

TECHNISCHEN UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Erste Medizinische Klinik und Poliklinik
des Klinikums rechts der Isar
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. H. Schunkert)

**RNA- Expression inflammatorischer und apoptotischer Mediatoren bei
Infarktpatienten nach Erythropoietintherapie**

Barbara Elisa Lorenz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. I. V. Ott

2. Univ.- Prof. Dr. H. Schunkert

Die Dissertation wurde am 23.07.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät für Humanmedizin am 29.01.2014 angenommen.

Für meinen Großvater Wendelin Lorenz

INHALTSVERZEICHNIS

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
2	EINLEITUNG	7
2.1	DER MYOKARDINFARKT	7
2.2	REPERFUSIONSSTRATEGIEN	7
2.3	REPERFUSIONSSCHADEN	8
2.4	ERYTHROPOIETIN	10
2.5	RNA- EXPRESSION ZIRKULIERENDER LEUKOZYTEN MIT QUANTITATIVER PCR	13
2.6	FRAGESTELLUNG	14
3	REGENERATION OF VITAL MYOCARDIUM IN ST-SEGMENT ELEVATION MYOCARDIAL INFARTION BY ERYTHROPOIETIN (REVIVAL-3)	15
4	MATERIAL UND METHODEN	17
4.1	ERYTHROPOIETIN- REZEPTOR- NACHWEIS	17
4.2	PATIENTENKOLLEKTIV	18
4.3	ABNAHMEPROTOKOLL	19
4.4	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	19
4.4.1	Funktionsprinzip eines Durchflusszytometers	19
4.4.2	Probenaufbereitung	20
4.4.3	Probenauswertung	22
4.5	RNA- ISOLATION UND cDNA- SYNTHESE	22
4.5.1	Vollblut- RNA- Isolation	23
4.5.2	Bestimmung der RNA- Konzentration	23
4.5.3	cDNA- Synthese	24
4.6	SEMIQUANTITATIVE POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)	25
4.7	KORRELATION KLINISCHER DATEN	27
5	ERGEBNISSE	28
5.1	EPO- REZEPTOR- NACHWEIS AUF LEUKOZYTEN	28
5.2	STUDIENPOPULATION	29
5.3	LABORCHEMISCHE ENTZÜNDUNGSPARAMETER	29
5.4	RNA- ANALYSE IN ZIRKULIERENDEN LEUKOZYTEN	32
5.5	ZYTOMETRISCHE APOPTOSEMESSUNG	33
6	DISKUSSION	34

6.1	ERYTHROPOIETIN- REZEPTOR-NACHWEIS AUF ZIRKULIERENDEN LEUKOZYTEN	36
6.2	POSTMYOKARDIALE ENTZÜNDUNGSREAKTION UND ERYTHROPOIETIN	36
6.2.1	IL-6 Expression in zirkulierenden Leukozyten	39
6.2.2	Systemische Entzündungsparameter	41
6.3	MOBILISATION HÄMATOGENER PROGENITORZELLEN IM INFARKTGESCHEHEN	41
6.3.1	CXCL12 –Expression in zirkulierenden Leukozyten	43
6.3.2	Prominin-1- Expression in zirkulierenden Leukozyten	45
6.3.3	Endoglin- Expression in zirkulierenden Leukozyten	46
6.4	APOPTOSEREAKTION NACH AKUTEM MYOKARDINFARKT	48
7	ZUSAMMENFASSUNG	50
8	LITERATURVERZEICHNIS	52
9	DANKSAGUNG	58
10	LEBENS LAUF	59

1 Abkürzungsverzeichnis

A.p.	Angina pecotris
ACA/AHA	American Collage of Cardiology
AHA	American Heart Association
AICDs	Automatic implantable cardioverter defibrillator
Apaf1	Apoptotic protease- activating factor
BCL- 2	B- cell lymphoma- 2
BMPCs	Bone marrow- derived progenitor cells
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CK	Creatininkinase
CK-MB	Kardiomyozytenspezifische Creatininkinase
CPDA	Citrat, Phosphat, Dextrose, Adenin
CRP	C- reaktives Protein
Ct	Cycle of Threshold
CXCL 12	Stroma derived factor 1 (SDF-1)
dATP	deoxy adenosine triphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENG	Endoglin
EPO	Erythropoietin
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	granulocyte colony- stimulation factor
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GOT	Glutamat- Oxalacetat- Transaminase
Hb	Hämoglobin
HBSS	Hank`s buffered salt solution
HSP	Hitzeschockproteine
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule- 1
IL- 10	Interleukin- 10
IL-1 beta	Interleukin- 1 beta
IL-6	Interleukin- 6
IL-8	Interleukin- 8
LAD	Left aterior decending
MNC CD34+	Mononukleare Zellen, CD 34 positiv
NF-Kappa B	Nuclear factor- Kappa B
Nnw	nicht nachweisbar
PCI	perkutane koronare Intervention
PCR	Polymerasekettenreaktion

PROM 1	Prominin/CD133
PTCA	Primäre transluminale Koronarangiographie
Revival-3	Regeneration of Vital Myocardium in ST- Segment Elevation Myocardial Infarction by Erythropoietin
RISK	Reperfusion Injury salvage kinase
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Rounds per minute
SMC	Smooth muscle cells
TGF- 1b	Transformin growth factor- 1b
TNF- alpha	Tumornekrosefaktor alpha

2 Einleitung

2.1 Der Myokardinfarkt

Die Bedeutung des akuten Myokardinfarkts für die Morbidität und Mortalität der westlichen Welt ist unbestritten. Noch vor neoplastischen oder Infektionskrankheiten nimmt die ischämische Herzerkrankung die Spitzenposition der Todesursachen aktuell und im Ausblick auf die Zukunft ein.¹

Die Diagnosekriterien des Herzinfarktes wurden im Jahre 2000 mit der Veröffentlichung eines Consensus Documents der European Society of Cardiology und des American College of Cardiology neu definiert²:

- 1) Nachweis der biochemischen Marker der Nekrose von Herzmuskelgewebe (Troponin oder CK-MB) mit mindestens einem der folgenden Kriterien:
 - a) ischämische Symptome
 - b) Entwicklung von pathologischen Q-Wellen im EKG
 - c) EKG-Veränderungen, die auf eine Ischämie hindeuten (ST-Streckenveränderungen)
 - d) Koronarintervention
- 2) Pathologische Befunde eines akuten Infarkts

Im Rahmen der verbesserten Therapiemöglichkeiten konnte in den letzten 40 Jahren die Zahl der Todesfälle der ischämischen Herzerkrankung verringert werden. Jedoch offenbart eine Aufstellung der Krankheits- und Todesfälle nach Altersklassen, dass vielmehr der tödliche Ausgang ins höhere Alter verschoben und nicht das Auftreten einer ischämischen Herzerkrankung an sich verhindert wird.

Dies ist im Besonderen interessant, da eine Abnahme der Mortalität bei weitgehend konstanter Inzidenz vor allem als Auswirkung der erweiterten Therapiemöglichkeiten und sekundären Prävention verstanden werden kann.³

Einen großen Betrag haben hier die immensen Therapiefortschritte der letzten Jahrzehnte, von der Thrombolyse über die Koronarangiographie im Rahmen einer Primären transluminalen Koronarangiographie (PTCA) und die medikamentösen Begleittherapie geleistet.

2.2 Reperusionsstrategien

Zu einem Myokardinfarkt kommt es meist, wenn es nach der Ruptur einer arteriosklerotischen Plaque und Freilegung koagulatorischen Materials, z.B. Kollagen, zu einem thrombotischen Verschluss eines Koronargefäßes kommt. Hierdurch wird das durch das entsprechende Gefäß

versorgte Myokard ischämisch und kann schließlich nekrotisch werden.

In wie weit es zur Ischämie und Nekrose kommt, hängt unter Anderem vom Ausmaß der kollateralen Blutversorgung, metabolischen Faktoren und der Wiedereröffnung des Gefäßes ab.

Zur Wiedereröffnung verschlossener Koronarien wurde zunächst das Prinzip der Fibrinolyse entdeckt. Als erste fibrinolytische Substanz wurde Streptokinase, gebildet von beta-hämolytischen Streptokokken, entdeckt.

Während Streptokinase ein allergisches Potenzial birgt, bevorzugt man heute gentechnisch veränderte Substanzen, wie Tenecteplase (Alteplase).

In den 1980er Jahren konnte in verschiedenen Studien, GISSI-1, ISIS-2, AIMS, ASSET, eine signifikante Abnahme der Mortalität bei Infarktpatienten gezeigt werden. Vor allem das Intervall zwischen Auftreten der Symptomatik und der Medikamentengabe, am besten innerhalb der ersten drei Stunden nach Symptombeginn, ist für den Therapieerfolg entscheidend.

Genau hier liegt auch weiterhin die Rolle der fibrinolytischen Therapie: Während man inzwischen der primären Koronarangiographie im Allgemeinen den Vorzug gibt, so ist die Fibrinolyse in Bereichen, in denen ein Katheterlabor nicht unmittelbar zur Verfügung steht, nicht wegzudenken.⁴

Soweit verfügbar hat sich die perkutane koronare Intervention (PCI) als zu bevorzugende Therapie bei einem ST- Strecken Hebungsinfarkt herausgestellt. Verschiedene Studien und Metaanalysen haben bewiesen, dass die PCI unter anderem die Mortalität und die Reinfarktrate, im Vergleich zur fibrinolytischen Therapie, deutlich senken kann.

Wie auch bei der Fibrinolyse stellt der Zeitpunkt der PCI einen prognoseentscheidenden Faktor dar: „Time is myocardium“. So wird nach den aktuellen Guidelines der ACA/AHA wird für ein Zeitintervall vom Auftreten der Beschwerden bis zur Koronarangiographie von weniger als 90 Minuten eingetreten.

Besonders im Vordergrund der Bemühungen stehen deshalb die weitere Ausdehnung der Verfügbarkeit der Koronarangiographie, bisher vor allem in abgelegenen Gebieten problematisch, sowie die supportive medikamentöse Therapie.⁵

Hier kommen im klinischen Alltag direkt zur Koronarangiographie Acetylsalicylsäure, Betablocker, Clopidogrel und Heparin zu Einsatz. Im weiteren Verlauf erfolgt eine, auf den Patienten zugeschnittene ergänzende Therapie mit Natriumkanalblockern und Cholinesterasehemmern, den sogenannten Statinen.

2.3 Reperfusionsschaden

Das Ziel sämtlicher Reperusionsstrategien ist neben der Besserung der Angina pectoris-Symptomatik vor allem die möglichst schnelle und komplette Wiederherstellung des Blutflusses in

dem zuvor verschlossenen Koronargefäß.

Damit möchte man die Ischämiezeit begrenzen und die durch die Myokardnekrose drohenden Komplikationen wie plötzlicher Herztod, Arrhythmien oder die Entwicklung einer Herzinsuffizienz verhindern.

Jedoch birgt auch die Reperfusion selbst Gefahren für das ischämische Myokard.

Der Reperfusionsschaden, „lethal reperfusion injury“, ist definiert als ein Myokardschaden, der nach der Wiederherstellung des koronaren Blutflusses nach vorangegangener Ischämiezeit entsteht und durch den Untergang von kardiale Myozyten, die noch unmittelbar vor der Reperfusion lebensfähig waren, bedingt ist.

Anhand der Ergebnisse von Ischämie-Reperfusion- Tierstudien wurde dem Reperfusionsschaden eine erhebliche Rolle am endgültigen Infarktausmaß eingeräumt. Bis zu 50% des endgültigen Gewebeschadens sollen durch die Reperfusion selbst verursacht werden.

Neben verschiedenen Faktoren, wie den Auswirkungen von oxidativem Stress, Kalziumungleichgewicht und pH- Veränderungen, steht auch die Entzündungsreaktion des Myokards im Vordergrund. Die vom Myokard ausgeschütteten Chemokine führen über Zelladhäsionsmoleküle zur Einwanderung von Neutrophilen in das Infarktgebiet. Hier verursachen die eingewanderten Leukozyten Gefäßverstopfungen, die Freisetzung von degenerativen Enzymen und reagiblen Sauerstoff.

Auf verschiedenen Wegen ist in klinischen Studien versucht worden, auf der Ebene der Neutrophilen in den Reperfusionsschaden einzugreifen, bisher leider ohne durchschlagenden Erfolg.⁶

Durch die kardiale Ischämie-Reperfusion werden sowohl Mechanismen der Nekrose als auch der Apoptose aktiviert. Während der Prozess der Nekrose charakterisiert ist durch einen Bruch der Membran, massive Zellschwellung, Zellyse und – fragmentierung mit einer sich daran anschließenden Entzündungsreaktion, ist die Apoptose dagegen ein energieabhängiger Prozess, der in der Kondensation des Chromatins, der DNA- Fragmentierung bei erhaltener Zellmembran resultiert und folglich keine entzündliche Reaktion hervorruft.

Der Apoptose kommt im Rahmen des Reperfusionsschadens eine besondere Rolle zu. Es wird vermutet, dass durch die Reperfusion die schon während der Ischämie begonnenen Apoptoseprozesse beschleunigt werden. Andere Ergebnisse deuten darauf hin, dass erst mit dem Einsetzen der Reperfusion der apoptotische Teil des Zellschadens ausgelöst wird.

In beiden Fällen stellt die Apoptose ein wichtiges Ziel in der Behandlung des Reperfusionsschadens dar.

Auf der Suche nach zellulären Schutzmechanismen die einer Apoptose entgegenwirken, konnten verschiedene überlebensfördernde Kinasen, so die Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI3K)- Akt

und die p42/p44 extrazelluläre signalkontrollierte Kinase (Erk1/2), auch als Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK) Pathway bezeichnet, gefunden werden.

Des Weiteren vermutet man eine Beteiligung an der Aktivierung antiapoptotischer Kinasen, wie p38, JNK, MAPK, Proteinkinase A (PKA), Rho-Kinase und JAK-STAT.⁷

Eine Möglichkeit zur RISK-Pathway Aktivierung ist die Postkonditionierung des Myokards: Kurze intermittierende Episoden von Ischämie und Reperfusion, die nach Auftreten einer längeren Zeit der Ischämie angewandt werden. Hierbei ist aber die klinische Anwendbarkeit unter Anderem auf Patienten, die zeitnah eine Koronarangiographie erhalten können, beschränkt. Als medikamentöse Alternative zur Postkonditionierung wurde Erythropoietin, dessen Rezeptoren auf Kardiomyozyten gefunden wurden, untersucht.⁸ Die Postkonditionierung und die EPO-Behandlung zeigten beide eine bessere post-ischämische linksventrikuläre Funktion. Im direkten Vergleich war darüber hinaus auch die Infarktgröße unter EPO- Therapie signifikant kleiner als nach der Postkonditionierung. Diese Ergebnisse lassen auf einen therapeutischen Effekt von Erythropoietin in der Therapie des akuten Myokardinfarkts hoffen.⁹

2.4 Erythropoietin

Das Gen für das Hormon Erythropoietin, kurz EPO, liegt auf dem Chromosom 7 und kodiert für eine Polypeptidkette von 193 Aminosäuren. Das reife, zirkulierende Protein hat ein Gewicht von 30,4 k Dalton und ist 165 Aminosäuren lang. EPO besitzt vier glykosylierte Ketten, davon drei N-linked und eine O-linked Seitenketten. Diese Seitenketten sowie zwei Disulfidbrücken, an Positionen 7 und 160 und an Positionen 29 und 33, sind notwendig für die biologische Aktivität des Hormons und können es vor Beschädigungen durch Sauerstoffradikale schützen.^{10, 11}

Zum größten Teil wird EPO in der Niere, aber auch in Leber, Gehirn und Uterus gebildet.¹¹

Die Bildung von EPO wird nicht allein durch eine niedrige Konzentration an roten Blutkörperchen, sondern vor allem durch das verminderte Sauerstoffangebot im Gewebe reguliert. Dadurch wird nicht nur in der Niere, sondern auch im Leber- und Hirngewebe die EPO- Bildung stimuliert. Während die hypoxisch vermittelte EPO-Produktion in der Niere nur vorübergehend zu sein scheint, ist sie im Hirngewebe anhaltender.¹²

Des Weiteren können anämischer Stress, Insulinausschüttung, verschiedene Zytokine, darunter Insulin-like growth factor, tumor necrosis factor-alpha (TNF- alpha), Interleukin-1beta und Interleukin-6 zu einer erhöhten Bildung von EPO und EPO- Rezeptoren führen.¹¹

Die primäre Funktion von EPO, die mittels des EPO- Rezeptors und sich anschließende Signalkaskaden vermittelt wird, besteht darin, die Proliferation, die Differenzierung und das Überleben von hämatogenen Progenitorzellen zu fördern und somit die Produktion von roten

Blutkörperchen zu steigern.¹²

Während bislang vor allem die Wirkung auf die Erythropoese, hier z.B. bei Anämien im Rahmen eines chronischen Nierenversagens oder der Dialyse, im Vordergrund stand, hat die Entdeckung der Expression von Erythropoietin- Rezeptoren auf weiteren Zellreihen, wie Megakaryozyten, Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen, Skelettmyoblasten, Neuronen, Nephronen und Myokardiozyten, einen Ausblick für weitere Therapiemöglichkeiten mit EPO gegeben.¹³

Auch konnten Erythropoietin- Rezeptoren im Verdauungstrakt von Ratten, im männlichen wie weiblichen Reproduktionstrakt und im respiratorischen System gefunden werden.

EPO ist ein gewebeprotectives Hormon, das bei verminderter oder fehlender Sauerstoffversorgung und der Exposition gegenüber freien Radikalen Apoptose verhindern kann.¹⁰

Dies ist vor allem im Rahmen eines zerebralen oder kardialen Infarktes wichtig, da neben der zentralen Zone des schnellen Zelltodes, der Nekrose, das umliegende Gewebe in Mitleidenschaft gezogen wird. Dieses erleidet zwar keinen schnellen Untergang, kann dafür aber in Apoptose gehen. Im Rahmen eines zerebralen Insults ist zu beobachten, dass zusätzlich zur parakrinen EPO- Ausschüttung der Astrozyten auch die Durchlässigkeit der Blut- Hirn- Schranke für EPO zur erhöhten Konzentration und somit zur gewebeprotectiven Wirkung mittels der EPO- Rezeptoren auf den Neuronen führt.

Nach Myokardinfarkt konnten erhöhte EPO-Spiegel im peripheren Blut von Patienten innerhalb von sieben Tagen nachgewiesen werden^{10, 11}

In einer Studie an Ratten konnte von Gao et al. 2007 durch die Gabe von Darbepoietin nach kardialer Ischämie eine Reduktion des Infarktgewebes gezeigt werden.¹⁴

Zu Beginn der Apoptoseinduktion der Zelle, kommt es zur Externalisierung von Phosphatidylserinen, während die Fragmentierung der DNA eher später in der Apoptose einsetzt. EPO bietet die Möglichkeit, schon die Präsentation von Phosphatidylserinen, dazu die einzelnen Stufen der DNA- Zerstörung und somit die sich anschließenden apoptotischen Kaskaden zu verhindern.¹¹

Während die Vaskulogenese, also die de- novo Gefäßbildung, weitgehend EPO- unabhängig abläuft, wie anhand von EPO-Rezeptor- Knock-out Mäusen gezeigt werden konnte, fördert EPO entscheidend die Angiogenese, also das Aussprosseln von neuen Gefäßen aus bereits vorhandenen. So stimuliert EPO zum Beispiel auch die Angiogenese im weiblichen Reproduktionstrakt um die während des Zyklus zu Grunde gegangenen Gefäße zu ersetzen.¹²

Proangiogenetische Effekte von EPO und Förderung der Zellproliferation- und Differenzierung konnten bei In-vitro-Versuchen an kultivierten Endothelzellen nach EPO-Stimulation beobachtet werden.

Auch in der Wundheilungskaskade, eben durch die Förderung der Angiogenese und der Bildung

von Granulationsgewebe, spielt EPO eine wichtige Rolle.

Des Weiteren führt die systemische Gabe von EPO zu einer Mobilisation von Progenitorzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut, was mit einer verbesserten myokardialen Funktion nach einem Myokardinfarkt bei Mäusen einhergeht.^{10, 15}

So konnte gezeigt werden, dass EPO im Rahmen der Differenzierung von Stammzellen einerseits die Regeneration des vaskulären Systems und die Proliferation und Migration der endothelialen Zellen selbst fördert und andererseits über die DNA- Synthese in hämatogenen Progenitorzellen die Produktion von erythrozytären, megakaryozytischen und neuronalen Progenitorzellen anregt.¹² Zudem konnte auch eine Einflussnahme auf Entzündungsreaktionen des Körpers nachgewiesen werden. So konnte im Mausmodell die immunmodulatorische Wirkung auf B- Lymphozyten, dendritische Zellen und Makrophagen gezeigt werden.¹⁰

Neben der schon lange bekannten und erfolgreich therapeutisch eingesetzten hämatopoese-fördernden Wirkung von Erythropoietin, rücken in jüngster Zeit die Effekte in der Angiogenese, Entzündungshemmung und die Anti-Apoptose in den klinischen Mittelpunkt.

Dabei stellt sich die Frage, über welche Rezeptoren diese Effekte vermittelt werden.

Der Erythropoietin- Rezeptor ist ein Transmembranrezeptor, der zur Zytokin- Rezeptor-Superfamilie gehört und als angelegtes Dimer vorliegt. Die Bindung eines EPO- Moleküls führt zur Homodimerisierung zweier Rezeptoren und aktiviert die intrazellulären Signalwege, so der Janus-Tyrosin Kinase 2 (Jak2).

In einigen Studien wurde zuletzt diskutiert, dass die hämatopoetischen und die antiapoptotischen, kardioprotektiven Effekte von EPO über zwei verschiedene EPO- Rezeptoren vermittelt werden.

Für die Hämatopoese wurde das klassische Homodimer zweier EPO- Rezeptoren postuliert, für die Antiapoptose dagegen ein Heterodimer aus einem EPO- Rezeptor und einem common beta Rezeptor. Diese Annahme beruht auf der Beobachtung, dass EPO- Analoga, die keine hämatopoetische Wirkung mehr besitzen, dennoch weiterhin gewebe- protektiv wirksam sind.¹⁶

Leider ist, anders als die Stimulation der Erythropoese, der kardioprotektive Mechanismus noch nicht in Gänze geklärt. Im Rahmen des Ischämie- Reperfusion- Zellschadens im Myokard, ist besonders der Reperfusion injury salvage kinase (RISK) – Signalweg von Bedeutung.

Zum RISK- Pathway werden neben anderen Kinasen vor allem die Phosphoinositid-3-Kinase (PI 3-K) und die über MEK1/2- aktivierte Extracellular-signal-regulated-kinase1/2 (ERK1/2) gezählt. Diese beiden Kinasen werden allerdings nicht direkt vom EPO- Rezeptor aktiviert, sondern im Laufe einer Aktivierungskaskade:

Durch die Bindung von EPO an ein Rezeptordimer kommt es zur Aktivierung der rezeptorassoziierten Januskinase 2 (Jak2).

Diese aktiviert durch Phosphorylierung die Phosphoinositid-3-Kinase (PI 3-K) und PI 3-K

ebenfalls durch Phosphorylierung die Protein Kinase B (Akt).

Jak2 aktiviert außerdem über die MEK 1/2 durch Phosphorylierung die extracellular-signal-regulated-kinase1/2 (ERK1/2).

PI 3-K/Akt wirkt unter anderem antiapoptotisch durch die Verhinderung der proapoptischen B-cell lymphoma (Bcl- 2) Proteine BAD und BAX, die Verhinderung der Kaspase- Aktivität und Stabilisierung der mitochondrial permeability transition pore (mPTP).

mPTP ist ein unspezifischer „high- conductance“ - Kanal, der sich in den ersten Minuten nach der Reperfusion in die innere Mitochondrienmembran bewegt und als entscheidender Mediator des Zelluntergangs gilt.

Die zytoprotektive Wirkung von ERK1/2 begründet sich unter Anderem auf die Inhibition der Kaspasen 3 und 9.⁷

Jak2 phosphoryliert außerdem die Signal and activator or transcription Proteine (STAT).

Die so aktivierten STAT3 und STAT5 führen schließlich zu einer gesteigerten Transkription der endothelialen NO -Synthase (eNOS) und Cyclooxygenase- 2 (COX-2). Wie oben erwähnt, verhindert das von eNOS gebildete Stickoxid die Öffnung der mitochondrialen PTP und schützt somit das Myokard bei der Reperfusion vor der Apoptoseeinleitung.¹⁶

In Hinblick auf die Zellprotektion hat sich gezeigt, dass Erythropoietin nicht nur STAT3, STAT5 und ERK1/2 aktiviert, sondern diese Reaktionswege in die Zellentwicklung und den Zellschutz einbindet.

2.5 RNA- Expression zirkulierender Leukozyten mit quantitativer PCR

In dieser Arbeit wurden neben klinischen Laborparametern und zytometrischer Analyse der Erythropoietin- Therapie bei akuten Herzinfarkten auch die Expression verschiedener RNA-Sequenzen in zirkulierenden Leukozyten mit Hilfe einer quantitativen PCR untersucht.

Um die antiinflammatorischen Effekte von EPO zu beurteilen, wurden die beiden Primer Stroma derived factor -1 /SDF-1 (CXCL12), sowie Interleukin 6 (IL-6) verfolgt.

CXCL-12 gehört zur Familie der Chemokine und wurde zuerst aus Knochenmarkszellen isoliert. Die Konzentration von CXCL12 spielt eine entscheidende Rolle in Hinblick auf die Migration von Progenitorzellen. So hält ein hoher Gradient im Knochenmark die Zellen zurück, eine verstärkte Ausschüttung im peripheren Blut begünstigt eine Migration der Progenitorzellen in die Peripherie.¹⁷⁻¹⁹

Zudem konnten in hohen Dosen anti- inflammatorische und Matrix-stabilisierende Effekte in instabiler Angina pectoris gefunden werden.²⁰

Interleukin- 6 (IL-6) gehört zur Familie der Interleukine und ist unter anderem über die Induktion von verschiedenen Akute-Phase-Proteinen an der systemischen Entzündungsreaktion beteiligt.²¹

Über den Tumor- necrosis- factor alpha (TNF alpha) und IL-1 beta wird im Entzündungsprozess die Bildung von IL-6 induziert. Diese drei Komponenten zeigen sich vor allem für den systemischen, weniger für den lokalen Anteil der Entzündungsreaktion verantwortlich.²²

Um die Einflüsse der EPO- Gabe auf die Progenitorzellmobilisation aus dem Knochenmark darzustellen wurde der Primer Proliferin- 1 (PROM-1/CD133) verfolgt.

Proliferin 1 dient der Expression des Oberflächenmarkers CD 133, der von Progenitor- und Stammzellen exprimiert wird.

Auf reifen peripheren Leukozyten konnte bisher keine Expression nachgewiesen werden, so dass die Nachweisbarkeit im peripheren Blut nach Myokardinfarkt und EPO- Gabe eine Mobilisation zur Voraussetzung hat.^{23, 24}

Zusätzlich wurde noch der Primer Endoglin (ENG) mit Hilfe der quantitativen PCR untersucht.

Endoglin ist ein transmembranöser Korezeptor der Transformin-growth-factor-1beta-Familie und wird v.a. auf proliferierenden Endothelzellen gebildet. Neben der Beteiligung an entzündlichen Prozessen z.B. im Rahmen der Arteriosklerose ist Endoglin auch an der Angiogenese und Neovaskularisation beteiligt.²⁵⁻²⁸

Bezüglich der anti- apoptotischen Wirkung von EPO wurde der Primer B cell lymphoma 2 (BCL-2) untersucht, der für die Regulation der Apoptose von Bedeutung ist.

BCL-2 findet sich in Kardiomyozyten und Leukozyten und wirkt über eine Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotenzials und antiapoptotisch im Gegenspiel gegen die proapoptotischen Mitglieder der B-cell-lymphoma 2 Proteinfamilie, hier zum Beispiel Bax, Bak.²⁹⁻³¹

2.6 Fragestellung

In der Revival 3- Studie wurde die linksventrikuläre Auswurffraktion nach 4-6 Monaten untersucht. Diese Substudie bestimmt die Auswirkungen der Erythropoietin- Hochdosistherapie im Vergleich zur Placebo- Gabe auf die Genexpression zirkulierender Leukozyten.

Verschiedentlich wurde in den letzten Jahren sowohl die systemische als auch die lokale, sich im Myokard abspielende Entzündungsreaktion bei Gefäßwiedereröffnung nach einem Akuten Myokardinfarkt diskutiert.³²

Auch die Rolle sog. Progenitorzellen, bone marrow-derived progenitor cells (BMPCs), deren Mobilisation aus dem Knochenmark und deren mutmaßlicher Beitrag zum Remodelling des geschädigten Myokards, war Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte.³³

Während die Expression des Erythropoietin- Rezeptors auf verschiedene Zellpopulationen so Kardiomyozyten, erythroide Progenitorzellen und verschiedene Zellen der weißen Zellreihe bereits dokumentiert wurde, wurde in dieser Arbeit der Nachweis des Rezeptors auf zirkulierenden Leukozyten verfolgt und darüber hinaus das Zusammenspiel der Wirkung auf Leukozyten im zirkulierenden Blut und den systemischen Auswirkungen der EPO-Therapie unter verschiedenen Gesichtspunkten untersucht:

1. Nachweis von Erythropoietin- Rezeptoren auf zirkulierenden Leukozyten
2. Laborchemische Entzündungsparameter im Myokardinfarkt
3. Quantitative RNA- Analyse zirkulierender Leukozyten
4. Zytometrische Apoptosemessung

3 Regeneration of Vital Myocardium in ST-Segment Elevation Myocardial Infarction by Erythropoietin (REVIVAL-3)

In dieser randomisierten, doppel-blinden Studie wurden 138 Patienten mit einem akuten ST-Strecken- Hebungsinfarkt und primärer perkutaner Koronarintervention eingeschlossen. Den Patienten wurde, randomisiert und entsprechend zugeteilt, sofort, nach 24h und nach 48h nach PTCA Epoetin-beta (3,33 x 10⁴ U, n= 68) oder ein Placebo (n=70) verabreicht. Der primäre Endpunkt war die linksventrikuläre Ejektionsfraktion sechs Monate nach dem Infarkt ereignis, gemessen mittels Kernspintomographie.

Andere Endpunkte beinhalteten die Infarktgröße nach 5 Tagen und 6 Monaten. Klinische Ereignisse (Tod, Reinfarkt, Apoplex und infarkt-bezogene arterielle Revaskularisation) wurden nach 30 Tagen und nach 6 Monaten untersucht.

Einschlusskriterien:

1. Patienten mit ST- Hebungsinfarkt innerhalb 24h nach Symptombeginn
 - Angina pectoris ≥ 20 min. und
 - ST- Streckenhebungen $\geq 0,1$ mV in ≥ 2 Extremitätenableitungen oder $\geq 0,2$ mV in ≥ 2 nebeneinander liegenden Brustwandableitungen oder neu aufgetretener Linksschenkelblock im EKG
2. Alter >18 Jahre und ≤ 80 Jahre
3. Negativer Schwangerschaftstest bei gebärfähigen Frauen

4. Unterschriebene Einverständniserklärung
5. Linksventrikuläre Ejektionsfraktion < 50% (angiographisch im Herzkatheter)
6. Erfolgreiche Koronarintervention

Ausschlusskriterien:

1. Stattgehabter Myokardinfarkt
2. Kardiogener Schock
3. Lebenserwartung < 1 Jahr (z.B. Malignom)
4. Koronarintervention innerhalb der letzten 30 Tage oder geplante Koronarintervention innerhalb der nächsten 30 Tage
5. Schwerer arterieller Hypertonus ($RR_{\text{sys}} > 160/100$ mmHg, medikamentös nicht einzustellen)
6. Bekannte Epilepsie
7. Aktive Blutung (gastrointestinal, urogenital), schweres Trauma oder große Operationen innerhalb der letzten Wochen, Z.n. interkranialer Blutung, Aortendissektion, Ablehnung einer Bluttransfusion
8. Perikarditis
9. Relevante hämatologische Erkrankungen (wie essentielle Thrombozythämie, megakaryoblastische Leukämie, Polycythämia vera)
10. Relevante hämatologische Abweichungen: Hb < 10 mg/dl oder > 15 mg/dl, Thrombozytenzahl < 100 000/ μ l oder > 600 000/ μ l
11. Kontraindikation für Kernspintomographie (elektrisch, magnetisch oder mechanisch aktivierbare Implantate wie Schrittmacher, AICDs, chirurgische Clips, Gefäßclips, Cochleaimplantate, Neurostimulatoren, Infusionspumpen, Metallsplitter z.B. im Auge, ferromagnetische Drähte, künstliche Herzklappen, wenn Verdacht auf Dehiszenz besteht)
12. Niereninsuffizienz (GFR < 30 ml/min, Kreatinin > 3mg/dl oder Dialyse)
13. Schwere Lebererkrankungen (GOT(=AST) > 5fache der Norm)
14. Bekannte Allergie gegenüber Erythropoietin
15. Anaphylaktische Reaktion nach Kontrastmittelgabe
16. Phenylketonurie
17. Schwangerschaft, Stillzeit, 90 Tage nach Entbindung

Im Rahmen der standardisierten klinischen Praxis wurde vor der Randomisierung jedem Patienten folgende Medikation verabreicht:

- Orale Loading Dose 600mg Clopidogrel

- 500 mg Aspirin intravenös

Weitere Medikamente, z.B. Betablocker, wurden je nach Einschätzung des behandelnden Arztes verordnet.

4 Material und Methoden

4.1 Erythropoietin- Rezeptor- Nachweis

Da im Verlauf der Revival-3- Studie auch die Wirkung von Erythropoietin auf zirkulierende Leukozyten untersucht werden sollte, wurde zunächst im Blut gesunder Kontrollpersonen (n=4) auf RNA-Ebene nach der Expression von EPO- Rezeptoren gesucht.

Hierzu wurden jeder Testperson zwei Röhrchen mit 8,5 ml CPDA (Citrat, Phosphat, Dextrose, Adenin)- Blut entnommen und mittels Dextranfällung die zirkulierenden Leukozyten isoliert.

Den 15 ml menschlichem Blut wurden hierzu 4,5ml 3%ige Dextranlösung in einem 50 ml Falcon Tube zugegeben und anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die so von den restlichen Blutbestandteilen getrennten Leukozyten wurden mit dem Überstand mittels einer sterilen Pasteurpipette in ein neues 50ml Falcon Tube überführt und mit PBS (Phosphat buffered salt solution)- Pufferlösung, invitrogen GmbH Karlsruhe, auf 50 ml Gesamtvolumen aufgefüllt.

Anschließend wurde das Falcon Tube bei 4° Celsius und 1600 rpm für 10 Minuten zentrifugiert.

Nach diesem Waschvorgang wurde der Überstand über dem Leukozytenpellet abgenommen und verworfen.

Das verbleibende Pellet am Tube- Boden wurde in 7,5 ml Aqua dest. resuspendiert und nach exakt 25 Sekunden 2,5 ml einer 3,6% NaCl- Lösung zugegeben. Durch die Zugabe dieser Kochsalzlösung sollen die verbleibenden Erythrozyten zum Platzen gebracht werden.

Wiederum wurde das Falcon Tube mit PBS- Pufferlösung auf 50 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und bei 4° Grad Celsius und 1600 rpm für 10 Minuten zentrifugiert.

Im diesmal abgenommenen und verworfenen Überstand befinden sich auch die lysierten Erythrozytenbestandteile.

Die nun isolierten Granulozyten und Neutrophilen wurden 10^6 Zellen in 100 µl Hank's buffered salt solution (HBSS), um das osmotische Gleichgewicht zu erhalten, aufgenommen.

Um die Expression des EPO- Rezeptors mit und ohne Stimulation beurteilen zu können, wurde ein Teil der isolierten Zellen für 8h mit 100 IU Erythropoietin inkubiert, während dem anderen Teil keine Medikation zugesetzt wurde.

Nach der Inkubation wurde mit Hilfe des RNeasy Protokolls der Firma Qiagen (RNeasy Mini Kit) die RNA isoliert.

Anschließend wurde ebenfalls mit Hilfe der hergestellten cDNA eine Polymerasekettenreaktion mit dem Primer des EPO- Rezeptors der Firma Applied Biosciences, Hs001811092_m1, zum spezifischen Nachweis der Expression durchgeführt.

Die Ergebnisse beider Ansätze, mit und ohne Erythropoietin- Stimulation, wurden mit Hilfe des Programms Excel, Microsoft, ausgewertet.

4.2 Patientenkollektiv

Das untersuchte Patientenkollektiv ist eine Subgruppe der Revival-3 Studie. Das Ziel der Untersuchungen war herauszufinden, ob sich durch die Erythropoietingabe eine Veränderung der Entzündungs- und Apoptoseentwicklung der zirkulierenden Leukozyten finden lässt.

Zu diesem Zweck wurden in Korrelation mit den Erythropoietin-Gaben direkt vor der ersten EPO-Gabe, nach 48h zur zytometrischen Analyse, nach 60h (nach der 2. EPO- Gabe) und nach circa 6 Monaten Blutentnahmen durchgeführt.

Aus diesen Blutproben wurden zum Einen mit FACS- Zytometrie die apoptotischen Leukozyten gemessen und zum Anderen mit Hilfe des RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen, die RNA zirkulierender Leukozyten extrahiert und bei -70 Grad Celsius tiefgefroren. In einem weiteren Arbeitsschritt wurde die RNA- Konzentration gemessen und cDNA gebildet, die im Anschluss mittels semiquantitativen Polymerasekettenreaktion (PCR) auf bestimmte Primer untersucht wurde.

Das Kollektiv teilt sich in zwei Gruppen: Patienten, die Erythropoietin bekamen (n=43) und die Patienten der Kontrollgruppe, die ein Placebo erhielten (n=33).

Tabelle 1: Studienpopulationen

	EPO-Gruppe (n=43)	Kontrollgruppe (n=33)
Alter in Jahren	57,9 ± 12,9	60,7 ± 13,3
Geschlechterverteilung	w=8 (18%), m=35 (82%)	w=7 (21%), m=26 (79%)
Arterielle Hypertonie	63%	58%
Nikotinabusus	42%	54%
Diabetes mellitus	16%	12%
Familiäre Disposition	47%	15%

4.3 Abnahmeprotokoll

Allen randomisierten Patienten wurden gemäß des Studienprotokolls entweder ein Placebo oder Erythropoietin verabreicht und Blutproben entnommen.

1. Abnahme: Direkt nach erfolgreicher PTCA, noch vor der ersten EPO/Placebo- Gabe (T0)
2. Abnahme: 48h nach Randomisierung (vor der 3. EPO- Gabe, nur für die zytometrische Analyse)
3. Abnahme: 60 Stunden nach Randomisierung (12h nach der 3. EPO-Gabe, T3)
4. Abnahme: Circa 6 Monate nach der Randomisierung im Rahmen der Kontrollangiographie (nur RNA- Gewinnung, M6)

4.4 Durchflusszytometrie

Um die aus dem zirkulierenden Blutvolumen entnommenen Zellen zu unterscheiden, kann man sie mit Hilfe eines Durchflusszytometers untersuchen. Hierbei werden die Zellen nach verschiedenen Parametern aufgetrennt, so zum Beispiel nach Größe und Granularität. Möchte man darüber hinaus noch einzelne Zellpopulationen abgrenzen, die sich durch die Nachweisbarkeit bestimmter Oberflächenmarker unterscheiden, kann man zusätzlich mit Hilfe monoklonaler Antikörper diese Oberflächenmoleküle anfärben.

Wie auch im Rahmen anderer photometrischer Verfahren bedient man sich der Messung von Licht, welches durch die Probe gestrahlt wird: So wird abhängig von Größe und Granularität der Zelle der eingebrachte Laserstrahl gestreut. Die zur Anfärbung verwendeten fluoreszierenden Antikörper werden hingegen durch den Laserstrahl angeregt und emittieren eine Strahlung bestimmter Wellenlänge.

Die einzelnen Zellen können so aufgrund ihrer photometrischen Eigenschaften bestimmten Zellpopulationen zugeordnet und ausgewertet werden.

4.4.1 Funktionsprinzip eines Durchflusszytometers

Mit Hilfe eines Laserdurchflusszytometers kann man Zellen anhand der Unterschiede ihrer Oberflächenstruktur, durch die unterschiedliche Streuung des einfallenden Lasers, unterscheiden. Zudem kann man sich zusätzlich der Anfärbung mit monoklonalen Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenmarker, bedienen. Hierbei werden die fluoreszierenden Antikörper durch den Laserstrahl angeregt, ihrerseits Photonen einer bestimmten, für jedes Fluorochrom spezifischen

Wellenlänge abzugeben.

Einer einzelnen Probe können mehrere monoklonale Antikörper zugegeben werden, so dass einzelne Subpopulationen, die sich durch die simultane Expression verschiedener Oberflächenmarker charakterisieren lassen, ausfindig gemacht werden können. Des Weiteren lässt sich ein Rückschluss darauf ziehen, in welchem Ausmaß der untersuchte Oberflächenmarker exprimiert wird, da die emittierte Fluoreszenz als proportional zur Anzahl der gebundenen Antikörper angesehen werden kann.

Die graphische Darstellung der Messergebnisse erfolgt mit Hilfe eines zweiachsigen Koordinatensystems im Softwareprogramm (CellQuest Research software, Becton Dickinson, San Jose, USA). Die einzelnen Zellen erscheinen hier als Messpunkte, deren Lage im Koordinatensystem durch ihre lichtbrechenden Eigenschaften und die von den gebundenen Antikörpern emittierten Fluoreszenzen bestimmt wird. So lassen sich über die Abbildung der einzelnen Punkte unterschiedliche Populationen erkennen und quantitativ beurteilen.

4.4.2 Probenaufbereitung

Für die spätere Antikörperfärbung wurden zwei Röhrchen mit jeweils 8,5 ml CPDA (Citrat, Phosphat, Dextrose, Adenin)- Blut eingesetzt. Hierzu war zunächst die Isolation der Leukozyten aus dem CPDA- Blut notwendig. Dazu wurde unter der Sterilbank eine, der Menge an eingesetztem Blut (ca. 16ml), entsprechende Menge an Ficoll-Paque PLUS Lösung, Fa. GE Healthcare Freiburg, mit Hilfe einer sterilen Pipette in ein 50ml Falcon Tube gefüllt.

Anschließend wurde das Blut aus den beiden Entnahmeröhrchen mit der sterilen Pipette aufgenommen und vorsichtig über die Ficoll-Paque Lösung geschichtet.

Daraufhin wurde das gefüllte Tube bei 19° Celsius und 1900 rpm für 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Dadurch kam es zur Auftrennung der einzelnen Bestandteile des Blutes. Die vom restlichen Blut getrennten Leukozyten konnten nach ca. 50 Minuten mit einer sterilen Pipette aufgenommen werden.

Der Rest wurde verworfen und der aufgenommene Überstand in einem weiteren 50 ml Falcon Tube mit ca. gleicher Menge an PBS (Phosphat buffered salt solution)- Pufferlösung, invitrogen GmbH Karlsruhe, vermischt.

Dieses Falcon Tube wurde ebenfalls bei 19° Celsius und 1900 rpm diesmal für 5 Minuten mit Einsatz der Bremse zentrifugiert.

Danach wurde der Überstand über dem am Falconboden befindlichem Zellpellet abgenommen und verworfen. Das verbliebene Zellpellet wurde mit ca. 15 ml PBS- Pufferlösung gemischt, anschließend nochmals bei 19° Celsius und 1900 rpm für 5 Minuten mit Bremse zentrifugiert.

Nach Abnahme des Überstandes wurde als letzter Schritt das Zellpellet mit 1 ml PBS-Pufferlösung vermischt und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß übertragen.

Mit Hilfe eines Sysmex KX-21N Hämatologiegerätes der Fa. Sysmex Digitana AG, Schweiz, wurde die Zellzahl in der isolierten Leukozytensuspension zweimal bestimmt und anschließend aus den beiden Messungen der Mittelwert gebildet.

Im Anschluss an die Bestimmung der Leukozytenzahl wurden 8×10^5 Zellen in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert.

Zu den Leukozyten wurden 500 μ l Inkubationspuffer gegeben und bei Raumtemperatur und 4000 rpm zwei Minuten lang zentrifugiert.

Danach wurde der Überstand abgesaugt und auf das Zellpellet 400 μ l Inkubationspuffer gegeben.

Anschließend wurden je 100 μ l in 4 bereitstehende BD Trucount-Tubes pipettiert.

Mit den vier BD Trucount-Tubes wurde wie folgt verfahren:

Tube 1: keine weiteren Reagenzien wurden zugegeben

Tube 2: 2 μ l Annexin-V-Fluorescein zugeben

Tube 3: 2 μ l Propidium Iodid zugeben

Tube 4: 2 μ l Annexin-V-Fluorescein und 2 μ l Propidium Iodid zugeben.

Die Tubes wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Abschließend wurden noch je 250 μ l Washing-buffer in jedes Tube zugegeben.

Alle hier verwendeten Reagenzien entstammen dem Annexin-V-FLUOS Staining Kit der Firma Roche Diagnostics GmbH, Penzberg.

Die BD Trucount Tubes der Firma Becton Dickison and Company, BD Biosciences aus San Jose, USA, werden für die Bestimmung von absoluten Leukozytenzahlen im Blut verwendet. In den Tubes ist eine bekannte Anzahl von fluoreszierenden Beads vorgelegt. Hierzu werden die Leukozyten, sowie der gewünschte fluoreszierende Antikörper hinzugegeben und mit Hilfe des Cytometers bestimmt.

Die Bestimmung der absolut gemessenen Zahl an Leukozyten kann anhand der Gesamt-Beads rückgerechnet werden:

$$n_{\text{Leukozyten}} = (n_{\text{positive cellular events}} : n_{\text{bead events}}) \times \text{Trucount Bead concentration}$$

Ausgewertet wurde der Prozentsatz an apoptotischen Zellen der eingesetzten Gesamtleukozytenzahl.

4.4.3 Probenauswertung

Die Auswertung der Proben erfolgte mittels FACS caliber flow cytometers der Firma Becton, Dickinson and Company. Angeregt wurden die beiden eingesetzten monoklonalen Antikörper mit der gleichen Wellenlänge von 488nm, emittierten jedoch unterschiedlich: Das Annexin-Fluorescein bei 518nm und das Propidium Iodid bei 617nm.

In frühen Phasen der Apoptose werden als eine der ersten Veränderungen der Zelle Phosphatidylserine von der inneren Seite der Zellmembran an die Oberfläche transloziert. An diese Phosphatidylserinen kann Annexin calciumabhängig binden und eignet sich somit zur Identifizierung von apoptotischen Zellen. Allerdings werden die Phosphatidylserine nicht nur von apoptotischen Zellen an der Zelloberfläche exprimiert, sondern auch von bereits nekrotischen Zellen, deren Membranstabilität verloren gegangen ist. Um also die nekrotischen von den apoptotischen Zellen unterscheiden zu können, färbt man zusätzlich mit Propidium Iodid, welches DNA, die nur bei durchlässiger Zellmembran für den Farbstoff erreichbar ist, anfärbt.

Die BD Trucount Tubes der Firma Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences aus San Jose, USA, werden für die Bestimmung von absoluten Leukozytenzahlen im Blut verwendet.

In den Tubes ist eine bekannte Anzahl von fluoreszierenden Beads vorgelegt. Hierzu werden die Leukozyten, sowie der gewünschte fluoreszierende Antikörper hinzugegeben.

Die Auswertung konzentrierte sich so auf die Zellpopulation, die von Annexin, aber nicht von Propidium Iodid gefärbt wurde. Mit Hilfe der Trucount Tubes ließ sich so der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen bestimmt.

4.5 RNA- Isolation und cDNA- Synthese

Zur Gewinnung der t-RNA (Gesamt-RNA) aus 5 ml Ethylendiamintetraacetat (EDTA) –Blut wurde das RNeasy Protokoll der Firma Qiagen (RNeasy Mini Kit) verwendet. Die extrahierte RNA stellte das Ausgangsmaterial für die cDNA- Gewinnung dar.

Um aufgrund der Empfindlichkeit der Ribonukleinsäure jede Verunreinigung zu vermeiden, wurden während aller Arbeitsschritte Einweghandschuhe, RNase-freie Pipettenspitzen und RNase- freies Wasser verwendet.

4.5.1 Vollblut- RNA- Isolation

Das RNeasy Mini Kit der Firma QIAGEN beinhaltet eine RNA- Isolationsmethode, bei der das Erbgut von einer Größe bis zu 200 Basen an Silica-Gel-Membranen (QIAmp spin column) gebunden wird. Die Wahl fiel auf eine Vollblutmethode, da eine Zellaktivierung der Leukozyten vermieden werden sollte.

Direkt nach der Blutentnahme wurden die kernlosen Erythrozyten, die für eine RNA- Gewinnung nutzlos sind, lysiert. Hierzu wurde pro 1 ml entnommenes Blut, 5 ml hypotoner EL- Buffer (Erythrocyte lysis- Buffer) in ein Falcon- Tube zugemischt und 10-15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Falcon- Tube 10 Minuten lang, auf 4 Grad Celsius gekühlt, mit 1500 rpm zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand nach Ende der Zentrifugation abgenommen und das am Tubeboden befindliche Zellpellet mit 2 ml EL- Buffer erneut zentrifugiert.

Um das Zellpellet erneut zu lösen, wurden 1200µl RLT-Buffer (Lysis- Buffer), dem zuvor Beta-Mercaptoethanol zugesetzt wurde, zugegeben, das Ganze gut gemischt, und zur vollständigen Auflösung der Zellstrukturen auf ein QIAshredder Spin Column überführt. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 3000 rpm wurde die Säule verworfen und das Lysat mit 600µl 70%igem Ethanol gemischt.

Das Gemisch wurde auf ein QIA Spin Column pipettiert. Diese bestehen aus Silica-Gel-Membranen, die zur Bindung der RNA dienen. Die Bindung der RNA wird zudem durch das Ethanol unterstützt.

Um die Kontamination der Proben zu verhindern wurde die Säule mit verschiedenen Reagenzien gewaschen. Zunächst mit 700µl RW1- Buffer, danach zweimal mit 500µl RPE- Buffer.

Zuletzt wurde die QIAmp Säule mit 30µl RNase-freiem Wasser benetzt und bei 13 000 rpm eine Minute lang zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule verworfen und die RNA- Probe bei -70 Grad Celsius eingefroren.

4.5.2 Bestimmung der RNA- Konzentration

Die Bestimmung des RNA- Gehalts wurde photometrisch, mit Hilfe des Gene Quant pro Classic Photometers des Firma amersham Biosciences, durchgeführt. Zur Konzentrationsbestimmung bedient man sich der Messung der Absorption bzw. Extinktion von monochromatischem Licht beim Durchgang durch die probenhaltige Küvette. Anschließend wird die Konzentration nach dem Lambert- Beer- Gesetz berechnet.

Die extrahierte RNA wurde im Verhältnis 1: 20 mit depc (Diethylpyrocarbonat)- Wasser, zur Ausschaltung von RNAsen, verdünnt und bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt.

Nach folgender Formel wurde die Konzentration (in ng/μl) berechnet:

Gemessener Wert (bei einer Wellenlänge von 260nm) x 100 x 40 = c (ng/μl).

4.5.3 *cDNA- Synthese*

Für die angestrebte Polymerasekettenreaktion war es nötig aus der RNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) komplementäre, einzelsträngige DNA (cDNA) zu bilden. Die Reverse Transkriptase ist eigentlich ein retrovirales Schlüsselenzym, das zur Transkription des viralen Genoms in DNA dient.

Bei diesem Versuch wurde das Omniscript RT Kit der Firma QIAGEN verwendet.

Für jeden Ansatz wurden 300ng RNA je Probe eingesetzt. Mit Hilfe der zuvor bestimmten Konzentration wurden die einzusetzenden μl wie folgt bestimmt:

300ng : gemessene Konzentration (ng/μl) = x μl

Für jede Probe wurden 6,25μl Ansatz bestehend aus:

- 2μl 10xBuffer RT
- 2μl dNTPs (5mM)
- 1 μl random primer
- 1μl RT O (Qiagen)
- und 0,25 μl RNase Out vorgelegt.

Dazu wurde 13,75μl RNase freies Wasser, abzüglich der einzusetzenden x μl RNA, in ein Eppendorf- Gefäß zugegeben, so dass das Probenvolumen insgesamt bei 20μl lag.

6,25μl Ansatz + (13,75μl RNase freies Wasser – x μl RNA) = 20 μl

Anschließend wurden die Eppendorf- Gefäße bei 37 Grad Celsius 60 Minuten im Wärmeblock inkubiert und zur Aufbewahrung bei – 20 Grad Celsius eingefroren.

4.6 Semiquantitative Polymerasekettenreaktion (PCR)

In der Polymerasekettenreaktion wurden je Probe 2µl cDNA verwendet. Für jeden der untersuchten Primer wurde ein Mix zusammengestellt.

Dieser Mix bestand aus:

- 10µl TaqMan qPCR Master Mix (Eurogentec)
 - 7µl H₂O
 - 1µl Assay on demand (entsprechende Primer- Sequenzen siehe Tabelle)
- = 18 µl

In jedes Well der PCR- Platte (96-well Optical Reaction plate, Fa. G. Kisker) wurden 18µl Mix vorgelegt und dazu 2µl cDNA pipettiert.

18µl Mix + 2µl cDNA = 20 µl Ansatz

Tabelle 2: Primer

Primer	Produkt ID, Applied Biosciences
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	Hs99999905_m1
Prominin 1 (PROM1)	Hs00195682_m1
Endoglin (ENG)	Hs00164438_m1
Chemokine ligand 12 (CXCL12)	Hs00171022-m1
Interleukin 6 (IL-6)	Hs00174131_m1
B-cell lymphoma 2 (BCL-2)	Hs00187845_m1

Anschließend wurde die Platte mit einem Optical Adhesive Cover (Fa. G. Kisker) abgedeckt und bis zur Messung auf Eis im Dunklen gelagert.

Für die Messung wurde ein ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Fa. Perkin Elmer) verwendet. Als Referenzwert wurde der Primer des Housekeeping- Gen GAP-DH, die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, die einen Schritt der Glykolyse katalysiert, verwendet.

Die Proben mit einem Volumen von 20µl durchliefen im Thermocycler 40 Zyklen unter folgenden Bedingungen (siehe Tabelle 3):

Tabelle 3: PCR- Zyklen

	Temperatur	Zeit	
Stage 1 (AmpErase UNG Aktivierung)	50 Grad Celsius	2 Minuten	
Stage 2 (AmpliTaq Aktivierung)	95 Grad Celsius	10 Minuten	
Stage 3 (PCR)	95 Grad Celsius	15 Sekunden	Denaturierung
	60 Grad Celsius	1 Minute	Annealing & Extension

Anschließend wurden die Werte in ein Windows Excel-File gespeichert und ausgewertet.

Die Ergebnisse der RT- PCR wurden als Endpunktmessung nach Durchlaufen der 40 Zyklen gemessen. Hierzu werden die Fluoreszenzwerte vor Beginn und am Ende der Zyklen gemessen.

Der Wert zu Beginn dient als Leerwert, da die fluoreszierenden Primer schon vor der Amplifikation eine gewisse Grundfluoreszenz aussenden.

Zu Beginn der Zyklen ändert sich der gemessene Fluoreszenzwert zunächst nur mäßig, da es zwar schon zur Produktsynthese kommt, die entstehende Kopienmenge jedoch noch zu gering ist, einen messbaren Anstieg zu erzeugen.

In der Messung muss festgesetzt werden, ab welcher gemessenen Fluoreszenz von der Hintergrundfluoreszenz unterschieden wird. Dieser Punkt wird als Schwellenwert (Threshold) bezeichnet. Er wird definiert als die Standardabweichung des Leerwertes (Grundfluoreszenz), gemessen zwischen Zyklus 3 und 15, und anschließend mit dem Faktor 10 multipliziert.

Der Schnittpunkt der Fluoreszenz und dem Schwellenwert, projiziert auf die Abszisse, die Anzahl der Zyklen, ergibt den Cycle of Threshold (Ct). Dies stellt den niedrigsten messbaren positiven Wert dar.

Somit gibt der Ct- Wert an, ab welcher Anzahl an Zyklen der Schwellenwert überschritten wird. Ein niedriger Ct- Wert deutet folglich auf eine große Menge eingesetzter DNA hin.

Zur weiteren Auswertung wurde die relative Quantifizierung genutzt.

Hier wird das Verhältnis zweier Proben zueinander berechnet. Man verwendet zum Einen eine unbekannte Menge an Sequenz, die es zu untersuchen gilt, und stellt ihr eine zweite Sequenz zur

Seite. Somit kann die Menge der ersten Sequenz (gesuchter Primer) semiquantitativ, also bezogen auf die zweite Sequenz (GAP-DH) abgeschätzt werden.

Zur Berechnung benötigt man neben der Zielsequenz noch eine endogene Kontrolle, ein sog. Referenzgen. Als Referenzgen verwendet man ein sog. Housekeeping- Gen, das in einer konstanten Menge in den verwendeten Zellen vorkommt, in unserem Falle GAPDH (Glycerinaldehyd-3- Phosphatdehydrogenase).

In unserem Falle wurde die RNA von bestimmten Zytokinen in zirkulierenden Leukozyten in der EPO- und der Placebogruppe, jeweils im Vergleich zum Ausgangswert (T0= Abnahme vor Studienmedikation) mit entweder der RNA- Expression 3 Tage (T3) nach PCI oder 6 Monate (M6) nach PCI bezogen.

Zur Berechnung der Anzahl der RNA- Kopien mit Hilfe der $\Delta\Delta Ct$ - Methode wird die gleiche Effizienz der Housekeeping -Gen-PCR und der Zielsequenz-PCR benötigt.

Die Formel lautet:

$$x = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{T0} - \Delta Ct_{T3/M6}$$

$$Ct_{T0/T3/M6} = Ct_x - Ct_r$$

Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger t-Test durchgeführt. P- Werte von $< 0,05$ wurden als signifikant gewertet. Zur Datenauswertung wurde das Programm Microsoft Excel 2011 verwendet.

4.7 Korrelation klinischer Daten

Die Ergebnisse der FACS- Zytometrie und der Polymerase- Kettenreaktion der Studienpatienten wurden mit den im Rahmen des stationären Aufenthaltes gewonnen klinischen Parametern ergänzt.

1. Kardiale Parameter (CK, CK-MB im Verlauf)
2. Systemische Entzündungsparameter (CRP-Wert, Leukozyten- und Retikulozytenzahl im Verlauf)
3. Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen

Ziel war es die experimentellen Ergebnisse mit den klinischen Parametern in Korrelation bringen zu können.

5 Ergebnisse

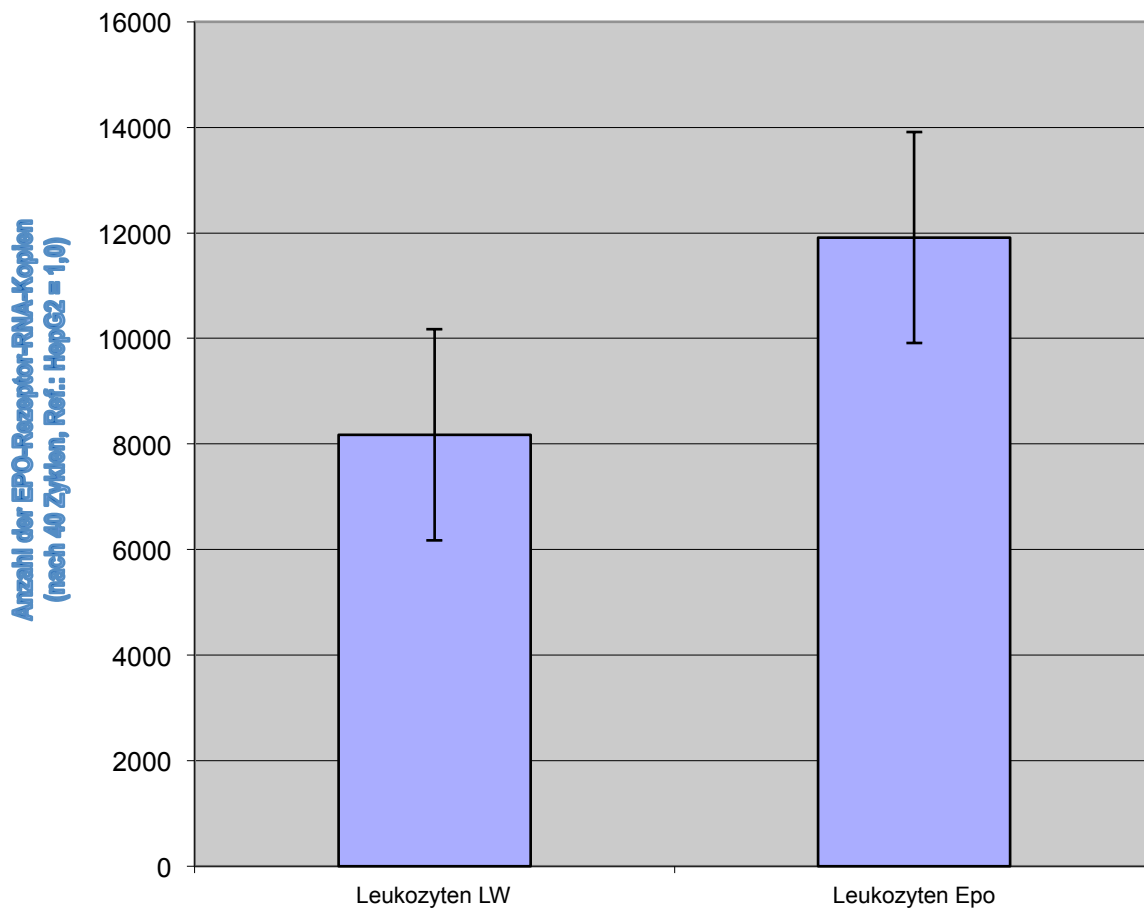
5.1 EPO- Rezeptor- Nachweis auf Leukozyten

Mit Hilfe dieses Versuchs konnte die Expression von spezifischer EPO-Rezeptoren-RNA in zirkulierenden Leukozyten von gesunden Kontrollpersonen (n=4) nachgewiesen werden.

Hierzu wurden zunächst die Leukozyten von den restlichen Blutbestandteilen getrennt und ein Teil anschließend für 8 Stunden mit 100 IU Erythropoietin inkubiert.

Besonders interessant ist zudem die beobachtete Steigerung der RNA- Produktion in der vitalen Zelle bei Inkubation mit Erythropoietin.

Graphik 1: EPO- Rezeptor- RNA- Produktion in Leukozyten



5.2 Studienpopulation

Das untersuchte Kollektiv besteht aus zwei Gruppen: Den Patienten, die mit Erythropoietin behandelt wurden (n=43) und den Patienten der Kontrollgruppe, die ein Placebo erhielten (n=33). In beiden untersuchten Gruppen überwiegt der Anteil männlicher Patienten. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Bezüglich der erfassten Risikofaktoren (Hypertonie, Hypercholesterinämie, bestehender oder vorangegangener Nikotinabusus, familiäre Disposition und dem Vorliegen eines Diabetes mellitus) unterschieden sich die Gruppen nicht signifikant.

Auch das anzunehmende Ausmaß des myokardialen Schadens, abschätzbar anhand der Enzyme Creatininkinase (CK) und der Kardiomyozyten spezifischen Creatininkinase (CK-MB), zeigte sich die beiden Gruppen betreffend kein signifikanter Unterschied.

Tabelle 4: Herzenzyme

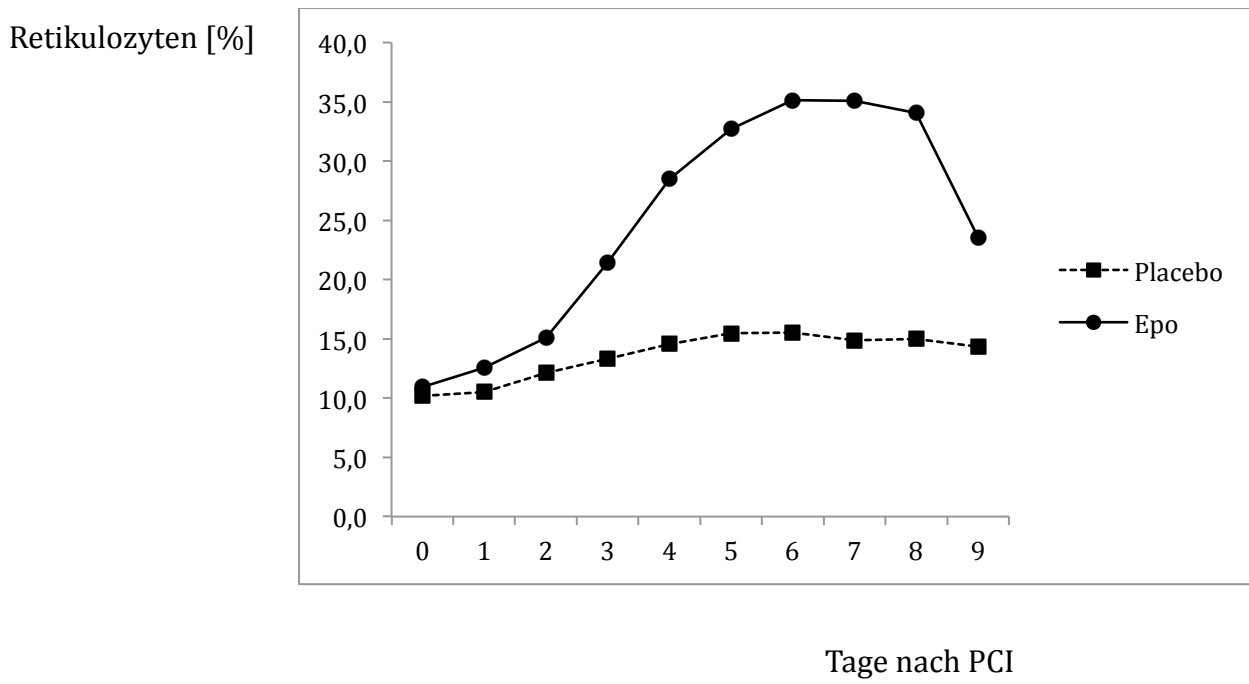
	Kontrollgruppe (n=33)	EPO (n=43)
CK max (U/l)	2111,1	2507,5
CK-MB max (U/l)	247,6	336,4
Ratio CK-MB max/CKmax	0,117	0,134

Des Weiteren wurden im Rahmen der stationären Verlaufskontrollen auch die systemischen Entzündungsparameter, die Leukozytenanzahl, das C-reaktive Protein und die Retikulozytenzahl bestimmt. Diese Werte werden im Folgenden besprochen.

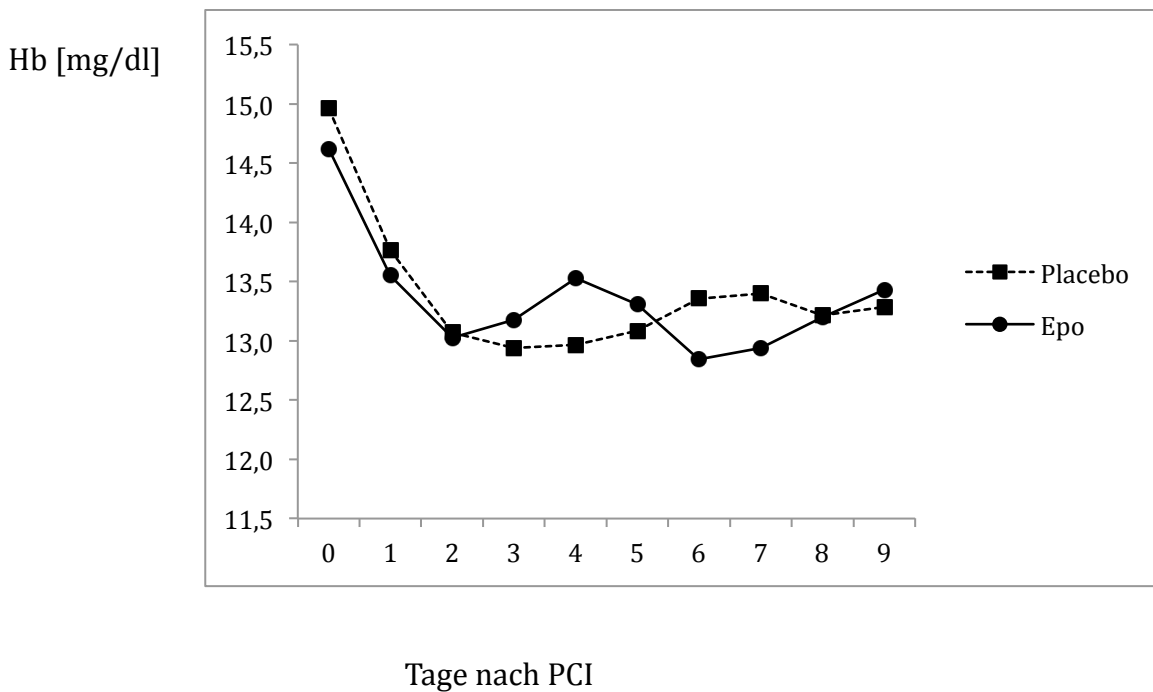
5.3 Laborchemische Entzündungsparameter

Im Vergleich der klinischen Parameter der systemischen Entzündungsreaktion zeigt sich ein signifikanter Anstieg der zirkulierenden Retikulozyten unter Erythropoietintherapie (p= 0,017). Dieser war jedoch nicht mit einem Anstieg des Hämoglobinwertes assoziiert (Hb: p=0,438). Bei den übrigen erfassten Verlaufsparemtern konnte keine Signifikanz gezeigt werden (Leukozyten: p= 0,998; CRP: p= 0,437).

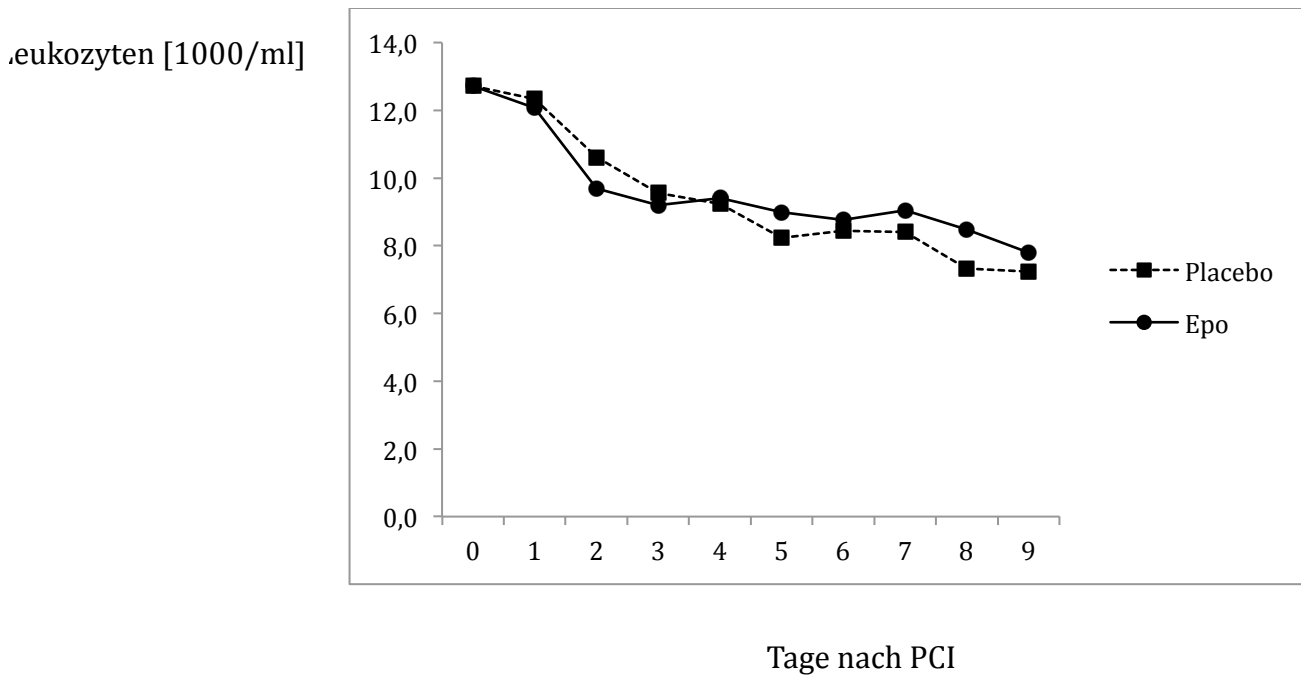
Graphik 2: Retikulozytenverlauf (MW)



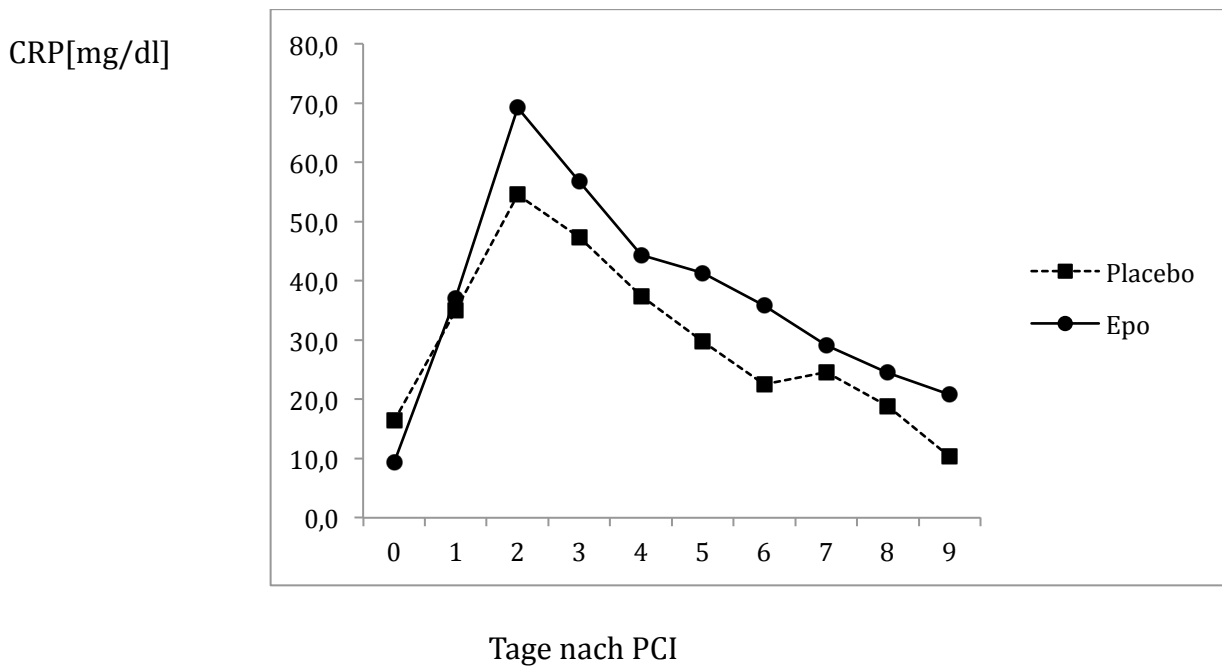
Graphik 3: Hämoglobinverlauf (MW)



Graphik 4: Leukozytenverlauf (MW)



Graphik 5: CRP- Verlauf (MW)



5.4 RNA- Analyse in zirkulierenden Leukozyten

Neben der Analyse der klinischen Laborparameter unter EPO- Therapie wurde zudem die RNA- Expression verschiedener Primer in zirkulierenden Leukozyten bestimmt.

Tabelle 5: RNA- Analyse zirkulierender Leukozyten

Primer	Differenz T3-T0		Differenz M6-T0	
	Epo	Placebo	Epo	Placebo
Bcl2	10+27	18+50	2+6,9	4+6,9
PROM1	1,3+4,2	3+12	2+5,7	2,3+5,7
ENG	1,2+4,1	8,6+24	1+1,8	1,2+4,1
CXCL12	0,7+1,6	3,3+7,9	3,2+7,9	0,7+1,6
IL6	nnw	nnw	2,3+9,9	8,5+18,9

Hierbei bezeichnet T0 die erste Blutabnahme am Tag des Studieneinschlusses (Tag 0), T3 die Abnahme an Tag 3 und M6 die Kontrollblutentnahme nach 6 Monaten.

Der antiapoptotische Marker BCL-2 zeigte im Vergleich des Verlaufes der beiden Subgruppen EPO und Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied.

Im Langezeitverlauf scheint sich jedoch eine abnehmender Verlauf zu zeigen.

Problematisch ist hier jedoch, dass die Standardabweichung der Werte ein Vielfaches des Wertes beträgt und somit wenig aussagekräftig ist.

Ein wesentlicher Gesichtspunkt der REVIVAL-3-Studie war neben der Apoptoseverhinderung, vor allem auch die Frage nach einer gesteigerten Progenitorzellenmobilisation im Infarktgeschehen unter EPO- Therapie.

Die hierzu untersuchten RNA- Primer, Prominin 1 und Endoglin, wiesen im Vergleich der beiden Subpopulationen keine signifikanten Unterschiede auf.

Um den Einfluss der postmyokardialen Entzündungsreaktion auf zirkulierende Leukozyten beurteilen zu können und in wie weit ihr Anteil am Entzündungsgeschehen von einer Erythropoietin- Hochdosistherapie verändert werden kann, wurde die mRNA- Expression der beiden Marker Stroma-derived-factor 1 (CXCL12) und Interleukin- 6 (IL-6) untersucht.

Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Verlauf und im Vergleich der beiden Subgruppen.

Hierzu passend war in der Untersuchung der klinischen Laborparameter hinsichtlich der Entzündungsparameter, Leukozyten und C- reaktives Protein, kein Unterschied nachweisbar.

Insgesamt muss hinsichtlich der negativen Ergebnisse der RNA- Auswertung sicher auf die beeinflussenden Faktoren eingegangen werden.

Die einzelnen Gruppen weisen hinsichtlich des Alters, der Risikofaktoren und Geschlecht eine deutliche Heterogenität aus.

Des Weiteren wurde um die unmittelbaren Effekte einer Hochdosis- EPO- Therapie untersuchen zu können, die Isolation aus Vollblut verwendet um auch Ex-vivo- Artefakte möglichst gering zu halten.

Für die RNA- Analyse wurden die gesamten zirkulierenden Leukozyten verwendet und auf eine weitere Trennung in Subpopulationen verzichtet.

Auf eine Trennung mit Hilfe von Oberflächenmolekül- Antikörpern wurde aufgrund der damit verbundenen Zellaktivierung und konsekutiven Einflussnahme auf die exprimierten Primer verzichtet.

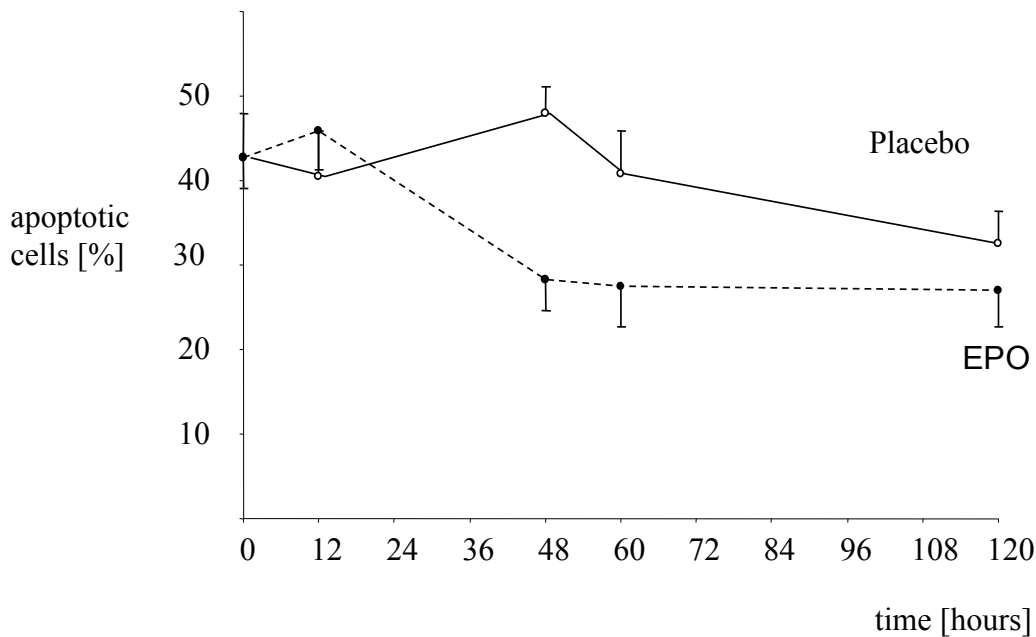
Allerdings können somit Effekte, die z.B. nur in einer der Subpopulationen auftreten, in der Masse untergehen und nicht detektiert werden.

5.5 Zytometrische Apoptosemessung

Neben der Messung molekularer Apoptosemarker wurde auch unmittelbar auf der Oberfläche der zirkulierenden Leukozyten nach Apoptoseinduktion anzeigenden Markern gesucht. Dies geschah mittels Anfärbung bestimmter Oberflächenmoleküle, deren zytometrischer Detektion und Auswertung.

Hier zeigte sich in der Auswertung eine signifikante Reduktion des Prozentsatzes der apoptotischen Zellen nach 48 Stunden und nach 60 Stunden ($p_{\text{EPOvsPlacebo}} < 0,05$).

Graphik 6: Zytometrische Messung der apoptotischen Zellen



6 Diskussion

In der Revival-3-Studie wurde anhand klinischer Endpunkte, die Auswirkung der hochdosierten Erythropoietintherapie nach einem myokardialen Infarkt untersucht.

Der Fokus dieser Arbeit richtete sich auf die Charakterisierung zirkulierender Leukozyten und der Entzündungsreaktion.

Der Nachweis des Erythropoietin- Rezeptors ist bereits neben dem blutbildenden System, so in Megakaryozyten, Myeloidzellen und endothelialen Progenitorzellen, auch in einer Vielzahl anderer Organe erfolgt. So konnte der EPO- Rezeptor im zentralen Nervensystem, hier in den Neuronen, sowie im kardiovaskulären System, hier in den Endothelzellen, den glatten Muskelzellen und den Kardiomyozyten nachgewiesen werden.

Des Weiteren war der EPO- Rezeptor noch auf den Inselzellen des Pankreas, den Zellen der Nebenschilddrüsen, sowie der Cervix, dem Endometrium und des Ovars nachweisbar.¹⁰ Die Nachweisbarkeit des Erythropoietinrezeptors in vielen Zellen und Organverbänden außerhalb der Erythropoese legt eine entscheidende physiologische Rolle des Hormons, unter anderem für das Herzkreislaufsystem nahe.

Zunächst war das Ziel, mit Hilfe von gesunden Kontrollpersonen den Nachweis der Expression des Erythropoietin- Rezeptors in zirkulierenden Leukozyten zu erbringen. Im Rahmen dieses Versuchs wurde neben dem Nachweis eine gesteigerte Expression der mRNA bei Inkubation mit

Erythropoietin festgestellt. Somit lässt sich der Wirkungsbereich von EPO neben den Progenitorzellen und verschiedenen Organverbänden auch auf zirkulierende kernhaltige Zellen erweitern und bildet die Grundlage für die Hypothese, dass durch EPO- Gabe inflammatorische oder apoptotische Genexpression in zirkulierenden Leukozyten beeinflusst wird.

Bei den beiden Patientengruppen sollte untersucht werden in wie fern auch die zirkulierenden Leukozyten an der Entzündungsreaktion, die sich nach einem Herzinfarkt sowohl systemisch als auch im Myokard abspielt, beteiligt sind. Hier wurden neben den klinischen Parametern der Entzündung, vor allem der Leukozytenverlauf im zirkulierenden Blut und der Plasmaspiegel des C- reaktiven Proteins, auch die Expression der RNA zweier an der Entzündungsreaktion beteiligter Proteine, des Stroma-derived-factor 1 (CXCL-12) und Interleukin-6 (IL-6), gemessen. Hier konnte anhand der Messergebnisse in der Placebo- und EPO- Gruppe kein signifikanter Unterschied gezeigt werden.

Allein die messbare Anzahl der Retikulozyten im peripheren Blut, jedoch ohne Auswirkung auf den Hämoglobinwert, war bei den Erythropoietin- Patienten an Tag 7 deutlich höher und ist somit ein Hinweis auf die Wirkung von EPO.

Von der EPO- Gabe war eine verstärkte Mobilisation der Progenitorzellen und eine Hemmung der inflammatorischen Reaktion erhofft gewesen. In den normalen Laborkontrollen konnte hinsichtlich der standardisierten Entzündungsmarker und der Leukozytenzahlbestimmung kein Unterschied dargestellt werden.

Ein weiterer Gesichtspunkt war die im Infarktgeschehen beobachtete Mobilisation von hämatogenen Stammzellen. Hier konnten anhand der RNA-Expression von Endoglin und Prominin1, als Marker für zirkulierende Progenitorzellen im Vergleich der beiden Studiengruppen keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden.

Um die antiapoptotische Wirkung von Erythropoietin auf die zirkulierenden Leukozyten beurteilen zu können, wurde zytometrisch die Nachweisbarkeit von Apoptosemarkern untersucht und darüber hinaus auf molekularem Wege mit dem Verlauf des antiapoptotischen Markers B-cell lymphoma 2 (BCL-2) untersucht.

Hier zeigte sich im Verlauf der zytometrischen Messungen eine signifikante Abnahme der zirkulierenden apoptotischen Zellen innerhalb der EPO- Gruppe von der ersten, direkt nach Revaskularisation entnommenen, zur zweiten, 60 Stunden nach Revaskularisation entnommenen, Abnahme, also im Zeitraum der Erythropoietin-Therapie.

6.1 Erythropoietin- Rezeptor-Nachweis auf zirkulierenden Leukozyten

Wie oben erwähnt, konnten die vielfältigen Wirkungen von Erythropoietin auf verschiedene Zellreihen, neben den erythroiden Zellen auch neuronale und myokardiale Zellen, bereits gezeigt werden. Neben den protektiven Effekten der EPO- Wirkung auf das Myokard im akuten Infarktgeschehen, wollten wir zum Einen die Mobilisation von Progenitorzellen, des Weiteren auch die direkte Wirkung von EPO auf zirkulierende Zellen im peripheren Blut untersuchen.

So wurde die Isolation von im peripheren Blut zirkulierenden Leukozyten angestrebt, um hier zum Einen den Nachweis einer Expression von Erythropoietin- Rezeptoren durchzuführen und weitergehend eine mögliche Einflussnahme auf die intrazellulären Vorgänge, so v.a. Induktion und Promotion der Entzündungsreaktion, zu untersuchen.

In unserer Untersuchung an gesunden Testpersonen war mit Hilfe der Polymerase- Kettenreaktion ein Nachweis der mRNA des Erythropoietin- Rezeptors möglich.

Zudem zeigte sich nach in vitro- Inkubation mit Erythropoietin ein Anstieg der EPO- Rezeptorexpression.

In Hinblick darauf, welcher Anteil der zirkulierenden Leukozyten für die Expression des EPO- Rezeptors und den Expressionsanstieg verantwortlich sein könnte, zeigte sich in einer Studie an Dialysepatienten folgendes:

Bei Patienten, die an einer chronischen Niereninsuffizienz mit Dialysepflichtigkeit leiden, findet sich aufgrund des Erythropoietinmangels häufig eine Anämie.

Eine weitere Beobachtung ist eine supprimierte Immunantwort, so dass z.B. auf Schutzimpfungen wie gegen Hepatitis B eine deutlich geringere Ansprechrate besteht.

Unter EPO- Therapie konnte von Lisowska et al. eine verbesserte T- und B- Lymphozytenfunktion mit Hilfe der Antikörpermarkierung beobachtet werden.³⁴

Eine weitere Differenzierung, welche Anteile der weißen Blutreihe besonders auf die Stimulation mit Erythropoietin ansprechen, wurde in unserem Versuch nicht weiter verfolgt.

6.2 Postmyokardiale Entzündungsreaktion und Erythropoietin

Das therapeutische Ziel in der Behandlung des akuten Myokardinfarkts liegt in der möglichst kompletten Erhaltung der kardialen Pumpfunktion und in der Abwendung möglicher sich anschließender Komplikationen. Zu diesen Komplikationen gehören neben den akut bedrohlichen Zuständen, wie etwa Myokardruptur, gefährlichen Herzrhythmusstörungen und dem plötzlichen Herztod, auch die im Langzeitverlauf auftretenden Beeinträchtigungen, wie eine konstant eingeschränkte Pumpfunktion mit Entwicklung einer Herzinsuffizienz.

Grundlegend gerade für die Einschränkung der Pumpfunktion des Herzens ist das Ausmaß des myokardialen Schadens nach einem ischämischen Ereignis.

Die möglichst schnelle und vollständige Wiedereröffnung eines verschlossenen Koronargefäßes dient vor allem dazu das Areal der irreversiblen Schädigung zu begrenzen. So liegen im Zentrum der Bemühungen die Begrenzung des kardialen Zelluntergangs und die optimale Förderung der Reparaturmechanismen des Herzens.

Es zeigte sich allerdings, dass die sich an ein ischämisches Ereignis anschließende lokale Entzündungsreaktion bei reperfundiertem Myokard zu beachtlichem Zellschaden führen kann.³²

Neben der lokalen Entzündung entwickelt sich in Myokardinfarktpatienten zudem auch eine systemische Entzündungsreaktion. Diese systemische Entzündung ist vor allem deswegen von besonderem Interesse, da so auch der klinische Verlauf von Infarktpatienten beeinträchtigt wird.

Bei der Entzündungsreaktion am infarzierten Myokard steht die Ausschüttung verschiedener Zytokine im Vordergrund. So wird im Rahmen der Zellnekrose während des Myokardinfarktes durch die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), Hitzeschockproteinen (HSP) und Fibronektin die Entzündungsreaktion am Myokard vermittelt.³⁵

Ein wichtiges Element in der Regulation der Zytokin-Gene ist der nuclear factor-kappa B (NF-kappa B), ein redox-sensitiver Transkriptionsfaktor.

NF-kappaB liegt unter normalen Bedingungen inaktiv an seine inhibitorische Untereinheit gebunden an der Zelle vor und wird durch eine Gewebsverletzung, wie im Rahmen eines Myokardinfarkts aktiviert. Nach Aktivierung triggert NF-kappaB unter anderem die Expression von Zytokinen, wie tumor necrosis factor- alpha (TNF-alpha) und Interleukinen.³⁶

So konnte vor allem Tumor necrosis factor- alpha (TNF- alpha) und Interleukin- 1_{beta} (IL-1_{beta}) eine Schlüsselrolle zugewiesen werden. Beide verfügen über die Fähigkeit, die Produktion sekundärer Zytokine, darunter Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8), zu induzieren. Während IL-8 an der Rekrutierung und lokaler Aktivierung von Neutrophilen beteiligt ist, ist IL-6, im Zusammenspiel mit TNF-alpha und IL-1_{beta} vor allem für die systemische Entzündungsreaktion verantwortlich.²²

Die schon während der ischämischen Phase einsetzende Zytokinausschüttung und entzündliche Infiltration des Gewebes verschlimmert sich nach der Reperfusion und steht in Verdacht, den Caspasen- abhängigen apoptotischen Zelltod und die voranschreitende Entzündungssignalwege zu stimulieren.

Es wird vermutet, dass eher die Reperfusion und nicht die Ischämie zur Aktivierung von NF-kappa B beiträgt. So kann ein Peak in der Plasmakonzentration von IL-6, einem nachgeordneten Zytokin, nach Reperfusion beobachtet werden.³⁷

Im hier untersuchten Kollektiv wurde die Konzentration von IL-6- RNA im zirkulierenden Blut, also die Expression in zirkulierenden Leukozyten, der Verlauf der IL-6- RNA und der Unterschied zwischen der EPO- und der Placebo- Gruppe untersucht.

Beide, TNF-alpha und IL-6, können außerdem die Induktion des Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in dem ischämischen Areal regulieren.³⁸ Vor allem IL-6 zeigte sich als höchst potent in der Induktion von ICAM-1.³⁹

ICAM-1 spielt eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion neutrophiler Granulozyten an Kardiomyozyten. Im Tiermodell war eine Stunde nach Reperfusion nur in dem zuvor ischämischen Areal, nicht in den Anteilen des Myokards, die normal durchblutet worden waren, eine Expression der ICAM-1- mRNA nachweisbar. Im Verlauf, circa 24h später, konnte die ICAM-1- mRNA in allen Myokardproben nachgewiesen werden. Anhand dieser Ergebnisse konnte die Vermutung angestellt werden, dass zirkulierende Zytokine die ICAM-1- mRNA Bildung, eben nicht nur im direkt betroffenen Gewebe, sondern zeitversetzt im gesamten Myokard induzieren.

Die Adhäsion der Neutrophilen ist in so fern besonders relevant, als dass es durch Neutrophile zu einer weiteren Schädigung des ischämischen Myokards kommt. Es wird angenommen, dass die Neutrophilen sich im ischämischen und reperfundierten Areal akkumulieren und durch die Abgabe proteolytischer Enzyme oder reaktiver Sauerstoffe die umgebenden Kardiomyozyten schädigen. Diese schädigenden Substanzen werden allerdings nur von anhaftenden Neutrophilen abgegeben und betonen die Bedeutung der Expression der spezifischen Bindungsproteine im ischämischen und reperfundierten Myokard.³²

Neben einem messbaren Zytokinanstieg nach einem Myokardinfarkt, kann auch eine Leukozytose beobachtet werden.

Das Auftreten der Leukozytose kann durch die erhöhte Produktion und Ausschüttung von Zytokinen wie IL-1, TNF-alpha, IL-6 und IL-8 erklärt werden. Vor allem Monozyten und Makrophagen, die aus dem zirkulierenden Blut in die Gefäßintima migrieren und durch die Verarbeitung von Lipoproteinen zu sog. Schaumzellen werden können, sind eine wichtige Quelle für bioaktive Stoffe, wie die oben genannten Zytokine.

Die Zytokine, Enzyme und radikalen Sauerstoffspezies spielen eine wichtige Rolle in der Atherosklerose und Destabilisierung der Gefäßplaques, deren Ruptur einem akuten Koronarsyndrom zugrunde liegen kann.

Obwohl die Rolle der Leukozytose nach Infarkt noch nicht zur Gänze geklärt ist, konnte eine Korrelation zwischen der Anzahl der zirkulierenden Leukozyten und dem CK- Wert bei Aufnahme, als Hinweis auf das Ausmaß der myokardialen Schädigung, nachgewiesen werden.⁴⁰

In der Revival- 3 Studie war im Vergleich zur Placebogruppe bei den Patienten der EPO- Gruppe eine signifikant höhere Mobilisation von Progenitorzellen mit unveränderter, intakter Expression des Homing- Rezeptors CXCR4 nachweisbar. Somit konnte neben der endogenen Mobilisation von Progenitorzellen, auch die Mobilisation durch EPO gezeigt werden.⁴¹

Durch die gesteigerte Mobilisation wird eine Verbesserung des kardialen Remodelling und letztendlich des klinischen Verlaufs erhofft.

Das Homing der mobilisierten Progenitorzellen vollzieht sich entlang der CXCR 4/CXCL12- Achse. Anhand der beobachteten EPO- und Placebogruppe wurde der Verlauf der CXCL12- Expression in zirkulierenden Leukozyten unter EPO- Therapie untersucht. Es zeigte sich unter EPO zwar eine gesteigert Mobilisation der Progenitorzellen, in der Messung der CXCL12- RNA war zwischen der EPO- und der Placebogruppe und innerhalb der einzelnen Gruppen kein signifikanter Unterschied nachweisbar.

Somit scheinen die zirkulierenden Leukozyten an der CXCL-12-Bildung und dem Aufbau eines steuernden Gradienten nicht beteiligt zu sein.

Auf der Suche nach Möglichkeiten, die sich nach einem Infarkt und erfolgreicher Reperfusion dennoch abspielenden negativen Auswirkungen, u.a. entzündlicher Genese, auf das Myokard abzumildern oder gar zu verhindern, zeigte sich bei Einsatz von rekombinantem Erythropoietin ein positiver Effekt.

Die direkt kardioprotektiven Effekte konnten zudem als unabhängig von Veränderungen des Hämoglobinwertes, der Erythrozytenzahl und der Sauerstofftransport-Kapazität gezeigt werden.

Im Tiermodell konnten durch eine vorherige Verabreichung von rekombinantem Erythropoietin eine Induktion des protektiven Interleukin-10 (IL-10) und eine Abmilderung der Expression von NF-kappaB und der sich daran anschließenden Zytokinkaskade, dazu gehörend auch Interleukin-6 (IL-6) und schließlich der Zellschädigung erreicht werden.³⁸

Im Rahmen der Revival-3- Studie wurden bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt mit Hilfe von zytometrischen Bead Arrays der direkte Einfluss von Erythropoietin auf die Konzentration von proentzündlichen Zytokinen, unter anderem IL-1beta, TNF-alpha und IL-6, im Plasma der Patienten gemessen. Hier konnten anders als im Tierexperiment keine signifikanten Unterschiede zwischen der EPO- und der Placebogruppe festgestellt werden.⁴¹

6.2.1 IL-6 Expression in zirkulierenden Leukozyten

Interleukin- 6 ist ein pleiotropes Zytokin mit einer großen Bandbreite an biologischen Aktivitäten, so z.B. in der Regulation des Immunsystems, der Hämatopoese und wie oben bereits angesprochen der Entzündung. Im Rahmen einer Entzündungsreaktion induziert Interleukin-6

verschiedene Akute- Phase- Proteine, darunter C-reaktives Protein, beta2- Fibrinogen und Haptoglobin.²¹

Auch bei der Entzündungsreaktion nach akutem Myokardinfarkt konnten erhöhte Interleukin-6-Werte gemessen werden. Es konnte bereits die Abgabe von Interleukin-6 aus Kardiomyozyten des Ischämie-Areals gezeigt werden.⁴² Da die Expression von ICAM-1 nach gewisser Latenz auch in nicht von der Ischämie betroffenem Gewebe nachweisbar ist und dieser Entwicklung wohl eine systemische Stimulation durch Zytokine zu Grunde liegt³², wurde in diesem Versuch nun nach der Induktion von Interleukin-6 in zirkulierenden Leukozyten nach Myokardinfarkt gesucht. Darüber hinaus wurde nach einer möglichen Alteration unter Erythropoietin- Hochdosistherapie geforscht. Zu drei Zeitpunkten, bei der Koronarangiographie, nach 60 Stunden und bei der Nachkontrolle nach 6 Monaten wurde in Vollblutproben mittels mRNA nach der Expression von Interleukin-6 gesucht. Der mit Erythropoietin behandelten Patientengruppe stand hier eine Kontrollgruppe mit Placebogabe gegenüber.

Sowohl in der EPO- als auch in der Kontrollgruppe konnte anhand der Messungen kein signifikanter Unterschied im Verlauf des Interleukin-6 gezeigt werden. Ebenfalls im direkten Vergleich beider Versuchsgruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Dieses Ergebnis legt zum Einen die Vermutung nahe, dass die zirkulierenden Leukozyten selbst nicht in signifikantem Maße durch die myokardiale Entzündung zur Interleukin-6- Bildung angeregt werden und die meßbaren Spiegel erhöhungen auf Endothelzellen und Kardiomyozyten zurückgehen. Zum Anderen wird von Neumann et al. wegen des raschen Konzentrationsanstiegs zum Teil noch vor Reperfusion vermutet, dass die Ischämie selbst einen starken Trigger zur Interleukin-6- Ausschüttung darstellt. Da die zirkulierenden Leukozyten erst nach Wiederherstellung der Perfusion zum Infarktareal gelangen, könnte der stimulierende Effekt des zuvor ischämischen Gewebes schon abgeschwächt sein.²²

Somit konnte auf der Ebene der zirkulierenden Leukozyten keine Beeinflussung der Interleukin-6-Induktion durch die Erythropoietingabe beobachtet werden, es bleibt jedoch der positive Effekt der Verminderung der IL-6-Bildung im ischämischen Myokard.³⁸

Verschiedene Studien legen allerdings nahe, dass die Wirkkomponenten von IL-6 weitaus komplexer sind. Neben der entzündlichen Komponente spielt Interleukin-6 auch bei Heilungsprozessen des Gewebes eine wichtige Rolle. So konnte an IL-6- Knock-out- Mäusen eine deutlich verzögerte Wundheilung gezeigt werden.

IL-6 spielt also, gemeinsam mit TNF-alpha, nicht nur in der ischämischen Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle, sondern könnte ebenfalls ein wichtiger Regulator der Myozytenapoptose und der kardialen Reparaturprozesse sein.³²

Auf der Suche nach vorhergehenden Studien zur Expression von IL-6 auf zirkulierenden Leukozyten konnten keine aussagekräftigen gefunden werden.

In dieser Versuchsreihe konnte zwar eine Expression von IL-6 in zirkulierenden Leukozyten, jedoch keine signifikante Änderung nach EPO- Gabe gezeigt werden.

6.2.2 Systemische Entzündungsparameter

Im Rahmen des stationären Verlaufs der an der REVIVAL-3- Studie teilnehmenden Patienten wurden auch systemische Entzündungsparameter erhoben, vor allem die Anzahl der zirkulierenden Leukozyten, sowie der Verlauf des C- reaktiven Proteins (kurz: CRP).

Die Bedeutung der lokalen Entzündungsreaktion im infarzierten Myokard³² ist hinsichtlich ihrer Bedeutung für den Verlust von funktionellem Myokardgewebe und zudem Ausweitung auf eine systemische Entzündungsreaktion bekannt.

Mit Hilfe der im klinischen Verlauf erhobenen klassischen laborchemischen Entzündungsparameter, der Leukozytenanzahl und dem Verlauf des C- reaktiven Proteins konnte im Verlauf der vorliegenden Daten kein signifikanter Unterschied erhoben werden. In beiden Gruppen zeigte sich ein initialer Anstieg der Leukozyten und ein um 1-2 Tage verspäteter Anstieg des C-reaktiven Proteins. Somit spiegelt sich in den Laborwerten die initiale Entzündung in beiden Gruppen wider ohne hier einen Unterschied in der EPO- Gruppe nachweisen zu können.

6.3 Mobilisation hämatogener Progenitorzellen im Infarktgeschehen

Bereits 2001 zeigten Shintani et al., dass es nach akutem Myokardinfarkt zu einem Anstieg der Endothelialen Progenitorzellen und deren mutmaßlichen Vorläuferzellen, den CD34- positiven Mononuklearen Zellen (MNC^{CD34+}), kommt. Zwar sind auch im zirkulierenden Blut gesunder Kontrollpersonen zirkulierende MNC^{CD34+} nachweisbar, jedoch konnte bei Infarktpatienten eine signifikante Steigerung der Zahl, mit einem Gipfel nach 7 Tagen nachgewiesen werden.⁴³

Zur Mobilisation dieser im Knochenmark gelegenen Progenitorzellen kommt es unter Anderem durch die erhöhten Serumspiegel verschiedener Zytokine, wie stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) und granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). Die Zytokine werden durch die myokardiale Ischämie ausgeschüttet.^{44, 45}

Das besondere Interesse an den mobilisierten Progenitorzellen, darunter endotheliale Progenitorzellen aber auch hämatopoietische, nicht-hämatopoietische Stammzellen und eventuell auch mesenchymale Zellen, besteht in der Kardiologie darin, dass lange Zeit angenommen wurde, dass es weder Stammzellen außerhalb des hämatopoetischen Systems noch eine Möglichkeit im adulten Organismus gibt, den Untergang der hochdifferenzierten Kardiomyozyten zu ersetzen.

Die mobilisierten Progenitorzellen werden als ein physiologischer Reparaturmechanismus verstanden: Durch die im ischämischen Organ ausgeschütteten Botenstoffe werden die Zellen mobilisiert und zum betroffenen Organ gelenkt (Homing).⁴⁶

Zunächst anhand von Tierstudien konnte das mögliche Potenzial der mobilisierten Progenitorzellen zur Regeneration oder zur verbesserten Funktion des Myokards gezeigt werden.⁴⁷

So konnten Hirata et al. in einer Studie an Hunden nach chirurgischer Ligation der LAD und gestaffelter EPO- Gabe (sofort, 6h, 1 Woche) einen deutlichen Anstieg der Progenitorzellen im Blut und positive Effekte hinsichtlich der kardialen Funktion nachweisen. Bemerkenswert war an den Ergebnissen zudem, dass zwar die EPO- Gabe sofort nach Ligation und nach sechs Stunden, beide zu einer gesteigerten Mobilisation von Progenitorzellen und einer gesteigerten Kapillardichte führten, jedoch bei verzögerter EPO- Gabe kein Nachweis einer Reduktion der Infarktgröße gelang. Somit sehen die Autoren die Reduktion des Infarktareals als eine sofortige Wirkung von EPO auf die Apoptose und die freien Radikale.⁴⁸

Eine weitere Studie an Mäusen zeigte ebenfalls nach Infarktinduktion und EPO-Gabe neben einer deutlich höheren Überlebensrate und erhaltenen kardialen Funktion unter EPO eine gesteigerte Freisetzung von Progenitorzellen aus dem Knochenmark. Deren Homing in das infarzierte Myokard vollzog sich entlang der CXCR4/SDF-1- Achse.⁴⁹

Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Van Westenbrink et al. und konnten eine direkte Beteiligung der aus dem Knochenmark mobilisierten Zellen an den kardialen Reparaturmechanismen nachweisen.

Anhand der REPAIR- AMI- Studie zeigten Schächinger et al., dass die intracoronare Progenitorzellinfusion nach akutem Myokardinfarkt die linksventrikuläre Pumpfunktion im Langzeitverlauf verbessert. Hierzu wurden in einer randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten Multicenter- Studie 204 Patienten mit akutem Myokardinfarkt eingeschlossen, die durchschnittlich 4 Tage nach erfolgreicher Reperfusion die Progenitorzelltherapie erhielten.

Ein therapeutischer Effekt zeigte sich vor allem bei großen Infarkten im Sinne einer verbesserten Pumpfunktion im Langzeitverlauf (vier Monate). Allerdings bedürfen die genauen Umstände einer invasiven Progenitorzelltherapie noch weiterer Forschung, da bisher kein standardisiertes Protokoll für die Therapie mit Progenitorzellen (Methode der Entnahme, Menge, Aufbereitung) besteht.⁴⁶

Neben invasiven Zelltherapien gab es auch Anstrengungen im Rahmen der physiologischen Mechanismen auf die Progenitormobilisation pharmakologisch Einfluss zu nehmen.

Bei Gabe von G-CSF im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes ließ sich eine gesteigerte Mobilisation von Progenitorzellen aus dem Knochenmark nachweisen.

Jedoch waren die Oberflächenmoleküle, die für das Homing der Progenitorzellen nötig sind, wie z.B. CXCR-4 deutlich reduziert und somit die mobilisierten Zellen in Hinblick auf ihre Effektivität stark eingeschränkt.

Unter der Therapie mit EPO zeigte sich im Vergleich mit der Therapie mit G-CSF eine geringere Mobilisation, jedoch mit erhaltenen Oberflächenrezeptoren.⁵⁰

In wie weit sich eine Therapie mit Erythropoietin, dessen kardioprotektive, anti-inflammatorische und anti-apoptotische Wirkungen bereits angesprochen wurden, auf die Zytokinausschüttung und damit auf das Zusammenspiel mit Progenitorzellen und kardialem Remodelling auswirkt, wurde hier untersucht.

6.3.1 CXCL12 –Expression in zirkulierenden Leukozyten

Chemokine sind multifunktionelle Mediatoren: Sie können Entzündungsreaktionen fördern, Immunantworten verstärken und das Überleben, die Entwicklung und die Homostase von Stammzellen begünstigen. Daneben spielen sie auch eine wichtige Rolle bei der Chemotaxis und Angiogenese. Die Chemokine werden nach ihrer primären Aminosäuresequenz in vier Untergruppen unterteilt: CXC, CC, C und CX3C.

Zur CXC- Familie gehört neben z.B. Interleukin- 8 und dem neutrophil activating peptide-2, der stromal cell-derived-factor (SDF)-1, auch CXCL 12 genannt.

Während die Gene für alle anderen CXC- Chemokine auf Chromosom 4 liegen, ist CXCL 12 auf Chromosom 10 lokalisiert.

CXCL 12 wurde zuerst aus dem Überstand von Zellen aus dem Knochenmark isoliert. Gebildet wird es allerdings zudem in verschiedenen Geweben, darunter Pankreas, Milz, Ovarien und Dünndarm.¹⁷ Auch in hämatopoetischen Stammzellen konnte die Synthese von SDF-1 nachgewiesen werden, allerdings dürfte der überwiegende Anteil der produzierenden Zellen im Knochenmark liegen.⁵¹

Verglichen mit anderen Chemokinen, induziert SDF-1 selektiv die Migration von Bone marrow derived Progenitorzellen. Ein hoher SDF-1- Gradient im Knochenmark hält die Progenitorzellen im Knochenmark direkt zurück, während die Veränderung des Gradienten zur Mobilisation der Progenitorzellen in die Zirkulation führt.

Aufgrund von Gefäßverletzungen verschiedener Art und dadurch induzierter Apoptose kommt es zu einer verstärkten SDF-1- Ausschüttung durch Smooth Muscle Cells (SMCs) und aktivierte Thrombozyten, gefolgt von einem vorübergehenden Anstieg des SDF-1-Plasmalevels. Der somit gesteigerte Plasmaspiegel verändert den Gradienten zwischen zirkulierendem Blut und Knochenmark und führt konsekutiv zu einer Mobilisierung von Progenitorzellen. Die SDF-1-

Ausschüttung in verletzten Arterien ist somit entscheidend für das Gefäßremodelling:¹⁷⁻¹⁹

Nach Gefäßverletzungen vermittelt SDF-1 die Rekrutierung der CD34+ Progenitorzellen und der primitiven hämatopoetischen Zellen entlang des hypoxischen Gradienten mit Hilfe der an der beschädigten Gefäßoberfläche anhaftenden Thrombozyten.^{52, 53}

Damas et al. konnten 2002 im Rahmen einer Studie an Patienten mit stabiler und instabiler Angina pectoris nicht nur deutliche Unterschiede in der Plasmaexpression von SDF-1 zeigen, sondern zudem besonders bei hohen Dosen Hinweise auf anti-inflammatorische und Matrix-stabilisierende Effekte in instabiler Angina pectoris finden. Eine Rolle bei der Plaquestabilisierung wurde vermutet.²⁰

CXCR 4 ist der wichtigste CXC- Rezeptor auf Endothelzellen und über seine Liganden SDF-1alpha und SDF- 1beta induziert er die entscheidenden Chemoattractants für Endothelzellen.⁵⁴

Die kontinuierliche Expression von CXCL12 und Interaktion mit seinem Liganden CXCR4 im Organismus sind in umfangreichem Ausmaß an der Organentwicklung und -erhaltung beteiligt. An Hand von Knock-out- Mäusen konnten deutliche Beeinträchtigungen in der Entwicklung von kardialen und vaskulären Strukturen gezeigt werden. Die Bedeutung von CXCL12/CXCR4 im Myokardinfarkt zeigt sich in einer erhöhten Expression nach kardialer Ischämie. Hiervon werden CXCR4- tragende Progenitorzellen im Knochenmark und gemäß dem CXCL12- Gradienten mobilisiert. Für die kardiale Funktion nach ischämischem Myokarduntergang konnte hierdurch ein Benefit erreicht werden.^{55,56} Eine Möglichkeit, die Mobilisation der Progenitorzellen weiter zu stimulieren und den Effekt von SDF-1 zu unterstützen, stellt eine medikamentöse Therapie mit EPO dar. Es konnte eine deutlich gesteigerte Mobilisation im Mausmodell gezeigt werden.⁴⁹

In dieser Arbeit sollte die Beteiligung der im peripheren Blut zirkulierenden Leukozyten und deren Response auf eine Gabe von EPO beim Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt untersucht werden. Während der Nachweis von EPO- Rezeptoren auf zirkulierenden Leukozyten erbracht ist, konnte in der Studie kein signifikanter Unterschied für die Expression von CXCL12 gezeigt werden. Der beobachtete Benefit einer EPO- Gabe am Mausmodell und somit über SDF-1 gesteigerte Mobilisation der Progenitorzellen scheint ohne Beteiligung der peripheren Leukozyten abzulaufen. Unterstützt wird dies von der Beobachtung, dass zwar auf vielen Geweben neben dem des Herzens auch der Leber, Milz und Nieren, der CXCL12 Nachweis gelang, auf Leukozyten jedoch bisher nicht.⁵⁵

In dieser Arbeit wurde mithilfe einer quantitativen PCR- Messung nach der Expression von SDF-1 in zirkulierenden Leukozyten und dessen Alteration unter Erythropoietin- Hochdosistherapie gesucht. Zwar wurde bisher kein Nachweis der Bildung in Leukozyten allgemein erbracht¹⁷, dafür konnten Hinweise auf die Expression in hämatogenen Stammzellen gefunden werden.⁵¹

Die gesteigerte Mobilisation eben dieser hämatogenen Stammzellen ins zirkulierende Blut ist

einer der beobachteten kardioprotektiven Effekte von Erythropoietin^{10, 15}, so dass auch nach einer gesteigerten Expression durch vermehrt zirkulierende Stammzellen in der EPO- Gruppe gesucht wurde.

In der Placebo- und auch in der Erythropoietingruppe konnte keine signifikante Veränderung im Verlauf der SDF-1- Expression nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich auch bei direkter Inbezugnahme kein signifikanter Unterschied.

Während die Expression in den Leukozyten beider Gruppen unter der Nachweisgrenze liegen könnte, so könnte auch ein Unterschied aufgrund des geringen Ausmaßes der Mobilisationssteigerung nicht nachweisbar sein.⁴¹

6.3.2 Prominin-1- Expression in zirkulierenden Leukozyten

Prominin- 1 ist ein Transmembranglykoprotein, bestehend aus 865 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 120 kDalton. Die kodierende Gensequenz liegt auf dem Chromosom 4. Prominin- 1 hat eine einzigartige Struktur, die aus einer N- terminalen extrazellulären Domäne, fünf transmembranen Domänen mit zwei großen extrazellulären Schleifen und einem 59aa zytoplasmatischen Schwanz besteht. Benannt wurde Prominin-1 nach seiner prominenten Lokalisierung auf Zellmembranvorwölbungen.

Transkripte des humanen Prominin-1 können auf verschiedenen Zelllinien und den meisten adulten Geweben wie Hirngewebe, kardiales Gewebe, Nieren, Leber und Lunge, gefunden werden, allerdings nicht auf reifen peripheren Leukozyten.

Die Expression des zugehörigen Oberflächenmoleküls, AC 133, ist auf undifferenzierte Zellen beschränkt, darunter endotheliale Progenitorzellen, hämatopoetische Stammzellen und verschiedene Krebszellarten. Die genaue Funktion von Prominin-1 konnte bisher noch nicht geklärt werden, dafür eignet sich das Oberflächenantigen AC 133, bzw. CD 133 hervorragend für die Suche nach und Isolation von Progenitor- und Stammzellen.^{23, 24}

Bonnano et al. gelang es 2007 anhand von in-vitro- Versuchen zu zeigen, dass CD133+ hämatopoetische Stammzellen je nach Auswahl des Mediums eine endotheliale oder kardiomyozytische Differenzierung aufweisen können.⁵⁷ Dies ist im Besonderen von Interesse, da aufgrund von Ischämie eines Gewebes oder einem endothelialen Schaden, die Mobilisierung von endothelialen Progenitorzellen aus dem Knochenmark nachgewiesen werden konnte. Diese endothelialen Progenitorzellen siedeln sich an den Gewebeschäden an, differenzieren zu Endothelzellen und beteiligen sich an der Neovaskularisation. Konsekutiv kommt es dadurch zu einem verbesserten Blutfluss und Erholung des Gewebes.⁵⁸

An Patienten die einen Herzinfarkt erlitten und sich einer Bypass-Operation unterziehen mussten

untersuchten Stamm et al. 2003, ob sich durch die zusätzliche Implantation von autologen AC 133+ Knochenmarkszellen die günstigen Effekte der Progenitorzellen nutzen lassen. In ihrer Studie konnten sie zeigen, dass eine verbesserte linksventrikuläre Funktion mit verbesserter Gefäßperfusion im Infarktgebiet zu beobachten ist.⁵⁹

Im Rahmen der Revival-3- Studie wurde versucht durch die Hochdosistherapie mit Erythropoietin neben anti- inflammatorischen Effekten auch die Mobilisation der Progenitorzellen, ihres Zeichens CD133- Antigenträger, zu fördern. Da Prominin-1 im zirkulierenden Blut zwar von Progenitorzellen, aber nicht von reifen Leukozyten transkribiert und exprimiert wird²³, wurde versucht, einen Anstieg der RNA- Synthese im zirkulierenden Blut der Patienten zu finden.

Im Verlauf der EPO und der mit Placebo behandelten Kontrollgruppe konnten keine signifikanten Unterschiede in der Prominin-1- Expression nachgewiesen werden. Auch bei Inbezugnahme der Erythropoietin- und der Placebogruppe zu einander, konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden.

Allerdings wurde von Padfield et al. 2009 untersucht, dass die Mobilisierung von Progenitorzellen aus dem Knochenmark nicht von der, ein Akutes Koronarsyndrom begleitenden systemischen Entzündungsreaktion abhängt, sondern v.a. die Gefäßverletzung, wie auch bei einer perkutanen transluminalen Koronarangiographie, der entscheidende Faktor ist.⁶⁰ So könnte die Gefäßtraumatisierung im Rahmen der Angiographie in beiden Gruppen ähnliche Werte hervorgerufen haben.

6.3.3 Endoglin- Expression in zirkulierenden Leukozyten

Endoglin ist ein transmembranöser Korezeptor der Transformin-growth-factor-1beta- Familie. Es ist ein homodimerisierendes Protein, das aus 658 Aminosäureresten besteht und eine extrazelluläre Domäne, eine einzige transmembranöse Domäne und eine kurze intrazelluläre Domäne besitzt. Die intrazelluläre Domäne von Endoglin besitzt keine enzymatische Kopplung, dafür viele Serin- und Theroninreste, von denen einige durch Transforming Growth Factor-1beta- Rezeptor-Kinasen phosphoryliert werden. Üblicherweise wird Endoglin an der Zelloberfläche als Homodimer exprimiert. Während Endoglin in ruhenden Endothelzellen normalen Gewebes nur in geringen bis nicht nachweisbaren Mengen exprimiert wird, kommt es in Gefäßendothelien am Rande von aktiver Angiogenese im Rahmen von Embryogenese, Tumoren, so z.B. Melanomen, Ovarial- und Prostatakrebs, und eben auch Entzündungen zu einer starken Expression. Auch in anderen Zellreihen neben dem Endothel konnte die Expression von Endoglin nachgewiesen werden: So unter anderem in Monozyten und glatten Muskelzellen. Bei Atherosklerose ist die Bildung in glatten Muskelzellen stark gesteigert, was leicht nachvollziehbar ist, wenn man sich die

Atherosklerose als entzündlichen Prozess in der Gefäßwand vor Augen hält. Des Weiteren kann die Endoglin- Expression von adulten hämatopoetischen Stammzellen nachgewiesen werden.

Natürlicherweise ist die Expression von Endoglin wie bereits erwähnt während Veränderungen an vaskulären Strukturen, wie Embryogenese, Wundheilung und Entzündung gesteigert. Endoglin-defizite Mäuse haben in Bezug auf die Gefäßbildung deutliche Nachteile, die sich auch nach z.B.: einem Infarktgeschehen und der sich anschließenden Neovaskularisation zeigten.

Neben diesen TGF-1b abhängigen Funktionen ließen sich auch andere, unabhängige Wirkungen zeigen: So zum Beispiel die Apoptose- Inhibition in Endothelzellen unter hypoxischem Stress und die Einflussnahme auf Zellmigration via Endothelzellen.

Beide Komponenten sowie die Induktion der Neovaskularisation spielen auch nach einem Myokardinfarkt für das Outcome des Patienten eine entscheidende Rolle.

So konnte gezeigt werden, dass die Hochregulierung von Endoglin mit dem Ausmaß der Neovaskularisierung nach Myokardinfarkt korreliert. Ob dies mehr durch die direkte Stimulierung von TGF-beta oder durch unabhängige Effekte zustande kommt, konnte noch nicht genau geklärt werden.²⁵⁻²⁸

Erythropoietin übt stimulierende Effekte auf die Angiogenese, vor allem im Rahmen von Entzündungsreaktionen, und auf die Migration von Endothelzellen und deren Vorläufer aus. Die Expression des Erythropoietin- Rezeptors konnte, ebenso wie die des Endoglin- Rezeptors auf zirkulierenden Monozyten nachgewiesen werden.³⁴

Bereits 2006 untersuchte eine Forschungsgruppe des Deutschen Herzzentrums München um K. Schömig et al. die Mobilisation von Progenitorzellen und zirkulierenden Endothelzellen im akuten Infarktgeschehen und im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina pectoris

Da sowohl auf der Oberfläche der Progenitorzellen, als auch auf der von Endothelzellen der Oberflächenmarker CD34 nachweisbar ist, muss zur weiteren Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen der Marker CD 133 hinzugezogen werden. Im akuten Infarktgeschehen zeigte sich ein rascher Anstieg der Endothelzellen, der nach einem Tag zurückging. In der stabilen A.p.- Gruppe war eine kleine konstante Expression der Endothelzellen, nach PCI kein Anstieg nachweisbar. Bezüglich der Progenitorzellen (CD133) zeigte sich bei den Patienten mit akutem Myokardinfarkt ein Anstieg nach zwei Tagen, bei der Kontrollgruppe nicht.

Es wird vermutet, dass eine Entzündungsreaktion, die Ischämie oder eine Gefäßverletzung eine gesteigerte Mobilisation der Progenitorzellen auslösen.

Die unterschiedliche Nachweisbarkeit von zirkulierenden Endothelzellen sehen die Autoren als durch Endoglin ausgelöst. Im akuten Infarktgeschehen waren im peripheren Blut vorrübergehend erhöhte Konzentrationen nachweisbar, einem akuten Anstieg und raschem Abfall der Endothelzellen entsprechend. In der stabilen A.p.- Gruppe waren konstant niedrige Levels von

Endothelzellen nachweisbar, ebenfalls der Expression entsprechend.⁶¹

In der hier vorliegenden Arbeit wurde nun untersucht, in wie fern sich die bekannten Erythropoietin- Effekte auch über eine veränderte Expression von Endoglin in den zirkulierenden Leukozyten, hier vor allem in der Subpopulation der Monozyten, nachweisen lassen können. Beide, sowohl Endoglin als auch Erythropoietin, nehmen auf ähnliche Weise Einfluß auf die Geschehnisse von Entzündungsreaktionen, so dass ein Zusammenspiel auf molekularer Ebene denkbar erscheint.

Allerdings konnte in der Erythropoietin- und in der Kontrollgruppe der Studienpopulation im Verlauf der Endoglinexpression in zirkulierenden Leukozyten auf RNA- Ebene kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Auch im direkten Vergleich mit der Expression in der EPO- und Placebogruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Dass sich in der Erythropoietin- Gruppe zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zeigen ließ, könnte darauf hinweisen, dass obwohl Endoglin und Erythropoietin sich zwar beide über die Angiogenese und die Migrationsförderung von Endothelzellen an den Regeationsvorgängen im ischämischen Myokard beteiligen, dies aber auf unterschiedlichem Wege.

6.4 Apoptosereaktion nach akutem Myokardinfarkt

Im akuten Herzinfarkt kommt es neben dem Zellverlust durch Nekrose auch zu einem nicht unbeträchtlichen Myokardschaden durch Apoptose. Die Apoptose ist ein energieabhängiger Prozess, der in der Kondensation des Chromatins und der DNA- Fragmentierung bei erhaltener Zellmembran resultiert. In Folge dessen ruft die Apoptose im Unterschied zur Nekrose keine entzündliche Reaktion hervor.

Die Bedeutung des apoptotischen Zellverlustes in verschiedenen kardialen Krankheitsbildern, wie dem Myokardinfarkt, der dilatativen Kardiomyopathie und der chronischen Herzinsuffizienz, konnte bereits belegt werden.

Vor allem im Rahmen des kardialen Reperfusionsschadens, bei akutem Myokardinfarkt und der therapeutischen Wiedereröffnung des verschlossenen Koronargefäßes, kommt dem apoptotischen Zellschaden eine wichtige Rolle zu. Hier bietet sich die Möglichkeit des therapeutischen Eingreifens zur Begrenzung des Ausmaßes des myokardialen Schadens.

Bei der Induktion der kardialen Apoptose gibt es neben dem extrinsischen, rezeptorvermittelten auch den intrinsischen Pathway. Besonders im Vordergrund bei der intrinsischen Aktivierung steht die B- cell- lymphoma 2- Proteinfamilie. Die Familie besteht sowohl aus proapoptotischen Proteinen, wie Bax, Bak, Bad und Puma, als auch aus antiapoptotischen Vertretern, wie Bcl-2 und Bcl-X_L.⁶²⁻⁶⁴

Das menschliche Bcl-2 besteht aus 239 Aminosäuren und befindet sich im Cytosol, in den Mitochondrien, hier bevorzugt an Stellen, an denen sich die innere und die äußere Membran eng gegenüber liegen, am Endoplasmatischen Retikulum und der Kernhülle.^{29, 65, 66}

Neben der bereits beschriebenen Expression im Myokard und anderen Geweben, wie z.B. Leber- Lungen- und Pankreasgewebe, findet sich Bcl-2 auch im Knochenmark in den myeloiden und erythroiden Vorläuferzellen und ist hier für das Überleben dieser Zellen zuständig.^{65, 66}

Eine Überexpression von Bcl-2 führt in den Mitochondrien zu einer Resistenz gegen den Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials und zur Resistenz gegen eine erhöhte Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran. Die proapoptotischen Bax oder Bak haben den gegenteiligen Effekt und fördern die Freisetzung von Cytochrom c. Cytochrom c spielt im intrinsischen Aktivierungsweg die Hauptrolle durch seine Interaktion mit dem apoptotic protease-activating factor (Apaf1) und den deoxyadenosine triphosphate (dATP) zur Bildung von Apoptosomen. Die Apoptosomen schaffen eine Plattform, um die Moleküle der Initiator caspase des intrinsischen Aktivierungsweges zusammenzubringen.

Dieser Aktivierungsweg mündet üblicherweise in der Aktivierung der Caspase-9 und ermöglicht deren Auto-Aktivierung. Auch die Caspase-8 hat eine bedeutende Rolle bei der Bi- Aktivierung, indem sie in die Mitochondrien transloziert und Cytochrom c freisetzt. Die aktivierte Caspase-8 spaltet die Procaspase-3, wobei die aktivierte Caspase-3 freigesetzt wird. Diese schließlich wirkt wie ein Scharfrichter, indem sie vielfältige andere Substrate in der Zelle spaltet.

Bcl-2 bewirkt seine antiapoptotische Wirkungen somit auch durch die Inhibition von proapoptotischen Mitgliedern der Proteinfamilie.²⁹⁻³¹

In dieser Arbeit konnten wir zytometrisch das Ausmaß der Apoptoseminderung der Erythropoietintherapie hinsichtlich der zirkulierenden Leukozyten zeigen. In der RNA- Analyse konnte keine signifikante Änderung dargestellt werden.

In der Annexin- Messung zeigte sich ein deutlich verringertes Apoptoseverhalten im zirkulierenden Blut der EPO- Gruppe. Dies lässt sich auf die antiapoptotische Wirkung von Erythropoietin, wie oben besprochen zurückführen.

Molekular konnte keine signifikant gesteigerte Bcl-2- Expression nachgewiesen werden. Interessanterweise sind die unter EPO beobachteten antiapoptotischen Wirkmechanismen, wie oben bereits ausgeführt, in einigen Teilen mit denen des Bcl-2 identisch.

Wie in der Einleitung bereits angesprochen, bedient sich EPO des PI 3-K/Akt- Signalwegs um die Apoptose auf verschiedenen Wegen zu unterbinden. Dazu gehören die Regulation von Transkriptionsfaktoren, die Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotenzials, die Verhinderung der Cytochrom c – Freisetzung und die Blockade der Caspase- Aktivität.¹¹

Leider ließ sich in unserer Untersuchung kein Nachweis dafür finden, dass zumindest einige der zytoprotektiven Effekte von Erythropoietin über die Bcl-2- Familie vermittelt werden.

7 Zusammenfassung

Das oberste Ziel der Therapie eines akuten Myokardinfarkts ist die Erhaltung von möglichst viel vitalem, somit funktionellem Herzmuskelgewebe. Im Rahmen der Wiedereröffnung des zuvor okkludierten Gefäßes kommt es zu einem relevanten Zellschaden (lethal reperfusion injury) mit einer lokalen und anschließend einer systemischen Entzündungsreaktion.

Die Verabreichung von Erythropoietin im Rahmen eines Gefäßverschlusses und anschließender Reperfusion zeigte im Tierversuch eine Reduktion des Reperfusionsschadens.⁹

Ob nun der Effekt des Erythropoietins auf die Inhibition der Entzündungsreaktion oder der Apoptose zurückzuführen ist, wurde anhand von RNA- Expression an zirkulierenden Leukozyten untersucht.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass EPO- Rezeptoren auf zirkulierenden Leukozyten exprimiert werden und deren Expression durch Erythropoietin noch gesteigert werden kann.

In einer Substudie der REVIVAL-3- Studie wurden bei 76 Patienten gezielte Blutabnahmen (Direkt nach PTCA, 48h und 60h nach der ersten Blutabnahme und die Langzeitkontrolle ca. 6 Monate nach PTCA) durchgeführt und die klinischen Laborparameter (Blutbild, Retikulozyten, CRP) und die RNA- Expression von BCL-2, PROM1, ENG, CXCL 12 und IL-6 untersucht. Außerdem wurde die Anzahl zirkulierender apoptotischer Leukozyten durchflusszytometrisch bestimmt.

Hinsichtlich der klinischen Laborparameter zeigte sich der Wert für die Retikulozytenzahl in der EPO- Gruppe erhöht, während der Hämoglobinwert, die Leukozyten und das C- reaktive Protein gleich waren.

In der RNA- Analyse von BCL-2, PROM1, ENG, CXCL 12 und IL-6 war kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen, und ebenso nicht in der EPO- oder Kontrollgruppe im Verlauf darstellbar. Wie bereits oben besprochen, muss auf die Heterogenität, sowie die Vollblutisolation und unterlassene Isolation der Subgruppen der zirkulierenden Leukozyten hingewiesen werden.

Hinsichtlich der Apoptosemessung in zirkulierenden Leukozyten zeigte sich eine signifikante Reduktion des Prozentsatzes der apoptotischen Zellen in der EPO-Gruppe nach 48 Stunden und nach 60 Stunden.

Die kurzzeitige hochdosierte Gabe von Erythropoietin im akuten Myokardinfarkt beeinflusst die systemische Entzündungsreaktion und die RNA- Expression inflammatorischer und apoptotischer Gene in zirkulierenden Leukozyten nicht.

Es zeigte sich aber eine Hemmung der Apoptose in zirkulierenden Leukozyten unter EPO-Therapie. Dies könnte ein Hinweis für die apoptotischen Effekte einer hochdosierten EPO-Therapie sein.

8 Literaturverzeichnis

1. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Adams RJ, Berry JD, Brown TM, Carnethon MR, Dai S, de Simone G, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Greenlund KJ, Hailpern SM, Heit JA, Ho PM, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McDermott MM, Meigs JB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Rosamond WD, Sorlie PD, Stafford RS, Turan TN, Turner MB, Wong ND, Wylie-Rosett J. Heart disease and stroke statistics--2011 update: A report from the american heart association. *Circulation*. 2011;123:e18-e209
2. Committee TJESoCACoC. Myocardial infarction redefined- a consensus document of the joint european society of cardiology/american college of cardiology committee for the redefinition of myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000;Vol.36,No.3,2000
3. Véronique L. Roger M, MPH. Epidemiology of myocardial infarction. *The Medical Clinics of North America*. 2007;Vol.91:537-552
4. Kiernan TJ, Gersh BJ. Thrombolysis in acute myocardial infarction: Current status. *Med Clin North Am*. 2007;91:617-637; x
5. Singh KP, Harrington RA. Primary percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction. *Med Clin North Am*. 2007;91:639-655; x-xi
6. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007;357:1121-1135
7. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: Targeting the reperfusion injury salvage kinase (risk)-pathway. *Cardiovasc Res*. 2004;61:448-460
8. Wright GL, Hanlon P, Amin K, Steenbergen C, Murphy E, Arcasoy MO. Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia-reperfusion injury. *FASEB J*. 2004;18:1031-1033
9. Tamarelle S, Ghaboura N, Treguer F, Khachman D, Croue A, Henrion D, Furber A, Prunier F. Myocardial reperfusion injury management: Erythropoietin compared with postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297:H2035-2043
10. Lombardero M, Kovacs K, Scheithauer BW. Erythropoietin: A hormone with multiple functions. *Pathobiology*. 2011;78:41-53
11. Maiese K, Chong ZZ, Shang YC. Raves and risks for erythropoietin. *Cytokine Growth*

- Factor Rev.* 2008;19:145-155
12. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Angiogenesis and plasticity: Role of erythropoietin in vascular systems. *J Hematother Stem Cell Res.* 2002;11:863-871
 13. Maiese K, Li F, Chong ZZ. New avenues of exploration for erythropoietin. *JAMA.* 2005;293:90-95
 14. Gao E, Boucher M, Chuprun JK, Zhou RH, Eckhart AD, Koch WJ. Darbepoetin alfa, a long-acting erythropoietin analog, offers novel and delayed cardioprotection for the ischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:H60-68
 15. Stein A, Knodler M, Makowski M, Kuhnel S, Nekolla S, Keithahn A, Weidl E, Groha P, Schurmann M, Saraste A, Botnar R, Oostendorp RA, Ott I. Local erythropoietin and endothelial progenitor cells improve regional cardiac function in acute myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord.* 2010;10:43
 16. Riksen NP, Hausenloy DJ, Yellon DM. Erythropoietin: Ready for prime-time cardioprotection. *Trends Pharmacol Sci.* 2008;29:258-267
 17. Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, Honjo T. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (sdf1) gene. *Genomics.* 1995;28:495-500
 18. Schober A. Chemokines in vascular dysfunction and remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1950-1959
 19. Zernecke A, Schober A, Bot I, von Hundelshausen P, Liehn EA, Mopps B, Mericskay M, Gierschik P, Biessen EA, Weber C. Sdf-1alpha/cxcr4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. *Circ Res.* 2005;96:784-791
 20. Damas JK, Waehre T, Yndestad A, Ueland T, Muller F, Eiken HG, Holm AM, Halvorsen B, Froland SS, Gullestad L, Aukrust P. Stromal cell-derived factor-1alpha in unstable angina: Potential antiinflammatory and matrix-stabilizing effects. *Circulation.* 2002;106:36-42
 21. Kishimoto T. Il-6: From its discovery to clinical applications. *Int Immunol.* 2010;22:347-352
 22. Marx N, Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Koch W, Pinkau T, Schomig A. Induction of cytokine expression in leukocytes in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1997;30:165-170
 23. Shmelkov SV, Jun L, St Clair R, McGarrigle D, Derderian CA, Usenko JK, Costa C, Zhang F, Guo X, Rafii S. Alternative promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein ac133. *Blood.* 2004;103:2055-2061
 24. Mizrak D, Brittan M, Alison MR. Cd133: Molecule of the moment. *J Pathol.* 2008;214:3-9

25. ten Dijke P, Goumans MJ, Pardali E. Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis*. 2008;11:79-89
26. Lebrin F, Mummery CL. Endoglin-mediated vascular remodeling: Mechanisms underlying hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Trends Cardiovasc Med*. 2008;18:25-32
27. Lopez-Novoa JM, Bernabeu C. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299:H959-974
28. van Laake LW, van den Driesche S, Post S, Feijen A, Jansen MA, Driessens MH, Mager JJ, Snijder RJ, Westermann CJ, Doevendans PA, van Echteld CJ, ten Dijke P, Arthur HM, Goumans MJ, Lebrin F, Mummery CL. Endoglin has a crucial role in blood cell-mediated vascular repair. *Circulation*. 2006;114:2288-2297
29. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292:C45-51
30. Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem*. 2011;351:41-58
31. Regula KM, Kirshenbaum LA. Apoptosis of ventricular myocytes: A means to an end. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;38:3-13
32. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2002;53:31-47
33. Hosoda T, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Mechanisms of myocardial regeneration. *Circ J*. 2010;74:13-17
34. Lisowska KA, Debska-Slizien A, Bryl E, Rutkowski B, Witkowski JM. Erythropoietin receptor is expressed on human peripheral blood t and b lymphocytes and monocytes and is modulated by recombinant human erythropoietin treatment. *Artif Organs*. 2010;34:654-662
35. Frantz S, Bauersachs J, Ertl G. Post-infarct remodelling: Contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovasc Res*. 2009;81:474-481
36. Sun Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: Roles of local factors. *Cardiovasc Res*. 2009;81:482-490
37. Vilahur G, Juan-Babot O, Pena E, Onate B, Casani L, Badimon L. Molecular and cellular mechanisms involved in cardiac remodeling after acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;50:522-533
38. Liu X, Xie W, Liu P, Duan M, Jia Z, Li W, Xu J. Mechanism of the cardioprotection of rheso pretreatment on suppressing the inflammatory response in ischemia-reperfusion. *Life Sci*. 2006;78:2255-2264
39. Youker K, Smith CW, Anderson DC, Miller D, Michael LH, Rossen RD, Entman ML.

- Neutrophil adherence to isolated adult cardiac myocytes. Induction by cardiac lymph collected during ischemia and reperfusion. *J Clin Invest.* 1992;89:602-609
40. Djurdjevic PM, Arsenijevic NN, Baskic DD, Djukic AL, Popovic S, Samardzic G. Systemic response of peripheral blood leukocytes and their phagocytic activity during acute myocardial infarction. *Exp Clin Cardiol.* 2001;6:159-166
 41. Stein A, Mohr F, Laux M, Thieme S, Lorenz B, Cetindis M, Hackl J, Groha P, Demetz G, Schulz S, Mehilli J, Schomig A, Kastrati A, Ott I. Erythropoietin-induced progenitor cell mobilisation in patients with acute st-segment-elevation myocardial infarction and restenosis. *Thromb Haemost.* 2012;107:769-774
 42. Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Richardt G, Holzapfel H, Jochum M, Schomig A. Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation.* 1995;92:748-755
 43. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation.* 2001;103:2776-2779
 44. Wojakowski W, Kucia M, Kazmierski M, Ratajczak MZ, Tendera M. Circulating progenitor cells in stable coronary heart disease and acute coronary syndromes: Relevant reparatory mechanism? *Heart.* 2008;94:27-33
 45. Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension.* 2005;45:321-325
 46. Schachinger V, Dimmeler S, Zeiher AM. [stem cells after myocardial infarction]. *Herz.* 2006;31:127-136; quiz 142-123
 47. Wojakowski W, Tendera M. Mobilization of bone marrow-derived progenitor cells in acute coronary syndromes. *Folia Histochem Cytobiol.* 2005;43:229-232
 48. Hirata A, Minamino T, Asanuma H, Fujita M, Wakeno M, Myoishi M, Tsukamoto O, Okada K, Koyama H, Komamura K, Takashima S, Shinozaki Y, Mori H, Shiraga M, Kitakaze M, Hori M. Erythropoietin enhances neovascularization of ischemic myocardium and improves left ventricular dysfunction after myocardial infarction in dogs. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:176-184
 49. Brunner S, Winogradow J, Huber BC, Zaruba MM, Fischer R, David R, Assmann G, Herbach N, Wanke R, Mueller-Hoecker J, Franz WM. Erythropoietin administration after myocardial infarction in mice attenuates ischemic cardiomyopathy associated with enhanced homing of bone marrow-derived progenitor cells via the cxcr-4/sdf-1 axis. *FASEB J.* 2009;23:351-361
 50. Stein A, Zohlhofer D, Pogatsa-Murray G, von Wedel J, Steppich BA, Schomig A,

- Kastrati A, Ott I. Expression of cxcr4, vla-1, lfa-3 and transducer of erb in g-csf-mobilised progenitor cells in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 2010;103:638-643
51. Link DC. Neutrophil homeostasis: A new role for stromal cell-derived factor-1. *Immunol Res.* 2005;32:169-178
52. Hristov M, Zerneck A, Liehn EA, Weber C. Regulation of endothelial progenitor cell homing after arterial injury. *Thromb Haemost.* 2007;98:274-277
53. Frangiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb Haemost.* 2007;97:738-747
54. Salcedo R, Oppenheim JJ. Role of chemokines in angiogenesis: Cxcl12/sdf-1 and cxcr4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses. *Microcirculation.* 2003;10:359-370
55. Takahashi M. Role of the sdf-1/cxcr4 system in myocardial infarction. *Circ J.* 2010;74:418-423
56. Frangiannis NG. The stromal cell-derived factor-1/cxcr4 axis in cardiac injury and repair. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58:2424-2426
57. Bonanno G, Mariotti A, Procoli A, Corallo M, Rutella S, Pessina G, Scambia G, Mancuso S, Pierelli L. Human cord blood cd133+ cells immunoselected by a clinical-grade apparatus differentiate in vitro into endothelial- and cardiomyocyte-like cells. *Transfusion.* 2007;47:280-289
58. Friedrich EB, Walenta K, Scharlau J, Nickenig G, Werner N. Cd34-/cd133+/vegfr-2+ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities. *Circ Res.* 2006;98:e20-25
59. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet.* 2003;361:45-46
60. Padfield GJ, Tura O, Haeck ML, Short A, Freyer E, Barclay GR, Newby DE, Mills NL. Circulating endothelial progenitor cells are not affected by acute systemic inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;298:H2054-2061
61. Schomig K, Busch G, Steppich B, Sepp D, Kaufmann J, Stein A, Schomig A, Ott I. Interleukin-8 is associated with circulating cd133+ progenitor cells in acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2006;27:1032-1037
62. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Mechanisms of apoptosis in the heart. *J Clin Immunol.* 2003;23:447-459
63. Lee Y, Gustafsson AB. Role of apoptosis in cardiovascular disease. *Apoptosis.* 2009;14:536-548

64. Hawkins CJ, Vaux DL. Analysis of the role of bcl-2 in apoptosis. *Immunol Rev.* 1994;142:127-139
65. McDonnell TJ, Beham A, Sarkiss M, Andersen MM, Lo P. Importance of the bcl-2 family in cell death regulation. *Experientia.* 1996;52:1008-1017
66. Cory S, Huang DC, Adams JM. The bcl-2 family: Roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene.* 2003;22:8590-8607

9 Danksagung

Herzlichsten Dank möchte ich meiner Doktormutter und Betreuerin Frau Prof. Dr. med. Ilka Ott für die Überlassung des Themas und die Betreuung aussprechen.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. H. Schunkert für die Möglichkeit, mit dieser Arbeit an seiner Klinik forschen und lernen zu dürfen.

Herzlichen Dank an Birgit Campell und das gesamte Laborteam der Erwachsenenkardiologie am Deutschen Herzzentrum München für die engagierte und unermüdliche Unterstützung bei der Laborarbeit.

Vielen Dank auch für die gute Zusammenarbeit an das gesamte Team des Deutschen Herzzentrums München und meine Kollegen, die an der Revival-3- Studie beteiligt waren.

Des Weiteren möchte ich meiner ganzen Familie, vor allem meiner Schwester Larissa, und meinen Freunden für ihre Hilfe und Unterstützung danken.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Barbara Elisa Lorenz
Adresse: Westerholzstr.20, 81245 München
Telefon: 089/ 41 14 24 14
E-mail: be_lorenz@gmx.de
Geburtsdatum: 07.12.1985, in München
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Berufstätigkeit

Seit 05/2011 Assistenzärztin Innere Medizin, Krankenhaus Barmherzige Brüder, München- Nymphenburg

Studium

10/04 - 09/06 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
09/06 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note „gut“)
10/06 - 09/10 Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München
02/09 - 06/09 Auslandssemester im Rahmen des Erasmus-Programms an der Università degli Studi di Roma „Tor vergata“, Rom, Italien
12/10 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note „gut“)

Praktisches Jahr

08/09 - 12/09 1. Tertial: Innere Medizin am Klinikum Rechts der Isar, München
08/98-10/09 Nephrologie
10/09-12/09 Kardiologie
12/09 - 04/10 2. Tertial: Neurologie am Klinikum Rechts der Isar, München
04/10 - 07/10 3. Tertial: Chirurgie am Ospedale di Careggi Clinica Firenze, in Florenz, Italien

Famulaturen

02/07 - 03/07 Praxisfamulatur Kardiologie Dr. O. Tschaidse, München
08/07 - 09/07 Gynäkologie und Geburtshilfe, Policlinico G. Martino, Messina, Italien
09/07 - 10/07 Angiologie, Interdisziplinäres Centrum für Gefäßerkrankungen Klinikum Rechts d. Isar, München
02/08 - 03/08 Viszeralchirurgie/Chirurgische Ambulanz, Klinik Dr. Reiser, Ingolstadt

Krankenpflegepraktikum

08/04 - 10/04 Klinik Dr. Reiser, Ingolstadt
09/05 - 10/05 Krankenhaus Dritter Orden. München - Nymphenburg

Schulbildung

1992-1996 Grundschule an der Oselstraße, München
1996-2004 Karlsruhgymnasium München- Pasing,
Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife, Note 1,3