

Aus der  
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin III  
(Schwerpunkt: Kardiologie und Angiologie)

**Interaktion von TGF-beta 1 und der SDF-1/CXCR4/CXCR7  
Achse auf menschlichen Thrombozyten**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Kuska, geb. Holtkamp, Annabell**

**2020**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter Professor Dr. T. Geisler  
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. U. Holzer

Tag der Disputation: 05.03.2020

Teile der vorgelegten Arbeit wurden veröffentlicht :

Rath D, Chatterjee M, Holtkamp A, Tekath N, Borst O, Vogel S, Müller K, Gawaz M, Geisler T. Evidence of an interaction between TGF- $\beta$ 1 and the SDF-1/CXCR4/CXCR7 axis in human platelets. *Thromb Res.* 2016 Aug;144:79-84.

| <b>Gliederung</b>   | <b>Seite</b> |
|---|--------------|
| Abkürzungen .....   | 6            |
| 1. Einleitung .....                                       | 9            |
| 1.1 Koronare Herzerkrankung .....                         | 9            |
| 1.2 Thrombozyten .....                                    | 12           |
| 1.2.1 Struktur .....                                      | 12           |
| 1.2.2 Funktion .....                                      | 14           |
| 1.3 TGF-beta 1 .....                                      | 16           |
| 1.3.1 Struktur .....                                      | 17           |
| 1.3.2 Funktion .....                                      | 17           |
| 1.3.3 Regulation .....                                    | 19           |
| 1.3.4 Synthese und Aktivierung .....                      | 19           |
| 1.3.5 TGF-beta Rezeptoren .....                           | 19           |
| 1.4 SDF-1/CXCR4/CXCR7 Signalweg .....                     | 22           |
| 1.4.1 SDF-1 .....   | 22           |
| 1.4.2 Struktur .....                                      | 22           |
| 1.4.3 Funktion .....                                      | 23           |
| 1.4.4 Regulation .....                                    | 24           |
| 1.4.5 Rezeptoren .....                                    | 24           |
| 1.4.5.1 CXCR4 .....                                       | 24           |
| 1.4.5.2 CXCR7 .....                                       | 27           |
| 1.4.5.3 CXCR4 und CXCR7 Rezeptoren auf Thrombozyten ..... | 29           |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 1.5    | Interaktion zwischen TGF-beta1<br>und SDF-1/CXCR4/CXCR7 Signalweg .....                                    | 29 |
| 2.     | Fragestellung .....  | 33 |
| 3.     | Material und Methode .....   | 34 |
| 3.1    | Patienten .....  | 34 |
| 3.2    | Gesunde Probanden .....  | 36 |
| 3.3    | Messungen .....  | 37 |
| 3.3.1. | Durchflusszytometrische Messung der SDF-1, TGF-beta1,<br>CXCR4 und CXCR7 Expression auf Thrombozyten. .... | 37 |
| 3.3.2. | Stimulation mit TGF-beta1, SDF-1 und Blockade mit<br>Anti-CXCR4 und Anti-CXCR7 .....                       | 38 |
| 3.3    | Statistik .....  | 39 |
| 4.     | Ergebnisse .....   | 40 |
| 4.1    | Korrelation der Expression von TGF-beta1<br>mit SDF-1, CXCR4 und CXCR7 .....                               | 40 |
| 4.2    | Stimulation der thrombozytären TGF-beta1 Expression<br>durch SDF-1 in vitro .....                          | 42 |
| 4.3    | Blockade der SDF-1 induzierten TGF Expression<br>durch Anti-CXCR4 und Anti-CXCR7 .....                     | 42 |
| 4.4    | Fehlender Effekt von TGF-beta1 auf die Expression<br>von SDF-1, CXCR4 und CXCR7 .....                      | 44 |
| 5.     | Diskussion .....   | 46 |
| 6.     | Zusammenfassung .....  | 53 |
| 7.     | Danksagung .....   | 54 |
| 8.     | Literaturverzeichnis .....   | 55 |

## Verzeichnis der Abkürzungen

|                  |   |
|------------------|---|
| ACS              | Akutes Koronarsyndrom                     |
| ADP              | Adenosindiphosphat                        |
| AKT              | Proteinkinase B                           |
| AMH              | Anti muellerian hormone                   |
| BMP              | Bone morphogemnetic protein               |
| c-Kit+           | Tyrosinkinase KIT                         |
| Ca <sup>++</sup> | Calciumion                                |
| cAbl             | Tyrosinkinase ABL1                        |
| CD34             | Cluster of differentiation antigen 34     |
| CI               | Konfidenzintervall                        |
| CPDA             | Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin           |
| CXCL11           | C-X-C motif chemokine 11                  |
| CXCL14           | C-X-C motif chemokine 14                  |
| CXCR4            | CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4              |
| CXCR7            | CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 7              |
| ECM              | Extrazelluläre Matrix                     |
| EGF              | Epidermal growth factor                   |
| EPC              | Endotheliale Progenitorzellen             |
| ERK1/2           | Extracellular-signal regulated kinase 1/2 |
| FACS             | Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung     |
| FoxO3a           | Forkhead-Box-Protein O3                   |
| G-Protein        | Guanosintriphosphat-bindendes Protein     |
| GDF              | Growth differentiation factors            |

|                |   |
|----------------|---|
| GDNF           | Glial derived neurotrophic growth factor          |
| GPCR-Kinase    | $\beta$ -Adrenorezeptor-Kinase                    |
| GPIIb/IIIa     | Glykoprotein-2b/3a                                |
| GRK            | G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase               |
| IP3            | Inositoltrisphosphat                              |
| I-TAC          | Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant |
| JAK            | Januskinase                                       |
| JNK            | c-Jun N-terminale Kinase                          |
| KHK            | Koronare Herzerkrankung                           |
| LAPs           | Latency associated proteins                       |
| LDL            | Low density protein                               |
| LLC            | Large latent complex                              |
| LTBP           | Latentes TGF-beta binding protein                 |
| LVEF           | Linksventriculäre Ejektionsfraktion               |
| Maus-IgG1-FITC | Maus-IgG1 isotype control                         |
| Maus-IgG2b-PE  | Mouse IgG2b kappa isotype control                 |
| MFT            | Mitochondrialer Folattransporter                  |
| MFI            | Mediane Fluoreszenzintensität                     |
| MIF            | Macrophagenmigration inhibierender Factor         |
| MSC            | Mesenchymale Stammzellen                          |
| miRNA          | Micro RNA   |
| mRNA           | Messenger RNA                                     |
| mTOR           | Mechanistic Target of Rapamycin                   |
| PBS            | Phospat-gepufferte Kochsalzlösung                 |

|              |   |
|--------------|---|
| PI3K         | Phosphoinositid-3-Kinasen                                 |
| PKA          | Proteinkinase A   |
| PLC          | Phospholipase C   |
| PRP          | Plättchenreiches Plasma                                   |
| RAS          | Rattensarkom Protoonkogen                                 |
| RF/6A Zellen | Choroid-retinale Endothelzellen                           |
| SARA         | Smad anchor for receptor activation                       |
| SAP/JNK      | Stressaktivierte Proteinkinasen/C-Jun-N-terminale Kinasen |
| SDF-1        | Stromal-cell-derived-factor-1                             |
| SEM          | Standard error of mean                                    |
| SLC          | Small latent complex                                      |
| SMAD         | Mother against decapentaplegic homolog                    |
| SPSS         | Statistical Package for the Social Sciences               |
| STAT         | Aktivator of transscription                               |
| TAK1         | Transforming growth factor beta-aktivierte Kinase 1       |
| TGF-beta     | Transforming growth factor-beta                           |
| TGF-beta-R   | TGF-beta-Rezeptor   |
| TRAP         | Thrombin-Rezeptor-Agonist-Peptid                          |

## **1. Einleitung**

### *1.1 Koronare Herzerkrankung*

Die Koronare Herzerkrankung (KHK) ist eine der häufigsten Erkrankungen der westlichen Welt. Nach dem Gesundheitsbericht des Bundes 2012 leiden in Deutschland 7,8 % aller Menschen an einer KHK; in 50 % der Fälle ist ein akuter Herzinfarkt das Primärsymptom dieser Erkrankung. Obwohl die Mortalitätsraten in den letzten Jahren gesunken sind, ist die KHK mit 17 % weiterhin die häufigste Todesursache in Deutschland. Eine koronare Herzerkrankung wird mit Abstand am häufigsten durch eine arteriosklerotisch bedingte Einengung der Gefäße verursacht, seltener durch Koronarspasmen, Vasculitiden, kardiale Thrombosen oder Embolien, eine Myokardhypertrophie oder eine Anämie (1).

Die Arteriosklerose ist der Folgezustand von Veränderungen an der Gefäßintima, die letztlich zur Ausbildung eines lumenobstruierenden arteriosklerotischen Plaque führen. Die Entstehung eines arteriosklerotischen Plaque ist ein chronisch fortschreitender, in Schüben verlaufender Prozess. Makrophagen in der Gefäßintima nehmen LDL aus der Zirkulation auf und wandeln sich zu Schaumzellen um. Die zugrundegegangenen Schaumzellen lagern sich herdförmig zwischen Intima und Media der Gefäßwand ab. Es wird eine chronische Entzündungsreaktion ausgelöst, die mit einem langsamen Umbau des betroffenen Endothelabschnitts einhergeht (2). Unter dem Einfluß von Zytokinen kommt es zu einer Proliferation und Migration von glatten

Muskelzellen und Fibroblasten aus der Media in die Intima der Gefäße. Es resultiert ein in das Gefäßlumen hineinragendes arteriosklerotisches Plaque, das aus einem weichen Kern mit großen Mengen von Lipiden und einer bindegewebigen Kappe besteht. Die Entstehung und das Fortschreiten der Arteriosklerose wird durch zahlreiche Risikofaktoren begünstigt (1).

Eine passagere Koronarischaemie führt infolge des Austritts von Kalium und Phosphat aus der Myocardzelle mit Absinken des pH-Wertes funktionell zur einer reversiblen Steifigkeit des Herzmuskels mit Einschränkung der myokardialen Pumpfunktion (Hibernation) (3). Eine chronische koronare Minderdurchblutung löst Adaptationsvorgänge im Myocard aus (Prä-konditionierung), die zu einem begrenzten Schutz vor erneuten Ischaemien führen. (4) Eine langandauernde lokale Hypoxie bei schwerer koronarsklerose kann zur Ausbildung von Kollateralgefäßen führen, begünstigt langfristig jedoch eine Myocardhypertrophie, welche die Ischaemie verstärkt und zu einer Funktionseinschränkung des Myocards führt (Remodeling) (5) .

Ein akuter, meist kompletter Verschuß eines Koronargefäßes löst ein akutes Koronarsyndrom (ACS) aus. Das Leitsymptom ist ein persistierender Schmerz im vorwiegend linken Thoraxbereich oder Rücken, der in die Schulterregion, Arme Unterkiefer oder Oberbauch ausstrahlen kann. In den weitaus meisten Fällen liegt dem ACS eine akute Thrombose einer Koronararterie zugrunde, die durch ein rupturiertes oder erodiertes arteriosklerotisches Plaque verursacht ist (6),(7). In selteneren Fällen kann ein akuter Koronarverschuß auch bei

Vaskulitiden, Kokainmissbrauch, Thromboembolien, durch Gefäßverletzungen im Rahmen einer Koronarangiographie oder durch einen Koronarspasmus ausgelöst werden (8). Der Einriss der Deckmembran des Plaque führt zur schlagartigen Freisetzung thrombogener Substanzen aus der Gefäßwand, die zur lokalen Aktivierung der Thrombozyten mit deren Konformationsänderung und Aggregation auf dem betroffenen Plaque mit Ausbildung eines Thrombus führt. Wird das Gefäß nicht wieder eröffnet, führt der Koronarverschluss zu einer irreversiblen Nekrose der nachgeschalteten Myocardanteile. Etwa ein Drittel der Patienten versterben im Rahmen eines akuten Herzinfarktes. Todesursachen sind Herzrhythmusstörungen, wie Asystolie oder Kammerflimmern, oder ein myokardiales Pumpversagen infolge der Infarktgröße, eine akute Mitralinsuffizienz nach Papillarmuskelabriss oder eine Herzwandruptur mit Pericardtamponade. Durch die in den letzten Jahrzehnten entwickelten Therapieverfahren, insbesondere die frühzeitige Reperfusionstherapie mittels primärer percutaner Koronarintervention und Thrombolyse sowie die Intensivüberwachung mit Akutbehandlung von Herzrhythmusstörungen und medikamentöser Therapie, ist die Wahrscheinlichkeit, an einem akuten Herzinfarkt zu versterben, in Deutschland seit über 10 Jahren kontinuierlich rückläufig (1). Das Ziel der Reperusionsbehandlung besteht darin, durch eine möglichst rasche Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes das Infarktareal möglichst klein zu halten. Bereits sehr früh im Rahmen des Infarktgeschehens kommt es zum Einsetzen von Heilungsvorgängen, welche die Adhäsion von zirkulierenden Stammzellen, die Aktivierung und Proliferation von Fibroblasten und Epithelzellen, die Neoangiogenese und die Narbenbildung

umfassen (9). Hierbei kommt den Thrombozyten insbesondere in der Frühphase des akuten Myokardinfarktes eine Schlüsselrolle zu.

## *1.2 Thrombozyten*

### 1.2.1 Struktur

Thrombozyten sind mit einem Durchmesser von 2 bis 4  $\mu\text{m}$  und einem Zellvolumen von 6-11 fl die kleinsten zellulären Bestandteile des Bluts. Pro Tag werden etwa  $1 \times 10^{11}$  Thrombozyten nachgebildet, der Normalbereich liegt zwischen 150.000 und 450.000 /  $\mu\text{l}$  Blut. Ihre durchschnittliche Überlebenszeit beträgt ca. 10 Tage, Abbauort sind Milz und Leber. Etwa 40% aller Thrombozyten sind reversibel in der Milz gespeichert (10). Die in der Zirkulation befindlichen Thrombozyten wandern zum Teil am Endothel der Gefäßwand entlang, ohne mit ihr unter normalen Bedingungen zu interferieren. Thrombozyten besitzen keinen Zellkern sondern entstehen durch Abschnürungen von Zytoplasma aus ihren Vorläuferzellen, den Megakaryozyten im Knochenmark. Thrombozyten enthalten Ribosomen, ein endoplasmatisches Retikulum, intrazytoplasmatische Granula (alpha-Granula, elektronendichte Granula und Lysosomen) und ein Zytoskelett (11), (12). Insbesondere die Granula enthält zahlreiche plättchenspezifische Signalstoffe. Thrombozyten sind zur Proteinbiosynthese befähigt, obwohl sie aufgrund des fehlenden Zellkerns keine Transskription von DNA in RNA betreiben können. Sie sind jedoch mit funktionstüchtiger messenger RNA aus ihren Vorläuferzellen ausgestattet (13). Die Proteinbiosynthese der Thrombozyten erfolgt also auf

translationalen Ebene. Damit umgehen Thrombozyten die Transkription und können so direkt die Proteinsynthese aktivieren und sehr schnell auf äußere Einflüsse reagieren. Thrombozyten enthalten zwar nur eine geringe Menge mRNA, diese weist jedoch eine deutlich höhere Stabilität und längere Halbwertszeit als die mRNA eukaryoter Zellen auf, was die fehlende Möglichkeit einer Neubildung im Zellkern ausgleicht.

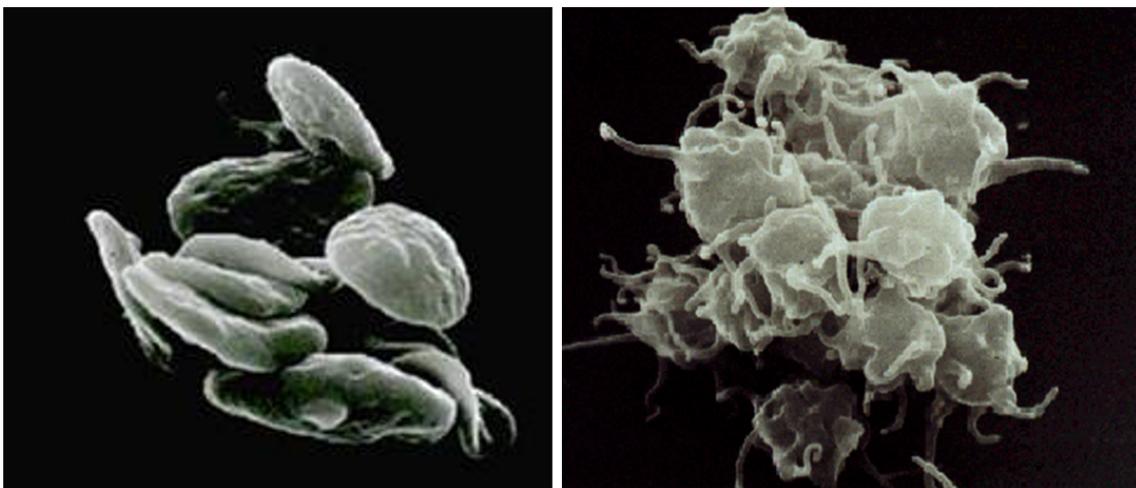


Abb.1 : ruhende (links) und aktivierte (rechts) Thrombozyten  
<https://blood.ca/en/blog/2016-09/shining-light-platelet-quality?pedisable=true>

Die Translation der mRNA in Thrombozyten wird durch miRNAs (micro RNA) reguliert (14). MicroRNAs sind kleine nichtcodierende RNA Abschnitte im Zytoplasma, die an die mRNA binden und deren Translation blockieren, seltener auch induzieren können. In Thrombozyten scheinen sie eine Schlüsselrolle in der Regulation der thrombozytären Proteinsynthese zu spielen.

### 1.2.2 Funktion

Thrombozyten weisen zwei Hauptfunktionen auf : die Blutstillung und die Einleitung und Förderung der Wundheilungsvorgänge. Damit Thrombozyten ihre Funktion ausüben können, ist eine Aktivierung notwendig (Abb.1). Kommt es zur Verletzung des Gefäßendothels werden Signalwege ausgelöst, die zu einem Anhaften der Thrombozyten am defekten Epithel führen. Durch ihren Membranrezeptor Glycoprotein IIb/IIIa, Fibronectin und weitere Membranrezeptoren haften sie trotz der Scherkräfte der Blutzirkulation unter Vermittlung des von-Willebrand-Faktors am Kollagen der freigelegten subendothelialen Matrix (15). Glycoprotein VI und  $\alpha 2\beta 1$  verstärken die Bindung zwischen Thrombozyt und Kollagen. Die Bindung löst eine Kaskade von intrazellulären Signalwegen aus, die zu einer Erhöhung von freien  $Ca^{++}$ -Ionen im Intrazellularraum der Thrombozyten führen , was eine Konformationsänderung der Thrombozytenstruktur mit Vergrößerung der Oberfläche durch Ausbildung von Zellfortsätzen auslöst (16). Die so aktivierten Thrombozyten aggregieren miteinander. An der Oberfläche des Thrombozyten werden GPIIb/IIIa Rezeptoren exprimiert, die an Integrine insbesondere  $\alpha IIb\beta 3$  binden (17), was wiederum die Bildung von Fibrinogen bewirkt und zur Stabilisierung des Thrombus führt (15). Neben der Konformationsänderung entleeren die aktivierten Thrombozyten durch Exocytose ihre Granula in den Extrazellulär-raum. Die Signalstoffe werden im Microenvironment freigesetzt, aktivieren weiter die Blutgerinnung, Zelladhäsion und Aggregation und lösen eine Entzündungsreaktion aus, die unter anderem die Chemotaxis und

Zellproliferation fördert und den ersten Schritt für die Wundheilung und Gefäßneubildung darstellt (9). Die Signalstoffe bewirken die Adhäsion und Proliferation von hämatopoetischen Zellen und Lymphozyten, die Anlagerung von Stammzellen, Aktivierung von Fibroblasten, Proliferation von Epithelzellen, die Neoangiogenese und schließlich die Ausbildung einer extrazellulären Matrix (9). Thrombozyten sind also neben ihrer Bedeutung für die Blutgerinnung die Wegbereiter der wenig später einsetzenden Wundheilung.

Neben ihrer Aktivierung bei Endothelverletzungen können Thrombozyten auch durch andere, im einzelnen noch nicht genau bekannte, Signalwege aktiviert und zu Thrombosen bei intaktem Epithel führen. Bei Patienten mit KHK befinden sich die zirkulierenden Thrombozyten in einem Zustand der „Präaktivierung“. Sondermeijer wies bei Patienten mit stabiler KHK im Vergleich zu gesunden Patienten ein unterschiedliches Expressionsmuster thrombozytärer miRNA nach (18). Bei Patienten mit ischaemischen Ereignissen, wie einem akuten Koronarsyndrom, wurden erhöhte TGF-beta 1 und erhöhte SDF-1 Spiegel auf zirkulierenden Thrombozyten nachgewiesen (19),(20). Insbesondere SDF-1 und TGF-beta 1 sind die zentralen Vermittler der thrombozytären Wirkungen. In dieser Doktorarbeit wird die Expression der beiden Signalmoleküle TGF-beta1 und SDF-1 sowie dessen Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 auf Thrombozyten von Patienten mit Koronarer Herzerkrankung und eine mögliche Interaktionen beider Signalwege bei Gesunden untersucht. Im Folgenden werden daher zunächst die TGF-1 und SDF-1 Signalwege näher beschrieben.

### 1.3 TGF-beta 1

Als Transformierende Wachstumsfaktoren (TGF) bezeichnet man eine Gruppe von biologisch aktiven Zytokinen, die neben ihrer zentralen Bedeutung in der Embryogenese im adulten Organismus eine Vielzahl von physiologischen Prozessen auf zellulärer Ebene regulieren. Nachdem TGFs zunächst als Faktoren identifiziert wurden, die das Wachstum und die Kontaktinhibition von kultivierten Fibroblasten steuern (21), hat man in den letzten Jahrzehnten zahlreiche komplexe Wirkungen auf Zellwachstum und -differenzierung, Adhäsivität, Apoptose und Angiogenese nachweisen können. Diese Vorgänge sind physiologischerweise insbesondere bei der Wundheilung, Geweberegeneration und Regulation von Immunfunktionen wichtig (22), können aber auch bei der malignen Transformation von Geweben und der Propagation von malignen Tumoren eine Rolle spielen (23).

Es werden derzeit 2 Gruppen von TGF unterschieden : Die TGF-alpha und TGF-beta Superfamilie. Die TGF-beta Superfamilie umfasst wiederum über 30 strukturell ähnliche Zytokine (23). Zu diesen zählen u.a. BMPs (bone morphogenetic proteins), die wiederum eine eigene Familie bilden, GDFs (growth differentiation factors), GDNF (glial derived neurotrophic growth factor), Aktivine/Inhibine, und AMH (anti muellerian hormone) (24). Bei den Zytokinen der TGF-alpha Familie handelt es sich um einkettige Peptide mit einem Molekulargewicht von 5,5 kD, die insbesondere von maligne transformierten Zellen gebildet werden. TGF-alpha besitzt eine 33% Homologie zum Epidermal

Growth Factor (EGF) und konkurriert mit diesem um den gleichen Rezeptor (25), (26).

### 1.3.1 Struktur

TGF-beta ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 25kD, das als Dimer aus 2 je 12,5kD Einheiten zusammengesetzt ist, die mit einer Disulfidbrücke verbunden sind (27). Von TGF-beta sind bei Säugetieren 3 strukturell sehr ähnliche Isoformen mit identischem Rezeptorsignalweg bekannt (TGF-beta 1-3). TGF-beta 1 ist die bei weitem häufigste Isoform. Das Gen für TGF-beta1 liegt im Chromosom 19 in der Region q13. TGF-beta kommt in zahlreichen Geweben vor. Insbesondere Thrombozyten enthalten eine 40- bis 100-fach höhere Konzentration von TGF-beta 1 als die übrigen Körpergewebe, was eine physiologische Rolle bei thrombozytenvermittelten Funktionen nahelegt (28).

### 1.3.2 Funktion

TGF-beta 1 ist als multifunktionelles Zytokin an zahlreichen verschiedenen Zellfunktionen beteiligt (29). Die spezifische Wirkung in der Zielzelle ist stark kontextabhängig und hängt von Differenzierungsgrad, Rezeptorbesatz und -regulation, Regulation der intrazellulären Signalkaskade, Cofaktoren, Konzentration, Wirkzeitpunkt und anderen Faktoren ab. Im einzelnen wurden folgende Hauptwirkungen nachgewiesen:

- Hemmung von
  - Zellproliferation
  - Immunfunktionen (Inhibierung von Hämatopoese und Zytokinproduktion)
  - Angiogenese
  
- Förderung von
  - Differenzierung
  - Apoptose
  - Zelladhäsion
  - Zellmigration, Chemotaxis
  - Wundheilung
  - Geweberegeneration
  - Kardiales Remodeling
  - Synthese von Proteinen der Extrazellulärmatrix u. Kollagen, Fibrosierung
  - Zellproliferation

Die Hauptwirkung von TGF-beta 1 besteht in den meisten Zellsystemen in der Hemmung der Zellproliferation und immunsuppressiven Effekten (30). Die Hemmung des Zellwachstums wird durch die Blockierung der Zielzelle in der G0 Phase erzielt. Dagegen wird das Wachstum einiger mesenchymaler Zellen und die Bildung der extrazellulären Matrix gefördert (31). Knock out Mäuse, denen das TGF-beta1 Gen fehlt, weisen eine multifokale Entzündung in verschiedenen Geweben auf. Eine TGF-beta 1 Mutation führt bei Mäusen zu einer exzessiven inflammatorischen Antwort und frühem Tod (32).

### 1.3.3 Regulation

### 1.3.4 Synthese und Aktivierung

TGF-beta 1 ist intrazellulär als Vorläuferprotein an LAPs (latency associated proteins) gekoppelt und wird in dieser Form als SLC (small latent complex) bezeichnet. Nach Sekretion des TGF-beta 1 Dimers wird es in der extrazellulären Matrix (ECM) an ein weiteres Bindungsprotein (latentes TGF-beta binding protein, LTBP) gekoppelt. Man bezeichnet es dann als LLC (large latent complex), (Abb.2) (33). Die Freisetzung und damit Aktivierung des aktiven TGF-beta 1 aus dem LLC ist ein kritischer regulatorischer Schritt in der Kontrolle der TGF vermittelten Effekte (30). Er wird durch proteolytische Spaltung des Komplexes ausgelöst. Die Freisetzung kann durch verschiedene Faktoren induziert werden (u.a. Plasmin, Thrombospondin, Fibroblasten Growth Faktor 2, Endotoxine). Ferner wurde in vitro und in vivo eine Aktivierung im sauren Microenvironment beschrieben (34).

### 1.3.5 TGF-beta Rezeptoren

Die Wirkung von TGF-beta 1 wird durch spezifische Rezeptoren auf der Zellmembran der Zielzelle vermittelt. Man unterscheidet 3 Rezeptortypen (TGF-beta-R Typ I-III) (35). Die in der Zellmembran gelegenen Rezeptoren weisen eine extrazelluläre Domäne zur Bindung des Liganden, eine in der Zellmembran

gelegene und eine intrazytoplasmatische Domäne auf. TGF-beta 1 bindet unter Vermittlung von TGF-beta-R Typ III zunächst an den Typ II Rezeptor (Abb.2).

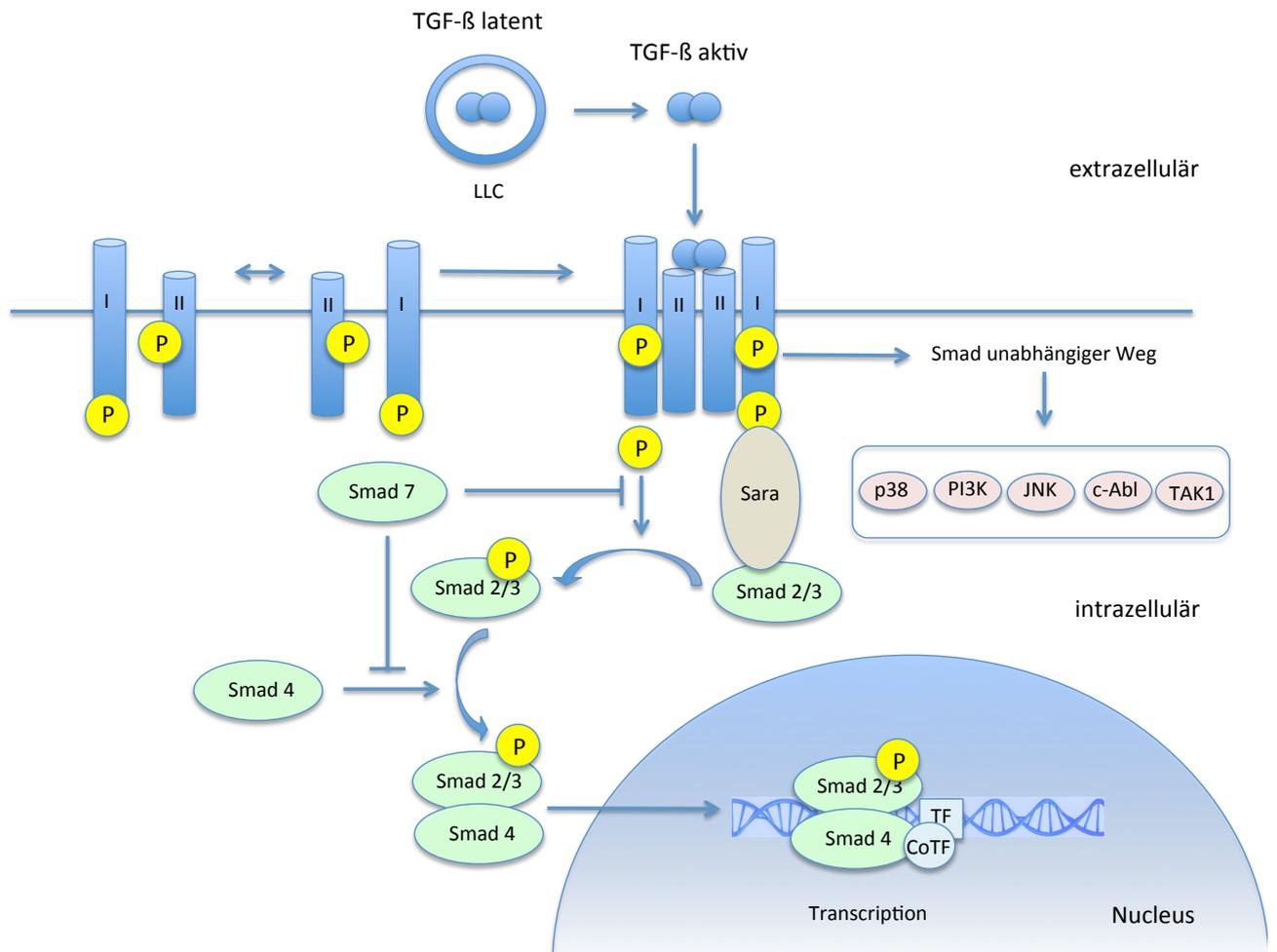


Abb.2 : TGF-beta Signalweg (Erläuterung s. Text)

Die Bindung führt zur Anlagerung eines TGF-beta-R Typ I, der durch Phosphorylierung aktiviert wird und zur Änderung der Konformation und Bildung eines Hetero-tetramerschen Komplexes aus TGF-beta und je 2 Paaren TGF-beta-R I und II führt (36). Unter Vermittlung des membranassoziierten

Zinkfingerproteins SARA bindet SMAD 2 und 3 an den Rezeptor Komplex in der Region des Typ I Rezeptors. Der Rezeptor aktiviert dann durch Phosphorylierung die intrazellulären Signalmoleküle SMAD 2 und 3, was zu deren Konformationsänderung und Ablösen vom Rezeptor führt (37). Die aktivierten SMADs bilden wiederum einen Komplex mit dem Signalmolekül SMAD4. Dieser Komplex wird in den Zellkern transloziert und bewirkt nach Bindung an den Transkriptionsfaktor (TF) unter Vermittlung von Cotransformationsfaktoren (CoTF) die Transskription der Zielgene. Sowohl die Phosphorylierung von SMAD2 und 3, wie auch die Bindung von SMAD4 an den SMAD2/3 Komplex wird durch das regulatorische Protein SMAD7 gehemmt. Daneben kann TGF-beta 1 weitere Signalkaskaden (JNK, p38, PI3K, cAbl, TAK1 und andere) aktivieren (Abb.2).

Die Signalwege von TGF-beta können auf verschiedenen Ebenen der Kaskade inhibiert werden (38). Ein wichtiger negativer Feedback ist die Bildung der inhibitorischen Signalmoleküle SMAD6 und 7 durch TGF-beta. Die Transkription der SMAD7 kodierenden Gene wird durch den SMAD2/3/4 Komplex induziert. SMAD7 hemmt die Phosphorylierung von SMAD2 und 3 und damit die TGF-beta Wirkung im Sinne eines negativen Feedback. Daneben existieren weitere Signalwege. Die komplexe Regulation der verschiedenen intrazellulären Signalwege von TGF-beta erklärt die vielen unterschiedlichen und zum Teil entgegengesetzten Wirkungen in den verschiedenen Zellsystemen.

## 1.4 SDF-1/CXCR4/CXCR7 Signalweg

### 1.4.1 SDF-1

### 1.4.2 Struktur

Der Stromal-cell-derived-factor-1 (SDF-1 oder CXCL12) wird in fast allen Organsystemen gebildet und ist in der alpha Granula der Thrombozyten in großen Mengen vorhanden (39). Es gehört zur Gruppe der Chemokine, weist ein Molekulargewicht von 8 kD auf und ist aus 72 Aminosäuren zusammengesetzt. Es wurde ursprünglich in einer Bindegewebszelllinie des murinen Knochenmarks nachgewiesen, wodurch sich sein Name erklärt (40). SDF-1 wird durch ein Gen auf dem Chromosom 10 Region q11 codiert. Die Aminosäuresequenz ist innerhalb der Säugetiere stark konserviert; SDF-1 der Maus und des Menschen weisen eine 99% Strukturhomologie auf (41). Im Gegensatz zu den meisten Chemokinen, die an zahlreiche verschiedene Rezeptoren binden können, wird die Wirkung von SDF-1 ausschließlich über die SDF-1 spezifischen Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 vermittelt. Von SDF 1 sind verschiedene Isoformen bekannt, von denen SDF-1alpha und SDF-1beta (im Folgenden als SDF-1 bezeichnet) die größte Bedeutung aufweisen (42), (43).

### 1.4.3 Funktion

SDF-1 reguliert als Chemokin in der Embryonalphase die Migration von Stammzellen aus der fetalen Leber in das Knochenmark und steuert die Wanderung und Verankerung der Stammzellen während der Organogenese (44), (45). Damit spielt die SDF-1/CXCR4 Achse eine entscheidende Rolle bei dem Homing humaner Vorläuferzellen der Hämatopoese im Microenvironment des Knochenmarks (46). Knockout-Mäuse, denen SDF-1 oder dessen Rezeptor CXCR4 fehlt, weisen eine Hypozellularität des Knochenmarks und schwere Organschäden auf und sind nicht lebensfähig (47), (48), (49).

Beim Erwachsenen hat SDF-1 neben seiner Rolle bei Mobilisation und Verankerung hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark eine besondere Bedeutung bei der Reparatur von Gewebeschäden und ist mit Entzündung, Gefäßneubildung, Wundheilung und Regeneration assoziiert. Im Rahmen von Reparaturvorgängen wird es insbesondere bei Hypoxie am Ort der Gewebedestruktion aus den Geweben, wie zB. dem Endothel, freigesetzt und wirkt als lokaler Attraktor für CXCR4-positive zirkulierende Stammzellen und Endotheliale Progenitor Zellen (EPCs) (50), (51). Damit fördert es die Angiogenese und Revaskularisierung beschädigter Gewebe. Die Freisetzung von SDF-1 bei Ischaemie korreliert mit der Schwere der Hypoxie (52). Im Rahmen von Entzündungsvorgängen wird durch Chemotaxis auch eine

Akkumulation von CXCR4 exprimierenden Lymphozyten vermittelt. In vitro ist die Wirkung von SDF-1 dosisabhängig. Bei hoher Konzentration (100-200 ng/ml) bewirkt es die Mobilisation von Stamm/Progenitorzellen aus dem Knochenmark und weist einen inhibitorischen Effekt auf den Zellzyklus auf. In niedriger Konzentration (0,05-0,5 ng/ml) aktiviert es dagegen den Zellzyklus und damit die Zellproliferation (45), (53) .

#### 1.4.4 Regulation

Die Regulation der SDF-1 Wirkung erfolgt im Zusammenspiel mit der Expression der SDF-1 Rezeptoren CXCR4 und CXCR7.

#### 1.4.5 SDF-1 Rezeptoren

##### 1.4.5.1 CXCR4

Der CXCR4 Rezeptor (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor4, aka Fusin, CD 184 oder LESTR) vermittelt die Hauptwirkungen von SDF-1 (54). CXCR4 ist in zahlreichen Organsystemen (u.a. Herz, Lunge, Gehirn, Colon, Niere, Leber) nachweisbar. CXCR4 Rezeptoren finden sich auf Endothel- und epithelialen Zellen, Zellen der glatten Muskulatur einschließlich ihrer Vorläuferzellen, hämatopoetischen Zellen insbesondere CD34+ Stammzellen, T- und B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, neutrophilen und eosinophilen Zellen, Microglia, Astrozyten und neuronalen Zellen (55). CXCR4 wird auf embryonalen

pluripotenten und gewebespezifischen Stammzellen exprimiert. CXCR4 wurde auf Megakaryozyten und Thrombozyten nachgewiesen (56), (57).

CXCR4 ist ein an G-Proteine gebundener 7-Transmembranrezeptor mit 3 extra- und 3 intrazellulär gelegenen Schleifen, wobei das N-terminale Ende außerhalb und das C-terminale Ende innerhalb der Zelle liegt (Abb.3), (54), (58).

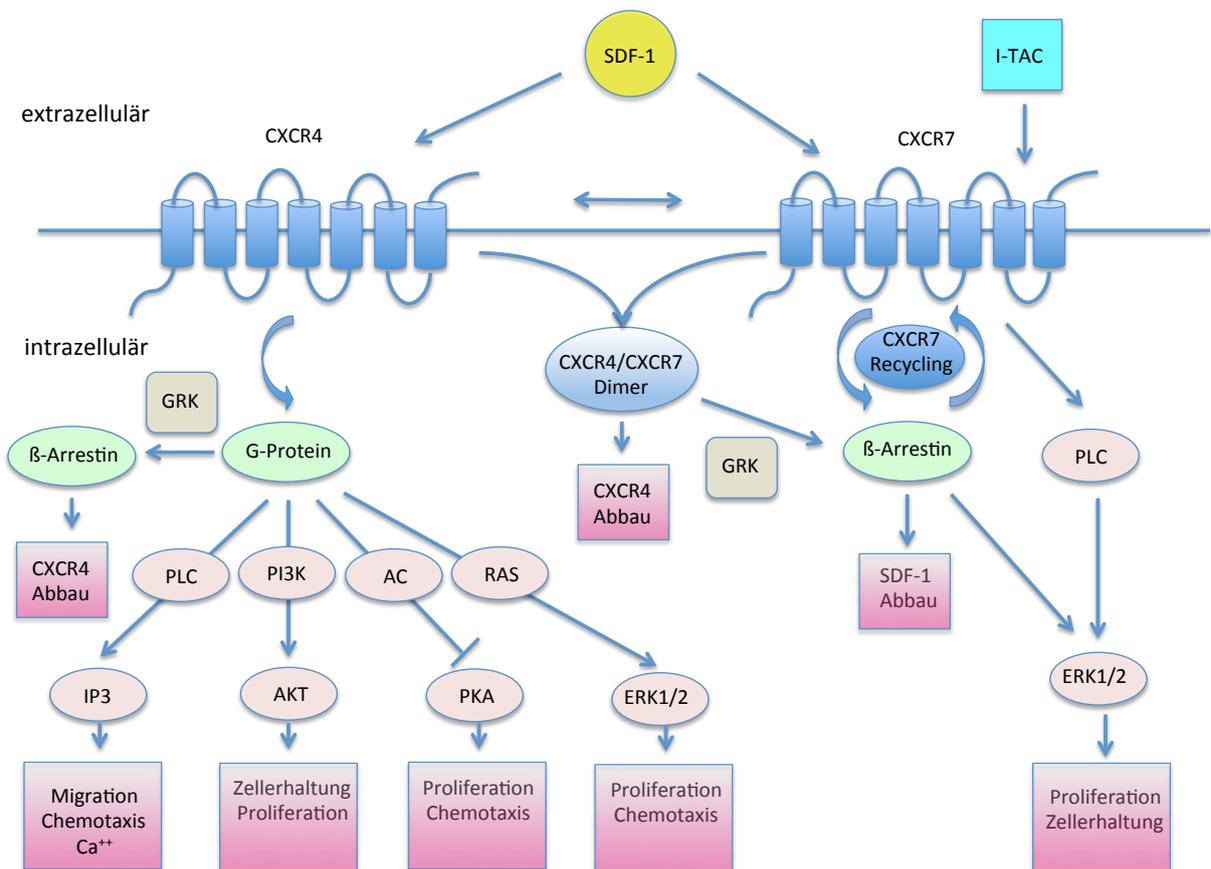


Abb.3 : SDF-1 Signalwege (Erläuterung s. Text)

Der Rezeptor besteht aus 352 Aminosäuren. Er hat eine molare Masse von ca. 40kD und kann in dimerer oder oligomerer Form vorliegen (45). Die Expression des Rezeptors auf Endothelzellen wird auf Ebene der Transcription unter anderem durch Hypoxie induziert (59). Die Bindung von SDF-1 an den Rezeptor ist ein zweistufiger Prozess; nach Bindung an den extrazellulären N-Terminus taucht das N-terminale Ende von SDF1 in eine in der Transmembrandomäne gelegene Bindungstasche von CXCR4 ein. Dies führt zur Aktivierung und Internalisierung des Rezeptors (60). Die Aktivierung von CXCR4 löst mehrere intrazelluläre Signalkaskaden aus, an der insbesondere Gi-Proteine beteiligt sind (Abb.3) (61), (62).

Die G-Protein abhängigen Signalwege umfassen unter anderem IP3, AKT, PKA und ERK1/2. Letzlich resultiert die Aktivierung dieser Signalwege in intrazellulärer Ca<sup>++</sup>-Freisetzung, Zellproliferation und Migration, Chemotaxis und Vaskulogenese. SDF-1 vermittelt durch Mobilisation und Rekrutierung CXCR4 positiver Zellen die Revaskularisierung und Reparaturvorgänge ischaemischer Gewebe . Nach Aktivierung wird der Rezeptorkomplex internalisiert und unter Vermittlung von G-Proteinrezeptor-Kinasen (GRK) und  $\beta$ -Arrestin durch Proteasen abgebaut. Werden CD34+ Progenitorzellen längere Zeit SDF-1 ausgesetzt, kommt es durch Rezeptorverbrauch zur Desensibilisierung der Zellen und zum Verlust der CXCR4 vermittelten SDF-1 getriggerten Zellmigration (63), (53). Neben den G-Protein assoziierten Signalwegen existieren noch die G-Protein unabhängigen JAK(Januskinase) / STAT(Aktivator of transscription) Signalwege (45).

#### 1.4.5.2 CXCR7

2006 wurde erstmals ein weiterer Rezeptor für SDF-1 beschrieben und als CXCR7 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor7) oder ACKR3 bezeichnet (64). CXCR7 ist wie CXCR4 ein 7-Transmembranrezeptor mit 3 extra- und 3 intrazellulär gelegenen Schleifen (Abb.3) (65). Das innerhalb der Säugetiere stark konservierte 39,7 kD Protein besteht aus 362 Aminosäuren (45). Im Gegensatz zu CXCR4 wird seine Wirkung nicht durch G-Proteine vermittelt (66). CXCR7 bindet neben SDF-1 auch an I-TAC (Interferon induzierbarer T zell chemoattractant, auch CXCL11) (67). Der Rezeptor wird in aktivierten Endothelzellen, fetalen Leberzellen, Plazenta, Monozyten, neuronalen Geweben, Thrombozyten und im fetalen Herzgewebe gebildet. Während Knock-out Mäuse, denen CXCR4 fehlt, eine Hypozellularität des Knochenmarks aufweisen, haben Knock-out Mäuse ohne CXCR7 Rezeptor zwar eine normale Hämatopoese, sind aber aufgrund verschiedener Defekte des Herzmuskels nicht überlebensfähig (68). Bei renalen Gewebedefekten in vitro scheint CXCR7 das Überleben und die Funktion von endothelialen Progenitorzellen zu steuern. CXCR7 vermittelt die Adäsion renaler multipotenter Progenitor Zellen und deren Migration durch das Gefäßendothel (69). Beim Rattenmodell führt ein Apoplex zu einer vermehrten Expressierung von CXCR7 in neuronalen Geweben außerhalb der primären ischaemischen Läsion. Es wird vermutet, das SDF-1 über einen CXCR7 vermittelten Effekt neuronale und nicht neuronale Gewebe vor hypoxischen Schäden schützen könnte (70). Hypoxie induziert die

Expression von CXCR7 in humanen microvasculären Endothelzellen. Da im Gegensatz zu anderen Zytokinen die Bindung von SDF-1 an CXCR7 keine Aktivierung von G-Proteinen auslöst, wird CXCR7 auch als Fänger und Speicher für die Chemokine SDF-1 und I-TAC angesehen (Abb.3) (71), (72). Nach Bindung von SDF-1 an CXCR7 wird der Rezeptorkomplex unter Vermittlung von  $\beta$ -Arrestin internalisiert. Das gebundene SDF-1 wird nach intrazellulär abgegeben und abgebaut; der CXCR7 Rezeptor wird dagegen anschließend recycled und gelangt wieder an die Zelloberfläche (Abb.3). Die CXCR7 induzierten Effekte werden durch Aktivierung des ERK1/2, p38 und SAPK/JNK Signalwegs unter Vermittlung von  $\beta$ -Arrestin vermittelt (dargestellt ist in Abb.3 zur besseren Übersicht nur der ERK1/2 Signalweg) (73). CXCR7 kann mit CXCR4 Heterodimere bilden. Das Heterodimer wird nach Aktivierung durch SDF-1 internalisiert und löst die ERK1/2 Kaskade aus; CXCR4 und SDF-1 werden anschließend unter Vermittlung von GRK und  $\beta$ -Arrestin abgebaut, CXCR7 wird dagegen wieder recycled (Abb.3). CXCR7 kann damit durch Bildung von Heterodimeren die CXCR4 Signalwege modulieren (61), (74). Während CXCR4 spezifisch die Migration von Monozyten zu einem SDF1-Gradienten vermittelt, wird die SDF-1 induzierte Adhäsion von Monozyten an immobilisierten Thrombozyten spezifisch durch CXCR7 gesteuert (39). Die Interaktion von aktivierten Thrombozyten mit verschiedenen CXCR7 positiven Zellen, wie zB. Monozyten, führt durch Hemmung der Apoptose zu Verlängerung des Überlebens dieser Zellen. Die genaue Funktion von CXCR7 ist in weiten Teilen noch unbekannt (75).

#### 1.4.5.3 CXCR4 und CXCR7 Rezeptoren auf Thrombozyten

Thrombozyten und Megakaryozyten sind nicht nur eine Quelle für SDF-1, sondern sie exprimieren auch die Rezeptoren CXCR4 und CXCR7. SDF-1 ist ein chemotaktischer Faktor für Megakaryozyten. Die zunehmende Differenzierung von CD34+ Progenitor Zellen zu Megakaryozyten im Knochenmark geht mit einem kontinuierlichen Anstieg der CXCR4 Expression einher (76). In vitro kommt es in allen Stadien der Differenzierung in Anwesenheit von SDF1 im Kulturmedium zu einer Abnahme der CXCR4 Expression auf Megakaryozyten und zu einer Hemmung ihrer Ausreifung in vitro (56). SDF1 induziert die Aktivierung von Thrombozyten über einen autokrinen und parakrinen Effekt, was zu einer Konformationsänderung mit Calciummobilisation, Adhäsion, Aggregation und SDF1 Ausschüttung führt (77). Thrombozyten wandern unter der Einwirkung von Scherkräften in Richtung auf einen SDF1 - Gradienten (77). Die Freisetzung von SDF1 aus aktivierten Thrombozyten führt wiederum zu einer parakrinen Aktivierung benachbarter Thrombozyten (77).

#### *1.5 Interaktion von TGF-beta 1 und SDF-1/CXCR4/CXCR7 Signalwegen*

TGF-beta1 und SDF-1 sind entscheidende Faktoren in der Regulation der Migration und Proliferation hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen (78). Während SDF-1 die Zellproliferation induziert, hemmt TGF-beta die

Zellproliferation, indem es den Übertritt der Zellen von der G0 in die G1 Phase blockiert (79) (Abb.4). In CD34+ Progenitorzellen wird die SDF-1 Wirkung durch Cycline, Cyclinabhängige Kinaseinhibitoren und TGF-1 abhängige Signalmoleküle vermittelt (78). Es besteht ein Crosstalk zwischen intrazellulären SDF-1 und TGF-beta1 Signalwegen (Abb.4) (78), (79), (80), (81).

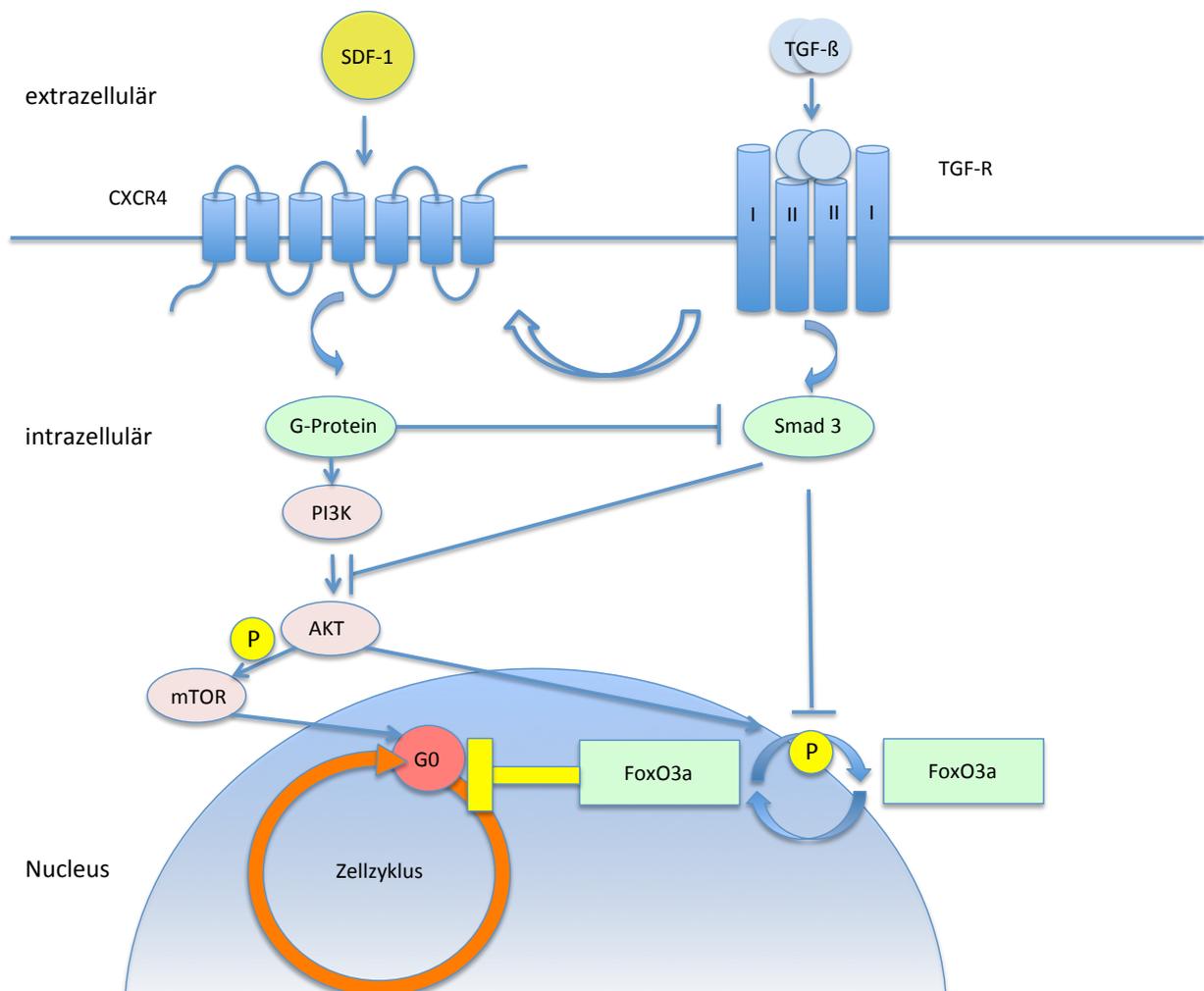


Abb. 4 : SDF-1 und TGF-beta 1 Crosstalk (Erläuterung s. Text)

Nach derzeitiger Vorstellung aktiviert SDF-1 den PI3K/Akt Signalweg, was zu einer für die Zellzyklusprogression notwendigen Phosphorylierung von mTOR führt (79). Außerdem bewirkt SDF-1 über AKT die Phosphorylierung von FoxO3a, was dessen Abwanderung aus dem Zellkern in das Zytoplasma induziert. Dies hebt die Blockade der Zellen in der G0 Phase auf und resultiert in der Progression des Zellzyklus. TGF-beta1 inaktiviert dagegen den PI3K/Akt Signalweg, was zur Inaktivierung von m-TOR und Hemmung der Phosphorylierung von FoxO3a führt. Das unphosphorylierte FoxO3a kann in den Zellkern wandern und die Zellzyklusprogression durch Aktivierung von Zielgenen hemmen. SDF-1 hemmt dagegen die TGF-beta1 induzierte Aktivierung von SMAD3, einem Signalmolekül der TGF-beta1 Wirkung. Unter Homoeostasebedingungen ist die SDF-1 Wirkung durch TGF-beta1 blockiert, so dass eine Zellzyklusprogression verhindert wird (79).

Werden CD34+ Progenitorzellen längere Zeit SDF-1 ausgesetzt, kommt es - wie bereits erwähnt - zur Desensibilisierung der Zellen und zum Verlust der CXCR4 vermittelten SDF-1 getriggerten Zellmigration (63). Eine Behandlung mit TGF-beta1 kann dosis- und zeitabhängig die Sensibilität der Zielzelle für SDF-1 wiederherstellen (78). Da SDF-1 in hoher Konzentration im Knochenmark vorkommt, wird vermutet, dass dieser modulierende Effekt von TGF-beta1 die anhaltende Empfindlichkeit der Stammzellen auf SDF-1 sicherstellt und so das Homing von Stammzellen im Knochenmark stabilisiert (82). TGF-beta1 steigert die Expressierung von CXCR4 Rezeptoren (Abb.4) auf synovialen T-Zellen, was wiederum zu einer SDF-1 induzierten integrin-

vermittelten Zelladhäsion führt. Dieser Mechanismus wird für die Akkumulierung von T-Zellen bei der rheumatoiden Arthritis verantwortlich gemacht (83), (84).

Nach einem akuten Myokardinfarkt kommt es zur Einwanderung von Mesenchymalen Stammzellen (MSC) und myokardialen Progenitorzellen aus dem Knochenmark in die myokardiale Defektzone. Dieser Effekt wird durch die SDF-1/CXCR4 Achse vermittelt (85), (86). Im Mausmodell führt eine akute Ischaemie und Reperfusion nach Koronarligatur zu einer Freisetzung von TGF-beta1 und CXCR4 auf MSC und Myozyten; die CXCR4 Expression kann sowohl durch anti-CXCR4 als auch durch anti-TGF-beta1 Antikörper gehemmt werden (87). Dies weist auf eine Induktion von CXCR4 auf MSC durch TGF-beta1 beim Myokardinfarkt hin. Myokardiales TGF-beta1 scheint also die SDF-1 induzierte Chemotaxis von MSC nach akutem Myokardinfarkt durch Induktion des CXCR4 auf Stammzellen zu verstärken (88). Die Rolle der Freisetzung von TGF-beta-1 und SDF-1 aus aktivierten Thrombozyten ist in diesem Szenario noch nicht ausreichend untersucht.

## 2. Fragestellung

Thrombozyten sind neben ihrer Bedeutung für die Haemostase die Schrittmacher der Reparaturvorgänge nach Myokardinfarkt. Dabei nehmen die thrombozytären Zytokine TGF-beta 1 und SDF-1 die zentrale Rolle in der Vermittlung und Regulation thrombozytärer Funktionen ein. Beide Faktoren sind in großen Mengen im Thrombozyten enthalten und werden bei Aktivierung aus der alpha-Granula freigesetzt. Patienten mit akuter myokardialer Ischaemie weisen eine verstärkte Expression von TGF-beta 1 und SDF-1 auf zirkulierenden Thrombozyten auf.

In dieser Doktorarbeit wird zunächst die Expression der beiden Signalmoleküle TGF-beta1 und SDF-1 sowie dessen Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 auf der Thrombozytenoberfläche bei Patienten mit symptomatischer KHK untersucht. Hierzu wurde bei einer großen Kohorte von Patienten mit symptomatischer KHK die Expression von SDF-1, TGF-beta1, CXCR4 und CXCR7 mittels fluoreszenzaktivierter Durchflußzytometrie gemessen und mittels multipler Regressionsanalyse untersucht, ob eine Korrelation der Faktoren untereinander besteht. Da wir eine positive Korrelation von TGF-beta1, SDF-1, CXCR4 und CXCR7 bei diesen Patienten nachweisen konnten, wurde in vitro bei gesunden Probanden untersucht, ob die thrombozytäre Expression von SDF-1, TGF-beta1 CXCR4 und CXCR7 durch TGF-beta1 oder SDF-1 induziert werden kann.

### **3. Material und Methoden**

#### *3.1 Patienten*

Im Zeitraum vom 1. März 2012 bis 1. Mai 2013 wurde bei 284 konsekutiven Patienten, bei denen wegen einer symptomatischen KHK an der Abteilung für Kardiologie der Universitätsklinik Tübingen eine Herzkatheteruntersuchung erfolgte, vor der Koronarintervention 50 ml Blut über den Herzkatheter abgenommen und innerhalb einer Stunde mittels Durchflußzytometrie analysiert. Etwa die Hälfte der Patienten litt an einer stabilen KHK (n=143), die andere Hälfte an einem akuten Koronarsyndrom (n=141). Innerhalb von 1 Stunde wurde in den Proben die Expression von TGF-beta1, SDF-1, CXCR4, und CXCR7 auf der Thrombozytenoberfläche mittels FACS (Fluorescence-activated cell sorting) gemessen. Die klinischen Parameter der Patienten sind in Tabelle 1 dargestellt. Bereits in früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass in diesem Patientenkollektiv keine Korrelation von kardialen Risikofaktoren oder der Medikation mit den gemessenen SDF1, TGF-beta1, CXCR4 und CXCR7 bestand (89). Alle Patienten willigten zuvor schriftlich in die Studie ein. Alle Teilnehmer der Studie bzw. deren gesetzliche Vertreter und diejenige Person, die das Aufklärungsgepräch führte, datierten und unterschrieben eigenhändig das Formblatt zur Einwilligungserklärung. Das Studienprotokoll war von der Ethikkommission der Universität genehmigt worden (270/2011BO1), entspricht den „good clinical practice guidelines“ und der Deklaration von Helsinki.

Tab.1 Charakteristika der untersuchten Patientenkohorte (n=284)

| <b>Patientencharakteristika<br/>(n=284)</b> | <b>n</b>     | <b>%</b> |
|---|--------------|----------|
| Alter (MW+- SD)                             | 68,3 +- 11,8 |          |
| Geschlecht (m)                              | 205          | 72,2     |
| <b>Risikofaktoren</b>                       |              |          |
| Arterielle Hypertonie                       | 250          | 88       |
| Fettstoffwechselstörung                     | 190          | 66,9     |
| Diabetes mellitus Typ II                    | 75           | 26,4     |
| Raucher                                     | 55           | 19,4     |
| <b>Klinik</b>                               |              |          |
| Stabile KHK                                 | 143          | 50,4     |
| ACS   | 141          | 49,6     |
| Vorhofflimmern                              | 60           | 21,1     |
| LVEF % (MW+- SD)                            | 50,6 +- 10,9 |          |
| <b>Medikation</b>                           |              |          |
| ASA   | 172          | 60,6     |
| Clopidogrel                                 | 64           | 22,5     |
| ACE Hemmer                                  | 136          | 47,9     |
| AT-1 Blocker                                | 48           | 16,9     |
| Beta-Blocker                                | 165          | 58,1     |
| Statine                                     | 163          | 57,4     |

### 3.2. Gesunde Probanden

Da wir in der Patientengruppe eine Korrelation der gemessenen Parameter nachweisen konnten, erschien eine wechselseitige Beziehung von TGF-beta1 und SDF-1 auf Ebene der Thrombozyten möglich. Zur weiteren Klärung haben wir daher bei gesunden Probanden untersucht, ob die Expression von SDF-1, TGF-beta1, CXCR4 und CXCR7 auf Thrombozyten durch SDF-1 oder TGF-beta1 induziert werden kann. Das Alter der 20 Probanden betrug im Mittel 35,1+-17,42 Jahre, 12 waren männlich, 8 weiblich. Da wir bei den gesunden Probanden eine Stimulation der TGF-beta1 Expression nach Inkubation mit SDF-1 ab einer Konzentration von 500 ng/ml nachweisen konnten, haben wir anschließend untersucht, ob diese Stimulation über die SDF-1 Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 vermittelt wird und durch Blockierung der Rezeptoren inhibiert werden kann. Die Charakteristika der Probanden sind in Tab. 2 dargestellt.

Tab.2 Charakteristika der gesunden Probanden (n=20)

| Patientencharakteristika (n=20) | n           | %    |
|---------------------------------|-------------|------|
| Alter (MW+-SD)                  | 35,1 +-17,4 |      |
| Geschlecht (m)                  | 12          | 63,2 |
| Medikamente                     | Keine       |      |

### 3.3 Messungen

#### 3.3.1. Durchflusszytometrische Messung der SDF-1, TGF-beta1, CXCR4 und CXCR7 Expression auf Thrombozyten

Vor der Koronarintervention wurden 50 ml Blut über den Herzkatheter in Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin (CPDA) Röhrchen abgenommen. Direkt im Anschluss wurde die Blutprobe in einem Verhältnis von 1 : 50 mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS, Gibco) verdünnt und jeweils für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit den folgenden konjugierten Antikörpern inkubiert: Maus monoklonaler anti-humaner TGF-beta1-PE, Maus monoklonaler anti-humaner CXCR4-PE, Maus monoklonaler anti-humaner CXCR7-PE, Maus monoklonaler anti-humaner SDF-1-CFS (alle von R&D Systems) und Maus anti-humanem GPIIb-Fluoresceinisothiocyanat (Beckman Coulter) oder Maus anti-humanem GPIIb-phycoerythrin/PE (BD Biosciences) oder ihre Isotypkontrollen (Maus-IgG1-FITC, Maus-IgG2b-PE, R&D Systems) durchgeführt. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben mit 0,5% Paraformaldehyd fixiert und anschließend mittels FACS analysiert (FACSCalibur, Becton-Dickinson, Heidelberg). Die Plättchenaktivatoren Thrombin-Receptor-Agonist-Peptide (TRAP) und ADP (Sigma-Aldrich) wurden eingesetzt, um die Agonisten-induzierten Veränderungen der Plättchenexpression der oben genannten Oberflächenmarker zu beobachten.

### 3.3.2. Stimulation mit TGF-beta1, SDF-1 und Blockade mit Anti-CXCR4 und Anti-CXCR7

Die Stimulationstests wurden mit plättchenreichem Plasma (PRP) durchgeführt. Blut wurde in Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin (CPDA) Röhrchen abgenommen und PRP durch Zentrifugation (200g, 20 min) gewonnen. Danach wurden die oberen 2/3 des Plasma mittels Saugpipette abgezogen und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (falcon tube) gegeben. Die Thrombozytenzählung erfolgte mittels Sysmex-Counter. Die Plättchenzahl wurde auf  $10 \times 10^6/\mu\text{l}$  eingestellt. Zur Untersuchung der TGF-beta1 bzw. der SDF-1 Wirkung wurden  $1 \times 10^6$  Thrombozyten je Probe ( $5 \mu\text{l}$  der  $10 \times 10^6/\mu\text{l}$  PRP Suspension in einem  $50 \mu\text{l}$  System) mit  $5 \mu\text{l}$  rekombinatem humanem TGF-beta1 (Konzentration  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) bzw.  $5 \mu\text{l}$  rekombinatem menschlichen SDF-1 (Konzentration  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) vermischt und mit PBS-Calcium Puffer bis zu einem Endvolumen von  $50 \mu\text{l}$  aufgefüllt. In gleicher Weise wurden Kontrollen ohne TGF-beta1 bzw. SDF-1 angesetzt. Die Proben wurden lichtgeschützt bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von  $300 \mu\text{l}$  0,5% Paraformaldehyd beendet und die Oberflächenexpression von TGF-beta1, CXCR4, CXCR7 und SDF-1 unter Einsatz der jeweiligen fluorochrom konjugierten Antikörper mit FACS gemessen. Für die Messung der Blockade von CXCR4 und CXCR7 wurden die Thrombozyten zunächst für 30 min bei Raumtemperatur mit rekombinatem Maus anti-humanem CXCR4 bzw. Maus anti-humanem CXCR7 vor der SDF-1 Zugabe inkubiert.

### 3.4. Statistik

Alle Daten wurden mit SPSS, Version 21.0 (SPSS Inc., Chicago IL) ausgewertet. Für den Vergleich der nicht parametrischen Daten einschließlich der Medianen Fluoreszenzintensitäten (MFI) wurde der Mann-Whitney U Test angewendet. Die nicht-parametrischen MFI wurden als Median mit 25. und 75. Percentile als Box-Whisker Plot dargestellt. Korrelationen wurden mit dem Spearman Rangkorrelationskoeffizient angegeben und als Streudiagramme dargestellt. Da wir mehr als 2 Gruppen für die SDF-1 Stimulationsexperimente untersucht haben, wurde zur Analyse dieser Daten die einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey post hoc Korrektur angewandt. Diese MFIs sind als Mittelwert mit Standardabweichung und 95% Konfidenzintervall, die MFIs in Abb. 8 als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Ein p-Wert  $<0,05$  wurde als signifikant erachtet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Korrelation der Expression von TGF-beta1 mit SDF-1, CXCR4 und CXCR7 auf zirkulierenden Thrombozyten bei Patienten mit symptomatischer KHK

Auf der Oberfläche zirkulierender Thrombozyten bei Patienten mit symptomatischer KHK konnte eine deutliche Korrelation zwischen der TGF-beta1 Expression und der Expression von CXCR7 ( $\rho=0.572$ ,  $p<0.001$ ) nachgewiesen werden (Abb.5). Ferner bestand eine Korrelation von TGF-beta1 mit CXCR4 (Abb.6) und seinem Ligand SDF-1.

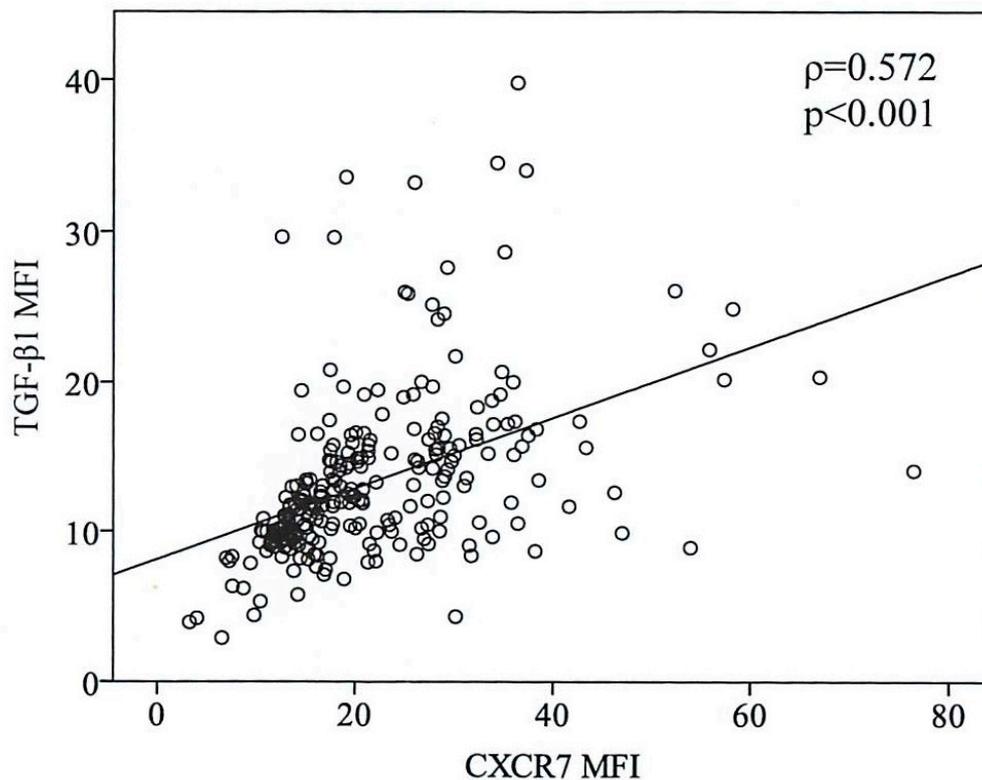


Abb. 5 : Korrelation der TGF-beta1 Expression mit der Expression von CXCR7 auf Thrombozyten

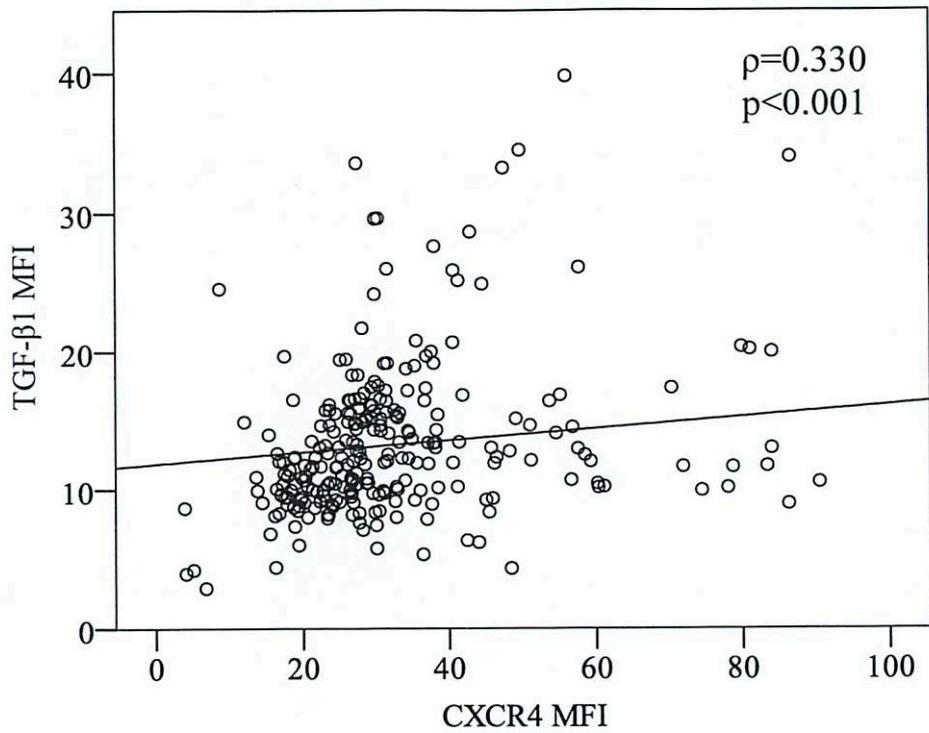


Abb. 6 : Korrelation der TGF-beta1 Expression mit der Expression von CXCR4 auf Thrombozyten

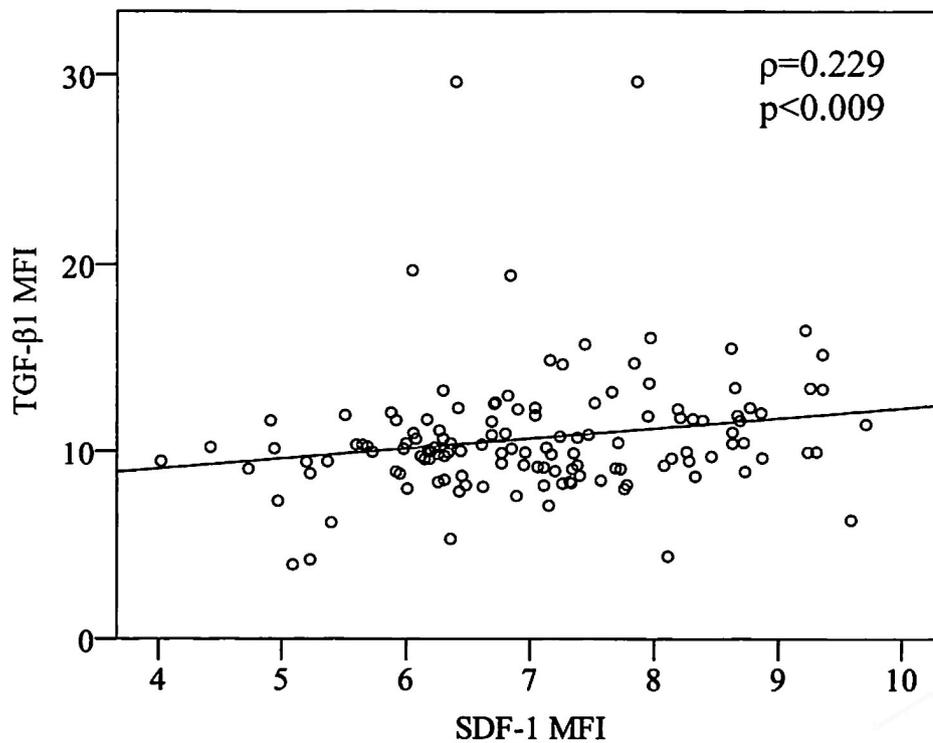


Abb. 7 : Korrelation der TGF-beta1 Expression mit der Expression von SDF-1 auf Thrombozyten

Um eine direkte mögliche Interaktion von TGF-beta1 mit SDF1 und dessen Rezeptoren zu untersuchen, haben wir aufgrund der hier in vivo gefundenen Korrelation von TGF-beta1 mit SDF-1, CXCR4 und CXCR7 untersucht, ob SDF-1 und TGF-beta1 in vitro die Expression von TGF-beta1, SDF-1, CXCR4 und CXCR7 auf Thrombozyten beeinflussen.

#### *4.2. Stimulation der thrombozytären TGF-beta1 Expression durch SDF-1 in vitro*

Thrombozyten gesunder Personen wiesen nach Inkubation mit rekombinantem SDF-1 einen signifikanten Anstieg der thrombozytären TGF-beta1 Expression im Vergleich zu unbehandelten Thrombozyten auf (Mittelwert TGF-beta1 MFI 19.01 vs. TGF-beta1 MFI 14.01, Differenz des Mittelwertes -5.07, 95% CI -7.84 - -2.31,  $p < 0.001$ ), (Abb. 8).

#### *4.3 Blockade der SDF-1 induzierten TGF Expression durch Anti-CXCR4 und Anti-CXCR7*

Der stimulierende Effekt von SDF-1 auf die thrombozytäre Expression von TGF-beta1 konnte sowohl durch Inkubation mit anti-CXCR4 wie auch mit anti-CXCR7 monoclonalen Antikörpern vollständig blockiert werden (Mittelwert TGF-beta1 MFI ohne Stimulation 14.01 vs. TGF-beta1 MFI (SDF-1 stimuliert und CXCR4 geblockt) 12.36, Differenz des Mittelwertes 1.65, 95% CI -1.66 - 4.95,

p<0.535) und Mittelwert TGF-beta1 MFI ohne Stimulation 14.01 vs. TGF-beta1 MFI (SDF-1 stimuliert und CXCR7 geblockt) 14.56, Differenz des Mittelwertes -0.55, 95% CI -3.85 - 2.76, p<0.969), (Abb.8).

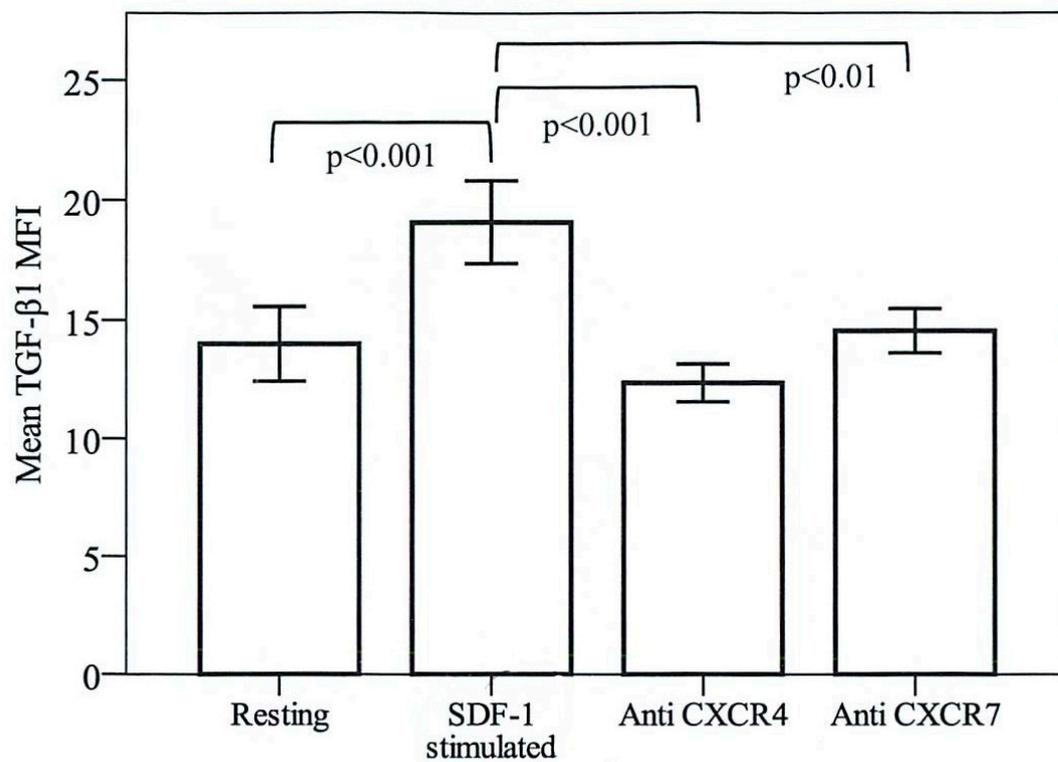


Abb.8. : Stimulation der thrombozytären Expression von TGF-beta1 durch SDF-1. Hemmung der SDF-1 induzierten Stimulation durch Inkubation mit anti-CXCR4 und anti-CXCR7

#### 4.4. Fehlender Effekt von TGF-beta1 auf die thrombozytäre Expression von SDF-1, CXCR4 und CXCR7

Im Gegensatz zu der Inkubation mit SDF-1 fand sich kein Anstieg der SDF-1 Expression auf Thrombozyten nach Inkubation mit TGF-beta1, (Abb.9). Dies galt auch für die Expression der Rezeptoren CXCR4 und CXCR7, (Abb.10,11). (Median SDF-1 MFI in Ruhe 77.26 (25.; 75. Perzentile 21.70; 186.47) vs. Median SDF-1 MFI (TGF-beta1 stimuliert) 88.27 (25.; 75. Perzentile 24.02; 187.47)  $p=0.665$ , Median CXCR4 MFI in Ruhe 44.77 (25.; 75. Perzentile 21.81; 64.84) vs. Median CXCR4 MFI (TGF-beta1 stimuliert) 38.23 (25.; 75. Perzentile 22.02; 44.89)  $p=0.558$  und Median CXCR7 MFI in Ruhe 24.56 (25.; 75. Perzentile 20.51; 64.84) vs. Median CXCR7 MFI (TGF-beta1 stimuliert) 25.09 (25.; 75. Perzentile 20.23; 30.61)  $p=0.866$ .

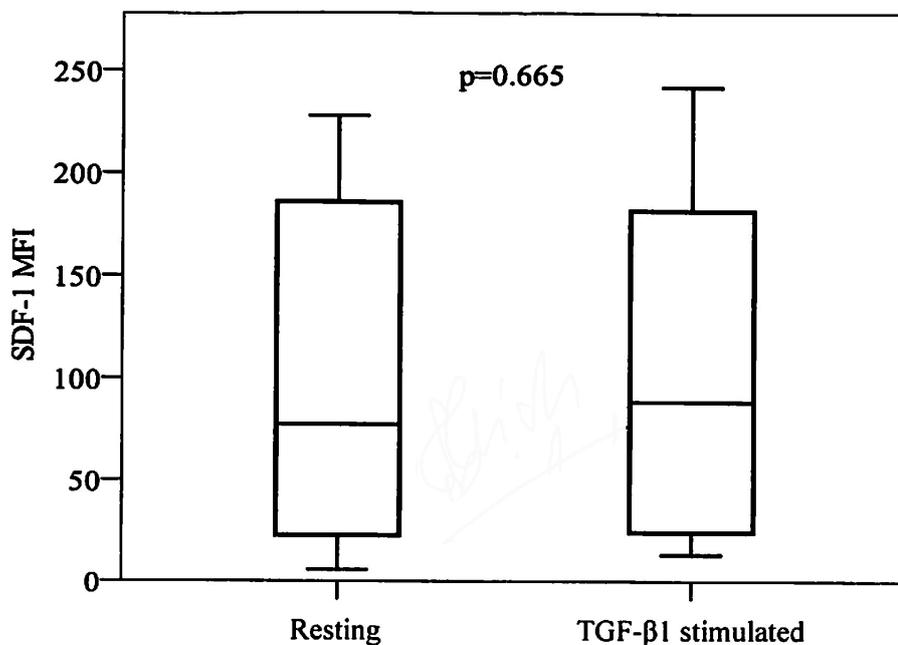


Abb. 9 : Fehlender Effekt von TGF-beta1 auf die thrombozytäre Expression von SDF-1

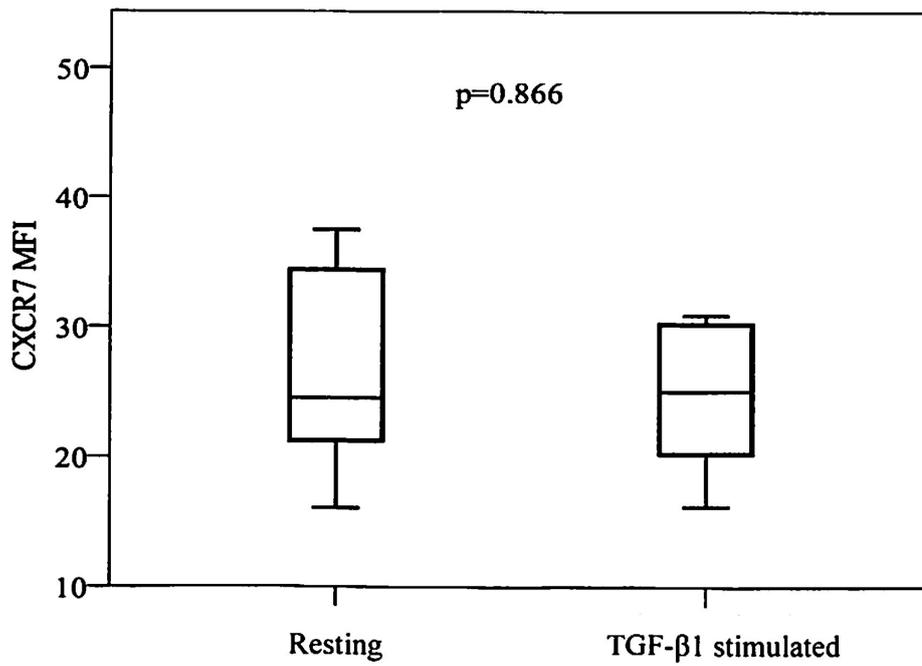


Abb. 10 : Fehlender Effekt von TGF-beta1 auf die thrombozytäre Expression von CXCR7

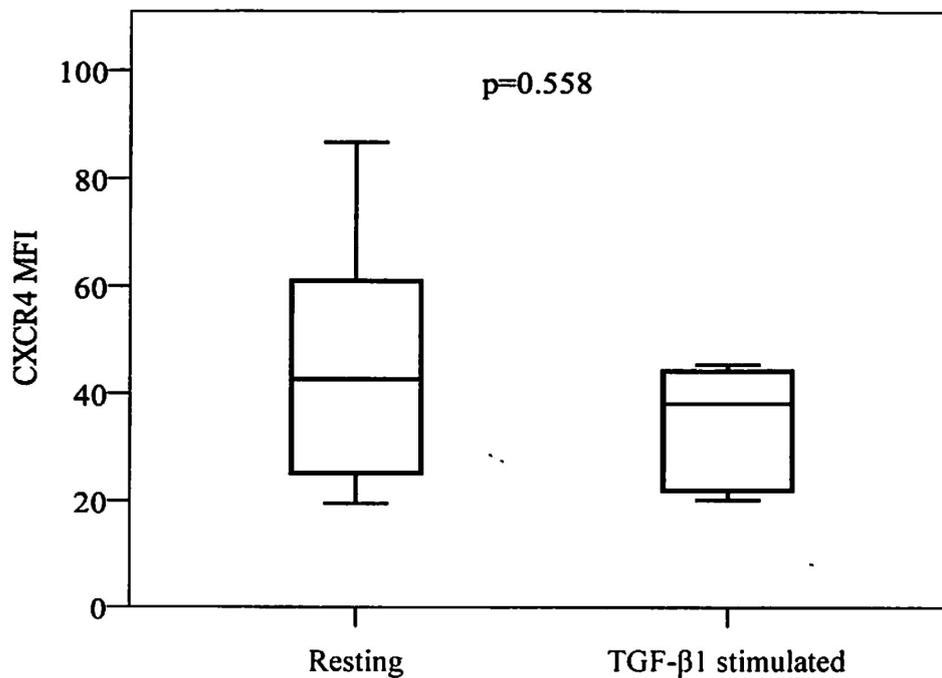


Abb. 11 : Fehlender Effekt von TGF-beta1 auf die thrombozytäre Expression von CXCR4

## 5. Diskussion

In unserer Studie fanden wir bei Patienten mit symptomatischer KHK eine erhöhte Expression von TGF-beta1 und SDF-1, CXCR4 und CXCR7 auf zirkulierenden Thrombozyten. Es bestand eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von TGF-beta1 und SDF-1, CXCR4 und CXCR7.

Neben ihrer physiologischen Rolle im Rahmen der Embryonalphase, in der sie Organogenese, Gewebsdifferenzierung, Mobilisierung und zielgerichtete Wanderung von Stammzellen steuern, sind beim erwachsenen Organismus TGF-beta1 und die SDF-1/CXCR4/CXCR7 Achse auch wichtige Faktoren in der Regulation von Reparaturvorgängen, der Wundheilung und Immunfunktionen. Eine Reihe von Untersuchungen weisen auf eine Bedeutung dieser Zytokine für die koronare Herzerkrankung, den Verlauf des akuten Myokardinfarktes und das kardiale Remodeling hin.

Patienten mit stabiler KHK weisen höhere TGF-beta1 Serumspiegel auf als gesunde Kontrollen (90). Bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt findet sich im Vergleich zu Patienten mit stabiler KHK eine höhere TGF-beta1 Expression auf zirkulierenden Thrombozyten wie auch höhere Serum TGF-beta1 Spiegel (19), (90). Bei Patienten mit symptomatischer KHK korrelieren die TGF-beta1 Serumspiegel und die TGF-beta1 Expression auf der Thrombozytenoberfläche mit der Mortalität und Reinfarktrate während eines 12-monatigen Follow-up (19). Eine niedrige thrombozytäre TGF-beta1 Expression ist mit einer erhöhten

Gesamtmortalität assoziiert (19). Im Mausmodell führt eine durch Ligatur der linken Herzarterie induzierte myokardiale Ischaemie zu einer erhöhten kardialen Expression von TGF-beta1; die Hemmung von TGF-beta1 erhöht die Postinfarktmortalität (91). TGF-beta 1 beeinflusst die Entzündungsreaktion und das kardiale Remodelling nach Infarkt. Obwohl TGF-beta1 einerseits Entzündungsreaktionen hemmt und damit vor Reperfusionsschäden schützen könnte und andererseits in der extrazellulären Matrix die Kollagensynthese und Fibrosierung fördert, sind die Wirkungen einer TGF basierten Therapie komplex und im Mausmodell u.a. auch vom Interventionszeitpunkt nach Infarkt abhängig (91).

Neben TGF-beta1 kommt es bei Patienten mit akutem Herzinfarkt auch zu einer vermehrten Freisetzung von kardialem SDF-1, die bereits innerhalb von Minuten nachweisbar ist und ca. 4 bis 7 Tage anhält (85). Zirkulierende Thrombozyten von Patienten mit akutem Koronarsyndrom weisen im Vergleich zu Patienten mit stabiler CAD eine erhöhte Expression von SDF-1 und CXCR7 auf (89), (92). Die erhöhte Expression von thrombozytärem SDF-1 und thrombozytärem CXCR7 korreliert mit einem besseren funktionellen Ergebnis nach akutem Koronarsyndrom, während eine niedrige CXCR4 Expression mit einer höheren Mortalität und Reinfarktrate einhergeht (20), (89), (93). Auch die erhöhte Expression von SDF-1 im ischaemischen Myocard ist mit einer besseren myokardialen Funktion nach Infarkt korreliert (92), (94), (95). Die Applikation eines viralen Genvectors für SDF-1 führte im Rattenmodell zu einer Verbesserung der linksventrikulären Funktion und kleiner Infarktgröße in vivo

(89). Bei den behandelten Tieren wurde eine höhere Gefäßdicke, eine höhere Zahl von c-Kit+ Stammzellen und Kardiomyozyten, eine größere Ventrikeldicke und ein niedrigerer Gehalt von Kollagen Typ I und II nachgewiesen (89). Diese Ergebnisse sprechen für einen kardioprotektiven Effekt von SDF-1 beim Myokardinfarkt.

Die hier nachgewiesene positive Korrelation von TGF-beta1 und der SDF1/CXCR4/CXCR7 Achse weist darauf hin, dass die Freisetzung von TGF-beta1 und SDF1 aus Thrombozyten bei Patienten mit symptomatischer Myokardischaemie durch den gleichen Auslöser induziert wird. Als mögliche Ursache wurde erstmalig eine positive Interaktion von TGF-beta1 und der SDF1/CXCR4/CXCR7 Achse auf thrombozytärer Ebene nachgewiesen.

Es bestehen Hinweise für eine synergistische Wirkung von TGF-beta1 und SDF-1 in der Frühphase des Myokardinfarktes. Bei einem Myokardinfarkt kommt es am Ort des Gewebedefektes innerhalb von Sekunden zur schlagartigen Freisetzung von großen Mengen TGF-beta1 und SDF-1 aus den aktivierten Thrombozyten (87). SDF-1 bewirkt über eine integrinvermittelte Chemotaxis die Akkumulation der CXCR4 positiven zirkulierenden Stamm- und Progenitorzellen in der Umgebung der Infarktzone (96). Dieser Mechanismus wird durch eine Hypoxie verstärkt, die eine vermehrte Expression von CXCR4 Rezeptoren auf Progenitorzellen auslöst (97). Neben den lokalen Effekten in der Infarktzone mit Chemotaxis zirkulierender Stamm- und Progenitorzellen bewirken erhöhte systemische SDF-1 Spiegel auch eine vermehrten Shift von

Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmarkkompartiment in den zirkulierenden Pool (98). Bei Patienten mit symptomatischer KHK sind vermehrt CD34+ Zellen in der Zirkulation nachweisbar (97). Die CD34+ Zellen wandern entlang des SDF-1 Gradienten in Richtung auf die hohe SDF-1 Konzentration in der Infarktzone. Die Zellmigration der Stammzellen wird wiederum durch TGF-beta1 und die CXCR4 Expression moduliert (87).

SDF-1 aktiviert über seine Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 glatte Muskelzellen, Endothelzellen und mesenchymale Stromazellen in der Umgebung des Infarktes, die ihrerseits SDF-1 freisetzen und den CXCR4 Rezeptor vermehrt exprimieren (99). Die SDF-1 Wirkung auf die Zielzelle ist jedoch zeitlich begrenzt, da es unter der Dauerstimulation mit SDF1 durch Internalisierung der CXCR4 Rezeptoren zu einer Desensibilisierung der Zelle für SDF1 kommt. In verschiedenen Zellsystemen (CD34+ Stammzellen, Makrophagen, T-Zellen, Mammakarzinom-zellen, kardiale Myozyten, Synovia u.a.) wurde nachgewiesen, dass TGF-beta1 sowohl auf transcriptionaler wie translationaler Ebene zu einer anhaltenden Induktion von CXCR4 Rezeptoren auf der Zielzelle führt und somit die SDF-1 Wirkung nachhaltig perpetuiert (80), (81), (83), (84), (87), (100), (101). In choroid-retinalen Endothel (RF/6A) Zellen verstärkt TGF-beta die Expression von CXCR4 und CXCR7 dosis- und zeitabhängig durch Aktivierung des Erk 1/2 Wegs; hierdurch erleichtert es die SDF-1 induzierte RF/6A Migration und Tubulusformation (81). TGF-beta1 verstärkt und verlängert also die SDF-1 Wirkung in diesen in vitro Modellen. Auch beim akuten Myokardinfarkt führt dieser Mechanismus zu einer Verlängerung der SDF-1

Wirkung und damit zu einer zeitlich anhaltenden Akkumulation von Stammzellen in der Umgebung der Infarktzone (87). TGF-beta1 induziert die Chemotaxis von mesenchymalen Zellen aus dem Knochenmark in die Umgebung des Myokardinfarktes über einen CXCR4 vermittelten Effekt (87). Da SDF-1 und TGF-beta 1 in großen Mengen in Thrombozyten gespeichert und bei deren Aktivierung sehr schnell freigesetzt werden, werden durch diesen Mechanismus schon in der sehr frühen Infarktphase die Reparaturvorgänge eingeleitet, bevor die SDF-1 Synthese und Freisetzung aus den Endothelzellen und Myozyten anläuft.

Erstmalig konnte gezeigt werden, dass bei gesunden Probanden SDF-1 über seine Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 die Freisetzung von TGF-beta1 auf Thrombozyten in vitro stimuliert. Dieser Effekt war ab einer SDF-1 Konzentration von 5 µg/ml in vitro nachweisbar, während niedrigere Konzentrationen keinen oder nur einen geringen Effekt aufwiesen. Hohe SDF-1 Konzentrationen werden bei Epitheldefekten, wie sie zB. beim Myokardinfarkt auftreten, erreicht, bei denen die Akkumulation von aktivierten Thrombozyten zu einer starken lokalen Freisetzung von SDF-1 führt. Der stimulierende Effekt von SDF-1 auf die thrombozytäre TGF-beta1 Expression ist rezeptorvermittelt, da er durch Blockade des CXCR4 und CXCR7 Rezeptors gehemmt werden konnte. TGF-beta1 ist in hoher Konzentration in den alpha Granula der Thrombozyten gespeichert. Walsh (2015) konnte nachweisen, dass SDF1 die Freisetzung von P-Selektin aus thrombozytärer alpha-Granula unter der Einwirkung von geringen Scherkräften und geringen ADP-Konzentrationen

induziert (102). Ähnlich wie P-Selektin könnte auch TGF-beta1 durch Vermittlung der SDF-1/CXCR4/CXCR7 Achse aus den alpha Granula der Thrombozyten freigesetzt werden. Durch die SDF-1 induzierte Förderung der TGF-beta1 Freisetzung aus Thrombozyten werden in der Infarktzone schnell hohe TGF-beta1 Konzentrationen erreicht. Damit sind die Voraussetzungen für eine Verstärkung und Verlängerung der lokalen SDF-1 Wirkung in den Zielzellen (hämatopoetische und epitheliale Progenitorzellen, Myozyten) durch TGF-beta1 gegeben.

Umgekehrt fanden wir keine Hinweise für eine Stimulation der thrombozytären Expression von SDF-1, CXCR4 und CXCR7 durch TGF-beta1 in vitro. Während in verschiedenen Zellsystemen eine Verstärkung/Verlängerung der SDF-1 Wirkung und die Induktion von CXCR4 in der Zielzelle durch TGF-beta1 gezeigt wurde, führte TGF-beta1 auf Thrombozyten zu keiner vermehrten Expression von SDF-1, CXCR4 und CXCR7. Lev wies in Thrombozyten mRNA für den TGF Rezeptor Typ I und II und SMAD2 nach, eine Aktivierung von Thrombozyten durch TGF konnte er jedoch nicht erzielen (103). In Abhängigkeit von der ADP Konzentration wurde die ADP vermittelte Plättchenaggregation entweder in geringem Maß gehemmt oder stimuliert. Dies weist darauf hin, dass die Expression von CXCR4 und CXCR7 auf Thrombozyten - möglicherweise aufgrund der Anwesenheit weiterer Liganden wie zB. MIF und CXCL11 - anders reguliert ist als in den kernhaltigen Zellen. Da aktivierte Thrombozyten SDF-1 in großen Mengen freisetzen und SDF-1 über eine autokrine und parakrine Rückkopplung die eigene Freisetzung fördert, scheint eine Induktion der

thrombozytären SDF-1 Freisetzung durch TGF-beta1 physiologisch auch nicht notwendig zu sein. Umgekehrt fördert SDF-1 dagegen die Induktion der thrombozytären TGF-beta1 Freisetzung und damit die SDF-1 Wirkung in der Zielzelle in der Frühphase des Infarktes; im weiteren Verlauf könnte sich TGF-beta1 auch durch antiinflammatorische Effekte und Förderung der Angiogenese günstig auf die Infarktheilung auswirken.

Zusammenfassend konnten wir eine signifikante positive Korrelation der thrombozytären SDF-1/CXCR4/CXCR7 Achse und der thrombozytären TGF-beta1 Expression bei Patienten mit symptomatischer KHK nachweisen. Erstmals wurde eine Wechselwirkung zwischen TGF-beta1 und der SDF-1/CXCR4/CXCR7 Achse auf thrombozytärer Ebene aufgezeigt. SDF-1 stimuliert über seine Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 die thrombozytäre TGF-beta1 Freisetzung in vitro. Beide Faktoren sind über unterschiedliche Mechanismen in die Reparatur und das Remodelling nach Myokardinfarkt involviert. Es ergeben sich damit Hinweise dafür, dass sich die Zytokine in der Frühphase des Infarktes gegenseitig verstärken, indem SDF-1 die thrombozytäre TGF-beta1 Freisetzung fördert und TGF-beta1 die SDF-Wirkung in der Zielzelle zunächst verstärkt.

## 6. Zusammenfassung

Bei 284 Patienten mit symptomatischer KHK wurde eine erhöhte Expression von TGF-beta1 und SDF-1, CXCR4 und CXCR7 auf zirkulierenden Thrombozyten nachgewiesen. Es bestand eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von TGF-beta1 und SDF-1, CXCR4 und CXCR7. Um eine mögliche positive Interaktion von TGF-beta1 mit der SDF-1/CXCR4/CXCR7 Achse in Thrombozyten nachzuweisen, wurde bei gesunden Probanden untersucht, ob die thrombozytäre Expression von SDF-1, TGF-beta1, CXCR4 und CXCR7 durch TGF-beta1 oder SDF-1 induziert werden kann. Erstmals konnte gezeigt werden, dass bei gesunden Probanden SDF-1 über seine Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 die Freisetzung von TGF-beta1 auf Thrombozyten in vitro stimuliert. Die SDF-1 induzierte Freisetzung von TGF-beta1 konnte durch Blockade sowohl des CXCR4 und CXCR7 gehemmt werden. Umgekehrt fanden wir keine Hinweise für eine Stimulation der thrombozytären Expression von SDF-1, CXCR4 und CXCR7 durch TGF-beta1 in vitro. Diese Ergebnisse weisen auf eine Interaktion der SDF-1/CXCR4/CXCR7 Achse und TGF-beta1 auf thrombozytärer Ebene hin.

## **7. Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. T. Geisler für die Vergabe des Themas und Herrn Dr. D. Rath für die Betreuung der Doktorarbeit.

## 8. Literatur

1. Nabel EG, Braunwald E. A tale of coronary artery disease and myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2012;366(1):54-63.
2. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362(6423):801-9.
3. Shah BN, Khattar RS, Senior R. The hibernating myocardium: current concepts, diagnostic dilemmas, and clinical challenges in the post-STICH era. *Eur Heart J*. 2013;34(18):1323-36.
4. Iliodromitis EK, Lazou A, Kremastinos DT. Ischemic preconditioning: protection against myocardial necrosis and apoptosis. *Vasc Health Risk Manag*. 2007;3(5):629-37.
5. Bhatt AS, Ambrosy AP, Velazquez EJ. Adverse Remodeling and Reverse Remodeling After Myocardial Infarction. *Curr Cardiol Rep*. 2017;19(8):71.
6. Davies MJ, Woolf N, Robertson WB. Pathology of acute myocardial infarction with particular reference to occlusive coronary thrombi. *Br Heart J*. 1976;38(7):659-64.
7. Hellstrom HR. Time relationships between plaque rupture and infarction. *Circulation*. 2001;104(2):E9.
8. Guo LR, Myers ML, Kuntz EL. Coronary artery spasm: a rare but important cause of postoperative myocardial infarction. *Ann Thorac Surg*. 2008;86(3):994-5.
9. Gawaz M, Vogel S. Platelets in tissue repair: control of apoptosis and interactions with regenerative cells. *Blood*. 2013;122(15):2550-4.
10. Michelson AD. How platelets work: platelet function and dysfunction. *J Thromb Thrombolysis*. 2003;16(1-2):7-12.
11. George JN. Platelets. *Lancet*. 2000;355(9214):1531-9.
12. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*. 2009;23(4):177-89.
13. Bijak M, Dzieciol M, Rywaniak J, Saluk J, Zielinska M. Platelets miRNA as a Prediction Marker of Thrombotic Episodes. *Dis Markers*. 2016;2016:2872507.
14. Landry P, Plante I, Ouellet DL, Perron MP, Rousseau G, Provost P. Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. *Nat Struct Mol Biol*. 2009;16(9):961-6.
15. Chen J, Lopez JA. Interactions of platelets with subendothelium and endothelium. *Microcirculation*. 2005;12(3):235-46.

16. Tangelder GJ, Teirlinck HC, Slaaf DW, Reneman RS. Distribution of blood platelets flowing in arterioles. *Am J Physiol.* 1985;248(3 Pt 2):H318-23.
17. Niiya K, Hodson E, Bader R, Byers-Ward V, Koziol JA, Plow EF, et al. Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation. *Blood.* 1987;70(2):475-83.
18. Sondermeijer BM, Bakker A, Halliani A, de Ronde MW, Marquart AA, Tijssen AJ, et al. Platelets in patients with premature coronary artery disease exhibit upregulation of miRNA340\* and miRNA624\*. *PLoS One.* 2011;6(10):e25946.
19. Rath D, Chatterjee M, Muller I, Muller K, Bockmann C, Droppa M, et al. Platelet expression of transforming growth factor beta 1 is enhanced and associated with cardiovascular prognosis in patients with acute coronary syndrome. *Atherosclerosis.* 2014;237(2):754-9.
20. Rath D, Chatterjee M, Bongartz A, Muller K, Droppa M, Stimpfle F, et al. Platelet surface expression of SDF-1 is associated with clinical outcomes in the patients with cardiovascular disease. *Platelets.* 2017;28(1):34-9.
21. de Larco JE, Todaro GJ. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978;75(8):4001-5.
22. Douglas HE. TGF-ss in wound healing: a review. *J Wound Care.* 2010;19(9):403-6.
23. Lavery HG, Wakefield LM, Occleston NL, O'Kane S, Ferguson MW. TGF-beta3 and cancer: a review. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20(4):305-17.
24. Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H. Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol.* 2001;187(3):265-76.
25. Umekita Y, Enokizono N, Sagara Y, Kuriwaki K, Takasaki T, Yoshida A, et al. Immunohistochemical studies on oncogene products (EGF-R, c-erbB-2) and growth factors (EGF, TGF-alpha) in human breast cancer: their relationship to oestrogen receptor status, histological grade, mitotic index and nodal status. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1992;420(4):345-51.
26. McCulloch RK, Walker CE, Chakera A, Jazayeri J, Leedman PJ. Regulation of EGF-receptor expression by EGF and TGF alpha in epidermoid cancer cells is cell type-specific. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998;30(11):1265-78.
27. Mittl PR, Priestle JP, Cox DA, McMaster G, Cerletti N, Grutter MG. The crystal structure of TGF-beta 3 and comparison to TGF-beta 2: implications for receptor binding. *Protein Sci.* 1996;5(7):1261-71.
28. Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem.* 1983;258(11):7155-60.

29. Lawrence DA. Transforming growth factor-beta: a general review. *Eur Cytokine Netw.* 1996;7(3):363-74.
30. Kubiczкова L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. TGF-beta - an excellent servant but a bad master. *J Transl Med.* 2012;10:183.
31. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature.* 1992;359(6397):693-9.
32. Kulkarni AB, Karlsson S. Transforming growth factor-beta 1 knockout mice. A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease. *Am J Pathol.* 1993;143(1):3-9.
33. Miyazono K, Hellman U, Wernstedt C, Heldin CH. Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural characterization. *J Biol Chem.* 1988;263(13):6407-15.
34. Lyons RM, Keski-Oja J, Moses HL. Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol.* 1988;106(5):1659-65.
35. Cheifetz S, Weatherbee JA, Tsang ML, Anderson JK, Mole JE, Lucas R, et al. The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell.* 1987;48(3):409-15.
36. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003;113(6):685-700.
37. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.* 1997;390(6659):465-71.
38. Lutz M, Knaus P. Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. *Cell Signal.* 2002;14(12):977-88.
39. Chatterjee M, Gawaz M. Platelet-derived CXCL12 (SDF-1alpha): basic mechanisms and clinical implications. *J Thromb Haemost.* 2013;11(11):1954-67.
40. Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science.* 1993;261(5121):600-3.
41. Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, et al. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics.* 1995;28(3):495-500.
42. De La Luz Sierra M, Yang F, Narazaki M, Salvucci O, Davis D, Yarchoan R, et al. Differential processing of stromal-derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity. *Blood.* 2004;103(7):2452-9.

43. Gosalbez M, Hupe MC, Lokeshwar SD, Yates TJ, Shields J, Veerapen MK, et al. Differential expression of SDF-1 isoforms in bladder cancer. *J Urol*. 2014;191(6):1899-905.
44. Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med*. 1997;185(1):111-20.
45. Asri A, Sabour J, Atashi A, Soleimani M. Homing in hematopoietic stem cells: focus on regulatory role of CXCR7 on SDF1a/CXCR4 axis. *EXCLI J*. 2016;15:134-43.
46. Jung Y, Wang J, Schneider A, Sun YX, Koh-Paige AJ, Osman NI, et al. Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts; a possible mechanism for stem cell homing. *Bone*. 2006;38(4):497-508.
47. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*. 1996;382(6592):635-8.
48. Dar A, Kollet O, Lapidot T. Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice. *Exp Hematol*. 2006;34(8):967-75.
49. Lapidot T. Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID mice. The role of SDF-1/CXCR4 interactions. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;938:83-95.
50. Shi X, Zhang W, Yin L, Chilian WM, Krieger J, Zhang P. Vascular precursor cells in tissue injury repair. *Transl Res*. 2017;184:77-100.
51. Zampetaki A, Kirton JP, Xu Q. Vascular repair by endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res*. 2008;78(3):413-21.
52. Ceradini DJ, Gurtner GC. Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue. *Trends Cardiovasc Med*. 2005;15(2):57-63.
53. Plett PA, Frankovitz SM, Wolber FM, Abonour R, Orschell-Traycoff CM. Treatment of circulating CD34(+) cells with SDF-1alpha or anti-CXCR4 antibody enhances migration and NOD/SCID repopulating potential. *Exp Hematol*. 2002;30(9):1061-9.
54. Ho TK, Shiwen X, Abraham D, Tsui J, Baker D. Stromal-Cell-Derived Factor-1 (SDF-1)/CXCL12 as Potential Target of Therapeutic Angiogenesis in Critical Leg Ischaemia. *Cardiol Res Pract*. 2012;2012:143209.
55. Pozzobon T, Goldoni G, Viola A, Molon B. CXCR4 signaling in health and disease. *Immunol Lett*. 2016;177:6-15.
56. Wang JF, Liu ZY, Gropman JE. The alpha-chemokine receptor CXCR4 is expressed on the megakaryocytic lineage from progenitor to platelets and modulates migration and adhesion. *Blood*. 1998;92(3):756-64.

57. Chatterjee M, Rath D, Gawaz M. Role of chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 for platelet function. *Biochem Soc Trans.* 2015;43(4):720-6.
58. Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol.* 2003;63(6):1256-72.
59. Schioppa T, Uranchimeg B, Saccani A, Biswas SK, Doni A, Rapisarda A, et al. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med.* 2003;198(9):1391-402.
60. Cojoc M, Peitzsch C, Trautmann F, Polishchuk L, Telegeev GD, Dubrovskaya A. Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis. *Oncotargets Ther.* 2013;6:1347-61.
61. Wurth R, Bajetto A, Harrison JK, Barbieri F, Florio T. CXCL12 modulation of CXCR4 and CXCR7 activity in human glioblastoma stem-like cells and regulation of the tumor microenvironment. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:144.
62. Scala S. Molecular Pathways: Targeting the CXCR4-CXCL12 Axis--Untapped Potential in the Tumor Microenvironment. *Clin Cancer Res.* 2015;21(19):4278-85.
63. Signorello N, Oldridge J, Pelchen-Matthews A, Klasse PJ, Tran T, Brass LF, et al. Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4. *J Cell Biol.* 1997;139(3):651-64.
64. Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med.* 2006;203(9):2201-13.
65. Watt SM, Forde SP. The central role of the chemokine receptor, CXCR4, in haemopoietic stem cell transplantation: will CXCR4 antagonists contribute to the treatment of blood disorders? *Vox Sang.* 2008;94(1):18-32.
66. Rajagopal S, Kim J, Ahn S, Craig S, Lam CM, Gerard NP, et al. Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(2):628-32.
67. Balabanian K, Levoye A, Klemm L, Lagane B, Hermine O, Harriague J, et al. Leukocyte analysis from WHIM syndrome patients reveals a pivotal role for GRK3 in CXCR4 signaling. *J Clin Invest.* 2008;118(3):1074-84.
68. Sierro F, Biben C, Martinez-Munoz L, Mellado M, Ransohoff RM, Li M, et al. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(37):14759-64.
69. Mazzinghi B, Ronconi E, Lazzeri E, Sagrinati C, Ballerini L, Angelotti ML, et al. Essential but differential role for CXCR4 and CXCR7 in the therapeutic homing of human renal progenitor cells. *J Exp Med.* 2008;205(2):479-90.

70. Schonemeier B, Schulz S, Hoeltl V, Stumm R. Enhanced expression of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 after cerebral ischemia in the rat brain. *J Neuroimmunol.* 2008;198(1-2):39-45.
71. Naumann U, Cameroni E, Pruenster M, Mahabaleshwar H, Raz E, Zerwes HG, et al. CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS One.* 2010;5(2):e9175.
72. Thelen M, Thelen S. CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio? *J Neuroimmunol.* 2008;198(1-2):9-13.
73. Luker KE, Gupta M, Steele JM, Foerster BR, Luker GD. Imaging ligand-dependent activation of CXCR7. *Neoplasia.* 2009;11(10):1022-35.
74. Levoye A, Balabanian K, Baleux F, Bachelier F, Lagane B. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood.* 2009;113(24):6085-93.
75. Sanchez-Martin L, Sanchez-Mateos P, Cabanas C. CXCR7 impact on CXCL12 biology and disease. *Trends Mol Med.* 2013;19(1):12-22.
76. Chatterjee M, von Ungern-Sternberg SN, Seizer P, Schlegel F, Buttcher M, Sindhu NA, et al. Platelet-derived CXCL12 regulates monocyte function, survival, differentiation into macrophages and foam cells through differential involvement of CXCR4-CXCR7. *Cell Death Dis.* 2015;6:e1989.
77. Kraemer BF, Schmidt C, Urban B, Bigalke B, Schwanitz L, Koch M, et al. High shear flow induces migration of adherent human platelets. *Platelets.* 2011;22(6):415-21.
78. Basu S, Broxmeyer HE. Transforming growth factor- $\beta$ 1 modulates responses of CD34+ cord blood cells to stromal cell-derived factor-1/CXCL12. *Blood.* 2005;106(2):485-93.
79. Chabanon A, Desterke C, Rodenburger E, Clay D, Guerton B, Boutin L, et al. A cross-talk between stromal cell-derived factor-1 and transforming growth factor- $\beta$  controls the quiescence/cycling switch of CD34(+) progenitors through FoxO3 and mammalian target of rapamycin. *Stem Cells.* 2008;26(12):3150-61.
80. Kojima Y, Acar A, Eaton EN, Mellody KT, Scheel C, Ben-Porath I, et al. Autocrine TGF- $\beta$  and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(46):20009-14.
81. Feng YF, Yuan F, Guo H, Wu WZ. TGF- $\beta$ 1 enhances SDF-1-induced migration and tube formation of choroid-retinal endothelial cells by up-regulating CXCR4 and CXCR7 expression. *Mol Cell Biochem.* 2014;397(1-2):131-8.
82. Wright N, de Lera TL, Garcia-Moruja C, Lillo R, Garcia-Sanchez F, Caruz A, et al. Transforming growth factor- $\beta$ 1 down-regulates expression of chemokine stromal

cell-derived factor-1: functional consequences in cell migration and adhesion. *Blood*. 2003;102(6):1978-84.

83. Buckley CD, Amft N, Bradfield PF, Pilling D, Ross E, Arenzana-Seisdedos F, et al. Persistent induction of the chemokine receptor CXCR4 by TGF-beta 1 on synovial T cells contributes to their accumulation within the rheumatoid synovium. *J Immunol*. 2000;165(6):3423-9.

84. Franitza S, Kollet O, Brill A, Vaday GG, Petit I, Lapidot T, et al. TGF-beta1 enhances SDF-1alpha-induced chemotaxis and homing of naive T cells by up-regulating CXCR4 expression and downstream cytoskeletal effector molecules. *Eur J Immunol*. 2002;32(1):193-202.

85. Penn MS. Importance of the SDF-1: CXCR4 axis in myocardial repair. *Circ Res*. 2009;104(10):1133-5.

86. Ghadge SK, Muhlstedt S, Ozcelik C, Bader M. SDF-1alpha as a therapeutic stem cell homing factor in myocardial infarction. *Pharmacol Ther*. 2011;129(1):97-108.

87. Zhang SJ, Song XY, He M, Yu SB. Effect of TGF-beta1/SDF-1/CXCR4 signal on BM-MSCs homing in rat heart of ischemia/perfusion injury. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(5):899-905.

88. Tang J, Wang J, Song H, Huang Y, Yang J, Kong X, et al. Adenovirus-mediated stromal cell-derived factor-1 alpha gene transfer improves cardiac structure and function after experimental myocardial infarction through angiogenic and antifibrotic actions. *Mol Biol Rep*. 2010;37(4):1957-69.

89. Rath D, Chatterjee M, Borst O, Muller K, Langer H, Mack AF, et al. Platelet surface expression of stromal cell-derived factor-1 receptors CXCR4 and CXCR7 is associated with clinical outcomes in patients with coronary artery disease. *J Thromb Haemost*. 2015;13(5):719-28.

90. Chen C, Lei W, Chen W, Zhong J, Gao X, Li B, et al. Serum TGF-beta1 and SMAD3 levels are closely associated with coronary artery disease. *BMC Cardiovasc Disord*. 2014;14:18.

91. Frantz S, Hu K, Adamek A, Wolf J, Sallam A, Maier SK, et al. Transforming growth factor beta inhibition increases mortality and left ventricular dilatation after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2008;103(5):485-92.

92. Stellos K, Bigalke B, Langer H, Geisler T, Schad A, Kogel A, et al. Expression of stromal-cell-derived factor-1 on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndrome and correlates with the number of CD34+ progenitor cells. *Eur Heart J*. 2009;30(5):584-93.

93. Geisler T, Fekecs L, Wurster T, Chiribiri A, Schuster A, Nagel E, et al. Association of platelet-SDF-1 with hemodynamic function and infarct size using cardiac MR in patients with AMI. *Eur J Radiol*. 2012;81(4):e486-90.

94. Zaruba MM, Theiss HD, Vallaster M, Mehl U, Brunner S, David R, et al. Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction. *Cell Stem Cell*. 2009;4(4):313-23.
95. Rath D, Schaeffeler E, Winter S, Hewer J, Muller K, Droppa M, et al. SDF1 Polymorphisms Influence Outcome in Patients with Symptomatic Cardiovascular Disease. *PLoS One*. 2016;11(9):e0161933.
96. Massberg S, Konrad I, Schurzinger K, Lorenz M, Schneider S, Zohlnhoefer D, et al. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med*. 2006;203(5):1221-33.
97. Stellos K, Bigalke B, Borst O, Pfaff F, Elskamp A, Sachsenmaier S, et al. Circulating platelet-progenitor cell coaggregate formation is increased in patients with acute coronary syndromes and augments recruitment of CD34+ cells in the ischaemic microcirculation. *Eur Heart J*. 2013;34(32):2548-56.
98. Hattori K, Heissig B, Tashiro K, Honjo T, Tateno M, Shieh JH, et al. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*. 2001;97(11):3354-60.
99. Zhang D, Fan GC, Zhou X, Zhao T, Pasha Z, Xu M, et al. Over-expression of CXCR4 on mesenchymal stem cells augments myoangiogenesis in the infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;44(2):281-92.
100. Si XY, Li JJ, Yao T, Wu XY. Transforming growth factor-beta1 in the microenvironment of ischemia reperfusion-injured kidney enhances the chemotaxis of mesenchymal stem cells to stromal cell-derived factor-1 through upregulation of surface chemokine (C-X-C motif) receptor 4. *Mol Med Rep*. 2014;9(5):1794-8.
101. Dewan MZ, Ahmed S, Iwasaki Y, Ohba K, Toi M, Yamamoto N. Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer. *Biomed Pharmacother*. 2006;60(6):273-6.
102. Walsh TG, Harper MT, Poole AW. SDF-1alpha is a novel autocrine activator of platelets operating through its receptor CXCR4. *Cell Signal*. 2015;27(1):37-46.
103. Lev PR, Salim JP, Marta RF, Osorio MJ, Goette NP, Molinas FC. Platelets possess functional TGF-beta receptors and Smad2 protein. *Platelets*. 2007;18(1):35-42.