

Aus der Klinik für Innere Medizin III  
Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin  
Direktor Prof. Dr. med. M. Böhm  
Fachbereich Klinische Medizin  
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Die Bedeutung des  
„Receptor of Advanced Glycation  
End Products“  
im kardiogenen Schock

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2015**

Vorgelegt von: Lisa Franziska Hewera,  
geb. am 07.08.1985 in Lichtenfels

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung / Summary</b>	<b>9</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>12</b>
2.1 Kardiogener Schock – Allgemeines . . . . .	12
2.1.1 Definition des kardiogenen Schocks . . . . .	12
2.1.2 Epidemiologie der Akuten Koronarsyndrome und des kardiogenen Schocks . . . . .	12
2.2 Kardiogener Schock – Pathophysiologie . . . . .	13
2.2.1 Allgemeine Pathophysiologie des kardiogenen Schocks . . . . .	13
2.2.2 Damage associated molecule pattern (DAMPs) im Zusammenhang mit Ischämie und Reperfusion . . . . .	15
2.3 Allgemeines zu RAGE/sRAGE . . . . .	16
2.3.1 Vorkommen von RAGE . . . . .	18
2.3.2 Wirkungsweise von RAGE . . . . .	18
2.3.3 Die Struktur von RAGE . . . . .	18
2.3.4 Wechselwirkungen zwischen sRAGE und RAGE . . . . .	20
2.3.5 Assays zur Messung von sRAGE . . . . .	20
2.3.6 Die Bedeutung des Liganden-RAGE-Systems in speziellen Krankheitsbildern . . . . .	20
2.3.7 RAGE und sRAGE bei kardiovaskulären Erkrankungen . . . . .	21
2.4 Membran-assoziierte Proteinasen . . . . .	22
2.4.1 A disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) . . . . .	22
2.4.2 Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) . . . . .	22
2.5 Möglichkeiten der Prognoseabschätzung beim kardiogenen Schock . . . . .	23
2.5.1 Allgemeines zur Prognoseabschätzung beim kardiogenen Schock . . . . .	23
2.5.2 SAPS-II-Score . . . . .	23
2.5.3 Cardiac Power Index . . . . .	23
2.5.4 Myokardiale Nekrosemarker . . . . .	24
2.5.5 C-reaktives Protein . . . . .	24
2.5.6 Brain natriuretic peptide . . . . .	24
2.5.7 Die „klinische“ Relevanz von Biomarkern . . . . .	24
2.6 Fragestellung . . . . .	25
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>26</b>
3.1 Studienpopulation und Studiendesign . . . . .	26
3.2 Probengewinnung und Aufbereitung . . . . .	27
3.2.1 Allgemeines . . . . .	27
3.2.2 PBMC-Isolierung mittels Dichtezentrifugation . . . . .	28

3.2.3	Probengewinnung für Westernblot-Analyse . . . . .	28
3.2.4	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry . . . . .	28
3.2.5	Zell-Fraktionierung in eine Zytosol- und eine Membran-Fraktion . . . . .	29
3.3	Durchflusszytometrie . . . . .	29
3.3.1	Prinzip der Durchflusszytometrie . . . . .	29
3.3.2	Durchführung der FACS-Analyse . . . . .	30
3.3.3	Auswertung der FACS-Analysen . . . . .	31
3.4	Westernblot-Analyse . . . . .	32
3.4.1	SDS-PAGE . . . . .	32
3.4.2	Immunblotting . . . . .	32
3.4.3	Auswertung der Westernblot-Analyse . . . . .	33
3.5	Zymographie . . . . .	34
3.5.1	Prinzip der Zymographie . . . . .	34
3.5.2	Gelatine-Zymographie-Gelektrophorese . . . . .	34
3.5.3	Auswertung der Zymographie . . . . .	35
3.6	Enzym-gekoppelter Immunoassay (ELISA) . . . . .	35
3.7	Nachweis eines RAGE-Shedding-Mechanismus durch in-vitro-MMP-9-Aktivierung . . . . .	35
3.8	Statistische Auswertung . . . . .	36
3.9	Reagenzien und Materialien . . . . .	37
3.9.1	Verwendete Substanzen und Materialien . . . . .	37
3.9.2	Antikörper für Westernblot-Analyse . . . . .	39
3.9.3	Antikörper für Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS-Analyse) . . . . .	39
3.9.4	Verwendete Lösungen . . . . .	39
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> . . . . .	<b>42</b>
4.1	Klinische Daten der Studienpopulation . . . . .	42
4.2	Differentialblutbild und (inflammatorische) Laborparameter der Studienpopulation . . . . .	45
4.3	RAGE-Expression auf Monozyten im Studienkollektiv . . . . .	47
4.4	sRAGE-Level im Studienkollektiv . . . . .	47
4.5	sRAGE/RAGE-Interaktion . . . . .	49
4.5.1	sRAGE/RAGE-Verhältnis . . . . .	49
4.5.2	In-vitro-Aktivierung der MMP-9 induziert RAGE-Abspaltung auf PBMCs . . . . .	49
4.6	Prognostische Bedeutung der monozytären RAGE-Expression und der Plasma-sRAGE-Level . . . . .	50
4.6.1	sRAGE und RAGE im Verhältnis zum SAPS-II-Score . . . . .	50
4.6.2	Prognostische Relevanz der bestimmten Parameter . . . . .	50

4.6.3	RAGE und sRAGE zur Vorhersage der Wahrscheinlichkeit, am CS zu versterben . . . . .	54
4.6.4	RAGE und sRAGE als unabhängige Prädiktoren für die Vorhersage der 28-Tages-Mortalität . . . . .	54
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>
5.1	Klinische Daten der Studienpopulation . . . . .	56
5.2	RAGE/sRAGE im kardiogenem Schock . . . . .	57
5.3	RAGE und sRAGE zur Vorhersage der Wahrscheinlichkeit, am CS zu versterben . . . . .	58
5.4	Unabhängige Prädiktoren für die Mortalität im CS . . . . .	58
5.5	Die Bedeutung der sRAGE-RAGE-Interaktion für ihre Liganden und die Immunantwort . . . . .	59
5.6	Die Bedeutung von MMP-9 für das RAGE-Shedding . . . . .	60
5.7	Limitationen der Studie . . . . .	60
5.8	Ausblick . . . . .	61
<b>6</b>	<b>Eigene Publikationen</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>Danksagungen</b>	<b>72</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>73</b>

# Abbildungsverzeichnis

1	Pathophysiologie des kardiogenen Schocks . . . . .	14
2	RAGE als Multiliganden-Rezeptor hält Inflammation aufrecht, nach [82] .	17
3	RAGE-Signalkaskade, aus [76] . . . . .	19
4	Struktur des vollständigen RAGE-Moleküls und seiner löslichen Isoformen	19
5	Wirkung von RAGE auf den Organismus, aus [68] . . . . .	21
6	Interaktion einer Zelle mit dem Laserstrahl . . . . .	30
7	Repräsentative Darstellung der Messung der RAGE-Expression auf Mono- zyten mittels Durchflusszytometrie . . . . .	31
8	Blotting-Schema nach dem Sandwich-Prinzip . . . . .	32
9	Beispiel einer Ponceau-Rot-Färbung . . . . .	33
10	Beispiel eines Westernblots für sRAGE . . . . .	33
11	Positivkontrolle der Zymographie mit HT1080-Überstand . . . . .	35
12	RAGE-Expression auf CD14 <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup> -Monozyten . . . . .	47
13	sRAGE im Plasma . . . . .	48
14	Inverses Verhalten von sRAGE zu RAGE . . . . .	49
15	Aktivierung der MMP-9 in PBMCs . . . . .	51
16	Korrelation zwischen RAGE bzw. sRAGE zum SAPS-II-Score . . . . .	52
17	ROC-Kurve für die Sterblichkeit . . . . .	53
18	Kaplan-Meier-Überlebenskurve . . . . .	55

## Tabellenverzeichnis

1	Parameter zur Berechnung des SAPS-II-Score nach [28] . . . . .	27
2	Primär- und Sekundärantikörper für Westernblot-Analyse . . . . .	39
3	Antikörper für FACS-Analyse . . . . .	39
4	Klinische, kardiovaskuläre und hämodynamische Daten der Studienpopu- lation, Teil 1 . . . . .	43
5	Klinische, kardiovaskuläre und hämodynamische Daten der Studienpopu- lation, Teil 2 . . . . .	44
6	Inflammatorische und weitere Laborparameter der Studienpopulation . . .	46
7	Receiver operating characteristic curve analysis . . . . .	53
8	Unabhängige Prädiktoren für die 28-Tages-Mortalität in Patienten mit kardiogenem Schock . . . . .	55

# Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ACS	Akutes Koronarsyndrom
ADAM-10	A disintegrin and metalloproteinase-10
AGE	Advanced glycation endproduct
AMI	Akuter Myokardinfarkt/ Patient nach AMI
APMA	4-Amino-Phenyl-Quecksilberacetat
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
AU	arbitrary units
AUC	Area under the curve
ca.	circa
CRP	C-reaktives Protein
CS	kardiogener Schock/ Patient im kardiogenen Schock nach AMI
DAMP	Damage associated molecule pattern
ECL	Westernblot-Detektionsreagenz
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay/ Enzym-gekoppelter Immunoassay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FSC	forward scatter
g, mg, µg, pg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Pikogramm
GCS	Glasgow-Coma-Scale
h	Stunde(n)
HC	Healthy Control/ gesunde Kontrolle
HMGB-1	High-mobility group box 1/ Amphoterin
HT1080	humane Fibrosarkom-Zelllinie
HZV	Herzzeitvolumen
IABP	intraaortale Ballongegenpulsation
IgG	Immunglobulin G
IL-6	Interleukin-6
iNOS	induzierbare NO-Synthase
kDa	Kilodalton
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Füllungsdruck
M	Molar
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MI	Myokardinfarkt
min	Minuten(n)
mm, µm, nm	Millimeter, Mikrometer, Nanometer

MMP	Matrix-Metalloproteinase
MODS	Multiorgandysfunktionssyndrom
NSTEMI	Nicht-ST-Strecken-Elevations-Myokardinfarkt
oxLDL	oxidiertes LDL
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBMC	peripheral blood mononuclear cells/ mononukleäre Zellen aus peripheren Blut
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCI	Perkutane Koronarintervention
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PRR	Pattern recognition receptor
RAGE	Receptor for advanced glycation end products
ROC	Receiver operating characteristic curve analysis
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SAPS-II	Simplified Acute Physiology Score-II
SDS	Dodecylsulfat Na-Salz
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
sRAGE	soluble RAGE/ lösliches RAGE
SSC	side scatter
STEMI	ST-Strecken-Elevations-Myokardinfarkt
SV	Schlagvolumen
SVR	systemischer vaskulärer Widerstand
TEMED	N',N',N',N',-Tetramethyldiamin
TIMI	Thrombolysis in myocardial infarction
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrix-Metalloproteinases
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
z. B.	zum Beispiel



# 1 Zusammenfassung / Summary

Der kardiogene Schock (CS) nach akutem Myokardinfarkt (AMI) ist immer noch mit einer hohen Mortalität behaftet. Es ist inzwischen bekannt, dass eine systemische inflammatorische Reaktion (SIRS), die durch oxidativen Stress vermittelt wird, eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielt und das Outcome negativ beeinflusst. Die Aktivierung des Multiliganden-Rezeptors Receptor for advanced glycation end products (RAGE) durch seine Liganden vermittelt inflammatorische Prozesse mit konsekutiver Gewebsschädigung. In der Literatur finden sich einige Hinweise, dass die lösliche Form des Rezeptors im Plasma (soluble RAGE, sRAGE) die Liganden-vermittelten Signaltransduktionswege von RAGE verhindert, indem es diese Liganden bindet, da sRAGE die gleiche Ligandenbindungsspezifität hat wie der vollständige Rezeptor. Dieser positive Effekt zeigte sich beispielsweise in einem Tiermodell, in dem die Verabreichung von rekombinantem sRAGE die Myokardinfarktgröße verkleinerte und das Überleben nach AMI verbesserte.

Unsere Hypothese ist daher, dass die monozytäre RAGE-Expression negative Effekte und hohe im Plasma zirkulierende sRAGE-Konzentrationen hingegen positive Auswirkungen auf das Überleben im kardiogenen Schock haben könnten. Bisher gibt es jedoch keine Daten zur Rolle von RAGE und sRAGE im kardiogenen Schock.

Wir führten eine prospektive Beobachtungs-Kohortenstudie auf der internistischen Intensivstation des Universitätsklinikums des Saarlandes durch. In die Studie schlossen wir 30 Patienten im CS nach AMI, 20 altersgleiche Patienten mit unkompliziert verlaufendem AMI sowie 20 altersgleiche gesunde Probanden ein. Wir untersuchten die monozytäre RAGE-Expression mittels Durchflusszytometrie und die im Plasma zirkulierende sRAGE-Konzentration mittels Westernblotting bei Aufnahme auf die Intensivstation und stellten diese in Beziehung zu bereits etablierten Prognose-Parametern für das 28-Tage-Überleben im CS. Die monozytäre RAGE-Expression ergab einen signifikanten Anstieg in den Nicht-Überlebenden im CS ( $137.02 \pm 7.48$  mittlere Fluoreszenzintensität (MFI),  $n=13$ ) im Vergleich zu den Überlebenden im CS ( $67.80 \pm 8.33$  MFI,  $n=17$ ,  $p<0.001$ ). Im Gegensatz dazu zeigten sich in den Westernblots signifikant niedrigere Plasma-sRAGE-Level bei den Nicht-Überlebenden im CS ( $79.87 \pm 10.62$  arbitrary units (AU),  $n=13$ ,  $p=0.004$ ) im Vergleich zu den Überlebenden im CS ( $127.65 \pm 10.52$  AU,  $n=17$ ). Die monozytäre RAGE-Expression und die im Blut zirkulierende sRAGE-Konzentration wurden als Prädiktoren für die 28-Tages-Mortalität im CS ermittelt, was durch die Receiver operating characteristic (ROC) bestätigt wurde (RAGE: Area Under the Curve (AUC)= $0.943 \pm 0.05$ ,  $p<0.001$ , sRAGE: AUC= $0.815 \pm 0.08$ ,  $p<0.01$ ). Sowohl RAGE als auch sRAGE zeigten sich in der Cox-Regressionsanalyse als unabhängige Prädiktoren für die Sterblichkeit. Bei einer

monozytären RAGE-Expression  $>103.6$  MFI besteht ein 27.87-facher ( $p<0.001$ ), bei einem sRAGE-Level  $<76.88$  AU/PC besteht ein 3.97-fachen ( $p=0.019$ ) Anstieg in der 28-Tages-Mortalität im CS.

Bei unseren Patienten waren immer intraindividuell hohe monozytäre RAGE-Expressionen mit niedrigen löslichen sRAGE Plasmakonzentrationen assoziiert und umgekehrt. Wir fanden eine signifikant inverse Korrelation zwischen Plasma-sRAGE-Spiegeln und der monozytären RAGE-Expression ( $r=-0.569$ ,  $r^2=0.528$ ,  $p<0.001$ ,  $n=50$ ). Als einen möglichen Pathomechanismus konnten wir anhand von in-vitro-Untersuchungen ( $n=4$ ) einen Metalloproteinasen-induzierten „shedding“-Mechanismus nachweisen. Dabei bewirkten aktivierte Metalloproteinasen ein Abscheren der monozytären RAGE-Rezeptoren und somit einen Anstieg der zirkulierenden löslichen sRAGE-Spiegel.

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmalig die negative Bedeutung von erhöhter monozytärer RAGE-Expression und erniedrigtem zirkulierendem sRAGE-Spiegel bei Patienten im kardiogenen Schock. RAGE und sRAGE könnten eine prognostische Bedeutung als Biomarker für das Überleben im CS haben und möglicherweise neue therapeutische Ansätze im CS bieten. Dies müssen jedoch erst größere Studien beweisen.

## Summary

Cardiogenic shock (CS) is still the leading cause of death in patients with acute myocardial infarction (AMI). New evidence suggests that a systemic inflammatory response syndrome (SIRS) mediated by oxidative stress plays an important role in pathogenesis of shock and negatively influences its outcome. Activation of the multiligand-receptor Receptor for advanced glycation end products (RAGE) by its ligands promotes inflammatory processes followed by tissue injury. The available evidence suggests that soluble forms of RAGE (sRAGE) circulating within the plasma prevents RAGE-mediated signalling cascades by acting as a decoy, as it has the same ligand binding specificity as the full-length RAGE. In an animal model animals benefit from administration of recombinant sRAGE, because it reduced the myocardial infarct size and led to a better outcome after AMI.

Thus, we hypothesize that monocytic RAGE-expression might be deleterious and high concentration of circulating sRAGE in plasma might be beneficial to survival in cardiogenic shock. However, to date, no data exists concerning the role of RAGE and sRAGE in cardiogenic shock.

We carried out a prospective, observational cohort study at the intensive critical care unit of the Universitätsklinikum des Saarlandes. In our study, we enrolled 30 patients in CS following AMI, 20 age-matched patients with uncomplicated AMI and 20 age-matched

healthy volunteers. We related monocytic RAGE-expression assessed by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) and in plasma circulating sRAGE-concentration assessed by western blotting to established prognostic parameters for 28-day-survival in CS. Monocytic RAGE-expression was significantly increased in non-survivors in CS ( $137.02 \pm 7.48$  mean fluorescence intensity (MFI),  $n=13$ ) compared to survivors ( $67.80 \pm 8.33$  MFI,  $n=17$ ,  $p < 0.001$ ). Conversely, non-survivors had significantly decreased plasma sRAGE-levels ( $79.87 \pm 10.62$  arbitrary units (AU),  $n=13$ ,  $p=0.004$ ) compared to survivors in CS ( $127.65 \pm 10.52$  AU,  $n=17$ ) as assessed by western blotting. Monocytic RAGE-expression and sRAGE-concentration circulating within the bloodstream were determined as predictors for 28-day-mortality in CS, as confirmed by Receiver operating characteristic (ROC) (RAGE: Area under the curve (AUC) =  $0.943 \pm 0.05$ ,  $p < 0.001$ , sRAGE: AUC =  $0.815 \pm 0.08$ ,  $p < 0.01$ ). RAGE as well as sRAGE independently predicted mortality as shown by Cox regression analysis. The 28-day-mortality-rate in CS was 27.87-fold ( $p < 0.001$ ) higher in patients with a monocytic RAGE-expression  $> 103.6$  MFI and 3.97-fold ( $p=0.019$ ) higher in patients with a sRAGE-level  $< 76.88$  AU.

Among our patients there was an intraindividual association between a high monocytic RAGE-expression and a low soluble sRAGE-plasma-level and vice versa. There was an inverse correlation between circulating sRAGE-plasma-concentration and monocytic RAGE-expression ( $r = -0.569$ ,  $r^2 = 0.528$ ,  $p < 0.001$ ,  $n=50$ ). Through in-vitro testing we identified a matrix-metalloproteinase-induced shedding mechanism as a possible pathomechanism ( $n=4$ ). Activated matrix-metalloproteinases shed the monocytic RAGE-receptor and thus increase the circulating soluble sRAGE-level.

We are first to show the negative role of elevated monocytic RAGE-expression and decreased plasma sRAGE-levels in patients in cardiogenic shock. RAGE and sRAGE possibly play a prognostic role as biomarkers for survival in CS and might represent a novel therapeutic target in CS. Further studies are required to investigate this.

## 2 Einleitung

### 2.1 Kardiogener Schock – Allgemeines

#### 2.1.1 Definition des kardiogenen Schocks

Der kardiogene Schock (CS) ist definiert als ein kardiales Pumpversagen, in dessen Folge es zu einer zunehmenden Kreislaufzentralisation mit Hypoperfusion und unzureichender Sauerstoffversorgung lebenswichtiger Organe kommt. Die Folgen dieser Minderdurchblutung können sein: Verwirrtheit, Agitiertheit oder Somnolenz bei einer zerebralen Hypoxie; Oligurie oder Anurie bei einer renalen Hypoperfusion; gastrointestinale Symptome bei einer mesenterialen Minderdurchblutung; blasse, kühle, schweißige, marmorierte Haut und ggf. auch Zyanose bei einer peripheren Minderperfusion [46].

Neben dieser klinischen Definition lässt sich der kardiogene Schock auch über ein invasives hämodynamisches Monitoring definieren [36, 46, 73, 78]:

- ein erniedrigtes Herzzeitvolumen (Wird das Herzzeitvolumen auf die Körperoberfläche bezogen, spricht man vom Herz-Index= Cardiac Index,  $CI < 2,21/\text{min}/\text{m}^2$ .) verbunden mit
- erniedrigten system-arteriellen Blutdruckwerten (systolischer Blutdruck  $< 90$  mmHg über 30 min) oder
- einem Blutdruckabfall  $\geq 30$  mmHg vom Ausgangswert für mind. 30 min oder
- einem Anstieg des pulmonalkapillären Verschlussdruckes (pulmonary capillary wedge pressure, PCWP  $> 15$  mmHg) oder
- einem erniedrigten Cardiac Power Index (CPI  $< 0,4$  mmHg/l/min/m<sup>2</sup>), welcher sich aus dem Produkt aus Cardiac-Index und mittlerem systemarteriellen Blutdruck (MAP) errechnet (CPI= CI x mittlerer arterieller Blutdruck x 0.0022).

#### 2.1.2 Epidemiologie der Akuten Koronarsyndrome und des kardiogenen Schocks

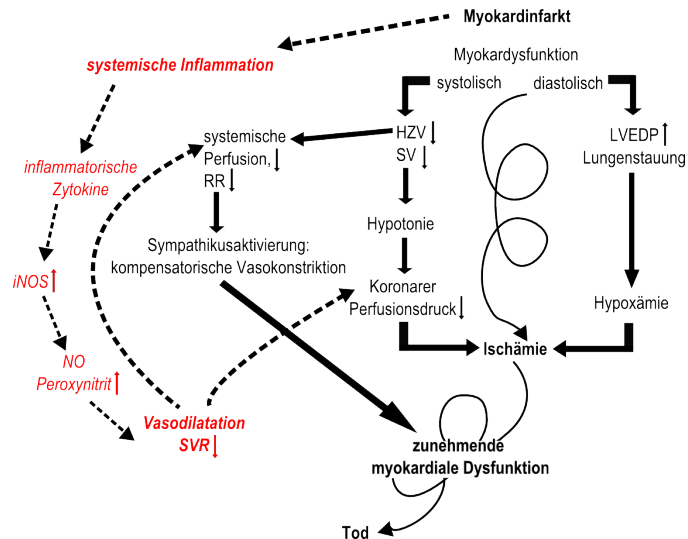
In über 70 % der Fälle ist ein herzinferktbedingter kardiogener Schock die häufigste Ursache des myokardialen Pumpversagens. [35]. Mit Hilfe einer schnellen Herzinferkttherapie – „Jede Minute zählt!“ – mit rascher Wiederherstellung einer effektiven koronaren Perfusion durch Akut-Koronarintervention, prähospitalen Fibrinolyse, Antikoagulation und kombinierter Thrombozytenaggregationshemmung konnte in den letzten Jahren die Mortalität des akuten Myokardinfarktes (AMI) auf unter 25 % gesenkt werden [84]. Kommt es im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes jedoch zu einem kardiogenen Schock, so liegt

die Sterblichkeit trotz allen interventionellen und medikamentösen Revaskularisationsverfahren unverändert hoch bei 50-70 % [36, 34, 38], wobei die Inzidenz des CS von ca. 7,5 % seit den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts bis heute auf ca. 4 % gesunken ist [32].

## 2.2 Kardiogener Schock – Pathophysiologie

### 2.2.1 Allgemeine Pathophysiologie des kardiogenen Schocks

Einem kardiogenem Schock liegt ein myokardiales Pumpversagen zugrunde, das in der Regel mit einer Abnahme der Auswurfleistung (Cardiac Index = CI) einhergeht. Dies führt zu einer Minderperfusion der peripheren Organe (Vorwärtsversagen) oder zu einer Rückstauung in das zum betroffenen Ventrikel proximal befindliche Kreislaufsystem (Rückwärtsversagen). Körper eigene akute Kompensationsmechanismen zur Blutdruckstabilisierung wie der Frank-Starling-Mechanismus, das sympathische Nervensystem und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System werden aktiviert (siehe Abb. 1, modifiziert nach [34]). Reichen diese Kompensationsmechanismen zur Kreislaufstabilisierung nicht aus, ist ein unzureichender Anstieg des Cardiac Index (CI) bei überschießender Vasokonstriktion die Folge, gegen die das insuffiziente Herz immer schwerer ankämpfen kann. Ein Circulus vitiosus entsteht. Klinisch imponieren Zeichen der Kreislaufzentralisation wie Blässe, Kaltschweißigkeit und marmoriertes Hautkolorit. Es kommt zur Minderperfusion und Hypoxie vitaler Organe, zur systemischen Inflammationsreaktion (SIRS) und schließlich zum Multiorganversagen (MOV) [34, 37, 40, 47]. Ein Patient im myokardinfarktbedingten kardiogenen Schock stirbt nicht immer am verschlossenen Infarktgefäß, sondern oft am Multiorganversagen [47].



**Abbildung 1:** Pathophysiologie des kardiogenen Schocks

Auf der rechten Seite ist der klassische Ablauf der Pathophysiologie dargestellt. Links (in Rot) befindet sich die schematische Darstellung des neuen Paradigmas: Eine systemische inflammatorische Antwort wird beispielsweise durch einen Myokardinfarkt ausgelöst, daraufhin kommt es zur NO-Bildung und Vasodilatation. Modifiziert nach [34]. HZV: Herzzeitvolumen, iNOS: induzierbare NO-Synthase, LVEDP: linksventrikulärer enddiastolischer Druck, NO: Stickoxid, RR: systemarterieller Blutdruck, SV: Schlagvolumen, SVR: systemvaskulärer Widerstand.

Neben einer neurohumoralen Aktivierung kommt es im Verlauf eines kardiogenen Schocks auch zu einer systemischen inflammatorischen Immunantwort (systemic inflammatory response syndrome, SIRS). Des Weiteren wird die angeborene und zelluläre Immunantwort aktiviert, sodass Entzündungsmediatoren (z. B. C-reaktives Protein, Heat Shock Proteine), proinflammatorische Zytokine (z. B. Interleukin (IL)-6, Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ ) oder Stickoxide (NO) durch Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) freigesetzt werden. Folglich kommt es zu einer Zellschädigung nahezu aller Organsysteme, was letztendlich in Multiorgandysfunktionen (MODS) und schließlich im Multiorganversagen (MOV) mündet [19, 30, 29, 34, 65].

Das eigentliche Schockgeschehen spielt sich im Bereich der Mikrozirkulation ab. Infolge einer direkten sympathoadrenergen Gegenregulation kommt es zu Gewebsminderperfusion, Gewebshypoxie, metabolischen Azidose und schließlich zu einer Endothelschädigung. Dies führt zu einer Freisetzung chemotaktischer und proinflammatorischer Mediatoren (PAF (Platelet-activating factor), TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1, Komplementaktivierung) [19, 30, 48, 59]. Diese aktivieren zirkulierende neutrophile Granulozyten und Monozyten. Es kommt zur Adhäsion und Transmigration ins subendotheliale Gewebe. Im Interstitium bilden neutrophile Granulozyten [49] und Makrophagen freie O<sub>2</sub>-Radikale, proinflammatorische Zytokine und Matrix-Metalloproteinasen, welche eine weitere Endothelschädigung bewirken (sog. Reperfusionsschaden [57, 83]).

Eine Immunantwort wird in der Regel durch körperfremde exogene Liganden, z.B. Bestandteile von Bakterien, ausgelöst. Neben exogenen Liganden können aber auch körpereigene endogene Liganden, welche z.B. im Rahmen von Ischämie und Reperfusion durch Gewebeuntergang freigesetzt werden, eine Immunantwort auslösen. Die exogenen Liganden werden als Pathogen associated molecular patterns (PAMPs) zusammengefasst, wohingegen die endogenen Liganden den Damage associated molecule patterns (DAMPs) zugeordnet werden [8, 53, 55, 67].

### **2.2.2 Damage associated molecule pattern (DAMPs) im Zusammenhang mit Ischämie und Reperfusion**

Im Rahmen von Ischämie und Reperfusion werden beim kardiogenen Schock konsekutiv körpereigene Liganden freigesetzt, welche zu einer Aktivierung der Immunreaktion führen. Zu diesen endogenen Liganden, DAMPs genannt, gehören unter anderem oxidiertes LDL (oxLDL), Heat Shock Proteine (HSPs), S100-Proteine, Advanced glycation endproducts (AGEs) oder High-mobility group box-1 (HMGB-1).

OxLDL spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung von Schaumzellen, der Veränderungen des NO-signaling, der Endothelzellaktivierung mit der konsekutiven Expression von Adhäsionsmolekülen sowie der Anhäufung und Aktivierung von Monozyten und T-Lymphozyten innerhalb einer atherosklerotischen Plaque [75]. Im Tiermodell konnte an oxLDL-Rezeptor-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass die Immunantwort sowie die Atherosklerose vermindert werden [56].

Zur Klasse der Heat Shock Proteine (HSPs) gehören einige Proteine, welche eine essentielle Rolle für die korrekte Faltung von Proteinen spielen. Sie können aktiv freigesetzt werden oder aus nekrotischen Zellen stammen. Zirkulierende HSPs induzieren die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen entweder direkt über Toll-like Rezeptoren oder über Antigen-präsentierende Zellen [8].

S100-Moleküle sind eine Gruppe von Calcium-bindenden Proteinen, welche intrazelluläre Wirkungen haben. Bei Inflammation werden sie sezerniert und können dann auch als Marker für die Aktivität einer Erkrankung dienen. Innerhalb dieser Molekülgruppe können u.a. S100A12 und S100B mit dem Receptor for advanced glycation end products (RAGE) interagieren. Über RAGE aktivieren sie Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen. Proinflammatorische Zytokine sowie Adhäsionsmoleküle werden freigesetzt [8, 12, 24, 67]. Die Interaktion mit RAGE fördert somit eine Inflammation [12].

Advanced glycation endproducts (AGEs) sind eine heterogene Substanzklasse, die durch nichtenzymatische Glykierung von Proteinen, Lipoproteinen und Nukleinsäuren im Rahmen der sog. Maillard-Reaktion entsteht. AGEs werden durch exogene Quellen (Rauchen, bestimmte Nahrungsmittel) [39, 71] vom Körper aufgenommen oder sie entstehen endogen – begünstigt durch ein erhöhtes Substratangebot (z.B. Diabetes mellitus) oder durch oxidativen Stress (z.B. Hypoxie, Ischämie und Reperfusion) [71]. AGEs akkumulieren in Geweben, wo sie rezeptorunabhängig oder durch Bindung an Rezeptoren wie den Receptor for advanced glycation end products (RAGE) oder die spezifischen Rezeptoren AGE-R1-R3 Alterungsprozesse und Immunreaktionen induzieren [12, 71]. Abgebaut werden AGEs durch extra- oder intrazelluläre Proteolysen und sie werden dann über die Niere ausgeschieden [71].

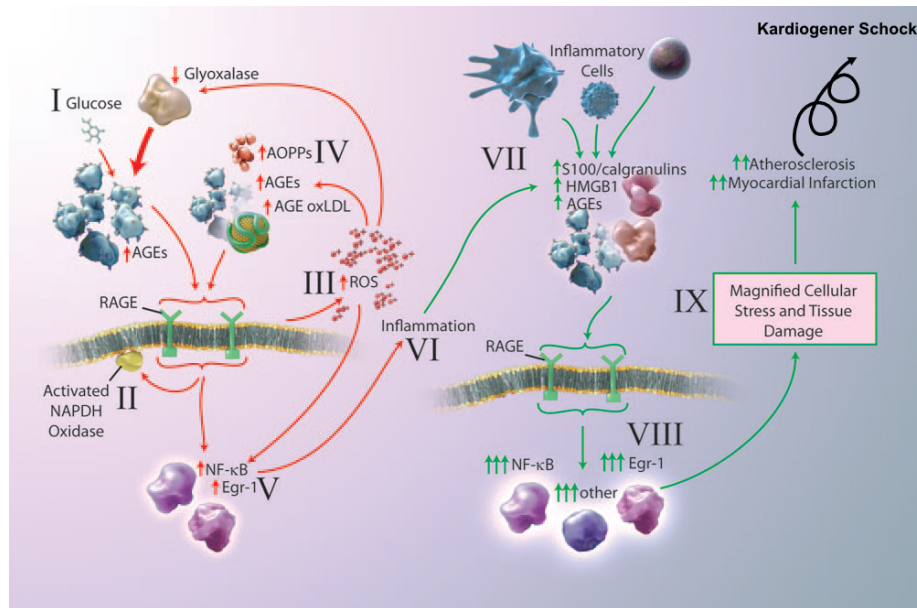
HMGB-1, früher Amphoterin genannt, wurde ursprünglich als ein nukleäres Nicht-Histon-Protein beschrieben, welches an der DNA bindet, die nukleosomale Struktur stabilisiert und die Transkription reguliert [2]. Es wird passiv von nekrotischen, jedoch nicht apoptotischen Zellen freigesetzt und dient daher als Hinweis auf einen ungeplanten Zelltod [62]. Des Weiteren wird es von aktivierten Makrophagen, reifen dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen sekretiert [12, 68]. Es begünstigt die Transmigration von Entzündungszellen und hält somit die Entzündung aufrecht. HMGB-1 ist außerdem eines der zahlreichen RAGE-Liganden [9, 60]. Mittels RAGE erhöht es die Expression von proinflammatorischen Zytokinen [60].

Diese DAMPs werden von sog. Pattern recognition receptors (PRR) erkannt und induzieren oder verstärken auf diesem Weg eine proinflammatorische Immunantwort.

## 2.3 Allgemeines zu RAGE/sRAGE

Die Bezeichnung des Receptor for advanced glycation end products (RAGE) beruht auf der erstmaligen Entdeckung, dass AGEs an RAGE binden und darüber eine Signalkaskade induzieren. Neben AGEs binden jedoch auch zahlreiche andere Liganden oder DAMPs an den Rezeptor z. B. Advanced oxidation protein products (AOPPs), bestimmte S100-Moleküle (z.B. S100A11-13, -B, etc.), extrazelluläres High-mobility group box 1 (HMGB-1),  $\beta$ 2-Integrin Mac-1, amyloid  $\beta$ -Peptide und Fibrillen, sodass RAGE auch als Multiliganden-Rezeptor angesehen wird [9, 10, 61]. Über die Signaltransduktionswege von RAGE wird die Bildung proinflammatorischer Zytokine aufrechterhalten [12], siehe auch Abb. 2.





**Abbildung 2:** RAGE als Multiliganden-Rezeptor hält Inflammation aufrecht, nach [82].  
 Zum Beispiel durch Hyperglykämie induzierte AGEs (I) aktivieren RAGE (II) und induzieren dadurch ROS (III). Diese verursachen dann eine erhöhte Produktion von weiteren DAMPs wie AOPPs, AGEs, AGE-modifiziertes oxLDL (IV), welche die RAGE-Aktivierung weiter aufrechterhalten, so dass über die RAGE-Signalkaskade (V) Inflammationsmechanismen in Gang gesetzt werden (VI). Die Aktivierung von Entzündungszellen, z. B. Monozyten (VII), bedingt die Freisetzung von proinflammatorischen RAGE-Liganden. Die RAGE-Signalkaskade wird weiter angetrieben (VIII) und verursacht zellulären Stress und Gewebeschaden (IX), was in einen Progress der Atherosklerose münden kann. AGE: Advanced glycation endproduct, AOPP: Advanced oxidation protein product, DAMP: Damage associated molecule pattern, Egr-1: Early growth response protein 1, HMGB-1: High-mobility group box 1, NF-κB: Nuclear factor-κB, RAGE: Receptor for advanced glycation end products, ROS: reaktive Sauerstoffspezies, oxLDL: oxidiertes LDL.

### 2.3.1 Vorkommen von RAGE

RAGE wird physiologisch auf der Oberfläche einer Vielzahl von Immunzellen (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten), aber auch auf Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert [4, 61]. Die RAGE-Expression kann auf Zellen, welche normalerweise auf niedrigem Niveau RAGE exprimieren, durch inflammatorische Mediatoren und Liganden induziert werden [12, 68]. Myeloide Zellen und Endothelzellen sind an der Initiierung und dem Fortschreiten systemischer Entzündungsreaktionen beteiligt. Welche Rolle dabei dem Liganden-RAGE-System zukommt, ist weitgehend unklar. Die Liganden-RAGE-Interaktion hat eine große Bedeutung in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen (siehe Abb. 2, S. 17 und Abb. 5, S. 21) wie Atherosklerose, Diabetes mellitus, Autoimmunerkrankungen, neurodegenerative Erkrankungen und Tumorwachstum sowie für allgemeine Alterungsprozesse [20, 31, 61, 70, 77].

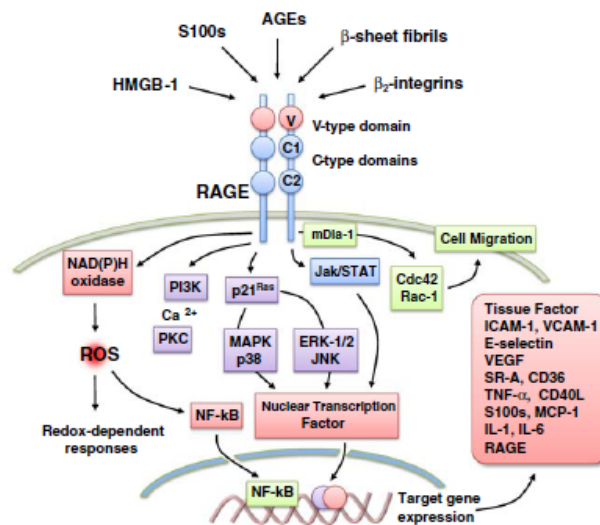
### 2.3.2 Wirkungsweise von RAGE

Die Liganden-RAGE-Interaktion führt schließlich über eine Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin), Chemokinen (MCP-1, Tissue factor, VEGF, S100-Proteinen) und proinflammatorischen Zytokinen (wie IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) [4, 76]. Dies ist schematisch in Abb. 3 dargestellt. Diese RAGE-vermittelten Signalkaskaden sind verantwortlich für die Entstehung von oxidativen Stressreaktionen und für akute sowie chronische Entzündungsreaktionen [16, 68, 81].

### 2.3.3 Die Struktur von RAGE

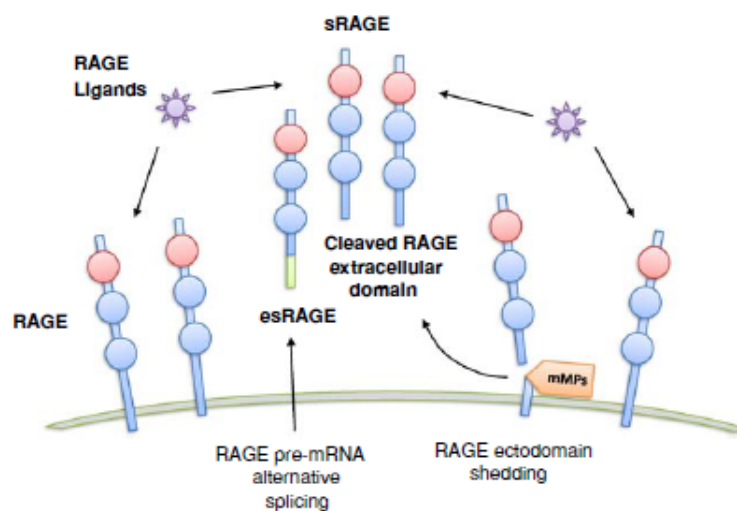
Der vollständige Receptor for advanced glycation end products (RAGE) ist ein 55-kDa Protein [25, 87]. Seine extrazelluläre Region setzt sich aus einer V-Typ (variabel) Immunglobulindomäne und daran anhängend zwei C-Typ (konstant) Immunglobulindomänen zusammen. Ferner hängt daran eine kurze hydrophobe transmembranäre Domäne, an die eine kurze zytoplasmatische Domäne folgt, welche essentiell für die RAGE-vermittelte Signaltransduktion ist [4].

Interessanterweise gibt es neben zellgebundenem RAGE im Plasma zirkulierendes lösliches RAGE (siehe Abb. 4). Zum löslichen RAGE zählt man zwei Formen: Das soluble RAGE (sRAGE) wird extrazellulär enzymatisch durch Proteinasen abgespalten, daher nennt man es auch cleaved RAGE (cRAGE). Folgende Proteinase wurden hierfür als verantwortlich identifiziert: A disintegrin and metalloproteinase (ADAM)-10 und Matrix-Metalloproteinase (MMP)-9 [62, 87]. Dieses RAGE-Shedding wird durch das Andocken



**Abbildung 3:** RAGE-Signalkaskade, aus [76]

AGE: Advanced glycation endproduct, ERK: Extracellular regulated kinase, HMGB-1: High-mobility group box 1, ICAM-1: Intercellular adhesion molecule 1, IL: Interleukin, JNK: c-Jun N-terminal kinase, MAPK: Mitogen activated protein kinase, MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1, mDia-1: mammalian Diaphanous-1, NAD(P)H: Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat), NF- $\kappa$ B: Nuclear factor- $\kappa$ B, PI3K: Phosphoinositol 3-kinase, PKC: Protein kinase C, RAGE: Receptor for advanced glycation end products, ROS: reaktive Sauerstoffspezies, SR: scavenger receptor, TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$ , VCAM-1: Vascular cell adhesion protein 1, VEGF: Vascular endothelial growth factor.



**Abbildung 4:** Struktur des vollständigen RAGE-Moleküls und seiner löslichen Isoformen, aus [76]

von HMGB-1 oder durch Zugabe von Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) gefördert [62, 87]. Ein weiterer Anteil an soluble RAGE wird endogen gebildet und sezerniert; man spricht vom endogenous secretory RAGE (esRAGE). Es entsteht durch alternatives Spleißen der mRNA. Zu den gesamten löslichen RAGE-Isoformen trägt esRAGE nur zu einem kleinen Teil bei [62, 80].

#### **2.3.4 Wechselwirkungen zwischen sRAGE und RAGE**

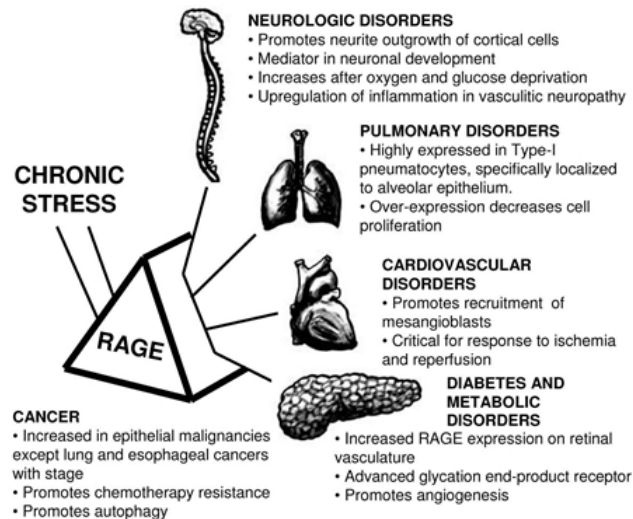
Die biologische Bedeutung von sRAGE besteht in der kompetitiven Hemmung von RAGE durch Bindung frei zirkulierender Liganden [62], da die löslichen Isoformen ähnliche Ligandenbindungsspezifität haben [62]. Somit moduliert sRAGE die Liganden-RAGE-vermittelte proinflammatorische Immunantwort. In mehreren präklinischen Modellen konnten durch die Gabe von rekombinantem sRAGE die proinflammatorischen RAGE-Signaltransduktionseffekte reduziert werden, beispielsweise bei diabetischer und nicht-diabetischer Atherosklerose, Ischämie- und Reperfusionsschäden, Arthritiden und Sepsis [1, 13, 45, 76].

#### **2.3.5 Assays zur Messung von sRAGE**

Viele Enzym-gekoppelte Immunoassays (ELISA) differenzieren nicht zwischen endogenem esRAGE und abgespaltenem sRAGE. Die meisten Publikationen zu löslichem RAGE unterscheiden daher nicht zwischen den verschiedenen Isoformen [80]. esRAGE und sRAGE scheinen aber nicht gleichwertig als Biomarker zu sein [80]. Die esRAGE-Plasmaspiegel sind in etwa 2-5mal niedriger als die heterogene Gruppe an sRAGE-Spiegel [62, 80]. Zhang et al. verwendeten die Westernblot-Technik, um esRAGE und sRAGE in human embryonic kidney (HEK)-Zellen nachzuweisen, die esRAGE bzw. den vollständigen Rezeptor exprimieren [87]. sRAGE konnte er von den RAGE-exprimierenden HEK-Zellen durch MMP-Aktivierung gewinnen. Dabei wies FL-RAGE (Full-length RAGE) 55 kDa, sRAGE 48 kDa und esRAGE 51 kDa auf. Forbes et al. fanden auch eine Bande für den vollständigen RAGE-Rezeptor um die 55 kDa und sRAGE um die 50 kDa [25].

#### **2.3.6 Die Bedeutung des Liganden-RAGE-Systems in speziellen Krankheitsbildern**

Das Liganden-RAGE-System spielt eine wichtige Rolle bei verschiedensten Krankheitsbildern wie bei Multipler Sklerose, Krebsentstehung, Diabetes mellitus, Atherosklerose, essentielle Hypertonie, Schizophrenie und M. Alzheimer (siehe Abb. 5) [20, 31, 61, 70, 77].



**Abbildung 5:** Wirkung von RAGE auf den Organismus, aus [68]

### 2.3.7 RAGE und sRAGE bei kardiovaskulären Erkrankungen

RAGE wird auf allen Zellen, die an der Plaquebildung beteiligt sind, exprimiert (Endothelzellen, glatte Gefäßmuskelzellen, Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten). Dort befinden sich zahlreiche RAGE-Liganden wie AGEs, S100/Calgranuline und HMGB-1 [4]. RAGE(-/-)-Mäuse haben im Vergleich zu Wildtypmäusen deutlich kleinere Herzinfarkte [1].

Die Plasmalevel von sRAGE sind bei Patienten mit Diabetes mellitus, Hypertension und metabolischem Syndrom im Vergleich zu Gesunden erniedrigt [6, 31, 42]. Beispielsweise haben Patienten mit Aortenklappenstenose, die durch atherosklerotische Mechanismen entsteht, niedrigere Plasma-sRAGE-Level im Vergleich zu gesunden Kontrollen [5]. Ferner konnte eine Verminderung von atherosklerotischen Plaques durch die Blockade von RAGE durch sRAGE belegt werden [14]. Die Gabe von sRAGE im Mausmodell verminderte die Expression von vaskulären Adhäsionsmolekülen, prothrombotischen Faktoren und MMP-9 [14, 77]. Auch beim Myokardinfarkt wirkt sRAGE protektiv. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Gabe von sRAGE das Myokard von Mäusen mit Myokardinfarkt vor einem ischämischen Schaden schützt [1, 13]. Man fand eine inverse Korrelation zwischen sRAGE und Troponin I [7, 54]. Daher kann man vermuten, dass sRAGE eine protektive Funktion und RAGE eher negative Effekte im Akuten Koronarsyndrom hat. Es gibt jedoch bisher keine Daten zur RAGE/sRAGE im kardiogenen Schock.

## 2.4 Membran-assoziierte Proteinasen

Die Abspaltung von sRAGE von RAGE erfolgt durch membranständige Proteinasen wie A disintegrin and metalloproteinase (ADAM)-10 und Matrix-Metalloproteinase (MMP)-9 [62, 87].

### 2.4.1 A disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10)

Die Gruppe der ADAMs spaltet einige Proteine ab, wobei die ADAM-10 und ADAM-17/TACE die meisten Oberflächenproteine abtrennen. Dabei wiesen Raucci et al. nach, dass die ADAM-10 die wichtigste Proteinase („Sheddase“) ist [62]. Sie konnten außerdem nachweisen, dass die Bindung von HMGB-1 und die Zugabe von PMA (durch die Aktivierung der Proteinkinase C) das RAGE-Shedding fördern und vermehrt sRAGE entsteht. Nach der Zugabe von ADAM-10-Inhibitoren war mehr RAGE auf PBMCs nachweisbar.

### 2.4.2 Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9)

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) gehören zur Familie der Zink-abhängigen Endopeptidasen, die spezifische Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) abbauen. Fast alle MMPs werden als pre-pro-Enzym synthetisiert. Die aktive Form der MMPs lässt sich von der latenten Form mittels Zymographie durch die elektrophoretische Auftrennung unterscheiden [43]. Die MMPs spielen eine wichtige Rolle in zahlreichen physiologischen Prozessen wie Gewebeumbau, Knochenresorption, Wundheilung etc. Für die Balance von Ab- und Aufbau der ECM sorgen Gewebe-Inhibitoren der MMPs/tissue inhibitors of MMPs (TIMPs), die massive ECM-Degradierung verhindern. Es gibt viele verschiedene MMPs, welche nach ihrem (teilweise spezifischen) Hauptsubstrat aus der ECM benannt werden [69].

Wie auch fast alle anderen MMPs wird die Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) – auch Gelatinase B oder 92-kDa type collagenase genannt – als pre-pro-Enzym synthetisiert. Die Aktivierung des latenten Enzyms durch die Abspaltung der Pro-Domäne erfolgt mit Hilfe von aktiven MMPs, Plasmin oder anderen Proteasen [41]. Die MMP-9 spielt eine Rolle bei der Stammzellmobilisierung, der Regulation der Leukozytose, der Leukozytenmigration, der Angiogenese [41] sowie dem Abbau von Kollagen-Typ I, IV, V, VII, X und XIV [15, 41]. Diese Kollagene finden sich zu einem großen Teil in atherosklerotischen Läsionen. In menschlichen atherosklerotischen Plaques wird die MMP-9 v. a. von Makrophagen und glatten Muskelzellen ausgeschüttet [41]. Bei Patienten mit ACS konnten mittels ELISA

erhöhte MMP-9-Spiegel nachgewiesen werden [22, 26, 27, 72]. Der MMP-9-Spiegel steigt innerhalb 8 h nach Myokardschaden an und bleibt bis zu 60 h danach erhöht [69].

Interessanterweise konnte an Human Embryonic Kidney cells (HEK)-Zellen gezeigt werden, dass durch die aktive MMP-9 eine lösliche 48 kDa-sRAGE-Isoform freigesetzt wird [87]. In einer in-vitro Studie konnten Zhang et al. nachweisen, dass AGEs und S100b, welche RAGE-Liganden sind, die MMP-9-Aktivität in Makophagen induzieren [86, 85]. Die Gabe von sRAGE reduziert im Mausmodell die MMP-9-Aktivität [14].

## **2.5 Möglichkeiten der Prognoseabschätzung beim kardiogenen Schock**

### **2.5.1 Allgemeines zur Prognoseabschätzung beim kardiogenen Schock**

Eine Prognoseabschätzung bei Patienten im kardiogenen Schock ist wichtig. In den Publikationen wird zwischen kurz- und längerfristigem Überleben unterschieden. Es ist bekannt, dass die meisten Patienten innerhalb der ersten 48 h versterben [34, 65]. Jedoch ist es üblich, die 30-Tages-Mortalität als Definition des kurzzeitigen Überlebens zu verwenden [32, 52].

### **2.5.2 SAPS-II-Score**

1993 präsentierte Le Gall den „Simplified Acute Physiology Score“ (SAPS-II), der auf der Grundlage von physiologischen Daten eine bessere und einfachere Einschätzung der Erkrankungsschwere und des Letalitätsrisikos von Intensivpatienten bietet. In diesem Score werden diejenigen Werte einer Punktebewertung einbezogen (siehe Tab. 1, S. 27), die innerhalb der ersten 24 h nach Aufnahme auf die Intensivstation am weitesten von der Norm abweichen. Außerdem werden chronische Vorerkrankungen, der Einweisungsgrund und der neurologische Status (mittels Glasgow-Coma-Scale, GCS) bewertet und berücksichtigt. Der SAPS-II-Score ist geeignet, Patienten mit ACS zu beurteilen [66], und wird auch bei Patienten im kardiogenen Schock verwendet [74].

### **2.5.3 Cardiac Power Index**

Der Herzindex ( $CI = \text{Herzzeitvolumen [HZV]} / \text{Körperoberfläche [KÖF]}$ ) ist ein häufig bestimmter Parameter. Der CI ist dabei nicht nur ein Hinweis auf die Herzkontraktilität, welche durch den Infarkt beeinträchtigt wird, sondern er ist auch beeinflusst durch die Gefäßsteifheit und den Gefäßwiderstand sowie das vaskuläre Füllungsvolumen und die

ventrikulären Füllungsdrücke. Der Cardiac Power Index (CPI= Cardiac Index x mittlerer arterieller Blutdruck x 0,0022) berücksichtigt, dass die Organdurchblutung sowohl vom Blutfluss (HZV) als auch vom Perfusionsdruck (mittlerer systemarterieller Blutdruck) abhängig ist. Der CPI ist ein unabhängiger Prädiktor für die Prognose eines Patienten im kardiogenen Schock [23, 78]. Je niedriger der CPI, desto höher die Sterblichkeit [18, 23].

#### **2.5.4 Myokardiale Nekrosemarker**

Der klassische Nekrosemarker CK-MB (creatine kinase-myokardial band) und das noch sensitivere Troponin T und Troponin I werden zur Risikostratifizierung bei Patienten mit ACS verwendet [48]. Das high-sensitiv Troponin kann innerhalb der ersten 3 h nachgewiesen werden [63]. Die myokardiale CK-MB als nicht myokardspezifisches Enzym ist nach 4-6 h nachweisbar. Die CK/CK-MB Messungen dienen zur Beurteilung der Infarktgröße und eines Reinfarktes [63].

#### **2.5.5 C-reaktives Protein**

Debrunner et al. wiesen signifikant erhöhte CRP (C-reaktives Protein)-Werte bei kardiogenen Schock-Patienten mit SIRS im Vergleich zu Patienten mit unkomplizierten Myokardinfarkt nach [19]. Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem CRP-Wert und dem Myokardinfarkttrisiko sowie eine Korrelation mit der Infarktgröße. Obwohl sich das CRP als stärkster unabhängiger Prädiktor für zukünftiges kardiovaskuläre Risiko zeigte [48], ist der CRP-Wert kein unabhängiger Prädiktor im kardiogenem Schock.

#### **2.5.6 Brain natriuretic peptide**

Als Marker für die Herzinsuffizienz wird das Prohormon des Brain natriuretic peptide (pro-BNP) verwendet [63]. Jedoch ist die Wertigkeit beim kritisch Kranken auf Grund des Multiorgandysfunktionssyndroms eingeschränkt, da eine reduzierte Nierenfunktion die pro-BNP-Werte bei unveränderter hämodynamischer Situation erhöht [63].

#### **2.5.7 Die „klinische“ Relevanz von Biomarkern**

Gemäß der Definition des National Institutes of Health (NIH) müssen Biomarker objektiv messbar und ihre Funktion als Indikator von physiologischen oder pathologischen Prozessen sowie ihre Veränderung unter therapeutischer Intervention evaluierbar sein. Biomarker helfen sowohl bei der Diagnosestellung als auch bei der Einschätzung des Schweregrades sowie der Prognoseabschätzung einer Erkrankung.



## 2.6 Fragestellung

Wenn sich auf dem Boden eines akuten Herzinfarktes ein kardiogener Schock entwickelt, ist die Prognose des betroffenen Patienten sehr ernst. Trotz einer kausalen Behandlung der Ursache – nämlich der Wiederherstellung der Koronarperfusion, was meist auch zu einer Verbesserung der myokardialen Pumpfunktion führt – ist es häufig nicht möglich, ein Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS) und den fatalen Verlauf des Schocks zu verhindern. Eine zunehmende Anzahl von klinischen und experimentellen Studien deutet darauf hin, dass die Entwicklung eines systemischen Inflammation-Response-Syndroms (SIRS) eine Schlüsselrolle im Krankheitsprozess des kardiogenen Schocks spielt.

Hypoxie, Ischämie und Reperfusion führen zu einer Freisetzung von zahlreichen chemotaktischen und proinflammatorischen Mediatoren. Viele dieser sog. Damage associated molecular pattern (DAMP) können den Receptor for advanced glycation end products (RAGE) aktivieren und auf diesem Weg eine proinflammatorische Immunantwort auslösen. Die Liganden-RAGE-Interaktion hat eine große Bedeutung in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen wie Atherosklerose, Diabetes mellitus und Autoimmunerkrankungen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das Liganden-RAGE-System entsprechend des Schweregrades eines ACS – unkomplizierter akuter Myokardinfarkt vs. Überlebende im kardiogenen Schock vs. Nicht-Überlebende im kardiogenen Schock – erstmalig näher zu charakterisieren. Folgende Fragen sollen mit dieser Arbeit im Einzelnen beantwortet werden:

- Verändern sich die Expressionsdichte der monozytären RAGE-Expression und die sRAGE-Plasmakonzentration in Abhängigkeit des Schweregrades eines ACS?
- Welche Bedeutung hat das Wechselspiel zwischen löslichem sRAGE und membran-gebundenem RAGE für die Immunantwort?
- Haben die monozytäre RAGE-Expression und die zirkulierende Plasma-sRAGE-Spiegel eine prognostische Relevanz für das Überleben eines Patienten im kardiogenen Schock?
- Sind RAGE und sRAGE unabhängige Prädiktoren für das Überleben im kardiogenen Schock?
- Lässt sich ein in-vitro-Modell für eine Interaktion zwischen monozytärer RAGE-Expression und zirkulierendem sRAGE etablieren?
- Welche mögliche Bedeutung könnte unsere Studie für die Zukunft haben?

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Studienpopulation und Studiendesign

Die vorliegende Studie wurde als klinische prospektive, nicht-interventionelle Beobachtungsstudie mit Zustimmung der Ethikkommission der Universität des Saarlandes und nach den Regeln der Deklaration von Helsinki und Good Clinical Practice durchgeführt [64]. Eingeschlossen wurden 30 Patienten im kardiogenen Schock (CS) nach akutem Myokardinfarkt und 20 Patienten mit unkompliziertem akutem Myokardinfarkt (AMI). 20 gesunde Probanden (HC), die als Vergleichskollektiv altersgleichverteilt waren, wurden zusätzlich untersucht.

Der akute Myokardinfarkt wurde anhand folgender Parameter diagnostiziert: Brustschmerz über 30 min, neu auftretende ST-Hebungen in mindestens zwei anatomisch benachbarten Ableitungen (mind. 0,1 mV in den Extremitätenableitungen, mind. 0,2 mV in den Brustwandableitungen) oder ein Anstieg der myokardialen Nekrosemarker (Kreatinkinase, Troponin T) [44, 79].

Der kardiogene Schock ist gekennzeichnet durch eine reduzierte kardiale Auswurfleistung mit konsekutiver Verminderung der Endorganperfusion. Die Hypoperfusion manifestiert sich klinisch mit kalten Extremitäten auf Grund der Zentralisierung, Oligurie oder Verwirrtheit. Er lässt sich wie folgt über ein invasives hämodynamisches Monitoring definieren: als wichtigsten Parameter (aber nicht obligatorisch) die Abnahme des systolischen Blutdrucks  $< 90$  mmHg ohne Hypovolämie als Ursache oder der Einsatz von Vasopressoren um einen systolischen Blutdruck  $\geq 90$  mmHg aufrechtzuhalten; des Weiteren ein verminderter Herzindex (CI)  $< 1,81$  /min/m<sup>2</sup> und erhöhte linksventrikuläre Füllungsdrücke oder ein erhöhter pulmonalkapillärer Verschlussdruckes (pulmonary capillary wedge pressure [PCWP])  $> 18$  mmHg [36, 73].

Er lässt sich wie folgt über ein invasives hämodynamisches Monitoring definieren: der wichtigste Parameter (aber nicht obligatorisch) ist die Abnahme des systolischen Blutdrucks  $< 90$  mmHg ohne Hypovolämie als Ursache oder der Einsatz von Vasopressoren um einen systolischen Blutdruck  $\geq 90$  mmHg aufrechtzuhalten; des Weiteren ein verminderter Herzindex (CI)  $< 1,81$  /min/m<sup>2</sup> und erhöhte linksventrikuläre Füllungsdrücke oder ein erhöhter pulmonalkapillärer Verschlussdruckes (pulmonary capillary wedge pressure [PCWP])  $> 18$  mmHg [36, 73].

Bei allen Patienten wurde auf Grund des akuten Koronarsyndroms ohne/ mit kardiogenem Schock direkt eine Akut-Koronarangiographie mit Intervention des Infarktgefäßes durch-

geführt. Nach Wiedereröffnung der infarktbedingten Koronarie und Erreichen eines TIMI-III-Blutflusses [33] wurden alle Patienten für die Studie evaluiert und bei Einverständnis sofort in die Studie eingeschlossen.

Ausgeschlossen wurden folgenden Patienten: Z. n. kardiopulmonaler Reanimation, Bluttransfusion, Kollagenerkrankung, fortgeschrittene Lebererkrankung, maligne Erkrankung, unklares Fieber, vermutete Infektionen oder Patienten, bei denen das Infarktgefäß nicht oder nicht ausreichend wiedereröffnet werden konnte (TIMI-0-II-Fluss) oder bei denen angiographisch kein Korrelat gesehen wurde.

Bei allen Patienten wurde der Schweregrad der Erkrankung anhand des üblicherweise verwendeten SAPS-II-Score evaluiert [28] (siehe Tab. 1).

<b>Variable</b>	<b>Punkte</b>
Alter	0 – 18
Herzfrequenz	0 – 11
Systolischer Blutdruck	0 – 13
Körpertemperatur	0 – 3
Verhältnis $paO_2/FiO_2$ -Ratio bei Beatmung	6 – 11
Urinvolumen/Tag	0 – 11
Serumharnstoffwert	0 – 10
Leukozytenwert im Blut	0 – 12
Serumkaliumwert	0 – 3
Serumnatriumwert	0 – 5
Serumbicarbonatwert	0 – 6
Serumbilirubinwert	0 – 9
Definierte chronische Erkrankung	9 – 17
Elektive oder notfallmäßige Aufnahme	0 – 8
Glasgow-Coma-Scale	0 – 26

**Tabelle 1:** Parameter zur Berechnung des SAPS-II-Score nach [28]

## 3.2 Probengewinnung und Aufbereitung

### 3.2.1 Allgemeines

Die Blutproben wurden, direkt nachdem durch PCI ein TIMI-III-Fluss wiederhergestellt worden war, durch eine liegende arterielle Kanüle auf der internistischen Intensivstation des Universitätsklinikums des Saarlandes gewonnen und umgehend entsprechend den nachfolgenden Protokollen verarbeitet. Die Blutentnahme umfasste:

- 10 ml EDTA-Blut zur Bestimmung eines Differentialblutbildes, zur Proteinbestimmung nach Lowry, für die Westernblots für sRAGE und Proteinbestimmung mittels ELISA
- 40 ml Citrat-Blut zur Isolation von PBMCs mittels Ficoll-Dichtegradient
- 10 ml Lithium-Heparin-Blut zur Bestimmung der klinisch-chemischen Routine-Laborparameter (C-reaktives Protein (CRP), Troponin T, Kreatininkinase (CK) und myokardiale Kreatininkinase (CK-MB), Glutamat-Oxal-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), Laktatdehydrogenase, Kreatinin, Harnstoff und Elektrolyte).

### 3.2.2 PBMC-Isolierung mittels Dichtezentrifugation

Die Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMC, peripheral blood mononuclear cells) erfolgte aus Citrat-Blut mittels Dichtezentrifugation (2000 rpm, 20 min) über einen Ficollgradienten unter sterilen Bedingungen. Die PBMCs aus der Interphase wurden dann in ein neues Röhrchen überführt und durch mehrere Waschstschritte vom Ficoll entfernt. Dann wurden die PBMCs mit frisch angesetzttem Einfriermedium (RPMI-1640 Medium, fetales Kälberserum (FKS-10 %), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml)) und DMSO (im Verhältnis 9:1) resuspendiert, in ein Cryo-Vial überführt und für 24 h bei -80 °C in einem Freezing Container eingefroren, um dann bis zur Durchführung der FACS-Analyse in Stickstoff aufbewahrt werden zu können.

### 3.2.3 Probengewinnung für Westernblot-Analyse

EDTA-Serum (9 ml) der Patienten und der gesunden Kontrollgruppe wurden bei 4 °C für 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert (Megafuge 1.0R Heraeus, Roth, Karlsruhe). Der Überstand wurde abpipettiert und bei -20 °C aufbewahrt. Für die Immunblotting-Elektrophorese wurde eine 1:50-Verdünnung (Plasma) der Proben verwendet.

### 3.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Die Proteinbestimmung der Proben erfolgte mit Hilfe der kolorimetrischen Methode nach Lowry et al. [50]. Im ersten Schritt bildet sich ein Kupfer-Protein-Komplex in alkalischer Lösung, der dann ein zugegebenes Phosphomolybdat-Phosphowolfram-Reagens (Folin-Ciocalteu's-Phenol-Reagens) reduziert. Durch diesen Vorgang färbt sich die Lösung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration intensiv blau. Diese Blaufärbung wird zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration benutzt, indem die Extinktion des bei der Reaktion mit dem Folin-Reagenz entstehenden blauen Farbstoffs ermittelt wird.

Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen-Gesetzes kann die Konzentration errechnet werden. Die Messung erfolgte mittels des „detergent compatible kit“ (DC protein assay, Bio-Rad, München). 40 µl Ampuwa dienten als Blank, zu 38 µl Ampuwa wurden 2 µl Probe hinzugegeben (1:20-Verdünnung). Anschließend wurden sowohl die Proben als auch der Blank mit 100 µl A-Lösung versetzt. Nach Zugabe von 800 µl B-Lösung und 15 min Inkubation bei RT wurde die Absorption der Lösung bei 750 nm photometrisch gemessen (Eppendorf-Biophotometer). Die Proteinbestimmung erfolgte pro Patient bzw. Kontrolle als Dreifachbestimmung, aus der der Mittelwert errechnet wurde.

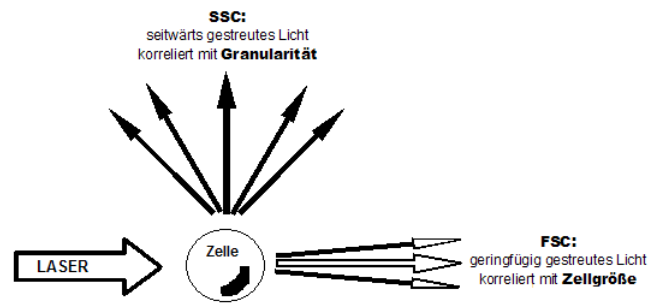
### **3.2.5 Zell-Fraktionierung in eine Zytosol- und eine Membran-Fraktion**

Die Zellen wurden mit eiskaltem 1x PBS (pH 7,4) gewaschen, zentrifugiert (1652 rpm, 5 min, 4 °C) und das Zellpellet in hypotonem Puffer mit Protease-Inhibitoren (PMSF, Aprotinin und Leupeptin) für 15 min bei 4 °C resuspendiert. Anschließend an eine weitere Zentrifugation (1652 rpm, 15 min, 4 °C) erfolgte die Auftrennung in eine „Zytosol“- (Überstand) und eine „Membran“-Fraktion (Pellet) durch Ultrazentrifugation (Ultrazentrifuge L7-65, Beckman Coulter) des Überstandes (29613 rpm, 1 h, 4 °C). Die Membran-Fraktion wurde dann in 100 µl hypotonem Puffer resuspendiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels kolorimetrischer Methode nach Lowry bestimmt [50], wie in Kapitel 3.2.4, S. 28 beschrieben. Dabei diente bovines Serum-Albumin (BSA) als Standard. Mittels Westernblot-Analyse wurde die Membran-Fraktion auf RAGE, der Zellkulturüberstand auf sRAGE untersucht.

## **3.3 Durchflusszytometrie**

### **3.3.1 Prinzip der Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie, auch fluoreszenz-aktivierte Zellanalyse (FACS-Analyse) genannt, ermöglicht die semiquantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Molekülen mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper. Das Grundprinzip ist dabei die Messung von abstrahlendem Licht und spezifischer Fluoreszenzen großer Zellzahlen in kurzer Zeit. Zur Zellsuspension werden verschiedene mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Antikörper hinzugegeben. Bei der Messung werden u. a. Signale durch Lichtstreuung detektiert: Der „forward scatter“ (FSC) erfasst das Licht, das durch die Zellen hindurchstrahlt, und korreliert mit der Zellgröße. Durch Detektion der seitlichen Streuung im „side scatter“ (SSC) wird die Granularität bestimmt (siehe Abb. 6 und 7A).



**Abbildung 6:** Interaktion einer Zelle mit dem Laserstrahl

Die Fluorochrom-konjugierten Antikörper korrelieren dabei mit der Expressionsdichte der jeweiligen Antigene auf der Zelloberfläche u./o. der intrazellulären Moleküle (siehe Abb. 7B und C, S. 31).

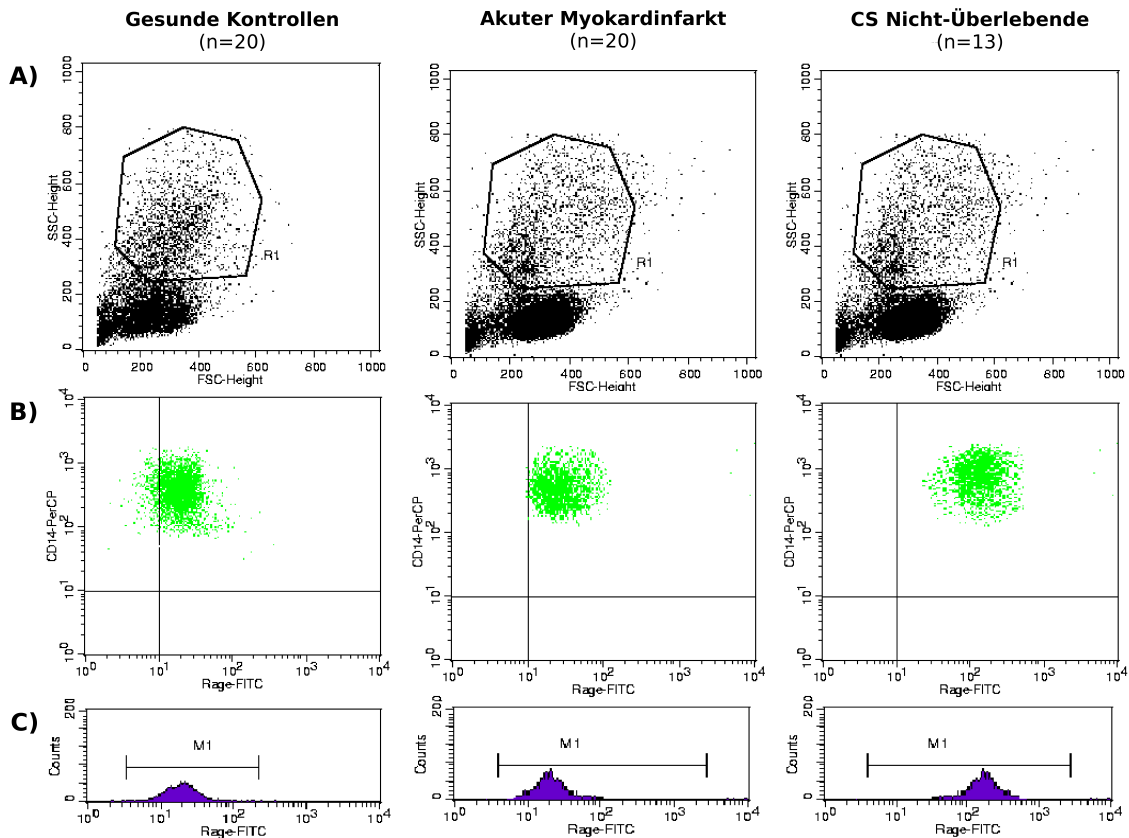
### 3.3.2 Durchführung der FACS-Analyse

Als Negativkontrolle (sog. Isotypenkontrolle) wurde eine Probe mit isotypischen Antikörpern mitgetestet, um antigenunspezifische Bindungen des Antikörpers zu detektieren. Alle Antikörper wurden in zuvor getesteten Sättigungskonzentrationen eingesetzt. Die Messungen der Proben und deren Auswertung erfolgte mit Hilfe des Durchflusszytometers (FACS Calibur, CellQuest Pro-Software, Becton Dickinson, Heidelberg). In der Regel wurde auf 10.000 Ereignisse quantifiziert. Dabei ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ein Maß für die Menge an gebundenem Fluoreszenzfarbstoff pro Partikel und korreliert mit der Expressionsdichte des gemessenen Antigens auf der Zelloberfläche (hier RAGE). Die daraus entstehenden Daten wurden mit Hilfe eines Computers berechnet und als Punkteschema oder eindimensionales Histogramm dargestellt (siehe Abb. 7, S. 31). Davon ließen sich die unterschiedlichen Zellpopulationen ablesen und mittels der spezifischen fluoreszierenden Antikörper auf den Zellen genauer zuordnen und quantifizieren.

Nach Auftauen der in Stickstoff eingefrorenen Proben wurden die Zellen durch Zentrifugation (1300 rpm, 10 min) isoliert, dann mit 10 ml kaltem FACS-Puffer resuspendiert. Nachfolgend wurde eine Zellzählung mit Trypan-Blau in einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt, welche die vitalen Zellen färbt. Von der Suspension wurden je 100 µl pro FACS-Röhrchen pipettiert. Wenn die Zellzahl unter  $1-2 \times 10^7$  Zellen/ml lag, wurde die doppelte Menge genommen.

Für die Oberflächenfärbung benötigt man je ein FACS-Röhrchen für die Isotypenkontrolle und eine für die Monozyten-Identifizierung (anti-CD14<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>). Während der Färbung wurden die Proben möglichst dunkel gehalten, um photochemische Inaktivierung der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden. 0,025 µl Primärantikörper (anti-RAGE) wurde zusammen mit Zellantikörpern für 45 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Für Monozyten

sind diese 2,5 µl CD14-PE-Cy5 und 2,5 µl CD86-PE. Anschließend an die Inkubation wurde dreimal mit 2 ml kaltem Cell-Wash gewaschen und jeweils 10 min bei 1300 rpm zentrifugiert, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Dann konnte 5 µl FITC-gelabelter Sekundärantikörper für RAGE zugegeben werden. Nach einer Inkubationszeit von 45 min bei RT im Dunkeln und erneutem Waschen wurde das Zellpellet in 1 ml FACS-Puffer aufgelöst und direkt gemessen. Die Daten werden als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) dargestellt (siehe Abb. 7).



**Abbildung 7:** Repräsentative Darstellung der Messung der RAGE-Expression auf Monozyten mittels Durchflusszytometrie am Beispiel einer gesunden Kontrolle, einem Patienten nach Myokardinfarkt und einem Nicht-Überlebenden mit kardiogenem Schock (CS) nach Myokardinfarkt

**A)** Dotplot-Darstellung der PMBCs im forward (FSC) und side scatter (SSC) mit Markierung der Monozyten anhand von Größe und Granularität (R1).

**B)** Dotplot-Darstellung der im forward (FSC) und side scatter (SSC) markierten Monozyten (R1) anhand ihrer Expression der Oberflächenantigene CD14 und RAGE, welche mit Fluoreszenzmarkierten Antikörpern detektiert wurden (Anti-CD14-PerCP, Anti-RAGE-FITC).

**C)** Histogramm-Darstellung der RAGE-Expressionsdichte auf den markierten Monozyten (R1).

### 3.3.3 Auswertung der FACS-Analysen

Statistisch wurden die Daten bezüglich Expressionsmuster und -dichte ausgewertet.

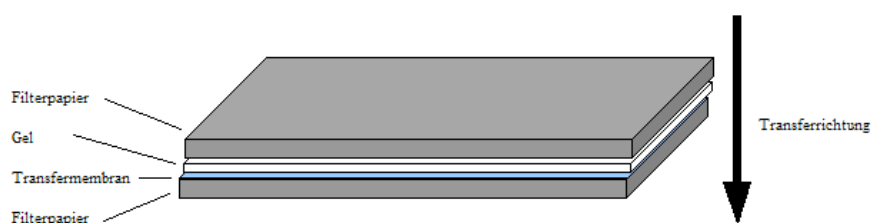
## 3.4 Westernblot-Analyse

### 3.4.1 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-(SDS-PAGE)

Nach dem Verdünnen mit Sample Buffer und Aufkochen für 5 min bei 95 °C im Thermomixer 5436 (Eppendorf) wurden 20 µl Probe/Spur auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und insgesamt ca. 5–7 Stunden mit 100 V für die Sammelphase und 150–200 V für die Laufphase elektrophoretisch aufgetrennt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in der Elektrophoresekammer SE600 (Hoefer, San Francisco). Zur Spannungsversorgung wurde das Electrophoresis Power Supply 601 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet. Parallel zu den Proben des Studienkollektivs liefen als Standardmarker der Full Range Rainbow Marker (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und die Probe einer gleichbleibenden gesunden Probandin als Kontrolle, die zum Vergleich der Westernblots diente. Rekombinantes sRAGE wurde als qualitative Positivkontrolle für sRAGE verwendet.

### 3.4.2 Immunblotting

Die aufgetrennten Proteine wurden per „semi-dry electrophoretic blotting“ (0,8 mA/cm<sup>2</sup>) auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran Nitrocellulose Transfer Membran Pore size 0,2 µm, Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen. Zunächst wurden Nitrocellulose-Membran und Filterpapiere (Filter Papier, BioRad, München) mit Transferpuffer durchtränkt und dann nach dem Sandwich-Prinzip (siehe Abb. 8) auf die Blotting-Kammer (Trans-Blot Semi-DRY Transfer Cell, BioRad, München) gelegt, hierbei sollte die Entstehung von Luftblasen vermieden werden.

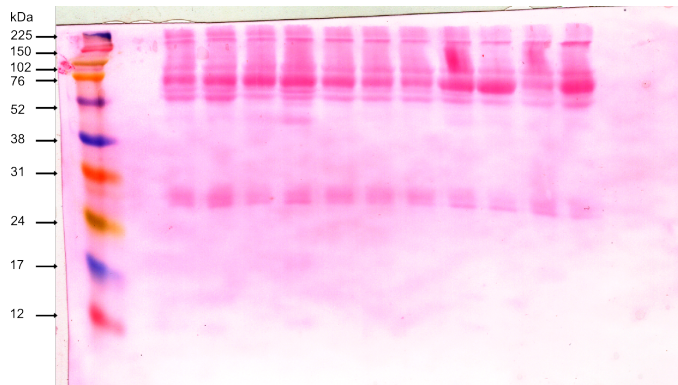


**Abbildung 8:** Blotting-Schema nach dem Sandwich-Prinzip

Die relative Gesamtbeladung und der erfolgreiche Proteintransfer wurden mittels Ponceau-Rot-Färbung überprüft (siehe. Abb. 9).

Über Nacht wurden die Membranen in Blocker-Lösung (0,5 ml Western Blocking Reagent (Roche, Mannheim) und 20 µl Ziegen Serum in 1xPBS 49,5 ml) bei RT geblockt, damit unspezifische Bindungen vermindert werden. Dann wurden die Membranen mit den in 1xPBS verdünnten spezifischen primären Antikörpern für 1,5–2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die überschüssigen Antikörper wurden später in einen viermaligem Waschschritt

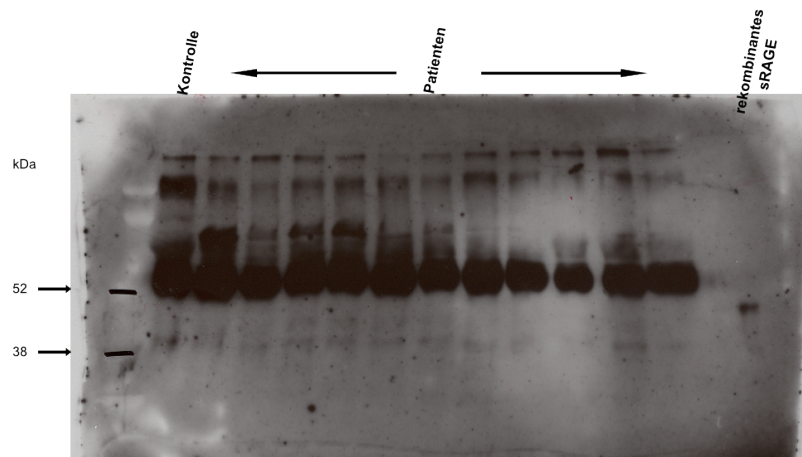




**Abbildung 9:** Beispiel einer Ponceau-Rot-Färbung

entfernt (1xPBS + 0,05% Tween für 2x 5 min und 2x 10 min). Anschließend wurde die Membran eine Stunde bei RT mit Peroxidase-konjugiertem sekundären Antikörper (anti-rabbit 1:10000 gegen Primärantikörper für sRAGE) inkubiert und wiederum mit 0,05% Tween-1xPBS (2x 5 min und 1x 10 min) und 1xPBS (1x 10 min) gewaschen. Die Antikörper, die gegen sRAGE gerichtet sind, stammen von Sigma, Deisenhofen.

Zur Entwicklung/Sichtbarmachung der Proteine wurde eine Peroxidase-vermittelte Chemilumineszenzreaktion durch Western-Blot-Detektions-Reagenz ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) erzeugt, die zu einer Schwärzung der aufgelegten Röntgenfilme (Hyperfilm MP, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) im Bereich der Antikörpermarkierten Banden führte (siehe Abb. 10).



**Abbildung 10:** Beispiel eines Westernblots für sRAGE

### 3.4.3 Auswertung der Westernblot-Analyse

Die jeweiligen Proteinbanden in den Autoradiographien wurden mit Hilfe des Programms LabWorks 4.6. Software (LabWorks Image Acquisition and Analysis Software UVP BioImaging Systems, Cambridge) quantifiziert, um dann als optische Dichte-Werte

(OD, optical density) in Prozent einer Kontrollprobe dargestellt zu werden. Diese Werte wurden dann auf die Proteinkonzentration bezogen.

## 3.5 Zymographie

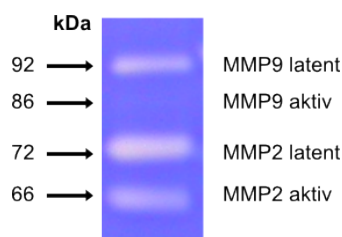
### 3.5.1 Prinzip der Zymographie

Mittels Gelatine-Zymographie-Gelelektrophorese kann die substratspaltende Aktivität der Gelatinasen, wie z. B. die MMP-9, dargestellt werden, da diese das im Gel enthaltene Substrat Gelatine verdauen. Die Zymographie funktioniert ähnlich wie eine Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), in der die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Im Gegensatz zur herkömmlichen SDS-PAGE werden die Gelatinasen unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt, damit möglichst ihre native Struktur und hiermit auch ihre enzymatische Aktivität erhalten bleiben. Durch die Konfigurationsänderung wird das aktive Zentrum der Enzyme freigesetzt, sodass auch die in vivo latenten Enzymformen Gelatine in vitro im Gel abbauen. Die anschließende Inkubation in Reaktionspuffer (Substratpuffer) ermöglicht den Proteasen die Spaltung des Substrats in den Positionen im Gel, an denen sie sich nach der elektrophoretischen Auftrennung befinden. Diese Bereiche können über eine Färbung der im Gel verbleibenden Gelatine mit Coomassie Brilliant Blau sichtbar gemacht werden. Diese Gelatine-freien Stellen zeichnen sich als helle Banden in dem ansonsten blau gefärbten Gelatinegel ab.

### 3.5.2 Gelatine-Zymographie-Gelelektrophorese

Gelatine Typ B von boviner Haut (Sigma, Deisenhofen) wurde in einer Konzentration von 3 mg/ml unter leichtem Erhitzen und ständigem Rühren aufgelöst. Von dieser Lösung wurde 1 mg/ml der Standard-Laemmli-Acrylamid-Polymerisations-Mischung hinzugefügt. Für eine Großgelelektrophorese wurden zu 20 µl Probe 10 µl neutralisierter Extraktionspuffer und 15 µl Loading Buffer (10 % w/v SDS, 4 % w/v Sucrose, 0,1 % Bromphenolblau) hinzupipettiert, die Mischung auf dem Vortexer geschüttelt und in die Slots des Gels mit einer Spacerdicke von 1,5 mm aufgetragen. Als Positivkontrolle diente 20 µl HT1080-Überstand (siehe Abb. 11), der wie die Proben mit neutralisiertem Extraktionspuffer und Loading-Buffer versetzt und auf das Gel aufgetragen wurde. HT1080 ist eine humane Fibrosarkom-Zelllinie, die in starkem Maße Gelatinasen (MMP-2 72/66 kDa und MMP-9 92/83 kDa) produziert, welche in den Zellkulturüberstand abgegeben werden.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in SE600 (Hofer, San Francisco) unter ständiger Kühlung mit Eispacks über 4–6 Stunden mit 100 V in der Sammelphase und 200 V in der Laufphase. Zur Spannungsversorgung wurde das Electrophoresis Power Supply



**Abbildung 11:** Positivkontrolle der Zymographie mit HT1080-Überstand

601 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet. Nach der Auftrennung wurden die Gele in 2,5 % w/v Triton X-100-Lösung unter sanftem Schütteln für 3x 20 min bei RT gewaschen, um dann für ca. 13 Stunden bei 37 °C in Substratpuffer (50 mmol/l TrisHCl mit pH=8,0, 5 mmol/l CaCl<sub>2</sub>) inkubiert zu werden. Anschließend wurden die Gele wiederum unter sanftem Schütteln mit 0,05 % Coomassie Brilliant Blue G-250 (BioRad, München) verdünnt in Ethanol für 1,5 Stunden gefärbt, danach in Entfärberlösung gegeben, bis die Gelatinolyse-Banden nach ca. 3x 30 min als helle Banden sichtbar wurden, und schließlich für 45 min getrocknet (Vakuum-Heizplatte).

### 3.5.3 Auswertung der Zymographie

Die Quantifizierung erfolgte durch Densitometrie des größenfraktionierten Bandenmusters. Die Werte wurden dargestellt als optische Dichtewerte in Prozent der entsprechenden HT1080-Bande als Kontrolle. Diese Werte wurden dann auf die Proteinkonzentration der Probe bezogen.

## 3.6 Enzym-gekoppelter Immunoassay (ELISA)

Die Blutproben wurden für 30 min zentrifugiert, dann bis zur Analyse bei -70 °C gelagert. Pro-BNP und IL-6 wurden mittels ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA) bestimmt.

## 3.7 Nachweis eines RAGE-Shedding-Mechanismus durch in-vitro-MMP-9-Aktivierung

Kulturmedium und alle Reagenzien waren keimfrei. Alle Inkubationen wurden bei 37 °C, 21 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt. PBMCs von gesunden Probanden wurden aus venösem Blut (siehe 3.2.2) isoliert, wovon 10<sup>8</sup> PBMCs für 24 h in einem Gemisch aus RPMI 1640 und 10 % FKS kultiviert wurden. Nach 24 h wurde das komplette Medium gegen Serum-freies RPMI 1640 ausgetauscht und für weitere 24 h inkubiert, damit die Zellen Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) sekretieren konnten. Der Zellkulturüberstand

wurde auf das Vorhandensein von MMP-9 mittels Zymographie und hinsichtlich sRAGE mittels Westernblotting untersucht. Dann wurden die Zellkulturüberstände mit APMA (4-Amino-Phenyl-Quecksilberacetat) versetzt, um eine Aktivierung der Gelatinasen auszulösen. APMA verdrängt das Propeptid der latenten MMP-Form aus dem aktiven Zentrum und bewirkt somit eine Autoaktivierung der latenten MMP zur aktiven Form. In der zymographischen Untersuchung der Proben lässt sich dann eine Zunahme der aktiven Bande in Höhe von 86 kDa feststellen. Die PBMCs der gleichen gesunden Probanden wurden anschließend mit diesem APMA sowie aktive MMP-9 enthaltendem Medium für 15 min inkubiert. Die gleichzeitige Gabe von 10 µg/ml Brefeldin A (Sigma, Deisenhofen) während der Stimulierung verhinderte die Freisetzung des endogen gebildeten esRAGE, welches durch Splice-Varianten entsteht. Hiermit konnte sichergestellt werden, dass das gemessene sRAGE ausschließlich von der Zelloberfläche stammt. Die Zellkulturüberstände wurden dann abpipettiert und mit 2:1 v/v 2x Loadingpuffer für Westernblotting vermischt. Mit den Zellen wurde eine Zellmembranfraktion durchgeführt (siehe 3.2.5), damit RAGE mittels Westernblot detektiert werden konnte.

### 3.8 Statistische Auswertung

Kategoriale Daten wurden als Anzahl und als prozentuale Anteile angegeben und mittels Fisher's exact Test (CS-Überlebende vs. CS-Nichtüberlebende) oder Chi-Quadrat-Test (HC, AMI, Überlebende im CS, Nicht-Überlebende im CS) miteinander verglichen. Kontinuierliche Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt sowie mittels Mann-Whitney-Test (Überlebende im CS vs. Nicht-Überlebende im CS) und one-way ANOVA (HC, AMI, Überlebende im CS, Nicht-Überlebende im CS) miteinander verglichen. Alle quantitativen Parameter waren normalverteilt (Kolmogorov-Smirnov-Test). Die Korrelationskoeffizienten wurden mittels Spearman-Test berechnet. Zur Evaluation einer prognostischen Bedeutung einzelner Biomarker wurde eine Receiver operating characteristic (ROC) Analyse durchgeführt. Als „cut-off“-Punkte wurde eine Spezifität von 80 % festgelegt. Um das Überleben der ACS-Subgruppen zu beurteilen, wurden Überlebenskurven nach Kaplan-Meier errechnet und durch den Log-rank test überprüft. Mit Hilfe der Cox-Regression wurde der gleichzeitige Einfluss von mehreren Variablen auf die Überlebenszeit untersucht.

Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert  $p < 0.05$  festgelegt. Alle Tests wurden zweiseitig verwendet. Alle statistischen Daten wurde mit StatView (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) erhoben.

## 3.9 Reagenzien und Materialien

### 3.9.1 Verwendete Substanzen und Materialien

Acrylamid, Sigma, Deisenhofen

Ammoniumpersulfat (APS), Serva, Heidelberg

Ampuwa Wasser, Fresenius

p-Aminophenyl-Quecksilberacetat (APMA), Sigma, Deisenhofen

Aprotinin, Sigma, Deisenhofen

Aqua. destillata

$\beta$ -Mercaptoethanol, Sigma, Deisenhofen

Bromphenolblau, Merck, Darmstadt

Bovine Serum Albumine (BSA), Sigma, München

Calciumchlorid, Sigma, Deisenhofen

Cell-Wash, Becton Dickinson, Heidelberg

Coomassie Brilliant Blue G-250, BioRad, München

DC protein assay, BioRad, München

Dinatriumhydrogenphosphat, Merck, Darmstadt

Dodecylsulfat Na-Salz (SDS), VWR international, Haasrode

Essigsäure, Merck, Darmstadt

Ethanol, Merck, Darmstadt

FACS-Röhrchen (5 ml), Becton Dickinson, Heidelberg

FACS-Clean, Becton Dickinson, Heidelberg

FACS-Flow (Sheath Fluid for use on Flow-Cytometry), Becton Dickinson, Heidelberg

FACS-Puffer, Becton Dickinson, Heidelberg

FACS-Rinse, Becton Dickinson, Heidelberg

Fetales Kälberserum (FKS), Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

Ficoll, Biochrom, Berlin

Filter Papier, BioRad, München

Full Range Rainbow Marker, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Gelatine Typ B, Sigma, Deisenhofen

Glukose, Sigma, Deisenhofen

Glyzerol, Sigma, Deisenhofen

Glyzin, VWR international, Hassrode

Größe Objektträger: 76 x 26 mm (beschnitten/mattrand) (Menzel-Gläser)

Größe Deckgläser: 24 x 60 mm (Menzel-Gläser)

Hofer Glas Platten, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

HT-1080 Überstand

Hyperfilm MP, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Isopropanol, Merck, Darmstadt

Kaliumchlorid, Merck, Darmstadt  
Kaliumdihydrogenphosphat, Merck, Darmstadt  
Kaliumhydroxid, Sigma, Deisenhofen  
Kakodylsäure, Sigma, Deisenhofen  
Leupeptin, Sigma, Deisenhofen  
Magermilchpulver, TSI, Zeven  
Methanol, VWR international, Briare  
MMP-Kontrolle1, Sigma, Deisenhofen  
Natriumacetat, Merck, Darmstadt  
Natriumazid, Sigma, Deisenhofen  
Natriumbicarbonat, Sigma, Deisenhofen  
Natriumchlorid, Merck, Darmstadt  
Natriumdihydrogenphosphat, Merck, Darmstadt  
Natriumhydroxid, Merck, Darmstadt  
Penicillin, Sigma, Deisenhofen  
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Sigma, Deisenhofen  
Ponceau S Solution, Serva, Heidelberg  
Protran Nitrocellulose Transfer Membran, Schleicher & Schüll, Dassel  
RPMI 1640 Medium, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe  
Salzsäure, Merck, Darmstadt  
Streptomycin, Sigma, Deisenhofen  
Succrose, Sigma, Deisenhofen  
N',N',N',N',-Tetramethylendiamin (TEMED), Sigma, Deisenhofen  
Thimerosal (Mercury[(o-carboxyphenyl)thio]-ethyl sodium Salz, Sigma, Deisenhofen  
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (TRIS), Sigma, Deisenhofen  
Triton X-100, Sigma, Deisenhofen  
Trypan-Blau-Lösung, Sigma, Deisenhofen  
Türks-Lösung, Merck, Darmstadt  
Tween 20 (Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaureate), BioRad, München  
Western Blocking Reagent, Roche, Mannheim  
Western-Blot-Detektions-Reagenz ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg  
Zentrikons YM-10, Millipore, Bedford, USA  
Ziegenserum, Sigma, Deisenhofen  
Zinkdichlorid, Sigma, Deisenhofen  
Es kommt ausschließlich deionisiertes und bidestilliertes Wasser zur Anwendung.

### 3.9.2 Antikörper für Westernblot-Analyse

Tabelle 2 listet die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper für den Nachweis von sRAGE mittels Westernblot auf.

Primärantikörper für RAGE		Sekundärantikörper für RAGE	
Clone	ab37647	Clone	polyclonal
Immunglobulin	IgG	Immunglobulin	IgG
Species	rabbit	Species	goat
kDa	45/52	Fluoreszenz-Konjugation	Peroxidase
Firma	Abcam	Firma	Sigma, Deisenhofen

**Tabelle 2:** Primär- und Sekundärantikörper für Westernblot-Analyse

### 3.9.3 Antikörper für Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS-Analyse)

Tabelle 3 listet die verwendeten Antikörper für den Nachweis von monozytärer RAGE-Expression mittels FACS-Analyse auf.

Specificity	Monozyten		RAGE	
	CD14	CD86	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Clone	RMO52	2331(FUN-1)	ab37647	ab6717
Immunglobulin	IgG2a	IgG1κ	IgG	IgG
Species	Mouse	Mouse	Rabbit	Goat
Fluorochrome	PE-Cy5	PE	—	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
λ excitation	488 nm	488 nm	—	495 nm
Emission peak	670 nm	578 nm	—	528 nm
Firma	Beckman/Coulter	Becton Dickinson	Abcam	Abcam

**Tabelle 3:** Antikörper für FACS-Analyse

### 3.9.4 Verwendete Lösungen

#### 3.9.4.1 Lösungen für Westernblot-Analyse

**Laufgel für Westernblot:** 12%

Aqua dest. 10,0 ml, 30 % Acrylamid-Mix 12,0 ml, 1,5 M Tris (pH 8,8) 7,5 ml, 10 % SDS 0,3 ml, 10 % Ammoniumpersulfat 0,15 ml, TEMED 0,02 ml.

**Sammelgel für Westernblot:**

Aqua dest. 5,4 ml, 30 % Acrylamid-Mix 2,0 ml, 1,0 M Tris (pH 6,8) 2,5 ml, 10 % SDS 0,1 ml, 10 % Ammoniumpersulfat 0,05 ml, TEMED 0,01 ml.

**Laufpuffer:** 500 ml

90,75 g Tris base (= 1,5 M Tris), ad 160 ml Aqua dest. (Magnetührer), pH einstellen mit rauchender HCl auf 8,8, ad 500 ml Aqua dest.

**Sammelpuffer:** 200 ml

12 g Tris base (= 0,5 M Tris), ad 160 ml Aqua dest. (Magnetprüher), pH einstellen mit rauchender HCl auf 6,8, ad 200 ml Aqua dest.

**Probenpuffer Marc Wolff:**

2,0 ml Glycerol, 2,0 ml SDS 10 %, 0,25 mg Bromphenolblau, 2,5 ml Stacking Gel Buffer (6,06 g Tris (=0,5 M) und 4,0 ml SDS 10 % mit HCl auf 100 ml Aqua dest., pH 6,8), 9,5 ml Aqua dest. Frisch jeweils 5 V/V %  $\beta$ -Mercaptoethanol dazugeben.

**Elektrophoresepuffer 10x:**

720 g Glycin, 151,5 g Tris, 50 g SDS, ad 5 l Aqua dest. Zum Gebrauch 1:10 verdünnen.

**Transferpuffer:** 2000 ml

9,7 g Tris (= 25 mM), 45 g Glycin (= 190 mM), 800 ml Methanol (= 20 %), ad 2000 ml Aqua dest. hinzu.

**10x PBS:**

80 g NaCl, 2 g KCl, 2,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 14,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , ad 900 ml Aqua dest., dann mit HCl auf pH = 7,4 einstellen, auf 1000 ml auffüllen.

**Stripping Buffer:**

1 M Tris-HCl pH 6,8 , 10 % SDS, 0,7 %  $\beta$ -Mercaptoethanol.

**Blocker-Lösung:**

49,5 ml 1xPBS, 0,5 ml Western Blocking Reagent, 20  $\mu\text{l}$  Ziegenserum.

**3.9.4.2 Lösungen für Zymographie****Laufgel für Zymographie:**

30 % Acrylamid-Mix 9,32 ml, Puffer 4 % SDS 7,0 ml, Gelatine (3mg/ml) 9,32 ml (handwarm zugeben), Aqua dest 2,0 ml, 10 % APS 280  $\mu\text{l}$ , TEMED 10  $\mu\text{l}$ .

**Sammelgel für Zymographie:**

30 % Acrylamid-Mix 2,0 ml, Puffer 0,4 % SDS 2,5 ml, Aqua dest 5,5 ml, 10 % APS 100  $\mu\text{l}$ , TEMED 5  $\mu\text{l}$ .

**Laufpuffer:** 200 ml

36,3 g Tris base (= 1,5 M Tris), 8 g SDS (= 4 % SDS), ad 150 ml Aqua dest. (Magnetprüher), pH einstellen mit rauchender HCl auf 8,8, ad 200 ml Aqua dest.

**Sammelpuffer:** 200 ml

12 g Tris base (= 0,1 M Tris), 0,8 g SDS (= 0,4 % SDS), ad 150 ml Aqua dest. (Magnetprüher), pH einstellen mit rauchender HCl auf 6,8, ad 200 ml Aqua dest.



**Elektrophoresepuffer 10x:**

720 g Glycin, 151,5 g Tris, 50 g SDS, ad 5 l Aqua dest., Zum Gebrauch 1:10 verdünnen.

**Extraktionspuffer:**

10 mM Kakodylsäure 0,8 g, 150 mM NaCl 4,4 g, 1  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> 10  $\mu$ l (6,8 mg/ml), 20 mM CaCl<sub>2</sub>\*2 H<sub>2</sub>O 1,47 g, 1,5 mM NaN<sub>3</sub> (Natriumazid) 48,8 mg, 0,01 % TritonX-100 50  $\mu$ l, 500 ml Aqua dest., auf pH = 5,0 einstellen.

**Neutralizationpuffer:**

1 M Tris/HCl 60,51 g, 500 ml pH 8,0.

**Triton-X-Lösung:**

Triton 2,5 % 25 ml ad 1000 ml Aqua dest.

**Substratpuffer:**

50  $\mu$ M Tris-HCL pH 8,0, 5 mM CaCl<sub>2</sub>.

**Entfärberlösung:**

500 ml Aqua dest., 100 ml Ethanol, 70 ml Essigsäure. Auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen.

**3.9.4.3 Lösungen für FACS-Analyse****Zellmedium:**

500 ml RPMI 1640, 10 % fetales Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin.

**3.9.4.4 Lösungen für Zell-Fraktionierung****Hypotoner Puffer:**

5 mmol/l Tris, 1 mmol/l EDTA, 5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, pH 8,0, 1 mmol/l PMSF, 1 mmol/l Leupeptin, 5  $\mu$ g/ml Aprotinin.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Klinische Daten der Studienpopulation

Die klinischen, kardiovaskulären und hämodynamischen Daten aller untersuchten gesunden Probanden (Healthy Controls, HC; n=20), Patienten mit unkompliziertem akutem Myokardinfarkt (Acute Myocardial Infarction, AMI; n=20) sowie Patienten mit kardiogenem Schock nach akutem Myokardinfarkt (Cardiogenic Shock, CS; n=30) finden sich in Tabelle 4 und 5 auf S. 43f. Die Gruppen hatten eine gleiche Altersverteilung (Median HC: 63 Jahre, AMI: 68 Jahre, CS: 67 Jahre). Es fand sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich Alter, Geschlecht, kardiovaskulären Risikofaktoren, Infarktlokalisation sowie Zeitintervall zwischen Symptombeginn und Wiedereröffnung eines verschlossenen Infarktgefäßes. Alle Patienten im kardiogenen Schock (CS) wurden zusätzlich mittels intraaortaler Ballongegenpulsation kreislaufunterstützend therapiert und erhielten sofern erforderlich vasoaktive Substanzen. Patienten mit akutem Myokardinfarkt (AMI) hatten im Vergleich zu den Patienten im CS kleinere Infarkte, gemessen am myokardialen Nekrosemarker (Troponin T), und eine höhere linksventrikuläre Ejektionsfraktion. Eine Differenzierung der Patienten im CS in Überlebende (n=17) und Nicht-Überlebende (n=13), also Tod innerhalb von 28 Tagen, zeigte für die letztgenannte Gruppe einen signifikant geringeren Cardiac Index ( $p=0.014$ ) und signifikant größere Infarkte gemessen am Troponin T ( $p=0.014$ ). Der Cardiac Power Index (CPI) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Überlebenden und Nicht-Überlebenden ( $p=0.279$ ). Hinsichtlich des SAPS-II-Scores zeigte sich in der Gruppe der Nicht-Überlebenden ein signifikanter Anstieg des SAPS-II-Scores ( $p<0.001$ ).

	Healthy Controls	AMI	Kardiogener Schock		
			Alle	Überlebende	Nicht-Überlebende
	n=20	n=20	n=30	n=17	n=13
<b>Alter, Jahre</b>	63 (43; 86)	68 (47; 92)	67 (38; 89)	65 (38; 89)	69 (46; 84)
<b>Frauen/Männer, n</b>	8/12	8/12	8/22	5/12	3/10
<b>Risikofaktoren</b>					
Nikotin, n	5 (25%)	8 (40%)	16 (53.3%)	9 (52.9%)	7 (53.8%)
Diabetes mellitus, n	0	7 (35%)	11 (36.7%)	4 (23.5%)	6 (36.2%)
Hyperlipidämie, n	0	16 (80%)	30 (100%)	17 (100%)	13 (100%)
Hypertonie, n	0	7 (35%)	12 (40%)	8 (47.1%)	4 (30.8%)
<b>SAPS-II-Score, Pkt.</b>	—	28 (16; 44)	34 (16; 66)	26 (16; 45)	44 (27; 66)
<b>Myokardinfarkt</b>					
STEMI/NSTEMI, n	—	10/10	10/20	5/12	5/8
Troponin T, pg/ml	—	2.59 (0.02; 8.24)	9.0 (0.02; 54.57)	4.09 (0.02; 14.07)	15.39 (0.54; 54.57)
Kreatinkinase, U/l	—	1716 (53; 11392)	3725 (53; 29871)	2171 (53; 10141)	5637 (155; 29871)
<b>Ejektionsfraktion, %</b>	—	36 (20; 72)	25 (12; 40)	25 (12; 40)	25 (12; 40)
<b>Cardiac Index, l/min/m<sup>2</sup></b>	—	2.42 (2.32; 2.87)	1.22 (0.64; 2.73)	1.38 (0.80; 2.73)	1.00 (0.64; 1.50)
<b>CPI, mmHg/l/min/m<sup>2</sup></b>	—	0.55 (0.42; 0.58)	0.13 (0.07; 0.30)	0.14 (0.07; 0.30)	0.12 (0.07; 0.18)
<b>Symptom-Reperfusion-Zeit, h</b>	—	9.3 (3.0; 24.0)	9.3 (3.0; 24.0)	9.0 (3.0; 22.0)	9.7 (3.0; 24.0)
<b>Infarktgefäß</b>	—				
LAD/RCX/RCA, n	—	8/6/6	17/6/7	8/4/5	9/2/2
<b>PCI+Stent, n</b>	—	20	30	17	13
<b>IABP, n</b>	—	0	30	17	13
<b>Begleitende Therapie</b>	—				
ASS+Clopidogrel, n	—	20	30	17	13
Dobutamin, Dosis, µg/kg/min	—	0	6.0 (0; 12.0)	5.5 (0; 12.0)	6.5 (0; 12.0)
Noradrenalin, Dosis, µg/kg/min	—	0	3.1 (0; 17.0)	2.8 (0; 17.0)	3.5 (0; 10.0)

**Tabelle 4:** Klinische, kardiovaskuläre und hämodynamische Daten der Studienpopulation, Teil 1

Die Daten werden als Anzahl (n) oder Median (Minimum; Maximum) gezeigt. AMI: akuter Myokardinfarkt. ASS: Acetylsalicylsäure. CPI: Cardiac Power Index (= Cardiac Index x mittlerer arterieller Blutdruck x 0,0022). IABP: Intraortale Ballongegenpulsation. LAD: Left anterior descending. NSTEMI: Nicht-ST-Hebungsinfarkt. PCI: Perkutane Koronarintervention. Pkt.: Punkte. RCX: Ramus circumflexus. RCA: Right coronary artery. SAPS-II-Score: Simplified Acute Physiology Score-II. STEMI: ST-Hebungsinfarkt.

	p-Wert					ANOVA
	HC vs. AMI	AMI vs. Überlebende	AMI vs. Nicht-Überlebende	Überlebende vs. Nicht-Überlebende		
Alter, Jahre	0.238	0.534	0.689	0.379	0.828	
Frauen/Männer, n	1.000	0.731	0.456	1.000	—	
Risikofaktoren						
Nikotin, n	0.501	0.517	0.493	1.000	—	
Diabetes mellitus, n	<b>0.008</b>	0.495	0.717	0.255	—	
Hyperlipidämie, n	< <b>0.001</b>	0.109	0.136	—	—	
Hypertonie, n	<b>0.008</b>	0.516	1.000	0.465	—	
SAPS-II-Score, Pkt.	—	0.631	< <b>0.001</b>	< <b>0.001</b>	< <b>0.001</b>	
Myokardinfarkt						
STEMI/NSTEMI, n	—	—	—	—	—	
Troponin T, pg/ml	—	0.248	<b>0.004</b>	<b>0.014</b>	< <b>0.008</b>	
Kreatinkinase, U/l	—	0.635	0.055	0.134	0.180	
Ejektionsfraktion, %	—	<b>0.007</b>	<b>0.021</b>	0.909	<b>0.002</b>	
Cardiac Index, l/min/m <sup>2</sup>	—	< <b>0.001</b>	< <b>0.001</b>	0.014	< <b>0.001</b>	
CPI, mmHg/l/min/m <sup>2</sup>	—	< <b>0.001</b>	< <b>0.001</b>	0.279	< <b>0.001</b>	
Symptom-Reperfusion-Zeit	—	0.909	0.873	0.781	0.995	
Infarktgefäß						
LAD/RCA/RCA, n	—	—	—	—	—	
PCI+Stent, n	—	—	—	—	—	
IABP, n	—	—	—	—	—	
Begleitende Therapie						
ASS+Clopidogrel, n	—	—	—	—	—	
Dobutamin, Dosis, µg/kg/min	—	—	—	0.538	—	
Noradrenalin, Dosis, µg/kg/min	—	—	—	0.052	—	

**Tabelle 5:** Klinische, kardiovaskuläre und hämodynamische Daten der Studienpopulation, Teil 2

Die Daten zeigen die Ergebnisse des Mann-Whitney-Tests (Überlebende vs. Nicht-Überlebende im CS) und der one-way ANOVA (HC, AMI, Überlebende im CS, Nicht-Überlebende im CS). AMI: akuter Myokardinfarkt. ASS: Acetylsalicylsäure. CPI: Cardiac Power Index (= Cardiac Index x mittlerer arterieller Blutdruck x 0,0022). CS: Patient im kardiogenen Schock. HC: Healthy Controls. IABP: Intraaortale Ballongegenpulsation. LAD: Left anterior descending. NSTEMI: Nicht-ST-Hebungsinfarkt. PCI: Perkutane Koronarintervention. Pkt.: Punkte. RCA: Ramus circumflexus. RCA: Right coronary artery. SAPS-II-Score: Simplified Acute Physiology Score-II. STEMI: ST-Hebungsinfarkt.

## 4.2 Differentialblutbild und (inflammatorische) Laborparameter der Studienpopulation

Die Daten aus den Untersuchungen des Differentialblutbildes und der Zellsubpopulationen sind in Tabelle 6 auf S. 46 dargestellt. Es fand sich eine signifikant erhöhte Gesamtzahl der im Blut zirkulierenden Leukozyten bei allen Patienten mit ACS im Vergleich zu gesunden Kontrollen (HC,  $p=0.003$ ), was u. a. auf eine Erhöhung der Zahl zirkulierender Monozyten zurückzuführen ist. Den stärksten Leukozytenanstieg hatten dabei Patienten mit letal verlaufendem kardiogenem Schock, jedoch ohne signifikanten Unterschied zu den Überlebenden ( $p=0.235$ ). Hinsichtlich der Monozyten fanden sich signifikant höhere Werte bei den Patienten mit ACS im Vergleich zu HC ( $p=0.003$ ). Es zeigte sich jedoch kein relevanter Unterschied in den ACS-Subpopulationen. Bei den Inflammationsparametern (CRP und IL-6) zeigten sich signifikante Unterschiede sowohl im Vergleich AMI vs. Überlebende im CS (CRP:  $p<0.01$ ; IL-6:  $p=0.033$ ) sowie AMI vs. Nicht-Überlebende im CS (CRP:  $p<0.01$ ; IL-6:  $p<0.001$ ). Innerhalb der Gesamtgruppe von Patienten im CS bestand nur hinsichtlich IL-6 ein signifikanter Unterschied ( $p=0.011$ ). Bei der Bestimmung von pro-BNP als Marker der Herzinsuffizienz hatten alle Patienten mit ACS erhöhte Werte, mit einem signifikanten Anstieg bei Patienten im CS (AMI vs. Überlebende:  $p<0.001$ , AMI vs. Nicht-Überlebende:  $p<0.001$ ). Innerhalb der CS-Gruppe wiesen die Nicht-Überlebenden höhere pro-BNP Werte auf, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $p=0.173$ ).

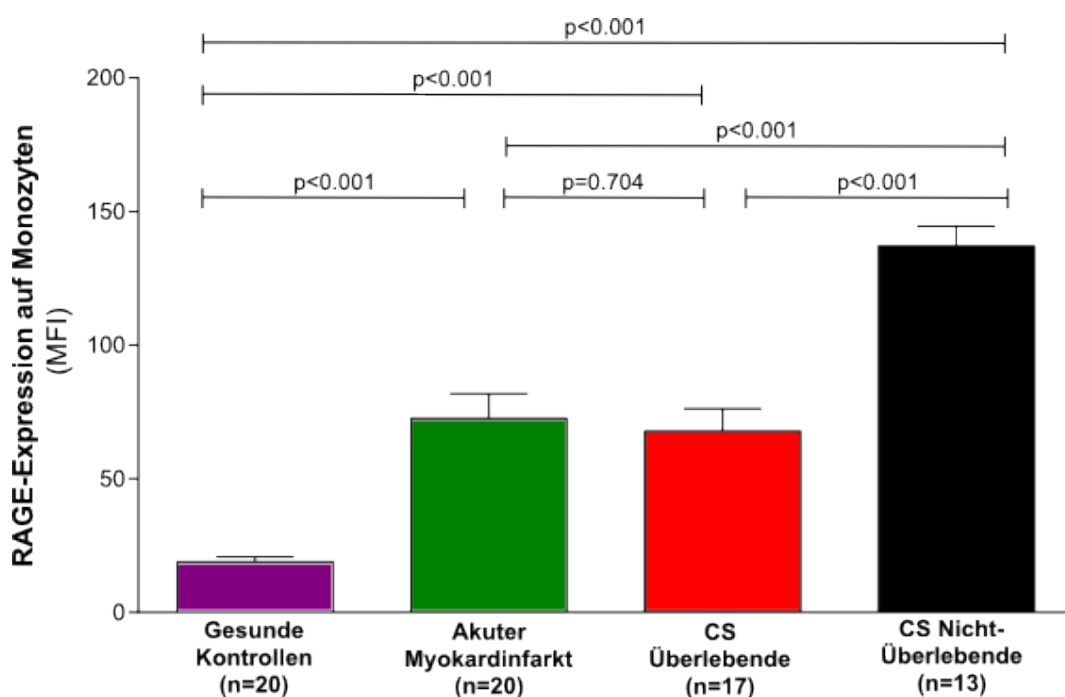
	Healthy Controls		AMI		Kardiogener Schock		
	n=20		n=20		Alle, n=30	Überlebende, n=17	Nicht-Überlebende, n=13
<b>Leukozyten, 10<sup>6</sup>/l</b>	8185 (4600; 11100)		12805 (4600; 24800)		12179 (4600; 21200)	11288 (4600; 16900)	13277 (5300; 21200)
<b>Monozyten, 10<sup>6</sup>/l</b>	739 (414; 999)		1061 (414; 2232)		1096 (414; 1908)	1016 (414; 1521)	1195 (477; 1908)
<b>RAGE-Expression auf CD14<sup>+</sup>-Monozyten, MFI</b>	18.93 (12.92; 41.98)		72.60 (21.77; 153.70)		97.79 (25.43; 170.42)	67.80 (25.43; 169.70)	137.02 (100.05; 170.42)
<b>sRAGE-Expression im Plasma, AU/PC</b>	125.68 (84.94; 205.64)		122.15 (72.31; 196.02)		106.94 (36.94; 189.98)	127.65 (57.27; 189.98)	79.87 (36.94; 159.60)
<b>CRP-Expression im Serum, mg/l</b>	0.13 (0.05; 0.30)		0.14 (0.05; 0.30)		95.35 (0.80; 313.80)	88.07 (1.00; 292.70)	105.05 (0.80; 313.80)
<b>IL-6-Expression im Serum, pg/ml</b>	3.26 (0.16; 9.96)		20.76 (0.18; 118.28)		92.09 (5.09; 350.50)	52.48 (5.09; 221.98)	148.21 (9.89; 350.50)
<b>pro-BNP-Expression im Serum, pg/ml</b>	111.90 (34; 245)		1365.71 (5.4; 4843)		13157.29 (964; 35000)	10080.01 (964; 29159)	16234.58 (2108; 35000)
					<b>p-Wert</b>		
	HC vs. AMI	AMI vs. Überlebende	AMI vs. Nicht-Überlebende	Überlebende vs. Nicht-Überlebende			ANOVA
<b>Leukozyten, 10<sup>6</sup>/l</b>	<b>0.003</b>	0.726	0.395	0.235			<b>0.003</b>
<b>Monozyten, 10<sup>6</sup>/l</b>	<b>0.003</b>	0.726	0.395	0.235			<b>0.003</b>
<b>RAGE-Expression auf CD14<sup>+</sup>-Monozyten, MFI</b>	< <b>0.001</b>	0.704	< <b>0.001</b>	< <b>0.001</b>			< <b>0.001</b>
<b>sRAGE-Expression im Plasma, AU/PC</b>	0.825	0.676	<b>0.003</b>	<b>0.004</b>			<b>0.009</b>
<b>CRP-Expression im Serum, mg/l</b>	0.899	< <b>0.001</b>	< <b>0.001</b>	0.638			< <b>0.001</b>
<b>IL-6-Expression im Serum, pg/ml</b>	0.059	<b>0.033</b>	< <b>0.001</b>	<b>0.011</b>			< <b>0.001</b>
<b>pro-BNP-Expression im Serum, pg/ml</b>	<b>0.002</b>	< <b>0.001</b>	< <b>0.001</b>	0.173			< <b>0.001</b>

**Tabelle 6:** Inflammatorische und andere Laborparameter der Studienpopulation

Die Daten werden als Anzahl (n) oder Median (Minimum; Maximum) gezeigt. AMI: Akuter Myokardinfarkt. AU: arbitrary units. BNP: Brain natriuretic peptide. CRP: C-reaktives Protein. CS: Patient im kardiogenen Schock. HC: Healthy Controls. IL-6: Interleukin-6. MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität. PC: Plasmakonzentration RAGE: Receptor for advanced glycation end products. sRAGE: lösliches RAGE.

### 4.3 RAGE-Expression auf Monozyten im Studienkollektiv

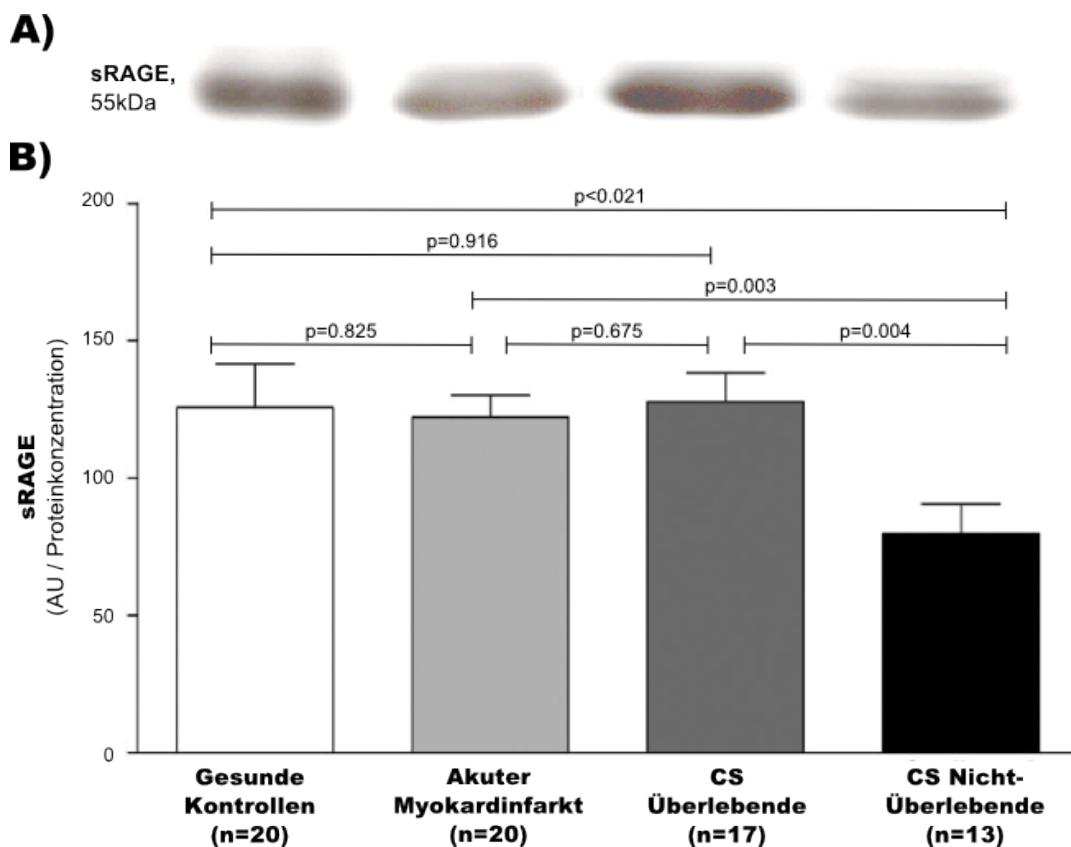
Bei Patienten mit ACS zeigte sich in der FACS-Analyse eine gesteigerte RAGE-Expression auf CD14<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>-Monozyten (siehe Abb. 12 und Tab. 6). Die letal verlaufenden Schockpatienten hatten bereits bei Aufnahme eine signifikant gesteigerte RAGE-Expression auf Monozyten im Vergleich zu gesunden Probanden ( $137.02 \pm 7.48$  MFI vs.  $46 \pm 4.7$  MFI;  $p < 0.001$ ) sowie im Vergleich zum unkomplizierten AMI ( $137.02 \pm 7.48$  MFI vs.  $72.60 \pm 9.19$  MFI;  $p < 0.001$ ). Innerhalb der Gruppe der Schockpatienten hatten interessanterweise die Nicht-Überlebenden ( $137.02 \pm 7.48$  MFI vs.  $67.80 \pm 8.33$  MFI;  $p < 0.001$ ) eine signifikant höhere RAGE-Expressionsdichte als die Überlebenden im CS. In Abb. 7 sind repräsentative Dotplots und Histogramme der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) des Studienkollektivs dargestellt.



**Abbildung 12:** RAGE-Expression auf CD14<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>-Monozyten  
Quantifizierung der monozytären RAGE-Expression im Studienkollektiv.  
CS: kardiogener Schock.

### 4.4 sRAGE-Level im Studienkollektiv

In der sRAGE Bestimmung mittels Westernblot (siehe Abb. 13 und Tab. 6) zeigten sich ähnliche sRAGE-Niveaus bei den Patienten mit AMI ( $122.15 \pm 7.97$  AU/PC), den Überlebenden im CS ( $127.65 \pm 10.52$  AU/PC) und den gesunden Kontrollen ( $125.68 \pm 15.79$  AU/PC). Nur die Nicht-Überlebenden im CS ( $78.87 \pm 10.62$  AU/PC) hatten signifikant geringere sRAGE-Level im Vergleich zu den Überlebenden im CS ( $127.65 \pm 10.52$  AU/PC;  $p = 0.004$ ).



**Abbildung 13:** sRAGE im Plasma

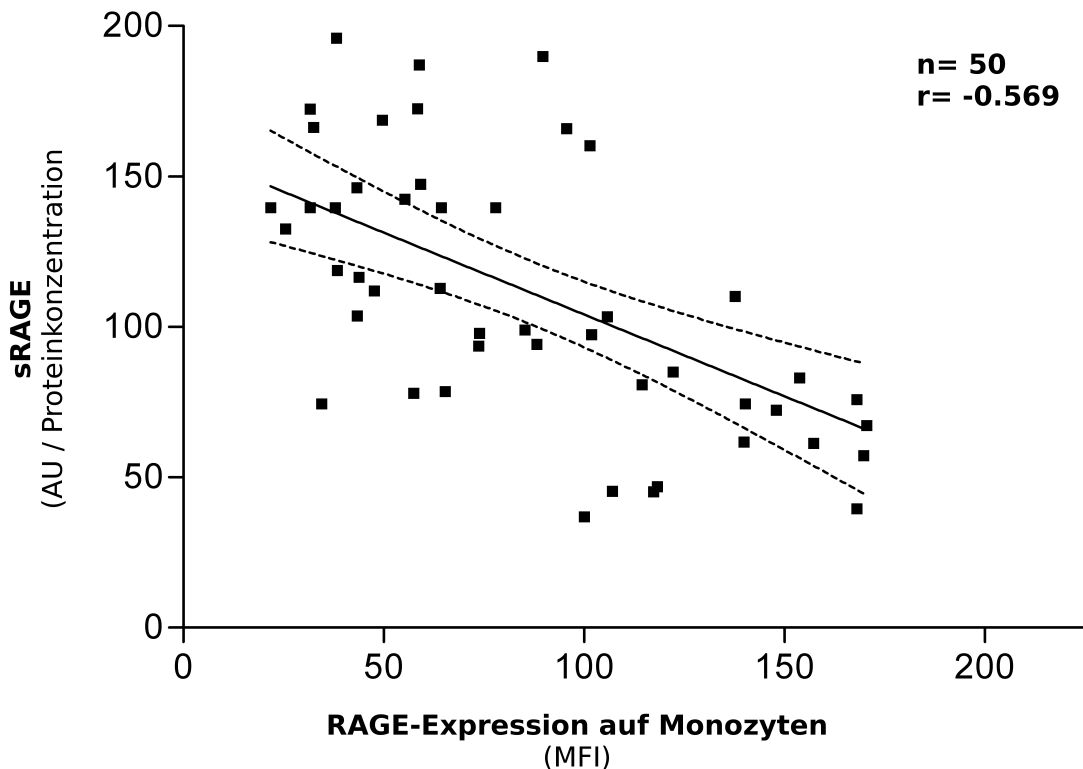
**A)** Repräsentative Westernblots von sRAGE (50-55 kDa) aus Plasma. **B)** Quantifizierung aller sRAGE-Isoformen aus dem Plasma der Studienpopulation. sRAGE in arbitrary units (AU) pro mg Plasmaprotein. CS: kardiogener Schock.



## 4.5 sRAGE/RAGE-Interaktion

### 4.5.1 sRAGE/RAGE-Verhältnis

Interessanterweise zeigte sich eine inverse Korrelation ( $r=-0.569$ ) zwischen dem Plasma-sRAGE-Level und der monozytären Expression des membranständigen Rezeptors (RAGE) bei allen Patienten mit ACS ( $n=50$ , AMI:  $n=20$ , CS:  $n=30$ , siehe Abb. 14). D. h. je höher das sRAGE-Niveau, desto niedriger ist die RAGE-Expression auf Monozyten bei allen Patienten mit ACS. Es scheint also einen Zusammenhang zwischen dem löslichen RAGE-Rezeptor und der monozytären RAGE-Expression zu geben. Die Herkunft des Plasma-sRAGE lässt sich dabei jedoch nicht näher differenzieren, sRAGE kann durch eine Abspaltung membrangebundener monozytärer und/oder endothelialen RAGE-Rezeptoren entstehen.



**Abbildung 14:** Inverses Verhalten von sRAGE zur membranständigen RAGE-Expression auf Monozyten in allen Patienten mit Akutem Koronarsyndrom ( $n=50$ , davon mit akutem Myokardinfarkt [ $n=20$ ] und mit kardiogenem Schock [ $n=30$ ]).  
Regressionsanalyse: sRAGE [arbitrary unit (AU)/Proteinkonzentration] =  $158.499 - 0.544 \times \text{RAGE}$  [mittlere Fluoreszenzintensität (MFI)].

### 4.5.2 In-vitro-Aktivierung der MMP-9 induziert RAGE-Abspaltung auf PBMCs

Bei unseren Patienten waren intraindividuell hohe monozytäre RAGE-Expressionen mit niedrigen löslichen sRAGE Plasmakonzentrationen assoziiert und umgekehrt. Es zeigte

sich eine signifikante inverse Korrelation zwischen Plasma-sRAGE-Spiegeln und der monozytären RAGE-Expression ( $r=-0.569$ ,  $r^2=0.528$ ,  $p<0.001$ ,  $n=50$ , siehe Abb. 14). Wir untersuchten daraufhin die Hypothese, ob die aktivierte Metalloproteinase MMP-9 ein Abscheren der monozytären RAGE-Rezeptoren induziert und somit für einen Anstieg der zirkulierenden löslichen sRAGE-Spiegel verantwortlich sein kann. Hierzu führten wir folgende in-vitro-Untersuchung durch: Bestimmung von löslichem sRAGE und monozytärem RAGE nach in-vitro-Stimulation von PBMCs gesunder Probanden ( $n=4$ ) mittels APMA-aktivierter MMP-9. Nach 15 min Behandlung mit aktivierter MMP-9 wurden etwa 35 % des vorher Zellmembran-gebundenen RAGE freigesetzt (siehe Abb. 15A), gleichzeitig kam es zu einer Zunahme an sRAGE im Zellkulturüberstand (siehe Abb. 15B). Durch die gleichzeitige Gabe von Brefeldin A konnte die Freisetzung von endogenem sRAGE (esRAGE), einer Splice-Variante von RAGE, welches keine transmembranäre Domäne besitzt, verhindert werden. Somit zeigen unsere Daten eindeutig, dass der vollständige Rezeptor von der monozytären Zelloberfläche abgespalten werden kann, wobei die aktive MMP-9 dabei eine Rolle spielt. Als Ladekontrolle wurde eine Ponceau-Rot-Färbung durchgeführt.

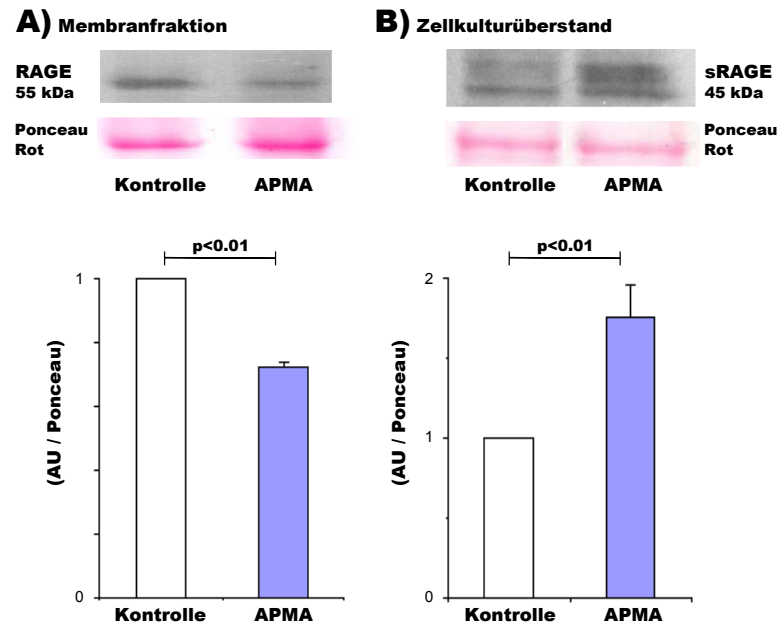
## **4.6 Prognostische Bedeutung der monozytären RAGE-Expression und der Plasma-sRAGE-Level**

### **4.6.1 sRAGE und RAGE im Verhältnis zum SAPS-II-Score**

Auf Grund der Bedeutung des SAPS-II-Scores im ACS [66] wurde die Korrelation der RAGE-Expression und des sRAGE-Levels mit dem SAPS-II-Score, einem prädiktiven Prognoseparameter für die Letalität von Intensivpatienten, in der Schock- und AMI-Gruppe untersucht (siehe Abb. 16, S. 52). Dabei zeigte sich eine signifikant positive Korrelation zwischen dem membranständigen RAGE und dem SAPS-II-Score ( $r=0.808$ ,  $p<0.001$ ,  $n=50$ , (siehe Abb. 16A). Gleichzeitig bestand ein inverses Verhältnis zwischen Plasma-sRAGE-Level und dem SAPS-II-Score ( $r=-0.704$ ,  $p<0.001$ ,  $n=50$ , (siehe Abb. 16B). Auf Grund dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass eine hohe monozytäre RAGE-Expression bzw. ein niedriger sRAGE-Plasmaspiegel bei Patienten im CS mit einer erhöhten Sterblichkeit assoziiert ist.

### **4.6.2 Prognostische Relevanz der bestimmten Parameter**

SAPS-II-Score und Cardiac Power Index (CPI) sind bekannte klinische Prognoseparameter für Patienten im kardiogenem Schock. Neben diesen etablierten Parametern haben Laborparameter wie z. B. IL-6, CRP und pro-BNP eine prognostische Bedeutung.

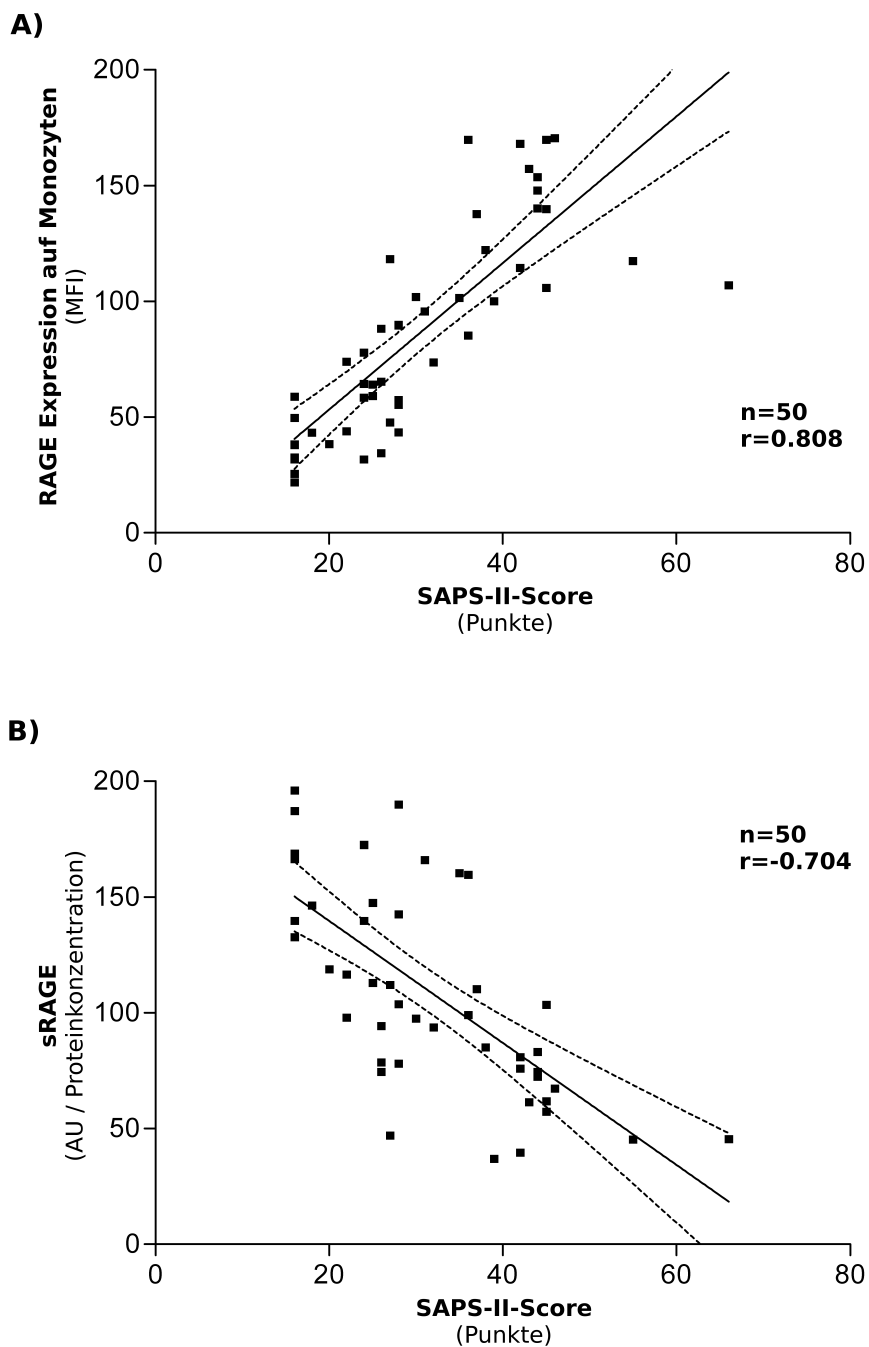


**Abbildung 15:** Aktivierung der MMP-9 in PBMCs

**A)** Repräsentative Westernblots von Plasmamembran verbundenem vollständigem RAGE aus peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) vor und nach APMA vermittelter MMP-9 Aktivierung sind oben dargestellt. Unten findet sich die quantitative Darstellung der Ergebnisse von vier unterschiedlichen Experimenten. AU: arbitrary units pro mg Protein

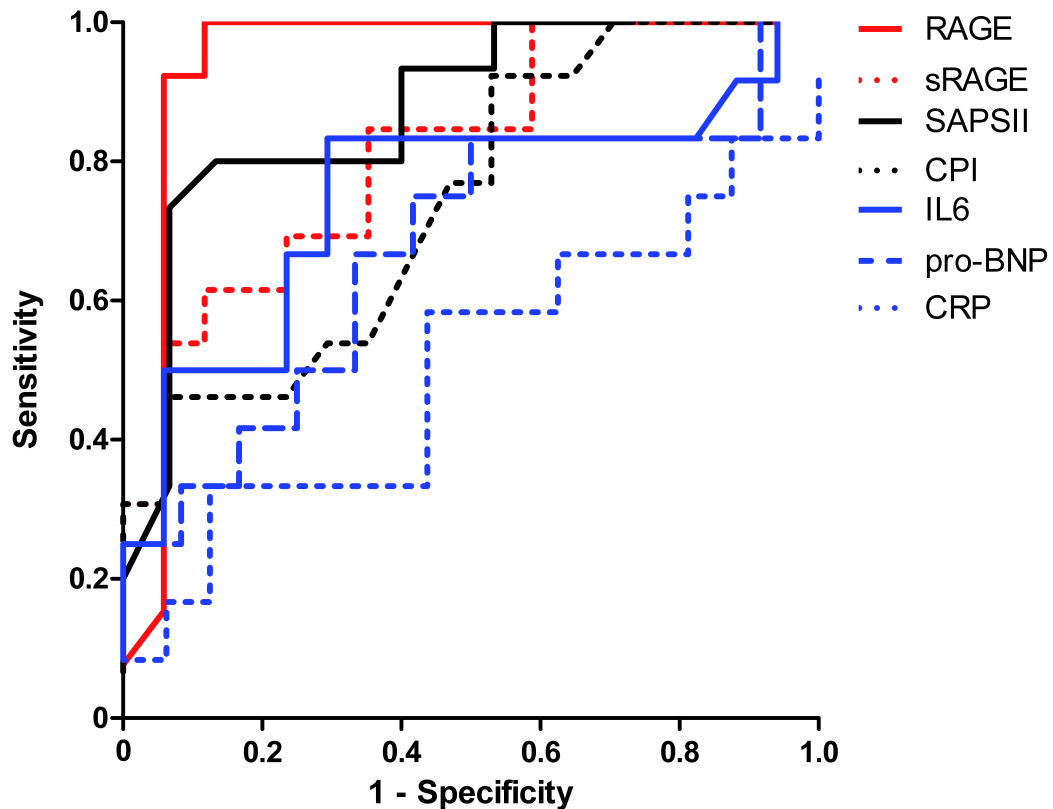
**B)** Repräsentative Westernblots für sRAGE aus Zellkulturüberstand von PBMCs vor und nach APMA vermittelter MMP-9 Aktivierung (oben) und quantitative Darstellung der Ergebnisse von vier unterschiedlichen Experimenten (unten). APMA: 4-Amino-Phenyl-Quecksilberacetat. AU: arbitrary units pro 20 µl Überstand.

sRAGE und RAGE Level werden in AU angegeben, wobei die Kontrollprobe auf einen Wert von 1 festgelegt wurde. Die Ponceau-Rot-Färbung belegt, dass die Proben mit der gleichen Proteinmenge verglichen wurden.



**Abbildung 16:** Korrelation zwischen **A)** RAGE bzw. **B)** sRAGE zum SAPS-II-Score in allen Patienten mit Akutem Koronarsyndrom (n=50, davon mit akutem Myokardinfarkt [n=20] und mit kardiogenem Schock [n=30])  
 Regressionsanalyse: **A)** RAGE [Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI)] = -10.242 + 3.158 x SAPS-II-Score [Punkte];  $r^2=0.652$ ; **B)** sRAGE [arbitrary unit (AU)/Proteinkonzentration] = 192.618 - 2.632 x SAPS-II-Score [Punkte];  $r^2=0.495$ .

Daher wurden ROC-Kurven (siehe Abb. 17, S. 53) für die o. g. Parameter (siehe Tab. 6, S. 46) errechnet, um die Relevanz der einzelnen Parameter für die Vorhersage des Überlebens im kardiogenem Schock zu beurteilen. Die Trennschärfe der einzelnen Parameter, welche aus der Berechnung der Area under the curve (AUC) aus der ROC-Analyse stammt, wird in Tab. 7 dargestellt. Dabei zeigte sich eine hohe Trennschärfe für RAGE, sRAGE und den SAPS-II-Score. Auch der Cardiac Power Index (CPI) und IL-6 wiesen eine relativ große AUC auf. Als nicht relevant erwiesen sich CRP und pro-BNP.



**Abbildung 17:** Receiver operating characteristic-Kurve für die Sterblichkeit anhand von RAGE, sRAGE, SAPS-II-Score, Cardiac Power Index, IL-6, pro-BNP und CRP.

Variable	Area Under Curve	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall	p-Wert
<b>RAGE-Expression</b> auf Monozyten	0.943	0.051	0.843–1.044	< 0.001
<b>sRAGE</b> im Plasma	0.815	0.078	0.662–0.967	0.004
<b>SAPS-II-Score</b>	0.873	0.066	0.744–1.002	< 0.001
<b>Cardiac Power Index</b>	0.742	0.091	0.565–0.919	0.025
<b>Interleukin-6</b>	0.747	0.102	0.548–0.947	0.025
<b>pro-BNP</b>	0.674	0.113	0.452–0.896	0.149
<b>CRP</b>	0.505	0.118	0.274–0.736	0.963

**Tabelle 7:** Receiver operating characteristic curve analysis

BNP: Brain natriuretic peptide. CRP: C-reaktives Protein. RAGE: Receptor for advanced glycation end products. sRAGE: soluble RAGE, lösliches RAGE. SAPS-II-Score: Simplified Acute Physiology Score.

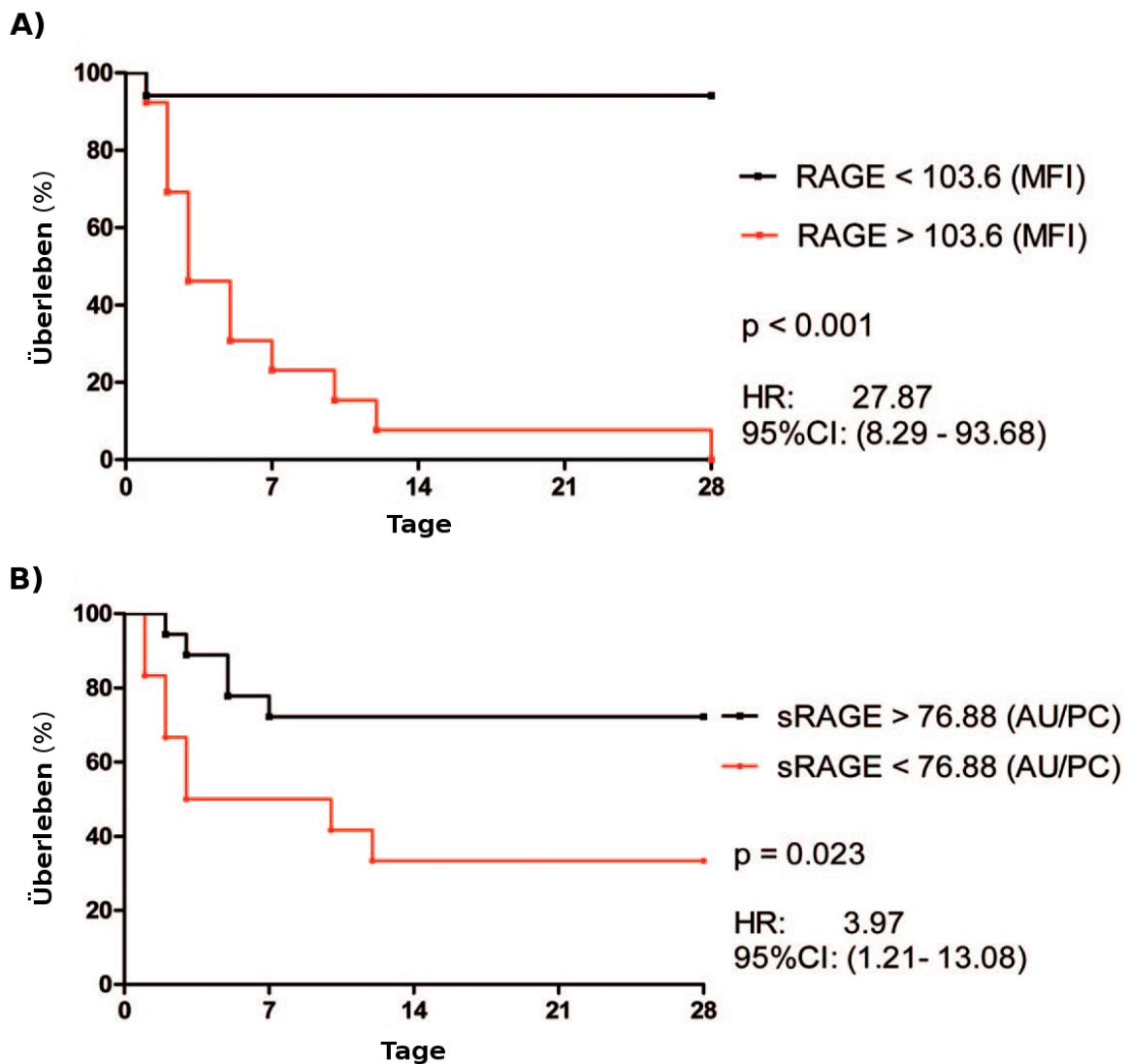
#### **4.6.3 RAGE und sRAGE zur Vorhersage der Wahrscheinlichkeit, am CS zu versterben**

Auf Grund des Verhaltens von RAGE bzw. sRAGE zum SAPS-II-Score fragten wir uns, inwieweit RAGE bzw. sRAGE mit der Mortalität der CS-Patienten zusammenhängen. Innerhalb der Nachbeobachtungszeit von 28 Tagen starben 13 CS-Patienten (43,3 %) an kardiovaskulären Ursachen. Anhand der ROC-Analyse stellten wir fest, dass mit einer monozytäre RAGE-Expression  $>103.6$  MFI bei Aufnahme auf die Intensivstation die Wahrscheinlichkeit, innerhalb von 28 Tagen zu versterben, eine Sensitivität von 92,31 % und eine Spezifität von 94,12 % ergab. In der Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier (siehe Abb. 18) hatten die Patienten im CS mit einer monozytären RAGE-Expression  $>103.6$  MFI eine 27,87fach höhere Wahrscheinlichkeit zu versterben (95 %CI 8.29-93.68). Der Unterschied im Überleben war statistisch signifikant ( $p < 0.001$ ).

Im Gegensatz dazu hatten die CS-Patienten mit einem höheren sRAGE-Level, wobei sRAGE mit dem SAPS-II-Score invers korreliert, bessere Überlebensraten. Ein niedriger sRAGE-Level  $<76.88$  AU/PC ging mit einer 3,97fach höheren Wahrscheinlichkeit nicht zu überleben einher (95 %CI 1.21-13.08), wohingegen ein hoher sRAGE-Level  $>76.88$  AU/PC mit einem besseren Überleben einherging. Anhand der ROC-Analyse zeigte sich, dass ein sRAGE-Level  $<76.88$  AU/PC eine Sensitivität von 62 % und eine Spezifität von 88 % aufweist, um die 28-Tages-Sterblichkeit vorherzusagen.

#### **4.6.4 RAGE und sRAGE als unabhängige Prädiktoren für die Vorhersage der 28-Tages-Mortalität**

Um zu prüfen, welche der Parameter unabhängige Prädiktoren für die Vorhersage der 28-Tages-Mortalität sind, wurde eine Cox-Regressionsanalyse durchgeführt (siehe Tab. 8, S. 55). Monozytäre RAGE-Expression, sRAGE-Level, SAPS-II-Score, Cardiac Power Index (CPI), IL-6 und pro-BNP werden als prognoserelevant für das Überleben im kardiogenen Schock diskutiert. In unserer Cox-Regressionsanalyse waren jedoch nur die monozytäre RAGE-Expression ( $p < 0.001$ ) und das Plasma-sRAGE-Niveau ( $p = 0.018$ ) signifikante unabhängige Prädiktoren für die 28-Tages-Mortalität bei Patienten im CS. Beim etablierten SAPS-II-Score war der p-Wert nur 0.977 und die Bedeutung des CPI war grenzwertig ( $p = 0.077$ ). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die monozytäre RAGE-Expression und das im Plasma zirkulierende sRAGE unabhängige Prädiktoren für die Vorhersage der 28-Tages-Mortalität sind. Dies bestätigen auch die Kaplan-Meier-Analysen zur monozytären RAGE-Expression und zirkulierendem sRAGE (siehe Abb. 18, S. 55).



**Abbildung 18:** Kaplan-Meier-Überlebenskurve für den kardiogenen Schock. **A)** anhand monozytärem RAGE oder **B)** anhand sRAGE. Die Cut-off-Werte basieren auf der ROC-Analyse. Hazard ratio (HR) mit Konfidenzintervall (CI), Log-rank-Test (p). AU: arbitrary unit. MFI: mittlere Fluoreszenzintensität. PC: Proteinkonzentration.

	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	Standard- koeffizient	T-Wert	p-Wert
<b>RAGE-Expression</b> auf Monozyten	0.008	0.002	0.712	4.998	< 0.001
<b>sRAGE</b> im Plasma	-0.004	0.001	-0.325	-2.641	<b>0.018</b>
<b>Cardiac Power Index</b>	-2.068	1.095	-0.203	-1.888	0.077
<b>SAPS-II-Score</b>	< -0.001	0.007	-0.005	-0.029	0.977
<b>Interleukin-6</b>	< 0.001	0.001	0.090	0.786	0.443
<b>pro-BNP</b>	< -0.001	<0.001	-0.069	-0.583	0.568

**Tabelle 8:** Unabhängige Prädiktoren für die 28-Tages-Mortalität in Patienten mit kardiogenem Schock (CS, n=30)

BNP: Brain natriuretic peptide. CS: Patient im kardiogenen Schock. RAGE: Receptor for advanced glycation end products. sRAGE: soluble RAGE, lösliches RAGE. SAPS-II-Score: Simplified Acute Physiology Score.

## 5 Diskussion

Der kardiogene Schock nach akutem Myokardinfarkt (AMI) ist immer noch mit einer hohen Mortalität behaftet. Es ist inzwischen bekannt, dass eine systemische inflammatorische Reaktion (SIRS), die durch oxidativen Stress vermittelt wird, eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielt und auch das Outcome negativ beeinflusst [34].

Der Rezeptor für advanced glycation end products (RAGE) wird physiologischerweise auf der Oberfläche einer Vielzahl von Immunzellen (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten), aber auch auf Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert [4, 61]. Durch RAGE vermittelte-Signalkaskaden werden systemische Entzündungsreaktionen ausgelöst [16, 68, 81]: Es kommt zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und proinflammatorischen Zytokinen (z. B. IL-6). Welche Rolle dabei dem Liganden-RAGE-System zukommt, ist weitgehend unklar. Bekannt ist, dass die RAGE-Liganden-Interaktion eine große Bedeutung in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen wie Atherosklerose, Diabetes mellitus, Autoimmunerkrankungen, neurodegenerativen Erkrankungen, Tumorwachstum und allgemeinen Alterungsprozessen hat [6, 20, 31, 61, 70, 77]. Vor kurzem wurde RAGE als Prognoseparameter beim septischen Schock postuliert [45]. Zunehmend wird auch klar, dass die RAGE-Liganden-Interaktion eine Rolle bei Ischämie und Reperfusion spielt [1, 3, 7, 13, 76, 82]. Daher haben wir in einer prospektiven Studie die Rolle der monozytären RAGE-Expression und der im Plasma zirkulierenden sRAGE-Konzentration bei Patienten im infarktbedingten kardiogenen Schock (CS) untersucht.

### 5.1 Klinische Daten der Studienpopulation

Der infarktbedingte kardiogene Schock geht immer noch mit einer hohen Sterblichkeit einher. In unserem – zugegebenermaßen sehr kleinen – Studienkollektiv haben wir trotz ähnlicher Altersverteilung im Vergleich zur Literatur eine deutlich niedrigere Mortalität (43,3% Nicht-Überlebende vs. 50-70%) gefunden [36, 34]. Ursächlich kann vielleicht die 100%ige Rate an Koronarintervention an allen Patienten im CS sowie die supportive Therapie mittels intraaortaler Ballongegenpulsation (IABP) sein, wobei die therapeutische Bedeutung der IABP gegenwärtig diskutiert wird [74].

Eine Prognoseabschätzung bei Patienten im CS ist wichtig. In den Publikationen wird zwischen kurz- und längerfristigem Überleben unterschieden. Es ist bekannt, dass die meisten Patienten innerhalb der ersten 48 h versterben [34, 65]. Jedoch ist es üblich, das 1-Monats-Überleben als Definition des kurzzeitigen Überlebens zu verwenden [32, 52]. Wir legten als Beobachtungszeitraum der Mortalität 28 Tage fest.



Zur klinischen Einschätzung der Schwere der Erkrankung verwendeten wir den „Simplified Acute Physiology Score“ (SAPS-II-Score) [28], ein etablierter Parameter in der Intensivmedizin, um die Mortalität zum Aufnahmezeitpunkt einzuschätzen. Der SAPS-II-Score ist geeignet, Patienten mit ACS zu beurteilen [66], und wird auch bei kardiogenen Schock-Patienten verwendet [74]. Unsere überlebenden Patienten im infarktbedingten kardiogenen Schock hatten signifikant niedrigere SAPS-II Werte als diejenigen Patienten, die verstarben. Im Vergleich zum SHOCK Trial waren unsere Patienten ähnlich schwer kritisch krank [58].

Wir führten eine Subgruppenanalyse zwischen gesunden Kontrollen, Patienten mit AMI, überlebenden Patienten im CS und nichtüberlebenden Patienten im CS durch. Dabei zeigte sich bzgl. der einzelnen Subgruppen kein Unterschied hinsichtlich Alter, Geschlecht, kardiovaskulären Risikofaktoren, Infarktlokalisierung, Zeitintervall zwischen Symptombeginn und Wiedereröffnung des verschlossenen Infarktgefäßes sowie intensivmedizinischer Therapie.

## 5.2 RAGE/sRAGE im kardiogenem Schock

Wir konnten zeigen, dass bei allen Patienten mit ACS die monozytäre RAGE-Expression im Vergleich zu den gesunden Kontrollen signifikant erhöht war. Die monozytäre RAGE-Expression war dabei in der Patientengruppe mit CS, die innerhalb von 28 Tagen verstorben waren, im Vergleich zu den Überlebenden im CS signifikant erhöht. Wir korrelierten die monozytäre RAGE-Expression mit dem SAPS-II-Score, um ihre prognostische Relevanz für das Überleben von Patienten im CS zu prüfen. Dabei zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der monozytären RAGE-Expression und dem SAPS-II-Score.

Im Gegensatz dazu waren die Plasma-sRAGE-Level bei den Nicht-Überlebenden im CS signifikant niedriger als bei den Überlebenden im CS und den unkompliziert verlaufenden AMI-Patienten. Passend hierzu zeigte sich ein signifikant inverses Verhältnis zum SAPS-II-Score. Unsere Daten sprechen dafür, dass eine RAGE-Aktivierung im kardiogenen Schock negative Auswirkungen auf das Überleben hat, wohingegen sRAGE möglicherweise eine protektive Rolle hat. Diese desaströse Wirkung der RAGE-Aktivierung haben bereits andere Arbeitsgruppen in präklinischen Daten nachweisen können [1, 13]. Für die negativen Auswirkungen einer RAGE-Aktivierung spricht, dass in der Kaplan-Meier-Kurve CS-Patienten, die eine monozytäre RAGE-Expression von  $>103.6$  MFI bei Aufnahme hatten, ein größeres Risiko hatten zu versterben.

### **5.3 RAGE und sRAGE zur Vorhersage der Wahrscheinlichkeit, am CS zu versterben**

In unseren Untersuchungen stellten wir fest, dass eine monozytäre RAGE-Expression  $>103.6$  MFI bei Aufnahme auf die Intensivstation sehr genau die Wahrscheinlichkeit vorhersagen kann, ob ein Patient im infarktbedingten CS innerhalb von 28 Tagen verstirbt (Sensitivität 92,31%, Spezifität von 94,12%). Wir konnten nachweisen, dass eine monozytäre RAGE-Expression MFI  $>103.6$  mit einem 28fach erhöhten Risiko zu versterben einhergeht. Dementsprechend hat ein niedriger sRAGE-Level  $<76.88$  AU/PC ein vierfach höheres Risiko zu versterben (Sensitivität 62%, Spezifität 88%). Auf Grund der kleinen Fallzahl bedarf es jedoch weiterer Studien, um bessere Cut-off-Werte für RAGE und sRAGE zu evaluieren, die vielleicht noch genauer die Mortalität vorhersagen können. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine hohe monozytäre RAGE-Expression negative Effekte im CS vermittelt, wohingegen ein hoher sRAGE-Level protektiv wirkt.

### **5.4 Unabhängige Prädiktoren für die Mortalität im CS**

Als prognostisch relevant für das Überleben eines Patienten im kardiogenen Schock werden in der Literatur folgende Parameter diskutiert: Cardiac Power Index (CPI), SAPS-II-Score, IL-6 und pro-BNP. In einer Cox-Regressionsanalyse untersuchten wir diese Parameter zusammen mit der monozytären RAGE-Expression und den Plasma-sRAGE-Spiegeln auf die Frage, ob es sich damit um unabhängige Prädiktoren für das Überleben eines Patienten im infarktbedingten CS handelt. Dabei erwiesen sich in unserem Patientengut der CPI, die monozytäre RAGE-Expression und die sRAGE-Plasmaspiegel als unabhängige Prädiktoren für das Überleben im CS.

Der Cardiac Power Index (CPI) ist ein wichtiger Prognose-Parameter im CS, ein erhöhter CPI geht mit einer höheren Mortalität einher [23]. Der CPI wird in der Literatur als ein unabhängiger Prädiktor für die Prognose eines CS-Patienten beschrieben [23, 78]. Je niedriger der CPI, desto höher die Sterblichkeit [18, 23]. Nach unseren Daten bestätigte sich der CPI als Prädiktor der 28-Tages-Mortalität an Hand der ROC-Analyse, er bestätigte sich jedoch nicht als unabhängiger Prädiktor in der Cox-Analyse, vermutlich da er von der Organdurchblutung, dem Blutfluss (HZV) und dem Perfusionsdruck (mittlerer systemarterieller Blutdruck) abhängig ist.

Der SAPS-II-Score [28] ist ein etablierter Parameter in der Intensivmedizin, um die Mortalität beim Aufnahmezeitpunkt einzuschätzen. Er ist geeignet, Patienten mit ACS zu beurteilen [66] und wird auch bei kardiogenen Schock-Patienten verwendet [74].

Hinsichtlich des SAPS-II-Scores zeigten die Nicht-Überlebenden im CS signifikant höhere Werte, was auf das Vorliegen eines MODS hindeutet. Laut unseren Daten ist der SAPS-II-Score zwar ein Prädiktor der Mortalität, dabei aber keine unabhängiger Variable für die Mortalität von Patienten im CS.

Interleukin-6 (IL-6) war bei den Nichtüberlebenden im CS signifikant höher. Es ist bekannt, dass IL-6 beim kardiogenen Schock nach AMI erhöht ist und mit einem Multiorganversagen einhergeht [19, 30], dementsprechend bestätigte sich IL-6 als Prädiktor der Mortalität, ist aber kein unabhängiger Prädiktor.

Als Hinweis auf die Herzinsuffizienz hatten die Patienten im CS signifikant höhere proBNP-Werte als die Patienten mit unkompliziertem AMI, bei der Differenzierung in Überleben und Nicht-Überleben zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede bei den Patienten mit CS. Es ist bekannt, dass ein Multiorgandysfunktionssyndrom die Elimination des pro-BNPs vermindert [63], was die Unterschiede im Vergleich AMI vs. CS erklären könnte. Jedoch ist eben die Wertigkeit beim kritisch Kranken auf Grund des Multiorgandysfunktionssyndrom eingeschränkt [63]. Der Patient im kardiogenen Schock stirbt nicht allein am hämodynamischen Pumpversagen, sondern auch an der SIRS. Hinsichtlich der Beurteilung der Mortalität war die AUC sehr klein und pro-BNP war bei unseren Patienten kein unabhängiger Prädiktor für die Mortalität.

Wie bereits oben erwähnt, zeigte der Vergleich von diesen bekannten Parametern mit der monozytären RAGE-Expression und des Plasma-sRAGE-Levels in der ROC-Analyse eine genauere Vorhersage der Mortalität. In der Cox-Analyse bestätigten sich erstaunlicherweise die monozytäre RAGE-Expression ( $p < 0.001$ ) und der Plasma-sRAGE-Level ( $p < 0.018$ ) als signifikante Prädiktoren der 28-Tages-Mortalität. Unsere Arbeit fand als erste diese Bedeutung von RAGE und sRAGE im kardiogenen Schock.

## **5.5 Die Bedeutung der sRAGE-RAGE-Interaktion für ihre Liganden und die Immunantwort**

Das im Plasma zirkulierende sRAGE hat eine protektive Bedeutung, indem es frei zirkulierende Liganden bindet und dadurch eine proinflammatorische Liganden-RAGE-Rezeptor-Signalkaskade verhindert [1, 14, 13]. Wir fanden eine inverse Korrelation zwischen dem Plasma-sRAGE-Level und der monozytären RAGE-Expression bei allen Patienten mit ACS. Dieser Zusammenhang unterstreicht die unterschiedliche Bedeutung von RAGE hinsichtlich seiner destruktiven und von sRAGE hinsichtlich seiner protektiven Effekte bei Patienten im CS. Der erhöhte sRAGE-Level im Plasma und die erniedrigte monozytäre

RAGE-Expression bei den Überlebenden im CS sprechen dafür, dass in dieser Patientengruppe sRAGE seine neutralisierende Wirkung durch den größeren Pool an löslichem RAGE-Rezeptor besser entfalten kann und somit durch diesen protektiven Effekt für das bessere Überleben verantwortlich sein könnte.

## 5.6 Die Bedeutung von MMP-9 für das RAGE-Shedding

Unsere Untersuchungen zeigen, dass die aktive MMP-9 *in vitro* für die RAGE-Abspaltung auf Monozyten verantwortlich ist und zu einer konsekutiven sRAGE-Erhöhung im Plasma führen kann. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten bereits, dass es in einigen Zelllinien einen RAGE-Shedding-Mechanismus gibt und dass dieser durch eine *in-vitro*-Aktivierung der Metalloproteinasen (nämlich MMP-9 und ADAM-10) hochreguliert werden kann [62, 87]. Wir fanden ähnliche Ergebnisse in einer *in-vitro*-Aktivierung der MMP-9 in humanen PBMCs: Durch APMA-Aktivierung der MMP-9 in PBMCs von gesunden Probanden wurden etwa 35 % des vorher Zellmembran-gebundenen RAGE freigesetzt und es kam gleichzeitig zu einer Zunahme an sRAGE im Zellkulturüberstand. Somit zeigen unsere Daten eindeutig, dass der vollständige Rezeptor von der Zelloberfläche abgespalten werden kann, wobei die aktive MMP-9 dabei eine wichtige Rolle spielt. Die inverse Korrelation von monozytärer RAGE-Expression und Plasma-sRAGE-Level bei Patienten mit ACS legt nahe, dass ein solcher Shedding-Mechanismus auch *in vivo* möglich sein könnte. Möglicherweise kann die aktive MMP-9 auf das Verhältnis der monozytären RAGE-Expression und dem Plasma-sRAGE-Level modulierend einwirken, wie unsere Daten der *in-vitro*-Aktivierung der MMP-9 mit konsekutiver sRAGE-Erhöhung vermuten lassen.

## 5.7 Limitationen der Studie

Auch wenn wir zum ersten Mal prospektiv die Rolle der monozytären RAGE-Expression und der im Plasma zirkulierenden sRAGE-Konzentration im Studienkollektiv untersuchten, muss man bedenken, dass das Studienkollektiv mit insgesamt 50 Patienten im Akuten Koronarsyndrom (AMI: n=20, CS: n=30) sehr gering ist. Außerdem ist es eine monozentrische Studie. Ziel dieser Pilotstudie war es, erstmalig die Rolle von RAGE und sRAGE im kardiogenen Schock zu untersuchen. Nun wird es größerer Studien bedürfen, um die Rolle von RAGE und sRAGE besser einschätzen zu können und auch die Bedeutung als prognostischen Biomarker zu untersuchen.

Um die Relevanz von RAGE und sRAGE als Prognoseparameter im kardiogenen Schock zu beurteilen, braucht man nicht nur ein größeres Studienkollektiv, sondern auch eine Untersuchung des sRAGE-Levels im Krankheitsverlauf. Interessant wäre es, auch die

Veränderung von RAGE/sRAGE unter der therapeutischen Intervention zu beobachten, wie es vom National Institut of Health für die Etablierung von Biomarkern gefordert wird (siehe [11]). Ziel dieser Studie war es aber nicht, RAGE/sRAGE als Prognoseparameter zu etablieren, sondern die generelle Bedeutung im kardiogenen Schock zu untersuchen.

Die negativen Auswirkungen der monozytären RAGE-Expression vermuten wir durch die erhöhte RAGE-Expression auf Monozyten bei den Nicht-Überlebenden im CS. Jedoch wirken die RAGE-vermittelten Signalkaskaden mit einer konsekutiven Inflammationsreaktion nicht nur an den Monozyten, sondern auch auf Endothelzellen oder Kardiomyozyten. Auch das gemessene sRAGE kann als Pool von verschiedensten Zellen stammen. Bei unserer Messung von sRAGE mittels Westernblot ließ sich der Plasma-sRAGE-Level erheben, die Herkunft desselben ließ sich jedoch nicht bestimmen. Unsere Daten unterstützen die Ergebnisse von anderen Gruppen, welche auch eine positive Korrelation von sRAGE mit der endothelialen Funktion gefunden haben [17, 21, 51]. Vermutlich stammt das sRAGE in der Blutbahn von Endothelzellen, welche einen großen Teil der RAGE-Expression ausmachen [4, 16]. Renale Zellen [25], Monozyten oder Zellen der glatten Muskulatur können auch zum Pool des zirkulierenden sRAGE beitragen [61]. Welche Zellart dabei den größten Anteil beiträgt, bleibt unklar. Unsere Untersuchungen, u. a. die Stimulierung der PBMCs mit konsekutivem sRAGE-Anstieg, unterstützen die Vermutung, dass auch PBMCs v. a. Monozyten zum Plasma-sRAGE-Pool beitragen. Wir haben in unserem Pilotversuch erstmals einen möglichen Abspaltungsmechanismus von sRAGE auf PBMCs nachweisen können.

## 5.8 Ausblick

Wir konnten feststellen, dass die monozytäre RAGE-Expression und die zirkulierende Plasma-sRAGE-Konzentration wichtige unabhängige Prädiktoren für die Voraussage der 28-Tagessterblichkeit im kardiogenen Schock sind. Dem Liganden-RAGE-System kommt somit eine große Bedeutung in der Prognoseabschätzung bei Patienten im kardiogenen Schock zu. Ferner könnte sich durch Modulation der sRAGE-RAGE-Interaktion ein neuer therapeutischer Ansatz in der Behandlung eines kardiogenen Schocks ergeben. Erste tierexperimentelle Studien mit Gabe von rekombinantem sRAGE zeigten bereits positive Effekte auf [1, 14, 13]. Weitere klinischen Studien müssen folgen.

## 6 Eigene Publikationen

### Eigene Publikationen

- Selejan S, Pöss J, Hewera L, Kazakov A, Böhm M, Link A (2012). **Role of Receptor for advanced glycation end products in cardiogenic shock**. Crit Care Med 40: 1513–1522.
- Link A, Selejan S, Hewera L, Walter F, Nickenig G, Böhm M (2011). **Rosuvastatin induces apoptosis in CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> T cells in patients with acute coronary syndromes**. Clin Res Cardiol 100: 147–158.

### Poster

- Selejan S, Walter F, Hewera L, Böhm M, Link A (2010). **Überexpression von TLR-2 und TLR-4 in Monozyten von Patienten im kardiogenen Schock nach Myokardinfarkt**. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, 76. Jahrestagung.
- Hewera L, Selejan S, Walter F, Kazakov A, Böhm M, Link A (2010). **Bedeutung von sRAGE und RAGE im kardiogenen Schock**. Intensivmed 47: 289–324
- Selejan S, Hewera L, Böhm M, Link A (2009). **sRAGE influences mortality in cardiogenic shock**. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, 75. Jahrestagung.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] **Aleshin A, Ananthakrishnan R, Li Q, Rosario R, Lu Y, Qu W, Song F, Bakr S, Szabolcs M, D'Agati V, Liu R, Homma S, Schmidt A M, Yan S F, Ramasamy R** (2008). RAGE modulates myocardial injury consequent to LAD infarction via impact on JNK and STAT signaling in a murine model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H1823–H1832.
- [2] **Andersson U, Erlandsson-Harris H, Yang H, Tracey K J** (2002). HMGB1 as a DNA-binding cytokine. *J Leukoc Biol* 72: 1084–1091.
- [3] **Andrassy M, Volz H C, Igwe J C, Funke B, Eichberger S N, Kaya Z, Buss S, Autschbach F, Pleger S T, Lukic I K, Bea F, Hardt S E, Humpert P M, Bianchi M E, Mairbäurl H, Nawroth P P, Remppis A, Katus H A, Bierhaus A** (2008). High-mobility group box-1 in ischemia-reperfusion injury of the heart. *Circulation* 117: 3216–3226.
- [4] **Basta G** (2008). Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis* 196: 9–21.
- [5] **Basta G, Corciu A I, Vianello A, Turco S D, Foffa I, Navarra T, Chiappino D, Berti S, Mazzone A** (2010). Circulating soluble receptor for advanced glycation end-product levels are decreased in patients with calcific aortic valve stenosis. *Atherosclerosis* 210: 614–618.
- [6] **Basta G, Sironi A M, Lazzerini G, Turco S D, Buzzigoli E, Casolaro A, Natali A, Ferrannini E, Gastaldelli A** (2006). Circulating soluble receptor for advanced glycation end products is inversely associated with glycemic control and S100A12 protein. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 4628–4634.
- [7] **Basta G, Turco S D, Marchi F, Navarra T, Battaglia D, Mercuri A, Mazzone A, Berti S** (2011). Elevated soluble receptor for advanced glycation end product levels in patients with acute coronary syndrome and positive cardiac troponin I. *Coron Artery Dis* 22: 590–594.
- [8] **Bianchi M E** (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81: 1–5.
- [9] **Bierhaus A, Humpert P M, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern D M, Nawroth P P** (2005). Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med* 83: 876–886.

- [10] **Bierhaus A, Stern D M, Nawroth P P** (2006). RAGE in inflammation: a new therapeutic target? *Curr Opin Investig Drugs* 7: 985–991.
- [11] **Biomarkers Definitions Working Group** (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69: 89–95.
- [12] **Bopp C, Bierhaus A, Hofer S, Bouchon A, Nawroth P P, Martin E, Weigand M A** (2008). Bench-to-bedside review: The inflammation-perpetuating pattern-recognition receptor RAGE as a therapeutic target in sepsis. *Crit Care* 12: 201.
- [13] **Bucciarelli L G, Kaneko M, Ananthakrishnan R, Harja E, Lee L K, Hwang Y C, Lerner S, Bakr S, Li Q, Lu Y, Song F, Qu W, Gomez T, Zou Y S, Yan S F, Schmidt A M, Ramasamy R** (2006). Receptor for advanced-glycation end products: key modulator of myocardial ischemic injury. *Circulation* 113: 1226–1234.
- [14] **Bucciarelli L G, Wendt T, Qu W, Lu Y, Lalla E, Rong L L, Goova M T, Moser B, Kislinger T, Lee D C, Kashyap Y, Stern D M, Schmidt A M** (2002). RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 106: 2827–2835.
- [15] **Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T** (2003). Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 253: 269–285.
- [16] **Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, Schneider D, Witte S, Linn T, Nagashima M, Morser J, Arnold B, Preissner K T, Nawroth P P** (2003). The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J Exp Med* 198: 1507–1515.
- [17] **Chiang K H, Huang P H, Huang S S, Wu T C, Chen J W, Lin S J** (2009). Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products are associated with endothelial function and predict cardiovascular events in nondiabetic patients. *Coron Artery Dis* 20: 267–273.
- [18] **Cotter G, Moshkovitz Y, Kaluski E, Milo O, Nobikov Y, Schneeweiss A, Krakover R, Vered Z** (2003). The role of cardiac power and systemic vascular resistance in the pathophysiology and diagnosis of patients with acute congestive heart failure. *Eur J Heart Fail* 5: 443–451.
- [19] **Debrunner M, Schuiki E, Minder E, Straumann E, Naegeli B, Mury R, Bertel O, Frielingsdorf J** (2008). Proinflammatory cytokines in acute myocardial infarction with and without cardiogenic shock. *Clin Res Cardiol* 97: 298–305.



- [20] **Emanuele E, D'Angelo A, Tomaino C, Binetti G, Ghidoni R, Politi P, Bernardi L, Maletta R, Bruni A C, Geroldi D** (2005). Circulating levels of soluble receptor for advanced glycation end products in Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch Neurol* 62: 1734–1736.
- [21] **Falcone C, Emanuele E, D'Angelo A, Buzzi M P, Belvito C, Cuccia M, Geroldi D** (2005). Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary artery disease in nondiabetic men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1032–1037.
- [22] **Ferroni P, Basili S, Martini F, Cardarello C M, Ceci F, Franco M D, Bertazzoni G, Gazzaniga P P, Alessandri C** (2003). Serum metalloproteinase 9 levels in patients with coronary artery disease: a novel marker of inflammation. *J Investig Med* 51: 295–300.
- [23] **Fincke R, Hochman J S, Lowe A M, Menon V, Slater J N, Webb J G, LeJemtel T H, Cotter G, Investigators S H O C K** (2004). Cardiac power is the strongest hemodynamic correlate of mortality in cardiogenic shock: a report from the SHOCK trial registry. *J Am Coll Cardiol* 44: 340–348.
- [24] **Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J** (2007). S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* 81: 28–37.
- [25] **Forbes J M, Thorpe S R, Thallas-Bonke V, Pete J, Thomas M C, Deemer E R, Bassal S, El-Osta A, Long D M, Panagiotopoulos S, Jerums G, Osicka T M, Cooper M E** (2005). Modulation of soluble receptor for advanced glycation end products by angiotensin-converting enzyme-1 inhibition in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 16: 2363–2372.
- [26] **Fukuda D, Shimada K, Tanaka A, Kusuyama T, Yamashita H, Ehara S, Nakamura Y, Kawarabayashi T, Iida H, Yoshiyama M, Yoshikawa J** (2006). Comparison of levels of serum matrix metalloproteinase-9 in patients with acute myocardial infarction versus unstable angina pectoris versus stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 97: 175–180.
- [27] **Furenes E B, Arnesen H, Solheim S, Grøgaard H K, Hoffmann P, Seljeflot I** (2009). The profile of circulating metalloproteinases after PCI in patients with acute myocardial infarction or stable angina. *Thromb Res* 124: 560–564.
- [28] **Gall J R L, Lemeshow S, Saulnier F** (1993). A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* 270: 2957–2963.

- [29] **Geppert A, Huber K** (2004). Inflammation and cardiovascular diseases: lessons that can be learned for the patient with cardiogenic shock in the intensive care unit. *Curr Opin Crit Care* 10: 347–353.
- [30] **Geppert A, Steiner A, Zorn G, Delle-Karth G, Koreny M, Haumer M, Siostrzonek P, Huber K, Heinz G** (2002). Multiple organ failure in patients with cardiogenic shock is associated with high plasma levels of interleukin-6. *Crit Care Med* 30: 1987–1994.
- [31] **Geroldi D, Falcone C, Emanuele E, D’Angelo A, Calcagnino M, Buzzi M P, Scioli G A, Fogari R** (2005). Decreased plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end-products in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 23: 1725–1729.
- [32] **Goldberg R J, Spencer F A, Gore J M, Lessard D, Yarzebski J** (2009). Thirty-year trends (1975 to 2005) in the magnitude of, management of, and hospital death rates associated with cardiogenic shock in patients with acute myocardial infarction: a population-based perspective. *Circulation* 119: 1211–1219.
- [33] **Group T T S** (1985). The Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) trial. Phase I findings. TIMI Study Group. *N Engl J Med* 312: 932–936.
- [34] **Hochman J S** (2003). Cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction: expanding the paradigm. *Circulation* 107: 2998–3002.
- [35] **Hochman J S, Buller C E, Sleeper L A, Boland J, Dzavik V, Sanborn T A, Godfrey E, White H D, Lim J, LeJemtel T** (2000). Cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction—etiologies, management and outcome: a report from the SHOCK Trial Registry. SHould we emergently revascularize Occluded Coronaries for cardiogenic shock? *J Am Coll Cardiol* 36: 1063–1070.
- [36] **Hochman J S, Sleeper L A, Webb J G, Sanborn T A, White H D, Talley J D, Buller C E, Jacobs A K, Slater J N, Col J, McKinlay S M, LeJemtel T H** (1999). Early revascularization in acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock. SHOCK Investigators. Should We Emergently Revascularize Occluded Coronaries for Cardiogenic Shock. *N Engl J Med* 341: 625–634.
- [37] **Janssens U** (2006). Infarktbedingter kardiogener Schock. *Der Internist* 47: 383–388.
- [38] **Janssens U, Garf J** (2010). Sterblichkeit bei Patienten mit refraktärem kardiogenem Schock. *Intensivmed* 47: 286–288.
- [39] **Kasper M, Funk R H** (2001). Age-related changes in cells and tissues due to advanced glycation end products (AGEs). *Arch Gerontol Geriatr* 32: 233–243.

- [40] **Kohsaka S, Menon V, Lowe A M, Lange M, Dzavik V, Sleeper L A, Hochman J S, Investigators S H O C K** (2005). Systemic inflammatory response syndrome after acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock. *Arch Intern Med* 165: 1643–1650.
- [41] **Konstantino Y, Nguyen T T, Wolk R, Aiello R J, Terra S G, Fryburg D A** (2009). Potential implications of matrix metalloproteinase-9 in assessment and treatment of coronary artery disease. *Biomarkers* 14: 118–129.
- [42] **Koyama H, Shoji T, Yokoyama H, Motoyama K, Mori K, Fukumoto S, Emoto M, Shoji T, Tamei H, Matsuki H, Sakurai S, Yamamoto Y, Yonekura H, Watanabe T, Yamamoto H, Nishizawa Y** (2005). Plasma level of endogenous secretory RAGE is associated with components of the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2587–2593.
- [43] **Kupai K, Szucs G, Cseh S, Hajdu I, Csonka C, Csont T, Ferdinandy P** (2010). Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *J Pharmacol Toxicol Methods* 61: 205–209.
- [44] **Kushner F G, Hand M, Smith S C, King S B, Anderson J L, Antman E M, Bailey S R, Bates E R, Blankenship J C, Casey D E, Green L A, Hochman J S, Jacobs A K, Krumholz H M, Morrison D A, Ornato J P, Pearle D L, Peterson E D, Sloan M A, Whitlow P L, Williams D O, of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines A C** (2009). 2009 Focused Updates: ACC/AHA Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction (updating the 2004 Guideline and 2007 Focused Update) and ACC/AHA/SCAI Guidelines on Percutaneous Coronary Intervention (updating the 2005 Guideline and 2007 Focused Update): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 120: 2271–2306.
- [45] **Liliensiek B, Weigand M A, Bierhaus A, Nicklas W, Kasper M, Hofer S, Plachky J, Gröne H J, Kurschus F C, Schmidt A M, Yan S D, Martin E, Schleicher E, Stern D M, ünterJ Hämmerling G G, Nawroth P P, Arnold B** (2004). Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *J Clin Invest* 113: 1641–1650.
- [46] **Link A, Böhm M** (2004). Kardiogener Schock – Diagnostik. *Dtsch Med Wochenschr* 129: 2418–2420.
- [47] **Link A, Böhm M** (2004). Kardiogener Schock – Therapie. *Dtsch Med Wochenschr* 129: 2421–2424.

- [48] **Link A, Böhm M, Nickenig G** (2002). Akutes Koronarsyndrom – bessere Risikostratifizierung durch Bestimmung von Entzündungsparametern? *Medizinische Klinik* 97: 63–69.
- [49] **Link A, Schwerdt H, Hennen B, Böhm M** (2004). [Polymorphonuclear neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion injury. Influence of coronary intervention?]. *Z Kardiol* 93: 605–611.
- [50] **Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275.
- [51] **Mahajan N, Malik N, Bahl A, Sharma Y, Dhawan V** (2009). Correlation among soluble markers and severity of disease in non-diabetic subjects with premature coronary artery disease. *Mol Cell Biochem* 330: 201–209.
- [52] **Marcolino M S, Simsek C, de Boer S P M, van Domburg R T, van Geuns R J, de Jaegere P, Akkerhuis K M, Daemen J, Serruys P W, Boersma E** (2012). Short- and long-term major adverse cardiac events in patients undergoing percutaneous coronary intervention with stenting for acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock. *Cardiology* 121: 47–55.
- [53] **Matzinger P** (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12: 991–1045.
- [54] **McNair E D, Wells C R, Qureshi A M, Pearce C, Caspar-Bell G, Prasad K** (2011). Inverse Association between Cardiac Troponin-I and Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products in Patients with Non-ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *Int J Angiol* 20: 49–54.
- [55] **Medzhitov R** (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454: 428–435.
- [56] **Mehta J L, Sanada N, Hu C P, Chen J, Dandapat A, Sugawara F, Satoh H, Inoue K, Kawase Y, Jishage K, Suzuki H, Takeya M, Schnackenberg L, Beger R, Hermonat P L, Thomas M, Sawamura T** (2007). Deletion of LOX-1 reduces atherogenesis in LDLR knockout mice fed high cholesterol diet. *Circ Res* 100: 1634–1642.
- [57] **Prasad A, Stone G W, Holmes D R, Gersh B** (2009). Reperfusion injury, microvascular dysfunction, and cardioprotection: the “dark side“ of reperfusion. *Circulation* 120: 2105–2112.
- [58] **Prondzinsky R, Lemm H, Swyter M, Wegener N, Unverzagt S, Carter J M, Russ M, Schlitt A, Buerke U, Christoph A, Schmidt H, Winkler M, Thiery J, Werdan K, Buerke M** (2010). Intra-aortic balloon counterpulsation

in patients with acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock: the prospective, randomized IABP SHOCK Trial for attenuation of multiorgan dysfunction syndrome. *Crit Care Med* 38: 152–160.

- [59] **Pudil R, Krejsek J, Pidrman V, Gregor J, Tichý M, Bures J** (2001). Inflammatory response to acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 44: 149–151.
- [60] **Ramasamy R, Yan S F, Herold K, Clynes R, Schmidt A M** (2008). Receptor for advanced glycation end products: fundamental roles in the inflammatory response: winding the way to the pathogenesis of endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1126: 7–13.
- [61] **Ramasamy R, Yan S F, Schmidt A M** (2009). RAGE: therapeutic target and biomarker of the inflammatory response—the evidence mounts. *J Leukoc Biol* 86: 505–512.
- [62] **Rauci A, Cugusi S, Antonelli A, Barabino S M, Monti L, Bierhaus A, Reiss K, Saftig P, Bianchi M E** (2008). A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J* 22: 3716–3727.
- [63] **Reith S, Marx N** (2012). Kardiale Biomarker bei kritisch Kranken. *Med Klin Intensivmed Notfmed* 107: 17–23.
- [64] **Rits I A** (1964). Declaration of Helsinki. Recommendations guidings doctors in clinical research. *World Med J* 11: 281.
- [65] **Ruiz-Bailén M, Rucabado-Aguilar L, Expósito-Ruiz M, Morante-Valle A, Castillo-Rivera A, Pintor-Mármol A, Rosell-Ortiz F, Mellado-Vergel F J, Machado-Casas J, Tejero-Pedregosa A, Lara-Torrano J** (2009). Cardiogenic shock in acute coronary syndrome. *Med Sci Monit* 15: RA57–RA66.
- [66] **Schuster H P, Schuster F P, Ritschel P, Wilts S, Bodmann K F** (1997). The ability of the Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) to predict outcome in coronary care patients. *Intensive Care Med* 23: 1056–1061.
- [67] **Sims G P, Rowe D C, Rietdijk S T, Herbst R, Coyle A J** (2010). HMGB1 and RAGE in Inflammation and Cancer. *Annu Rev Immunol* 28: 367–388.
- [68] **Sparvero L J, Asafu-Adjei D, Kang R, Tang D, Amin N, Im J, Rutledge R, Lin B, Amoscato A A, Zeh H J, Lotze M T** (2009). RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE ligands, and their role in cancer and inflammation. *J Transl Med* 7: 17.

- [69] **Spinale F G** (2007). Myocardial Matrix Remodeling and the Matrix Metalloproteases: Influence on Cardiac Form and Function. *Physiol Rev* 87: 1285–1342.
- [70] **Steiner J, Walter M, Wunderlich M T, Bernstein H G, Panteli B, Brauner M, Jacobs R, Gos T, Rothermundt M, Bogerts B** (2009). A new pathophysiological aspect of S100B in schizophrenia: potential regulation of S100B by its scavenger soluble RAGE. *Biol Psychiatry* 65: 1107–1110.
- [71] **Stirban A** (2010). Die Bedeutung von AGEs und ROS bei Atherosklerose. *Herz* 35: 170–180.
- [72] **Tan J, Hua Q, Gao J, Fan Z X** (2008). Clinical implications of elevated serum interleukin-6, soluble CD40 ligand, metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Clin Cardiol* 31: 413–418.
- [73] **Thiele H, Allam B, Chatellier G, Schuler G, Lafont A** (2010). Shock in acute myocardial infarction: the Cape Horn for trials? *Eur Heart J* 31: 1828–1835.
- [74] **Thiele H, Zeymer U, Neumann F J, Ferenc M, Olbrich H G, Hausleiter J, Richardt G, Hennersdorf M, Empen K, Fuernau G, Desch S, Eitel I, Hambrecht R, Fuhrmann J, Böhm M, Ebel H, Schneider S, Schuler G, Werdan K, Investigators I A B P S H O C K I T** (2012). Intraaortic balloon support for myocardial infarction with cardiogenic shock. *N Engl J Med* 367: 1287–1296.
- [75] **Trepels T, Zeiher A M, Fichtlscherer S** (2004). Akutes Koronarsyndrom und Entzündung. *Herz* 29: 769–776.
- [76] **Vazzana N, Santilli F, Cuccurullo C, Davì G** (2009). Soluble forms of RAGE in internal medicine. *Intern Emerg Med* 4: 389–401.
- [77] **Wendt T, Harja E, Bucciarelli L, Qu W, Lu Y, Rong L L, Jenkins D G, Stein G, Schmidt A M, Yan S F** (2006). RAGE modulates vascular inflammation and atherosclerosis in a murine model of type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 185: 70–77.
- [78] **Werdan K, Ruß M, Buerke M, Engelmann L, Ferrari M, Friedrich I, Geppert A, Graf J, Hindricks G, Janssens U, Pieske B, Prondzinsky R, Reith S, Trappe H J, Zehender M, Zerkowski H R, Zeymerand U, Adams H, Briegel J, Delle-Karth G, Schöndube F, Schwaab B, Bode C, Christoph A, Erbel R, Fuhrmann J, Strasser R, Figulla H R, Gorge G, Schmitt D, Schuler G, Silber R E, Tebbe U, Zwißler B** (2011). Deutsch-österreichische S3-Leitlinie Infarktbedingter kardiogener Schock – Diagnose, Monitoring und Therapie. *Kardiologie* 5: 166–224.

- [79] **de Werf F V, Bax J, Betriu A, Blomstrom-Lundqvist C, Crea F, Falk V, Filippatos G, Fox K, Huber K, Kastrati A, Rosengren A, Steg P G, Tubaro M, Verheugt F, Weidinger F, Weis M, for Practice Guidelines (CPG) E S C C** (2008). Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 29: 2909–2945.
- [80] **Yamamoto Y, Miura J, Sakurai S, Watanabe T, Yonekura H, Tamei H, Matsuki H, Obata K, Uchigata Y, Iwamoto Y, Koyama H, Yamamoto H** (2007). Assaying soluble forms of receptor for advanced glycation end products. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: e33–e34.
- [81] **Yan S D, Schmidt A M, Anderson G M, Zhang J, Brett J, Zou Y S, Pinsky D, Stern D** (1994). Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 269: 9889–9897.
- [82] **Yan S F, Ramasamy R, Schmidt A M** (2010). The RAGE axis: a fundamental mechanism signaling danger to the vulnerable vasculature. *Circ Res* 106: 842–853.
- [83] **Yellon D M, Hausenloy D J** (2007). Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 357: 1121–1135.
- [84] **Zeymer U, Zahn R, Senges J, Gitt A** (2010). Herzinfarktregister in Deutschland. Konsequenzen für die Arzneimitteltherapie bei Patienten mit akutem ST-Strecken-Hebungsinfarkt. *Internist* 51: 1324–7, 1329.
- [85] **Zhang F, Banker G, Liu X, Suwanabol P A, Lengfeld J, Yamanouchi D, Kent K C, Liu B** (2011). The novel function of advanced glycation end products in regulation of MMP-9 production. *J Surg Res* 171: 871–876.
- [86] **Zhang F, Kent K C, Yamanouchi D, Zhang Y, Kato K, Tsai S, Nowygrod R, Schmidt A M, Liu B** (2009). Anti-receptor for advanced glycation end products therapies as novel treatment for abdominal aortic aneurysm. *Ann Surg* 250: 416–423.
- [87] **Zhang L, Bukulin M, Kojro E, Roth A, Metz V V, Fahrenholz F, Nawroth P P, Bierhaus A, Postina R** (2008). Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. *J Biol Chem* 283: 35 507–35 516.

## 8 Danksagungen

An erster Stelle möchte ich meinen Eltern und Schwestern danken. Ohne sie, ihren Glauben an mich in den Krisenzeiten auf dem Weg zu meinem Medizinstudium und ihre Unterstützung, wäre ich heute nicht dort, wo ich jetzt bin.

Herrn PD OA Andreas Link gilt mein Dank für die Überlassung des Themas. Zudem für die äußerst kompetente Betreuung und die Bereitschaft, jederzeit als Ansprechpartner zur Verfügung zu stehen, sowie für sein Vertrauen in meine Arbeit, welche er konstruktiv kritisch unterstützte. Den Titel Doktorvater hat er für mich wirklich erlebbar gemacht. Er hat mich nicht nur hinsichtlich dieser Forschungsarbeit auf äußerst kompetente/einfühlsame Weise begleitet.

Ganz herzlichen Dank auch an meine Betreuerin, Fr. Dr. Simina Selejan, die mir nicht nur fachlich mit Rat zur Seite stand. Durch ihre kompetente Einführung in die Methoden fühlte ich mich bestens betreut. Ihre Begeisterung für die Wissenschaft war sehr motivierend.

Herrn Prof. Dr. Michael Böhm möchte ich danken für die Möglichkeit, im Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin III der Universität des Saarlandes meine Arbeit durchführen zu können.

Meinen Freunden, die mich während der arbeitsintensiven Laborphasen nicht im Stich gelassen haben. Es geht ein besonderer Dank an Magdalena Aures, die mich beim Schreiben immer motivierte; Michael Busch und Norbert Schuch, die mich bei meinen Kämpfen mit L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X unterstützt haben; Christian Stroppel, der geduldig auf mich gewartet hat, wenn es später geworden ist.

Mein Dank gilt auch der MTA unserer AG, Fr. Nina Rebmann, für die Einführung in die Laborarbeit sowie ihre Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich allen Mitdoktoranden/-innen, Assistenzärzten/-innen und technischen Assistentinnen des Labors für die freundschaftliche Zusammenarbeit. Dies hat das Einleben in den „Laboralltag“ sehr erleichtert.

Ein großer Dank gilt auch den Pflegern/-innen und Ärzten/-innen der M3-07 und M3-04 für die gute Zusammenarbeit während der Rekrutierung der Patienten sowie ihrer Bereitschaft mir als Probanden zur Verfügung zu stehen. Dafür herzlichen Dank!

Die Studie wurde finanziell gefördert durch HOMFOR der Universität des Saarlandes.



## 9 Lebenslauf

### **PERSÖNLICHE DATEN**

---

Name: Lisa Franziska Hewera  
Geburtsdatum: xxxx  
Geburtsort: xxx  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### **AKADEMISCHE AUSBILDUNG**

---

WS 04/05–WS 05/06 Externe Medizinstudentin: Universität zu Köln, LMU München  
SS 06 Zulassung zum Medizinstudium, Universität des Saarlandes  
WS 06/07 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
08/2010–07/2011 Praktisches Jahr: Royal Preston Hospital, UK;  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg  
10/2011–12/2011 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### **FACHARZTAUSBILDUNG für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie**

---

03/2012–03/2013 Innere Medizin, Kreisklinikum Vinzentinum, Ruhpolding  
unter CA Dr. S. Pscherer und CA Dr. T. Koch  
seit 04/2013 Psychosomatische Medizin, CIP Klinik Dr. Schlemmer, Bad Tölz  
unter CA Dr. M. Reicherzer

### **WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT**

---

seit 10/2008 Doktorandin unter OA Priv. Doz. Dr. A. Link  
08/2009–02/2010 Hilfswissenschaftliche Mitarbeiterin im kardiologischen  
Forschungslabor unter Prof. Dr. M. Böhm, Homburg