:** Relative mRNA-Expression TACE in Monozyten

Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von TACE in Monozyten in den jeweiligen Studiengruppen. Auf der Y-Achse ist die n-fache mRNA-Expression ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) normalisiert auf die Expressionslevel von RPL-19 und in Bezug zur Kontrollgruppe aufgetragen, auf der X-Achse die Gruppen: AMI an Tag 1 und Tag 3,  $n=50$ ; sCAD,  $n=50$ ; Kontrollen,  $n=25$ ; oberer Whisker, Maximum ohne Ausreißer; unterer Whisker, Minimum ohne Ausreißer; °, milde Ausreißer ( $1.5 \cdot IQA - 3.0 \cdot IQA$ ); \*, extreme Ausreißer ( $>3.0 \cdot IQA$ ) *Abkürzungen.* AMI, akuter Myokardinfarkt; sCAD, stabile koronare Herzerkrankung; d, Tag; n, Anzahl; IQA, Interquartilsabstand.

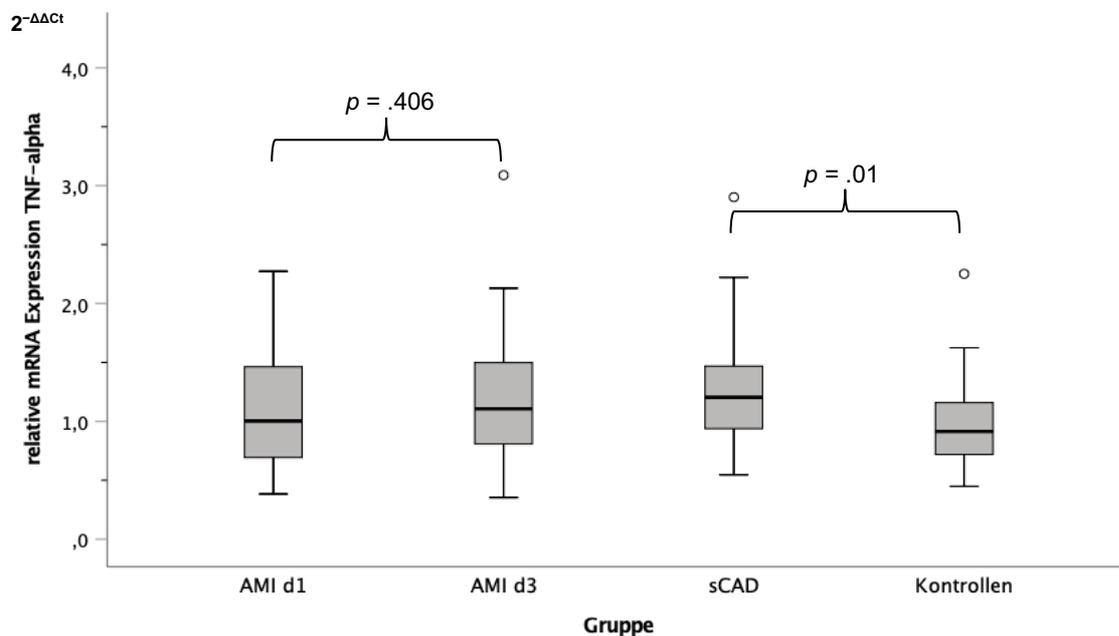
**Tabelle 14:** Relative mRNA-Expression von TACE und TNF- $\alpha$  in Monozyten in AMI-, sCAD- und Kontroll-Gruppe

Gen	AMI d1	AMI d3	sCAD	Kontrollen	$p$ -Wert	$p$ -Wert	$p$ -Wert	$p$ -Wert	$p$ -Wert
					AMI d1 vs. sCAD	AMI d3 vs. sCAD	AMI d1 vs. Kontrollen	AMI d3 vs. Kontrollen	sCAD vs. Kontrollen
TACE	1.07 (0.90–1.35)	1.10 (0.79–1.45)	1.24 (1.02–1.50)	0.96 (.84–1.17)	.52	.16	.13	.37	<b>.003</b>
TNF- $\alpha$	1.0 (0.68–1.47)	1.11 (0.82–1.51)	1.20 (0.94–1.48)	0.91 (0.72–1.23)	.16	.46	.45	.10	<b>.01</b>

*Anmerkung.* Angabe der Daten in Medianen mit Interquartilsabstand und Signifikanzniveaus im Gruppenvergleich; zur Vergleichbarkeit wurden die Gruppen auf das Expressionsniveau der Kontrollen normalisiert. *Abkürzungen.* AMI, akuter Myokardinfarkt; sCAD, stabile koronare Herzerkrankung; d, Tag.

## 5.5. mRNA-Expression von TNF- $\alpha$ in Monozyten

Abbildung 7 und Tabelle 14 zeigen die relative mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  in den jeweiligen Studiengruppen. Die mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  in Monozyten nahm innerhalb der AMI-Gruppe von Tag 1 zu Tag 3 gering, jedoch statistisch nicht signifikant, zu. Sowohl an Tag 1 als auch an Tag 3 nach einem AMI fanden sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der TNF- $\alpha$ -Expression zwischen der AMI- und sCAD-Gruppe. Die sCAD-Gruppe zeigte eine signifikant höhere mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  in Monozyten als die Kontroll-Gruppe ( $p = .01$ ). Zwischen der AMI- und der Kontrollgruppe ergaben sich trotz leicht höherer Werte in der AMI-Gruppe sowohl an Tag 1 als auch Tag 3 keine statistisch relevanten Unterschiede.

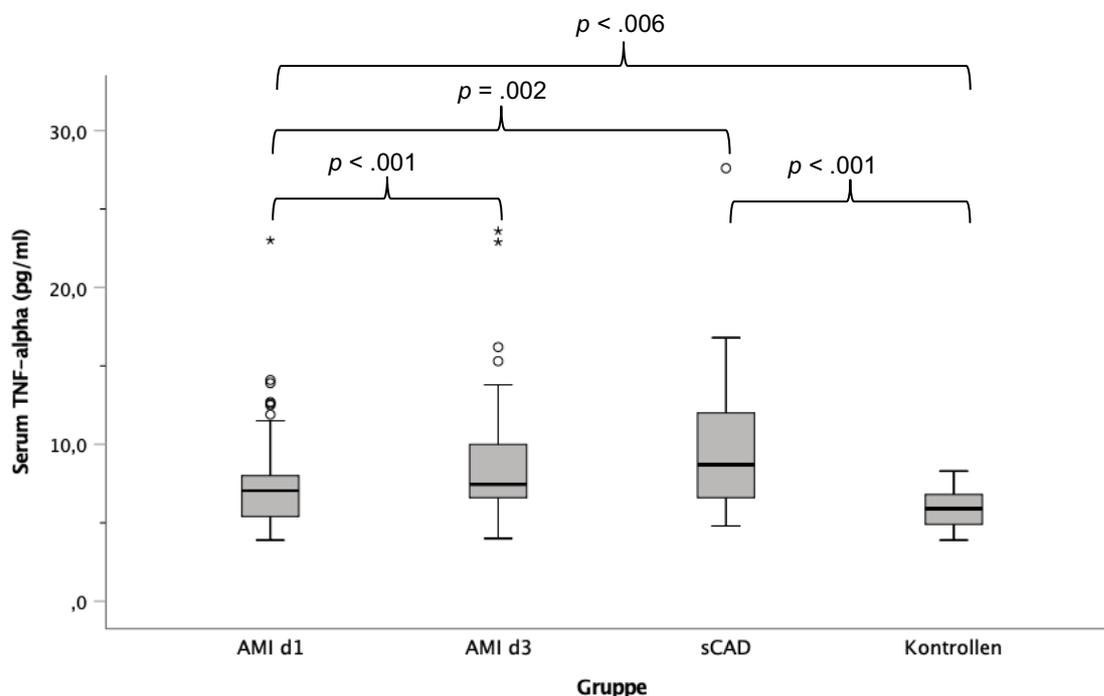


**Abbildung 7:** Relative mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  in Monozyten

Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  in Monozyten in den jeweiligen Studiengruppen. Auf der Y-Achse ist die n-fache mRNA-Expression ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) normalisiert auf die Expressionslevel von RPL-19 und in Bezug zur Kontrollgruppe aufgetragen, auf der X-Achse die Gruppen: AMI an Tag 1 und Tag 3,  $n=50$ ; sCAD,  $n=50$ ; Kontrollen,  $n=25$ ; oberer Whisker, Maximum ohne Ausreißer; unterer Whisker, Minimum ohne Ausreißer;  $\circ$ , milde Ausreißer ( $1.5 \cdot IQA - 3.0 \cdot IQA$ ). *Abkürzungen.* AMI, akuter Myokardinfarkt; sCAD, stabile koronare Herzerkrankung; d, Tag; n, Anzahl; IQA, Interquartilsabstand.

## 5.6. TNF- $\alpha$ Konzentration im Serum

Abbildung 8 und Tabelle 15 zeigen die Serum-TNF- $\alpha$  Konzentration in den jeweiligen Studiengruppen. In der AMI-Gruppe kam es von Tag 1 zu Tag 3 zu einem signifikanten Anstieg der Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentrationen ( $p < .001$ ). An Tag 1 und Tag 3 wies die AMI-Gruppe signifikant höhere TNF- $\alpha$ -Konzentrationen als die Kontrollgruppe auf. In der sCAD-Gruppe war die Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration ebenfalls signifikant höher als in Kontrollgruppe. An Tag 1 nach AMI war die Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration signifikant geringer als bei Patienten mit stabiler KHK. An Tag 3 nach AMI bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration in der AMI- und der sCAD-Gruppe (siehe Tabelle 15).



**Abbildung 8:** Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration

Dargestellt ist die Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration in den jeweiligen Studiengruppen. Auf der Y-Achse ist die Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration in pg/ml aufgetragen, auf der X-Achse die Gruppen: AMI an Tag 1 und Tag 3, n=50; sCAD, n=50; Kontrollen, n=25; oberer Whisker, Maximum ohne Ausreißer; unterer Whisker, Minimum ohne Ausreißer; °, milde Ausreißer ( $1.5 \cdot \text{IQA} - 3.0 \cdot \text{IQA}$ ); \*, extreme Ausreißer ( $>3.0 \cdot \text{IQA}$ ). *Abkürzungen.* AMI, akuter Myokardinfarkt; sCAD, stabile koronare Herzerkrankung; d, Tag; n, Anzahl; IQA, Interquartilsabstand.

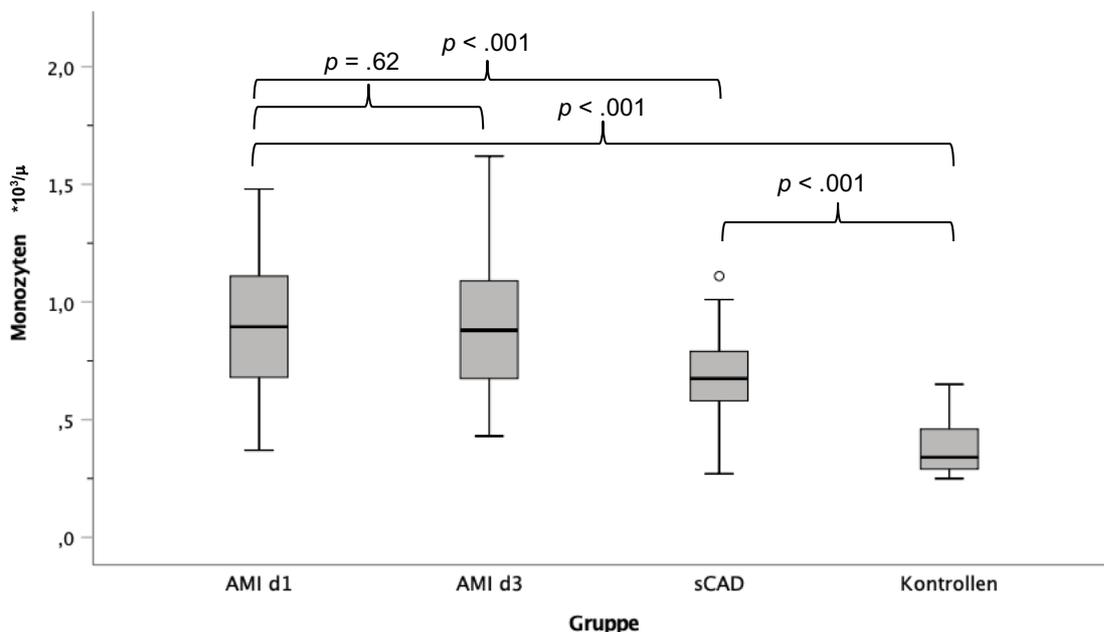
**Tabelle 15:** Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in der AMI-, sCAD- und Kontroll-Gruppe

Gruppen	TNF- $\alpha$ , pg/ml	p-Wert AMI d1 vs. sCAD	p-Wert AMI d3 vs. sCAD	p-Wert AMI d1 vs. Kontrollen
AMI d1	7,05 (5,4-8,0)			
AMI d3	7,45 (6,6-10,0)	<b>.002</b>	.235	<b>.006</b>
sCAD	8,70 (6,6-12,0)			
Kontrollen	5,90 (4,9-6,8)			

*Anmerkung.* Angabe der Daten in Medianen mit Interquartilsabstand und Signifikanzniveaus im Gruppenvergleich. *Abkürzungen.* AMI, akuter Myokardinfarkt; sCAD, stabile koronare Herzerkrankung; d, Tag.

## 5.7. Absolute Monozytenzahl

Abbildung 9 zeigt die absoluten Monozytenzahlen der verschiedenen Studiengruppen. Von Tag 1 ( $M = 889.1/\mu\text{l}$ ,  $SD = 294.36$ ) zu Tag 3 ( $M = 908.8/\mu\text{l}$ ,  $SD = 283.65$ ) nach AMI kam es zu keinem signifikanten Anstieg des Monozytengehalts im Blut ( $p = .62$ ). Der Monozytengehalt im Blut war bei Patienten mit AMI sowohl an Tag 1 ( $p < .001$ ) als auch an Tag 3 ( $p < .001$ ) signifikant höher als in der Kontrollgruppe ( $M = 374,7/\mu\text{l}$ ;  $SD = 105$ ). Auch im Vergleich zur sCAD-Gruppe ( $M = 694.4/\mu\text{l}$ ,  $SD = 167,20$ ) war der Monozytengehalt in der AMI-Gruppe an Tag zu beiden Messzeitpunkten (Tag 1:  $p < .001$ , Tag 3:  $p < .001$ ) signifikant höher. Insgesamt zeigte die Kontrollgruppe den geringsten Gehalt an zirkulierenden Monozyten.

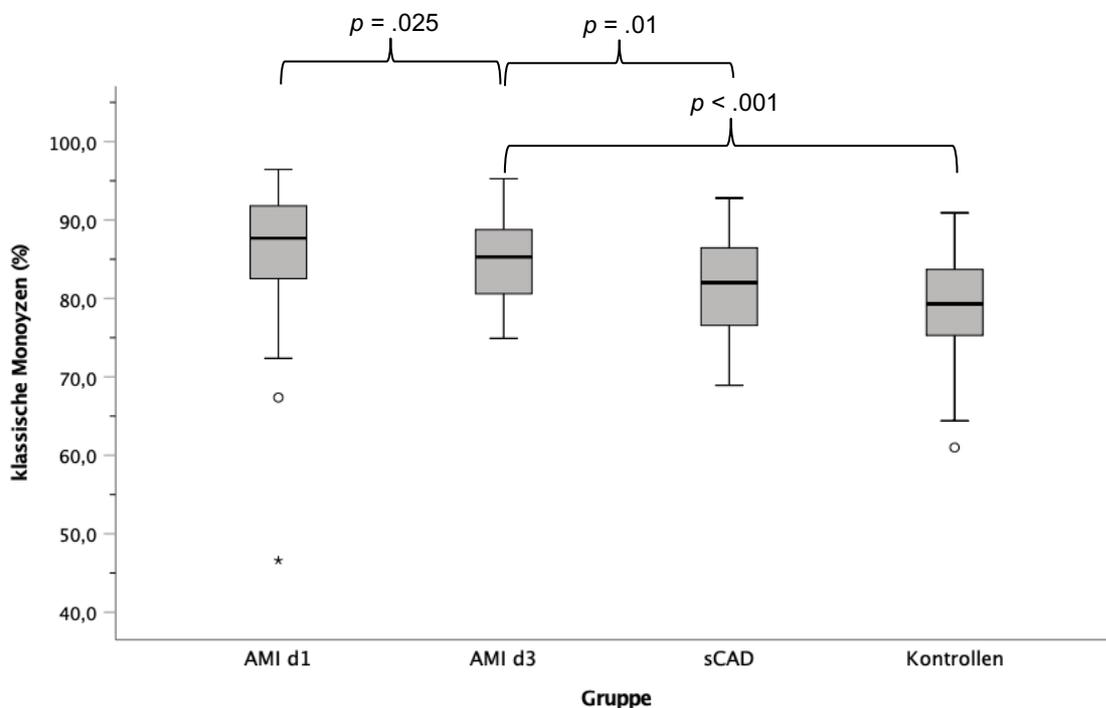


**Abbildung 9:** Absolute Monozytenzahl im Blut

Dargestellt ist die absolute Monozytenzahl in den jeweiligen Studiengruppen. Auf der Y-Achse ist die Monozytenzahl\*10<sup>3</sup>/μl aufgetragen, auf der X-Achse die Gruppen: AMI an Tag 1 und Tag 3, n=50; sCAD, n=50; Kontrollen, n=25; oberer Whisker, Maximum ohne Ausreißer; unterer Whisker, Minimum ohne Ausreißer; °, milde Ausreißer (1.5\*IQA – 3.0\*IQA). *Abkürzungen.* AMI, akuter Myokardinfarkt; sCAD, stabile koronare Herzerkrankung; d, Tag; n, Anzahl; IQA, Interquartilsabstand.

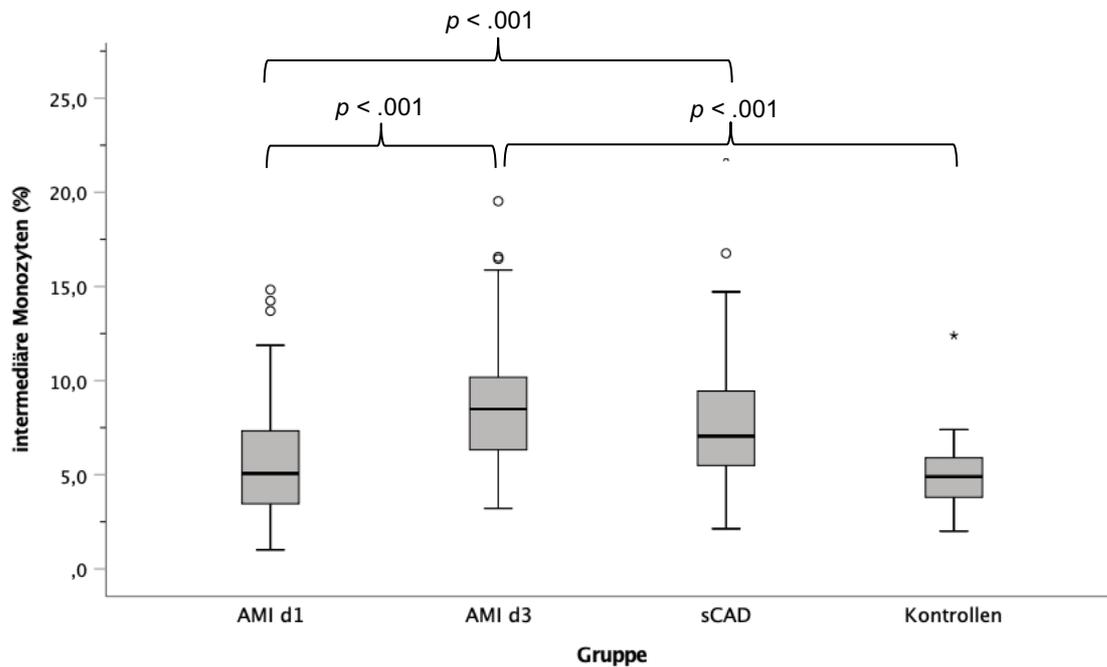
## 5.8. Monozyten-Subpopulationen

Abbildungen 10, 11 und 12 zeigen den jeweiligen Anteil der drei Monozyten-Subpopulationen (klassische, intermediäre und nicht-klassische Monozyten) an der Monozytengesamtpopulation, unterteilt nach den Studiengruppen. In der AMI-Gruppe kam es von Tag 1 zu Tag 3 zu einer signifikanten Zunahme des relativen Anteils der intermediären Monozyten ( $p < .001$ ). Parallel hierzu nahm der Anteil der klassischen Monozyten von Tag 1 zu Tag 3 signifikant ab ( $p = .025$ ). Bei den nicht-klassischen Monozyten fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zeitpunkten. In der sCAD-Gruppe war der Anteil intermediärer Monozyten signifikant höher als in der AMI-Gruppe an Tag 1. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied im Anteil intermediärer Monozyten zwischen der sCAD-Gruppe und der AMI-Gruppe an Tag 3. Der Anteil an klassischen Monozyten war in der AMI-Gruppe sowohl an Tag 1 als auch an Tag 3 signifikant höher als in der sCAD-Gruppe. Der Anteil der intermediären Monozyten der Kontroll-Gruppe unterscheidet sich gegenüber der AMI-Gruppe an Tag 1 nicht signifikant. Am Tag 3 nach AMI war der Anteil intermediärer Monozyten im Blut hingegen signifikant größer als bei den Kontrollen. Der Anteil nicht-klassischer Monozyten war in der AMI-Gruppe zu beiden Zeitpunkten signifikant geringer als in der sCAD- und Kontroll-Gruppe (siehe Tabelle 16).



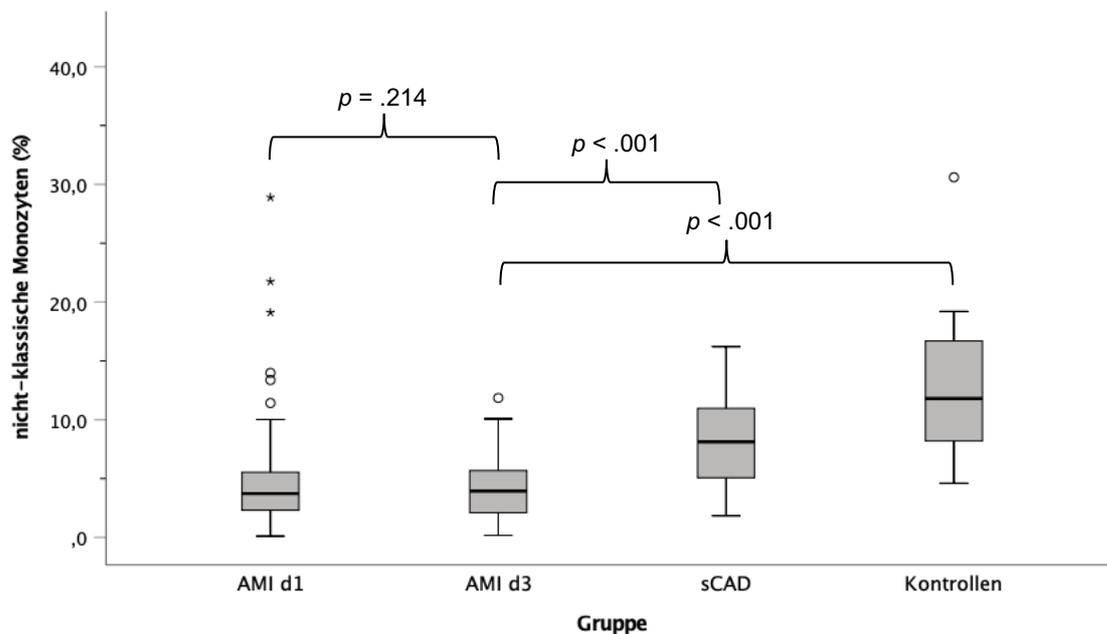
**Abbildung 10:** *Klassische Monozyten*

Dargestellt ist der relative Anteil klassischer Monozyten an der Monozytengesamtpopulation in den jeweiligen Studiengruppen. Auf der Y-Achse ist der Anteil klassischer Monozyten in Prozent aufgetragen, auf der X-Achse die Gruppen: AMI an Tag 1 und Tag 3,  $n=50$ ; sCAD,  $n=50$ ; Kontrollen,  $n=25$ ; oberer Whisker, Maximum ohne Ausreißer; unterer Whisker, Minimum ohne Ausreißer; °, milde Ausreißer ( $1.5 \cdot IQA - 3.0 \cdot IQA$ ); \*, extreme Ausreißer ( $>3.0 \cdot IQA$ ). *Abkürzungen.* AMI, akuter Myokardinfarkt; sCAD, stabile koronare Herzerkrankung; d, Tag; n, Anzahl; IQA, Interquartilsabstand.



**Abbildung 11: Intermediäre Monozyten**

Dargestellt ist der relative Anteil intermediärer Monozyten an der Monozytengesamtpopulation in den jeweiligen Studiengruppen. Auf der Y-Achse ist der Anteil klassischer Monozyten in Prozent aufgetragen, auf der X-Achse die Gruppen: AMI an Tag 1 und Tag 3, n=50; sCAD, n=50; Kontrollen, n=25; oberer Whisker, Maximum ohne Ausreißer; unterer Whisker, Minimum ohne Ausreißer; °, milde Ausreißer (1.5\*IQA – 3.0\*IQA); \*, extreme Ausreißer (>3,0\*IQA). *Abkürzungen.* AMI, akuter Myokardinfarkt; sCAD, stabile koronare Herzerkrankung; d, Tag; n, Anzahl; IQA, Interquartilsabstand.



**Abbildung 12: Nicht-klassische Monozyten**

Dargestellt ist der relative Anteil nicht-klassischer Monozyten an der Monozytengesamtpopulation in den jeweiligen Studiengruppen. Auf der Y-Achse ist der Anteil klassischer Monozyten in Prozent aufgetragen, auf der X-Achse die Gruppen: AMI an Tag 1 und Tag 3, n=50; sCAD, n=50; Kontrollen, n=25; oberer Whisker, Maximum ohne Ausreißer; unterer Whisker, Minimum ohne Ausreißer; °, milde Ausreißer (1.5\*IQA – 3.0\*IQA); \*, extreme Ausreißer (>3,0\*IQA). *Abkürzungen.* AMI, akuter Myokardinfarkt; sCAD, stabile koronare Herzerkrankung; d, Tag; n, Anzahl; IQA, Interquartilsabstand.

**Tabelle 16:** Relativer Anteil der Monozyten-Subpopulationen an der Monozytengesamtpopulation in AMI-, sCAD- und Kontroll-Gruppe

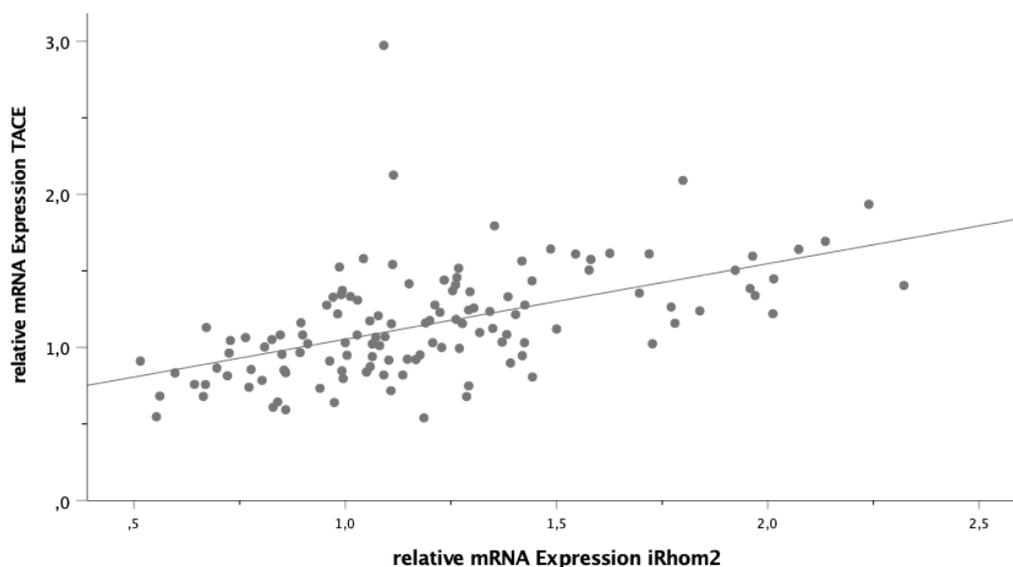
Monozyten Subtypen (%)	AMI d1	AMI d3	sCAD	Kontrollen	p-Wert AMI d1 vs. sCAD	p-Wert AMI d3 vs. sCAD	p-Wert AMI d1 vs. Kontrollen	p-Wert AMI d3 vs. Kontrollen
<b>Klassische Monozyten</b>	87.68 (82.47-91.83)	85.30 (80.81-88.79)	82.02 (76.55-86.53)	79.30 (75.10-83.95)	< .001	.010	< .001	< .001
<b>Intermediäre Monozyten</b>	5.07 (3.37-7.40)	8.50 (6.32-10.2)	7.05 (5.48-9.65)	4.90 (3.75-5.95)	< .001	.142	.552	< .001
<b>Nicht-Klassische Monozyten</b>	3.72 (2.30-5.60)	3.93 (2.08-5.68)	8.12 (5.02-11.06)	11.80 (7.65-17.95)	< .001	< .001	< .001	< .001

Anmerkung. Angabe der Daten in Medianen mit Interquartilsabstand und Signifikanzniveaus im Gruppenvergleich. Abkürzungen. AMI, akuter Myokardinfarkt; sCAD, stabile koronare Herzerkrankung; d, Tag.

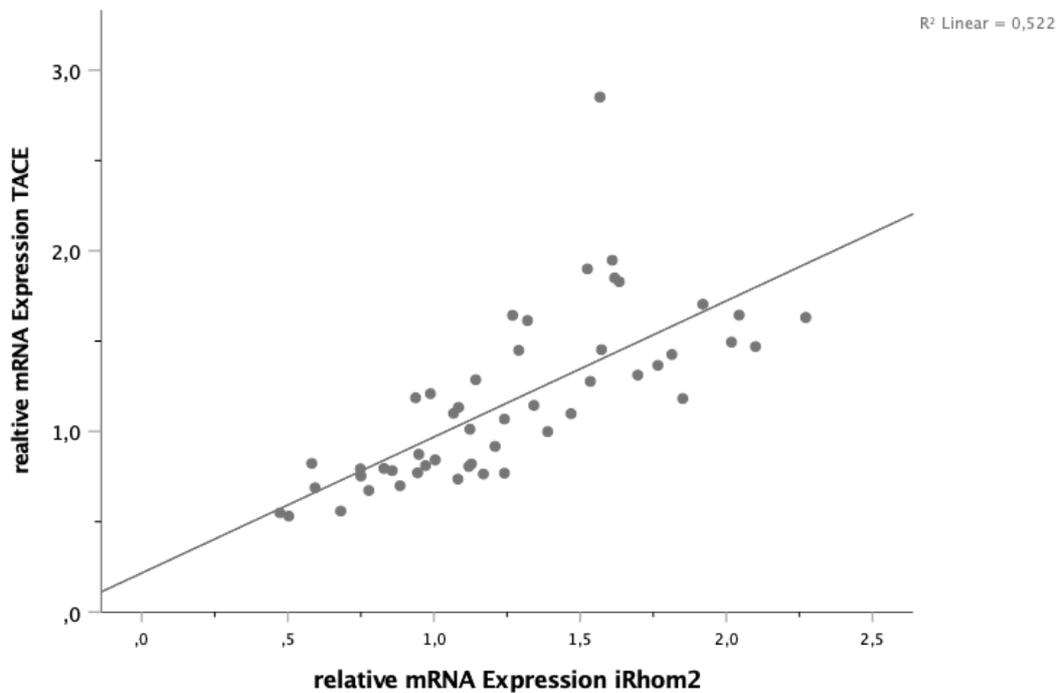
## 5.9. Korrelationen

### 5.9.1. Korrelation: mRNA-Expression von iRhom2 und TACE in Monozyten

Die Korrelation zwischen der mRNA-Expression von iRhom2 und TACE in Monozyten von AMI-Patienten (Tag 1), sCAD-Patienten und Kontrollen ist im Streudiagramm (siehe Abbildung 13) dargestellt. Bei Betrachtung aller Studienteilnehmer zum Messzeitpunkt Tag 1 zeigte sich eine stark positive Korrelation zwischen der mRNA-Expression von TACE und iRhom2 in Monozyten (Spearman  $r_s = .60, p < .001$ ). Bei der isolierten Betrachtung der AMI-Gruppe ergab sich an Tag 1 eine Korrelation mittlerer Stärke (Spearman  $r_s = .42, p = .002$ ) zwischen den beiden Parametern, während sich an Tag 3 eine starke positive Korrelation (Pearson  $r = .72, p < .001$ ; Spearman  $r_s = .82, p < .001$ ) zwischen der Expression von iRhom2 und TACE zeigte (siehe Abbildung 14).



**Abbildung 13:** Streudiagramm – relative mRNA-Expression TACE vs. iRhom2 in zirkulierenden Monozyten aller Studienteilnehmer (in der AMI-Gruppe am Tag 1)



**Abbildung 14:** Streudiagramm – relative mRNA-Expression TACE vs. iRhom2 in zirkulierenden Monozyten an Tag 3 nach AMI

### 5.9.2. Korrelation: mRNA-Expression von iRhom2 und TNF- $\alpha$ in Monozyten

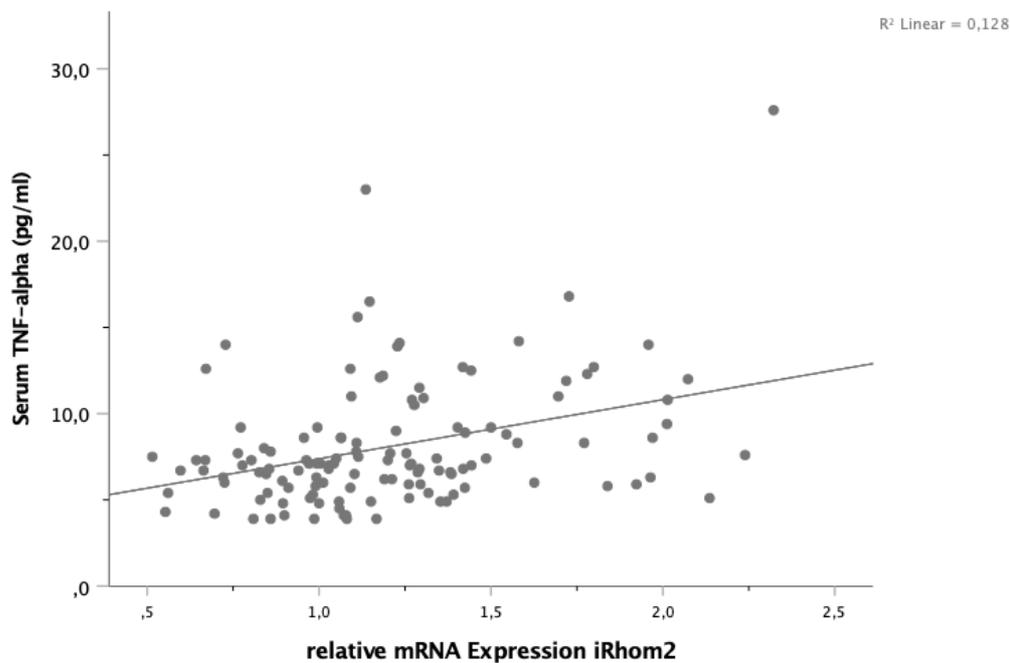
Es zeigte sich eine schwach positive, jedoch statistisch signifikante Korrelation zwischen der mRNA-Expression von iRhom2 und TNF- $\alpha$  in Monozyten aller Studienteilnehmer zum Messzeitpunkt Tag 1 (Spearman  $r_s = .25$ ,  $p = .006$ ).

Bei isolierter Betrachtung der einzelnen Studiengruppen zeigte sich sowohl für die sCAD-Gruppe (Spearman  $r_s = .34$ ,  $p = .015$ ) als auch für die Kontroll-Gruppe (Spearman  $r_s = .48$ ,  $p = .017$ ) eine signifikante positive Korrelation, während in der AMI-Gruppe sowohl an Tag 1 (Spearman  $r_s = -.194$ ,  $p = .18$ ) als auch an Tag 3 (Pearson  $r = -.016$ ,  $p = .91$ ) keine signifikante Korrelation bestand.

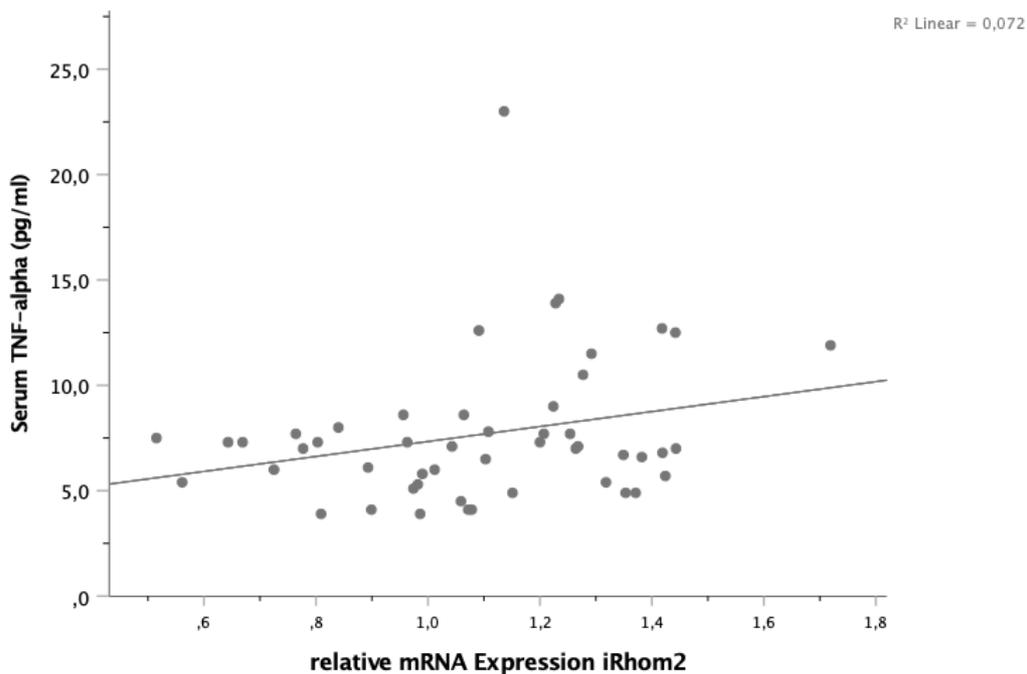
### 5.9.3. Korrelation: mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten und TNF- $\alpha$ im Serum

Es bestand eine moderate positive Korrelation zwischen der mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten und der Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration aller Studienteilnehmer zum Messzeitpunkt Tag 1 (Spearman  $r_s = .32$ ,  $p < .001$ ) (siehe Abbildung 15). Bei isolierter Betrachtung der AMI-Gruppe an Tag 3 nach AMI war ebenfalls eine positive Korrelation mittlerer Stärke zwischen den beiden Parametern nachweisbar (Spearman  $r_s = .33$ ,  $p = .019$ ) (siehe Abbildung 17).

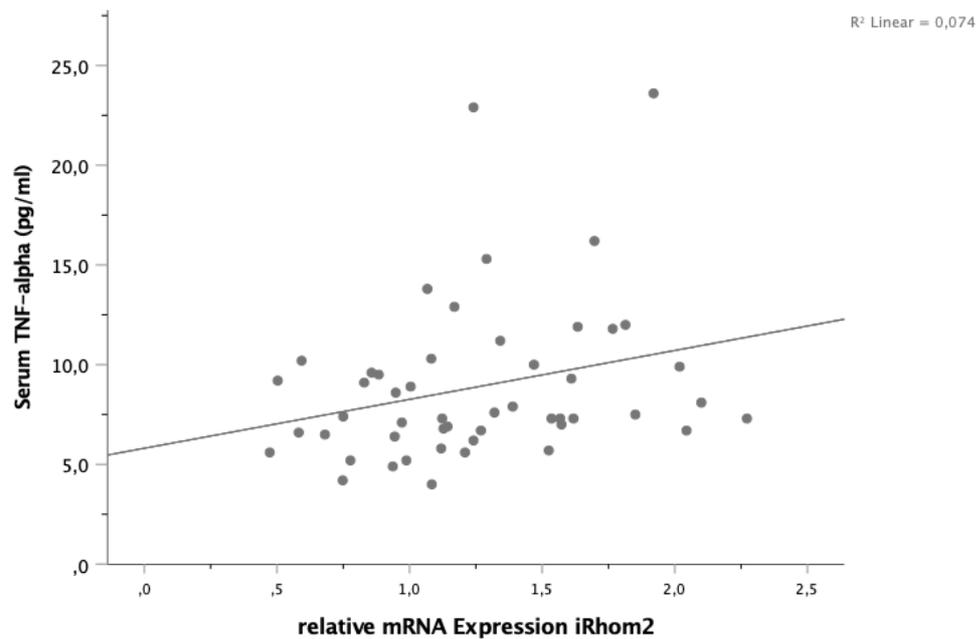
An Tag 1 nach AMI bestand hingegen kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden Parametern (Spearman  $r_s = .20$ ,  $p = .163$ ) (Abbildung 16). Weitere erhobene Entzündungsparameter im Blut der Patienten mit AMI korrelierten nicht signifikant mit der mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten (siehe Tabelle 17).



**Abbildung 15:** Streudiagramm – relative mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten vs. Serum-TNF- $\alpha$  aller Studienteilnehmer (in der AMI-Gruppe Tag 1)



**Abbildung 16:** Streudiagramm – relative mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten vs. Serum-TNF- $\alpha$  an Tag 1 nach AMI



**Abbildung 17:** Streudiagramm – relative mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten vs. Serum-TNF- $\alpha$  an Tag 3 nach AMI

**Tabelle 17:** Korrelation – relative mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten vs. Serum-CRP und Serum-IL-6 an Tag 1 und 3 nach AMI ( $n = 50$ )

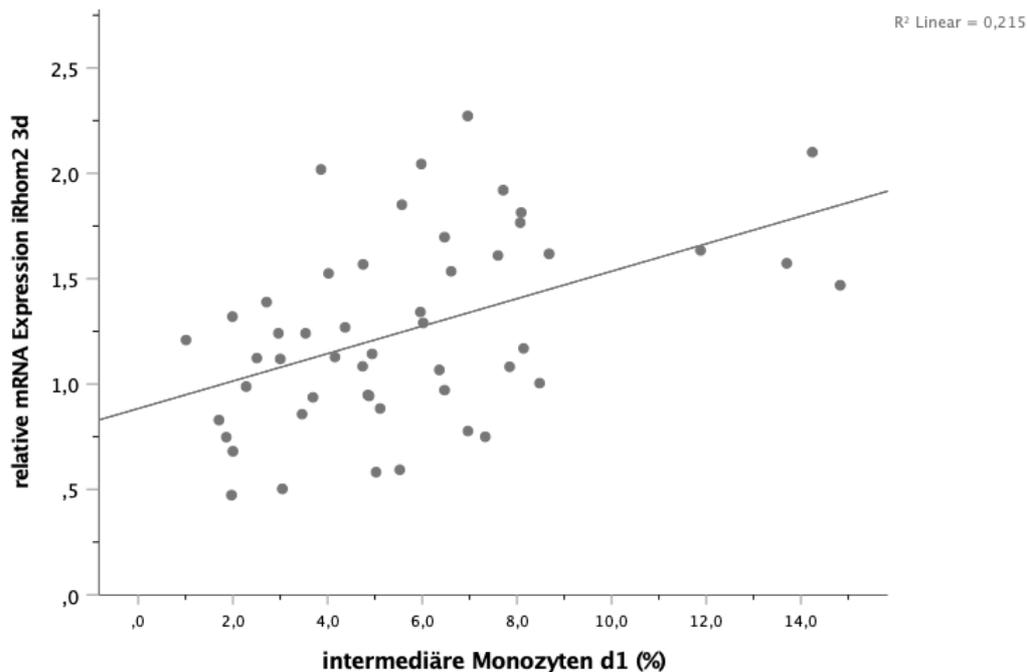
			CRP d1	IL-6 d1
Spearman-Rho	<b>iRhom2 d1</b>	Korrelationskoeffizient	.198	.233
		$p$ -Wert	.167	.104
			CRP d3 <sup>a)</sup>	IL-6 d3 <sup>b)</sup>
Spearman-Rho	<b>iRhom2 d3</b>	Korrelationskoeffizient	.231	.279
		$p$ -Wert	.110	.055

Anmerkung. a)  $n = 49$ , b)  $n = 48$ . Abkürzungen. CRP, C-reaktives Protein; IL-6, Interleukin-6; d, Tag; AMI, akuter Myokardinfarkt.

#### 5.9.4. Korrelation: mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten und zirkulierenden intermediären Monozyten

Bei Betrachtung aller Studienteilnehmer zum Messzeitpunkt Tag 1 zeigte sich eine geringe positive Korrelation zwischen der mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten und dem relativen Anteil an zirkulierenden intermediären Monozyten (Spearman  $r_s = .20$ ,  $p = .024$ ). In der isolierten Betrachtung der AMI-Gruppe fand sich an Tag 3 nach AMI eine positive Korrelation mittlerer Stärke zwischen den beiden Parametern (Spearman  $r_s = .37$ ,  $p = .009$ ). Zudem bestand bei Patienten mit AMI eine signifikante positive Korrelation zwischen dem Anteil zirkulierender intermediärer Monozyten an Tag 1 und der mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten an Tag 3 (Spearman  $r_s = .46$ ,  $p = .001$ ) (siehe Abbildung 18).

Dem gegenüber fand sich eine negative Korrelation zwischen dem Anteil klassischer Monozyten an Tag 1 und der mRNA-Expression von iRhom2 an Tag 3 nach AMI (Spearman  $r_s = -.34$ ,  $p = .017$ ). Weitere relevante Korrelationen zwischen klassischen und nicht-klassischen Monozyten und der mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten nach AMI waren nicht nachweisbar (siehe Tabelle 18). Auch zwischen der mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten und den absoluten Leukozyten- sowie Monozytenzahlen fanden sich an Tag 1 und Tag 3 nach AMI keine signifikanten Korrelationen (siehe Tabelle 19).



**Abbildung 18:** Streudiagramm – Anteil zirkulierender intermediärer Monozyten an Tag 1 vs. relative mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten an Tag 3 nach AMI

**Tabelle 18:** Korrelation – relative mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten vs. Anteil zirkulierender klassischer- und nicht-klassischer Monozyten an Tag 1 und Tag 3 nach AMI

			<b>iRhom2 1d</b>	<b>iRhom2 3d</b>
Spearman-Rho	<b>Klassische Monozyten d1</b>	Korrelationskoeffizient	.041	-.336
		$p$ -Wert	.776	<b>.017</b>
		n	50	50
	<b>Klassische Monozyten d3</b>	Korrelationskoeffizient	.027	-.185
		$p$ -Wert	.853	.199
		n	50	50
	<b>Nicht-Klassische Monozyten d1</b>	Korrelationskoeffizient	-.082	.167
		$p$ -Wert	.569	.246
		n	50	50
	<b>Nicht-Klassische Monozyten d3</b>	Korrelationskoeffizient	-.024	.051
		$p$ -Wert	.868	.723
		n	50	50

Abkürzungen. n, Anzahl; d, Tag; AMI, akuter Myokardinfarkt.

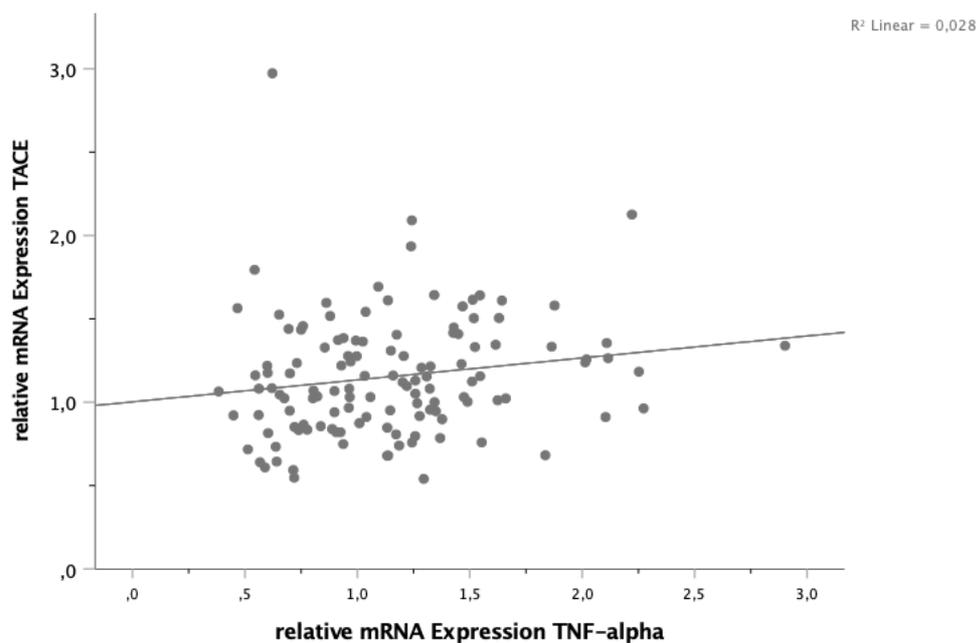
**Tabelle 19:** Korrelation – relative mRNA-Expression von *iRhom2* in Monozyten vs. Gehalt an Monozyten und Leukozyten im Blut an Tag 1 und Tag 3 nach AMI

			iRhom2 d1	iRhom2 d3
Spearman-Rho	<b>Monozyten d1</b>	Korrelationskoeffizient	.082	- .159
		<i>p</i> -Wert	.569	.271
		n	50	50
	<b>Monozyten d3</b>	Korrelationskoeffizient	.057	- .174
		<i>p</i> -Wert	.698	.236
		n	48	48
	<b>Leukozyten d1</b>	Korrelationskoeffizient	.120	- .780
		<i>p</i> -Wert	.407	.593
		n	50	50
	<b>Leukozyten d3</b>	Korrelationskoeffizient	.108	.084
		<i>p</i> -Wert	.456	.561
		n	50	50

Abkürzungen. n, Anzahl; d, Tag; AMI, akuter Myokardinfarkt.

### 5.9.1. Korrelation: mRNA-Expression von TACE und TNF- $\alpha$ in Monozyten

Für die mRNA-Expression von TACE und TNF- $\alpha$  in Monozyten aller Studienteilnehmer zum Messzeitpunkt Tag 1 zeigte sich eine schwach positive Korrelation (Spearman  $r_s = .21$ ,  $p = .017$ ) (siehe Abbildung 19). Bei isolierter Betrachtung der AMI-Gruppe zeigte sich an Tag 1 (Spearman  $r_s = -.15$ ,  $p = .29$ ) und Tag 3 (Spearman  $r_s = -.16$ ,  $p = .26$ ) nach AMI keine signifikante Korrelation zwischen den beiden Parametern. Sowohl in der Kontrollgruppe (Spearman  $r_s = .42$ ,  $p = .04$ ) als auch in der sCAD-Gruppe (Spearman  $r_s = .47$ ,  $p = .001$ ) fand sich hingegen eine moderate Korrelation zwischen der mRNA-Expression von TACE und TNF- $\alpha$  in Monozyten.



**Abbildung 19:** Streudiagramm – relative mRNA-Expression von TACE vs. TNF- $\alpha$  in Monozyten aller Studienteilnehmer (in der AMI-Gruppe an Tag 1)

### 5.9.2. Korrelation: Anteil zirkulierender intermediärer Monozyten und Serum-TNF- $\alpha$

Es bestand eine moderate Korrelation zwischen dem Anteil zirkulierender intermediärer Monozyten und der Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration aller Studienteilnehmer zum Messzeitpunkt Tag 1 (Spearman  $r_s = .39, p < .001$ ).

Die isolierte Betrachtung der AMI-Gruppe ergab sowohl an Tag 1 (Spearman  $r_s = .40, p = .004$ , moderat) als auch an Tag 3 ( $r_s = .29, p = .039$ , schwach bis moderat) eine signifikante Korrelation beider Parameter. Zudem zeigte sich in der AMI-Gruppe eine moderate Korrelation zwischen dem Anteil der zirkulierenden intermediären Monozyten an Tag 1 und der Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration an Tag 3 nach AMI (Spearman  $r_s = .45, p = .001$ ).

Zwischen dem Anteil an zirkulierenden klassischen Monozyten und der Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration konnte an Tag 1 nach AMI eine statistisch nicht signifikante negative Korrelation (Spearman  $r_s = -.25, p = .83$ ), und an Tag 3 nach AMI eine signifikant negative Korrelation mittlerer Stärke (Spearman  $r_s = -.34, p = .014$ ) nachgewiesen werden. Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen der absoluten Leukozyten-, Lymphozyten- sowie Monozytenzahl und der Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration an Tag 1 und Tag 3 nach AMI nachgewiesen werden (siehe Tabelle 20). Auch bestand keine signifikante Korrelation zwischen der CRP- sowie IL-6-Konzentration im Serum und dem Anteil intermediärer Monozyten im Blut (siehe Tabelle 21).

**Tabelle 20:** Korrelation – Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration vs. Gehalt an Leukozyten, Lymphozyten, sowie Monozyten im Blut an Tag 1 und Tag 3 nach AMI

			Serum-TNF- $\alpha$ d1	Serum-TNF- $\alpha$ d3
Spearman-Rho	<b>Leukozyten d1</b>	Korrelationskoeffizient	-.107	-.150
		<i>p</i> -Wert	.460	.298
	<b>Leukozyten d3</b>	Korrelationskoeffizient	.016	.021
		<i>p</i> -Wert	.911	.886
	<b>Lymphozyten d1</b>	Korrelationskoeffizient	.118	.058
		<i>p</i> -Wert	.413	.690
	<b>Lymphozyten d3*</b>	Korrelationskoeffizient	.151	.147
		<i>p</i> -Wert	.306	.319
	<b>Monozyten d1</b>	Korrelationskoeffizient	.025	-.022
		<i>p</i> -Wert	.865	.881
	<b>Monozyten d3*</b>	Korrelationskoeffizient	-.003	.062
		<i>p</i> -Wert	.983	.678

Anmerkung. \*, n=48 Patienten. Abkürzungen. d, Tag; AMI, akuter Myokardinfarkt.

**Tabelle 21:** Korrelation – Anteil zirkulierender intermediärer Monozyten vs. Serum-CRP und Serum-IL-6 an Tag 1 und Tag 3 nach AMI

		Intermediäre Monozyten d1	Intermediäre Monozyten d3	IL-6 d1	IL-6 d3	CRP d1	CRP d3
Spearman- Rho	<b>Intermediäre Monozyten d1</b>	Korrelationskoeffizient	.598**	.206	.116	.165	-.091
		p-Wert	<.001	.151	.431	.251	.534
		N	50	50	48	50	49
	<b>Intermediäre Monozyten 3d</b>	Korrelationskoeffizient	.598**	.318*	.074	.060	.096
		p-Wert	<.001	.025	.616	.678	.513
		N	50	50	48	50	49
	<b>IL-6 d1</b>	Korrelationskoeffizient	.206	.318*	.412**	.590**	.526**
		p-Wert	.151	.025	.004	<.001	<.001
		N	50	50	48	50	49
	<b>IL-6 d3</b>	Korrelationskoeffizient	.116	.074	.412**	.362*	.722**
		p-Wert	.431	.616	.004	.011	<.001
		N	48	48	48	48	48
	<b>CRP d1</b>	Korrelationskoeffizient	.165	.060	.590**	.362*	.553**
		p-Wert	.251	.678	<.001	.011	<.001
		N	50	50	50	48	49
	<b>CRP d3</b>	Korrelationskoeffizient	-.091	.096	.526**	.722**	.553**
		p-Wert	.534	.513	<.001	<.001	<.001
		N	49	49	49	48	49

Anmerkung. \*\*, Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig); \*, Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig). *Abkürzungen.* CRP, C-reaktives Protein; IL-6, Interleukin-6; d, Tag; AMI, akuter Myokardinfarkt.

## 6. Diskussion

Bei der vorliegenden Dissertation handelt es sich um eine Pilotstudie in der erstmalig die Genexpression von iRhom2 in Monozyten bei Patienten mit AMI untersucht wurde. Ziel der Studie war es herauszufinden, ob es infolge eines AMI zu Veränderungen in der mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten kommt, welche Hinweise auf eine regulatorische Beteiligung an der systemischen TNF- $\alpha$ -Sekretion nach einem AMI geben. Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten nach einem AMI signifikant ansteigt, während sich die mRNA-Expression von TACE und TNF- $\alpha$  nicht wesentlich veränderte. Dabei korrelierte an Tag 3 nach AMI die mRNA-Expression von iRhom2 mit der Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration, sowie dem Anteil an zirkulierenden intermediären Monozyten im Blut. Bisher war die mRNA-Expression von iRhom2 in humanen Monozyten im Verlauf eines AMI noch nicht untersucht worden.

Es ist bekannt, dass die Konzentration von TNF- $\alpha$  im Blut<sup>62,63,65,66</sup> (wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt) und Myokard<sup>44</sup> infolge eines AMI ansteigt und eine wichtige Rolle bei der Mediation nachfolgender inflammatorischer Prozesse spielt. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass eine dysregulierte postischämische Entzündungsreaktion ein ungünstiges kardiales Remodeling verursacht und somit die Entwicklung einer Herzinsuffizienz in der Folge begünstigen kann.<sup>16,20,32,67,141</sup>

Die pharmakologische Inhibition von TNF- $\alpha$  in diesem Setting könnte daher einen sinnvollen Weg darstellen, kardiales Remodeling gezielt zu begrenzen und damit möglicherweise die Prognose von Patienten mit AMI zu verbessern.

Entgegen vieler Hoffnungen, die man mit diesem Ansatz aufgrund präklinischer Erfolge verbindet, erbrachten klinische Studien mit etablierten TNF-Antagonisten am Menschen widersprüchliche Ergebnisse: Während die Gabe des TNF- $\alpha$ -Inhibitors Etanercept an Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz in zwei kleineren Studien die LVEF, Laufristanz und Lebensqualität verbesserte und das linksventrikuläre Volumen verringerte<sup>148,149</sup>, kam eine andere randomisiert kontrollierte Studie (RCT) mit dem TNF- $\alpha$ -Antikörper Infliximab zu dem Ergebnis, dass die Gabe in geringer Dosis zu keiner Verbesserung der Symptome führte und höhere Dosen des Antikörpers den klinischen Zustand der Patienten sogar verschlechterte.<sup>150</sup>

Um den klinischen Nutzen von Etanercept in verschiedenen Dosierungen bei bestehender Herzinsuffizienz in größerem Umfang zu evaluieren, fasste man 2004 die Ergebnisse zweier groß angelegter RCTs (*Randomized Etanercept North American Strategy to Study Antagonism of Cytokines*, RENAISSANCE, und *Research into Etanercept Cytokine antagonism in Ventricular dysfunction*, RECOVER) im Rahmen der *Results of the Randomized Etanercept Worldwide Evaluation* (RENEWAL)-Studie zusammen.<sup>151</sup> Da ein therapeutischer Nutzen von Etanercept hinsichtlich der primären Endpunkte Tod und Hospitalisierungsrate aufgrund von Herzinsuffizienz ausblieb, wurden beide Studien jedoch vorzeitig beendet.<sup>151</sup> Auch die LVEF und Dyspnoe-Symptomatik (klassifiziert nach *New York Heart Association*) konnte durch die Gabe von Etanercept nicht verbessert werden.

Erklärungsansätze für die negativen Ergebnisse dieser Interventionsstudien bieten insbesondere die äußerst komplexen und noch immer nicht vollständig aufgeklärten Wirkungen, welche TNF- $\alpha$  auf das Myokard ausübt. So ist bekannt, dass TNF- $\alpha$  in physiologischen Konzentrationen neben der prominenten zytotoxischen Rolle auch protektive Funktionen und Wirkungen auf das ischämische Myokard hat.<sup>50,152</sup>

Aufgrund dieser ambivalenten Effekte von TNF- $\alpha$  im Rahmen kardialer und systemischer Inflammation sowie beim kardialen Remodeling<sup>40,50,79</sup>, ist anzunehmen, dass die undifferenzierte Inhibition von TNF- $\alpha$ , wie sie von den Medikamenten Etanercept und Infliximab ausgeht, sowohl zytotoxische als auch protektive Wirkungen von TNF- $\alpha$  unterdrückt und dementsprechend nicht zielführend ist.

Klinische Studien zum Einsatz von etablierten TNF- $\alpha$ -Antagonisten an Patienten mit AMI zur Reduktion von kardialen Remodeling und kardiovaskulären Ereignissen existieren zum gegenwärtigen Zeitpunkt hingegen nicht, obwohl zahlreiche Tiermodell-Studien diesbezüglich vielversprechende Ergebnisse erbrachten.<sup>87-89</sup> Die Ergebnisse der RENEWAL-Studie sprechen daher zwar gegen einen klinischen Nutzen der Gabe von systemischen TNF- $\alpha$ -Antagonisten bei bestehender Herzinsuffizienz, adressieren jedoch nicht die akuten Remodelingprozesse infolge eines AMI. Die Frage nach der Möglichkeit einer Prävention von ungünstigem kardialen Remodeling nach AMI mittels Inhibition von TNF- $\alpha$  bleibt somit weiterhin unbeantwortet.

Zudem stehen den Ergebnissen der RENEWAL-Studie große Registerstudien an Patienten mit rheumatoider Arthritis gegenüber, in denen sich zeigte, dass Patienten die mit TNF- $\alpha$ -Antagonisten behandelt wurden, ein signifikant geringeres Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse,

wie zum Beispiel einen AMI<sup>153-155</sup>, im Vergleich zu Patienten die nicht mit TNF- $\alpha$ -Antagonisten behandelt wurden aufwiesen.

Daher erscheint es insbesondere nach den negativen Ergebnissen der RENEWAL-Studie sinnvoll, alternative Wege zur selektiveren TNF- $\alpha$ -Inhibition zu untersuchen, mit denen es gelingt die schädlichen kardialen Effekte von TNF- $\alpha$  zu hemmen und gleichzeitig protektive Wirkungen zu bewahren.

Die erst seit einigen Jahren beschriebene und in der vorliegenden Dissertation untersuchte iRhom2-TACE-TNF- $\alpha$ -Signalachse ist essentiell für die Freisetzung von löslichem TNF- $\alpha$  aus hämatopoetischen Zellen und bietet somit einen neuartigen und selektiven Ansatzpunkt zur Modulation der TNF- $\alpha$  Konzentration im Blut.<sup>130,135,136</sup>

## 6.1. mRNA-Expression von iRhom2, TACE und TNF- $\alpha$

Parallel zum signifikanten Anstieg von Serum-TNF- $\alpha$  im Blut konnte von Tag 1 zu Tag 3 nach AMI ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten (um etwa 14%) beobachtet werden. Während das mRNA-Expressionsniveau von iRhom2 in der AMI-Gruppe an Tag 1 noch vergleichbar mit den jungen und gesunden Kontrollprobanden war, zeigten Patienten mit sCAD zu diesem Zeitpunkt eine signifikant höhere iRhom2-Expression in Monozyten. Infolge des Anstiegs der iRhom2-Expression nach dem AMI entsprach das Expressionsniveau von iRhom2 in der AMI-Gruppe an Tag 3 etwa dem der sCAD-Gruppe. Bisher existieren keine weiteren mRNA-Expressions-Daten zu iRhom2 in humanen Zellen, mit denen die gemessenen Expressionswerte und -Dynamiken der drei Studienpopulationen verglichen oder eingeordnet werden könnten. In unserer Studie gehen wir daher davon aus, dass die Kontrollgruppe am ehesten einen physiologischen und nicht-stimulierten Grundzustand der iRhom2-Expression in Monozyten repräsentiert, da die ausgewählten Probanden keine wesentlichen Vorerkrankungen, Gewebeschäden oder sonstige immunologische Stressoren aufwiesen.

Erst infolge des AMI kam es zu einer gesteigerten Expression von iRhom2 in Monozyten und damit zu einem signifikant höheren Expressionsniveau im Vergleich zur Kontrollgruppe, sodass von einer frühen Hochregulation der iRhom2-Expression innerhalb der ersten Tage nach einem AMI zu berichten ist.

Bezüglich der mRNA-Expression von TACE und TNF- $\alpha$  in Monozyten zeigte sich von Tag 1 zu Tag 3 nach AMI hingegen keine Dynamik, sodass anzunehmen ist, dass iRhom2 eine

entscheidende Rolle bei der Regulation der beobachteten TNF- $\alpha$ -Antwort und somit für das postischämische inflammatorische Geschehen spielt.

Die mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  in Monozyten an Tag 3 nach AMI könnte darüber hinaus durch negative Feedbackmechanismen in Reaktion auf die erhöhten Serum-TNF- $\alpha$ -Level, die schon wenige Stunden nach einem AMI den Höhepunkt erreichen können<sup>63,66</sup>, beeinflusst bzw. supprimiert worden sein.<sup>156-158</sup> Es ist beschrieben, dass die TNF- $\alpha$ -Expression unter LPS-Stimulation bereits früh seinen Höhepunkt erreicht und trotz fortgesetzter LPS-Exposition schon nach einigen Stunden wieder auf sein Ursprungsniveau herunterreguliert wird.<sup>157,158</sup> Dies könnte erklären, warum in dieser Arbeit an Tag 3 nach AMI keine erhöhten Expressionslevel nachweisbar waren.

Die Regulation der Aktivität von TACE ist komplex und findet sowohl auf transkriptioneller und insbesondere auf posttranskriptioneller Ebene statt.<sup>130,139,159-161</sup> iRhom2 spielt eine wichtige Rolle für die Aktivierung von TACE<sup>135</sup> indem es den Transport der Sheddase vom ER in den Golgi-Apparat ermöglicht. In der vorliegenden Arbeit konnte übereinstimmend eine starke positive Korrelation zwischen der mRNA-Expression von iRhom2 und TACE in Monozyten nachgewiesen werden. Eine aktuelle Studie konnte darüber hinaus zeigen, dass iRhom2 durch Phosphorylierungsprozesse auch an der Zelloberfläche eine regulatorische Funktion gegenüber der Aktivität von TACE einnimmt und auf diese Weise insbesondere die schnelle Stimulation der Sheddase-Aktivität beeinflusst.<sup>162</sup> Die TACE-Aktivität wurde in der vorliegenden Arbeit hingegen nicht direkt bestimmt, sodass über den Einfluss von TACE auf die erhöhte Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration nach einem AMI keine abschließende Aussage getroffen werden kann.

Vorausgegangene Studien mit AMI-Patienten haben entgegen den Beobachtungen in der hier vorliegenden Arbeit eine gesteigerte Genexpression von TACE und TNF- $\alpha$  in zirkulierenden Leukozyten<sup>163-165</sup> und Monozyten<sup>166</sup> im Vergleich zu gleichaltrigen, gesunden Kontrollprobanden oder sCAD-Patienten gezeigt. Dabei konnte eine positive Korrelation zwischen der Genexpression von TACE und TNF- $\alpha$  nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit unterscheiden sich die TACE- und TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression in Monozyten lediglich zwischen sCAD- und Kontrollgruppe signifikant und es zeigte sich unter Berücksichtigung aller Studienteilnehmer lediglich eine schwache positive Korrelation zwischen der mRNA-Expression von TACE und TNF- $\alpha$  in den Monozyten.

Unterschiede zwischen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und den zitierten Studien könnten auf die zum Teil deutlich früher durchgeführte Blutentnahme (innerhalb von 12 Stunden nach Symptombeginn<sup>166</sup>), die Entnahme von Blut aus dem Gebiet des Gefäßverschlusses (lokal) bzw. aus dem Aortenbogen (peripher)<sup>166</sup> und die in drei der vier Studien nicht oder methodisch unterschiedlich erfolgte Monozyten-Isolation vom Rest der Leukozyten zurückzuführen sein.

## 6.2. Serum-TNF- $\alpha$

Parallel zu dem beobachteten Anstieg der iRhom2-Expression in der AMI-Gruppe kam es von Tag 1 zu Tag 3 zu einem signifikanten Anstieg der Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration. Inwiefern die TNF- $\alpha$ -Konzentration nach diesem Zeitpunkt weiter ansteigt oder bereits abnimmt kann aufgrund der Beschränkung auf zwei Messzeitpunkte nicht ermittelt werden. Die Rationale für den zweiten Messpunkt, 3 Tage nach AMI, beruht zum einen auf den Ergebnissen von vorausgehenden Studien, welche die höchsten TNF- $\alpha$ -Konzentrationen etwa 68 bis 84 Stunden nach einem AMI nachgewiesen hatten.<sup>62,65</sup> Zum anderen ist beschrieben, dass CD16-positive Monozyten, zu denen die intermediären Monozyten zählen und welche wesentlich an der TNF- $\alpha$ -Freisetzung beteiligt sind, ebenfalls etwa 3 Tage nach AMI ihren Gipfel im Anstieg erreichen.<sup>119</sup> Es existieren jedoch auch Studien, die frühere Gipfel der Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration innerhalb der ersten 24 Stunden nach AMI nachgewiesen haben.<sup>63,66</sup> Es ist daher anzunehmen, dass die Dynamik sowie das Ausmaß der TNF- $\alpha$  Freisetzung infolge eines AMI einer Vielzahl an Faktoren und Umständen des Ereignisses unterliegt, und daher nicht generalisierend für alle Patienten ein übereinstimmender Zeitpunkt für die höchste TNF- $\alpha$  Serumkonzentration benannt werden kann.

Im Vergleich zur sCAD-Gruppe war die TNF- $\alpha$ -Konzentration im Serum der AMI-Gruppe an Tag 1 signifikant geringer und stieg bis Tag 3 auf ein etwa gleich hohes Konzentrationsniveau (analog zur iRhom2-Expression in den Monozyten) an.

Eine Erklärung für die höhere Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration und mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten der sCAD-Gruppe gegenüber Kontroll- und AMI-Gruppe (an Tag 1) bietet möglicherweise die Pathogenese der Arteriosklerose. Die Arteriosklerose ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der arteriellen Gefäßwand.<sup>1</sup>

Komplexe immunologische Prozesse unter Einbeziehung von Immunzellen (insbesondere Monozyten und Makrophagen), sowie inflammatorischen Zytokinen (u.a. TNF- $\alpha$ ) spielen eine Schlüsselrolle bei der Entstehung und Progression der Erkrankung.<sup>167-171</sup>

Übereinstimmend mit dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit konnte Balbay et al. zeigen, dass Patienten mit koronarer Herzerkrankung im Vergleich zu Patienten mit unauffälligen epikardialen Gefäßen erhöhte Konzentrationen von TNF- $\alpha$  im Serum vorweisen.<sup>172</sup>

Die erhöhte mRNA-Expression von iRhom2 in den Monozyten der sCAD-Gruppe gegenüber der AMI-Gruppe an Tag 1 und der Kontrollgruppe könnte demnach ebenfalls Ausdruck einer chronischen Inflammation sein. Weiterführende Forschungsarbeiten bezüglich der Bedeutung von iRhom2 in der Pathogenese der Arteriosklerose werden aktuell durch unsere Arbeitsgruppe an der Charité – Universitätsmedizin Berlin verfolgt.

Im Hinblick auf die AMI-Gruppe könnte der Anstieg der iRhom2-Expression in den Monozyten und der Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration von Tag 1 zu Tag 3 nach AMI aus immunologischer Sicht vereinfacht als ein Übergang von einem weitgehend physiologischen Zustand der iRhom2-Expression vor dem AMI (vergleichbar mit der Kontrollgruppe) hin zu einem chronisch stimulierten Status interpretiert werden. Dagegen würde sprechen, dass angenommen werden kann, dass die Atherogenese in dem überwiegenden Teil der AMI-Patienten bereits seit mehreren Jahren bestand, auch wenn bei >80% der Patienten der AMI-Gruppe der AMI die Erstmanifestation einer KHK darstellte (in der sCAD-Gruppe 34%). Es kann jedoch spekuliert werden, dass das Ereignis des AMI einen persistierend höheren Status der iRhom2-Expression und folglich auch der systemischen TNF- $\alpha$ -Konzentration hervorruft. Diese Annahmen jedoch fundiert zu belegen ist aufgrund fehlender Möglichkeiten zur Identifikation und Untersuchung von Patienten hinsichtlich laborchemischer Entzündungsparameter (iRhom2, TNF- $\alpha$ , CRP, IL-6 und Leukozytenzahl) unmittelbar vor einem AMI als Erstmanifestation einer KHK nicht möglich.

### 6.3. Monozyten-Subpopulationen

In der vorliegenden Arbeit konnte von Tag 1 auf Tag 3 nach einem AMI ein signifikanter Anstieg des relativen Anteils zirkulierender intermediärer Monozyten an der Monozytengesamtpopulation nachgewiesen werden. Parallel nahm der Anteil an klassischen Monozyten signifikant ab, während sich der Anteil der nicht-klassischen Monozyten nicht signifikant veränderte.

Diese Beobachtungen bestätigen vorausgehende Studien, die einen Anstieg der CD16-positiven Monozyten-Subpopulation beobachteten.

So zeigten Tsujioka et al. einen Anstieg CD16-positiver Monozyten bis Tag 5 nach einem AMI; in dieser Arbeit erfolgte jedoch noch keine Differenzierung zwischen den beiden CD16-positiven

Subpopulationen (intermediäre und nicht-klassische Monozyten).<sup>119</sup> Nachfolgend zeigten Tapp et al. übereinstimmend mit der vorliegenden Arbeit einen prominenten Anstieg der intermediären Monozyten nach AMI, während keine relevante Dynamik bezüglich der nicht-klassischen Monozyten beobachtet wurde.<sup>120</sup> Unterschiede zu der vorliegenden Studie zeigen sich hingegen in der zeitlichen Dynamik des Anstiegs: während bei Tapp et al. die Anzahl intermediärer Monozyten gemeinsam mit den klassischen Monozyten bereits innerhalb der ersten 24 Stunden ein Maximum erreichte und bis Tag 7 auf diesem Niveau blieb, fand sich in der vorliegenden Studie an Tag 1 ein signifikant geringerer Anteil an intermediären Monozyten als an Tag 3 nach AMI. Eine mögliche Erklärung für diesen früheren Gipfel bietet der Umstand, dass in der Studie von Tapp et al. ausschließlich STEMI-Patienten untersucht wurden, während in der vorliegenden Studie auch NSTEMI-Patienten rekrutiert wurden. Es ist davon auszugehen, dass STEMI-Patienten einen größeren myokardialen Gewebeschaden vorweisen und daher möglicherweise auch eine stärkere inflammatorische Reaktion mit früherem Anstieg der intermediären Monozyten im Blut im Vergleich zu NSTEMI-Patienten verzeichnen. Tapp et al. zeigte passend hierzu, dass die Anzahl intermediärer Monozyten als einzige Subpopulation positiv mit den gemessenen Troponin-Werten im Blut nach AMI korrelierte.

Ob die beobachtete Zunahme der intermediären Monozyten nach einem AMI auf eine vermehrte Freisetzung aus dem Knochenmark oder durch eine Differenzierung des Phänotyps (von klassischen zu intermediären Monozyten) in der Zirkulation verursacht wird, ist aus den erhobenen Daten nicht abzuleiten und auch in der Literatur nicht abschließend geklärt. Sowohl die Anwesenheit aller drei Subpopulationen im Knochenmark<sup>173</sup> als auch eine Differenzierung der zellulären Merkmale von klassischen Monozyten hin denen von intermediären Monozyten ist in der Literatur beschrieben (Hochregulierung von CD16).<sup>174</sup> Eine weitere Erklärung für die rasche Dynamik nach einem AMI könnte die Freisetzung von Monozyten aus der Milz darstellen. Diese bildet mit den dort lokalisierten Monozyten eine Art Reservoir aus dem im Falle eines adäquaten Stimulus (wie zum Beispiel einem AMI) innerhalb kurzer Zeit große Zahlen von Monozyten rekrutiert werden können.<sup>175</sup> Sowohl in der hier vorliegenden Studie als auch in der Arbeit von Tapp et al.<sup>120</sup> konnte von Tag 1 zu Tag 3 nach AMI keine Zunahme der absoluten Monozytenzahl im peripheren Blut beobachtet werden. Rückschlüsse auf die Art der Rekrutierung von Monozyten erlaubt diese Beobachtung aufgrund ihrer Fähigkeit die Zirkulation zu verlassen dennoch nicht. Zusammenfassend kann jedoch davon ausgegangen werden, dass der Anstieg intermediärer Monozyten im Blut nach einem AMI eine typische Dynamik darstellt.

Intermediäre Monozyten gelten gegenüber den klassischen und nicht-klassischen Monozyten als besonders inflammatorische Subpopulation u.a. aufgrund der vermehrten Sekretion von TNF- $\alpha$ .<sup>110</sup> Übereinstimmend konnte in der vorliegenden Studie eine signifikante positive Korrelation zwischen dem Anteil intermediärer Monozyten und der TNF- $\alpha$ -Konzentration im Blut aller Studiengruppen sowie auch isoliert an Tag 1 und Tag 3 nach einem AMI nachgewiesen werden. Zwischen dem Anteil der klassischen Monozyten und der Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration konnte an Tag 1 nach AMI hingegen eine statistisch nicht signifikante negative Assoziation und an Tag 3 nach AMI eine signifikant negative Korrelation nachgewiesen werden. Nicht-klassische Monozyten korrelierten lediglich schwach positiv mit der Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration an Tag 3. Die Anzahl der Monozyten, Leukozyten und Lymphozyten standen ebenfalls in keiner Beziehung zu den Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentrationen nach einem AMI, was die Annahme einer insbesondere von den intermediären Monozyten ausgehende Sekretion von TNF- $\alpha$  nach AMI unterstützt.

Die iRhom2-Expression an Tag 3 nach AMI korrelierte ebenfalls positiv mit dem Anteil intermediärer Monozyten an Tag 3. Zudem fanden wir ähnlich wie beim Serum-TNF- $\alpha$  eine positive Assoziation zwischen dem Anteil intermediärer Monozyten an Tag 1 und der iRhom2-Expression in Monozyten an Tag 3. Anhand dieser Zusammenhänge kann spekuliert werden, dass die gesteigerte mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten insbesondere von intermediären Monozyten ausgeht, welche verglichen mit anderen Subpopulationen große Mengen TNF- $\alpha$  freisetzen und auch in dieser Arbeit als einzige Subpopulation signifikant mit dem Serum-TNF- $\alpha$  nach AMI korrelieren.

Zusammengenommen deuten die Daten darauf hin, dass iRhom2 an der Regulation der TNF- $\alpha$ -Freisetzung insbesondere durch intermediäre Monozyten beteiligt sein könnte. Um die auf den oben genannten Beobachtungen basierenden Annahmen und Zusammenhänge abschließend zu verifizieren, wäre eine getrennte Bestimmung der TNF- $\alpha$ -Expression und iRhom2-Expression in den einzelnen Subtypen mittels *Cell-Sorting* nötig sowie weitere in-vitro Versuche mit humanen Monozyten.

## 6.4. Schlussfolgerungen

Der parallele Anstieg der mRNA-Expression von iRhom2 in Monozyten und Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration bei Patienten mit akuten Koronarsyndrom gibt erste Hinweise darauf, dass iRhom2 an der TNF- $\alpha$ -Freisetzung und somit an der inflammatorischen Reaktion nach einem AMI beteiligt ist. AMI-Patienten mit hoher Expression von iRhom2 in Monozyten wiesen eine höhere TNF- $\alpha$ -Konzentration im Blut auf. Auch wenn diese Assoziation noch keine Kausalität zwischen den beiden Parametern nachweist, so passt diese Beobachtung zur Funktion von iRhom2 in der iRhom2-TACE-TNF- $\alpha$ -Signalachse, an dessen Ende die Freisetzung von TNF- $\alpha$  ins Blut steht.<sup>130</sup>

Unsere Annahme setzt jedoch voraus, dass die regulatorische Beteiligung von iRhom2 am Freisetzungsprozess von TNF- $\alpha$  zumindest in Teilen über eine gesteigerte Genexpression reguliert wird. Hinweise dafür finden sich in vorausgegangenen in-vitro Studien bei denen die TNF- $\alpha$ -Freisetzung durch Makrophagen unter LPS-Exposition von einer deutlich gesteigerten Expression von iRhom2 begleitet wurde.<sup>130,135,176</sup>

Auf Grundlage dieser Beobachtungen sowie den Erkenntnissen früherer Studien könnte die pharmakologische Inhibition von iRhom2 eine vielversprechende Methode darstellen, um die TNF- $\alpha$ -Sekretion nach AMI zu reduzieren und ungünstiges kardiales Remodeling zu begrenzen.

## 6.5. Ausblick

Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sollte in weiterführenden Studien untersucht werden, inwiefern die Modulation von iRhom2 eine Strategie zur Abschwächung einer übermäßigen TNF- $\alpha$ -Freisetzung und dem damit verbundenen ungünstigen kardialen Remodeling nach einem AMI darstellen könnte. Mit einem iRhom2-Inhibitor bestände die Möglichkeit spezifisch die TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus myeloischen Zellen zu blockieren, währenddessen die Funktion von TACE und damit die Spaltung einer Vielzahl weiterer physiologischer Substrate in nicht-myeloischen Zellen erhalten bliebe.<sup>136</sup>

iRhom2-defiziente Leukozyten exprimieren weiterhin membrangebundenes mTNF- $\alpha$ .<sup>130</sup> mTNF- $\alpha$  bindet und aktiviert bevorzugt TNFR2 anstelle von TNFR1.<sup>141,177</sup> Während über TNFR1 vorwiegend pro-inflammatorische, negativ-inotrope sowie pro-apoptotische Wirkungen auf Kardiomyozyten vermittelt werden, vermittelt der TNFR2 eher anti-inflammatorische Effekte zur Gewebeheilung und Angiogenese und gilt daher als kardioprotektiv.<sup>78-80,178</sup>

Insbesondere die Signaltransduktion über TNFR1 steht daher nachweislich in Zusammenhang mit der Progression von ungünstigem kardialen Remodeling und konsekutiver Herzinsuffizienz, während die Aktivierung von TNFR2 Remodelingprozesse günstig beeinflusste.<sup>179,180</sup>

Die Bindungspräferenz von mTNF- $\alpha$  an TNFR2 gemeinsam mit der Immunzellspezifität einer iRhom2-Blockade könnten interessante Vorteile gegenüber den systemischen TNF- $\alpha$ -Antagonisten bieten, da anzunehmen ist, dass auf diesem Weg ein Teil der kardioprotektiven Eigenschaften von TNF- $\alpha$  erhalten bliebe.

Ein sinnvoller weiterführender Forschungsansatz stellt die Untersuchung der Auswirkungen einer iRhom2-Defizienz im Myokardinfarkt-Mausmodell dar. Im Vergleich einer iRhom2-defizienten mit einer iRhom2-suffizienten Maus, die einer Koronararterien-Ligatur zugeführt werden, könnten die Auswirkungen auf die inflammatorischen Prozesse und das Remodeling mittels histologischer und bildgebender Verfahren untersucht werden.

Barnette et al. haben iRhom2-defiziente Mäuse nach Induktion eines Myokardinfarktes mittels operativer Ligatur des Ramus interventricularis anterior untersucht.<sup>181</sup> Dabei zeigte sich bei der histologischen Untersuchung der Herzen 21 Tage nach Infarktinduktion im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine unzureichende Fibrosierung der Infarktnarbe, sowie eine erhöhte Mortalität der iRhom2-defizienten Mäuse.

Bei genauer Betrachtung der Studie zeigen sich jedoch folgende wesentliche Limitationen, sodass die generierten Ergebnisse zunächst in weiteren Studien verifiziert werden sollten: Zum einen wurde die iRhom2-Maus mit einer normalen Wildtyp-Maus und nicht mit genetisch ähnlichen Wurfgeschwistern verglichen. Zudem wurde eine relativ kleine Fallzahl pro Versuchsgruppe ( $n = 5$  für funktionelle kardiale Parameter;  $n = 3$  für immunhistologische Parameter) gewählt. Zentrale morphologische und funktionelle Parameter des linken Ventrikels wie die linksventrikuläre Masse, LVEF als wichtiger funktioneller Parameter des Herzes, aber auch die Größe der Infarktnarbe unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen. Bezüglich der Ursache für die erhöhte Mortalität der iRhom2-defizienten Mäuse werden seitens der Autoren keine Erklärungshypothesen angeboten. Auch eine Aufschlüsselung der Todesursachen, welche zur erhöhten Mortalität der iRhom2-defizienten Mäuse führte, wird nicht geboten, sodass nicht bekannt ist, ob diese Zahlen durch kardiovaskuläre Ereignisse oder andere AMI-unabhängige Faktoren verursacht wurden. Die Beobachtungen der Studie von Barnette et al. stehen zudem im Gegensatz zu einer Reihe von

Studien mit AMI-Mausmodellen, bei denen eine genetische Defizienz oder eine pharmakologische Inhibition von TNF- $\alpha$  einen positiven Einfluss auf das kardiale Remodeling hervorrief.<sup>82,84-90</sup>

Aufgrund dieser Diskrepanz muss jedoch auch in Betracht gezogen werden, dass iRhom2 und TACE in Leukozyten möglicherweise weitere, bisher nicht bekannte Liganden haben, infolgedessen die Effekte einer iRhom2-Inhibition über die Reduktion der TNF- $\alpha$ -Freisetzung hinaus geht. Mögliche Substrate von TACE, die diesbezüglich in Frage kämen, sind TNFR1 und TNFR2, welche infolge einer iRhom2-Inhibition an der Zelloberfläche von Immunzellen akkumulieren und ihrer parakrinen sTNF- $\alpha$ -neutralisierenden Funktion in löslicher Form (ähnlich der Wirkungsweise von Etanercept) nicht mehr nachkommen können.<sup>182</sup>

Die postischämische Inflammation stellt in einem kurzfristigen und selbstlimitierenden Rahmen eine adaptive Reaktion auf den Gewebeschaden dar und ist für die kardialen Heilungsprozesse notwendig. Dementsprechend könnte eine konstante Inhibition, wie im Rahmen einer genetisch bedingten iRhom2-Defizienz, bei einer nicht dysregulierten, exzessiven oder anhaltenden Entzündungsreaktion zu einer Störung der adaptiven Prozesse mit möglichen negativen Folgen für das Remodeling führen, wie durch Barnette et al. berichtet. So kann spekuliert werden, dass insbesondere nur AMI-Patienten mit prolongierten, exzessiven TNF- $\alpha$ -Erhöhungen von einer Reduktion der TNF- $\alpha$ -Freisetzung profitieren und/oder diese nur in einem bestimmten Zeitfenster während des Remodelings erfolgen sollte. Auf dem Weg zu anti-inflammatorischen Therapiekonzepten für die Beeinflussung des kardialen Remodelings ist es daher von großer Bedeutung, Patienten zu identifizieren, bei denen die Inflammation einen dysregulierten oder auch anhaltenden Charakter zeigt. Dabei sollten der optimale Zeitpunkt sowie die Dauer einer anti-inflammatorischen Therapie differenziert untersucht werden, damit günstige immunologische Prozesse nicht beeinträchtigt werden. Dazu wäre es von Interesse, einen pharmakologischen Inhibitor für iRhom2 zu entwickeln, um die Wirkungen und Nebenwirkungen einer transienten Inhibition im AMI-Modell zu untersuchen und mit denen einer permanenten genetischen iRhom2-Defizienz zu vergleichen. Fragen nach dem optimalen Zeitpunkt ließen sich durch den gezielten und phasenweisen Einsatz eines iRhom2-Inhibitors ermitteln. Im Rahmen einer pharmakologischen Inhibition wären Leukozyten drüber hinaus vermutlich zunächst noch in der Lage gewisse Mengen an TNF- $\alpha$  über bereits an der Zelloberfläche lokalisiertes und aktives TACE freizusetzen.<sup>183</sup> Dies würde möglicherweise eine mildere Reduktion der TNF- $\alpha$ -Freisetzung hervorrufen und insbesondere die Hochregulation der TNF- $\alpha$ -Freisetzung über TACE im Rahmen einer Hyperinflammation reduzieren, während eine basale physiologische TNF- $\alpha$  Sekretion durch

Leukozyten vermutlich noch stattfinden könnte. iRhom2-defiziente Mäuse exprimieren hingegen nachweislich kein TACE an der Zelloberfläche.<sup>130</sup>

Aufgrund der Komplexität der möglichen immunologischen Auswirkungen einer Inhibition von iRhom2 und folglich TNF- $\alpha$  sind weiterführende grundlagenwissenschaftliche und klinische Studien erforderlich, um zu klären, inwiefern die Modulation von iRhom2 im Rahmen eines AMI zur Reduktion von ungünstigem kardialen Remodeling sowie kardiovaskulären Ereignissen nach einem AMI beitragen kann.

## 6.6. Limitationen der Studie

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Pilotstudie mit deskriptivem Charakter. Eine Aussage über eine Kausalität der beobachteten Assoziationen kann daher nicht erfolgen.

Die Blutentnahme bei den sCAD- sowie AMI-Patienten erfolgte erst nach der Herzkatheteruntersuchung. Es ist somit nicht auszuschließen, dass die Herzkatheteruntersuchung aufgrund des invasiven Charakters immunologische Reaktion induziert hat. Aufgrund des fehlenden Messzeitpunktes Tag 3 in der sCAD-Gruppe kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass die Veränderungen in der AMI-Gruppe von Tag 1 zu Tag 3 auf die Intervention zurückzuführen sind. Dagegen sprechen allerdings die Beobachtungen von Goldberg et al., die nach einer Herzkatheteruntersuchung mit und ohne Stentimplantation an 26 sCAD-Patienten keinen Anstieg der Serum-TNF- $\alpha$ -Konzentration 24 Stunden, 48 Stunden, sowie 4 Wochen nachweisen konnten.<sup>184</sup> Es ist daher anzunehmen, dass die Veränderungen der erhobenen Parameter von Tag 1 zu Tag 3 in der AMI-Gruppe primär die Folge des AMI widerspiegeln.

Eine weitere Limitation der Studie ist, dass für iRhom2 und TACE die Expressionsanalyse auf die RNA-Expression beschränkt ist, während Daten auf Proteinebene nicht existieren. Während für jeden Studienteilnehmer Protein aus Monozyten isoliert und konserviert wurde, gelang der spezifische Nachweis von iRhom2 mittels Western-Blot mit mehreren getesteten, kommerziell erworbenen Antikörpern nicht. Ein potentieller Nachweis von iRhom2-Protein könnte hingegen über die vorausgehende Immunpräzipitation für TACE und anschließendem Nachweis des an TACE gebundenen iRhom2 über einen Western-Blot gelingen. Da von jedem Patienten Protein-Proben aufbewahrt wurden, könnte ein erneuter Versuch der iRhom2-Proteinvermessung nach methodischer Etablierung eines iRhom2-Protein-Nachweises erfolgen.

## Literaturverzeichnis

1. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135-43.
2. Krankheiten des Herz-Kreislauf-Systems. Innere Medizin. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007:1-184.
3. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, Funck-Brentano C, Prescott E, Storey RF, Deaton C, Cuisset T. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes: the Task Force for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal* 2020;41:407-77.
4. Bax JJ, Baumgartner H, Ceconi C, Dean V, Fagard R, Funck-Brentano C, Hasdai D, Hoes A, Kirchhof P, Knuuti J. Third universal definition of myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 2012;60:1581-98.
5. Kannel WB. Some lessons in cardiovascular epidemiology from Framingham. *The American journal of cardiology* 1976;37:269-82.
6. Baer FM, Rosenkranz S. Koronare Herzkrankheit und akutes Koronarsyndrom. In: Erdmann E, ed. *Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011:13-72.
7. Roffi M, Patrono C, Collet J-P, Mueller C, Valgimigli M, Andreotti F, Bax JJ, Borger MA, Brotons C, Chew DP. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal* 2016;37:267-315.
8. Ibáñez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, Caforio AL, Crea F, Goudevenos JA, Halvorsen S. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Revista espanola de cardiologia (English ed)* 2017;70:1082.
9. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, Das SR, de Ferranti S, Després J-P, Fullerton HJ. Heart disease and stroke statistics—2016 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2015:CIR. 0000000000000350.
10. Todesursachenstatistik ab 1998. Sterbefälle, Sterbeziffern (je 100.000 Einwohner, altersstandardisiert). Statistisches Bundesamt, 2014. (Accessed 10.07.2018, 2018, at [www.gbe-bund.de](http://www.gbe-bund.de).)

11. Weir RA, McMurray JJ, Velazquez EJ. Epidemiology of heart failure and left ventricular systolic dysfunction after acute myocardial infarction: prevalence, clinical characteristics, and prognostic importance. *The American journal of cardiology* 2006;97:13-25.
12. Hellermann JP, Jacobsen SJ, Redfield MM, Reeder GS, Weston SA, Roger VL. Heart failure after myocardial infarction: clinical presentation and survival. *European journal of heart failure* 2005;7:119-25.
13. Lewis EF, Moya LA, Rouleau JL, Sacks FM, Arnold JMO, Warnica JW, Flaker GC, Braunwald E, Pfeffer MA. Predictors of late development of heart failure in stable survivors of myocardial infarction: the CARE study. *Journal of the American College of Cardiology* 2003;42:1446-53.
14. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, Caforio AL, Crea F, Goudevenos JA, Halvorsen S. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal* 2017;39:119-77.
15. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JG, Coats AJ, Falk V, González - Juanatey JR, Harjola VP, Jankowska EA. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European journal of heart failure* 2016;18:891-975.
16. Sutton MGSJ, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 2000;101:2981-8.
17. Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodeling. *The Lancet* 2006;367:356-67.
18. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990;81:1161-72.
19. Schirone L, Forte M, Palmerio S, Yee D, Nocella C, Angelini F, Pagano F, Schiavon S, Bordin A, Carrizzo A. A review of the molecular mechanisms underlying the development and progression of cardiac remodeling. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017;2017.
20. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *Journal of the American College of Cardiology* 2000;35:569-82.

21. Korup E, Dalsgaard D, Nyvad O, Jensen TM, Toft E, Berning J. Comparison of degrees of left ventricular dilation within three hours and up to six days after onset of first acute myocardial infarction. *The American journal of cardiology* 1997;80:449-53.
22. Gaudron P, Eilles C, Kugler I, Ertl G. Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Potential mechanisms and early predictors. *Circulation* 1993;87:755-63.
23. Sutton MSJ, Pfeffer MA, Moye L, Plappert T, Rouleau JL, Lamas G, Rouleau J, Parker JO, Arnold MO, Sussex B. Cardiovascular death and left ventricular remodeling two years after myocardial infarction: baseline predictors and impact of long-term use of captopril: information from the Survival and Ventricular Enlargement (SAVE) trial. *Circulation* 1997;96:3294-9.
24. Weisman HF, Bush DE, Mannisi JA, Bulkley BH. Global cardiac remodeling after acute myocardial infarction: a study in the rat model. *Journal of the American College of Cardiology* 1985;5:1355-62.
25. Hochman JS, Bulkley BH. Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study. *Circulation* 1982;65:1446-50.
26. McKay RG, Pfeffer MA, Pasternak RC, Markis JE, Come PC, Nakao S, Alderman JD, Ferguson JJ, Safian RD, Grossman W. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion. *Circulation* 1986;74:693-702.
27. Gajarsa JJ, Kloner RA. Left ventricular remodeling in the post-infarction heart: a review of cellular, molecular mechanisms, and therapeutic modalities. *Heart failure reviews* 2011;16:13-21.
28. Sabbah H, Goldstein S. Ventricular remodelling: consequences and therapy. *European heart journal* 1993;14:24-9.
29. Hutchins GM, Bulkley BH. Infarct expansion versus extension: two different complications of acute myocardial infarction. *The American journal of cardiology* 1978;41:1127-32.
30. Mitchell GF, Lamas GA, Vaughan DE, Pfeffer MA. Left ventricular remodeling in the year after first anterior myocardial infarction: a quantitative analysis of contractile segment lengths and ventricular shape. *Journal of the American College of Cardiology* 1992;19:1136-44.
31. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiological reviews* 1999;79:215-62.
32. White HD, Norris RM, Brown MA, Brandt P, Whitlock R, Wild CJ. Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation* 1987;76:44-51.

33. Rumberger JA, Behrenbeck T, Breen JR, Reed JE, Gersh BJ. Nonparallel changes in global left ventricular chamber volume and muscle mass during the first year after transmural myocardial infarction in humans. *Journal of the American College of Cardiology* 1993;21:673-82.
34. Anversa P, Olivetti G, Capasso JM. Cellular basis of ventricular remodeling after myocardial infarction. *American Journal of Cardiology* 1991;68:7-16.
35. Mann DL. Innate immunity and the failing heart: the cytokine hypothesis revisited. *Circulation research* 2015;116:1254-68.
36. Saxena A, Russo I, Frangogiannis NG. Inflammation as a therapeutic target in myocardial infarction: learning from past failures to meet future challenges. *Translational Research* 2016;167:152-66.
37. Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacological research* 2008;58:88-111.
38. Kain V, Prabhu SD, Halade GV. Inflammation revisited: inflammation versus resolution of inflammation following myocardial infarction. *Basic research in cardiology* 2014;109:444.
39. Prabhu SD, Frangogiannis NG. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction: from inflammation to fibrosis. *Circulation research* 2016;119:91-112.
40. Mann DL. Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. *Annual review of physiology* 2003;65:81-101.
41. Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodeling. *Nature Reviews Cardiology* 2014;11:255.
42. Frangogiannis NG. The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxidants & redox signaling* 2006;8:1907-39.
43. Seta Y, Shan K, Bozkurt B, Oral H, Mann DL. Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypothesis. *Journal of cardiac failure* 1996;2:243-9.
44. Irwin MW, Mak S, Mann DL, Qu R, Penninger JM, Yan A, Dawood F, Wen W-H, Shou Z, Liu P. Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor- $\alpha$  in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation* 1999;99:1492-8.
45. Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *New England Journal of Medicine* 1990;323:236-41.
46. Katz SD, Rao R, Berman JW, Schwarz M, Demopoulos L, Bijou R, LeJemtel TH. Pathophysiological correlates of increased serum tumor necrosis factor in patients with

- congestive heart failure. Relation to nitric oxide-dependent vasodilation in the forearm circulation. *Circulation* 1994;90:12-6.
47. Dutka D, Elborn J, Delamere F, Shale D, Morris G. Tumour necrosis factor alpha in severe congestive cardiac failure. *Heart* 1993;70:141-3.
  48. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand J-B, Bies RD, Young JB, Mann DL. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation* 1996;93:704-11.
  49. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Journal of the American College of Cardiology* 1996;27:1201-6.
  50. Mann DL. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circulation research* 2002;91:988-98.
  51. Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, Young JB, White BG, Mann DL. Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). *Circulation* 2001;103:2055-9.
  52. Dunlay SM, Weston SA, Redfield MM, Killian JM, Roger VL. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and mortality in heart failure: a community study. *Circulation* 2008;118:625-31.
  53. Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, Slawson SE, Lemster BH, Koretsky AP, Demetris AJ, Feldman AM. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Circulation research* 1997;81:627-35.
  54. Bryant D, Becker L, Richardson J, Shelton J, Franco F, Peshock R, Thompson M, Giroir B. Cardiac failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Circulation* 1998;97:1375-81.
  55. Bozkurt B, Kribbs SB, Clubb Jr FJ, Michael LH, Didenko VV, Hornsby PJ, Seta Y, Oral H, Spinale FG, Mann DL. Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor- $\alpha$  promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation* 1998;97:1382-91.
  56. Franco F, Thomas GD, Giroir B, Bryant D, Bullock MC, Chwialkowski MC, Victor RG, Peshock RM. Magnetic resonance imaging and invasive evaluation of development of heart failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Circulation* 1999;99:448-54.
  57. Sivasubramanian N, Coker ML, Kurrelmeyer KM, MacLellan WR, DeMayo FJ, Spinale FG, Mann DL. Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. *Circulation* 2001;104:826-31.

58. Kapadia SR, Oral H, Lee J, Nakano M, Taffet GE, Mann DL. Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$  gene and protein expression in adult feline myocardium. *Circulation research* 1997;81:187-95.
59. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circulation research* 2004;94:1543-53.
60. Schulz R, Heusch G. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and its receptors 1 and 2: Yin and Yang in myocardial infarction? : *Am Heart Assoc*; 2009.
61. Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S. Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation* 1998;98:149-56.
62. Maury C, Teppo AM. Circulating tumour necrosis factor -  $\alpha$  (cachectin) in myocardial infarction. *Journal of internal medicine* 1989;225:333-6.
63. Başaran Y, Başaran MM, Babacan K, Ener B, Okay T, Gök H, Özdemir M. Serum tumor necrosis factor levels in acute myocardial infarction and unstable angina pectoris. *Angiology* 1993;44:332-7.
64. Correia LC, Andrade BB, Borges VM, Clarêncio J, Bittencourt AP, Freitas R, Souza AC, Almeida MC, Leal J, Esteves JP. Prognostic value of cytokines and chemokines in addition to the GRACE Score in non-ST-elevation acute coronary syndromes. *Clinica Chimica Acta* 2010;411:540-5.
65. Hirschl M, Gwechenberger M, Binder T, Binder M, Graf S, Stefenelli T, Rauscha F, Laggner A, Sochor H. Assessment of myocardial injury by serum tumour necrosis factor alpha measurements in acute myocardial infarction. *European heart journal* 1996;17:1852-9.
66. Lissoni P, Pelizzoni F, Mauri O, Perego M, Pittalis S, Barni S. Enhanced secretion of tumour necrosis factor in patients with myocardial infarction. *The European journal of medicine* 1992;1:277-80.
67. Kleinbongard P, Heusch G, Schulz R. TNF $\alpha$  in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure. *Pharmacology & therapeutics* 2010;127:295-314.
68. Engel D, Peshock R, Armstrong RC, Sivasubramanian N, Mann DL. Cardiac myocyte apoptosis provokes adverse cardiac remodeling in transgenic mice with targeted TNF overexpression. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2004;287:H1303-H11.
69. Palojoki E, Saraste A, Eriksson A, Pulkki K, Kallajoki M, Voipio-Pulkki L-M, Tikkanen I. Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2001;280:H2726-H31.

70. Krown KA, Page MT, Nguyen C, Zechner D, Gutierrez V, Comstock KL, Glembotski CC, Quintana PJ, Sabbadini RA. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death. *The Journal of clinical investigation* 1996;98:2854-65.
71. Yokoyama T, Nakano M, Bednarczyk JL, McIntyre BW, Entman M, Mann DL. Tumor necrosis factor- $\alpha$  provokes a hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. *Circulation* 1997;95:1247-52.
72. Yokoyama T, Vaca L, Rossen RD, Durante W, Hazarika P, Mann DL. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart. *The Journal of clinical investigation* 1993;92:2303-12.
73. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 1992;257:387-9.
74. Siwik DA, Chang DL-F, Colucci WS. Interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circulation research* 2000;86:1259-65.
75. Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *Journal of the American College of Cardiology* 1989;13:1637-52.
76. Li Y, Feng Y, Kadokami T, McTiernan C, Draviam R, Watkins S, Feldman A. Myocardial extracellular matrix remodeling in transgenic mice overexpressing tumor necrosis factor  $\alpha$  can be modulated by anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000;97:12746-51.
77. Sun M, Dawood F, Wen W-H, Chen M, Dixon I, Kirshenbaum LA, Liu PP. Excessive tumor necrosis factor activation after infarction contributes to susceptibility of myocardial rupture and left ventricular dysfunction. *Circulation* 2004;110:3221-8.
78. Hamid T, Gu Y, Ortines RV, Bhattacharya C, Wang G, Xuan Y-T, Prabhu SD. Divergent tumor necrosis factor receptor-related remodeling responses in heart failure: role of nuclear factor- $\kappa$ B and inflammatory activation. *Circulation* 2009;119:1386-97.
79. Monden Y, Kubota T, Inoue T, Tsutsumi T, Kawano S, Ide T, Tsutsui H, Sunagawa K. Tumor necrosis factor- $\alpha$  is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2007;293:H743-H53.
80. Ramani R, Mathier M, Wang P, Gibson G, Tögel S, Dawson J, Bauer A, Alber S, Watkins SC, McTiernan CF. Inhibition of tumor necrosis factor receptor-1-mediated pathways has beneficial effects in a murine model of postischemic remodeling. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2004;287:H1369-H77.

81. Pagani FD, Baker LS, Hsi C, Knox M, Fink MP, Visner MS. Left ventricular systolic and diastolic dysfunction after infusion of tumor necrosis factor- $\alpha$  in conscious dogs. *The Journal of clinical investigation* 1992;90:389-98.
82. Sugano M, Hata T, Tsuchida K, Suematsu N, Oyama J-i, Satoh S, Makino N. Local delivery of soluble TNF- $\alpha$  receptor 1 gene reduces infarct size following ischemia/reperfusion injury in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2004;266:127-32.
83. Liu S, Yin T, Wei X, Yi W, Qu Y, Liu Y, Wang R, Lian K, Xia C, Pei H. Downregulation of adiponectin induced by tumor necrosis factor  $\alpha$  is involved in the aggravation of posttraumatic myocardial ischemia/reperfusion injury. *Critical care medicine* 2011;39:1935-43.
84. Toufektsian M-C, Robbez-Masson V, Sanou D, Jouan M-G, Ormezzano O, de Leiris J, Boucher F. A Single Intravenous sTNFR-Fc Administration at the Time of Reperfusion Limits Infarct Size—Implications in Reperfusion Strategies in Man. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 2008;22:437-42.
85. Gu Q, Yang XP, Bonde P, DiPaula A, Fox-Talbot K, Becker LC. Inhibition of TNF- $\alpha$  reduces myocardial injury and proinflammatory pathways following ischemia-reperfusion in the dog. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2006;48:320-8.
86. Yu X, Patterson E, Huang S, Garrett MW, Kem DC. Tumor necrosis factor  $\alpha$ , rapid ventricular tachyarrhythmias, and infarct size in canine models of myocardial infarction. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2005;45:153-9.
87. Maekawa N, Wada H, Kanda T, Niwa T, Yamada Y, Saito K, Fujiwara H, Sekikawa K, Seishima M. Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Journal of the American College of Cardiology* 2002;39:1229-35.
88. Li D, Zhao L, Liu M, Du X, Ding W, Zhang J, Mehta JL. Kinetics of tumor necrosis factor  $\alpha$  in plasma and the cardioprotective effect of a monoclonal antibody to tumor necrosis factor  $\alpha$  in acute myocardial infarction. *American heart journal* 1999;137:1145-52.
89. Berry MF, Woo YJ, Pirolli TJ, Bish LT, Moise MA, Burdick JW, Morine KJ, Jayasankar V, Gardner TJ, Sweeney HL. Administration of a tumor necrosis factor inhibitor at the time of myocardial infarction attenuates subsequent ventricular remodeling. *The Journal of heart and lung transplantation* 2004;23:1061-8.
90. Niemann JT, Youngquist ST, Shah AP, Thomas JL, Rosborough JP. TNF- $\alpha$  blockade improves early post-resuscitation survival and hemodynamics in a swine model of ischemic ventricular fibrillation. *Resuscitation* 2013;84:103-7.
91. Nakamura H, Umemoto S, Naik G, Moe G, Takata S, Liu P, Matsuzaki M. Induction of left ventricular remodeling and dysfunction in the recipient heart after donor heart myocardial infarction: new insights into the pathologic role of tumor necrosis factor- $\alpha$  from a novel

- heterotopic transplant–coronary ligation rat model. *Journal of the American College of Cardiology* 2003;42:173-81.
92. Pfeffer MA, Lamas GA, Vaughan DE, Parisi AF, Braunwald E. Effect of captopril on progressive ventricular dilatation after anterior myocardial infarction. *New England Journal of Medicine* 1988;319:80-6.
  93. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Hemodynamic benefits and prolonged survival with long-term captopril therapy in rats with myocardial infarction and heart failure. *Circulation* 1987;75:1149-55.
  94. Pfeffer MA, Braunwald E, Moyé LA, Basta L, Brown Jr EJ, Cuddy TE, Davis BR, Geltman EM, Goldman S, Flaker GC. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction: results of the Survival and Ventricular Enlargement Trial. *New England journal of medicine* 1992;327:669-77.
  95. Sharpe N, Smith H, Murphy J, Hannan S. Treatment of patients with symptomless left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *The Lancet* 1988;331:255-9.
  96. Group AS. Effect of ramipril on mortality and morbidity of survivors of acute myocardial infarction with clinical evidence of heart failure. *Lancet* 1993;342:821-8.
  97. Køber L, Torp-Pedersen C, Carlsen JE, Bagger H, Eliassen P, Lyngborg K, Videbæk J, Cole DS, Auclert L, Pauly NC. A clinical trial of the angiotensin-converting–enzyme inhibitor trandolapril in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *New England Journal of Medicine* 1995;333:1670-6.
  98. Basu S, Senior R, Raval U, van der Does R, Bruckner T, Lahiri A. Beneficial effects of intravenous and oral carvedilol treatment in acute myocardial infarction: a placebo-controlled, randomized trial. *Circulation* 1997;96:183-91.
  99. Group B-BHATR. A randomized trial of propranolol in patients with acute myocardial infarction. *JAMA* 1982;247:1707-14.
  100. Group NMS. Timolol-induced reduction in mortality and reinfarction in patients surviving acute myocardial infarction. *New England Journal of Medicine* 1981;304:801-7.
  101. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu Y-J, MacPherson G, Randolph GJ. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010;blood-2010-02-258558.
  102. Italiani P, Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Frontiers in immunology* 2014;5:514.
  103. Guilliams M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, Segura E, Tussiwand R, Yona S. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nature Reviews Immunology* 2014;14:571.

104. Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology* 2014;14:392.
105. Ingersoll MA, Spanbroek R, Lottaz C, Gautier EL, Frankenberger M, Hoffmann R, Lang R, Haniffa M, Collin M, Tacke F. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 2010;115:e10-e9.
106. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature reviews immunology* 2011;11:762.
107. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang X-F, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker research* 2014;2:1.
108. Stansfield BK, Ingram DA. Clinical significance of monocyte heterogeneity. *Clinical and translational medicine* 2015;4:5.
109. Zawada AM, Rogacev KS, Schirmer SH, Sester M, Böhm M, Fliser D, Heine GH. Monocyte heterogeneity in human cardiovascular disease. *Immunobiology* 2012;217:1273-84.
110. Belge K-U, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L. The proinflammatory CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> DR<sup>++</sup> monocytes are a major source of TNF. *The Journal of Immunology* 2002;168:3536-42.
111. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang S-Y, Senechal B, Puel A, Biswas SK, Moshous D, Picard C. Human CD14<sup>dim</sup> monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 2010;33:375-86.
112. Aoki S, Nakagomi A, Asai K, Takano H, Yasutake M, Seino Y, Mizuno K. Elevated peripheral blood mononuclear cell count is an independent predictor of left ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction. *Journal of cardiology* 2011;57:202-7.
113. Tashiro H, Shimokawa H, Yamamoto K, Nagano M, Momohara M, Muramatu K-h, Takeshita A. Monocyte-related cytokines in acute myocardial infarction. *American heart journal* 1995;130:446-52.
114. Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation* 2010;121:2437-45.
115. Yan X, Anzai A, Katsumata Y, Matsushashi T, Ito K, Endo J, Yamamoto T, Takeshima A, Shinmura K, Shen W. Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2013;62:24-35.
116. Swirski FK, Nahrendorf M. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science* 2013;339:161-6.

117. Nahrendorf M, Swirski FK. Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart. *Circulation research* 2013;112:1624-33.
118. Arfvidsson J, Ahlin F, Vargas KG, Thaler B, Wojta J, Huber K. Monocyte subsets in myocardial infarction: A review. *International journal of cardiology* 2017;231:47-53.
119. Tsujioka H, Imanishi T, Ikejima H, Kuroi A, Takarada S, Tanimoto T, Kitabata H, Okochi K, Arita Y, Ishibashi K. Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 2009;54:130-8.
120. Tapp L, Shantsila E, Wrigley B, Pamukcu B, Lip G. The CD14<sup>++</sup> CD16<sup>+</sup> monocyte subset and monocyte - platelet interactions in patients with ST - elevation myocardial infarction. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2012;10:1231-41.
121. van Amerongen MJ, Harmsen MC, van Rooijen N, Petersen AH, van Luyn MJ. Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice. *The American journal of pathology* 2007;170:818-29.
122. Leblond A-L, Klinkert K, Martin K, Turner EC, Kumar AH, Browne T, Caplice NM. Systemic and cardiac depletion of M2 macrophage through CSF-1R signaling inhibition alters cardiac function post myocardial infarction. *PLoS One* 2015;10:e0137515.
123. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo J-L, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *The Journal of Experimental Medicine* 2007;204:3037-47.
124. Panizzi P, Swirski FK, Figueiredo J-L, Waterman P, Sosnovik DE, Aikawa E, Libby P, Pittet M, Weissleder R, Nahrendorf M. Impaired Infarct Healing in Atherosclerotic Mice With Ly-6Chi Monocytosis. *Journal of the American College of Cardiology* 2010;55:1629-38.
125. Sager HB, Hulsmans M, Lavine KJ, Moreira MB, Heidt T, Courties G, Sun Y, Iwamoto Y, Tricot B, Khan OF. Proliferation and recruitment contribute to myocardial macrophage expansion in chronic heart failure. *Circulation research* 2016;119:853-64.
126. Kaikita K, Hayasaki T, Okuma T, Kuziel WA, Ogawa H, Takeya M. Targeted deletion of CC chemokine receptor 2 attenuates left ventricular remodeling after experimental myocardial infarction. *The American journal of pathology* 2004;165:439-47.
127. Liehn EA, Piccinini A-M, Koenen RR, Soehnlein O, Adage T, Fatu R, Curaj A, Popescu A, Zerneck A, Kungl AJ. A new monocyte chemotactic protein-1/chemokine CC motif ligand-2 competitor limiting neointima formation and myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *Journal of the American College of Cardiology* 2010;56:1847-57.

128. Hayashidani S, Tsutsui H, Shiomi T, Ikeuchi M, Matsusaka H, Suematsu N, Wen J, Egashira K, Takeshita A. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation* 2003;108:2134-40.
129. Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Abou-Khamis T, Michael LH, Rollins BJ, Entman ML, Frangogiannis NG. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circulation research* 2005;96:881-9.
130. Adrain C, Zettl M, Christova Y, Taylor N, Freeman M. Tumor necrosis factor signaling requires iRhom2 to promote trafficking and activation of TACE. *Science* 2012;335:225-8.
131. Siggs OM, Xiao N, Wang Y, Shi H, Tomisato W, Li X, Xia Y, Beutler B. iRhom2 is required for the secretion of mouse TNF $\alpha$ . *Blood* 2012;119:5769-71.
132. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S-i, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF- $\alpha$ : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology* 2010;49:1215-28.
133. SCHLÖNDORFF J, BECHERER JD, BLOBEL CP. Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor  $\alpha$  convertase (TACE). *Biochemical Journal* 2000;347:131-8.
134. Adrain C, Freeman M. New lives for old: evolution of pseudoenzyme function illustrated by iRhoms. *Nature reviews Molecular cell biology* 2012;13:489.
135. McIlwain DR, Lang PA, Maretzky T, Hamada K, Ohishi K, Maney SK, Berger T, Murthy A, Duncan G, Xu HC. iRhom2 regulation of TACE controls TNF-mediated protection against *Listeria* and responses to LPS. *Science* 2012;335:229-32.
136. Christova Y, Adrain C, Bambrough P, Ibrahim A, Freeman M. Mammalian iRhoms have distinct physiological functions including an essential role in TACE regulation. *EMBO reports* 2013;14:884-90.
137. Lee M-Y, Nam K-H, Choi K-C. iRhoms; its functions and essential roles. *Biomolecules & therapeutics* 2016;24:109.
138. Rose-John S. ADAM17, shedding, TACE as therapeutic targets. *Pharmacological research* 2013;71:19-22.
139. Maretzky T, McIlwain DR, Issuree PDA, Li X, Malapeira J, Amin S, Lang PA, Mak TW, Blobel CP. iRhom2 controls the substrate selectivity of stimulated ADAM17-dependent ectodomain shedding. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2013;110:11433-8.
140. Issuree PDA, Maretzky T, McIlwain DR, Monette S, Qing X, Lang PA, Swendeman SL, Park-Min K-H, Binder N, Kalliolias GD. iRHOM2 is a critical pathogenic mediator of inflammatory arthritis. *The Journal of clinical investigation* 2013;123:928-32.

141. Kleinbongard P, Schulz R, Heusch G. TNF $\alpha$  in myocardial ischemia/reperfusion, remodeling and heart failure. *Heart failure reviews* 2011;16:49-69.
142. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor- $\alpha$  and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation* 2000;101:2149-53.
143. Members TF, Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, Andreotti F, Arden C, Budaj A, Bugiardini R, Crea F, Cuisset T. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. *European heart journal* 2013;34:2949-3003.
144. Perper RJ, Zee TW, Mickelson MM. Purification of lymphocytes and platelets by gradient centrifugation. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1968;72:842-8.
145. Magnetic cell separation. Miltenyi Biotec, 2020. (Accessed 08.11.2020, 2020, at <https://www.miltenyibiotec.com/US-en/resources/macshandbook/macstechnologies/cell-separation/magnetic-cell-separation.html#structure-section-9630e5e8-d2da-4b24-9269-3c0782d49157>.)
146. Ziegler-Heitbrock L, Hofer TP. Toward a refined definition of monocyte subsets. *Frontiers in immunology* 2013;4:23.
147. Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*, 2nd edn. Á/L. Erbaum Press, Hillsdale, NJ, USA; 1988.
148. Bozkurt B, Torre-Amione G, Warren MS, Whitmore J, Soran OZ, Feldman AM, Mann DL. Results of targeted anti-tumor necrosis factor therapy with etanercept (ENBREL) in patients with advanced heart failure. *Circulation* 2001;103:1044-7.
149. Deswal A, Bozkurt B, Seta Y, Parilti-Eiswirth S, Hayes FA, Blosch C, Mann DL. Safety and efficacy of a soluble P75 tumor necrosis factor receptor (Enbrel, etanercept) in patients with advanced heart failure. *Circulation* 1999;99:3224-6.
150. Chung ES, Packer M, Lo KH, Fasanmade AA, Willerson JT. Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor- $\alpha$ , in patients with moderate-to-severe heart failure: results of the anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure (ATTACH) trial. *Circulation* 2003;107:3133-40.
151. Mann DL, McMurray JJ, Packer M, Swedberg K, Borer JS, Colucci WS, Djian J, Drexler H, Feldman A, Kober L. Targeted anticytokine therapy in patients with chronic heart failure: results of the Randomized Etanercept Worldwide Evaluation (RENEWAL). *Circulation* 2004;109:1594-602.
152. Kurrelmeyer KM, Michael LH, Baumgarten G, Taffet GE, Peschon JJ, Sivasubramanian N, Entman ML, Mann DL. Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte

- against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000;97:5456-61.
153. Dixon WG, Watson KD, Lunt M, Hyrich KL, Silman AJ, Symmons DPM. Reduction in the incidence of myocardial infarction in patients with rheumatoid arthritis who respond to anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  therapy: Results from the British Society for Rheumatology Biologics Register. *Arthritis & Rheumatism* 2007;56:2905-12.
154. Ljung L, Askling J, Rantapää-Dahlqvist S, Jacobsson L. The risk of acute coronary syndrome in rheumatoid arthritis in relation to tumour necrosis factor inhibitors and the risk in the general population: a national cohort study. *Arthritis research & therapy* 2014;16:R127.
155. Jacobsson LT, Turesson C, Gölfe A, Kapetanovic MC, Petersson IF, Saxne T, Geborek P. Treatment with tumor necrosis factor blockers is associated with a lower incidence of first cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* 2005;32:1213-8.
156. Carballo E, Lai WS, Blakeshear PJ. Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor- $\alpha$  production by tristetraproline. *Science* 1998;281:1001-5.
157. Baer M, Dillner A, Schwartz RC, Sedon C, Nedospasov S, Johnson PF. Tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages is attenuated by an autocrine factor that preferentially induces NF- $\kappa$ B p50. *Molecular and cellular biology* 1998;18:5678-89.
158. Gane JM, Stockley RA, Sapey E. TNF- $\alpha$  autocrine feedback loops in human monocytes: the pro-and anti-inflammatory roles of the TNF- $\alpha$  receptors support the concept of selective TNFR1 blockade in vivo. *Journal of immunology research* 2016;2016.
159. Wawro K, Wawro M, Strzelecka M, Czarnek M, Bereta J. The role of NF- $\kappa$ B and Elk-1 in the regulation of mouse ADAM17 expression. *Biology open* 2019;8:bio039420.
160. Brennan FM, Green P, Amjadi P, Robertshaw HJ, Alvarez-Iglesias M, Takata M. Interleukin-10 regulates TNF- $\alpha$ -converting enzyme (TACE/ADAM-17) involving a TIMP-3 dependent and independent mechanism. *European Journal of Immunology* 2008;38:1106-17.
161. Gooz M. ADAM-17: the enzyme that does it all. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 2010;45:146-69.
162. Cavadas M, Oikonomidi I, Gaspar CJ, Burbridge E, Badenes M, Félix I, Bolado A, Hu T, Bileck A, Gerner C. Phosphorylation of iRhom2 controls stimulated proteolytic shedding by the metalloprotease ADAM17/TACE. *Cell Reports* 2017;21:745-57.
163. Shimoda Y, Satoh M, Nakamura M, Akatsu T, Hiramori K. Activated tumour necrosis factor- $\alpha$  shedding process is associated with in-hospital complication in patients with acute myocardial infarction. *Clinical science* 2005;108:339-47.

164. Akatsu T, Nakamura M, Satoh M, Hiramori K. Increased mRNA expression of tumour necrosis factor- $\alpha$  and its converting enzyme in circulating leucocytes of patients with acute myocardial infarction. *Clinical Science* 2003;105:39-44.
165. Ghaderian SMH, Najar RA, Panah AST. Tumor necrosis factor- $\alpha$ : investigation of gene polymorphism and regulation of TACE–TNF- $\alpha$  system in patients with acute myocardial infarction. *Molecular biology reports* 2011;38:4971-7.
166. Satoh M, Ishikawa Y, Itoh T, Minami Y, Takahashi Y, Nakamura M. The expression of TNF -  $\alpha$  converting enzyme at the site of ruptured plaques in patients with acute myocardial infarction. *European journal of clinical investigation* 2008;38:97-105.
167. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in Atherosclerosis: From Pathophysiology to Practice. *Journal of the American College of Cardiology* 2009;54:2129-38.
168. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2012;32:2045-51.
169. Young JL, Libby P, Schönbeck U. Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thrombosis and haemostasis* 2002;88:554-67.
170. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *New England Journal of Medicine* 2005;352:1685-95.
171. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiological reviews* 2006;86:515-81.
172. Balbay Y, Tikiz H, Baptiste R, Ayaz S, Şaşmaz H, Korkmaz Ş. Circulating interleukin-1 beta, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, and soluble ICAM-1 in patients with chronic stable angina and myocardial infarction. *Angiology* 2001;52:109-14.
173. Shantsila E, Wrigley B, Tapp L, Apostolakis S, Montoro - Garcia S, Drayson M, Lip G. Immunophenotypic characterization of human monocyte subsets: possible implications for cardiovascular disease pathophysiology. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2011;9:1056-66.
174. Passacquale G, Vamadevan P, Pereira L, Hamid C, Corrigall V, Ferro A. Monocyte-platelet interaction induces a pro-inflammatory phenotype in circulating monocytes. *PloS one* 2011;6:e25595.
175. França CN, Izar MCO, Hortêncio MNS, do Amaral JB, Ferreira CES, Tuleta ID, Fonseca FAH. Monocyte subtypes and the CCR2 chemokine receptor in cardiovascular disease. *Clinical Science* 2017;131:1215-24.

176. Lu X-L, Zhao C-H, Zhang H, Yao X-L. iRhom2 is involved in lipopolysaccharide-induced cardiac injury in vivo and in vitro through regulating inflammation response. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017;86:645-53.
177. Grell M, Douni E, Wajant H, Löhden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1995;83:793-802.
178. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Bies RD, Lebovitz R, Mann DL. Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium. *Circulation* 1995;92:1487-93.
179. Higuchi Y, McTiernan CF, Frye CB, McGowan BS, Chan TO, Feldman AM. Tumor necrosis factor receptors 1 and 2 differentially regulate survival, cardiac dysfunction, and remodeling in transgenic mice with tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced cardiomyopathy. *Circulation* 2004;109:1892-7.
180. Defer N, Azroyan A, Pecker F, Pavoine C. TNFR1 and TNFR2 signaling interplay in cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry* 2007;282:35564-73.
181. Barnette DN, Cahill TJ, Gunadasa-Rohling M, Carr CA, Freeman M, Riley PR. iRhom2-mediated proinflammatory signalling regulates heart repair following myocardial infarction. *JCI insight* 2018;3.
182. Badenes M, Adrain C. iRhom2 and TNF: Partners or enemies? *Science Signaling* 2019;12:eaz0444.
183. Schwarz J, Broder C, Helmstetter A, Schmidt S, Yan I, Müller M, Schmidt-Arras D, Becker-Paul C, Koch-Nolte F, Mittrücker H-W. Short-term TNF $\alpha$  shedding is independent of cytoplasmic phosphorylation or furin cleavage of ADAM17. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 2013;1833:3355-67.
184. Goldberg A, Zinder O, Zdrovyyak A, Diamond E, Lischinsky S, Gruberg L, Markiewicz W, Beyar R, Aronson D. Diagnostic coronary angiography induces a systemic inflammatory response in patients with stable angina. *American heart journal* 2003;146:819-23.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Phillip van Dijck, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle von inaktivem Rhomboid-Protein 2 im akuten Myokardinfarkt“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

---

Datum

---

Unterschrift

## Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Publikationsliste

Bernd Hewing & Sebastian Chi-Diep Au & Antje Ludwig & Rena Ellerbroek & Phillip van Dijk & Lisa Hartmann & Heiko Grubitzsch & Carolin Giannini & Michael Laule & Verena Stangl & Gert Baumann & Karl Stangl, Severe Aortic Valve Stenosis in Adults is Associated with Increased Levels of Circulating Intermediate Monocytes, *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 2017

## Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Bernd Hewing, gilt für die Überlassung des Themas und die exzellente fachliche Betreuung mein besonderer Dank.

Darüber hinaus danke ich Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Antje Ludwig, Nicole Rösener, Andrea Weller und den übrigen Mitarbeitern am Center for Cardiovascular Research (CCR) für die stetige Hilfe bei meiner Arbeit im Labor.

Mein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. med. Verena Stangl und Herrn Prof. Dr. med. Karl Stangl als Leiter der Arbeitsgruppe am CCR sowie der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) für die großzügige Förderung mit dem Otto-Hess-Promotionsstipendium.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern, Sabine und Walther, für ihre immerwährende Unterstützung danken.