Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. Malte Kelm

Plasmakonzentrationen von CD40-assoziierten Faktoren im Myokardinfarkt in Abhängigkeit von Typ 2-Diabetes und CD40-Inhibition im *ex vivo*-Modell der akuten Myokardischämie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Robert Anton Gödecke

2026

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Norbert Gerdes

Zweitgutachterin: Univ.-Prof. Dr. med. Maria Grandoch

Für meine Eltern

Zusammenfassung

Der akute Myokardinfarkt (AMI) ist eine der weltweit führenden Todesursachen. Dabei kommt es, meist auf Grundlage atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen, zum akuten Verschluss einer Koronararterie mit ischämisch-nekrotischem Untergang von Kardiomyozyten. Dies geht mit einer lokalen Inflammation einher, die zur Vergrößerung des Gewebeschadens beiträgt, jedoch auch für die nachfolgende myokardiale Wundheilung von essenzieller Bedeutung ist. Diese inflammatorischen Prozesse werden durch verschiedene Immunzellen, membranständige Rezeptor-Liganden-Paare und Zytokine gesteuert, welche pro-inflammatorische und regulatorische intrazelluläre Signalwege aktivieren. Ein zentrales immunmodulatorisches Signalsystem des angeborenen und adaptiven Immunsystems ist das Rezeptor-Liganden-Paar CD40-CD40L. CD40-abhängige Signalwege, vermittelt durch intrazelluläre Signalmoleküle (z.B. TRAFs), bewirken zahlreiche pro-inflammatorische Prozesse wie Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen. Die pharmakologische Hemmung der CD40-TRAF6-Interaktion mittels TRAF-STOP zeigte im Mausmodell eine positive Beeinflussung atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen, sodass sich die Frage nach einem möglichen positiven Effekt auch bei akuter myokardialer Ischämie stellt. Dabei führte jedoch weder die unmittelbar prä-ischämische pharmakologische Hemmung CD40-TRAF6-abhängiger Signalwege noch die pharmakologische CD40-Aktivierung zu post-ischämischen Veränderungen der kardialen Funktion oder der Infarktgröße im *ex vivo*-Modell. Somit ergaben sich keine Hinweise darauf, dass die pharmakologische Modulation CD40-TRAF6-abhängiger Signalwege eine vielversprechende Option für die Akuttherapie der myokardialen Ischämie darstellt. Neben dem CD40-CD40L-Paar sind weitere interzelluläre Inflammationsproteine in teilweise noch unklarem Ausmaß an den pathophysiologischen Mechanismen des AMI und der myokardialen Wundheilung beteiligt. Daher wurden die Dynamiken von sCD40, sCD40L und potenziell assoziierten interzellulären Inflammationsproteinen nach AMI in humanen Plasmaproben mittels zweier Multiplex-Analysen (Luminex, NULISAseq) untersucht. Besonderer Fokus wurde dabei auf Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne Typ 2-Diabetes (T2D) als ein bekannter kardiovaskulärer Risikofaktor und Modulator inflammatorischer Prozesse gelegt. Insgesamt zeigte sich eine Abnahme der Inflammationsproteine innerhalb des ersten Tages nach AMI, wobei Patienten mit T2D deutlich erhöhte Inflammation mit verstärkter sCD40-sCD40L-Expression aufwiesen. Auch zeigten sich starke positive Korrelationen zwischen dem sCD40-sCD40L-Paar und den Zytokinen IL-7 und IL-18. Diese Funde deuten auf eine erhöhte Relevanz der CD40-CD40L-Interaktion nach AMI bei Patienten mit T2D hin und bilden eine Grundlage für weiterführende Untersuchungen hinsichtlich möglicher Ko-Regulationen zwischen dem CD40-CD40L-System und IL-7 sowie IL-18.

Abstract

Acute myocardial infarction (AMI) is a leading cause of worldwide mortality. Acute occlusion of a coronary artery, usually due to atherosclerotic changes in the vessel wall, leads to ischemic necrosis of cardiomyocytes. This is accompanied by local inflammation, which contributes to the extent of tissue damage but is also essential for subsequent myocardial wound healing. These inflammatory processes are driven by various immune cells, membrane-bound receptor-ligand pairs, and cytokines, which activate pro-inflammatory and regulatory intracellular signaling pathways. A key immunomodulatory signaling system of the innate and adaptive immune system is the CD40-CD40L receptor-ligand pair. CD40-dependent signaling pathways, mediated by intracellular signaling molecules (e.g. TRAFs), trigger numerous pro-inflammatory processes, such as the activation and differentiation of macrophages. Pharmacological inhibition of the CD40-TRAF6 interaction using TRAF-STOP demonstrated a positive effect on atherosclerotic changes in the vascular wall in a murine model, raising the question of a potential beneficial effect in acute myocardial ischemia. However, neither the immediate pre-ischemic pharmacological inhibition of CD40-TRAF6-dependent signaling cascades nor the pharmacological activation of CD40 led to post-ischemic changes in cardiac function or infarct size in the *ex vivo*-model. Thus, there was no evidence that pharmacological modulation of CD40-TRAF6-dependent signaling pathways represents a promising option for the acute treatment of myocardial ischemia. In addition to the CD40-CD40L pair, other intercellular inflammatory proteins are involved in the pathophysiological mechanisms of AMI and myocardial wound healing, to an extent that remains unclear in some cases. Therefore, the dynamics of sCD40, sCD40L, and potentially associated intercellular inflammatory proteins following AMI were investigated in human plasma samples using two multiplex assays (Luminex, NULISAseq). Particular focus was placed on differences between patients with and without type 2 diabetes (T2D) as a known cardiovascular risk factor and modulator of inflammatory processes. Overall, a decrease in inflammatory proteins was observed within the first day after AMI, while patients with T2D showed significantly increased inflammation with elevated sCD40-sCD40L expression. Additionally, strong positive correlations were observed between the sCD40-sCD40L pair and the cytokines IL-7 and IL-18. These findings suggest an increased relevance of the CD40-CD40L interaction following AMI in patients with T2D and provide a basis for further investigations into possible co-regulatory mechanisms between the CD40-CD40L system and IL-7 as well as IL-18.

Abkürzungsverzeichnis

AGE	*advanced glycation end product*
AMI	akuter Myokardinfarkt
AP	Aortendruck
APC	antigenpräsentierende Zelle
BL	Ausgangswert (*Baseline*)
CD	*Cluster of Differentiation*
CF	Koronarfluss
CF/HW	auf das Herzgewicht normierter Koronarfluss
COVID-19	*Coronavirus disease 2019*
CRP	C-reaktives Protein
CVD	kardiovaskuläre Erkrankung
DAMPs	*damage-associated molecular patterns*
DCs	dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
dP/dt_{max}	maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit
dP/dt_{min}	maximale Druckabfallsgeschwindigkeit
FGK45	aktivierender monoklonaler CD40-Antikörper
HDL	*high-density lipoprotein*-Cholesterin
HR	Herzfrequenz
ICD-10	*International Statistical Classification of Diseases Version 10*
IHD	ischämische Herzkrankheit
IL	Interleukin
I.p.	intraperitoneal
I/R-Versuch	Ischämie-Reperfusionsversuch
KG	Körpergewicht
KHB	Krebs-Henseleit-Puffer
LD	Langendorff
LDL	*Low-density lipoprotein*
LV	linker Ventrikel
LVDP	linksventrikulär entwickelter Druck
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
MAPK	*Mitogen-activated protein kinase*
MHC	*Major histocompability complex*
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Wasserstoff
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Wasserstoff
NFκB	*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
NGS	*Next-generation-sequencing*
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NO	Stickstoffmonoxid
NPQ	*NULSA Protein Quantification*
NULISAseq	*Nucleic acid-Linked Immuno-Sandwich Assay* mit NGS-Auswertung
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCI	perkutane Koronarintervention
PRR	*Pattern recognition receptor*
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPP	Druck-Frequenz-Produkt (*rate pressure product*)
SA-PE	Streptavidin-Phycoerythrin
sCD27	löslicher CD27
sCD40	löslicher CD40
sCD40L	löslicher CD40-Ligand
SIRD	schwerer Insulinresistenz-betonter Diabetes
STEMI	ST-Hebungsinfarkt
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF-β	*Transforming growth factor-β*
TLR	*Toll-like receptor*
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRAF	TNFR assoziierter Faktor
TRAF-STOP	niedermolekularer Inhibitor der CD40-TRAF6-Interaktion
Treg	regulatorische T-Zelle
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
T2D	Typ 2 Diabetes mellitus
WHO	*World Health Organization*
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung ..... - 1 -

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen ..... - 1 -

1.1.1 Epidemiologie kardiovaskulärer Erkrankungen ..... - 1 -

1.1.2 Atherosklerose ..... - 2 -

1.1.3 Akuter Myokardinfarkt ..... - 3 -

1.1.4 Pathophysiologie der myokardialen Wundheilung ..... - 4 -

1.1.5 Kardiodiabetes ..... - 4 -

1.2 Rolle der CD40-CD40L-Interaktion in CVDs ..... - 5 -

1.2.1 Physiologie der CD40-CD40L-abhängigen Signaltransduktion ..... - 5 -

1.2.2 Pathophysiologie der CD40-CD40L-abhängigen Signaltransduktion in der Atherosklerose ..... - 7 -

1.2.3 Blockade der CD40-TRAF6-Interaktion mittels TRAF-STOPs ..... - 8 -

1.3 CD40, CD40L und assoziierte interzelluläre Inflammationsproteine im AMI und der myokardialen Wundheilung ..... - 9 -

1.4 Experimentelle Modelle der myokardialen Ischämie ..... - 10 -

1.5 Ziele der Arbeit ..... - 11 -

2 Material und Methoden ..... - 13 -

2.1 Pharmakologische Modulation der CD40-TRAF6-abhängigen Signaltransduktion im I/R-Versuch am isolierten LD-Herzen ..... - 13 -

2.1.1 Versuchsdesign ..... - 13 -

2.1.2 Versuchstiere ..... - 13 -

2.1.3 Blut- und Organentnahme ..... - 14 -

2.1.4 Herstellung der Versuchslösungen ..... - 14 -

2.1.5 Aufbau der LD-Anlage ..... - 15 -

2.1.6 Versuchsablauf ..... - 17 -

2.1.7 Messung der Herzfunktion ..... - 18 -

2.1.8 Qualitätskriterien ..... - 19 -

2.1.9 Färbung des Herzens mittels TTC-Färbung ..... - 20 -

2.1.10 Auswertung der Infarktareale ..... - 20 -
2.2 Analyse interzellulärer Inflammationsproteine nach STEMI mittels NULISAseq ... - 21 -
2.2.1 Prinzip des NULISAseq-Immunoassays ..... - 21 -
2.2.2 Blutproben zur NULISAseq-Analyse ..... - 22 -
2.2.3 Datengenerierung ..... - 22 -
2.3 Analyse interzellulärer Inflammationsproteine nach STEMI mittels Luminex . - 22 -
2.3.1 Prinzip des Luminex-Immunoassays ..... - 22 -
2.3.2 Blutproben zur Luminex-Analyse ..... - 23 -
2.3.3 Materialien ..... - 23 -
2.3.4 Versuchsdurchführung ..... - 23 -
2.4 Statistik ..... - 24 -
3 Ergebnisse: ..... - 26 -
3.1 Pharmakologische Modulation der CD40-TRAF6-abhängigen Signaltransduktion im I/R-Versuch am isolierten LD-Herzen ..... - 26 -
3.1.1 Versuchsübersicht ..... - 26 -
3.1.2 Erfassung der funktionellen Daten der Herzfunktion ..... - 26 -
3.1.3 Auswertung der Herzfunktion ..... - 27 -
3.1.4 Bestimmung der Infarktgröße ..... - 30 -
3.2 Analyse interzellulärer Inflammationsproteine nach STEMI mittels NULISAseq ... - 31 -
3.2.1 Versuchsübersicht ..... - 31 -
3.2.2 Auswertung der Plasmakonzentrationen ..... - 31 -
3.2.3 Korrelationsanalysen ..... - 37 -
3.3 Analyse interzellulärer Inflammationsproteine mittels Luminex ..... - 42 -
3.3.1 Versuchsübersicht ..... - 42 -
3.3.2 Auswertung der Plasmakonzentrationen ..... - 42 -
3.3.3 Korrelationsanalysen ..... - 45 -
4 Diskussion ..... - 49 -
4.1 Schlussfolgerungen ..... - 49 -

4.2 Pharmakologische Modulation der CD40-TRAF6-abhängigen Signaltransduktion im I/R-Versuch am isolierten LD-Herzen ..... - 49 -
4.3 Analyse interzellulärer Inflammationsproteine nach STEMI ..... - 53 -
4.3.1 Grundsätzliche Ergebnisse ..... - 53 -
4.3.2 Analyse der CD40- und CD40L-Konzentrationen nach STEMI ..... - 54 -
4.3.3 Analyse der weiteren Inflammationsproteine nach STEMI ..... - 55 -
4.3.4 Vergleich der NULISA- und Luminex-Methode ..... - 58 -
4.3.5 Limitationen des Studiendesigns ..... - 58 -
4.4 Ausblick ..... - 60 -
5 Literatur- und Quellenverzeichnis: ..... - 62 -
6 Anhang: ..... - 67 -
6.1 Analyse interzellulärer Inflammationsproteine nach STEMI mittels NULISAseq ... - 67 -
6.1.1 Korrelationsanalysen – vollständige Korrelationsmatrizen ..... - 67 -
6.2 Analyse interzellulärer Inflammationsproteine nach STEMI mittels Luminex . - 68 -
6.2.1 Auswertung der Plasmakonzentrationen – nicht-signifikant ..... - 68 -
6.2.2 Korrelationsanalysen – vollständige Korrelationsmatrizen ..... - 71 -

1 Einleitung

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

1.1.1 Epidemiologie kardiovaskulärer Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD), also Erkrankungen des Herzens und der Blutgefäße, sind die weltweit führende Todesursache. Dazu zählen chronische Erkrankungen wie arterieller Hypertonus, Atherosklerose und Kardiomyopathien sowie akute Krankheitsbilder wie Schlaganfall und akuter Myokardinfarkt (AMI). Unter den kardiovaskulären Todesursachen stehen die ischämischen Herzerkrankungen (IHD) an erster Stelle, insbesondere der AMI.

Die *World Health Organization* (WHO) führt IHD seit Beginn des 21. Jahrhunderts als weltweit häufigste Todesursache auf. Selbst in der Hochphase der COVID-19 (*Coronavirus disease 2019*)-Pandemie verstarben weltweit mehr Menschen an IHD als an den Folgen von COVID-19 [1]. In Deutschland waren im Jahr 2023 33,9 % (348.312) aller Todesfälle auf CVDs zurückzuführen, darunter 11,7 % (119.795) auf IHD und 4,3 % (43.839) allein auf AMI. Damit ging die kardiovaskuläre Mortalität im Vergleich zum Vorjahr zwar um 2,7 % zurück, dennoch bleiben CVDs die mit Abstand häufigste Todesursache in Deutschland, gefolgt von malignen Neoplasien und Erkrankungen des Atmungssystems (**Abb. 1**) [2].

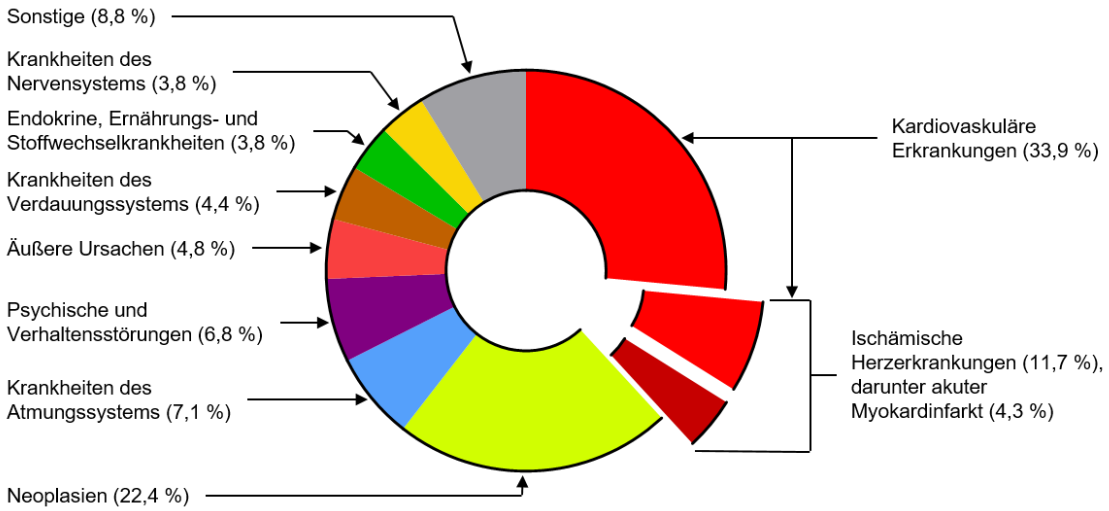


Abb. 1: Prozentuale Verteilung der Todesursachen in Deutschland im Jahr 2023. Dargestellt sind die acht häufigsten Todesursachenkategorien gemäß ICD-10 (*International Statistical Classification of Diseases Version 10*)-Klassifikation. Hervorgehoben ist die Kategorie der Todesfälle durch kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD) sowie deren Unterkategorien der ischämischen Herzerkrankungen (IDH) und des akuten Myokardinfarkts (AMI). In Anlehnung an die Todesursachenstatistik 2023, Statistisches Bundesamt [2].

Trotz anhaltender Fortschritte im Verständnis der Pathophysiologie, Prävention und Therapie ist in Zukunft mit einem weiteren Anstieg der globalen Mortalität zu rechnen, insbesondere in Entwicklungs- und Schwellenländern. Prognosen zufolge werden die Todesfälle durch CVD weltweit bis 2050 um 73,4 % zunehmen, von 20,5 Millionen im Jahr 2025 auf 35,6 Millionen

im Jahr 2050. Die Mortalität durch IHD wird im gleichen Zeitraum schätzungsweise sogar um 93,4 % steigen [3]. Daher bleibt die Suche nach pharmakologischen Strategien zur Prävention und Therapie CVDs, insbesondere des AMI, ein zentraler Schwerpunkt der biomedizinischen Forschung.

1.1.2 Atherosklerose

Atherosklerose ist eine chronisch-progrediente Erkrankung der Blutgefäße, die durch die Bildung und Progression atherosklerotischer Plaques in den arteriellen Gefäßwänden gekennzeichnet ist. Atherosklerose stellt die pathophysiologische Grundlage einer Vielzahl akuter und chronischer CVDs dar, darunter des AMI, des ischämischen Schlaganfalls sowie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK).

Die Atherogenese, also die Entstehung atherosklerotischer Plaques in den Gefäßwänden, ist ein mehrstufiger Prozess, der durch zahlreiche inflammatorische Zellen und Mediatoren geprägt ist. Zunächst bilden sich durch endotheliale Dysfunktion, Einwanderung von Immunzellen und glatten Muskelzellen sowie Phagozytose oxidierter *low-density lipoprotein* (LDL)-Partikel *fatty streaks*, die frühe Läsionsform der Atherosklerose, in der Intima der Blutgefäße. Über Jahre bis Jahrzehnte wachsen diese Läsionen zu atherosklerotischen Plaques an und führen ab einer bestimmten Größe zu einer hämodynamisch relevanten Stenose des Gefäßlumens. Werden diese Plaques instabil und rupturieren, gelangt thrombogener Plaqueinhalt in die Blutbahn, was eine vollständige Thrombosierung des Gefäßlumens und eine akute Ischämie des betroffenen Stromgebiets auslösen kann [4].

Die Atherogenese wird maßgeblich durch kardiovaskuläre Risikofaktoren und dadurch ausgelöste Mechanismen wie Endothelschädigung, systemische Inflammation oder oxidativen Stress begünstigt [5]. Das Verständnis dieser Faktoren ist entscheidend für die Risikostratifizierung sowie für individuelle Ansätze der Primär- und Sekundärprävention. Man unterscheidet nicht-beeinflussbare Risikofaktoren (z.B. männliches Geschlecht, Alter und genetische Dispositionen) von beeinflussbaren Risikofaktoren [6]. Letztere umfassen unter anderem arterielle Hypertonie, erhöhtes LDL-Cholesterin, Typ 2 Diabetes mellitus (T2D), Rauchen, Adipositas, ungesunde Ernährung oder körperliche Inaktivität [5, 7]. Eine Reduktion beeinflussbarer Risikofaktoren, etwa durch Lebensstilmodifikation oder medikamentöse Therapien, kann die Atherogenese verlangsamen und durch Förderung von glatter Muskelzellmigration, Kollagenbildung und verminderte Makrophageninfiltration bestehende Plaques stabilisieren [5, 8]. Da die Atherosklerose in ihren Frühstadien lange asymptomatisch verläuft, wird eine effektive Prävention erschwert, was die Bedeutung regelmäßiger laborchemischer und bildgebender Kontrolluntersuchungen verdeutlicht [9].

1.1.3 Akuter Myokardinfarkt

Der AMI bezeichnet den nekrotischen Zelluntergang von Kardiomyozyten infolge einer akuten myokardialen Ischämie. Die bei weitem häufigste Ursache ist die koronare Herzkrankheit (KHK), eine atherosklerotische Schädigung der Koronararterien. Seltener liegen andere Ursachen wie Vaskulitiden, Koronarspasmen oder Embolien zugrunde. Kommt es bei der KHK zur Ruptur einer instabilen Plaque, führt dies zur Thrombenbildung mit nachfolgender Okklusion der betroffenen Koronararterie, was eine akute Minderversorgung des Myokards mit Sauerstoff zur Folge hat [4, 10].

Die Pathophysiologie des AMI beruht auf einem akuten Energiedefizit, wodurch die Kardiomyozyten auf anaerobe Energiegewinnung übergehen. Dies führt zu einer intrazellulären Laktatazidose mit Störung des Elektrolytmilieus. Besonders eine intrazelluläre Ca^{2+}-Überladung trägt über Mechanismen wie mitochondriale Schädigung und Aktivierung proteolytischer Enzyme wesentlich zur Zellnekrose bei [11, 12].

Die Diagnose des AMI beruht auf der Kombination klinischer, laborchemischer, elektrophysiologischer und bildgebender Kriterien [13]. Eine zentrale Rolle in der laborchemischen Diagnostik spielen die kardialen Troponine T und I, Bestandteile des myokardialen Kontraktionsapparats. Eine charakteristische Dynamik dieser Marker gilt als hochspezifisch und -sensitiv für eine akute myokardiale Schädigung [13, 14]. Neben laborchemischen Befunden muss zur Diagnosestellung mindestens eines der folgenden Kriterien erfüllt sein: Symptome einer kardialen Ischämie, typische ST-Strecken- oder Q-Zacken-Veränderungen im Elektrokardiogramm, Nachweis einer neuen regionalen Wandbewegungsstörung in der Bildgebung oder Nachweis intrakoronarer Thromben [13].

Das primäre Therapieziel bei AMI ist die rasche Reperfusion des betroffenen Myokards. Die perkutane Koronarintervention (PCI) ist, sofern zeitnah verfügbar, der fibrinolytischen Therapie vorzuziehen. Im präklinischen Management spielt zudem die medikamentöse Hemmung der primären Hämostase eine zentrale Rolle [15].

Obwohl die Wiedereröffnung der okkludierten Koronararterie das entscheidende Therapieziel darstellt, kann sie paradoxerweise durch den sogenannten Reperfusionsschaden zur weiteren Schädigung des Myokards und damit zu Mortalität und Morbidität nach AMI beitragen. Bei Wiederherstellung der Sauerstoffversorgung kommt es zur Exazerbation der Myokardschädigung, vermittelt durch Mechanismen wie die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), Ca^{2+}-abhängige Hyperkontraktur der Myofibrillen oder Verlust der Stickstoffmonoxid (NO)-abhängigen Vasodilatation [11, 16, 17].

Ergänzend zu etablierten Behandlungsstrategien ist daher die Suche nach neuen pharmakologischen Ansätzen zur Modulation des Reperfusionsschadens und zur Förderung der myokardialen Wundheilung ein wichtiger Schwerpunkt aktueller Forschung [18, 19].

1.1.4 Pathophysiologie der myokardialen Wundheilung

Die myokardiale Wundheilung, welche auf die abgelaufene Ischämie und Reperfusion des Myokards folgt, beruht auf einem komplexen Zusammenspiel von Immunzellen, interzellulären Inflammationsproteinen und intrazellulären Signalkaskaden. Grundsätzlich lassen sich drei aufeinander folgende Phasen unterscheiden: die inflammatorische Phase, die proliferative Phase und die Maturationsphase. Störungen dieses fein abgestimmten Systems können zu einer Ausdehnung der Gewebeschädigung oder zu einer unzureichenden Narbenbildung mit Einschränkung der kardialen Funktion führen [20].

In der inflammatorischen Phase wird das angeborene Immunsystem aktiviert, wodurch Leukozyten (insbesondere Neutrophile, Monozyten und Makrophagen) das Infarktareal infiltrieren und nekrotische Kardiomyozyten und extrazelluläre Matrix phagozytieren. Dabei spielen verschiedene Mechanismen wichtige Rollen: die Freisetzung von *damage-associated molecular patterns* (DAMPs), die Bindung an *pattern-recognition*-Rezeptoren (PRRs) wie Toll-like-Rezeptoren (TLRs), die Aktivierung pro-inflammatorischer Signalkaskaden wie des *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NFκB)-Signalwegs, die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen sowie die Aktivierung des Komplementsystems. Besonders die ersten Stunden nach AMI sind durch einen akuten plasmatischen Anstieg zahlreicher interzellulärer Inflammationsproteine wie Interleukine (IL) und löslichem (*soluble*) CD40-Ligand (sCD40L) geprägt [21, 22].

Der Übergang zur proliferativen Phase wird etwa vier Tage nach AMI durch den Wechsel der eingewanderten Immunzellen von einem pro-inflammatorischen in einen reparativen Phänotyp und die Ausschüttung anti-inflammatorischer Mediatoren wie *transforming growth factor* β (TGF-β) und IL-10 eingeleitet. In dieser Phase kommt es zur Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, zur Produktion von Kollagen und extrazellulärer Matrix sowie zur Neovaskularisation. Diese Prozesse führen zur Bildung von Granulationsgewebe, das in der anschließenden Maturationsphase zu einer stabilen Myokardnarbe ausreift [20, 23]. Ein besseres Verständnis dieser Phasen und ihrer molekularen Steuermechanismen ist entscheidend, um therapeutische Strategien zur Verbesserung der myokardialen Wundheilung nach AMI zu entwickeln.

1.1.5 Kardiodiabetes

Das Vorliegen eines T2D stellt einen der relevantesten kardiovaskulären Risikofaktoren dar und trägt über verschiedene pathophysiologische Mechanismen wesentlich zur Atherogenese

bei. Durch die vorliegende Insulinresistenz wird die Ausbildung eines pro-atherogenen Lipidprofils mit erhöhten Triglyzeriden und kleinen, dichten LDL-Partikeln sowie erniedrigtem *high-density lipoprotein* (HDL)-Cholesterin begünstigt [24]. Chronisch erhöhte Blutzuckerspiegel und Blutzuckerspitzen führen zu verstärktem oxidativem Stress und zur Bildung von a*dvanced glycation end products* (AGEs), irreversiblen, nicht-enzymatisch eintretenden Verbindungen zwischen Glucose und Proteinen, Lipiden oder Nukleinsäuren, die zu endothelialer Dysfunktion und Plaque-Instabilität beitragen [25]. Darüber hinaus weisen Patienten mit T2D erhöhte Plasmaspiegel interzellulärer Inflammationsproteine wie C-reaktivem Protein (CRP), Tumornekrosefaktor (TNF) α, sCD40L und IL-18 auf, die ebenfalls die endotheliale Dysfunktion und damit die Atherogenese fördern [26, 27]. Infolgedessen haben Patienten mit T2D ein relevant erhöhtes Risiko für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse wie eines AMI, sowie ein ungünstigeres Langzeit-*Outcome* [28, 29].

Diese Erkenntnisse unterstreichen die Notwendigkeit einer konsequenten Reduktion der T2D-assoziierten pro-atherogenen Effekte sowohl durch Lebensstilmodifikation als auch durch gezielte medikamentöse Therapie. Die multifaktorielle Pathophysiologie, welche der T2D-abhängigen Atherogenese zugrunde liegt, eröffnet dabei vielfältige therapeutische Angriffspunkte. So sind etwa die Stabilisierung der Blutzuckerspiegel, die Modifikation des Lipidprofils, die Verbesserung der Insulinsensitivität oder die Hemmung pro-inflammatorischer, Zytokin-vermittelter Signalwege, beispielsweise durch Blockade der CD40-CD40L-abhängigen Signaltransduktion, wichtige Therapieansätze [30, 31].

1.2 Rolle der CD40-CD40L-Interaktion in kardiovaskulären Erkrankungen

1.2.1 Physiologie der CD40-CD40L-abhängigen Signaltransduktion

Die Funktion des adaptiven Immunsystems beruht auf der koordinierten Interaktion verschiedener Immunzellen über interzelluläre Inflammationsproteine (u.a. Zytokine, Chemokine und Hormone) und Zell-Zell-Interaktionen über membranständige Rezeptor-Liganden-Paare. Das Zusammenspiel dieser Mechanismen entscheidet über Aktivierung, Regulation oder Beendigung immunologischer und inflammatorischer Prozesse [32].

Im Zentrum der adaptiven Immunantwort steht die Interaktion zwischen dem T-Zell-Rezeptor (TCR) und dem *major histocompability complex*-II (MHC-II). Über diesen präsentieren antigenpräsentierenden Zellen (APCs) – wie B-Lymphozyten, dendritische Zellen (DCs) oder Makrophagen – Antigene, welche durch den TCR auf $CD4^+$ T-Helferzellen gebunden werden, was deren Aktivierung induziert. Für die vollständige Aktivierung bedarf es neben der MHC-II/TCR-Bindung eines weiteren Signals zwischen T-Zelle und APC über spezifische kostimulatorische Rezeptor-Liganden-Paare wie *Cluster of differentiation* (CD) *40* und seinen

Liganden CD40L. Bleibt dieses aus, resultiert eine funktionelle Anergie der T-Zelle. Zusätzlich sezerniert die APC Zytokine, die an die aktivierten T-Zellen binden und deren Differenzierung in bestimmte T-Helfer-Subpopulation steuern [33]. Die differenzierten T-Zellen proliferieren und übernehmen vielfältige immunologische Funktionen, darunter die Aktivierung von Makrophagen, die Differenzierung und Selektion von B-Lymphozyten, die Bildung von Keimzentren, den Antikörperklassenwechsel, die somatische Hypermutation oder die Entwicklung von Gedächtnis- und Plasmazellen [34]. (**Abb. 2**)

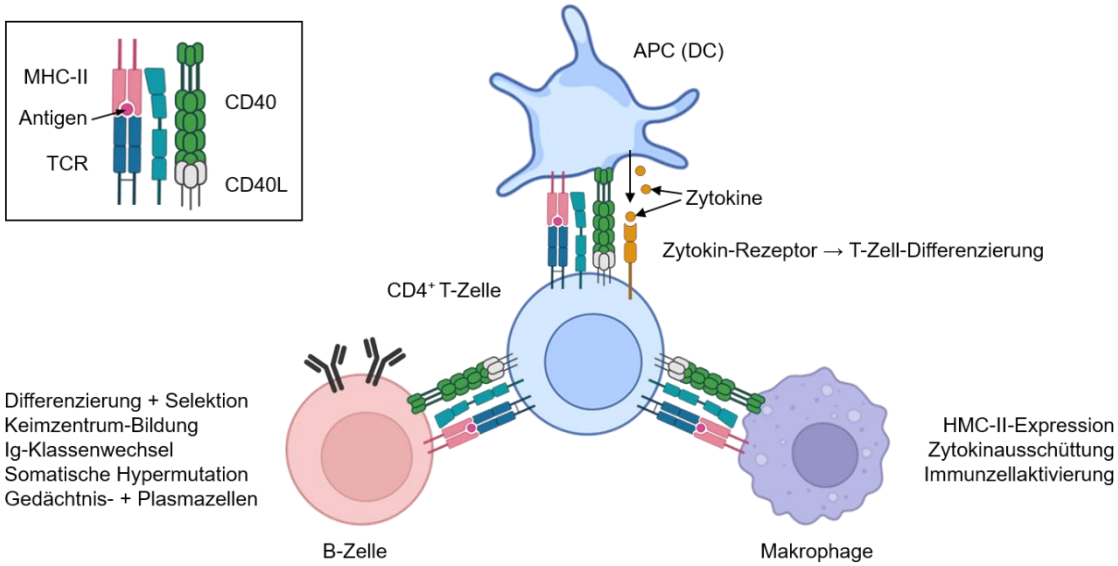


Abb. 2: Schematische Darstellung der TCR-MHC-II-abhängigen Immunzellinteraktion der adaptiven Immunantwort. Die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen benötigt drei aktivierende Signale. Zunächst präsentieren antigenpräsentierende Zellen (APC) wie dendritische Zellen (DC) über den *major histocompability complex*-II (MHC-II) Antigene, die von T-Zell-Rezeptoren (TCR) auf der Oberfläche von CD4⁺ T-Zellen gebunden werden (erstes Signal). Anschließend bindet ein ko-stimulatorischer Ligand wie CD40L auf der Oberfläche der T-Zelle an seinen Rezeptor CD40 auf der Oberfläche der APC (zweites Signal). Zuletzt sezerniert die APC Zytokine, die durch Bindung an einen Zytokin-Rezeptor auf der T-Zelle deren Differenzierung in bestimmte T-Helfer-Subtypen steuern (drittes Signal). Die aktivierten CD4⁺ T-Zellen können nun über MHC-II/TCR- und CD40/CD40L-Bindung weitere Immunzellen wie Makrophagen oder B-Zellen aktivieren, welche vielfältige Funktionen im Immunsystem erfüllen.

CD40 und CD40L sind ein zentrales kostimulatorisches Rezeptor-Liganden-Paar, welches für die T-Zell-Aktivierung und somit die Funktion des adaptiven Immunsystems essenziell ist. Ihre Interaktion und die dadurch ausgelöste intrazelluläre Signaltransduktion sind in **Abb. 3** schematisch dargestellt. CD40 ist ein homotrimeres integrales Membranprotein der Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR)-Familie, das konstitutiv auf professionellen APCs wie B-Lymphozyten, DCs, Monozyten und Makrophagen exprimiert ist, aber auch auf Endothelzellen, glatten Muskelzellen oder Fibroblasten vorkommt. Sein Ligand, CD40L, gehört zur TNF-Familie. Er wird primär auf aktivierten CD4⁺ T-Helferzellen exprimiert, findet sich daneben aber auch auf Thrombozyten sowie in einer löslichen, biologisch aktiven Form (sCD40L), die hauptsächlich aus Thrombozyten freigesetzt und nach CD40-Aktivierung

abgebaut wird [35, 36]. CD40 und CD40L sind somit auf vielen Zelltypen exprimiert, die an pathophysiologischen Mechanismen des AMI beteiligt sind. Eine Störung der CD40-CD40L-Interaktion führt zu einer deutlichen Beeinträchtigung der adaptiven Immunantwort [37].

Da CD40 selbst keine intrinsische Signalaktivität besitzt, erfolgt die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden über Adaptermoleküle, sogenannte *TNF receptor-associated factors* (TRAFs), die nach Aktivierung durch CD40L an die zytoplasmatische Domäne von CD40 binden [35, 38]. Dabei interagieren TRAF2, TRAF3, TRAF5 und indirekt TRAF1 mit einer distalen und TRAF6 mit einer proximalen Aminosäuresequenz der zytoplasmatischen CD40-Domäne [39]. Über die TRAF-vermittelte Signalübertragung werden verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden gesteuert, darunter der kanonische und nicht-kanonische NFκB-Signalweg, der PI3K/AKT-Signalweg sowie *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Kaskaden. Je nach involviertem TRAF resultieren daraus pro- oder anti-inflammatorische Effekte. Während die meisten TRAF-abhängigen Signalkaskaden pro-inflammatorische Funktionen vermitteln, kann insbesondere TRAF3 durch Hemmung des nicht-kanonischen NFκB-Wegs anti-inflammatorische Wirkungen entfalten [38, 40, 41].

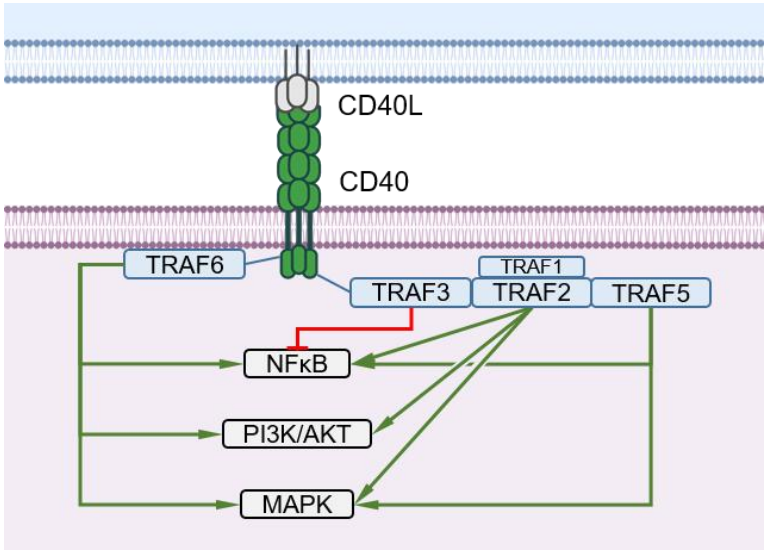


Abb. 3: Schematische Darstellung der intrazellulären CD40-abhängigen Signaltransduktion. Nach CD40-CD40L-Bindung binden Tumornekrosefaktor-assoziierte Faktoren (TRAFs) an die zytoplasmatische Domäne von CD40 und aktivieren oder hemmen intrazelluläre Signalkaskaden wie den kanonischen und nicht-kanonischen *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NFκB)-, den PI3K/AKT-Signalweg und *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Kaskaden. Dabei bindet TRAF6 an eine proximale Bindestelle der zytoplasmatischen CD40-Domäne, während TRAF2 (und darüber indirekt TRAF1), TRAF3 und TRAF5 an eine distale Bindestelle adaptieren.

1.2.2 Pathophysiologie der CD40-CD40L-abhängigen Signaltransduktion in der Atherosklerose

Neben ihrer zentralen Rolle im adaptiven Immunsystem ist die CD40-CD40L-Interaktion auch bei zahlreichen chronisch-entzündlichen Erkrankungen, darunter der rheumatoiden Arthritis, Transplantatabstoßung, Neoplasien sowie CVDs wie der Atherosklerose relevant [38, 42]. Da

CD40 und CD40L neben professionellen Immunzellen auch auf Zellen der Gefäßwand, insbesondere auf Endothelzellen und glatten Muskelzellen, exprimiert sind, tragen sie direkt zu inflammatorischen und Plaque-bildenden Prozessen bei. Sie fördern die Expression von Adhäsionsmolekülen, verstärken die Chemokin-Freisetzung und begünstigen dadurch die Rekrutierung von Leukozyten in die Gefäßwand [43, 44].

Eine gesteigerte CD40-CD40L-abhängige Signaltransduktion, beispielsweise infolge erhöhter sCD40L-Plasmaspiegel, kann die atherogene Aktivität verstärken und somit zum Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse beitragen [45]. Umgekehrt führte eine Hemmung der CD40-CD40L-Interaktion im Tiermodell wiederholt zu einer Blockade atherogener Mechanismen und damit zu erhöhter Plaquestabilität [44, 46, 47]. Eine systemische Blockade dieser Interaktion ist jedoch mit erheblichen Nebenwirkungen wie Immunsuppression und thromboembolischen Komplikationen verbunden, sodass sie trotz vielversprechender experimenteller Ergebnisse keine praktikable therapeutische Option darstellt [44, 48, 49]. (**Abb. 4A**)

Besonders bedeutsam für die atherogenen Effekte der CD40-CD40L-Interaktion ist die CD40-TRAF6-abhängige Aktivierung pro-inflammatorischer Signalkaskaden wie des kanonischen NFκB- sowie der MAPK-Signalwege in Makrophagen und anderen Immunzellen [40, 41]. Im Tiermodell zeigten sich bei gezielter Blockade der CD40-TRAF6-Interaktion durch Gendeletion ausgeprägte anti-inflammatorische Effekte mit deutlicher Reduktion atherosklerotischer Läsionen und erhöhter Plaquestabilität gegenüber der Kontrollgruppe sowie gegenüber einer gezielten CD40-TRAF2/3/5-Blockade [50]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine selektive Hemmung der CD40-TRAF6-Interaktion einen vielversprechenden Ansatz für die Behandlung chronisch-entzündlicher Erkrankungen wie der Atherosklerose darstellen könnte.

Bei Patienten mit T2D kommt der CD40-CD40L-abhängigen Signaltransduktion eine besondere pathophysiologische Bedeutung zu. So weisen sie häufig erhöhte sCD40L-Plasmaspeigel auf, die eine verstärkte CD40-Aktivierung bedingen [26, 51]. Zudem kann die CD40-Expression auf Endothelzellen durch erhöhte Konzentration von AGEs induziert werden [52]. In Tiermodellen diabetischer Mäuse wurde darüber hinaus eine erhöhte TRAF6-Expression und eine damit assoziierte endotheliale Dysfunktion im vaskulären Gewebe nachgewiesen [53]. Diese Befunde legen nahe, dass eine gezielte pharmakologische Hemmung der CD40-TRAF6-abhängigen Signaltransduktion insbesondere bei Patienten mit T2D von besonderer therapeutischer Relevanz sein könnte.

1.2.3 Blockade der CD40-TRAF6-Interaktion mittels TRAF-STOPs

Zur gezielten Blockade der CD40-TRAF6-Interaktion wurden niedermolekulare Inhibitoren, sogenannte TRAF-STOPs, entwickelt, welche die Bindung von TRAF6 an die proximale Bindestelle der zytoplasmatischen Domäne von CD40 verhindern. Die TRAF2/3/5-abhängigen

Signalwege, die eine zentrale Rolle in CD40-vermittelten Immunprozessen spielen, bleiben dabei unbeeinträchtigt.

Die dabei gefundenen TRAF-STOPs führten im Tiermodell zu einer verminderten Inflammation bei Peritonitis und Sepsis, ohne systemische Nebenwirkungen wie Immunsuppression zu verursachen [54, 55]. Darüber hinaus hatte die gezielte CD40-TRAF6-Inhibition positive Effekte auf weitere inflammatorische Prozesse wie Neuroinflammation und insbesondere Atherosklerose, indem sie atherogene Mechanismen hemmte und die Plaquestabilität erhöhte [55, 56]. (**Abb. 4B**)

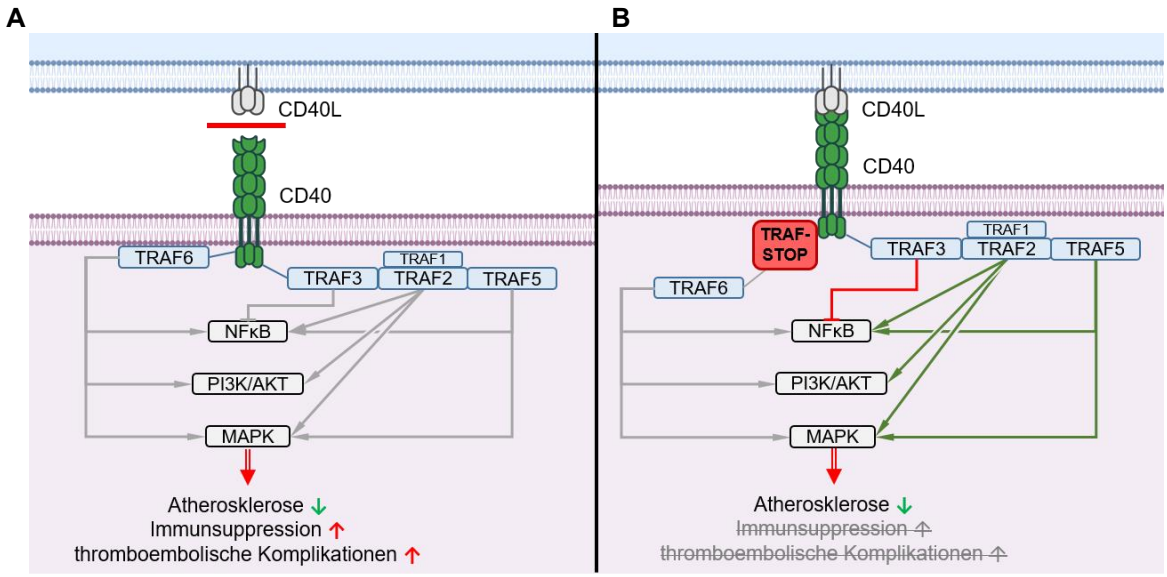


Abb. 4: Möglichkeiten der Blockade CD40-CD40L-vermittelter Signalkaskaden und derer Wirkung auf den Organismus. (**A**) Durch die direkte Blockade der CD40L-CD40-Bindung werden sämtliche CD40-vermittelten intrazellulären Effekte aufgehoben. Dies bewirkt eine Reduktion atherosklerotischer Prozesse, bei längerfristiger Blockade jedoch auch Immunsuppression und thromboembolische Komplikationen. (**B**) Durch gezielte Blockade der CD40-TRAF6-Interaktion mittels TRAF-STOP werden lediglich die TRAF6-abhängigen Effekte aufgehoben, während die TRAF2/3/5-abhängigen Signalkaskaden nicht beeinflusst werden. Somit kommt es ebenfalls zu einer Reduktion atherosklerotischer Prozesse, ohne dabei vermehrte Immunsuppression oder thromboembolische Komplikationen zu bewirken.

1.3 CD40, CD40L und assoziierte interzelluläre Inflammationsproteine im AMI und der myokardialen Wundheilung

Die pathophysiologischen Mechanismen des AMI und der myokardialen Wundheilung beruhen auf einem komplexen Zusammenspiel inflammatorischer und reparativer Prozesse, die wesentlich durch Zytokine und andere interzelluläre Inflammationsproteine gesteuert werden. Die Dynamik einzelner Inflammationsproteine während und nach AMI ist bislang nur teilweise verstanden, bietet jedoch großes Potential für neue pharmakologische Therapieansätze.

Wie bereits dargelegt, spielt die CD40-CD40L-Interaktion in diesen Prozessen eine zentrale Rolle. Insbesondere in der frühen inflammatorischen Phase nach AMI überwiegen CD40-

CD40L-vermittelte pro-inflammatorische Effekte. Auch wenn in den späteren Phasen der myokardialen Wundheilung zunehmend anti-inflammatorische und reparative CD40-CD40L-vermittelte Prozesse in den Vordergrund treten, ist eine gesteigerte CD40-CD40L-Signaltransduktion, etwa bei Patienten mit erhöhter sCD40L-Konzentration, insgesamt mit einem ungünstigeren kardialen Outcome nach AMI assoziiert [57-59]. Bisherige Studien legen nahe, dass die sCD40L-Konzentration unmittelbar post-ischämisch innerhalb der ersten Stunde nach AMI abfällt und anschließend innerhalb des ersten Tages nach AMI stark ansteigt [21, 60].

Ein weiterer ko-stimulatorischer Rezeptor, welcher an Aktivierung und Proliferation von $CD4^+$ T-Zellen beteiligt ist, ist CD27. CD27-abhängige Signalwege scheinen für eine koordinierte myokardiale Wundheilung essenziell zu sein. So führt eine Blockade der CD27-CD70-Interaktion zu ungünstigem kardialen *Remodeling* nach AMI. Erhöhte Konzentrationen löslichen CD27s innerhalb des ersten Tages nach Infarkt deuten auf eine wichtige Funktion in der Frühphase nach AMI hin [61].

Darüber hinaus spielt eine Vielzahl unterschiedlicher Interleukine eine wichtige Rolle in der Koordination pathophysiologischer Mechanismen des AMI und der myokardialen Wundheilung. Neben klassischen pro-inflammatorischen Interleukinen wie IL-18 und anti-inflammatorischen Interleukinen wie IL-10 gibt es viele regulatorische Interleukine, welche abhängig von Konzentration und beteiligten zellulären und humoralen Komponenten der Immunantwort pro- oder anti-inflammatorische Wirkprofile haben und somit förderlich oder schädigend auf die Mechanismen von AMI und myokardialer Wundheilung einwirken können.

1.4 Experimentelle Modelle der myokardialen Ischämie

Experimentelle Modelle der myokardialen Ischämie sind essenzielle Methoden der kardiovaskulären Forschung. Grundsätzlich wird dabei zwischen *in vivo*-Modellen, bei denen die Intervention am lebenden Tier erfolgt, und *ex vivo*-Modellen unterschieden, bei denen das isolierte Herz untersucht wird. *In vivo*-Modelle ermöglichen eine realitätsnahe Abbildung der pathophysiologischen Prozesse von Ischämie, Reperfusion und myokardialer Wundheilung unter Berücksichtigung systemischer Einflüsse wie Inflammation oder Organ-übergreifender Wechselwirkungen [62, 63]. *Ex vivo*-Modelle hingegen untersuchen die Effekte von Interventionen am isolierten, extrakorporal perfundierten Herzen. Nachteile dieser Modelle sind, dass systemische Prozesse nicht abgebildet und langfristige post-ischämische Wirkungen auf den Organismus nicht untersucht werden können. Allerdings ermöglichen *ex vivo*-Modelle pharmakologische und funktionelle Untersuchungen, die am lebenden Tier aus Gründen der Praktikabilität und Ethik nicht durchführbar wären, wie die in dieser Arbeit genutzten globalen Ischämie-Reperfusionsversuche (I/R-Versuche). Dadurch haben sie bis heute einen wichtigen Platz in der kardiovaskulären Forschung.

Ein etabliertes *ex vivo*-Modell ist das isolierte Langendorff (LD)-Herz. Das LD-Modell bietet zahlreiche experimentelle Möglichkeiten wie die kontrollierte Perfusion, induzierte Ischämie und pharmakologische Interventionen des retrograd perfundierten Herzens, wodurch sich verschiedene klinische Situationen simulieren lassen. Seit der Etablierung der retrograden Perfusionsmethode am isolierten Säugetierherzen durch Oscar Langendorff (1895) konnten mit diesem Modell wertvolle Erkenntnisse über Physiologie und Pathophysiologie des Herzens gewonnen werden [64].

1.5 Ziele der Arbeit

Die Rolle der CD40-TRAF6-abhängigen Signaltransduktion in der Atherogenese wurde in den vergangenen Jahren zunehmend untersucht und besser verstanden. Eine Blockade dieser Signalwege zeigte im Tiermodell ein großes Potential zur Primär- und Sekundärprävention der Atherosklerose [44, 46, 47, 55]. Da der AMI in hohem Maße auf die koronare Manifestation der Atherosklerose, die KHK, zurückzuführen ist, stellt die langfristige pharmakologische Hemmung der CD40-TRAF6-vermittelten pro-atherogenen Effekte theoretisch eine vielversprechende Möglichkeit zur Prävention des AMI dar.

Da jedoch ein erheblicher Anteil der Patienten mit erstem AMI zuvor keine klinischen Symptome einer KHK zeigt und somit unentdeckt bleibt, sind neben präventiven Strategien auch neue Ansätze zur medikamentösen Akuttherapie von Interesse. Die aktuelle Studienlage zur Wirkung einer medikamentösen Blockade der CD40-TRAF6-Interaktion auf den Verlauf des AMI ist bislang jedoch begrenzt.

Ziel dieser Arbeit ist die weiterführende Untersuchung der Rolle der CD40-CD40L-Interaktion und anderer interzellulärer Inflammationsproteine im Kontext des AMI. Hierzu ist die Arbeit in zwei Teilprojekte gegliedert, die sich der Fragestellung aus unterschiedlichen Perspektiven nähern.

Im ersten Teil wird die Auswirkung der akuten pharmakologischen Modulation der CD40-TRAF6-abhängigen Signaltransduktion auf die Ausprägung des AMI im isolierten Mäuseherzen untersucht. Die Hypothese lautet, dass die Hemmung CD40-TRAF6-vermittelter pro-inflammatorischer Signalkaskaden durch den TRAF-STOP 6860766 inflammatorische Prozesse des AMI abschwächt und unmittelbar post-ischämisch zu einer Verbesserung der myokardialen Funktion sowie zu einer Reduktion der Infarktgröße führt. Umgekehrt wird erwartet, dass die Behandlung mit einem aktivierenden monoklonalen CD40-Antikörper (Klon FGK45) die Herzfunktion verschlechtert und den Infarkt vergrößert. Die Untersuchung erfolgt durch Analyse von Herzfunktion und Infarktgröße nach globaler Ischämie und anschließender Reperfusion am isolierten LD-Herzen nach prä-ischämischer Zugabe von TRAF-STOP bzw. FGK45.

Im zweiten Teil der Arbeit wird die Dynamik der Plasmaspiegel von löslichem CD40 (sCD40), sCD40L und weiteren interzellulären Inflammationsproteinen, die an T-Zell-Aktivierung und anderen Prozessen des Immunsystems beteiligt sind, im Verlauf nach ST-Hebungsinfarkt (STEMI) untersucht. Die Fragestellung hierbei ist, ob sich aus dynamischen Veränderungen der Plasmaspiegel dieser Botenstoffe, insbesondere sCD40 und sCD40L, Rückschlüsse auf deren funktionelle Rolle im AMI und der myokardialen Wundheilung ziehen lassen und ob sich diese Dynamiken zwischen Patienten mit und ohne T2D unterscheiden. Hierfür werden Patientenproben, die innerhalb des ersten Tages sowie in den ersten sechs Monaten nach STEMI gewonnen wurden, mittels *Nucleic acid-Linked Immuno-Sandwich Assay* mit *Next-generation-sequencing* (NGS)-Auswertung (NULISAseq)- bzw. Luminex-Analyse untersucht und statistisch ausgewertet.

2 Material und Methoden

2.1 Pharmakologische Modulation der CD40-TRAF6-abhängigen Signaltransduktion im I/R-Versuch am isolierten LD-Herzen

2.1.1 Versuchsdesign

Die direkten Wirkungen von Inhibitoren oder Aktivatoren CD40-abhängiger Signalwege wurden in *ex vivo*-LD-Versuchen untersucht (**Abb. 5**). Unmittelbar vor Einleitung der globalen Ischämie wurde TRAF-STOP, FGK45 oder eine Dimethylsulfoxid (DMSO)-Kontrolle, jeweils in Mäuseblut gelöst, lokal in das isolierte Mäuseherz appliziert. Während der post-ischämischen Reperfusionsphase erfolgte eine kontinuierliche Erfassung der kardialen Funktionsparameter. Die Infarktgröße wurde anschließend durch Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)-Anfärbung des vitalen Restgewebes und planimetrische Auswertung der in Querschnitte geschnittenen Herzen bestimmt.

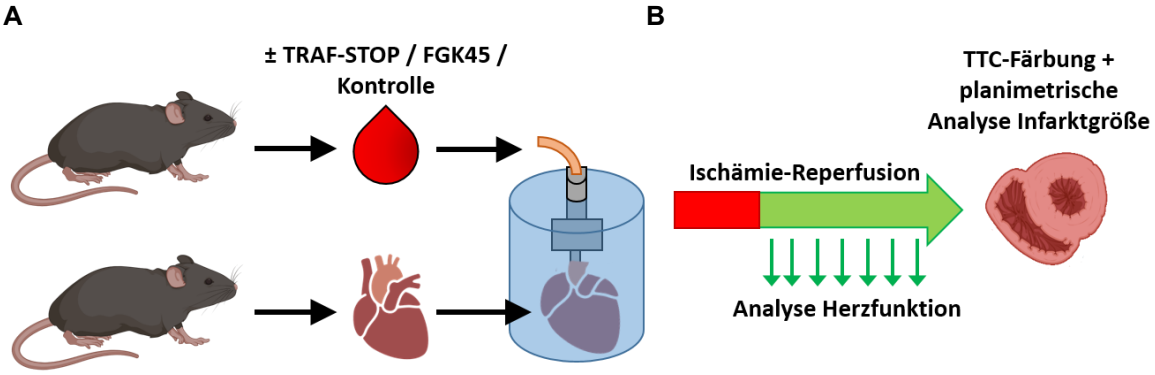


Abb. 5: Schematische Darstellung des Langendorff (LD)-Versuchsablaufs. (**A**) Die entnommenen Mäuseherzen wurden in der LD-Apparatur prä-ischämisch mit in Mäuseblut gelöstem TRAF-STOP, aktivierendem monoklonalen CD40-Antikörper (FGK45) oder einer 0,25 %-igen DMSO (Dimethylsulfoxid)-Kontrolle (Kontrolle) perfundiert. (**B**) Post-ischämisch erfolgte während der Reperfusionsphase die Analyse der Herzfunktion sowie anschließend die Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)-Färbung und planimetrische Bestimmung der Infarktgröße an horizontalen Herzschnitten.

2.1.2 Versuchstiere

Die LD-Versuche wurden an Herzen, die männlichen Wildtyp-Mäusen des Stammes C57BL/6J im Alter von 11–14 Wochen entnommen wurden, durchgeführt. Die Versuchstiere stammten vom Tierzüchter Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich). Die Haltung erfolgte gemäß nationaler und internationaler Tierschutzbestimmungen in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Standardisiertes Alleinfuttermittel in Pelletform sowie Trinkwasser standen *ad libitum* zur Verfügung. Am Versuchstag wurden die Tiere aus der ZETT abgeholt und bis zur Durchführung des Experiments im laboreigenen Brutschrank untergebracht.

2.1.3 Blut- und Organentnahme

Die Organentnahme aus den für die Versuche genutzten Mäusen wurde mit einer Erlaubnis durchgeführt, die seitens der ZETT genehmigt wurde (Organisationsnummer: O 6/18).

Die Blut- und Organentnahme erfolgte nach finaler Narkose der Mäuse durch Mitarbeiter*innen des kardiologischen Labors durch gewichtsadaptierte intraperitoneale (i.p.) Injektion von 100 mg/kg Körpergewicht (KG) Ketamin-Hydrochlorid (Ketaset®, Zoetis) und 10 mg/kg KG Xylazin (Rompun®, Serumwerk Bernburg). Die ausreichende Tiefe der Narkose wurde durch das Setzen eines Schmerzreizes an der Hinterpfote überprüft. Erst bei ausbleibender Schmerzreaktion wurde mit der Blut- und Organentnahme fortgefahren.

Die Blutentnahme erfolgte mittels Herzpunktion. Dafür wurde die Maus auf einem Präparationstisch fixiert, von subxiphoidal unter Aspiration eine 23 G Kanüle eingeführt und kontrolliert etwa 700 µl Blut in eine zuvor mit Heparin (Heparin-Natrium-5000, Ratiopharm) benetzten Injektionsspritze abgezogen. Zur Organentnahme wurde der Thorax der Maus rasiert und diese anschließend auf dem Präparationstisch fixiert. Durch das Fassen des Sternums mit einer Pinzette, einen waagerechten Bauchschnitt unterhalb des Sternums sowie zwei Entlastungsschnitte durch das Zwerchfell zu den Achseln wurde der Thorax ventral eröffnet und die intrathorakalen Organe freigelegt. Der infrakardiale Gefäßstrang, bestehend aus Aorta descendens, Vena cava inferior und Ösophagus, wurde durchtrennt, die intrathorakalen Organe nach ventral mobilisiert und mit retrokardialen, nach kranial ausgerichteten Schnitten dicht oberhalb der Wirbelsäule aus dem Thorax entfernt.

Zur Vermeidung hypoxischer Schädigung und ischämischer Präkonditionierung wurden die entnommenen Organe rasch in eine mit auf 4°C gekühltem modifiziertem Krebs-Henseleit-Puffer (KHB) gefüllte Präparierschale transferiert [65]. Lunge, Thymus und Ösophagus wurden makroskopisch entfernt. Anschließend wurde die Aorta mikroskopisch freipräpariert, am Truncus brachiocephalicus gekürzt und der linke Vorhof von dorsal eröffnet. Danach wurde die Aorta auf die Aortenkanüle aufgezogen und dort mit einem Seidenfaden fixiert.

2.1.4 Herstellung der Versuchslösungen

Die Perfusion des Herzens erfolgte mittels KHB, einem häufig zur *ex vivo*-Organperfusion verwendeten kristalloiden Bikarbonatpuffer [64]. In **Tabelle 1** sind die verwendeten Chemikalien einschließlich ihrer Konzentration und Mengenangaben zur Herstellung des modifizierten KHB dargestellt. Die Chemikalien (mit Ausnahme von Calciumchlorid) wurden in Reinstwasser (Milli-Q) gelöst und anschließend 15 Minuten lang mit einem Magnetrührer bei 600 Umdrehungen pro Minute (rpm) gemischt. Zur Stabilisierung des pH-Werts auf 7,4 wurde die Lösung mit Carbogen begast. Um eine Ausfällung von Calcium zu vermeiden, wurde Calciumchlorid erst am Ende der 15-minütigen Rührzeit hinzugefügt. Anschließend wurde die

Lösung mittels Vakuumsog durch eine 0,45 µm-Nitrozellulosemembran (Disk 0,45 µm, GVS Filter Technology) filtriert, bei 4°C gelagert und innerhalb von 48h verwendet.

Chemikalie (Hersteller)	**Konzentration**	**1 Liter**
Natriumchlorid (Sigma-Aldrich)	118 mM	6,9 g
Kaliumchlorid (KMF optiChem)	4,7 mM	0,35 g
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (EMSURE)	0,8 mM	0,2 g
Natriumhydrogencarbonat (Supelco)	25 mM	2,09 g
Kaliumdihydrogenphosphat (KMF optiChem)	1,2 mM	0,16 g
D-(+)-Glucose (Sigma-Aldrich)	5,0 mM	0,9 g
Natrium-Pyruvat (Sigma-Aldrich)	1,9 mM	0,22 g
Calciumchlorid-Dihydrat (Merck)	2,5 mM	0,37 g

Tabelle 1: Konzentrations- und Mengenangaben zur Herstellung des modifizierten Krebs-Henseleit-Puffers (KHB)

Zur pharmakologischen Beeinflussung der CD40-CD40L-TRAF6-Interaktion wurden der TRAF-STOP 6860766 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Esther Lutgens, AMC Amsterdam, [55]) und der aktivierende CD40-Antikörper FGK45 (BioXCell) eingesetzt. Zur Herstellung der Versuchslösungen wurden TRAF-STOP und DMSO in *Phosphate-buffered saline* (PBS) und FGK45 in einem spezifischen *Dilution Buffer* auf *Working solutions* verdünnt, welche dann in Mäuseblut gelöst worden. Dabei wurde der in DMSO gelöste TRAF-STOP in PBS auf eine *Working solution* von 250µM verdünnt und anschließend in die Blutproben gegeben, sodass eine Konzentration von 10µM entstand. FGK45 wurde in einem spezifischen *Dilution buffer* verdünnt und anschließend in Mäuseblut gelöst, sodass 10 µg ins Herz perfundiert wurden. Zur Kontrolle wurde DMSO, entsprechend dem TRAF-STOP, 400-fach in PBS verdünnt. Die genutzten Blutproben wurden unmittelbar vor der Verwendung verarbeitet und bis zum Einsatz bei 37°C aufbewahrt.

2.1.5 Aufbau der LD-Anlage

Abb. 6 zeigt den schematischen Aufbau der LD-Apparatur (Apparatus Isolated Heart, Size 1, HSE Harvard Apparatus). Das für die Versorgung des Herzens verwendete Perfusat wurde in einem Vorratsgefäß (**1**) innerhalb eines Wasserbads (**2**) auf 38,3°C erwärmt und dabei kontinuierlich mit Carbogen über eine Fritte begast (**3**), was die Stabilisierung des pH-Werts und eine ausreichende Oxygenierung des Herzens gewährleistete [66]. Die Temperatur des Wasserbads wurde über ein Thermostat (Lauda E100, LAUDA, (**4**)) geregelt.

Das erwärmte Perfusat wurde über den Zulaufschlauch (grün) mittels einer Rollerpumpe (REGLO Digital MS-4/8, Ismatec, (**5**)) in den „Aortenblock“, bestehend aus Basiseinheit, Dopplersonde, Absperrhahn und *Compliance*-Kammer, geleitet. Über die Basiseinheit (**6**) wurde durch Spannen einer eingebauten Teflonmembran (**7**) mithilfe einer Druckpumpe (**8**) der korrekte Perfusionsdruck (= Aortendruck, AP) eingestellt und auf einem Manometer (Bosch + Sohn, (**9**)) dargestellt. Über eine Dopplersonde (MC1PRB-HSE, Harvard Apparatus, (**10**))

wurde der Koronarfluss (CF) gemessen. Der Absperrhahn (**11**) ermöglichte die Regulation des Perfusatzuflusses in die *Compliance*-Kammer (**12**). Bei Umlegen des Absperrhahns zirkulierte das Perfusat über den Überlaufschlauch (blau) zurück in das Vorratsgefäß.

Die Compliance-Kammer war während des Versuchs teilweise mit Perfusat gefüllt und diente sowohl als Luftblasenfalle als auch der Dämpfung der durch die Rollerpumpe verursachten Druckschwankungen. Am unteren Ende der Kammer war die Aortenkanüle (**13**) angeschlossen, über welchen das Perfusat das Herz (**14**) erreichte. Nach der Passage durch das Herz wurde das verbrauchte Perfusat in einen Abfallbehälter geleitet.

Das Herz wurde während des Versuchs phasenweise über einen externen Schrittmacher (HSE Stimulator P, Hugo Sachs Elektronik, (**15**)) stimuliert. Über den dorsal eröffneten linken Vorhof und die Mitralklappe wurde ein Druckballon (**16**) im linken Ventrikel (LV) platziert, der mit einem Druckaufnehmer (Isotec Pressure Transducer, Hugo Sachs Elektronik, (**17**)) verbunden war und der Messung des im LV aufgebauten Drucks diente. Aortenblock und Herz waren von einer Plexiglaskammer (**18**) umgeben, um eine Auskühlung zu verhindern.

Die Zugabe von Blut und Medikamenten erfolgte über eine in einen Perfusor (Precidor Syringe Pump, Infors HT) eingespannte Perfusorspritze (**19**), die über einen Dreiwegehahn (**20**) und den Medikamentenschlauch (rot) mit der *Compliance*-Kammer und der Aortenkanüle verbunden war. Dies ermöglichte die getrennte und weitgehend Kontaminations-freie Applikation von Perfusat und Blut.

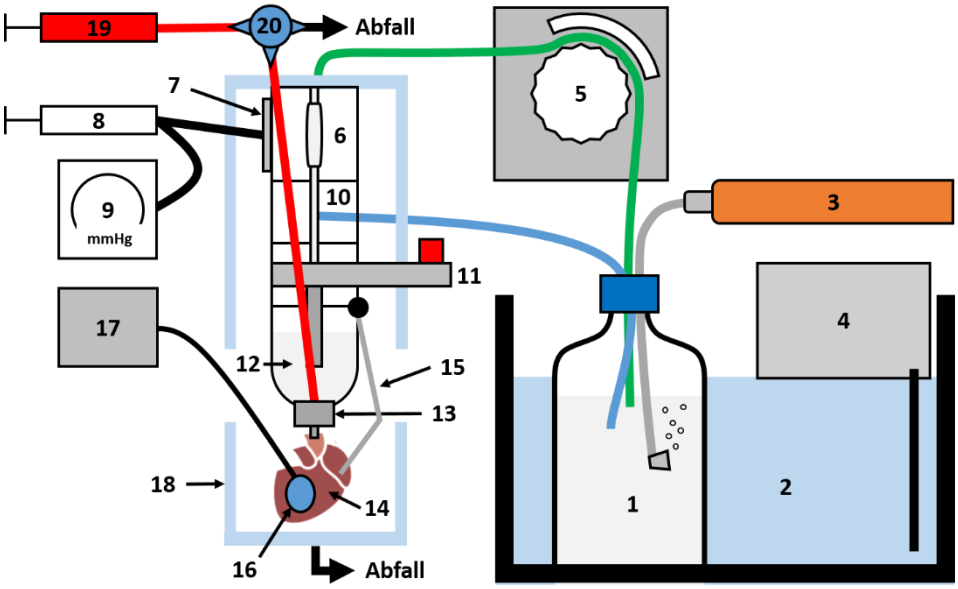


Abb. 6: **Schematischer Aufbau der für die Versuche genutzten LD-Apparatur.** Dargestellt sind: Perfusions-Vorratsgefäß (**1**), Wasserbad (**2**), Carbogen-Flasche (**3**), Thermostat (**4**), Rollerpumpe (**5**), Basiseinheit (**6**), Teflon-Membran (**7**), Druckpumpe (**8**), Manometer (**9**), Dopplersonde (**10**), Absperrhahn (**11**), *Compliance*-Kammer (**12**), Aortenkanüle (**13**), Herz (**14**), Schrittmacher (**15**), Ballon (**16**), Druckaufnehmer (**17**), Plexiglas-Herzkammer (**18**), Medikamenten/Blut-Spritze (**19**), Dreiwegehahn (**20**). Die Funktion der einzelnen Bestandteile wird im Text erläutert.

2.1.6 Versuchsablauf

Der LD-Versuch wurde gemäß eines festgelegten Protokolls durchgeführt. **Abb. 7** zeigt schematisch den Versuchsablauf sowie die Dokumentationszeitpunkte der Herzfunktion.

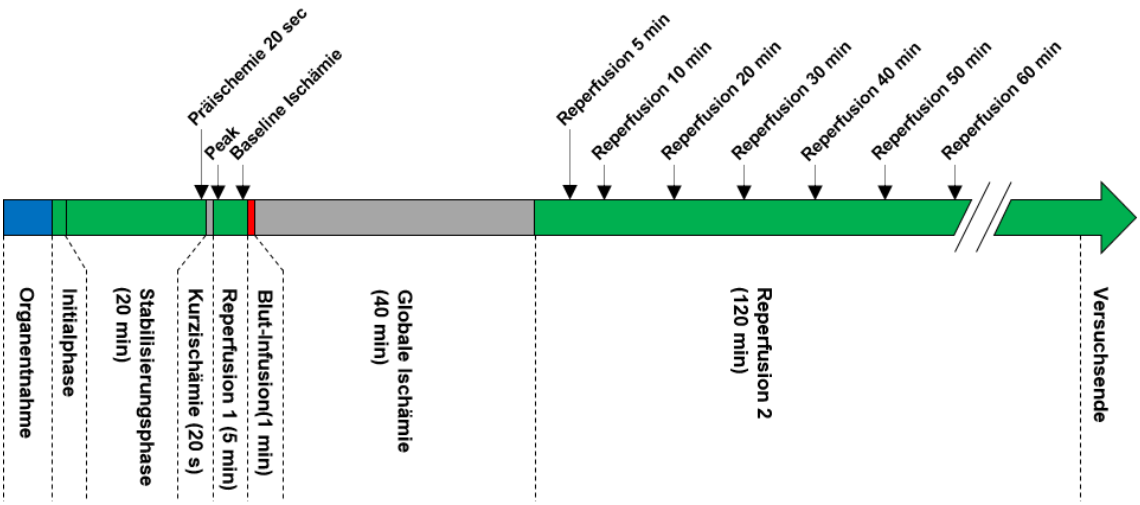


Abb. 7: Schematischer LD-Versuchsablauf. Dargestellt ist der zeitliche Ablauf des LD-Versuchs. Die Abfolge der einzelnen Phasen ist unter der Zeitleiste dargestellt. Die farbliche Markierung der Zeitleiste stellt die Perfusion des Herzens dar: Perfusion mit KHB während Initial-, Stabilisierungs- und Reperfusionsphasen (grün), Perfusion mit Blutprobe während der Phase der Blut-Infusion (rot), keine Perfusion während Organentnahme (Herz gekühlt, blau) und Ischämie-Phasen (grau). Die Zeitpunkte der Dokumentation der Herzfunktionsparameter sind durch Pfeile markiert.

Nach Organentnahme wurde das Herz in die LD-Apparatur eingespannt. Während des Versuchs wurde das Herz retrograd mit einem zuvor manuell eingestellten AP von 100 mmHg mit KHB perfundiert. Zur Messung des linksventrikulären Drucks wurde der Druckballon über den linken Vorhof und die Mitralklappe in den LV eingeführt. Eine physiologische Herzfrequenz (HR) von etwa 600 Schlägen pro Minute wurde über eine externe Schrittmacherelektrode mit einer Spannung von 2 V sichergestellt (Initialphase). Zur Erholung der durch Präparation und Versuchsbeginn verursachten Herzbelastung erfolgte anschließend eine 20-minütige Stabilisierung der Herzfunktion (Stabilisierungsphase).

Zur Überprüfung der Koronarreserve wurde anschließend eine 20-sekündige globale Ischämie ausgelöst (Kurzischämie). Nach einer 5-minütigen Reperfusionsphase (Reperfusion 1) wurden die Parameter der Herzfunktion als Ausgangswerte für die Versuchsauswertung dokumentiert (Baseline Ischämie).

Im Anschluss erfolgte die einminütige Perfusion des Herzens mit 0,4ml Blutprobe, in welcher zuvor TRAF-STOP, FGK45 oder DMSO gelöst worden war (Blut-Infusion). Danach wurde die retrograde Perfusion gestoppt und eine 40-minütige globale Ischämie eingeleitet. Währenddessen wurde der AP auf 0 mmHg gesenkt, die elektrische Stimulation pausiert und Herz in warmem KHB platziert, um eine Auskühlung zu vermeiden (globale Ischämie).

Nach Ablauf der Ischämie begann die 120-minütige Reperfusionsphase, in der das Herz erneut mit einem AP von 100 mmHg mit KHB perfundiert wurde (Reperfusion 2). Hierzu wurde das Organbad beendet und die elektrische Stimulation mit 5 V fortgesetzt, um eine adäquate Erregung des durch die Ischämie geschädigten Herzens sicherzustellen. Die Parameter der Herzfunktion wurden nach 5, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten Reperfusion dokumentiert. Nach 120 Minuten Reperfusion wurde der Versuch beendet.

2.1.7 Messung der Herzfunktion

Während des Versuchs wurden kontinuierlich Parameter der Herzfunktion über die Computersoftware iox2 (emka TECHNOLOGIES) aufgezeichnet. Dabei wurde über eine Dopplersonde der CF sowie über den im LV eingebrachten Druckballon der linksventrikulär entwickelte Druck (LVDP), der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP), die maximale Druckanstiegs- und Druckabfallsgeschwindigkeit des LV (dP/dt_{max} und dP/dt_{min}) und die HR gemessen. Zu festgelegten Zeitpunkten wurden die Parameter dokumentiert. Zusätzlich wurden der auf das Herzgewicht normierte Fluss (CF/HW) und das Herzfrequenz-Druck-Produkt (*Rate pressure product,* RPP) als Maß der Druckentwicklung pro Zeit berechnet.

Abb. 8 zeigt die Darstellung der untersuchten Parameter im zur Datenerfassung genutzten Computerprogramm iox2. Auf dem *Main Display* (**Abb. 8A**) waren die die gemessenen Parameter der Herzfunktion der letzten 60 Sekunden (1) sowie der LVDP (2), der AP (3) und der CF (4) über den gesamten Versuchsablauf graphisch dargestellt. Auf dem *Signal Screen* (**Abb. 8B**) waren der LVDP der letzten drei Sekunden (6), der AP über die letzten 0,6 Sekunden (7) und der CF über die letzten 25 Minuten (8) visualisiert. Zusätzlich wurde das verwendete Versuchsprotokoll mit der aktuellen Position im Versuchsablauf sowie den vorherigen und folgenden Schritten abgebildet (5).

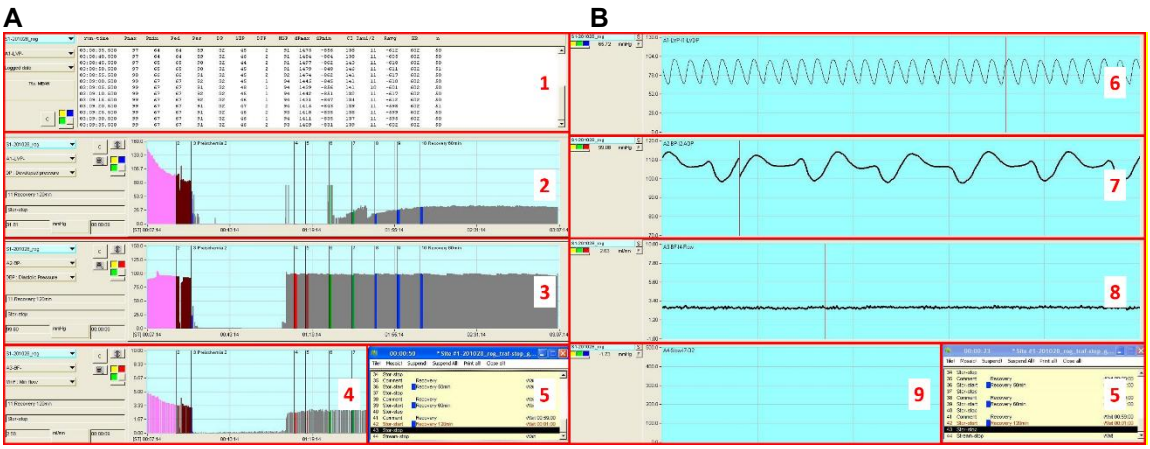


Abb. 8: Exemplarische Darstellung der gemessenen Parameter der Herzfunktion in iox2. (**A**) *Main Display* mit den in der letzten Minute gemessenen Parametern (1), dem linksventrikulär entwickelten Druck (LVDP, 2), dem Aortendruck (AP, 3) und dem koronaren Fluss (CF, 4) über den gesamten Versuchsablauf. (**B**) *Signal Screen* mit LVDP der letzten 3 Sekunden (6), AP der letzten 0,6 Sekunden (7) und CF der letzten 25 Minuten (8). Zusätzlich Darstellung des Versuchsprotokolls mit der aktuellen Position im Versuchsablauf sowie den vorherigen und kommenden Schritten (5).

2.1.8 Qualitätskriterien

Zur Qualitätssicherung der Versuche wurden institutsinterne Qualitätskriterien definiert, die eine annähernd physiologische Funktion der entnommenen Herzen sicherstellten. Wurde mindestens eines dieser Kriterien nicht erfüllt, wurde der Versuch von der Auswertung ausgeschlossen. Die definierten Qualitätskriterien sind in **Tabelle 2** aufgeführt.

Kriterium/Parameter	**Ziel**	**Zeitpunkt**
Präparationszeit	≤ 7 min	Versuchsbeginn
CF	1-4 ml/min	nach Stabilisierungsphase (Prä-Ischämie 20 sec)
PED	5-15 mmHg	nach Stabilisierungsphase (Prä-Ischämie 20 sec)
dP/dt_{max}	≥ 2.500 mmHg/s	nach Stabilisierungsphase (Prä-Ischämie 20 sec)
dP/dt_{min}	≤ -2.000 mmHg/s	nach Stabilisierungsphase (Prä-Ischämie 20 sec)
Anstieg des CF	≥ 75 %	nach Kurzischämie (Peak)
DP	> 50 mmHg	nach Reperfusion 1 (Baseline Ischämie)

Tabelle 2: Qualitätskriterien der LD-Versuche. Die Angabe des Zeitpunkts in Klammern bezieht sich auf die in **2.1.6** definierten Zeitpunkte.

Da die während der Präparation des Mäuseherzens unvermeidliche Unterbrechung der koronaren Perfusion, trotz Kühlung des Herzens in gekühltem KHB, zu einer ischämischen Schädigung des Myokards führte, musste die Präparationszeit möglichst kurz gehalten werden, um eine zusätzliche ischämische Schädigung zu vermeiden [64]. Die zulässige Präparationszeit, gemessen vom ersten Hautschnitt bis zum Beginn der retrograden Perfusion, wurde institutsintern auf 7 Minuten festgelegt. Um sicherzustellen, dass während der Präparation und des Versuchsbeginns kein signifikanter ischämischer Schaden aufgetreten war, musste am Ende der Stabilisierungsphase eine annähernd physiologische Herzfunktion gewährleistet sein. Hierfür wurden Grenzwerte definiert, die eine adäquate Kontraktilität anzeigten (dP/dt_{max} ≥ 2.500 mmHg/s, dP/dt_{min} ≤ -2.000 mmHg/s). Um eine physiologische Vordehnung des LV und damit eine adäquate Herzfunktion zu ermöglichen, musste der PED manuell auf 5-15 mmHg eingestellt sein. Der CF musste zwischen 1 und 4 ml/min liegen, um eine Obstruktion des Perfusatflusses in der LD-Apparatur oder eine Undichtigkeit des Systems auszuschließen. Zur Sicherstellung einer ausreichenden Koronarreserve musste der CF in der auf die Kurzischämie folgenden Reperfusionsphase um mehr als 75% des prä-ischämischen Wertes ansteigen. Zuletzt musste gewährleistet werden, dass vor Beginn der Blut-Infusion und der globalen Ischämie erneut eine annähernd physiologische Pumpfunktion vorlag. Hierfür musste der LVDP mindestens 50 mmHg betragen. Bei Nichterfüllung eines der Kriterien wurde der Versuch vorzeitig abgebrochen.

2.1.9 Färbung des Herzens mittels TTC-Färbung

Die Auswertung der Infarktgröße erfolgte nach Anfärbung des vitalen Restgewebes mittels TTC (Sigma-Aldrich), einem Redoxfarbstoff, der in vitalen Zellen durch die Co-Faktoren Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Wasserstoff (NADH) und Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Wasserstoff (NADPH) zu 1,3,5-Triphenylformazan reduziert wird, wodurch vitales Gewebe rot erscheint [67]. In abgestorbenen Zellen bleibt dieser Farbumschlag aufgrund des Verlusts reduzierender Co-Faktoren aus, sodass devitale Zellen farblos bleiben [68].

Für die Versuche wurde eine 1%ige TTC-Lösung vorbereitet. Die Herzen wurden nach Abschluss der 120-minütigen Reperfusion bei -20°C eingefroren, anschließend von der Herzspitze ausgehend in etwa 1 mm dicke transversale Scheiben geschnitten und jeweils lichtgeschützt für 5 Minuten bei 38°C und 600 rpm in der 1%igen TTC-Lösung angefärbt.

2.1.10 Auswertung der Infarktareale

Die Auswertung der Infarktgrößen erfolgte durch planimetrische Messung der einzelnen Herzscheiben mit der Software Las X (Leica Microsystems). **Abb. 9** zeigt die exemplarische Messung der Infarktgrößen an einer Herzscheibe.

Für jede Herzscheibe wurden die Flächen von LV (rot) und rechtem Ventrikel (RV, pink), die Flächen des vitalen Myokards von LV (blau) und RV (türkis) sowie gegebenenfalls der Flächen der ventrikulären Lumina (gelb) vermessen. Aus diesen Messwerten konnten rechnerisch die Flächen des devitalen Gewebes und damit die Infarktgrößen ermittelt werden. Unter Berücksichtigung der zuvor ermittelten Gewichte des Herzens und der Herzscheiben ließ sich näherungsweise die Infarktgröße des LV und des gesamten Herzens bestimmen.

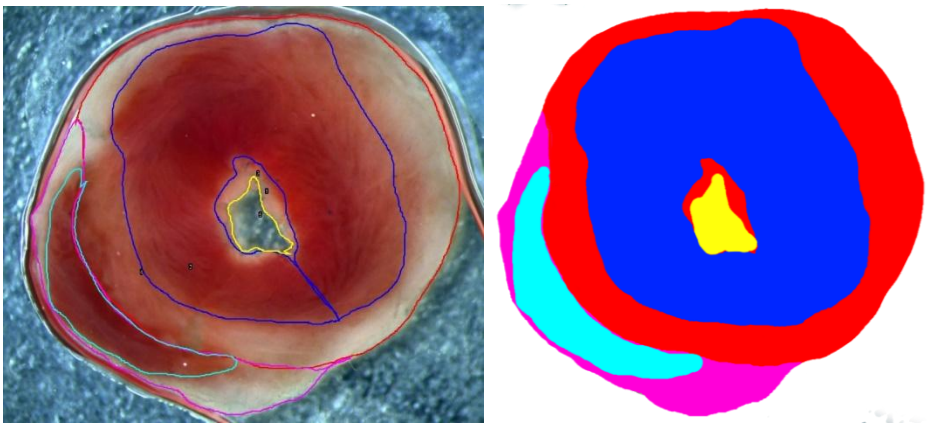


Abb. 9: Exemplarische planimetrische Bestimmung der Infarktgröße an einer Herzscheibe. Ausgemessen sind Fläche des linken Ventrikels (LV) inkl. Lumen (rot), Fläche des rechten Ventrikels (pink), vitales Gewebe des LV (blau), vitales Gewebe des rechten Ventrikels (türkis) und Lumen des LV (gelb).
Berechnung der Infarktgröße des LV = $\frac{rot-blau-gelb}{rot-gelb}$.

Berechnung der Infarktgröße der gesamten Herzscheibe = $\frac{rot+pink-blau-gelb-türkis}{rot+pink-gelb}$

2.2 Analyse interzellulärer Inflammationsproteine nach STEMI mittels NULISAseq

2.2.1 Prinzip des NULISAseq-Immunoassays

Die Untersuchung der Plasmaspiegel verschiedener interzellulärer Inflammationsproteine innerhalb des ersten Tages nach STEMI erfolgte mittels NULISAseq-Immunoassay. Dieser verknüpft die Eigenschaften klassischer Multiplex-Assays wie die Möglichkeit der zeitgleichen Multiparameteranalyse bei geringem Probenvolumen und eine dadurch reduzierte Anfälligkeit für präanalytische und analytische Fehler mit NGS. Durch Reduktion von Hintergrundsignalen und Amplifikation von als Identifikator-Molekül dienenden DNA-Oligonukleotiden wird eine hochsensitive Proteindetektion bis in den attomolaren Bereich ermöglicht [69].

Abb. 10 zeigt den schematischen Ablauf des NULISAseq-Verfahrens. Die zu messenden Analyte werden dabei von zwei DNA-Oligonukleotid-Antikörper-Konjugaten gebunden, die sowohl in der Antikörperkomplex-Reinigung als auch bei der Analyt-Detektion eine Rolle spielen (**A**). Anschließend binden magnetische Mikropartikel, sogenannte *„Beads“*, an die mit Poly-A-Oligonukleotiden verknüpften *Capture*-Antikörper. In einem magnetischen Waschvorgang werden die *Bead*-Antikörper-Komplexe im Probengefäß zurückgehalten, während ungebundene Substanzen entfernt werden (**B**). Nach dem Resuspendieren binden Streptavidin-beschichtete magnetische *Beads* an die biotinylierten *Detection*-Antikörper. In einem weiteren Waschschritt verbleiben erneut nur die magnetisch gebundenen *Bead*-Antikörperkomplexe im Probengefäß, während ungebundene Substanzen, einschließlich freier *Capture*-Antikörper, entfernt werden. (**C**) Nach diesem *Dual-Capture-and-Release*-Vorgang verbleiben ausschließlich die Antikörper-Analyt-Komplexe im Probengefäß. Die an *Capture*- und *Detection*-Antikörper konjugierten DNA-Oligonukleotide werden nun amplifiziert und anschließend ausgewertet, was eine Messung selbst geringster Protein-Konzentrationen ermöglicht (**D**).

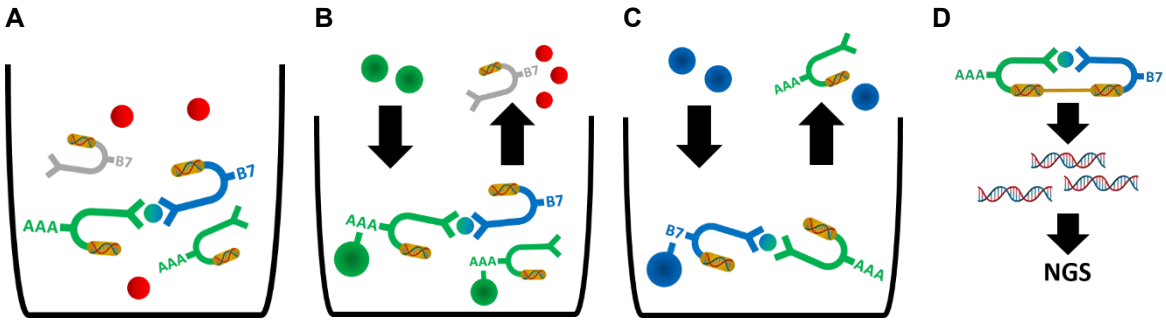


Abb. 10: Schematische Darstellung des NULISAseq-Versuchsablaufs. Bindung des Analyts durch die passenden *Capture*- und *Detection*-Antikörper (**A**). Bindung magnetischer *Beads* an die *Capture*-Antikörper, Auswaschen ungebundener Substanzen (**B**). Bindung Streptavidin-beschichteter magnetischer *Beads* an die biotinylierten *Detection*-Antikörper, Auswaschen ungebundener Substanzen (**C**). Amplifikation der als Identifikator-Moleküle dienenden, an *Capture*- und *Detection*-Antikörper gebundenen DNA-Oligonukleotide und anschließende Auswertung mittels *Next-Generation-Sequencing* (NGS) (**D**).

2.2.2 Blutproben zur NULISAseq-Analyse

Für die NULISAseq-Analyse wurden Blutproben der „Düsseldorfer SYSTEMI-Kohorte“ (Studiennummer 5961R, Registrierungs-ID: 2017044229) verwendet. Dabei wurden bei Patient*innen mit STEMI durch Mitarbeitende der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Uniklinikums Düsseldorf zu fest definierten Zeitpunkten nach STEMI Blutplasmaproben abgenommen, in diesem Fall zum Zeitpunkt der PCI bei STEMI (Zeitpunkt d0) sowie am folgenden Tag, also nach erfolgter Revaskularisation (Zeitpunkt d1) [70].

Die Plasmaproben wurden nach der Entnahme aliquotiert und unverdünnt bei -80°C gelagert. Da die Fragestellung auch den Vergleich von Patient*innen mit und ohne Vorliegen eines T2D beinhaltete, wurden in die Analyse zufällig ausgewählte Proben von 15 Patient*innen mit T2D (15 männlich, 0 weiblich, durchschnittliches Alter 67,7 Jahre, Median 69,6 Jahre) und 29 Patient*innen ohne T2D (22 männlich, 7 weiblich, durchschnittliches Alter 63 Jahre, Median 60,8 Jahre) eingeschlossen. Aus Praktikabilitätsgründen wird im Folgenden, wenn nicht anders erwähnt, das generische Maskulinum verwendet.

2.2.3 Datengenerierung

Die analysierten Daten stammen aus einer größeren NULISAseq-Untersuchung, welche von Dr. Alexander Lang koordiniert und bei *Alamar Biosciences Inc.* (Fremont, Kalifornien, USA) durchgeführt wurde. Die hier untersuchten Analyte stimmen mit dem Panel der Luminex-Untersuchungen überein, welches in internen Diskussionen festgelegt wurde (siehe 2.3.3).

2.3 Analyse interzellulärer Inflammationsproteine nach STEMI mittels Luminex

2.3.1 Prinzip des Luminex-Immunoassays

Die Untersuchung der Plasmakonzentrationen verschiedener interzellulärer Inflammationsproteine im Verlauf der ersten 6 Monate nach STEMI erfolgte mittels Luminex-Immunoassay. Dabei handelt es sich, wie beim NULISAseq-Assay, um einen multiplexen Immunoassay, mit dem sich zeitgleich mehrere Analyte in einer Probe bestimmen lassen. Grundlage des Verfahrens sind ebenfalls magnetische, fluoreszierende „*Beads*“, an welche *Capture*-Antikörper für ein spezifisches Analyt gebunden sind. So lässt sich jedem Analyt ein spezifisches Fluoreszenz-Profil zuordnen.

Bindet nach Zugabe einer diagnostischen Probe ein Analyt an seinen spezifischen *Capture*-Antikörper, wird es in einem folgenden Schritt von einem biotinylierten *Detection*-Antikörper gebunden, an den anschließend wiederum das fluoreszierende Reporter-Molekül Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) bindet. In der Luminex-Apparatur erfolgt anschließend eine durchflusszytometrische Analyse, bei der sowohl das Fluoreszenzprofil der *Beads* als auch

das Signal des SA-PE erfasst wird, wodurch die Konzentration der jeweiligen Analyte bestimmt werden kann.

Das Luminex-Verfahren bietet, ähnlich wie die NULISA-Analyse, viele Vorteile. Als Multiplex-Analyse erfordert es nur geringe Probenvolumina zur gleichzeitigen Bestimmung mehrerer Analyte, wobei die Versuchsbedingungen für alle Parameter identisch sind und sich somit das Risiko präanalytischer Fehler reduziert [71, 72]. Da die Konzentrationsbestimmung jedoch durchflusszytometrisch und nicht durch Amplifikation und NGS erfolgt, ist die Konzentrationsbestimmung im niedrig-molaren Bereich dem NULISAseq-Assay jedoch unterlegen.

2.3.2 Blutproben zur Luminex-Analyse

Für die Luminex-Analyse wurden ebenfalls Blutplasmaproben der „Düsseldorfer SYSTEMI-Kohorte“ verwendet. Die Blutentnahmen erfolgten zum Zeitpunkt der PCI sowie am nächsten Tag, außerdem 5 Tage und 6 Monate nach STEMI [70]. Die Proben wurden nach der Entnahme aliquotiert und unverdünnt bei -80°C gelagert. Zur Untersuchung potenzieller Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne Vorliegen eines T2D wurden zufällig ausgewählte Proben von 9 Patienten mit T2D (8 männlich, 1 weiblich, durchschnittliches Alter Jahre 52,8 Jahre, Median 55 Jahre) und 10 Patienten ohne T2D (7 männlich, 3 weiblich, durchschnittliches Alter 59,1 Jahre, Median 57,5 Jahre) in die Analyse eingeschlossen. Aus prozeduralen Gründen wurde bei einem Patienten mit T2D die Plasmaprobe am Tag nach STEMI sowie bei 2 Patienten mit und 2 Patienten ohne T2D die Plasmaprobe 5 Tage nach STEMI nicht in die Analyse einbezogen.

2.3.3 Materialien

Zur Durchführung des Multiplex-Immunoassays wurde ein *Human Premixed Multi-Analyte Kit* von R&D Systems verwendet, welches individuell für die Analyse von sCD40, sCD40L, löslichem CD27 (sCD27), IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-13 und IL-18 hergestellt wurde. Dieses Panel wurde in internen Diskussionen festgelegt und stimmt mit dem Panel der mittels NULISA-Analyse untersuchten Inflammationsproteine überein (siehe 2.2.1). Für die Analyse wurde ein Luminex® 200™ (R&D Systems) verwendet.

2.3.4 Versuchsdurchführung

Für die Durchführung des Luminex-Assays wurden alle benötigten Reagenzien, Standards und Plasmaproben gemäß den Herstellerangaben vorbereitet. Die Proben wurden behutsam auf Raumtemperatur gebracht und entsprechend dem Protokoll verdünnt.

Abb. 11 zeigt schematisch den Ablauf der Luminex®-Versuchsdurchführung. Eine 96-*Well*-Mikrotiterplatte wurde zunächst mit den Plasmaproben und den Standards befüllt (**A**). Anschließend wurden die magnetischen, mit *Capture*-Antikörpern beschichteten *Beads* in die

Wells gegeben und die Platte wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (**B**). Nach der Inkubation wurden alle ungebundenen Bestandteile der Plasmaproben aus den Wells gewaschen, wobei *Beads* und gebundene Analyte magnetisch in den Wells gehalten wurden (**C**). Danach wurde der biotinylierte *Detection*-Antikörper zugegeben und die Platte wurde eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (**D**). Anschließend wurden nicht an Analyte gebundene *Detection*-Antikörper in einem weiteren Waschgang entfernt, bevor fluoreszierendes SA-PE zugegeben wurde, die Platte verschlossen und für 30 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert wurde (**E**). Nicht an die *Detection*-Antikörper gebundenes SA-PE wurde in einem abschließenden magnetischen Waschvorgang entfernt (**F**). Zum Schluss wurden die an *Beads* und SA-PE-markierte *Detection*-Antikörper gebundenen Analyte resuspendiert und im Luminex® 200™ analysiert (**G**).

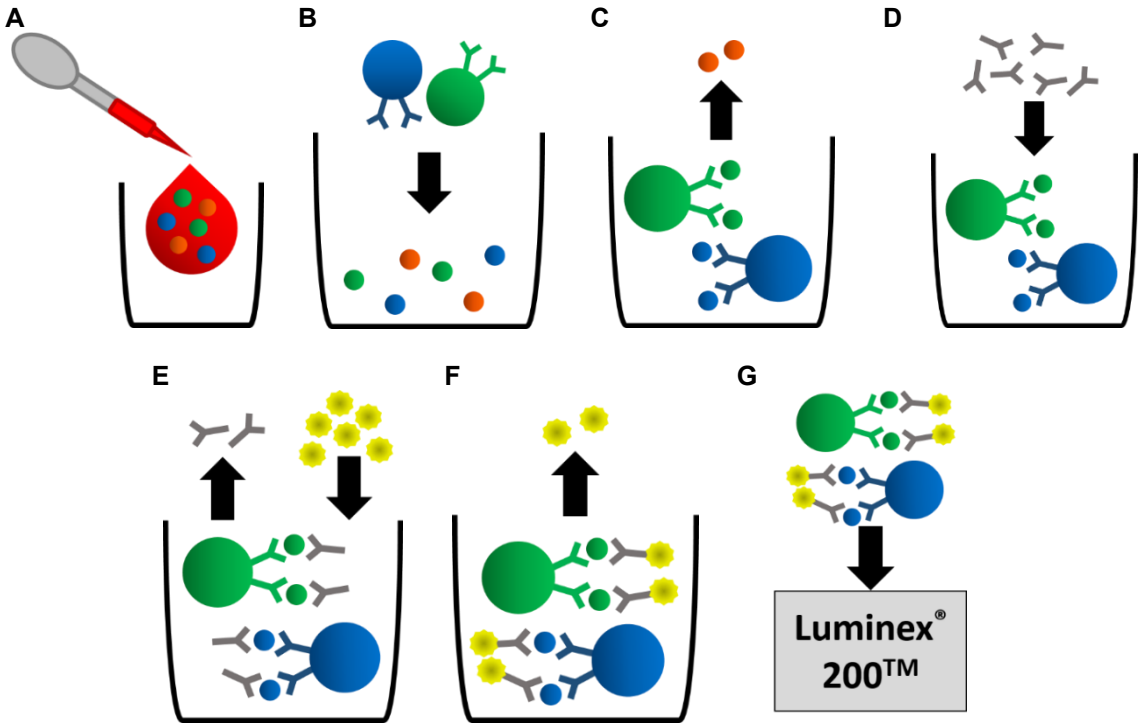


Abb. 11: Schematische Darstellung des Luminex-Versuchsablaufs. Hinzufügen der Standards und Plasmaproben in die Mikrotitierplatte (**A**), Hinzufügen der magnetischen Beads mit *Capture*-Antikörpern (**B**), magnetisches Auswaschen der ungebundenen Plasmaanteile (**C**), Hinzufügen der biotinylierten *Detection*-Antikörper (**D**), magnetisches Auswaschen der ungebundenen Detection-Antikörper und Hinzufügen des Streptavidin-Phycoerythrin (**E**), magnetisches Auswaschen des ungebundenen Streptavidin-Phycoerythrins (SA-PE, **F**), Resuspendieren und Auswertung (**G**).

2.4 Statistik

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgten mit der Statistik-Software GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA). Datensätze wurden mittels Shapiro-Wilk-Test und Q-Q-Plot auf Normalverteilung untersucht. Die jeweils durchgeführten statistischen Testverfahren und graphisch dargestellten Werte sind in den Abbildungsbeschreibungen aufgeführt. Testergebnisse wurden als statistisch signifikant

beschrieben bei einem p-Wert < 0,05, eine weitere Abstufung der Signifikanz erfolgte in sehr signifikant (p < 0,01) und hoch signifikant (p < 0,001). In den Korrelationsanalysen erfolgte die Einteilung nach starker positiver Korrelation (r ≥ 0,5), mäßiger positiver Korrelation (r ≥ 0,3), mäßiger negativer Korrelation (r ≤ -0,3) und starker negativer Korrelation (r ≤ -0,5).

3 Ergebnisse:

3.1 Pharmakologische Modulation der CD40-TRAF6-abhängigen Signaltransduktion im I/R-Versuch am isolierten LD-Herzen

3.1.1 Versuchsübersicht

Die Untersuchung der Auswirkung einer Modulation der CD40-TRAF6-abhängigen Signaltransduktion im Rahmen einer akuten myokardialen Ischämie auf Herzfunktion und Infarktgröße erfolgte durch Durchführung eines I/R-Versuchs am isolierten LD-Mäuseherzen. Um die mögliche Beteiligung von Immunzellen an den untersuchten Prozessen mit einzubeziehen, wurde das Koronarsystem der untersuchten Mäuseherzen, wie in 2.1.6 dargestellt, unmittelbar vor der globalen Ischämie mit Mäuseblut gefüllt, welches zuvor mit TRAF-STOP, dem aktivierenden CD40-Antikörper FGK45 oder einer PBS/DMSO-Kontrolle angereichert wurde. Im Anschluss an die 40-minütige globale Ischämie wurden innerhalb der ersten 60 Minuten der Reperfusion funktionelle Parameter der Herzfunktion (CF, CF/HW, LVDP, LVEDP, dP/dt_{max} und dP/dt_{min}) aufgezeichnet und analysiert. Nach weiteren 60 Minuten Reperfusion wurden die Herzschnitte angefärbt (s. 2.1.9) und dadurch die Infarktgröße analysiert (s. 2.1.10). Die zuvor definierten Qualitätskriterien (siehe 2.1.8) wurden in 9 Versuchen der TRAF-STOP-Gruppe, 7 Versuchen der FGK45-Gruppe und 9 Versuchen der Kontrollgruppe erfüllt. Diese Versuche wurden in die Auswertung einbezogen.

3.1.2 Erfassung der funktionellen Daten der Herzfunktion

Die Herzfunktion im Verlauf eines exemplarischen Versuchs der Kontrollgruppe zeigte post-ischämisch zunächst eine kurze Phase der Hyperämie mit folgendem Rückgang des CF im Verlauf der Reperfusion (**Abb. 12A**). Dabei fand sich in einem Teil der Versuche zwar ein initial erhöhter CF, welcher jedoch zum ersten Messzeitpunkt (nach 5 Minuten Reperfusion) bereits auf oder unter den prä-ischämischen Ausgangswert abgefallen war. Der LVEDP war post-ischämisch zunächst massiv erhöht und es kam erst im Verlauf der Reperfusion zu einer Erholung und damit zu einer Abnahme des LVEDP (**Abb. 12B**). LVDP und RPP als Zeichen der systolischen Funktion sowie dP/dt_{max} und dP/dt_{min} als Zeichen der Kontraktilität waren post-ischämisch stark vermindert. Erst mit Abnahme der kardialen Kontraktur setzte auch hier eine Erholung ein, welche jedoch die prä-ischämischen Ausgangswerte nicht erreichte (**Abb.** 12**C-F**). In den anderen Versuchen der drei Versuchsgruppen zeigten sich individuell leicht unterschiedliche Verläufe, die allgemeinen Entwicklungen im Rahmen der Reperfusion waren jedoch vergleichbar.

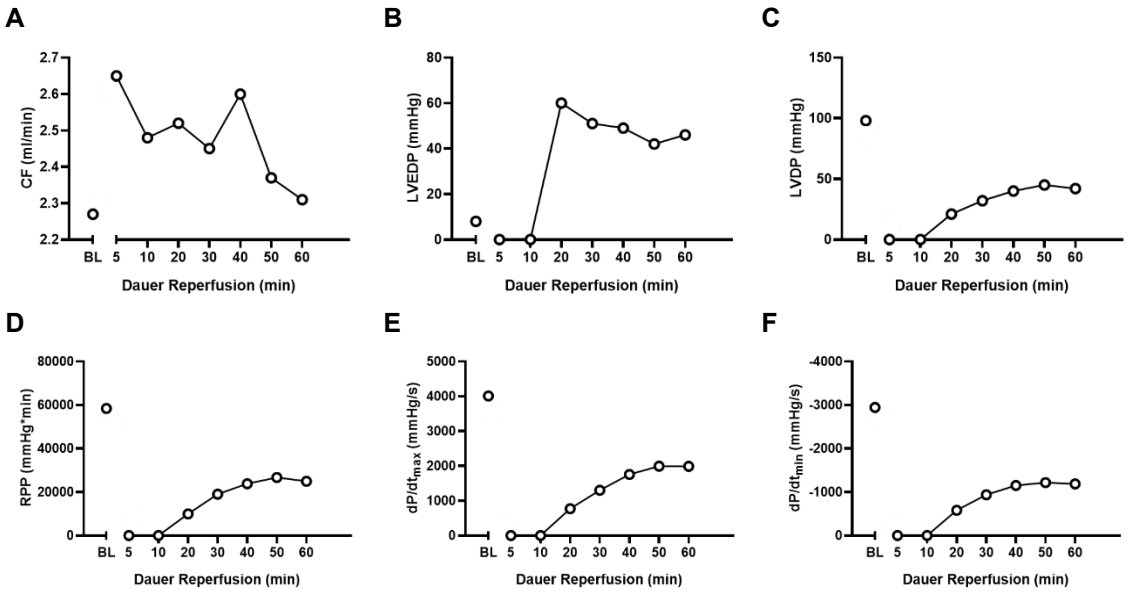


Abb. 12: Exemplarische Darstellung der Parameter der Herzfunktion im Verlauf eines LD-Versuchs der Kontrollgruppe (190823_c01). Abgebildet sind CF (**A**) in ml/min, enddiastolischer linksventrikulärer Druck (LVEDP, **B**) in mmHg, LVDP (**C**) in mmHg, *Rate Pressure Product* (RPP, **D**) in mmHg*min, maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}, **E**) in mmHg/s und maximale Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt_{min}, **F**) eines Versuchs der Kontrollgruppe. Darstellung der *Baseline*-Werte vor der 40-minütigen Ischämie (BL) sowie die Werte nach 5, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten Reperfusion.

3.1.3 Auswertung der Herzfunktion

Die Untersuchung der Herzfunktion im LD-Modell beinhaltete die Messung des CF (**Abb. 13A**). Ausgehend von ähnlichen Ausgangswerten zeigte sich eine stete Abnahme des koronaren Flusses in allen drei Versuchsgruppen.

In der TRAF-STOP-Gruppe war der CF prä-ischämisch sowie zu Beginn der Reperfusion zunächst nicht-signifikant, ab 20 Minuten Reperfusion jedoch signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (Differenz -0,77 bis -0,87 ml/min; p = 0,0453 bis 0,0110). In der FGK45-Gruppe fand sich weder prä-ischämisch noch im Verlauf der Reperfusion eine signifikante Differenz zur Kontrollgruppe. Auffällig zeigte sich ab 40 Minuten Reperfusion eine raschere Abnahme des CF in der FGK45- als in der TRAF-STOP- und Kontrollgruppe.

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Unterschiede im CF möglicherweise auf eine unterschiedliche Größe der verwendeten Herzen zurückzuführen waren, wurde der CF auf die Herzgewichte normiert (**Abb. 13B**). Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Herzgewichten der in den drei Versuchsgruppen verwendeten Herzen (p = 0,3743). In der TRAF-STOP-Gruppe zeigte sich eine ähnliche Dynamik wie in der Untersuchung des absoluten CF. Sowohl prä-ischämisch als auch während der ersten 10 Minuten der Reperfusion unterschied sich der CF/HW nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Ab 20 Minuten Reperfusion war der CF/HW in der TRAF-STOP-Gruppe jedoch signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (Differenz -6,97 bis -7,75 ml/(min*g); p = 0,0133 bis 0,0029). In der

FGK45-Gruppe unterschied sich der prä-ischämische CF/HW kaum von der Kontrollgruppe. Im späteren Verlauf der Reperfusion nahm, wie bei der Analyse des absoluten CF, der CF/HW in der FGK45-Gruppe stärker ab und war ab 50 Minuten Reperfusion signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (Differenz -6,133 bzw. -7,148 ml/(min*g); p = 0,0442 bzw. 0,0483).

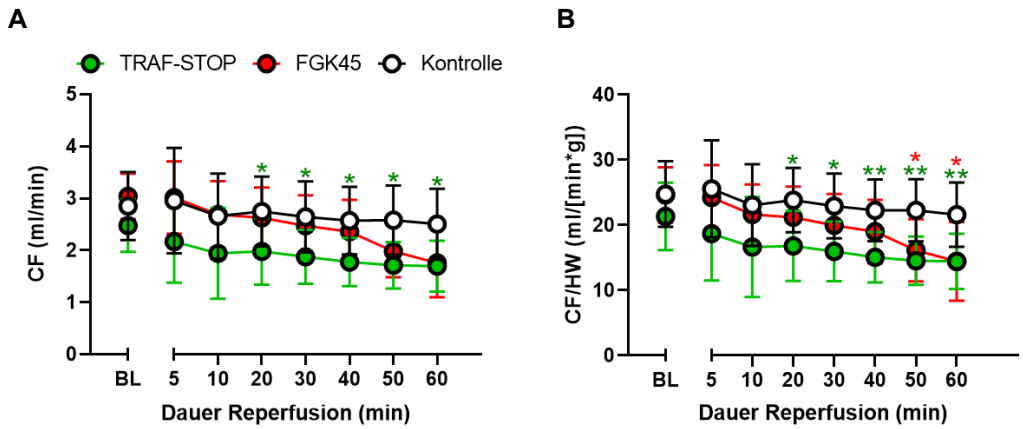


Abb. 13: Auswirkung der prä-ischämischen Applikation von TRAF-STOP und FGK45 auf die koronare Perfusion in der Reperfusionsphase. Entwicklung des CF (**A**) in ml/min sowie Entwicklung des CF/HW (**B**) in ml/(min*g). BL-Werte sowie nach 5, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten Reperfusion. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, für n = 9 (PBS-DMSO-Kontrolle und TRAF-STOP), n = 7 (FGK45); * p < 0,05, ** p < 0,01 (*2way ANOVA mit Dunnett's multiple comparisons test*).

Die post-ischämische Entwicklung der diastolischen kardialen Funktion wurde durch Messung des LVEDP untersucht (**Abb. 14**). Ausgehend von ähnlichen prä-ischämischen Ausgangswerten zeigte sich in allen Versuchsgruppen post-ischämisch ein stark erhöhter LVEDP, wobei der LVEDP in den ersten 20 Minuten der Reperfusion in allen Versuchsgruppen stark anstieg, in der TRAF-STOP- und der FGK45-Gruppe etwas schneller als in der Kontrollgruppe. Anschließend nahm der LVEDP bis zum Ende der Reperfusion langsam ab, ohne dass der prä-ischämische Ausgangswert erreicht wurde. Dabei zeigten sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Differenzen zwischen den Versuchsgruppen.

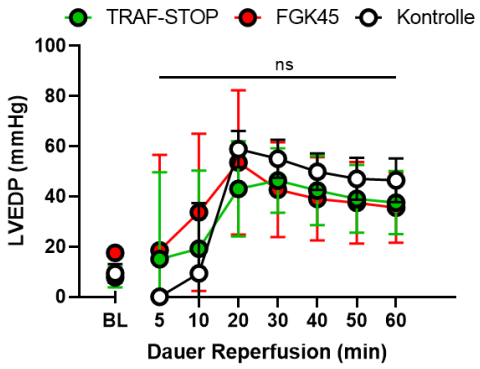


Abb. 14: Auswirkung der prä-ischämischen Applikation von TRAF-STOP und FGK45 auf den enddiastolischen linksventrikulären Druck in der Reperfusionsphase. Entwicklung des LVEDP in mmHg. BL-Werte sowie nach 5, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten Reperfusion. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, für n = 9 (PBS-DMSO-Kontrolle und TRAF-STOP), n = 7 (FGK45); ns = p ≥ 0,05 (*2way ANOVA mit Dunnett's multiple comparisons test*).

Die Untersuchung der systolischen linksventrikulären Funktion erfolgte durch Messung des LVDP (**Abb. 15A**). Dabei fand sich in allen Versuchsgruppen ein stark reduzierter LVDP nach der globalen Ischämie, welcher sich im Verlauf der Reperfusion langsam erholte, das präischämische Ausgangsniveau jedoch nicht wieder erreichte. Die Erholung des LVDP im Verlauf der Reperfusion ging dabei mit dem Abfall des LVEDP einher. In der TRAF-STOP-Gruppe zeigte sich dabei weder prä-, noch post-ischämisch eine relevante Differenz zur Kontrollgruppe. In der FGK45-Gruppe bestand prä-ischämisch ein signifikant geringerer LVDP als in der Kontrollgruppe (Differenz -19,63 mmHg; p = 0,0061). Davon ausgehend fanden sich in der Reperfusion jedoch kaum Unterschiede zur Kontrollgruppe. Lediglich nach 10 Minuten Reperfusion war der LVDP in der FGK45-Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Differenz 10,73 mmHg; p = 0,0044).

Zur genaueren Untersuchung der systolischen linksventrikulären Funktion pro Zeit wurde das RPP berechnet und analysiert (**Abb. 15B**). Da die Herzen während der gesamten Reperfusion durch eine externe Schrittmachersonde auf physiologische Werte stimuliert wurden, spiegelt das RPP vor allem die Druckentwicklung wider und es zeigten sich keine relevanten Differenzen in der Entwicklung des RPP im Vergleich zum LVDP. Ein relevanter Unterschied war lediglich, dass sich der signifikante Unterschied bei Vergleich des LVDP zwischen FGK45- und Kontrollgruppe nach 10 Minuten Reperfusion nicht reproduzieren ließ (p = 0,2072). Darüber hinaus fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen im Verlauf der gesamten Reperfusion.

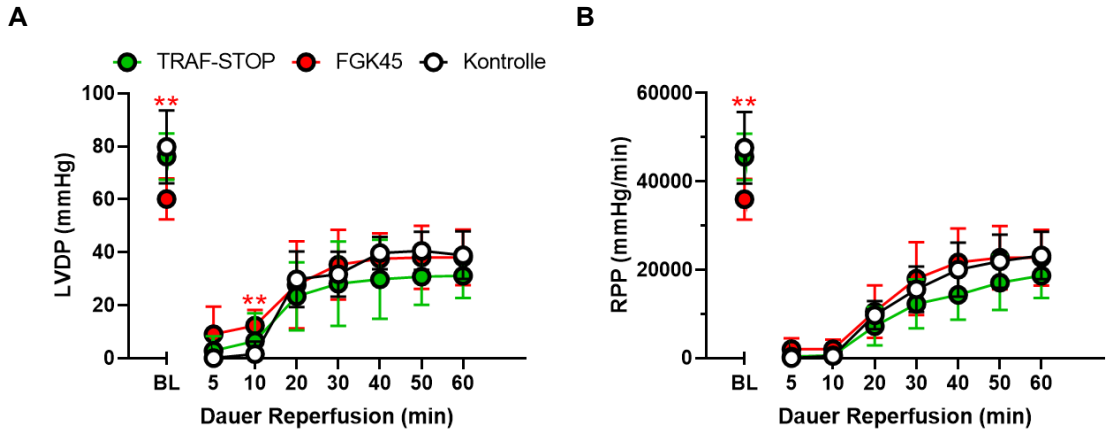


Abb. 15: Auswirkung der prä-ischämischen Applikation von TRAF-STOP und FGK45 auf den linksventrikulär entwickelten Druck in der Reperfusionsphase. Entwicklung des LVDP (**A**) in mmHg sowie Entwicklung des RPP (**B**) in mmHg*min. BL-Werte sowie nach 5, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten Reperfusion. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, für n = 9 (PBS-DMSO-Kontrolle und TRAF-STOP), n = 7 (FGK45); ** p < 0,01 (*2way ANOVA mit Dunnett's multiple comparisons test*).

Die Analyse der systolischen und diastolischen linksventrikulären Funktion im LD-Modell beinhaltete zusätzlich die Untersuchung der maximalen Druckanstiegs- und Druckabfallsgeschwindigkeit als Maß der linksventrikulären Kontraktilität (**Abb. 16**). Dabei

zeigten sich vergleichbare Dynamiken zur Analyse des LVDP (siehe **Abb. 15A**). In allen Versuchsgruppen zeigte sich nach der globalen Ischämie zunächst eine starke Abnahme der Kontraktilität, welche sich im Verlauf der Reperfusion erholte, die prä-ischämischen Ausgangswerte jedoch nicht wieder erreichte. Insgesamt bestanden zwar kaum signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen, die Erholung der Kontraktilität war in der TRAF-STOP-Gruppe besonders im späteren Verlauf der Reperfusion jedoch tendenziell schwächer als in der Kontrollgruppe. Signifikante Unterschiede fanden sich im Verlauf der Reperfusion lediglich nach 10 Minuten Reperfusion (dP/dt_{max}-Differenz 342 mmHg/s bzw. dP/dt_{min}-Differenz -246 mmHg/s; p = 0,0122 bzw. 0,0083) zwischen FGK45- und Kontrollgruppe.

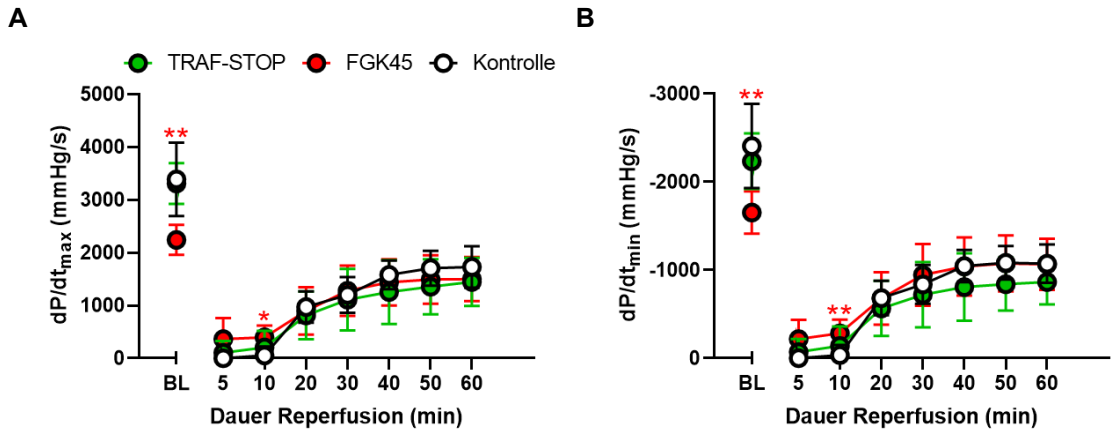


Abb. 16: Auswirkung der prä-ischämischen Applikation von TRAF-STOP und FGK45 auf die linksventrikuläre Kontraktilität in der Reperfusionsphase. Entwicklung von dP/dt_{max} (**A**) sowie dP/dt_{min} (**B**) in mmHg/s. BL-Werte sowie nach 5, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten Reperfusion. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, für n = 9 (PBS-DMSO-Kontrolle und TRAF-STOP), n = 7 (FGK45); * p < 0,05; ** p < 0,01 (*2way ANOVA mit Dunnett's multiple comparisons test*).

3.1.4 Bestimmung der Infarktgröße

In einem anschließenden Versuch wurde untersucht, ob die Modulation der CD40-TRAF6-abhängigen Signaltransduktion einen Einfluss auf die Infarktgröße nach globaler Ischämie hatte. Die untersuchten Mäuseherzen wurden dazu nach Ende der 120-minütigen Reperfusion zunächst bei -20°C eingefroren, dann transversal in 6-7 gleich dicke Scheiben (ca. 1 mm Dicke) geschnitten und mittels TTC-Lösung angefärbt (siehe 2.1.9). Anschließend wurden die gefärbten Herzschnitte mikroskopisch untersucht und die vitalen und avitalen Areale planimetrisch ausgewertet (siehe 2.1.10).

In der Kontrollgruppe zeigten sich eine globale Infarktgröße von 59,01% ±17,20 des gesamten Myokards sowie eine linksventrikuläre Infarktgröße von 58,92% ±17,90. Nach Behandlung mit TRAF-STOP vor Beginn der globalen Ischämie betrug die Infarktgröße 62,43% ±16,02 des gesamten Myokards und 61,27% ±15,80 des LV. Nach Behandlung mit FGK45 betrug die Infarktgröße 58,47% ±5,26 des gesamten Myokards sowie 55,62% ±7,55 des LV. Es zeigten sich keine signifikanten Differenzen zwischen den globalen (p = 0,8712) und linksventrikulären

Infarktgrößen (p = 0,9403) von TRAF-STOP- und Kontrollgruppe sowie den globalen (p = 0,9969) und linksventrikulären Infarktgrößen (p = 0,9001) von FGK45- und Kontrollgruppe (**Abb. 17**). Somit führte weder die prä-ischämische Behandlung mit TRAF-STOP noch mit FGK45 zu einer signifikanten Beeinflussung der myokardialen Infarzierung.

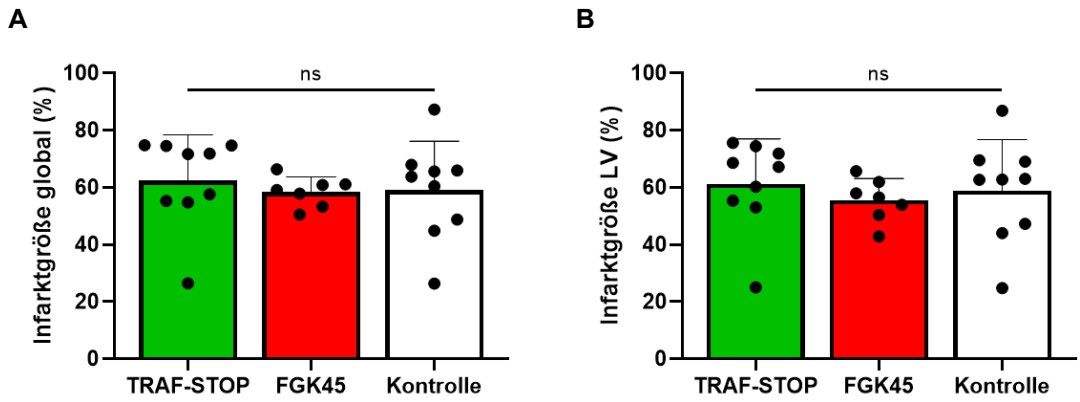


Abb. 17: Auswirkung der prä-ischämischen Applikation von TRAF-STOP und FGK45 auf die myokardiale Infarzierung. Globale (**A**) und linksventrikuläre Infarktgrößen (**B**) in % des Myokards nach planimetrischer Bestimmung. Datenpunkte: Mittelwert + SD, individuelle Werte für n = 9 (Kontrolle und TRAF-STOP), n = 7 (FGK45); ns = p ≥ 0,05 (*Ordinary one-way ANOVA mit Turkey's multiple comparisons test)*.

3.2 Analyse interzellulärer Inflammationsproteine nach STEMI mittels NULISAseq

3.2.1 Versuchsübersicht

Um die Entwicklung der Plasmakonzentrationen verschiedener Inflammationsproteine nach STEMI bei Patienten mit und ohne T2D zu vergleichen, wurden Blutproben der Düsseldorfer SYSTEMI-Kohorte analysiert. Verglichen wurden 15 Patienten mit T2D und 29 Patienten ohne T2D. Die Plasmakonzentrationen wurden mittels des NULISAseq-Verfahrens ermittelt, logarithmisch wiedergegeben (*NULISA Protein Quantification, NPQ*) und statistisch ausgewertet (siehe 2.2).

3.2.2 Auswertung der Plasmakonzentrationen

Zunächst wurde die Veränderung der einzelnen Inflammationsprotein-Plasmakonzentrationen in der Gesamtkohorte untersucht. Dabei fand innerhalb des ersten Tages nach STEMI keine signifikante Änderung der sCD40-Konzentration statt (**Abb. 18A**), während sich die sCD40L-Konzentration signifikant verringerte (NPQ-Differenz -1,23; p = 0,0002; **Abb. 18B**). Darüber hinaus nahmen die Plasmakonzentrationen von IL-4 (NPQ-Differenz -0,91; p < 0,0001; **Abb. 18E**), IL-7 (NPQ-Differenz -1,16; p < 0,0001; **Abb. 18G**), IL-10 (NPQ-Differenz -1,31; p = 0,0002; **Abb. 18H**) und IL-18 (NPQ-Differenz -0,82; p = 0,0007; **Abb. 18J**) signifikant ab, wohingegen lediglich die Plasmakonzentration von IL-2 (NPQ-Differenz 0,33; p = 0,0028; **Abb.**

18D) innerhalb des ersten Tages nach STEMI signifikant zunahm. Bei den übrigen Inflammationsproteinen zeigten sich keine signifikanten Änderungen (**Abb. 18**).

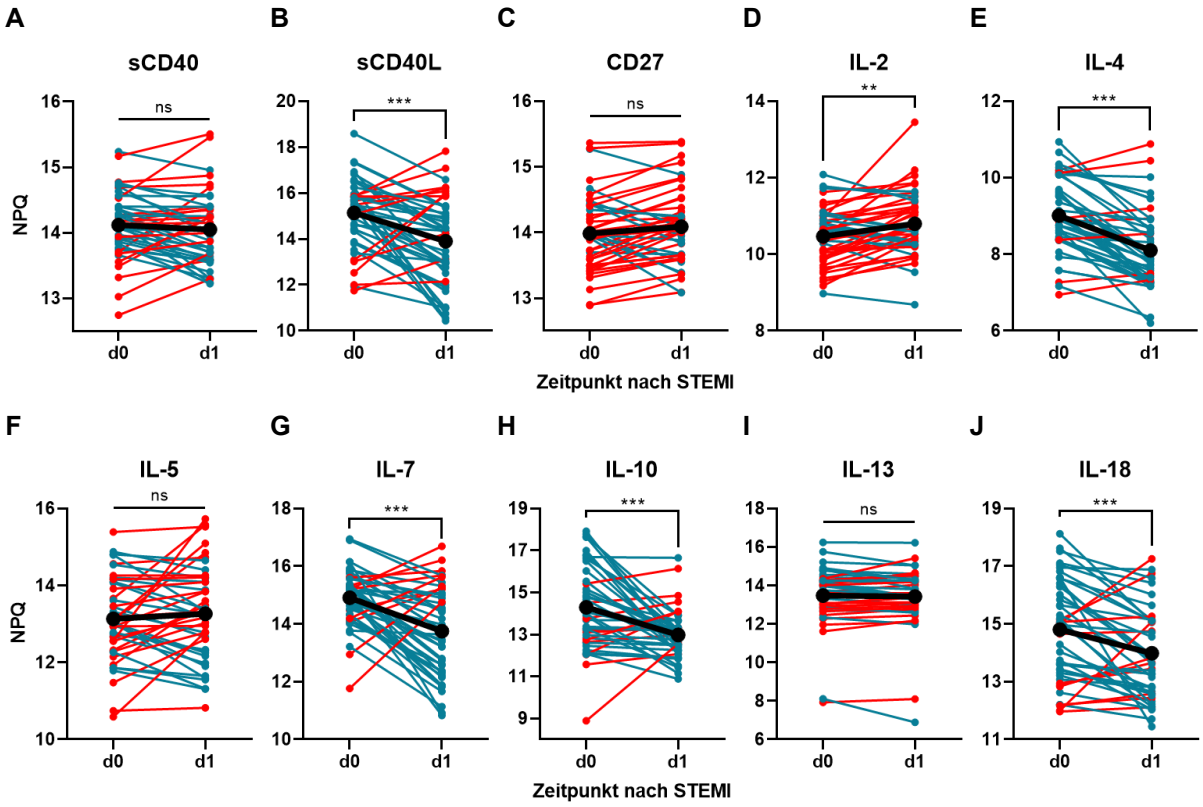


Abb. 18: Verlauf der Inflammationsprotein-Plasmakonzentrationen innerhalb des ersten Tages nach ST-Hebungsinfarkt (STEMI). Darstellung der Plasmakonzentrationen von löslichem CD40 (sCD40, **A**), löslichem CD40-Ligand (cSD40L, **B**), löslichem CD27 (sCD27, **C**), IL-2 (**D**), IL-4 (**E**), IL-5 (**F**), IL-7 (**G**), IL-10 (**H**), IL-13 (**I**) und IL-18 (**J**) als *Nulisa protein quantification* (NPQ)-Wert zum Zeitpunkt der perkutanen Koronarintervention bei STEMI (d0) und am folgenden Tag (d1). Datenpunkte: Mittelwert, individuelle Werte für n = 44, zusammengehörige Datenpunkte verbunden. Farbige Kodierung: schwarz = Verlauf des durchschnittlichen NPQ-Werts; rot = individueller Anstieg des NPQ-Werts von d0 auf d1; blau = individueller Abfall des NPQ-Werts von d0 auf d1; ns = p ≥ 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (*Paired t test, Wilcoxon test*).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob sich die Dynamik der Inflammationsprotein-Plasmakonzentrationen zwischen Patienten mit und ohne T2D unterscheidet. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied der sCD40-Plasmakonzentrationsänderung bei Vergleich der T2D- und der Kontrollgruppe innerhalb des ersten Tages nach STEMI (p = 0,0434; **Abb.** 19**A**). Während die sCD40-Plasmakonzentration in der T2D-Gruppe eher zunahm, nahm sie in der Kontrollgruppe signifikant ab (NPQ-Differenz -0,17; p = 0,0457). Beim Vergleich der sCD40-Plasmakonzentrationen zwischen T2D- und Kontrollgruppe zeigten sich keine signifikanten Differenzen zwischen den Versuchsgruppen zu den beiden untersuchten Zeitpunkten (**Abb. 19B**).

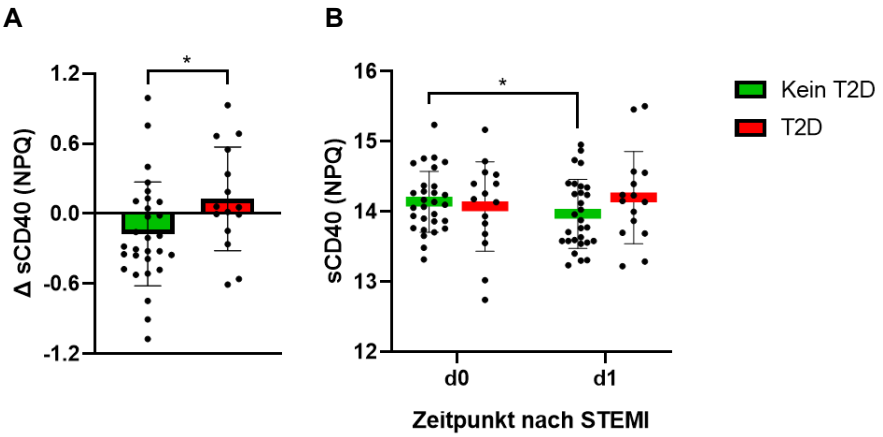


Abb. 19: Verlauf der sCD40-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit und ohne Typ 2 Diabetes mellitus (T2D) innerhalb des ersten Tages nach STEMI. Differenz der sCD40-Plasmakonzentrationen als Δ NPQ-Wert zwischen Zeitpunkt d0 und d1 bei Patienten mit und ohne T2D (**A**) und sCD40-Plasmakonzentrationen als NPQ-Wert zu Zeitpunkt d0 und d1 bei Patienten mit und ohne T2D (**B**). Datenpunkte: Mittelwert ± SD, individuelle Werte für n = 29 (kein T2D); n = 15 (T2D); * p < 0,05 (**A**: *Welsh's t test;* **B**: *Paired t test, Welsh's t test*).

In der Analyse der sCD40L-Plasmakonzentrationsänderungen fand sich eine signifikant stärkere Abnahme der sCD40L-Plasmakonzentration in der Kontrollgruppe als in der T2D-Gruppe (p = 0,0470; **Abb. 20A**). Die genauere Untersuchung zeigte eine signifikante Abnahme in der Kontrollgruppe (NPQ-Differenz -1,70; p < 0,0001), während in der T2D-Gruppe keine relevante Abnahme beobachtet wurde. Zu den beiden untersuchten Zeitpunkten bestanden keine signifikanten Differenzen zwischen T2D- und Kontrollgruppe (**Abb. 20B**).

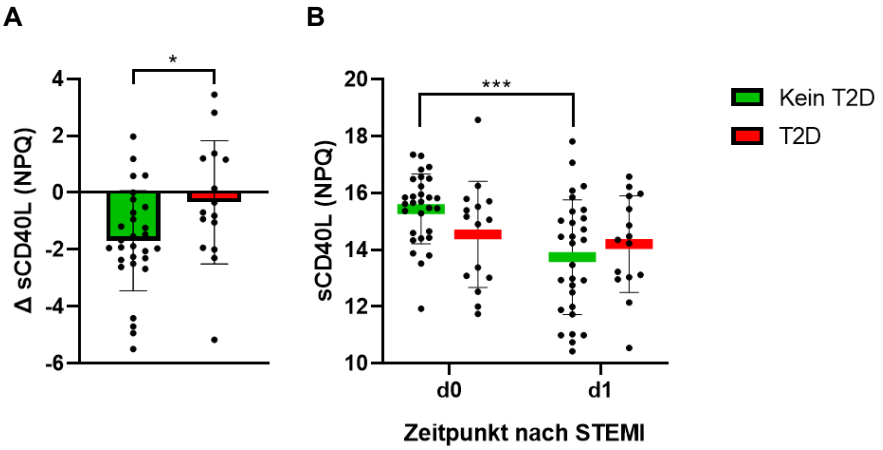


Abb. 20: Verlauf der sCD40L-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit und ohne T2D innerhalb des ersten Tages nach STEMI. Differenz der sCD40L-Plasmakonzentrationen als Δ NPQ-Wert zwischen Zeitpunkt d0 und d1 bei Patienten mit und ohne T2D (**A**) und sCD40L-Plasmakonzentrationen als NPQ-Wert zu Zeitpunkt d0 und d1 bei Patienten mit und ohne T2D (**B**). Datenpunkte: Mittelwert ± SD, individuelle Werte für n = 29 (kein T2D); n = 15 (T2D); * p < 0,05; *** p < 0,001 (**A**: *Welsh's t test;* **B**: *Paired t test, Welsh's t test*)

In der Analyse der sCD27-Plasmakonzentrationen fand sich eine signifikant stärkere Zunahme in der T2D-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (p = 0,0010; **Abb. 21A**). Während die Zunahme in der T2D-Gruppe signifikant war (NPQ-Differenz 0,33; p < 0,0001), war in der

Kontrollgruppe keine Änderung der sCD27-Plasmakonzentration innerhalb des ersten Tages nach STEMI zu beobachten. Während sich zu Zeitpunkt d0 keine signifikante Differenz zwischen Patienten mit und ohne T2D zeigte, fand sich zu Zeitpunkt d1 bei Patienten mit T2D eine signifikant höhere sCD27-Konzentration (NPQ-Differenz 0,39; p = 0,0306; **Abb. 21B**).

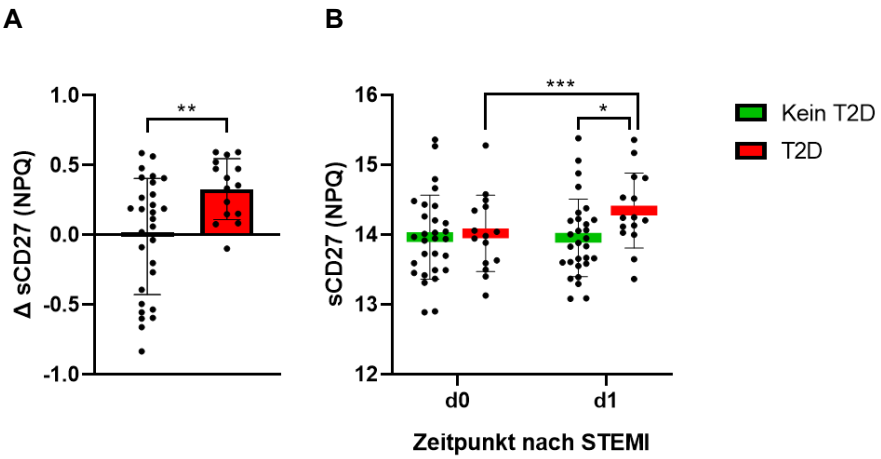


Abb. 21: Verlauf der sCD27-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit und ohne T2D innerhalb des ersten Tages nach STEMI. Differenz der sCD27-Plasmakonzentrationen als Δ NPQ-Wert zwischen Zeitpunkt d0 und d1 (**A**) und sCD27-Plasmakonzentrationen als NPQ-Wert zu Zeitpunkt d0 und d1 (**B**) bei Patienten mit und ohne T2D. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, individuelle Werte für n = 29 (kein T2D); n = 15 (T2D); * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (**A**: *Welsh's t test;* **B**: *Paired t test, Welsh's t test*)

Beim Vergleich der IL-2-Plasmakonzentrationsänderungen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der T2D- und der Kontrollgruppe (**Abb. 22A**), wobei sich jedoch eine signifikante Zunahme der IL-2-Plasmakonzentration in der T2D-Gruppe (NPQ-Differenz 0,37; p = 0,0077, **Abb. 22B**). Zu den einzelnen Zeitpunkten fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen T2D- und Kontrollgruppe.

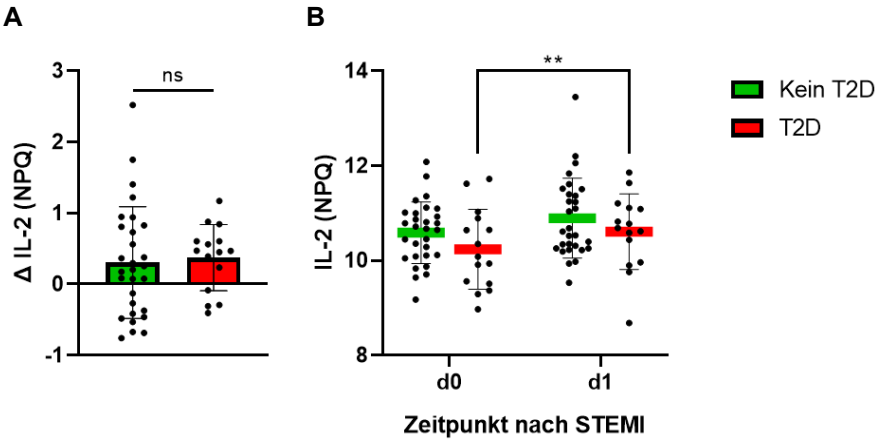


Abb. 22: Verlauf der IL-2-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit und ohne T2D innerhalb des ersten Tages nach STEMI. Differenz der IL-2-Plasmakonzentrationen als Δ NPQ-Wert zwischen Zeitpunkt d0 und d1 (**A**) und IL-2-Plasmakonzentrationen als NPQ-Wert zu Zeitpunkt d0 und d1 (**B**) bei Patienten mit und ohne T2D. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, individuelle Werte für n = 29 (kein T2D); n = 15 (T2D); ns = p ≥ 0,05; ** p < 0,01 (**A**: *Welsh's t test;* **B**: *Paired t test, Wilcoxon test, Welsh's t test, Mann-Whitney test*)

In der Analyse der IL-4-Plasmakonzentrationen fand postischämisch sich eine signifikant stärkere Abnahme in der Kontrollgruppe im Vergleich zur T2D-Gruppe (p = 0,0337; **Abb. 23A**). Die genauere Analyse zeigte eine signifikante Konzentrationsabnahme in beiden Gruppen, stärker jedoch in der Kontrollgruppe (NPQ-Differenz -1,09; p < 0,0001 in der Kontrollgruppe, NPQ-Differenz -0,56; p = 0,0083 in der T2D-Gruppe). Zwischen den beiden Versuchsgruppen zeigten sich keine Differenzen zu den beiden untersuchten Zeitpunkten (**Abb. 23B**).

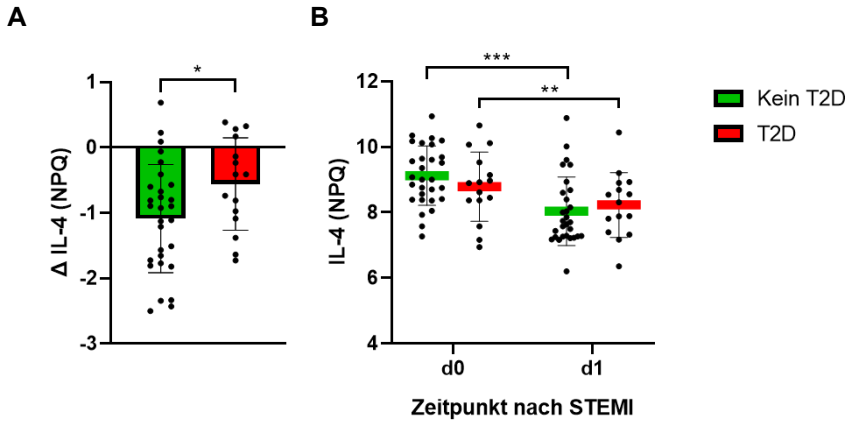


Abb. 23: Verlauf der IL-4-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit und ohne T2D innerhalb des ersten Tages nach STEMI. Differenz der IL-4-Plasmakonzentrationen als Δ NPQ-Wert zwischen Zeitpunkt d0 und d1 (**A**) und IL-4-Plasmakonzentrationen als NPQ-Wert zu Zeitpunkt d0 und d1 (**B**) bei Patienten mit und ohne T2D. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, individuelle Werte für n = 29 (kein T2D); n = 15 (T2D); * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (**A**: *Welsh's t test;* **B**: *Paired t test, Wilcoxon test, Welsh's t test, Mann-Whitney test*)

Bei Analyse der IL-5-Plasmakonzentrationen zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den Plasmakonzentrationsänderungen der T2D- und der Kontrollgruppe innerhalb des ersten Tages nach STEMI (p = 0,0065; **Abb. 24A**) mit signifikanten Anstieg in der T2D-Gruppe (NPQ-Differenz 0,64; p = 0,0367) Auch hier zeigten sich zu beiden Zeitpunkten keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (**Abb. 24B**).

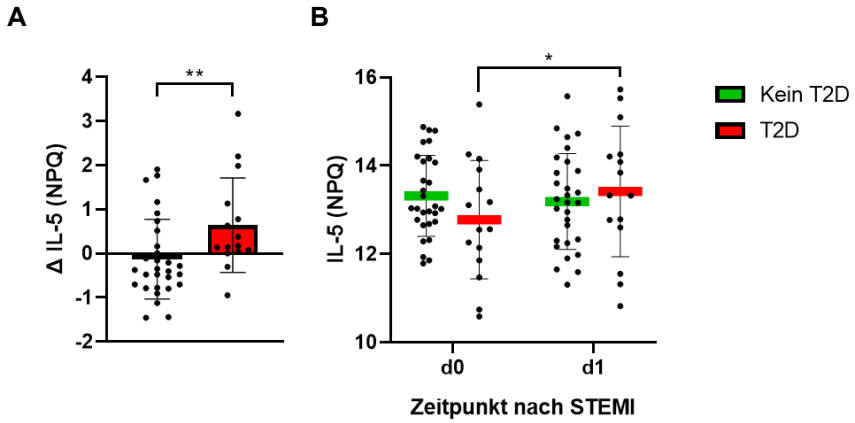


Abb. 24: Verlauf der IL-5-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit und ohne T2D innerhalb des ersten Tages nach STEMI. Differenz der IL-5-Plasmakonzentrationen als Δ NPQ-Wert zwischen Zeitpunkt d0 und d1 (**A**) und IL-5-Plasmakonzentrationen als NPQ-Wert zu Zeitpunkt d0 und d1 (**B**) bei Patienten mit und ohne T2D. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, individuelle Werte für n = 29 (kein T2D); n = 15 (T2D); * p < 0,05; ** p < 0,01 (**A**: *Welsh's t test;* **B**: *Paired t test, Welsh's t test*)

In der Analyse der IL-7- (**Abb. 25A**), IL-10- (**Abb. 25C**) und IL-18-Plasmakonzentrationen (**Abb. 25E**) fanden sich innerhalb des ersten Tages nach STEMI keine relevanten Unterschiede zwischen T2D- und Kontrollgruppe. In der Subgruppenanalyse fanden sich jedoch in der Kontrollgruppe jeweils signifikante Abnahmen der Plasmakonzentrationen (NPQ-Differenz -1,46; $p < 0,0001$ in der IL-7-Analyse; **Abb. 25B**; NPQ-Differenz -1,34; $p = 0,0023$ in der IL-10-Analyse; **Abb. 25D**; NPQ-Differenz -0,90; $p = 0,0033$ in der IL-18-Analyse; **Abb. 25F**). In der T2D-Gruppe hingegen fanden keine signifikanten Änderungen statt.

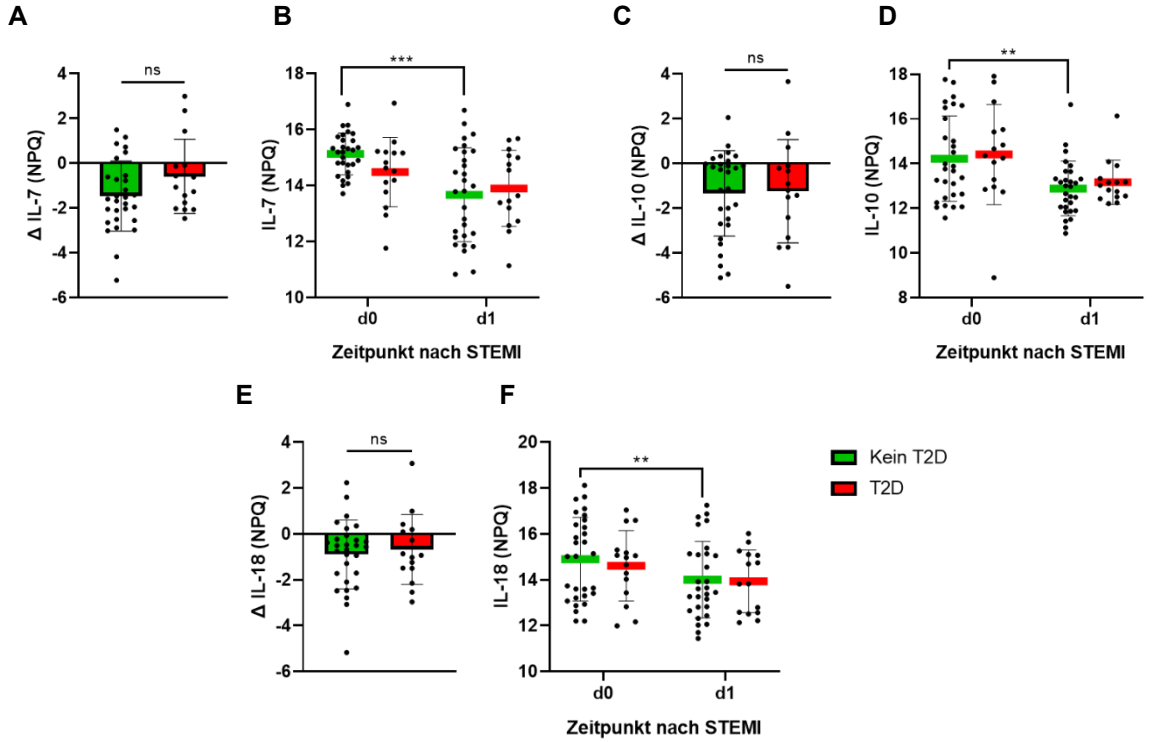


Abb. 25: Verlauf der IL-7-, IL-10 und IL-18-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit und ohne T2D innerhalb des ersten Tages nach STEMI. Differenz der IL-7- (**A**), der IL-10- (**C**) und der IL-18-Plasmakonzentrationen (**E**) als Δ NPQ-Wert zwischen Zeitpunkt d0 und d1 sowie IL-7- (**B**), IL-10- (**D**) und IL-18-Plasmakonzentrationen (**F**) als NPQ-Wert zu Zeitpunkt d0 und d1 bei Patienten mit und ohne T2D. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, individuelle Werte für n = 29 (kein T2D); n = 15 (T2D); ns = $p \geq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (**A, C, E**: *Welsh's t test;* **B, D, F**: *Paired t test, Wilcoxon test, Welsh's t test, Mann-Whitney test*)

In der Analyse der IL-13-Plasmakonzentrationen zeigte sich eine signifikante Differenz zwischen den Dynamiken der T2D- und der Kontrollgruppe innerhalb des ersten Tages nach STEMI ($p = 0,0486$, **Abb. 26A**). Die genauere Analyse der Untergruppen lieferte keine Hinweise auf relevanten Plasmakonzentrationsänderungen von Zeitpunkt d0 auf d1 in den untersuchten Gruppen sowie keine Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne T2D zu den beiden untersuchten Zeitpunkten (**Abb. 26B**).

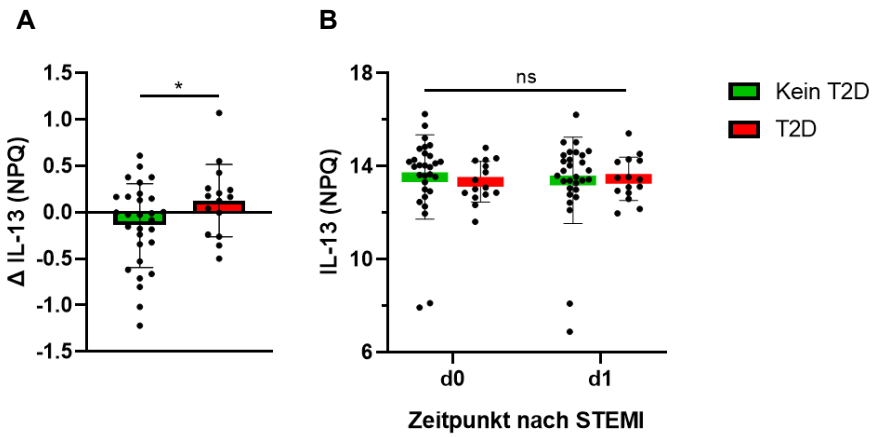


Abb. 26: Verlauf der IL-13-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit und ohne T2D innerhalb des ersten Tages nach STEMI. Differenz der IL-13-Plasmakonzentrationen als Δ NPQ-Wert zwischen Zeitpunkt d0 und d1 (**A**) und IL-13-Plasmakonzentrationen als NPQ-Wert zu Zeitpunkt d0 und d1 (**B**) bei Patienten mit und ohne T2D. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, individuelle Werte für n = 29 (kein T2D); n = 15 (T2D); ns = p ≥ 0,05; * p < 0,05; *** p < 0,001 (**A**: *Welsh's t test;* **B**: *Paired t test, Wilcoxon test, Mann-Whitney test*)

3.2.3 Korrelationsanalysen

Zur Untersuchung möglicher pathophysiologischer Zusammenhänge der untersuchten Inflammationsproteine nach STEMI wurden die jeweiligen Plasmakonzentrationsänderungen von Tag 0 auf Tag 1 mittels *Pearson*-Korrelationsanalyse untersucht (**Tabelle 3**).

	sCD40	**sCD40L**	**sCD27**	**IL-2**	**IL-4**	**IL-5**	**IL-7**	**IL-10**	**IL-13**	**IL-18**
sCD40		0,547	0,432	0,181	0,357	0,185	0,423	-0,078	0,185	0,475
sCD40L	<0,001		0,209	0,110	0,373	-0,019	0,738	0,207	-0,066	0,561
sCD27	0,003	0,173		0,446	0,415	0,456	0,351	0,162	0,524	-0,192
IL-2	0,240	0,479	0,002		0,401	0,413	0,408	0,246	0,345	-0,096
IL-4	0,017	0,013	0,005	0,007		0,101	0,429	-0,036	0,314	-0,017
IL-5	0,228	0,904	0,002	0,005	0,514		0,109	0,032	0,267	-0,172
IL-7	0,004	<0,001	0,019	0,006	0,004	0,481		0,318	0,093	0,433
IL-10	0,615	0,177	0,294	0,107	0,818	0,835	0,035		-0,083	0,012
IL-13	0,228	0,669	<0,001	0,022	0,038	0,079	0,549	0,592		-0,329
IL-18	0,001	<0,001	0,211	0,534	0,911	0,265	0,003	0,940	0,029	

Tabelle 3: Korrelationen zwischen den Plasmakonzentrationsänderungen der untersuchten Inflammationsproteine innerhalb des ersten Tages nach STEMI. Dargestellt sind in der oberen rechten Hälfte die Korrelationskoeffizienten r zwischen den Plasmakonzentrationsänderungen von sCD40, sCD40L, sCD27, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-13 und IL-18, in der unteren linken Hälfte die p-Werte der Korrelationskoeffizienten. Farbige Kodierung: dunkelgrün = starke positive Korrelation (r ≥ 0,5), hellgrün = mäßige positive Korrelation (0,5 > r ≥ 0,3), hellrot = mäßige negative Korrelation (-0,5 < r ≤ -0,3), hellblau = signifikante Korrelation (p < 0,05), mittelblau = sehr signifikante Korrelation (p < 0,01), dunkelblau = hoch signifikante Korrelation (p < 0,001). *(Pearson-Korrelationsanalyse mit two-tailed t-test)*

Dabei fanden sich in der Gesamtkohorte starke, hoch signifikante positive Korrelationen zwischen den Änderungen von sCD40 und sCD40L (**Abb. 27A**), sCD40L und IL-7 (**Abb. 27B**) sowie sCD40L und IL-18 (**Abb. 27C**), darüber hinaus zwischen den Änderungen von sCD27 und IL-13 (**Abb. 27D**).

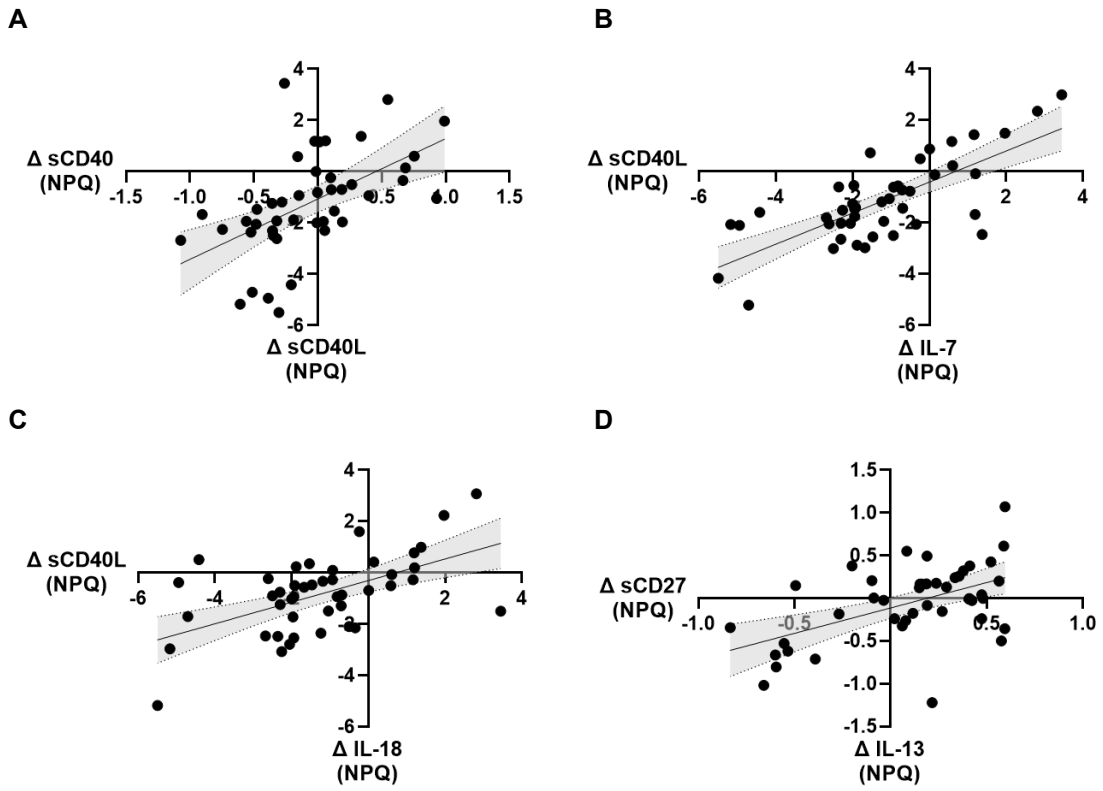


Abb. 27: Starke, hoch signifikante positive Korrelationen zwischen den untersuchten Plasmakonzentrationsänderungen innerhalb des ersten Tages nach STEMI in der Gesamtkohorte. Dargestellt sind in jeweils einzelnen Streudiagrammen die Korrelationen zwischen den Änderungen der NPQ-Werte von sCD40 und sCD40L (**A**), sCD40L und IL-7 (**B**), sCD40L und IL-18 (**C**) sowie sCD27 und IL-13 (**D**) von Zeitpunkt d0 auf Zeitpunkt d1 sowie die jeweilige Regressionsgerade. Datenpunkte: Plasmakonzentrationsänderungen für n = 44. *(Pearson-Korrelationsanalyse mit two-tailed t-test sowie linearer Regressionsanalyse)*

Da der besondere Fokus der Arbeit auf der Rolle von CD40 und CD40L im AMI und der myokardialen Wundheilung lag, wurde im Weiteren nach signifikanten Korrelationen von sCD40 und sCD40L mit anderen, potenziell assoziierten interzellulären Inflammationsproteinen gelegt. Dabei fanden sich zusätzlich signifikante, mäßig starke Korrelationen zwischen sCD40 und sCD27 (**Abb. 28A**), sCD40 und IL-4 (**Abb. 28B**), sCD40 und IL-7 (**Abb. 28C**), sCD40 und IL-18 (**Abb. 28D**) sowie sCD40L und IL-4 (**Abb. 28E**).

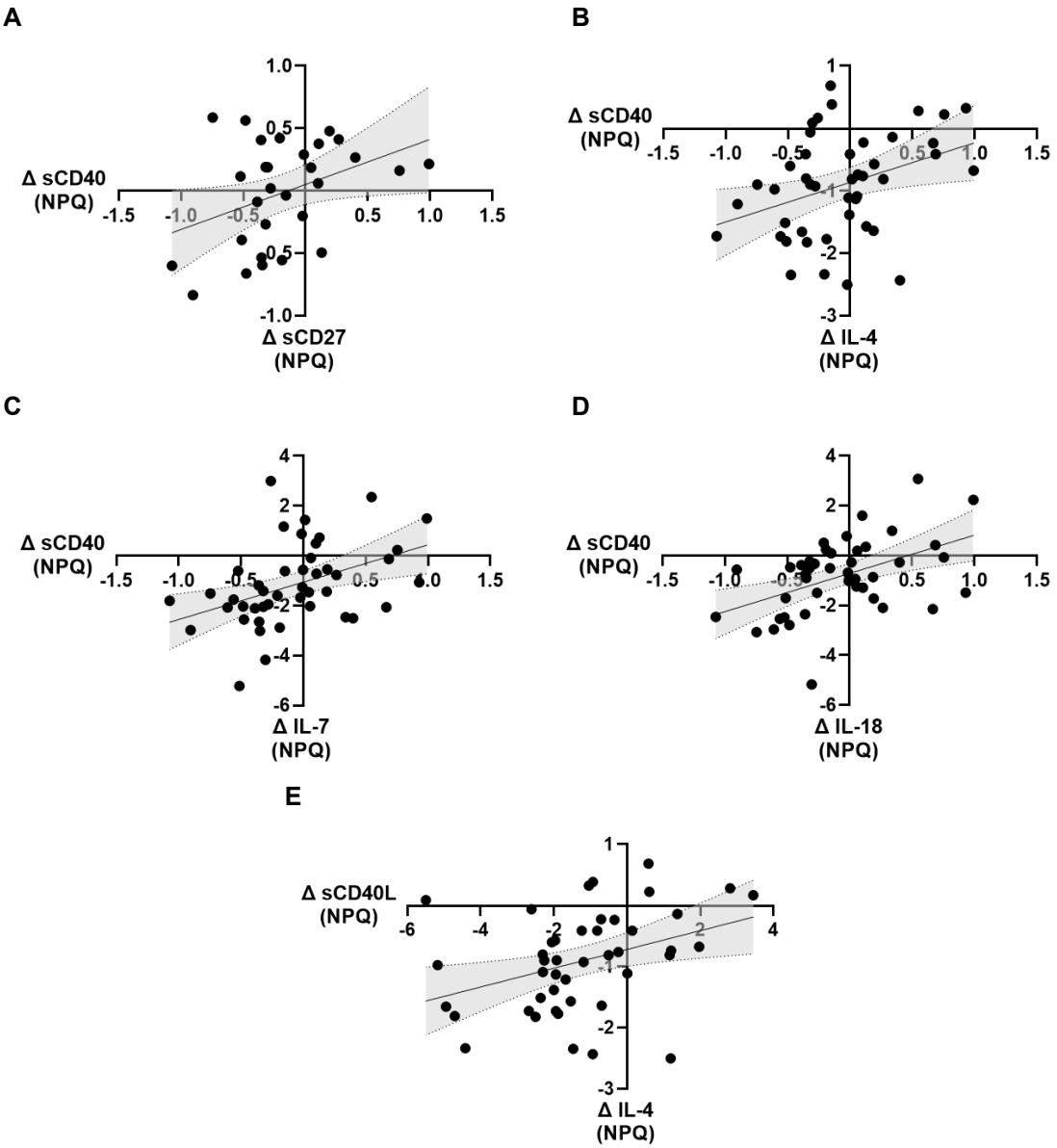


Abb. 28: Mäßige, signifikante positive Korrelationen zwischen den untersuchten Plasmakonzentrationsänderungen innerhalb des ersten Tages nach STEMI in der Gesamtkohorte. Dargestellt sind in jeweils einzelnen Streudiagrammen die Korrelationen zwischen den Änderungen der NPQ-Werte von sCD40 und sCD27 (**A**), sCD40 und IL-4 (**B**), sCD40 und IL-7 (**C**), sCD40 und IL-18 (**D**) sowie sCD40L und IL-4 (**E**) von Zeitpunkt d0 auf Zeitpunkt d1 sowie die jeweilige Regressionsgerade. Datenpunkte: Plasmakonzentrationsänderungen für n = 44. *(Pearson-Korrelationsanalyse mit two-tailed t-test sowie linearer Regressionsanalyse)*

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob sich die Korrelationen zwischen Plasmakonzentrationsänderungen von sCD40 bzw. sCD40L mit den anderen untersuchten Inflammationsproteinen zwischen Patienten mit und ohne T2D unterschieden. Dafür wurde die untersuchte Population in die Subgruppen der Patienten ohne T2D (29 Patienten) und mit T2D (15Patienten) unterteilt und diese Gruppen jeweils mittels *Pearson*-Korrelationsanalyse untersucht (**Tabelle 4**, gesamte Korrelationsmatrizen: **Tabelle 7**, **Tabelle 8**, siehe Anhang).

A

	gesamt	T2D	Kein T2D
sCD40L	0,547	0,361	0,583
sCD27	0,432	0,281	0,385
IL-2	0,181	-0,243	0,304
IL-4	0,357	0,473	0,212
IL-5	0,185	-0,448	0,400
IL-7	0,423	0,030	0,557
IL-10	-0,078	-0,320	0,049
IL-13	0,185	0,233	0,050
IL-18	0,475	0,441	0,497

B

	gesamt	T2D	Kein T2D
sCD40	0,547	0,361	0,583
sCD27	0,209	-0,018	0,128
IL-2	0,110	0,003	0,143
IL-4	0,373	0,510	0,200
IL-5	-0,019	-0,439	0,053
IL-7	0,738	0,738	0,705
IL-10	0,207	0,252	0,181
IL-13	-0,066	-0,430	-0,047
IL-18	0,561	0,653	0,524

Tabelle 4: Korrelationen zwischen den Änderungen der sCD40- bzw. sCD40L-Plasmakonzentrationen und den anderen untersuchten Inflammationsproteinen bei Patienten mit und ohne T2D innerhalb des ersten Tages nach STEMI. Dargestellt sind in zwei einzelnen Tabellen die Korrelationskoeffizienten r zwischen den Plasmakonzentrationsänderungen von sCD40 (**A**) bzw. sCD40L (**B**) und den jeweils anderen untersuchten Inflammationsproteinen (sCD40, sCD40L, sCD27, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-13 und IL-18). Dargestellt sind dabei nebeneinander die r-Werte der Gesamtpopulation, der Patienten mit und ohne T2D. Farbige Kodierung: dunkelgrün = starke, signifikante positive Korrelation ($r \geq 0,5$, $p < 0,05$), hellgrün = mäßige, signifikante positive Korrelation ($0,5 > r \geq 0,3$, $p < 0,05$). *(Pearson-Korrelationsanalyse mit two-tailed t-test)*

Dabei fanden sich in der T2D-Gruppe starke, signifikante positive Korrelationen zwischen den Änderungen von sCD40L und IL-7 (**Abb. 29A**) sowie sCD40L und IL-18 (**Abb. 29B**). Darüber hinaus fanden sich keine signifikanten Korrelationen zwischen den Änderungen von sCD40 oder sCD40L und den anderen untersuchten Inflammationsproteinen.

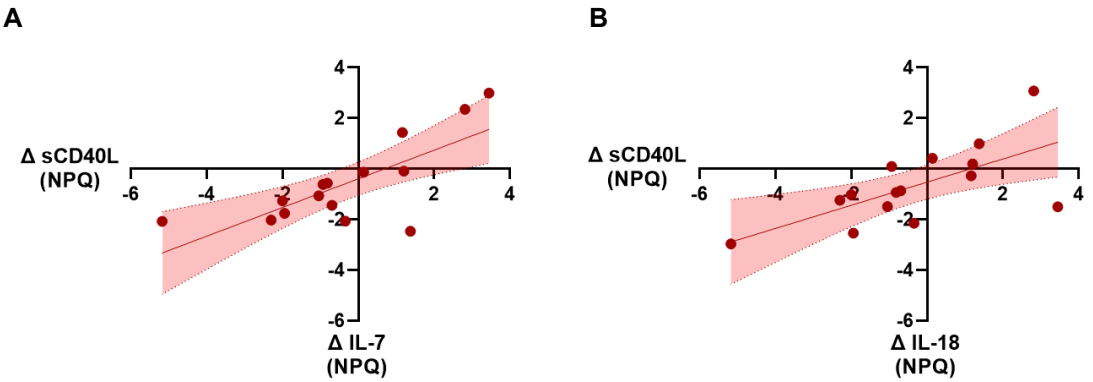


Abb. 29: Starke, signifikante positive Korrelationen zwischen den untersuchten Plasmakonzentrationsänderungen innerhalb des ersten Tages nach STEMI bei Patienten mit T2D. Dargestellt sind in jeweils einzelnen Streudiagrammen die Korrelationen zwischen den Änderungen der NPQ-Werte von sCD40L und IL-7 (**A**) sowie sCD40L und IL-18 (**B**) von Zeitpunkt d0 auf Zeitpunkt d1 sowie die jeweilige Regressionsgerade. Datenpunkte: Plasmakonzentrationsänderungen für n = 15. *(Pearson-Korrelationsanalyse mit two-tailed t-test sowie linearer Regressionsanalyse)*

In der Nicht-T2D-Gruppe fanden sich starke, signifikante positive Korrelationen zwischen sCD40 und sCD40L (**Abb. 30A**) sowie sCD40 und IL-7 (**Abb. 30B**). Darüber hinaus fanden sich wie in der T2D-Gruppe starke, signifikante positive Korrelationen zwischen sCD40L und IL-7 (**Abb. 30C**) sowie sCD40L und IL-18 (**Abb. 30D**).

A **B**

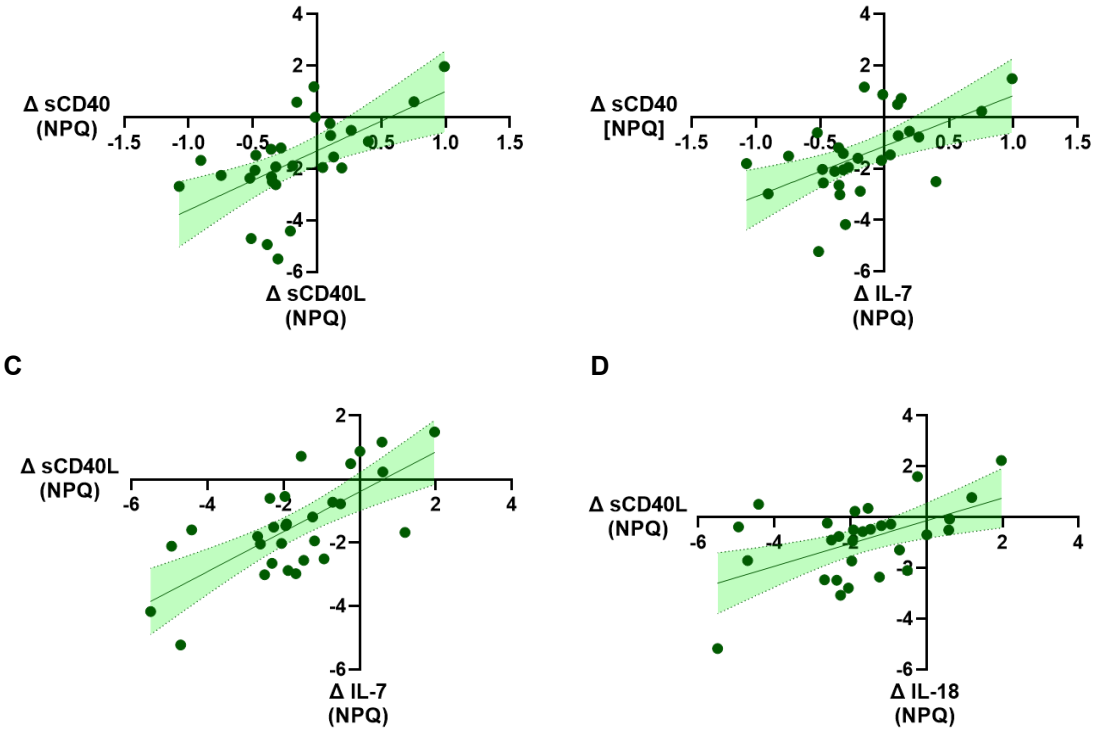


Abb. 30: Starke, signifikante positive Korrelationen zwischen den untersuchten Plasmakonzentrationsänderungen innerhalb des ersten Tages nach STEMI bei Patienten ohne T2D. Dargestellt sind in jeweils einzelnen Streudiagrammen die Korrelationen zwischen den Änderungen der NPQ-Werte von sCD40 und sCD40L (**A**), sCD40 und IL-7 (**B**), sCD40L und IL-7 (**C**) sowie sCD40L und IL-18 (**D**) von Zeitpunkt d0 auf Zeitpunkt d1 sowie die jeweilige Regressionsgerade. Datenpunkte: Plasmakonzentrationsänderungen für n = 29. *(Pearson-Korrelationsanalyse mit two-tailed t-test sowie linearer Regressionsanalyse)*

Zusätzlich fanden sich mäßige, signifikante positive Korrelationen zwischen sCD40 und sCD27 (**Abb. 31A**), sCD40 und IL-5 (**Abb. 31B**) sowie sCD40 und IL-18 (**Abb. 31C**).

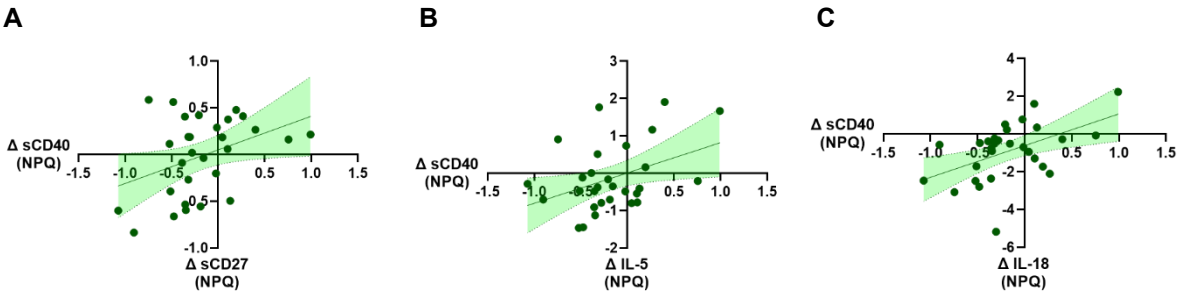


Abb. 31: Mäßige, signifikante positive Korrelationen zwischen den untersuchten Plasmakonzentrationsänderungen innerhalb des ersten Tages nach STEMI bei Patienten ohne T2D. Dargestellt sind in jeweils einzelnen Streudiagrammen die Korrelationen zwischen den Änderungen der NPQ-Werte von sCD40 und sCD27 (**A**), sCD40 und IL-5 (**B**) sowie sCD40 und IL-18 (**C**) von Zeitpunkt d0 auf Zeitpunkt d1 sowie die jeweilige Regressionsgerade. Datenpunkte: Plasmakonzentrationsänderungen für n = 29. *(Pearson-Korrelationsanalyse mit two-tailed t-test sowie linearer Regressionsanalyse)*

3.3 Analyse interzellulärer Inflammationsproteine mittels Luminex

3.3.1 Versuchsübersicht

Zur weitergehenden Analyse der Inflammationsprotein-Plasmakonzentrationen nach STEMI wurden Plasmaproben von 19 weiteren Patienten der Düsseldorfer SYSTEMI-Kohorte mit dem Luminex-Immunoassay analysiert und statistisch ausgewertet (siehe 2.3). Auch hier wurden Blutproben von zufällig ausgewählten 9 Patienten mit T2D und 10 Patienten ohne T2D verglichen, um einen möglichen Einfluss von T2D zu untersuchen. Die Blutproben wurden zum Zeitpunkt d0 und d1, außerdem 5 Tage (d5) und 6 Monate (6m) nach STEMI abgenommen, was eine Analyse über den ersten post-ischämischen Tag hinaus ermöglichte.

3.3.2 Auswertung der Plasmakonzentrationen

In der Gesamtkohorte fanden sich innerhalb des ersten Tages nach STEMI signifikante Abnahmen der Plasmakonzentrationen von sCD40L (Differenz -1050 pg/ml; $p < 0{,}0001$; **Abb. 32B**) und IL-7 (Differenz -2,34 pg/ml; $p = 0{,}0201$; **Abb. 32G**). Lediglich die Analyse der sCD27-Plasmalevel zeigte eine signifikante Zunahme (Differenz 850 pg/ml; $p = 0{,}0090$; **Abb. 32C**). Darüber hinaus fanden sich keine signifikanten Dynamiken (**Abb. 32**).

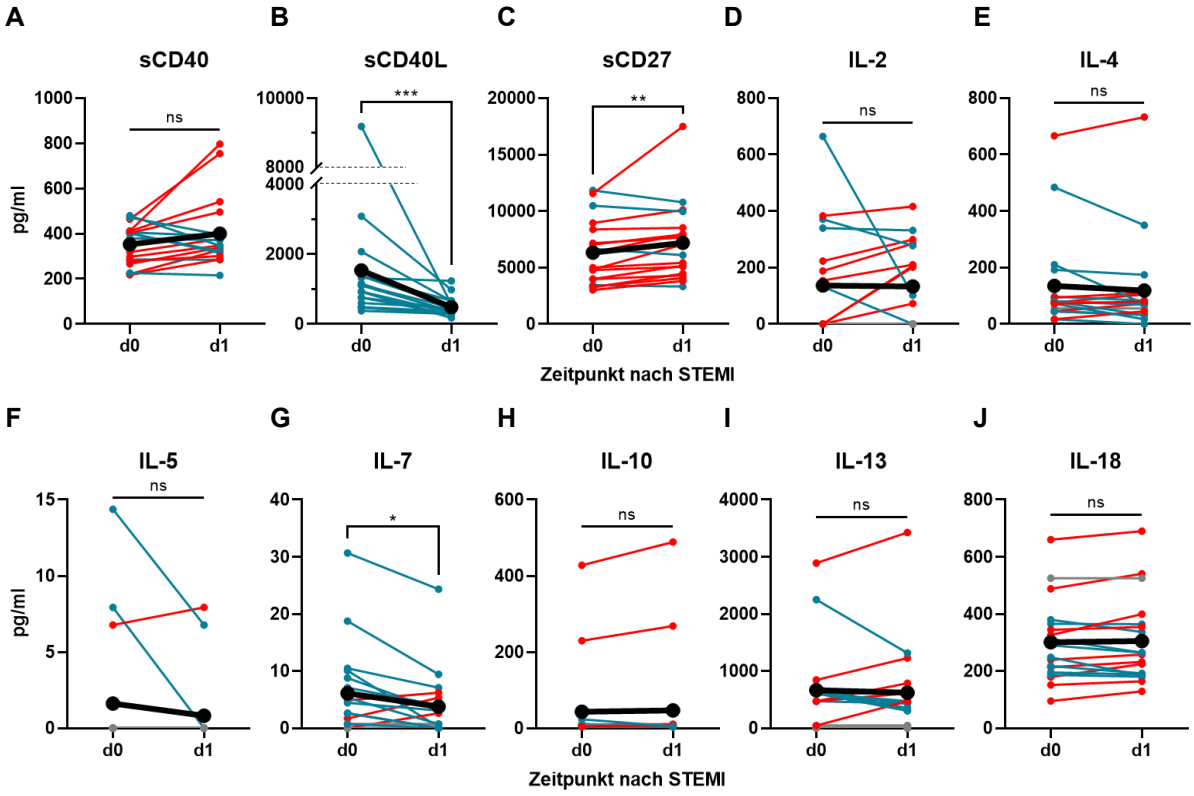


Abb. 32: Verlauf der Inflammationsprotein-Plasmakonzentrationen innerhalb des ersten Tages nach STEMI. Darstellung der Plasmakonzentrationen von sCD40 (**A**), sCD40L (**B**), sCD27 (**C**), IL-2 (**D**), IL-4 (**E**), IL-5 (**F**), IL-7 (**G**), IL-10 (**H**), IL-13 (**I**) und IL-18 (**J**) in pg/ml zu Zeitpunkt d0 und d1. Datenpunkte: Mittelwert, individuelle Werte für n = 18, zusammengehörige Datenpunkte verbunden. Farbige Kodierung: schwarz = Verlauf der durchschnittlichen Konzentration; rot = individueller Konzentrationsanstieg; blau = individueller Konzentrationsabfall; grau = keine individuelle Konzentrationsänderung; ns = $p \geq 0{,}05$; * $p < 0{,}05$; ** $p < 0{,}01$; *** $p < 0{,}001$ (*Wilcoxon test*).

Bei Untersuchung der Inflammationsprotein-Dynamiken innerhalb der ersten 6 Monate nach STEMI fand sich in der Gesamtkohorte ein signifikanter Anstieg der sCD27-Konzentration 5 Tage nach STEMI (Differenz 1740 pg/ml; p = 0,0014), wohingegen der Anstieg zu Zeitpunkt d1 und 6m knapp nicht signifikant war (**Abb. 33**). Darüber hinaus fanden sich in der Gesamtkohorte bei keinen der anderen untersuchten Inflammationsproteine signifikante Dynamiken im Verlauf der ersten 6 Monate nach STEMI (siehe Anhang).

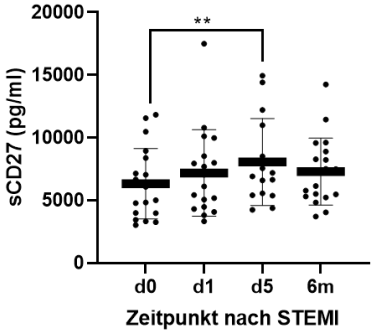


Abb. 33: Verlauf der sCD27-Plasmakonzentrationen innerhalb der ersten 6 Monate nach STEMI. Darstellung der Plasmakonzentrationen von sCD27 in pg/ml zu Zeitpunkt d0, d1, 5 Tage (d5) und 6 Monate (6m) nach STEMI. Datenpunkte: Mittelwert + SD, individuelle Werte für n = 19 (d0), 18 (d1), 15 (d5) bzw. 19 (6m); ** p < 0,01 (*Mixed-effects analysis, Tukey's multiple comparisons test*).

In einem weiteren Schritt wurde, analog zu den NULISA-Versuchen, die Dynamik der Inflammationsprotein-Plasmakonzentrationen zwischen Patienten mit und ohne T2D verglichen. In der Analyse der sCD40-Plasmakonzentrationen fand sich keine unterschiedliche Dynamik innerhalb des ersten Tages nach STEMI beim Vergleich von Patienten mit und ohne T2D (**Abb. 34A**). Auch im weiteren Verlauf fanden sich keine Unterschiede zwischen der T2D- und der Kontrollgruppe sowie keine relevanten Dynamiken innerhalb der Gruppen (**Abb. 34B**).

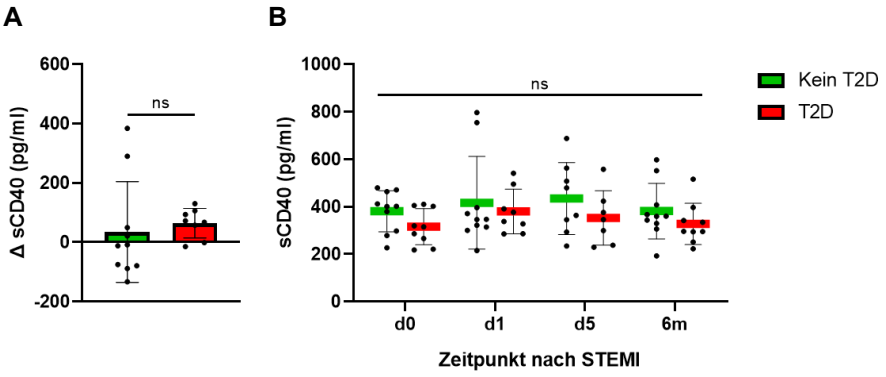


Abb. 34: Verlauf der sCD40-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit und ohne T2D nach STEMI. (**A**) Differenz der sCD40-Plasmakonzentrationen in pg/ml zwischen Zeitpunkt d0 und d1 bei Patienten mit/ohne T2D. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, individuelle Werte für n = 10 (kein T2D); n = 8 (T2D); ns = p ≥ 0,05 (*Mann-Whitney test*). (**B**) sCD40-Plasmakonzentrationen in pg/ml zu Zeitpunkt d0, d1, d5 und 6m bei Patienten mit/ohne T2D. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, individuelle Werte für n = 10 (kein T2D d0, kein T2D d1; kein T2D 6m); n = 9 (T2D d0, T2D 6m); n = 8 (kein T2D d5, T2D d1); n = 7 (T2D d5); ns = p ≥ 0,05 (*Mixed-effects analysis, Sidak's multiple comparisons test*).

Auch im Vergleich der sCD40L-Plasmakonzentrationsänderungen zwischen T2D- und Kontrollgruppe fanden sich keine signifikant unterschiedlichen Dynamiken innerhalb des ersten Tages nach STEMI (**Abb. 35A**). In der Subgruppenanalyse deutet sich jedoch eine höhere sCD40L-Konzentration in der T2D-Gruppe zum Zeitpunkt d0 und damit einhergehend eine tendenzielle Abnahme innerhalb des ersten Tages nach STEMI an (**Abb. 35B**).

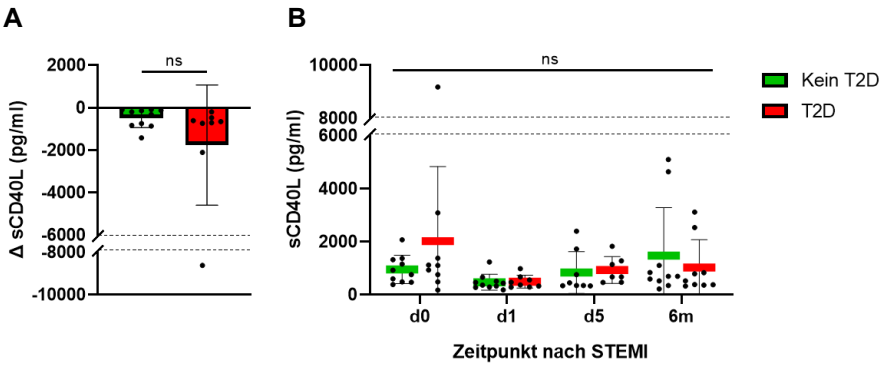


Abb. 35: Verlauf der sCD40L-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit und ohne T2D nach STEMI. (**A**) Differenz der sCD40L-Plasmakonzentrationen in pg/ml zwischen Zeitpunkt d0 und d1 bei Patienten mit/ohne T2D. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, individuelle Werte für n = 10 (kein T2D); n = 8 (T2D); ns = p ≥ 0,05 (*Mann-Whitney test*). (**B**) sCD40L-Plasmakonzentrationen in pg/ml zu Zeitpunkt d0, d1, d5 und 6m bei Patienten mit/ohne T2D. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, individuelle Werte für n = 10 (kein T2D d0, kein T2D d1; kein T2D 6m); n = 9 (T2D d0, T2D 6m); n = 8 (kein T2D d5, T2D d1); n = 7 (T2D d5); ns = p ≥ 0,05 (*Mixed-effects analysis, Sidak's multiple comparisons test*).

Auch im Vergleich der sCD27-Konzentrationsänderungen fand sich keine signifikante Differenz zwischen beiden Versuchsgruppen innerhalb des ersten Tages nach STEMI (**Abb. 36A**). Im weiteren Verlauf stieg die sCD27-Konzentration innerhalb beider Gruppen an, wobei sich in der T2D-Gruppe zu Zeitpunkt d5 und 6m sogar signifikant höhere sCD27-Plasmaspiegel als unmittelbar post-ischämisch zeigten (Differenz 2270 pg/ml; p = 0,0007 zu Zeitpunkt d5; Differenz 1615 pg/ml; p = 0,0142 zu Zeitpunkt 6m; **Abb. 36B**).

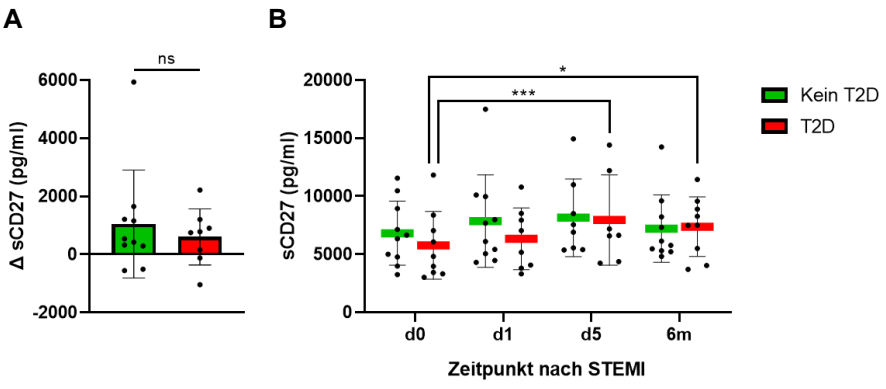


Abb. 36: Verlauf der sCD27-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit und ohne T2D nach STEMI. (**A**) Differenz der sCD27-Plasmakonzentrationen in pg/ml zwischen Zeitpunkt d0 und d1 bei Patienten mit/ohne T2D. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, individuelle Werte für n = 10 (kein T2D); n = 8 (T2D); ns = p ≥ 0,05 (*Mann-Whitney test*). (**B**) sCD27-Plasmakonzentrationen in pg/ml zu Zeitpunkt d0, d1, d5 und 6m bei Patienten mit/ohne T2D. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, individuelle Werte für n = 10 (kein T2D d0, kein T2D d1; kein T2D 6m); n = 9 (T2D d0, T2D 6m); n = 8 (kein T2D d5, T2D d1); n = 7 (T2D d5); * p < 0,05, *** p < 0,001 (*Mixed-effects analysis, Sidak's multiple comparisons test*).

In der Untersuchung der IL-13-Plasmakonzentrationen nach STEMI fand sich ein signifikanter Unterschied der Plasmalevel-Dynamiken zwischen T2D- und Kontrollgruppe innerhalb des ersten Tages nach STEMI (p = 0,0493, **Abb. 37A**). In der Analyse der Untergruppen fanden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede innerhalb der T2D- und der Kontrollgruppe zwischen den untersuchten Zeitpunkten sowie keine Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen zu den untersuchten Zeitpunkten (**Abb. 37B**).

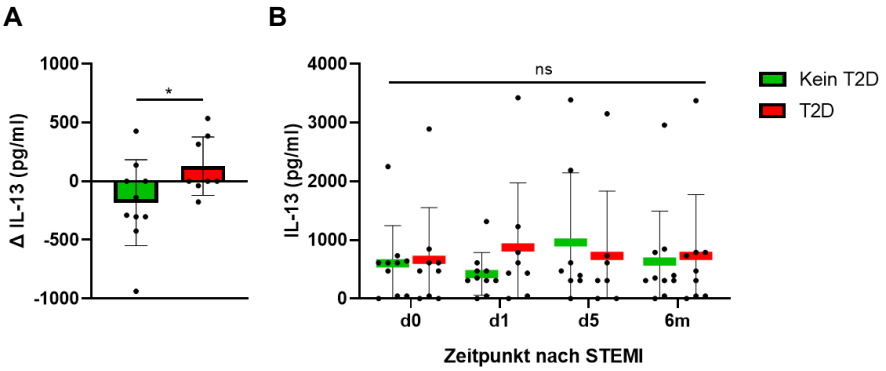


Abb. 37: Verlauf der IL-13-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit und ohne T2D nach STEMI. (**A**) Differenz der IL-13-Plasmakonzentrationen in pg/ml zwischen Zeitpunkt d0 und d1 bei Patienten mit/ohne T2D. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, individuelle Werte für n = 10 (kein T2D); n = 8 (T2D); * p < 0,05 (*Mann-Whitney test*). (**B**) IL-13-Plasmakonzentrationen in pg/ml zu Zeitpunkt d0, d1, d5 und 6m bei Patienten mit/ohne T2D. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, individuelle Werte für n = 10 (kein T2D d0, kein T2D d1; kein T2D 6m); n = 9 (T2D d0, T2D 6m); n = 8 (kein T2D d5, T2D d1); n = 7 (T2D d5); ns = p ≥ 0,05 (*Mixed-effects analysis, Sidak's multiple comparisons test*).

Darüber hinaus wurden die Entwicklungen der Plasmakonzentrationen von IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10 und IL-18 auf relevante Plasmaspiegel-Dynamiken sowie Unterschiede zwischen der T2D- und der Kontrollgruppe untersucht. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu den einzelnen Zeitpunkten, keine signifikanten Plasmakonzentrationsänderungen innerhalb der Versuchsgruppen in den ersten 6 Monaten nach STEMI und keine signifikanten Unterschiede bei Vergleich der Plasmakonzentrationsänderungen zwischen den Versuchsgruppen innerhalb des ersten Tages gemessen (siehe Anhang).

3.3.3 Korrelationsanalysen

In einem weiteren Schritt wurden, analog zur NULISAseq-Analyse die Inflammationsprotein-Dynamiken im Plasma innerhalb des ersten Tages nach STEMI mittels *Pearson*-Korrelationsanalyse untersucht (**Tabelle 5**). Da bei einem der 19 untersuchten Patienten die Blutentnahme zum Zeitpunkt 24h nicht vorlag, wurde dieser Patient aus der Analyse ausgeschlossen.

	sCD40	sCD40L
sCD40		0,007
sCD40L	0,977	
sCD27	0,219	0,515
IL-2	0,042	0,934
IL-4	0,713	0,704
IL-5	0,562	0,677
IL-7	0,508	0,011
IL-10	0,630	0,725
IL-13	0,022	0,117
IL-18	0,035	0,471

Tabelle 5: Korrelationen zwischen den Plasmakonzentrationsänderungen der untersuchten Inflammationsp
und IL-18, in der unteren linken Hälfte die p-Werte der Korrelationskoeffizienten. Farbige Kodierung: dunkelgrün = st

Dabei fanden sich bei der Untersuchung der gesamten Population starke, signifikante positive Korrelationen zwischen sCD40 und IL-13 (**Abb. 38A**), sCD40 und IL-18 (**Abb. 38B**) und sCD40L und IL-7 (**Abb. 38C**).

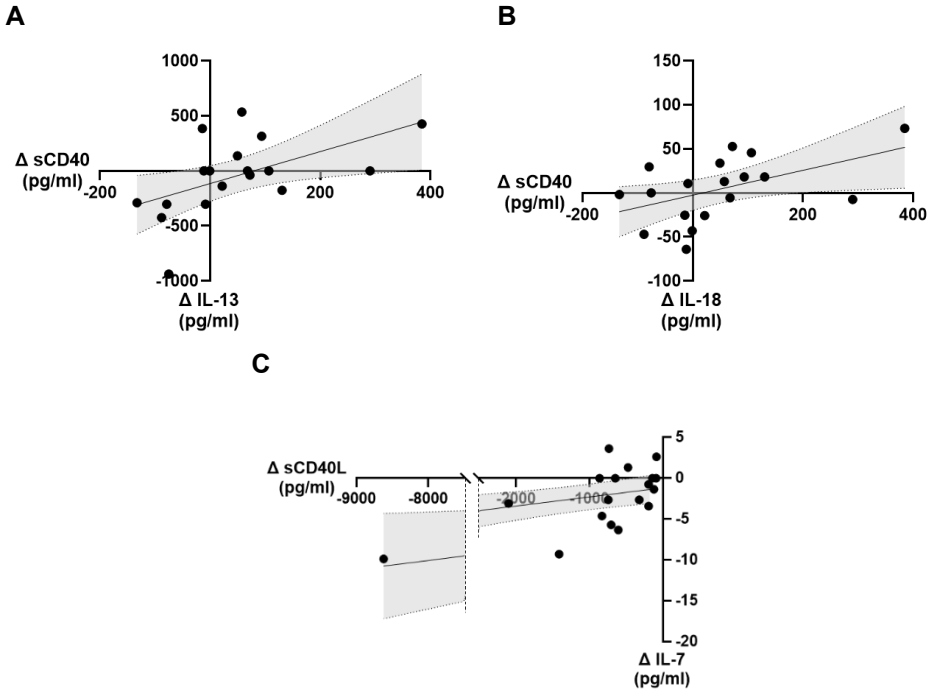


Abb. 38: Signifikante, starke positive Korrelationen zwischen den Änderungen der Plasmakonzentrationen innerhalb des ersten Tages nach STEMI in der Gesamtkohorte. Dargestellt sind in jeweils einzelnen Streudiagrammen die Korrelationen zwischen den Änderungen der Plasmakonzentrationen in pg/ml von sCD40 und IL-13 (**A**), sCD40 und IL-18 (**B**) und sCD40L und IL-7 (**C**) von Zeitpunkt d0 auf Zeitpunkt d1 sowie die jeweilige Regressionsgerade. Datenpunkte: Plasmakonzentrationsänderungen für n = 18. *(Pearson-Korrelationsanalyse mit two-tailed t-test sowie linearer Regressionsanalyse)*

Darüber hinaus fand sich eine signifikante, mäßig starke negative Korrelation zwischen sCD40 und IL-2 (Abb. 39).

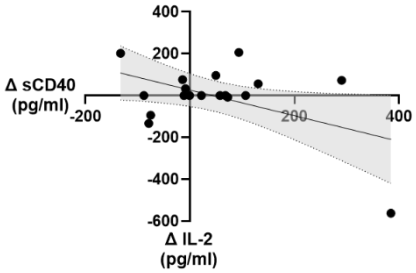


Abb. 39: Signifikante, mäßig starke negative Korrelation zwischen der sCD40- und IL-2-Plasmakonzentrationsänderung innerhalb des ersten Tages nach STEMI in der Gesamtkohorte. Dargestellt ist die Korrelation zwischen den Änderungen der Plasmakonzentrationen in pg/ml von Zeitpunkt d0 auf Zeitpunkt d1 sowie die Regressionsgerade. Datenpunkte: Plasmakonzentrationsänderungen für n = 18. *(Pearson-Korrelationsanalyse mit two-tailed t-test sowie linearer Regressionsanalyse)*

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob sich die Korrelationen zwischen Plasmakonzentrationsänderungen von sCD40 bzw. sCD40L und den anderen untersuchten Inflammationsproteinen abhängig vom Vorliegen oder Nicht-Vorliegen eines T2D unterscheiden. Dafür wurde die Population in die Subgruppen der Patienten ohne T2D (10 Patienten) und mit T2D (8 Patienten) aufgeteilt, welche anschließend mittels *Pearson*-Korrelationsanalyse untersucht wurden (**Tabelle 6**, gesamte Korrelationsmatrizen: **Tabelle 9**, **Tabelle 10**, siehe Anhang).

A

	gesamt	T2D	Kein T2D
CD40L	0,007	0,039	0,228
CD27	0,305	0,469	0,317
IL-2	-0,484	0,146	-0,590
IL-4	-0,093	0,274	-0,151
IL-5	0,147	0,524	0,092
IL-7	0,167	0,163	0,250
IL-10	-0,122	-0,382	-0,099
IL-13	0,535	-0,416	0,722
IL-18	0,500	0,763	0,485

B

	gesamt	T2D	Kein T2D
CD40	0,007	0,039	0,228
CD27	-0,164	-0,680	0,301
IL-2	0,021	0,283	0,184
IL-4	-0,096	-0,588	0,844
IL-5	-0,105	-0,165	-0,174
IL-7	0,581	0,633	0,814
IL-10	0,089	-0,245	0,178
IL-13	-0,382	-0,609	0,220
IL-18	-0,181	-0,159	-0,388

Tabelle 6: Korrelationen zwischen den Änderungen der sCD40- bzw. sCD40L-Plasmakonzentrationen und den anderen untersuchten Inflammationsproteinen bei Patienten mit und ohne T2D innerhalb des ersten Tages nach STEMI. Dargestellt sind in zwei einzelnen Tabellen die Korrelationskoeffizienten r zwischen den Plasmakonzentrationsänderungen von sCD40 (**A**) bzw. sCD40L (**B**) und den jeweils anderen untersuchten Inflammationsproteinen (sCD40, sCD40L, sCD27, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-13 und IL-18). Dargestellt sind dabei nebeneinander die r-Werte der Gesamtpopulation, der Diabetiker und der Nicht-Diabetiker. Farbige Kodierung: grün = starke, signifikante positive Korrelation ($r \geq 0,5$, $p < 0,05$), hellrot = mäßige, signifikante negative Korrelation ($-0,5 < r \leq -0,3$, $p < 0,05$). *(Pearson-Korrelationsanalyse mit two-tailed t-test)*

Dabei fand sich in der T2D-Gruppe eine starke, signifikante positive Korrelation zwischen sCD40 und IL-18 (**Abb. 40A**). In der Kontrollgruppe fanden sich starke, signifikante positive Korrelationen zwischen sCD40 und IL-13 (**Abb. 40B**), sCD40L und IL-4 (**Abb. 40C**) sowie sCD40L und IL-7 (**Abb. 40D**).

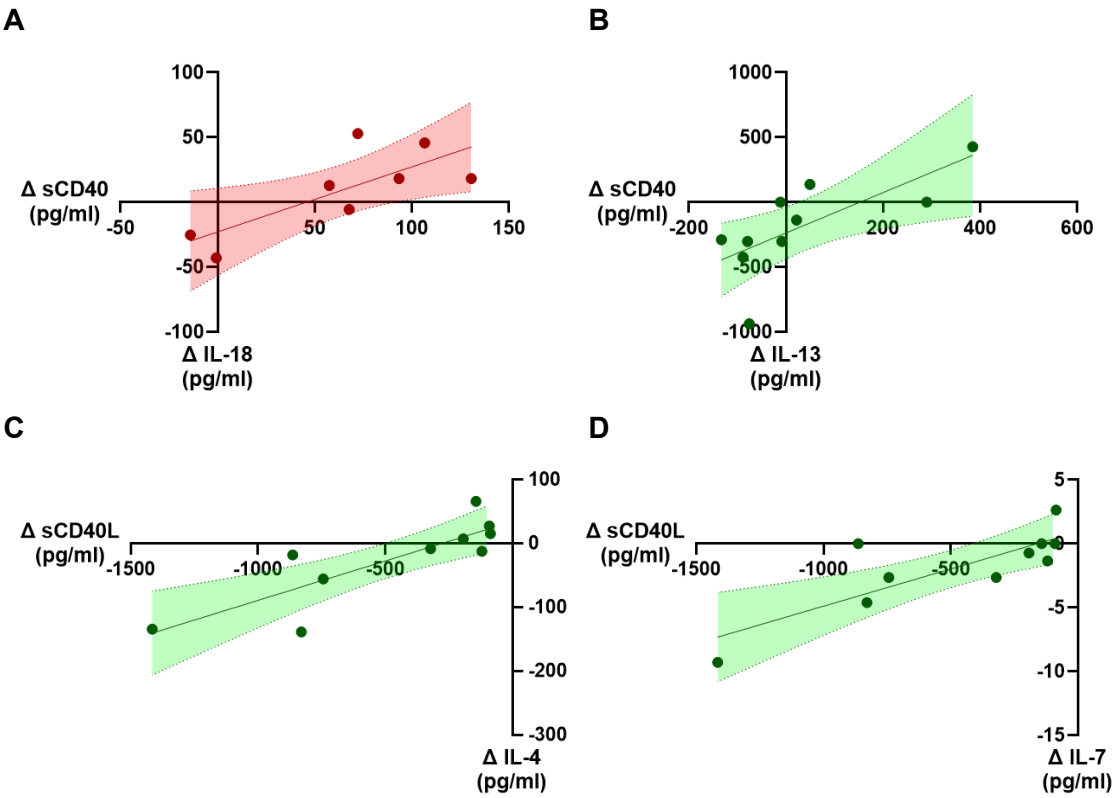


Abb. 40: Starke, signifikante positive Korrelationen zwischen den Änderungen der Plasmakonzentrationen bei Patienten mit und ohne T2D innerhalb des ersten Tages nach STEMI. Dargestellt sind in jeweils einzelnen Streudiagrammen die Korrelationen zwischen den Änderungen der Plasmakonzentrationen in pg/ml von sCD40 und IL-18 in der T2D-Gruppe (**A**) sowie von sCD40 und IL-13 (**B**), sCD40L und IL-4 (**C**) sowie sCD40L und IL-7 (**D**) in der Kontrollgruppe von Zeitpunkt d0 auf Zeitpunkt d1 sowie die jeweilige Regressionsgerade. Datenpunkte: Plasmakonzentrationsänderungen für n = 18 Patienten. *(Pearson-Korrelationsanalyse mit two-tailed t-test sowie linearer Regressionsanalyse)*

4 Diskussion

4.1 Schlussfolgerungen

Ziel dieser Arbeit war die genauere Untersuchung der Rolle der CD40-CD40L-Interaktion und anderer interzellulärer Inflammationsproteine im Kontext des AMI. Besonderer Fokus lag dabei auf der pharmakologischen Modulation der CD40-TRAF6-induzierten Effekte auf die Herzfunktion und die myokardiale Infarzierung nach globaler Ischämie im *ex vivo*-Modell. Dabei hatte die akute Hemmung der CD40-TRAF6-Interaktion mittels TRAF-STOP ebenso wie die CD40-Aktivierung mittels FGK45 keinen relevanten Effekt auf das unmittelbar post-ischämische Outcome.

Die Analyse der Plasmaspiegel von sCD40, sCD40L und weiteren, teils assoziierten Inflammationsproteinen innerhalb des ersten Tages nach STEMI zeigte im Vergleich zu den Ausgangswerten unmittelbar vor PCI insgesamt eine rasche Abnahme der hauptsächlich pro-inflammatorischen Inflammationsproteine. Ein Fokus dieser Arbeit lag auf der möglichen Beeinflussung pathophysiologischer Prozesse nach STEMI durch Vorliegen eines T2D. Dabei wiesen die Ergebnisse der Inflammationsprotein-Plasmaspiegel auf eine insgesamt höhere inflammatorische Aktivität nach STEMI bei Patienten mit T2D hin. Zusätzlich fanden sich Korrelationen zwischen dem CD40L-CD40-System und anderen interzellulären Inflammationsproteinen (insbesondere IL-7 und IL-18), was auf pathophysiologische Zusammenhänge im Kontext des AMI und der frühen Immunreaktion nach AMI hinweisen könnte.

4.2 Pharmakologische Modulation der CD40-TRAF6-abhängigen Signaltransduktion im I/R-Versuch am isolierten LD-Herzen

Die I/R-Versuche am isolierten LD-Herzen dienten der Beantwortung der Frage, ob die akute Hemmung oder Aktivierung CD40-abhängiger Signalwege durch Zugabe von in Vollblut gelöstem TRAF-STOP oder FGK45 ins Herz das unmittelbare Outcome nach globaler Ischämie beeinflussen. Dabei führte weder die akute Hemmung der CD40-TRAF6-Interaktion durch TRAF-STOP, noch die akute CD40-Aktivierung mittels FGK45 zu relevanten Veränderungen der post-ischämischen Herzfunktion oder der myokardialen Infarzierung.

Zwar ließen sich vereinzelte signifikante Unterschiede bestimmter kardialer Funktionsparameter nachweisen, diese waren jedoch meist durch technische, anatomische oder physiologische Unterschiede zwischen einzelnen Versuchen zu erklären. Besonders großen Einfluss auf die teils signifikanten Funde in der frühen Reperfusionsphase hat die Tatsache, dass in den einzelnen Versuchen unterschiedlich viele Minuten zwischen Start der Reperfusion nach globaler Ischämie und Wiedereinsetzen der Herzkontraktion vergingen, was die Messergebnisse innerhalb der ersten 10 Minuten nach Reperfusion nur eingeschränkt

verwertbar macht. So fanden sich beispielsweise in der frühen Reperfusionsphase signifikant erhöhte Parameter der systolischen Funktion und Kontraktilität in der FGK45-Gruppe, was jedoch auf das frühere post-ischämische Wiedereinsetzen suffizienter Herzkontraktionen zurückzuführen ist.

Auch der post-ischämische beobachtete Anstieg des LVEDP innerhalb der ersten 20 Minuten der Reperfusion ist auf ein verzögertes Wiedereinsetzen der Herzkontraktionen zurückzufuhren und bildet die Pathophysiologie der post-ischämischen kardialen Kontraktur nicht adäquat ab [17].

Der signifikant niedrigere CF in der TRAF-STOP-Gruppe in der späten Reperfusionsphase, welcher sich auch nach Normierung des Herzgewichts zeigte, deutete sich bereits prä-ischämisch und somit vor Zugabe des TRAF-STOP an. Der Unterschied ist somit vermutlich teilweise auf andere Ursachen als die pharmakologische Modulation zurückzuführen, beispielsweise auf Unterschiede in der Herzpräparation. Da sich in der späten Reperfusion jedoch neben signifikant niedrigerem CF/HW in der TRAF-STOP-Gruppe auch ein signifikant niedrigerer CF/HW in der FGK45-Gruppe findet, ist eine milde Beeinflussung durch die generelle pharmakologische Modulation – durch sowohl TRAF-STOP als auch FGK45 – nicht vollständig auszuschließen.

Die Ergebnisse legen insgesamt nahe, dass die Modulation der CD40-TRAF6-Interaktion unmittelbar prä-ischämisch keinen kurzfristigen Effekt im AMI hat. Dies deckt sich mit im Nachgang in unserer Arbeitsgruppe erhobenen Daten, in denen sich auch im *in vivo*-Modell keine akuten Effekte der CD40-TRAF6-Hemmung im AMI zeigen. Positive Effekte auf die myokardiale Wundheilung traten dabei frühestens 5 Tage nach AMI auf (*Lang et al., persönliche Mitteilung, 2025*). Auch die bisherige Studienlage zeigt eher längerfristige Effekte von TRAF-STOP. So traten positive Beeinflussung inflammatorischer Prozesse wie Atherosklerose oder Neuroinflammation über einen längeren Beobachtungszeitraum und nach regelmäßiger, längerfristiger TRAF-STOP-Applikation auf [55, 56]. Dies weist in Zusammenschau mit den Ergebnissen dieser Arbeit darauf hin, dass die Modulation der CD40-TRAF6-Interaktion weniger als Akuttherapie, sondern möglicherweise eher in der Primär- und Sekundärprävention sowie in der myokardialen Wundheilung eine Rolle spielen könnte.

Da die Fragestellung nach einer möglichen Beeinflussung der Herzfunktion und des Infarktausmaßes nach TRAF-STOP- bzw. FGK45-Applikation in dieser Arbeit am *ex vivo*-Modell beantwortet wurde, muss diskutiert werden, inwiefern sich die Ergebnisse in die klinische Realität übertragen lassen.

Im Rahmen des AMI und der myokardialen Wundheilung spielen zahlreiche Immunzellen und Inflammationsproteine eine zentrale Rolle [73]. Funktion und Zusammenspiel der residenten

Immunzellen im Mäuseherz (insbesondere Makrophagen, Lymphozyten, Mastzellen und DCs) sowie der Immunzellen im prä-ischämisch perfundierten Mäuseblut können im *ex vivo*-Modell zwar annähernd dargestellt werden. Systemische Prozesse, wie die post-ischämische Rekrutierung weiterer Immunzellen und die Funktionen lymphatischer und hämatopoetischer Organe, die eine essenzielle Rolle in der Pathophysiologie des AMI spielen, können jedoch nicht abgebildet werden [74, 75]. Gerade bei der pharmakologischen Modulation der CD40-TRAF6-Interaktion, welche in der interzellulären Kommunikation von Immunzellen entscheidend ist, stellt dies eine relevante Einschränkung dar [48]. Darüber hinaus hat die LD-Methode den Nachteil, dass die Beeinflussung der myokardialen Wundheilung durch TRAF-STOP oder FGK45 über einen längeren Zeitraum nicht untersucht werden kann. Aufgrund der kurzen Reperfusionszeit ist sie nur begrenzt zur Untersuchung von Reperfusionsschäden geeignet. Hierfür sind *in vivo*-Versuche mit der Möglichkeit der längerfristigen post-ischämischen Verlaufsbeobachtung erforderlich.

Eine weitere Limitation der Übertragbarkeit auf die klinische Realität besteht darin, dass die im LD-Modell ausgelöste globale Ischämie eher das klinische Bild eines Herzstillstands als das eines AMI simuliert. Ein realitätsgetreuerer Versuchsaufbau wäre die gezielte Ligatur einer Koronararterie am isolierten Herzen, welche die Pathophysiologie des AMI besser abbildet und einen besseren klinischen Transfer ermöglicht [76]. Da sich nach globaler Ischämie jedoch kein Hinweis auf einen Effekt der TRAF-STOP- bzw. FGK45-Behandlung zeigte, wurde zunächst auf eine weiterführende Untersuchung durch lokale Ischämie am LD-Herz verzichtet.

Durch das in dieser Arbeit genutzte Studiendesign ergeben sich – neben der Nutzung des *ex vivo*-Modells am isolierten LD-Herzen – weitere mögliche Limitationen. Die hier verglichenen Versuchsgruppen sind relativ klein, was die Generierung aussagekräftiger Daten begrenzt. Aufgrund der erhobenen Ergebnisse dieser Arbeit und weiterführender Versuche unserer Arbeitsgruppe, in welcher sich keine Hinweise auf relevante Effekte der akuten pharmakologischen Modulation der CD40-TRAF6-abhängigen Signaltransduktion zeigten (*Lang et al., persönliche Mitteilung, 2025*), wurde auf eine Ausweitung der Versuchsgruppen verzichtet.

Da in den Experimenten keine relevanten Differenzen zwischen den Versuchsgruppen auftraten, stellt sich auch die Frage nach der korrekten Dosierung der applizierten Wirkstoffe. Bisher existiert wenig Expertise über die adäquate Dosierung von TRAF-STOP und FGK45 in *ex vivo*-Versuchen. In *in vivo*-Versuchen, welche die Beeinflussung chronisch-inflammatorischer Prozesse durch regelmäßige i.p. TRAF-STOP-Applikation zeigen konnten, hat sich eine i.p.-Applikation von 10µmol/kg/d etabliert [55, 56]. In den Versuchen dieser Arbeit wurde eine im Mäuseblut gelöste Konzentration von 10µM ins Herz perfundiert, welche sich zuvor in Zellkultur-Versuchen als pharmakologisch wirksam erwiesen hatte [77]. Da sich weder

in dieser Arbeit noch in anderen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe Hinweise auf eine Relevanz der CD40-TRAF6-Modulation in der akuten myokardialen Ischämie zeigten, wurde auf eine Dosisanpassung verzichtet.

Bezüglich der adäquaten Dosierung von FGK45 bei intrakoronarer Perfusion über die LD-Apparatur existieren bislang keine belastbaren Daten oder relevante Vorerfahrung. Publikationen, die sich mit längerfristiger FGK45-Behandlung in anderen Krankheitsbildern (Neoplasien, Kolitis) beschäftigten, nutzen in ihren Versuchen unterschiedliche Dosierungen und Applikationsformen (200 µg bei i.p.-Applikation im Mausversuch, 24 µg bei intra-tumoraler Applikation im Mausversuch, 10 µg/ml bei in vitro-Stimulation muriner B-Lymphozyten) [78-80]. Aufgrund der nicht systemischen, sondern gezielten intrakoronaren Applikation am isolierten Herzen wurde eine niedrige Dosis von 10 µg festgelegt. Da sich in den Versuchen keine relevanten Änderungen der post-ischämischen Herzfunktion und der Infarktgrößen zeigte, ist nicht auszuschließen, dass die gewählte Dosis zu niedrig war. Aufgrund der insgesamt fehlenden Effekte der akuten pharmakologischen Modulation der CD40-TRAF6-abhängigen Signaltransduktion im LD-Versuch wurde auf eine Dosisanpassung verzichtet.

Um mögliche Effekte der TRAF-STOP- bzw. FGK45-Applikation auf die Folgen des AMI einheitlich und übersichtlich zu vergleichen, wurden beide Versuchsgruppen mit einer Kontrollgruppe verglichen, in welcher dem perfundierten Mäuseblut in PBS gelöstes DMSO (0,01 % Endkonzentration) anstelle der TRAF-STOP- bzw. FGK45-Versuchslösung zugesetzt wurde. Aufgrund unserer Laborerfahrung und der bisherigen Studienlage gehen wir davon aus, dass die Applikation der genutzten Konzentrationen von DMSO und PBS als Perfusat keinen negativen Einfluss auf Herzfunktion und Infarktgröße in den durchgeführten Versuchen hatte [81]. Während sich das in PBS gelöste DMSO gut als Kontrolle für den ebenfalls in PBS/DMSO gelösten TRAF-STOP eignet, muss einschränkend erwähnt werden, dass es sich als Kontrolle für FGK45 nur eingeschränkt eignet. Da sich in den Versuchsergebnissen kein relevanter Effekt der akuten FGK45-Applikation zeigte und der Fokus der Arbeit besonders auf der TRAF-STOP-vermittelten Hemmung der CD40-TRAF6-Interaktion lag, wurde auf die Durchführung einer weiteren Versuchsreihe mit einer spezifischen FGK45-Kontrolle, welche aus einer äquimolaren Lösung eines unspezifischen Ratten-IgG2a bestünde, verzichtet.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der LD-Versuche darauf hin, dass die akute pharmakologische Modulation der CD40-TRAF6-Interaktion keine Auswirkung auf die akuten Schäden einer myokardialen Ischämie hat. Aufgrund der genannten Limitationen kann das LD-Modell jedoch nur als Grundlage für weiterführende Experimente wie *in vivo*-Modelle dienen, um die Fragestellung der Wirkung von TRAF-STOP- oder FGK45-Behandlung im AMI realitätsnäher zu beantworten.

4.3 Analyse interzellulärer Inflammationsproteine nach STEMI

4.3.1 Grundsätzliche Ergebnisse

In der NULISAseq- und Luminex-Analyse von Plasmaproben bei Patienten nach STEMI fand sich innerhalb des ersten Tages nach STEMI grundsätzlich eine Konzentrations-Abnahme der meist pro-inflammatorischen interzellulären Inflammationsproteine im Vergleich zur unmittelbar post-ischämischen Akutphase. Gerade in der NULISAseq-Analyse nahmen die Konzentrationen mehrerer Inflammationsproteine signifikant ab (sCD40L, IL-4, IL-7, IL-10, IL-18), wohingegen lediglich die IL-2-Konzentration signifikant zunahm. Da der AMI bekanntermaßen zu einer unmittelbaren inflammatorischen Reaktion mit Anstieg interzellulärer Inflammationsproteine führt, weisen diese Ergebnisse auf eine Abnahme der inflammatorischen Aktivität innerhalb der ersten 24 post-ischämischen Stunden hin. Die Luminex-Analyse lieferte dabei weniger signifikante Ergebnisse, die sich jedoch teilweise mit den Ergebnissen der NULISA-Analyse decken (insbesondere die signifikante Abnahme der sCD40L- und IL-7-Plasmakonzentration nach STEMI). Einzeln fanden sich jedoch auch unterschiedliche Dynamiken in NULISAseq- und Luminex-Analyse, welche jedoch auch bei Analyten auftraten, deren Plasmakonzentrationen zu Teilen unterhalb der Nachweisgrenze der Luminex-Analyse lagen, was zu eingeschränkter Aussagekraft der Ergebnisse führt (IL-5, IL-10).

Ein Fokus dieser Arbeit lag auf der möglichen Beeinflussung pathophysiologischer Prozesse nach AMI durch Vorliegen eines T2D. Bei Vergleich der Inflammationsprotein-Konzentrationsänderungen zwischen Patienten mit T2D gegenüber Patienten ohne T2D zeigten sich meist übereinstimmende oder ähnliche Dynamiken in NULISAseq- und Luminex-Analyse. Zwar kam es vereinzelt zu widersprüchlichen Ergebnissen, diese traten jedoch erneut besonders im Vergleich der IL-5- und IL-10-Plasmaspiegel auf, welche niedrigere Plasmakonzentrationen aufwiesen und somit mit der Luminex-Analyse nur unzureichend erfasst werden konnten.

Grundsätzlich weisen die Ergebnisse auf eine erhöhte und prolongierte inflammatorische Aktivität nach STEMI bei Patienten mit T2D hin. So nahmen die Plasmakonzentrationen der überwiegend pro-inflammatorischen interzellulären Inflammationsproteine in beiden Untersuchungen innerhalb des ersten Tages nach STEMI in den T2D-Gruppen tendenziell stärker zu bzw. fielen weniger stark ab als in den Kontrollgruppen. In der NULISAseq-Analyse zeigten sich sogar signifikant unterschiedliche Dynamiken der sCD40-, sCD40L-, sCD27-, IL-4-, IL-5- und IL-13-Plasmaspiegel sowie eine signifikant unterschiedliche Dynamik bei Analyse der IL-13-Plasmaspiegel in den Luminex-Versuchen. Die Funde decken sich mit der aktuellen Studienlage, welche einen starken Zusammenhang zwischen erhöhter inflammatorischer Aktivität und T2D zeigt, auch nach AMI [82, 83].

4.3.2 Analyse der CD40- und CD40L-Konzentrationen nach STEMI

Der primäre Fokus dieser Arbeit lag auf der Rolle der CD40-CD40L-Interaktion im AMI. In der Gesamtkohorte zeigten sich keine relevanten Veränderungen der sCD40-Konzentration nach STEMI. Während die Luminex-Analyse zwar eine tendenzielle Zunahme innerhalb des ersten Tages erkennen ließ, konnte dies in der NULISAseq-Untersuchung nicht bestätigt werden. Interessanterweise deuten die Analysen auf eine verstärkte CD40-CD40L-Aktivität im Verlauf nach STEMI bei Patienten mit T2D hin. In diabetischen Patienten stieg die sCD40-Plasmakonzentration in beiden Versuchen stärker an als in der Kontrollgruppe, in der NULISAseq-Analyse sogar signifikant. Verstärkte CD40-Expression bei T2D ist bereits aus früheren Studien bekannt [26, 52]. Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass CD40 bei den pathophysiologischen Prozessen des AMI im Kontext von T2D eine besondere Bedeutung zukommen könnte.

Die sCD40L-Plasmakonzentration in der Gesamtkohorte nahm innerhalb des ersten Tages in beiden Versuchen hoch signifikant ab. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen früherer Arbeiten, in welchen sich eine relevante Abnahme von sCD40L bereits innerhalb der ersten 60 Minuten nach Revaskularisation zeigte [60]. Auch beim sCD40L fanden sich Anzeichen einer verstärkten Rolle bei T2D. So nahm in der NULISAseq-Analyse die sCD40L-Konzentration in der Kontrollgruppe signifikant ab, während sich in der T2D-Gruppe innerhalb des ersten Tages nach STEMI keine Änderung fand. Während bereits mehrfach gezeigt werden konnte, dass diabetische Patienten eine erhöhte inflammatorische Grundaktivität und erhöhte sCD40L-Plasmaspiegel aufweisen [26, 51], sind Studien über die Dynamik von sCD40L bei diabetischen Patienten im Kontext des AMI bislang begrenzt. Vereinzelte Untersuchungen fanden jedoch erhöhte sCD40L-Plasmalevel 10-14 Tage nach STEMI in diabetischen Patienten, was sich zumindest teilweise mit den Funden dieser Arbeit deckt [84]. In im Nachgang in unserer Arbeitsgruppe erhobenen Daten zeigte sich zusätzlich eine Assoziation zwischen erhöhten sCD40L-Plasmaspiegeln und ungünstigem kardialen Outcome nach AMI (*Lang et al., persönliche Mitteilung, 2025*). Inwiefern die potenziell stärkere Rolle von sCD40L nach STEMI kausal mit dem bekannten ungünstigeren kardialen Outcome bei T2D zusammenhängt, bleibt unklar und bedarf weiterführender Untersuchungen [85].

Die Korrelationsanalysen der Konzentrationsänderungen innerhalb des ersten Tages nach STEMI zeigten in der Gesamtkohorte und der Kontrollgruppe signifikante, starke positive Korrelationen zwischen sCD40 und sCD40L in den NULISAseq-Daten. In der T2D-Gruppe bestand lediglich eine mäßige Korrelation zwischen diesen Analyten. Ein verringerter Zusammenhang zwischen sCD40 und sCD40L bei T2D, etwa aufgrund T2D-abhängig erhöhter sCD40L-Plasmaspiegel, kann nicht ausgeschlossen werden und sollte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden [26, 51]. In der Luminex-Analyse fanden sich keine

signifikanten Korrelationen, was zumindest teilweise auf eine geringe Größe der untersuchten Kohorten und damit eine begrenzte Aussagekraft der statistischen Analysen zurückzuführen ist.

4.3.3 Analyse der weiteren Inflammationsproteine nach STEMI

Neben sCD40 und sCD40L wurde die Plasmalevel-Dynamik weiterer Inflammationsproteine (sCD27, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-13 und IL-18) bei Patienten mit STEMI untersucht.

CD27 ist wie CD40 ein Oberflächenrezeptor der TNFR-Familie, welcher an Aktivierung sowie Proliferation von $CD4^+$ T-Zellen und Zytokinproduktion beteiligt ist und im Kontext des AMI für eine koordinierte myokardiale Wundheilung essenziell zu sein scheint. In beiden Versuchen stieg die sCD27-Konzentration innerhalb des ersten Tages nach STEMI in der Gesamtkohorte signifikant an. Bereits in früheren Arbeiten konnte ein Anstieg der sCD27-Plasmakonzentration in des ersten Tages nach STEMI nachgewiesen werden [61]. Darüber zeigten sich in der Luminex-Analyse erhöhte sCD27-Plasmaspiegel in der Gesamtkohorte auch im späteren post-ischämischen Verlauf. Die Befunde dieser Arbeit deuten, in Zusammenschau mit bisherigen Arbeiten, eine Rolle von CD27 sowohl in frühen wie auch in späten Phasen der myokardialen Wundheilung an [61]. Eine signifikante Zunahme der sCD27-Plasmakonzentration fand sich in der Subgruppenanalyse lediglich in der T2D-, nicht jedoch in der Kontrollgruppe. Ob diese Differenz kausal mit dem nachgewiesen ungünstigerem kardialem *Remodeling* nach AMI bei Vorliegen eines T2D zusammenhängt, bleibt unklar [85].

IL-2 ist ein Schlüsselmolekül der adaptiven Immunantwort. Es stimuliert über autokrine Bindung an IL-2-Rezeptoren die Proliferation und Expansion von T-Zellen, kann zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) aktivieren, in geringeren Dosen jedoch auch immunregulatorische Effekte entfalten [86]. Dazu passt, dass die IL-2-Konzentration in der NULISAseq-Analyse innerhalb des ersten Tages nach STEMI signifikant anstieg. Studien zeigten bislang eine Verbesserung der myokardialen Wundheilung durch den Einsatz von IL-2 [87, 88]. Neue Daten legen nahe, dass dieser Effekt auch auf eine IL-2-vermittelte vermehrte Produktion regulatorischer T-Zellen (Tregs) zurückzuführen ist. So konnte durch eine niedrig-dosierte IL-2-Therapie bei Patienten mit ACS eine Abschwächung der koronararteriellen Inflammation erreicht werden [89]. Der hier beobachtete Anstieg der IL-2-Konzentration passt somit zumindest teilweise zu einer möglichen Rolle von IL-2 in der myokardialen Wundheilung. Ein relevanter Anstieg der IL-2-Konzentration in der Luminex-Analyse im späten post-ischämischen Verlauf, der diese Theorie weiter stützen würde, findet sich jedoch nicht. Einschränkend muss jedoch hinzugefügt werden, dass ein relevanter Anteil der Luminex-Einzelmessungen unterhalb des Messbereichs lag, wodurch die Analyse eine eingeschränkte Aussagekraft besitzt.

IL-4 ist ein immunmodulatorisches Zytokin, was nach AMI durch verschiedene Mechanismen wie Abschwächung inflammatorischer Prozesse oder Förderung der Angiogenese zu einer besseren myokardialen Wundheilung und einem besseren kardialen Outcome beiträgt [90, 91]. IL-4 nahm in der NULISAseq-Analyse innerhalb des ersten Tages nach STEMI signifikant ab, was sich besonders in der Kontrollgruppe zeigte, in welcher IL-4 signifikant stärker supprimiert wurde als in der T2D-Gruppe. Das eng verwandte IL-13, welches über ähnliche Mechanismen zur myokardialen Wundheilung beiträgt, zeigte in beiden Versuchen eine dazu passende signifikante Dynamik mit stärkerer Konzentrationsabnahme in der Kontrollgruppe und tendenziellem Anstieg in der T2D-Gruppe [92]. Im weiteren post-ischämischen Verlauf zeigte sich in der Luminex-Analyse keine weitere relevante Dynamik, was für eine Rolle von IL-4 und IL-13 eher in der Initiierung der myokardialen Wundheilung sprechen könnte.

IL-5 spielt als wichtigster Wachstums- und Differenzierungsfaktor eosinophiler Granulozyten eine entscheidende Rolle in eosinophilen Immunreaktionen [93]. Die bisherige Studienlage deutet auf eine eher untergeordnete Rolle im AMI hin. Es verstärkt IL-4-vermittelte Prozesse und damit die myokardiale Regeneration [94]. Zu dieser untergeordneten Rolle passt, dass sich in beiden Versuchen in der Gesamtkohorte keine relevanten Dynamiken der IL-5-Plasmaspiegel im Verlauf nach AMI zeigten. Allerdings nahm die IL-5-Konzentration in der NULISAseq-Analyse innerhalb des ersten Tages nach STEMI in der T2D-Gruppe signifikant stärker zu als in der Kontrollgruppe. Erhöhte IL-5-Konzentrationen bei Patienten mit T2D konnten bereits in anderen Immunoassays nachgewiesen werden [95]. Die Studienlage dazu ist jedoch uneinheitlich, da sich in anderen Arbeiten erniedrigte IL-5-Konzentrationen bei Patienten mit T2D fanden [96]. Die Rolle von IL-5 im AMI unter Berücksichtigung des Vorliegens oder Nicht-Vorliegens eines T2D bleibt somit unklar.

IL-7 kann nach AMI I/R-bedingte Schäden verstärken, indem es die Infiltration pro-inflammatorischer M1-Makrophagen fördert und die Apoptose von Kardiomyozyten begünstigt [97]. Die IL-7-Konzentration in der Gesamtkohorte nahm innerhalb des ersten Tages in beiden Versuchen signifikant ab. Im Vergleich der Subgruppen zeigte sich in der NULISAseq-Analyse besonders in der Kontrollgruppe eine starke, signifikante Abnahme der IL-7-Konzentration. Inwiefern die verringerte IL-7-Suppression bei Patienten mit T2D möglicherweise zur bekannten schlechteren myokardialen Wundheilung beiträgt bleibt unklar und bedarf im Verlauf weiterer Untersuchungen [85].

Daneben fielen in den Korrelationsanalysen, besonders in den NULISAseq-Daten, signifikante, teils starke positive Korrelationen zwischen IL-7 und sCD40 bzw. sCD40L auf. Anzeichen eines pathophysiologischen Zusammenhangs zwischen dem CD40-CD40L-Paar und IL-7 in inflammatorischen Prozesse und chronisch-inflammatorischen Erkrankungen wie T1D konnten bereits vereinzelt gefunden werden. [98, 99]. Die Studienlage bezüglich

Zusammenhängen im Kontext von CVDs und besonders dem AMI ist bislang jedoch begrenzt. Zwar ist IL-7, wie das CD40-CD40L-Paar, ein bekannter Treiber atherosklerotischer Prozesse. Einzelne Studien, die sich entfernt mit dieser Fragestellung beschäftigen, konnten bislang jedoch keinen pathophysiologischen Zusammenhang zwischen CD40-CD40L und IL-7 nachweisen. Beispielsweise wurde bei CD40-Aktivierung humaner Nabelschnurvenen-Endothelzellen durch CD40L keine erhöhte IL-7-Sezernierung festgestellt [100]. Die dargelegten Korrelationen könnten jedoch auf mögliche Zusammenhänge zwischen CD40, CD40L und IL-7 im Kontext des AMI hinweisen, was weitere Untersuchungen der interzellulären Inflammationsproteine zu einem potenziell vielversprechenden Ansatz der kardiovaskulären Forschung macht.

IL-10 ist ein stark anti-inflammatorisches Zytokin und trägt wesentlich zur myokardialen Wundheilung bei [101]. In der NULISAseq-Analyse zeigte sich eine signifikante Abnahme der IL-10-Konzentration in der Gesamtpopulation innerhalb des ersten Tages nach STEMI. Die Subgruppenanalyse zeigte dabei eine signifikante IL-10-Abnahme in der Kontrollgruppe, wohingegen sich diese Dynamik in der T2D-Gruppe lediglich andeutete. Die beobachtete Dynamik könnte darauf hinweisen, dass IL-10 kurz nach AMI einen relevanten Einfluss auf die Frühphase der myokardialen Wundheilung hat.

IL-18 ist ein wichtigstes pro-inflammatorischen Zytokin des angeborenen und adaptiven Immunsystems, welches sowohl an der Pathogenabwehr als auch an chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie der Atherosklerose beteiligt ist [102, 103]. Im Kontext des AMI fanden sich akut erhöhte IL-18-Plasmaspiegel, und erhöhtes IL-18 hatte in vergangen Studien negative Effekte auf das kardiale *Remodeling* und die myokardiale Funktion nach AMI, was es zu einem potenziellen Ziel neuer Therapieansätze machen könnte [104, 105]. Die hier präsentierten Ergebnisse zeigten eine signifikante Abnahme der IL-18-Konzentration innerhalb des ersten Tages nach STEMI in der NULISAseq-Analyse, was zur bisher aufgezeigten IL-18-Erhöhungen in der Akutphase des AMI passt [104]. In der Luminex-Analyse ließen sich diese Ergebnisse nicht reproduzieren. In bisherigen Untersuchungen wurden erhöhte IL-18-Spiegel bei T2D und akuter Hyperglykämie gemessen [106, 107]. Dazu passend fand sich in der NULISAseq-Analyse lediglich in der Kontrollgruppe eine signifikante Abnahme der IL-18-Konzentration innerhalb des ersten Tages nach STEMI, nicht jedoch in der T2D-Gruppe.

In den Korrelationsanalysen zeigten sich signifikante, stark positive Korrelationen zwischen IL-18 und sCD40 bzw. sCD40L. In bisherigen Studien konnte aufgezeigt werden, dass diese Inflammationsproteine in inflammatorischen Prozessen pathophysiologisch eng miteinander verbunden sind. So sezernieren beispielsweise durch CD40-CD40L-Interaktion stimulierte $CD4^+$-T-Zellen vermehrt IL-18, während IL-18 wiederum als starker Ko-Faktor bei der Aktivierung von $CD4^+$-T-Zellen deren CD40L-Expression verstärkt [108, 109]. Diese

Zusammenhänge spielen unter anderem in chronisch-inflammatorischen Erkrankungen wie der multiplen Sklerose eine Rolle [110, 111]. Mögliche pathophysiologische Zusammenhänge zwischen dem CD40L-CD40-Paar und IL-18 in CVDs sind bislang jedoch unzureichend untersucht. In Kombination mit dem bisherigen Verständnis über die pathophysiologischen Rollen von CD40-CD40L und IL-18 könnten die Ergebnisse dieser Arbeit auf relevante Interaktionen im AMI und der myokardialen Wundheilung hinweisen.

4.3.4 Vergleich der NULISA- und Luminex-Methode

Der Vergleich der NULISAseq- und Luminex-Methode zeigt deutliche Vor- und Nachteile beider Verfahren auf. Beide Methoden haben den Vorteil, dass sich unter gleichen Versuchsbedingungen zeitgleich multiple Analyte aus relativ geringen Plasmavolumina bestimmen lassen. Das NULISAseq- ermöglicht gegenüber dem Luminex-Verfahren jedoch eine noch zuverlässigere und aussagekräftigere Bestimmung der verschiedenen Proteine. Insbesondere Analyte mit geringer Plasmakonzentration lassen sich in der Luminex-Analyse nur eingeschränkt untersuchen, da viele der Messungen unterhalb des Standardbereichs des Tests oder gar unterhalb des messbaren Bereichs liegen (z.B. IL-5, IL-10). Dies verdeutlicht die zuverlässige Messung auch geringster Konzentration mit dem NULISAseq-Verfahren durch die Kombination des Multiplex-Ansatzes mit NGS und dadurch die potente Reduktion von Hintergrundsignalen [69]. Darüber hinaus werden Analyte mit großer Streuung sowie einzelne „Ausreißer“ besser durch die logarithmische Darstellung der NULISAseq-Analyse abgebildet. Bei der Luminex-Analyse hingegen können die Analysen, insbesondere bei kleinen untersuchten Kohorten, durch stark abweichende Einzelmessungen beeinflusst werden (z.B. sCD40L, Zeitpunkt d0, siehe **Abb. 32B**). Limitationen des NULISAseq-Verfahrens sind jedoch die bisher noch hohen Kosten und die fehlende Praktikabilität im Laboralltag. So wurden die für diese Arbeit genutzten Untersuchungen bei *Alamar Biosciences Inc.* in Fremont, Kalifornien, USA durchgeführt. Luminex-Analysen sind hingegen deutlich kostengünstiger und einfacher im Labor durchführbar und bieten dennoch die zahlreichen Vorzüge konventionellerer Multiplex-Verfahren [71].

4.3.5 Limitationen des Studiendesigns

Die durch diese Arbeit gefundenen Ergebnisse und die darauf aufbauenden Interpretationen resultieren auf dem Vergleich der Daten zweier unterschiedlicher Versuchsmethoden. Bei einigen der untersuchten Inflammationsproteine stimmten die Ergebnisse der NULISAseq- und Luminex-Analysen überein, teilweise zeigen sich jedoch auch uneinheitliche Funde. Basierend auf dem Design der Arbeit müssen dabei mehrere mögliche Ursachen für diese Tatsache diskutiert werden.

Die für die Versuche genutzten Blutproben stammen alle aus der „Düsseldorfer SYSTEMI-Kohorte“, sind somit unter annähernd gleichen Bedingungen bei einem diversen

Patientenkollektiv gewonnen worden [70]. Die Selektion der jeweiligen Proben erfolgte dabei größtenteils zufällig, es wurde aufgrund der zentralen Fragestellung der Unterscheidung von Patienten mit und ohne T2D lediglich darauf geachtet, vergleichbare Kohorten mit und ohne T2D zu generieren. Um ein möglichst großes Patientenkollektiv in die Auswertung zu integrieren, wurden zwei unterschiedliche Kohorten mit den beiden Versuchsmethoden untersucht, sodass die Proben der Patienten nicht sowohl in die NULISAseq- als auch in die Luminex-Analyse einflossen. Damit entstanden letztlich vier unterschiedliche Kohorten, zwei für die NULISAseq- und zwei für die Luminex-Analyse, jeweils eine davon bestehend aus Patienten mit und eine aus Patienten ohne T2D. Aus organisatorischen Gründen, und da diese Arbeit nur als Grundlage für größer angelegte Studiendesigns fungiert, waren die dadurch untersuchten Kohorten relativ klein. So wurden in der NULISAseq-Analyse 15 Patienten mit und 29 Patienten ohne T2D verglichen, in der Luminex-Analyse 9 Patienten mit und 10 Patienten ohne T2D. Durch die kleine Größe der untersuchten Kohorten nimmt die Bedeutung von Störfaktoren wie anderen kardiovaskulären Risikofaktoren (u.a. Alter, Nikotinabusus, Geschlecht, Dyslipidämie), aber auch anderer interindividueller Unterschiede wie systemischen oder myokardialen metabolischen Störungen zu [70]. Dies könnte gerade in der Luminex-Analyse, in welcher die Versuchsgruppen kleiner waren als in der NULISAseq-Analyse, zur Verzerrung der Ergebnisse führen. Außerdem haben einzelne abweichende Messungen in kleinen Kohorten einen größeren Effekt auf die Auswertung. Dazu passt, dass sich in der Luminex-Analyse weniger signifikante Ergebnisse zeigten als in der NULISAseq-Analyse. Für eine genauere Untersuchung bedarf es in Zukunft Untersuchungen an größeren, standardisierten Kohorten. Andererseits sind signifikante, in unterschiedlichen Kohorten mittels verschiedener Verfahren replizierbare Effekte als sehr vielversprechend anzusehen und können als Ausgangspunkt für nachfolgende Studien gelten.

Zusätzlich wird die Aussagekraft der mittels Luminex-Analyse erhobenen Daten durch das Fehlen einzelner Plasmaproben eingeschränkt. So trugen Patienten, bei denen einzelne Plasmaproben zu bestimmten Zeitpunkten aus prozeduralen Gründen nicht in die Analyse eingeschlossen wurden, nicht zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen zu den jeweiligen Zeitpunkten bei, was zu einer gewissen Verfälschung der statistischen Messungen führen könnte. Für zukünftige Analysen sollten daher idealerweise nur Patienten eingeschlossen werden, bei denen Blutproben zu allen definierten Zeitpunkten vorliegen. Alternativ könnte durch Untersuchung größerer Kohorten eine mögliche Verfälschung durch fehlende Werte minimiert werden.

Als weitere potenzielle Ursache der Messunterschiede müssen die bereits genannten Unterschiede zwischen den verwendeten Detektionsmethoden genannt werden. Gerade der Vorteil der NULISAseq-Methode bei der Messung sehr niedriger Konzentrationen kann zu

aussagekräftigeren Ergebnissen besonders bei Analyten mit niedriger Plasmakonzentration führen. Darüber hinaus schränkt die unterschiedliche numerische Darstellung der Messergebnisse – lineare Darstellung absoluter Konzentrationen bei der Luminex-, logarithmische Darstellung relativer Messergebnisse bei der NULISAseq-Analyse – die Vergleichbarkeit teilweise ein.

In den Ergebnissen dieser Arbeit fanden sich Unterschiede in der post-ischämischen Dynamik verschiedener Analyte zwischen Patienten mit und ohne T2D. Aktuelle Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass die jetzige Diabetes-Einteilung den zugrundeliegenden komplexen pathophysiologischen Mechanismen der Erkrankung nicht ausreichend gerecht wird. Diese basiert im Wesentlichen auf Hyperglykämie, Autoantikörpern und einigen klinischen Merkmalen, jedoch nicht auf Ätiologie, klinischem Verlauf und Komplikationsrisiken. So kommt zunehmend eine neue Einteilung in Diabetes-Subtypen auf, welche diese genauer abbildet und somit eine bessere Grundlage für zielgerichtete Forschung und individualisierte Therapieansätze darstellt. Dabei zeigte sich, dass der *Severe insulin-resistant diabetes* (SIRD), welcher sich durch Insulin-Resistenz und metabolische Dysfunktion auszeichnet, besonders stark mit dem Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen einhergeht [112]. Die hier dargestellten Unterschiede der inflammatorischen Aktivität nach AMI können somit nur bedingt auf alle Patienten mit T2D angewandt werden. Aufbauend auf den hier präsentierten Ergebnissen bedarf es in zukünftigen Arbeiten der Untersuchung der Inflammationsprotein-Konzentrationen in den verschiedenen Diabetes-Subtypen, mit Fokus auf dem SIRD.

Die in dieser Arbeit gefundenen statistisch signifikanten Ergebnisse bezüglich Inflammationsprotein-Dynamiken nach STEMI und Differenzen zwischen Patienten mit und ohne T2D wurden durch die kleinen und divergenten verglichenen Kohorten möglicherweise eingeschränkt. Hinzu kommt, dass aufgrund fehlender Werte in der Luminex-Analyse teilweise parametrische Tests für die Berechnung herangezogen werden mussten, obwohl die Daten teilweise nicht sicher normalverteilt waren. Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit bedarf es in Zukunft größer angelegter Untersuchungen mit Power-Analysen, um die Funde zu bestätigen.

4.4 Ausblick

Die Ergebnisse der Arbeit liefern Hinweise auf eine Rolle der CD40-CD40L-Interaktion im AMI, insbesondere in der Inflammationsprotein-Analyse bei Patienten mit STEMI. Die hier gefundenen Ergebnisse – wie die auf initialen Anstieg folgende Reduktion der meisten Inflammationsproteine innerhalb des ersten Tages nach STEMI, Anzeichen einer gesteigerten inflammatorischen und spezifisch CD40-CD40L-Aktivität bei Patienten mit T2D und Korrelationen zwischen sCD40-sCD40L und IL-7 bzw. IL-18 – stellen dabei eine vielversprechende Grundlage für weiterführende Analysen dar. Um eine eingeschränkte

Aussagekraft der erhobenen Daten durch die zuvor beschriebenen Limitationen zu vermeiden, bedarf es Studiendesigns mit Power-Analysen und großen Kohorten. So ist zukünftig eine umfassende Multiplex-Analyse von Proben aus der „Düsseldorfer SYSTEMI-Kohorte“ mittels des NULISAseq-Verfahrens geplant. Davon versprechen wir uns, auch aufgrund der zuvor diskutierten Vorzüge des NULISAseq-Verfahrens gegenüber anderer Multiplex-Verfahren, weiterführende Erkenntnisse bezüglich der Dynamik und Rolle von sCD40-sCD40L und assoziierten Inflammationsproteinen in den pathophysiologischen Prozessen des AMI und der myokardialen Wundheilung.

Bei der akuten, prä-ischämischen pharmakologischen Modulation der CD40-TRAF-abhängigen Signaltransduktion im isolierten LD-Herzen zeigten sich keine Hinweise auf eine mögliche Rolle von TRAF-STOP als akute therapeutische Option im AMI. Im Nachgang in unserer Arbeitsgruppe erhobene Daten deuten in Zusammenschau mit vorherigen Studien zur Hemmung der CD40-TRAF6-Interaktion in inflammatorischen Erkrankungen eher auf einen präventiven und therapeutischen Nutzen von TRAF-STOP bei längerfristiger Applikation hin. Somit sind zukünftige Studiendesigns, die den präventiven oder therapeutischen Nutzen von TRAF-STOP im AMI nach längerfristiger Applikation untersuchen, von großem Interesse.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis:

1. World Health, O., *World health statistics 2024: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals*. 2024, Geneva: World Health Organization.
2. Bundesamt, S. *KORREKTUR: Todesursachenstatistik 2023: Zahl der Todesfälle im Jahr 2023 um 3,6 % gesunken*. 2024 30.09.2024; Available from: https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2024/08/PD24_317_23211.html.
3. Chong, B., et al., *Global burden of cardiovascular diseases: projections from 2025 to 2050.* Eur J Prev Cardiol, 2024.
4. Renz-Polster, H., *Basislehrbuch innere Medizin : kompakt, greifbar, verständlich [Lehrbuch]*. 5. Aufl. ed, ed. H. Renz-Polster, B. Bätge, and J. Braun. 2013, München: Elsevier, Urban & Fischer.
5. Lechner, K., et al., *Lifestyle factors and high-risk atherosclerosis: Pathways and mechanisms beyond traditional risk factors.* Eur J Prev Cardiol, 2020. **27**(4): p. 394-406.
6. Khera, A.V., et al., *Genetic Risk, Adherence to a Healthy Lifestyle, and Coronary Disease.* N Engl J Med, 2016. **375**(24): p. 2349-2358.
7. Roth, G.A., et al., *Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study.* J Am Coll Cardiol, 2020. **76**(25): p. 2982-3021.
8. Bays, H.E., et al., *Ten things to know about ten cardiovascular disease risk factors.* Am J Prev Cardiol, 2021. **5**: p. 100149.
9. Gatto, L. and F. Prati, *Subclinical atherosclerosis: how and when to treat it?* Eur Heart J Suppl, 2020. **22**(Suppl E): p. E87-e90.
10. Falk, E., et al., *Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view.* Eur Heart J, 2013. **34**(10): p. 719-28.
11. Barry, W.H., *Calcium and ischemic injury.* Trends Cardiovasc Med, 1991. **1**(4): p. 162-6.
12. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target.* J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 92-100.
13. Thygesen, K., et al., *Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018).* Circulation, 2018. **138**(20): p. e618-e651.
14. Tiwari, R.P., et al., *Cardiac troponins I and T: molecular markers for early diagnosis, prognosis, and accurate triaging of patients with acute myocardial infarction.* Mol Diagn Ther, 2012. **16**(6): p. 371-81.
15. Saito, Y., et al., *Treatment strategies of acute myocardial infarction: updates on revascularization, pharmacological therapy, and beyond.* J Cardiol, 2023. **81**(2): p. 168-178.
16. Turer, A.T. and J.A. Hill, *Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy.* Am J Cardiol, 2010. **106**(3): p. 360-8.
17. Yusof, N.L.M., D.M. Yellon, and S.M. Davidson, *The contribution of cardiomyocyte hypercontracture to the burden of acute myocardial infarction: an update.* Basic Res Cardiol, 2025. **120**(4): p. 619-639.
18. Zhao, W., J. Zhao, and J. Rong, *Pharmacological Modulation of Cardiac Remodeling after Myocardial Infarction.* Oxid Med Cell Longev, 2020. **2020**: p. 8815349.
19. Sharma, V., R.M. Bell, and D.M. Yellon, *Targeting reperfusion injury in acute myocardial infarction: a review of reperfusion injury pharmacotherapy.* Expert Opin Pharmacother, 2012. **13**(8): p. 1153-75.
20. Nah, D.Y. and M.Y. Rhee, *The inflammatory response and cardiac repair after myocardial infarction.* Korean Circ J, 2009. **39**(10): p. 393-8.
21. Ohashi, Y., et al., *Soluble CD40 ligand and interleukin-6 in the coronary circulation after acute myocardial infarction.* Int J Cardiol, 2006. **112**(1): p. 52-8.
22. Patel, K.D., et al., *High sensitivity cytokine detection in acute coronary syndrome reveals up-regulation of interferon gamma and interleukin-10 post myocardial infarction.* Clin Immunol, 2009. **133**(2): p. 251-6.

23. Prabhu, S.D. and N.G. Frangogiannis, *The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis.* Circ Res, 2016. **119**(1): p. 91-112.
24. Krauss, R.M., *Lipids and lipoproteins in patients with type 2 diabetes.* Diabetes Care, 2004. **27**(6): p. 1496-504.
25. Maruhashi, T. and Y. Higashi, *Pathophysiological Association between Diabetes Mellitus and Endothelial Dysfunction.* Antioxidants (Basel), 2021. **10**(8).
26. Jinchuan, Y., et al., *Upregulation of CD40--CD40 ligand system in patients with diabetes mellitus.* Clin Chim Acta, 2004. **339**(1-2): p. 85-90.
27. Poznyak, A., et al., *The Diabetes Mellitus-Atherosclerosis Connection: The Role of Lipid and Glucose Metabolism and Chronic Inflammation.* Int J Mol Sci, 2020. **21**(5).
28. Kerola, A.M., M. Juonala, and V. Kytö, *Short- and long-term mortality in patients with type 2 diabetes after myocardial infarction– a nationwide registry study.*
29. Cui, J., et al., *Type 2 Diabetes and Myocardial Infarction: Recent Clinical Evidence and Perspective.* Front Cardiovasc Med, 2021. **8**: p. 644189.
30. Karakasis, P., et al., *Diabetes-Driven Atherosclerosis: Updated Mechanistic Insights and Novel Therapeutic Strategies.* Int J Mol Sci, 2025. **26**(5).
31. Strohm, L., et al., *Role of inflammatory signaling pathways involving the CD40-CD40L-TRAF cascade in diabetes and hypertension-insights from animal and human studies.* Basic Res Cardiol, 2024. **119**(4): p. 1-18.
32. Friedl, P. and J. Storim, *Diversity in immune-cell interactions: states and functions of the immunological synapse.* Trends Cell Biol, 2004. **14**(10): p. 557-67.
33. Hilligan, K.L. and F. Ronchese, *Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4+ T helper cell responses.* Cell Mol Immunol, 2020. **17**(6): p. 587-599.
34. Walzog, B. and J. Fandrey, *Blut: Ein flüssiges Organsystem*, in *Physiologie*, H.-C. Pape, A. Kurtz, and S. Silbernagel, Editors. 2014, Thieme: Stuttgart. p. 284-288.
35. Schonbeck, U. and P. Libby, *CD40 signaling and plaque instability.* Circ Res, 2001. **89**(12): p. 1092-103.
36. Bosmans, L.A., et al., *The CD40-CD40L Dyad as Immunotherapeutic Target in Cardiovascular Disease.*
37. Quezada, S.A., et al., *CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity.* Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 307-28.
38. Elgueta, R., et al., *Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system.* Immunol Rev, 2009. **229**(1): p. 152-72.
39. Pullen, S.S., et al., *CD40-tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) interactions: regulation of CD40 signaling through multiple TRAF binding sites and TRAF hetero-oligomerization.* Biochemistry, 1998. **37**(34): p. 11836-45.
40. Mukundan, L., et al., *TNF receptor-associated factor 6 is an essential mediator of CD40-activated proinflammatory pathways in monocytes and macrophages.* J Immunol, 2005. **174**(2): p. 1081-90.
41. Bishop, G.A., et al., *TRAF proteins in CD40 signaling.* Adv Exp Med Biol, 2007. **597**: p. 131-51.
42. Toubi, E. and Y. Shoenfeld, *The role of CD40-CD154 interactions in autoimmunity and the benefit of disrupting this pathway.* Autoimmunity, 2004. **37**(6-7): p. 457-64.
43. Mach, F., et al., *Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): p. 1931-6.
44. Lutgens, E., et al., *CD40 and its ligand in atherosclerosis.* Trends Cardiovasc Med, 2007. **17**(4): p. 118-23.
45. Schönbeck, U., et al., *Soluble CD40L and cardiovascular risk in women.* Circulation, 2001. **104**(19): p. 2266-8.
46. Lievens, D., et al., *The multi-functionality of CD40L and its receptor CD40 in atherosclerosis.* Thromb Haemost, 2009. **102**(2): p. 206-14.

47. Lutgens, E., et al., *Both early and delayed anti-CD40L antibody treatment induces a stable plaque phenotype.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(13): p. 7464-9.
48. Schönbeck, U. and P. Libby, *The CD40/CD154 receptor/ligand dyad.* Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(1): p. 4-43.
49. André, P., et al., *CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism.* Nat Med, 2002. **8**(3): p. 247-52.
50. Lutgens, E., et al., *Deficient CD40-TRAF6 signaling in leukocytes prevents atherosclerosis by skewing the immune response toward an antiinflammatory profile.* J Exp Med, 2010. **207**(2): p. 391-404.
51. Varo, N., et al., *Elevated plasma levels of the atherogenic mediator soluble CD40 ligand in diabetic patients: a novel target of thiazolidinediones.* Circulation, 2003. **107**(21): p. 2664-9.
52. Yamagishi, S., et al., *Blockade by nifedipine of advanced glycation end product-induced CD40-CD40 ligand interaction in endothelial cells.* Drugs Exp Clin Res, 2005. **31**(5-6): p. 221-6.
53. Liu, R., et al., *TRAF6 mediates high glucose-induced endothelial dysfunction.* Exp Cell Res, 2018. **370**(2): p. 490-497.
54. Zarzycka, B., et al., *Discovery of small molecule CD40-TRAF6 inhibitors.* J Chem Inf Model, 2015. **55**(2): p. 294-307.
55. Seijkens, T.T.P., et al., *Targeting CD40-Induced TRAF6 Signaling in Macrophages Reduces Atherosclerosis.* J Am Coll Cardiol, 2018. **71**(5): p. 527-542.
56. Aarts, S., et al., *Inhibition of CD40-TRAF6 interactions by the small molecule inhibitor 6877002 reduces neuroinflammation.* J Neuroinflammation, 2017. **14**(1): p. 105.
57. Strohm, L., et al., *Role of CD40(L)-TRAF signaling in inflammation and resolution-a double-edged sword.* Front Pharmacol, 2022. **13**: p. 995061.
58. Napoleão, P., M.M. Carmo, and T. Pinheiro, *Prognostic evaluation of soluble CD40L in acute myocardial infarction: is not fancy, is science!* Ann Transl Med, 2017. **5**(4): p. 90.
59. Varo, N., et al., *Soluble CD40L: risk prediction after acute coronary syndromes.* Circulation, 2003. **108**(9): p. 1049-52.
60. Liebetrau, C., et al., *Release kinetics of inflammatory biomarkers in a clinical model of acute myocardial infarction.* Circ Res, 2015. **116**(5): p. 867-75.
61. Li, W., et al., *The role of CD27-CD70 signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling.* Int J Cardiol, 2019. **278**: p. 210-216.
62. Saeidnia, S., A. Manayi, and M. Abdollahi, *From in vitro Experiments to in vivo and Clinical Studies; Pros and Cons.* Curr Drug Discov Technol, 2015. **12**(4): p. 218-24.
63. Muthuramu, I., et al., *Permanent ligation of the left anterior descending coronary artery in mice: a model of post-myocardial infarction remodelling and heart failure.* J Vis Exp, 2014(94).
64. Bell, R.M., M.M. Mocanu, and D.M. Yellon, *Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion.* J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(6): p. 940-50.
65. Minhaz, U., et al., *Perfusion delay causes unintentional ischemic preconditioning in isolated heart preparation.* Basic Res Cardiol, 1995. **90**(5): p. 418-23.
66. Kuzmiak-Glancy, S., et al., *Oxygen demand of perfused heart preparations: how electromechanical function and inadequate oxygenation affect physiology and optical measurements.* Exp Physiol, 2015. **100**(6): p. 603-16.
67. Vivaldi, M.T., R.A. Kloner, and F.J. Schoen, *Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats.* Am J Pathol, 1985. **121**(3): p. 522-30.
68. Klein, H.H., et al., *The mechanism of the tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction.* Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histology, 1981. **393**(3): p. 287-297.
69. Feng, W., et al., *NULISA: a proteomic liquid biopsy platform with attomolar sensitivity and high multiplexing.*
70. Bönner, F., et al., *SYSTEMI - systemic organ communication in STEMI: design and rationale of a cohort study of patients with ST-segment elevation myocardial infarction.* BMC Cardiovasc Disord, 2023. **23**(1): p. 232.

71. dupont, N.C., et al., *Validation and comparison of luminex multiplex cytokine analysis kits with ELISA: determinations of a panel of nine cytokines in clinical sample culture supernatants.* J Reprod Immunol, 2005. **66**(2): p. 175-91.
72. Bio-Techne. *What is a Luminex Assay?* 2025 28.10.2025]; Available from: https://www.rndsystems.com/what-luminex-assay.
73. Pekayvaz, K., et al., *Multiomic analyses uncover immunological signatures in acute and chronic coronary syndromes.* Nat Med, 2024. **30**(6): p. 1696-1710.
74. Anzai, A., S. Ko, and K. Fukuda, *Immune and Inflammatory Networks in Myocardial Infarction: Current Research and Its Potential Implications for the Clinic.* Int J Mol Sci, 2022. **23**(9).
75. Yang, T., et al., *Isolated Perfused Hearts for Cardiovascular Research: An Old Dog with New Tricks.* J Cardiovasc Transl Res, 2024. **17**(5): p. 1207-1217.
76. Lindsey, M.L., et al., *Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2018. **314**(4): p. H812-h838.
77. Chatzigeorgiou, A., et al., *Blocking CD40-TRAF6 signaling is a therapeutic target in obesity-associated insulin resistance.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(7): p. 2686-91.
78. Palrasu, M., et al., *AhR Activation Transcriptionally Induces Anti-Microbial Peptide Alpha-Defensin 1 Leading to Reversal of Gut Microbiota Dysbiosis and Colitis.* Gut Microbes, 2025. **17**(1): p. 2460538.
79. Pioli, K.T., et al., *Lymphopoiesis is attenuated upon hepatocyte-specific deletion of the cytochrome c oxidase assembly factor Sco1.* iScience, 2025. **28**(4): p. 112151.
80. Labiano, S., et al., *Targeting the CD40 costimulatory receptor to improve virotherapy efficacy in diffuse midline gliomas.* Cell Rep Med, 2025. **6**(7): p. 102204.
81. Dmitriev, Y.V., et al., *Cardioprotective properties of dimethyl sulfoxide during global ischemia-reperfusion of isolated rat heart.* Bull Exp Biol Med, 2012. **154**(1): p. 47-50.
82. Kufazvinei, T.T.J., et al., *Emerging opportunities to target inflammation: myocardial infarction and type 2 diabetes.* Cardiovasc Res, 2024. **120**(11): p. 1241-1252.
83. Devaraj, S., et al., *Hyperglycemia induces monocytic release of interleukin-6 via induction of protein kinase c-{alpha} and -{beta}.* Diabetes, 2005. **54**(1): p. 85-91.
84. Belenkova, Y., et al., *Association of inflammatory markers and poor outcome in diabetic patients presenting with ST segment elevation myocardial infarction.* J Inflamm Res, 2015. **8**: p. 107-16.
85. Lamblin, N., et al., *Cardiac remodeling and heart failure after a first anterior myocardial infarction in patients with diabetes mellitus.* J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2012. **13**(6): p. 353-9.
86. Spolski, R., P. Li, and W.J. Leonard, *Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy.* Nat Rev Immunol, 2018. **18**(10): p. 648-659.
87. Zeng, Z., et al., *Interleukin-2/Anti-Interleukin-2 Immune Complex Attenuates Cardiac Remodeling after Myocardial Infarction through Expansion of Regulatory T Cells.* J Immunol Res, 2016. **2016**: p. 8493767.
88. Bouchentouf, M., et al., *Interleukin-2 enhances angiogenesis and preserves cardiac function following myocardial infarction.* Cytokine, 2011. **56**(3): p. 732-738.
89. Sriranjan-Rothwell, R.S., et al., *Anti-inflammatory therapy with low-dose IL-2 in acute coronary syndromes: a randomized phase 2 trial.* Nat Med, 2026. **32**(2): p. 624-632.
90. Lu, D., et al., *IL-4 attenuates myocardial infarction injury by promoting M2 macrophage polarization.* Ann Med Surg (Lond), 2024. **86**(6): p. 3349-3356.
91. Shintani, Y., et al., *IL-4 as a Repurposed Biological Drug for Myocardial Infarction through Augmentation of Reparative Cardiac Macrophages: Proof-of-Concept Data in Mice.* Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 6877.
92. Alvarez-Argote, S., et al., *IL-13 promotes functional recovery after myocardial infarction via direct signaling to macrophages.* JCI Insight, 2024. **9**(2).
93. Antosz, K., et al., *Insight into IL-5 as a Potential Target for the Treatment of Allergic Diseases.* Biomedicines, 2024. **12**(7).

94. Xu, J.Y., et al., *Interleukin-5-induced eosinophil population improves cardiac function after myocardial infarction.* Cardiovasc Res, 2022. **118**(9): p. 2165-2178.
95. Sokolova, R.N., et al., *Association between Type 2 Diabetes, Obesity and Key Immunological Components of IgE-mediated Inflammation.* Folia Med (Plovdiv), 2017. **59**(2): p. 159-164.
96. Hang, H., et al., *Multiplex bead array assay of plasma cytokines in type 2 diabetes mellitus with diabetic retinopathy.* Mol Vis, 2014. **20**: p. 1137-45.
97. Yan, M., et al., *Interleukin-7 aggravates myocardial ischaemia/reperfusion injury by regulating macrophage infiltration and polarization.* J Cell Mol Med, 2021. **25**(21): p. 9939-9952.
98. Carreno, B.M., M. Becker-Hapak, and G.P. Linette, *CD40 regulates human dendritic cell-derived IL-7 production that, in turn, contributes to CD8(+) T-cell antigen-specific expansion.* Immunol Cell Biol, 2009. **87**(2): p. 167-77.
99. Hehenkamp, P., et al., *Interleukin-7-dependent nonclassical monocytes and CD40 expression are affected in children with type 1 diabetes.* Eur J Immunol, 2021. **51**(12): p. 3214-3227.
100. Damås, J.K., et al., *Interleukin-7-mediated inflammation in unstable angina: possible role of chemokines and platelets.* Circulation, 2003. **107**(21): p. 2670-6.
101. Shirakawa, K., et al., *IL (Interleukin)-10-STAT3-Galectin-3 Axis Is Essential for Osteopontin-Producing Reparative Macrophage Polarization After Myocardial Infarction.* Circulation, 2018. **138**(18): p. 2021-2035.
102. Ihim, S.A., et al., *Interleukin-18 cytokine in immunity, inflammation, and autoimmunity: Biological role in induction, regulation, and treatment.* Front Immunol, 2022. **13**: p. 919973.
103. Gerdes, N., et al., *Expression of interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for atherogenesis.* J Exp Med, 2002. **195**(2): p. 245-57.
104. Mallat, Z., et al., *Increased plasma concentrations of interleukin-18 in acute coronary syndromes.* Heart, 2002. **88**(5): p. 467-9.
105. O'Brien, L.C., et al., *Interleukin-18 as a therapeutic target in acute myocardial infarction and heart failure.* Mol Med, 2014. **20**(1): p. 221-9.
106. Mirza, S., et al., *Type 2-diabetes is associated with elevated levels of TNF-alpha, IL-6 and adiponectin and low levels of leptin in a population of Mexican Americans: a cross-sectional study.* Cytokine, 2012. **57**(1): p. 136-42.
107. Esposito, K., et al., *Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress.* Circulation, 2002. **106**(16): p. 2067-72.
108. Gardella, S., et al., *Interleukin-18 synthesis and secretion by dendritic cells are modulated by interaction with antigen-specific T cells.* J Leukoc Biol, 1999. **66**(2): p. 237-41.
109. Hoshino, T., et al., *In vivo administration of IL-18 can induce IgE production through Th2 cytokine induction and up-regulation of CD40 ligand (CD154) expression on CD4+ T cells.* Eur J Immunol, 2000. **30**(7): p. 1998-2006.
110. Karni, A., et al., *IL-18 is linked to raised IFN-gamma in multiple sclerosis and is induced by activated CD4(+) T cells via CD40-CD40 ligand interactions.* J Neuroimmunol, 2002. **125**(1-2): p. 134-40.
111. Sedimbi, S.K., T. Hägglöf, and M.C. Karlsson, *IL-18 in inflammatory and autoimmune disease.* Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(24): p. 4795-808.
112. Herder, C. and M. Roden, *A novel diabetes typology: towards precision diabetology from pathogenesis to treatment.* Diabetologia, 2022. **65**(11): p. 1770-1781.

6 Anhang:

6.1 Analyse interzellulärer Inflammationsproteine nach STEMI mittels NULISAseq

6.1.1 Korrelationsanalysen – vollständige Korrelationsmatrizen

	sCD40	sCD40L	sCD27	IL-2	IL-4	IL-5	IL-7	IL-10	IL-13	IL-18
sCD40		0,361	0,281	-0,243	0,473	-0,448	0,030	-0,320	0,233	0,441
sCD40L	0,186		-0,018	0,003	0,510	-0,439	0,738	0,252	-0,430	0,653
sCD27	0,310	0,949		0,108	0,239	0,091	-0,007	-0,010	-0,082	-0,279
IL-2	0,383	0,993	0,701		0,396	0,422	0,175	-0,030	0,018	0,126
IL-4	0,075	0,052	0,391	0,143		-0,343	0,428	-0,363	0,082	0,437
IL-5	0,094	0,102	0,747	0,117	0,211		-0,119	0,004	0,050	-0,353
IL-7	0,915	0,002	0,981	0,532	0,111	0,674		0,291	-0,270	0,453
IL-10	0,245	0,365	0,972	0,915	0,183	0,989	0,292		-0,439	-0,019
IL-13	0,404	0,110	0,772	0,948	0,771	0,860	0,331	0,102		-0,264
IL-18	0,100	0,008	0,315	0,655	0,104	0,196	0,090	0,948	0,342	

Tabelle 7: Korrelationen zwischen den Plasmakonzentrationsänderungen der untersuchten Inflammationsproteine bei Patienten mit T2D innerhalb des ersten Tages nach STEMI. Dargestellt sind in der oberen rechten Hälfte die Korrelationskoeffizienten r zwischen den Plasmakonzentrationsänderungen von sCD40, sCD40L, sCD27, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-13 und IL-18, in der unteren linken Hälfte die p-Werte der Korrelationskoeffizienten. Farbige Kodierung: dunkelgrün = starke positive Korrelation ($r \geq 0,5$), hellgrün = mäßige positive Korrelation ($0,5 > r \geq 0,3$), hellrot = mäßige negative Korrelation ($-0,5 < r \leq -0,3$), mittelblau = sehr signifikante Korrelation ($p < 0,01$). *(Pearson-Korrelationsanalyse mit two-tailed t-test)*

	CD40	CD40L	CD27	IL-2	IL-4	IL-5	IL-7	IL-10	IL-13	IL-18
CD40		0,583	0,385	0,304	0,212	0,400	0,557	0,049	0,050	0,497
CD40L	0,001		0,128	0,143	0,200	0,053	0,705	0,181	-0,047	0,524
CD27	0,039	0,510		0,525	0,360	0,475	0,373	0,238	0,599	-0,246
IL-2	0,109	0,460	0,003		0,415	0,454	0,501	0,361	0,435	-0,171
IL-4	0,270	0,299	0,055	0,025		0,156	0,361	0,119	0,307	-0,248
IL-5	0,032	0,783	0,009	0,013	0,420		0,104	0,042	0,254	-0,128
IL-7	0,002	<0,001	0,046	0,006	0,054	0,590		0,345	0,153	0,419
IL-10	0,799	0,346	0,213	0,055	0,540	0,829	0,067		0,085	0,028
IL-13	0,795	0,809	0,001	0,018	0,105	0,183	0,428	0,662		-0,412
IL-18	0,006	0,004	0,198	0,376	0,194	0,508	0,024	0,886	0,026	

Tabelle 8: Korrelationen zwischen den Plasmakonzentrationsänderungen der untersuchten Inflammationsproteine bei Patienten ohne T2D innerhalb des ersten Tages nach STEMI. Dargestellt sind in der oberen rechten Hälfte die Korrelationskoeffizienten r zwischen den Plasmakonzentrationsänderungen von sCD40, sCD40L, sCD27, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-13 und IL-18, in der unteren linken Hälfte die p-Werte der Korrelationskoeffizienten. Farbige Kodierung: dunkelgrün = starke positive Korrelation ($r \geq 0,5$), hellgrün = mäßige positive Korrelation ($0,5 > r \geq 0,3$), hellrot = mäßige negative Korrelation ($-0,5 < r \leq -0,3$), hellblau = signifikante Korrelation ($p < 0,05$), mittelblau = hoch signifikante Korrelation ($p < 0,01$), dunkelblau = sehr hoch signifikante Korrelation ($p < 0,001$). *(Pearson-Korrelationsanalyse mit two-tailed t-test)*

6.2 Analyse interzellulärer Inflammationsproteine nach STEMI mittels Luminex

6.2.1 Auswertung der Plasmakonzentrationen – nicht-signifikant

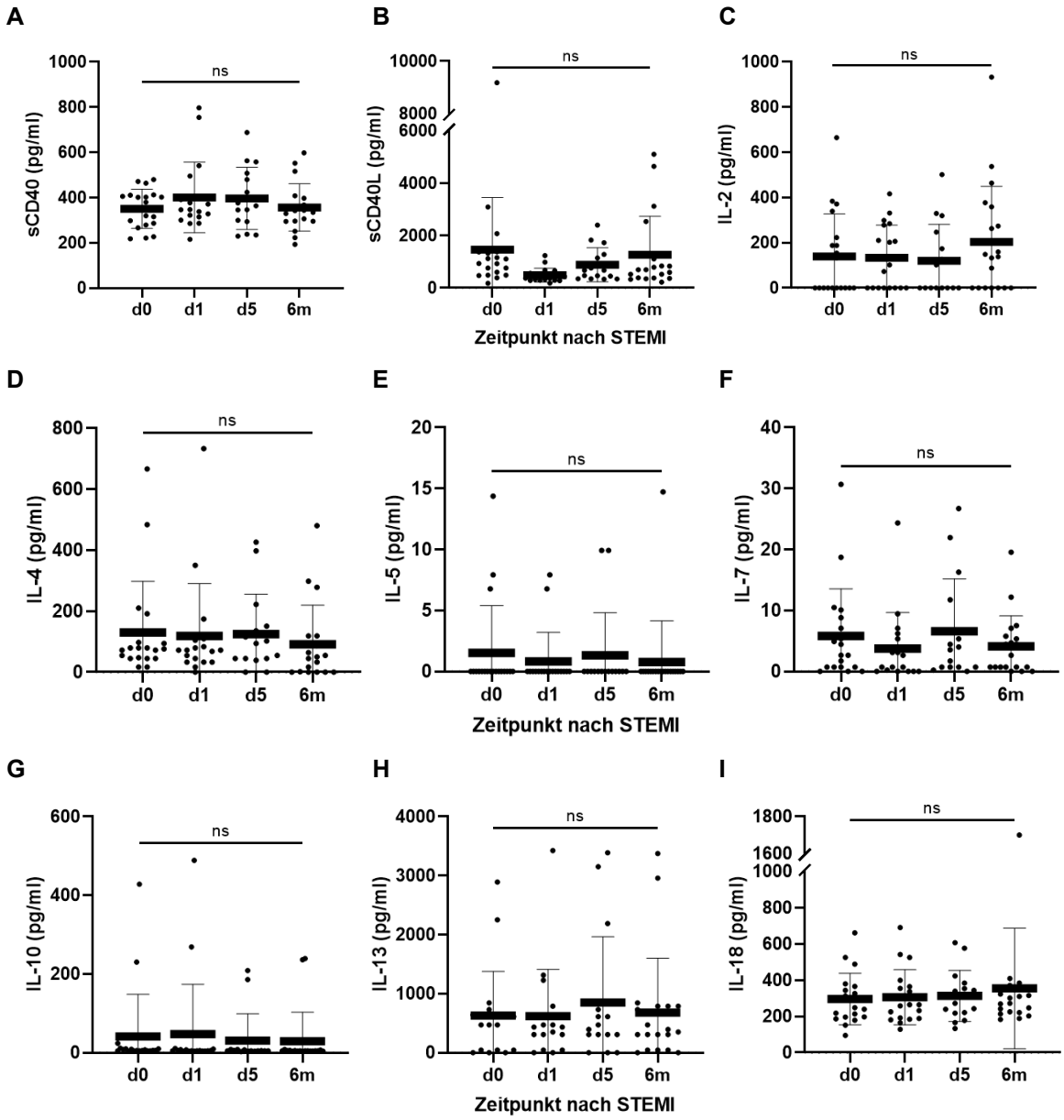


Abb. 41: Nicht-signifikante Verläufe der Inflammationsprotein-Plasmakonzentrationen innerhalb der ersten 6 Monate nach STEMI. Darstellung der Plasmakonzentrationen von sCD40 (A), sCD40L (B), IL-2 (C), IL-4 (D), IL-5 (E), IL-7 (F), IL-10 (G), IL-13 (H) und IL-18 (I) in pg/ml zu Zeitpunkt d0, d1, d5 und 6m nach STEMI. Datenpunkte: Mittelwert + SD, individuelle Werte für n = 19 (d0), 18 (d1), 15 (d5) bzw. 19 (6m); ns = p ≥ 0,05 (*Mixed-effects analysis, Tukey's multiple comparisons test*).

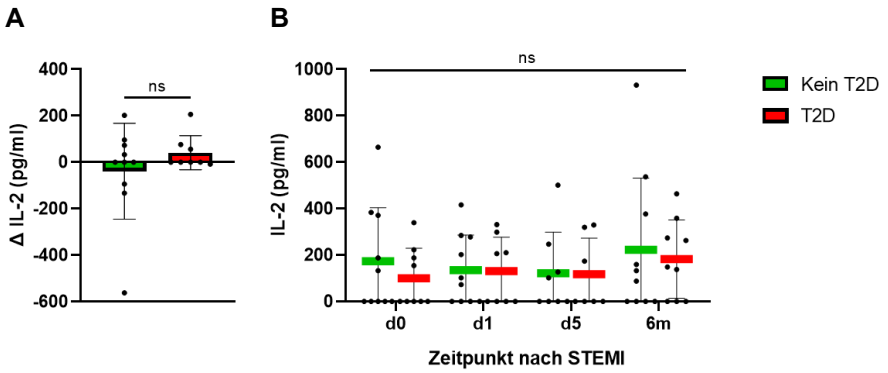


Abb. 42: Verlauf der IL-2-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit/ohne T2D nach STEMI. (**A**) Differenz der IL-2-Plasmakonzentrationen in pg/ml zwischen Zeitpunkt d0 und d1 bei Patienten mit/ohne T2D. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, individuelle Werte für n = 10 (kein T2D); n = 8 (T2D); ns = p ≥ 0,05 (*Mann-Whitney test*). (**B**) IL-2-Plasmakonzentrationen in pg/ml zu Zeitpunkt d0, d1, d5 und 6m bei Patienten mit/ohne T2D. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, individuelle Werte für n = 10 (kein T2D d0, kein T2D d1; kein T2D 6m); n = 9 (T2D d0, T2D 6m); n = 8 (kein T2D d5, T2D d1); n = 7 (T2D d5); ns = p ≥ 0,05 (*Mixed-effects analysis, Sidak's multiple comparisons test*).

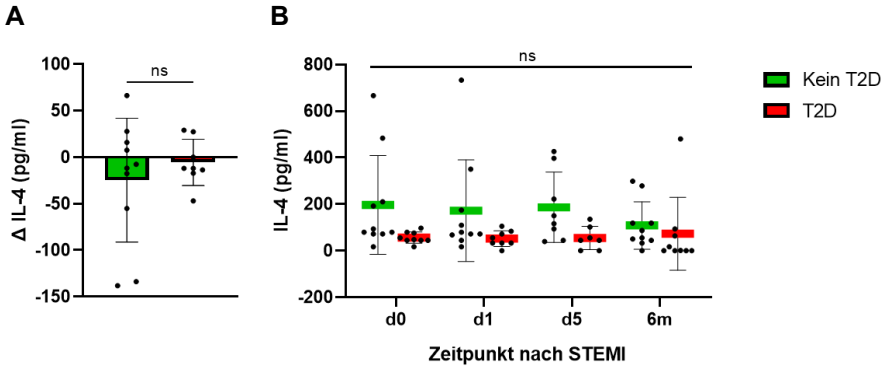


Abb. 43: Verlauf der IL-4-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit/ohne T2D nach STEMI. (**A**) Differenz der IL-4-Plasmakonzentrationen in pg/ml zwischen Zeitpunkt d0 und d1 bei Patienten mit/ohne T2D. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, individuelle Werte für n = 10 (kein T2D); n = 8 (T2D); ns = p ≥ 0,05 (*Mann-Whitney test*). (**B**) IL-4-Plasmakonzentrationen in pg/ml zu Zeitpunkt d0, d1, d5 und 6m bei Patienten mit/ohne T2D. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, individuelle Werte für n = 10 (kein T2D d0, kein T2D d1; kein T2D 6m); n = 9 (T2D d0, T2D 6m); n = 8 (kein T2D d5, T2D d1); n = 7 (T2D d5); ns = p ≥ 0,05 (*Mixed-effects analysis, Sidak's multiple comparisons test*).

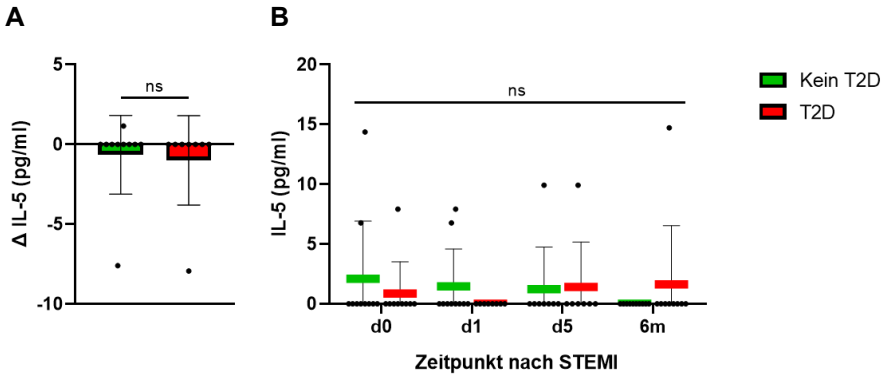


Abb. 44:**Verlauf der IL-5-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit/ohne T2D nach STEMI.** (**A**) Differenz der IL-5-Plasmakonzentrationen in pg/ml zwischen Zeitpunkt d0 und d1 bei Patienten mit/ohne T2D. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, individuelle Werte für n = 10 (kein T2D); n = 8 (T2D); ns = p ≥ 0,05 (*Mann-Whitney test*). (**B**) IL-5-Plasmakonzentrationen in pg/ml zu Zeitpunkt d0, d1, d5 und 6m bei Patienten mit/ohne T2D. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, individuelle Werte für n = 10 (kein T2D d0, kein T2D d1; kein T2D 6m); n = 9 (T2D d0, T2D 6m); n = 8 (kein T2D d5, T2D d1); n = 7 (T2D d5); ns = p ≥ 0,05 (*Mixed-effects analysis, Sidak's multiple comparisons test*).

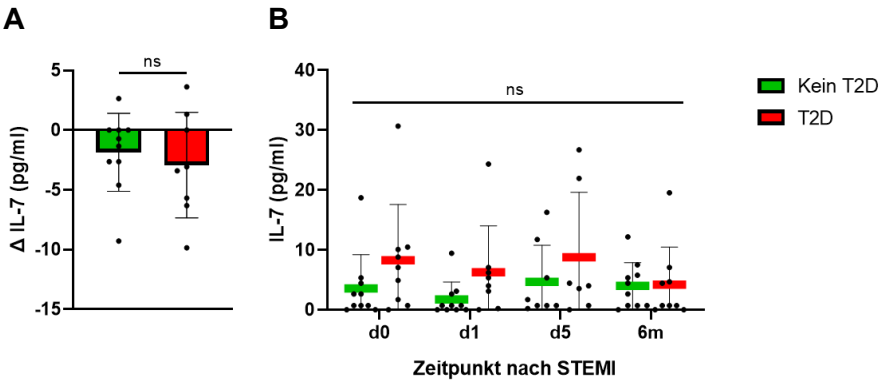


Abb. 45: Verlauf der IL-7-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit/ohne T2D nach STEMI. (**A**) Differenz der IL-7-Plasmakonzentrationen in pg/ml zwischen Zeitpunkt d0 und d1 bei Patienten mit/ohne T2D. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, individuelle Werte für n = 10 (kein T2D); n = 8 (T2D); ns = p ≥ 0,05 (*Mann-Whitney test*). (**B**) IL-7-Plasmakonzentrationen in pg/ml zu Zeitpunkt d0, d1, d5 und 6m bei Patienten mit/ohne T2D. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, individuelle Werte für n = 10 (kein T2D d0, kein T2D d1; kein T2D 6m); n = 9 (T2D d0, T2D 6m); n = 8 (kein T2D d5, T2D d1); n = 7 (T2D d5); ns = p ≥ 0,05 (*Mixed-effects analysis, Sidak's multiple comparisons test*).

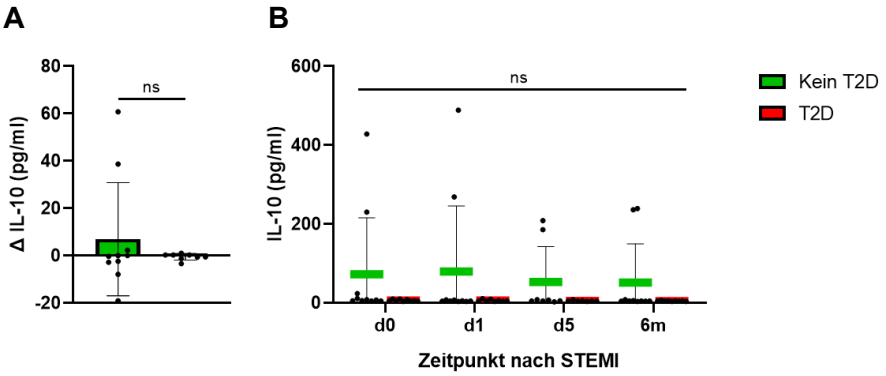


Abb. 46: Verlauf der IL-10-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit/ohne T2D nach STEMI. (**A**) Differenz der IL-10-Plasmakonzentrationen in pg/ml zwischen Zeitpunkt d0 und d1 bei Patienten mit/ohne T2D. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, individuelle Werte für n = 10 (kein T2D); n = 8 (T2D); ns = p ≥ 0,05 (*Mann-Whitney test*). (**B**) IL-10-Plasmakonzentrationen in pg/ml zu Zeitpunkt d0, d1, d5 und 6m bei Patienten mit/ohne T2D. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, individuelle Werte für n = 10 (kein T2D d0, kein T2D d1; kein T2D 6m); n = 9 (T2D d0, T2D 6m); n = 8 (kein T2D d5, T2D d1); n = 7 (T2D d5); ns = p ≥ 0,05 (*Mixed-effects analysis, Sidak's multiple comparisons test*).

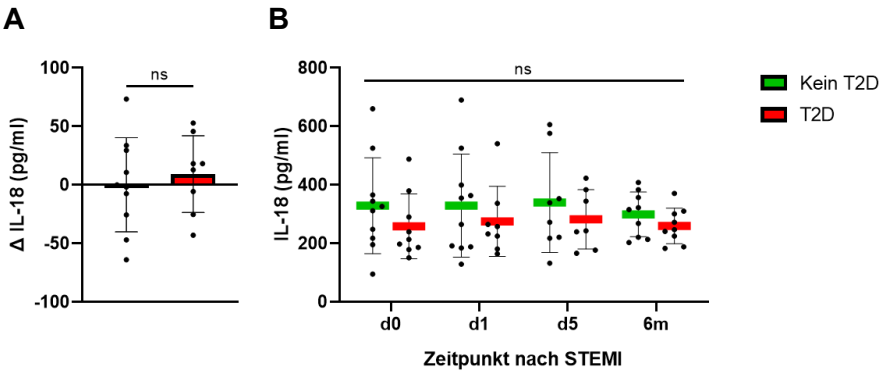


Abb. 47: Verlauf der IL-18-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit/ohne T2D nach STEMI. (**A**) Differenz der IL-18-Plasmakonzentrationen in pg/ml zwischen Zeitpunkt d0 und d1 bei Patienten mit/ohne T2D. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, individuelle Werte für n = 10 (kein T2D); n = 8 (T2D); ns = p ≥ 0,05 (*Mann-Whitney test*). (**B**) IL-18-Plasmakonzentrationen in pg/ml zu Zeitpunkt d0, d1, d5 und 6m bei Patienten mit/ohne T2D. Datenpunkte: Mittelwert ± SD, individuelle Werte für n = 10 (kein T2D d0, kein T2D d1; kein T2D 6m); n = 9 (T2D d0, T2D 6m); n = 8 (kein T2D d5, T2D d1); n = 7 (T2D d5); ns = p ≥ 0,05 (*Mixed-effects analysis, Sidak's multiple comparisons test*).

6.2.2 Korrelationsanalysen – vollständige Korrelationsmatrizen

	sCD40	sCD40L	sCD27	IL-2	IL-4	IL-5	IL-7	IL-10	IL-13	IL-18
sCD40		0,039	0,469	0,146	0,274	0,524	0,163	-0,382	-0,416	0,763
sCD40L	0,927		-0,680	0,283	-0,588	-0,165	0,633	-0,245	-0,609	-0,159
sCD27	0,241	0,064		-0,042	0,514	0,689	-0,048	-0,029	0,444	0,635
IL-2	0,730	0,497	0,922		-0,108	0,227	0,414	-0,826	0,332	-0,038
IL-4	0,511	0,125	0,193	0,799		0,188	-0,033	0,354	0,313	0,422
IL-5	0,183	0,697	0,059	0,589	0,656		0,310	-0,230	0,207	0,643
IL-7	0,699	0,092	0,911	0,308	0,939	0,455		-0,143	-0,097	0,299
IL-10	0,351	0,558	0,946	0,011	0,390	0,584	0,735		-0,039	-0,132
IL-13	0,305	0,109	0,271	0,422	0,450	0,623	0,819	0,928		-0,205
IL-18	0,028	0,706	0,091	0,929	0,298	0,086	0,473	0,756	0,626	

Tabelle 9: Korrelationen zwischen den Plasmakonzentrationsänderungen der untersuchten Inflammationsproteine bei Patienten mit T2D innerhalb des ersten Tages nach STEMI. Dargestellt sind in der oberen rechten Hälfte die Korrelationskoeffizienten r zwischen den Plasmakonzentrationsänderungen von sCD40, sCD40L, sCD27, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-13 und IL-18, in der unteren linken Hälfte die p-Werte der Korrelationskoeffizienten. Farbige Kodierung: dunkelgrün = starke positive Korrelation ($r \geq 0,5$), hellgrün = mäßige positive Korrelation ($0,5 > r \geq 0,3$), dunkelrot = starke negative Korrelation ($r \leq -0,5$), hellrot = mäßige negative Korrelation ($-0,5 < r \leq -0,3$), hellblau = signifikante Korrelation ($p < 0,05$). *(Pearson-Korrelationsanalyse mit two-tailed t-test)*

	sCD40	sCD40L	sCD27	IL-2	IL-4	IL-5	IL-7	IL-10	IL-13	IL-18
sCD40		0,228	0,317	-0,590	-0,151	0,092	0,250	-0,099	0,722	0,485
sCD40L	0,527		0,301	0,184	0,844	-0,174	0,814	0,178	0,220	-0,388
sCD27	0,373	0,398		0,350	0,235	0,119	0,424	-0,024	-0,056	-0,116
IL-2	0,073	0,611	0,322		0,396	-0,084	0,047	0,008	-0,349	-0,567
IL-4	0,677	0,002	0,514	0,258		-0,156	0,836	0,352	-0,084	-0,578
IL-5	0,801	0,630	0,744	0,818	0,668		-0,110	0,339	0,157	-0,047
IL-7	0,486	0,004	0,222	0,897	0,003	0,762		0,059	0,087	-0,226
IL-10	0,786	0,623	0,948	0,983	0,318	0,338	0,871		-0,069	-0,414
IL-13	0,018	0,542	0,878	0,323	0,818	0,666	0,812	0,850		0,363
IL-18	0,156	0,268	0,750	0,087	0,080	0,898	0,530	0,234	0,303	

Tabelle 10: Korrelationen zwischen den Plasmakonzentrationsänderungen der untersuchten Inflammationsproteine bei Patienten ohne T2D innerhalb des ersten Tages nach STEMI. Dargestellt sind in der oberen rechten Hälfte die Korrelationskoeffizienten r zwischen den Plasmakonzentrationsänderungen von sCD40, sCD40L, sCD27, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-13 und IL-18, in der unteren linken Hälfte die p-Werte der Korrelationskoeffizienten. Farbige Kodierung: dunkelgrün = starke positive Korrelation ($r \geq 0,5$), hellgrün = mäßige positive Korrelation ($0,5 > r \geq 0,3$), dunkelrot = starke negative Korrelation ($r \leq -0,5$), hellrot = mäßige negative Korrelation ($-0,5 < r \leq -0,3$), hellblau = signifikante Korrelation ($p < 0,05$), mittelblau = hoch signifikante Korrelation ($p < 0,01$). *(Pearson-Korrelationsanalyse mit two-tailed t-test)*

Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Norbert Gerdes, bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe zu absolvieren und er während der gesamten Promotionsdauer ein verlässlicher, motivierender und sehr geduldiger Ansprechpartner für mich war.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeiter*innen der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie bedanken, die mich während der Zeit meiner Promotion unterstützt haben. Namentlich hervorheben möchte ich besonders Frau Dr. Susanne Pfeiler, Herrn Dr. Sven Witkowski, Frau Stefanie Becher, Herrn Dr. Alexander Lang und Frau M.Sc. Christin Elster.

Besonderer Dank gilt meinen Freunden, meiner Familie und insbesondere meinem Vater für die unermüdliche Unterstützung, ohne die ich diese Arbeit niemals abgeschlossen hätte.