



Technische Universität München
Fakultät für Medizin

Phänotypische Veränderungen von Blut-Monozyten während eines ST-Hebungs-Myokardinfarkts

Nicolás López Armbruster

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung eines
Doktors der Medizin (Dr. med.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Marcus Makowski

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Hendrik Sager
2. Prof. Dr. Lars Mägdefessel

Die Dissertation wurde am 16.05.2022 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.10.2022 angenommen.

Für meine Eltern, Laila und Sebastián

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	XII
Tabellenverzeichnis	XIII
Zusammenfassung	XV
Abstract	XVI
1 Einleitung	17
1.1 <i>Akuter Myokardinfarkt</i>	17
1.1.1 Definition	17
1.1.2 Epidemiologie.....	17
1.1.3 Pathophysiologie.....	18
1.1.4 Klinik und Diagnostik.....	19
1.1.5 Therapie	20
1.1.6 Komplikationen	22
1.2 <i>Monozyten und Makrophagen</i>	23
1.2.1 Subpopulationen von Monozyten	25
1.2.2 Subpopulationen von Makrophagen.....	26
1.2.3 Monozytäre Adhäsionskaskade	28
1.3 <i>Inflammation im akuten Myokardinfarkt</i>	30
1.3.1 Frühe inflammatorische Phase:.....	30
1.3.2 Späte inflammatorische Phase:	33
1.3.3 Immunopathologische Bedeutung von Monozyten im akuten Myokardinfarkt	33
1.3.4 Postischämische Inflammation als therapeutisches Angriffsziel	34
1.4 <i>Ziel der Arbeit</i>	36
2 Material	37
2.1 <i>Chemikalien, Puffer und Lösungen</i>	37
2.2 <i>Antikörper, Proteinkonjugate, MicroBeads</i>	38
2.3 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	40
2.4 <i>Komplett-Systeme (Kits)</i>	41
2.5 <i>Laborgeräte</i>	42

2.6	<i>Software</i>	42
2.7	<i>Datenbanken</i>	43
2.8	<i>Online Software</i>	43
3	Methoden	44
3.1	<i>Studienkollektiv</i>	44
3.1.1	Gruppen und Einschlusszeiträume	44
3.1.2	Ein- und Ausschlusskriterien	45
3.1.3	Erhobene Patientendaten	45
3.2	<i>Probengewinnung</i>	47
3.2.1	Zeitpunkte	47
3.2.2	Blutentnahme	48
3.3	<i>Leukozyten- und Plasmaisolation</i>	48
3.3.1	Leukozyten-Isolation	48
3.3.2	Konzentrationsbestimmung	48
3.3.3	Plasma-Isolation	49
3.4	<i>Monozyten-Isolation</i>	49
3.4.1	Dichtegradienten-Zentrifugation	49
3.4.2	Immunomagnetische Separation	50
3.4.3	Konzentrationsbestimmung	51
3.5	<i>RNA-Isolierung</i>	52
3.5.1	Aliquotportionierung	52
3.5.2	Lagerung und Probenauswahl	53
3.5.3	Flüssig-Flüssig-Extraktion	53
3.5.4	Festphasenextraktion	54
3.6	<i>Durchflusszytometrie</i>	55
3.6.1	Antikörper	56
3.6.2	Markierung der Oberflächenantigene	57
3.6.3	Kompensation	58
3.6.4	Datenauswertung	61
3.7	<i>Transkriptomanalyse</i>	64
3.7.1	Transkriptomsequenzierung	64
3.7.2	Aufarbeitung der Transkriptomdaten und funktionelle Analyse	64
3.7.3	Auswertung der Genexpressionsanalyse	65
3.8	<i>Statistische Auswertungen</i>	65
4	Ergebnisse	67

4.1	<i>Charakterisierung des Studienkollektivs</i>	67
4.1.1	Patientencharakteristika.....	67
4.1.2	Anzahl und Zeitpunkte der Blutentnahmen bei STEMI-Patienten	71
4.2	<i>Quantitative Veränderungen von Blut-Leukozyten nach Myokardinfarkt</i>	72
4.2.1	Blut-Leukozyten	72
4.2.2	Neutrophile Granulozyten im Blut	72
4.2.3	Blut-Lymphozyten.....	73
4.2.4	Blut-Monozyten.....	74
4.3	<i>Qualitative Veränderungen von Blut-Monozyten nach Myokardinfarkt</i>	76
4.3.1	Reinheit der Monozytenisolate.....	76
4.3.2	Differentiell exprimierte Gene und funktionelle Anreicherung.....	78
4.3.2.1	STEMI Tag 0 versus CCS:.....	78
4.3.2.2	STEMI Tag 3 versus CCS:.....	82
4.3.2.3	STEMI Tag 3 versus STEMI Tag 0:	85
5	Diskussion	91
5.1	<i>Quantitative Veränderungen</i>	91
5.2	<i>Differentiell exprimierte Gene</i>	93
5.2.1	Vermehrte Expression STEMI Tag 0 versus CCS:	93
5.2.2	Verminderte Expression STEMI Tag 0 versus CCS:	95
5.2.3	Vermehrte Expression STEMI Tag 3 versus CCS:	97
5.2.4	Verminderte Expression STEMI Tag 3 versus CCS:	98
5.2.5	Vermehrte Expression STEMI Tag 3 versus STEMI Tag 0:	98
5.2.6	Verminderte Expression STEMI Tag 3 versus STEMI Tag 0:	99
5.2.7	CYP19A1	99
5.2.8	THBS1	100
5.2.9	CLU	101
5.2.10	TRPM6	101
5.2.11	MTUS1	102
5.2.12	CRIP2.....	103
5.3	<i>Gen Ontologie</i>	103
5.3.1	STEMI Tag 0 versus CCS.....	103
5.3.2	STEMI Tag 3 versus CCS:.....	104
5.3.3	STEMI Tag 3 versus STEMI Tag 0:	104
5.3.4	Interleukin-1-Rezeptor Aktivität	105
5.3.5	Interleukin-18-Rezeptor Aktivität	106
5.3.6	Interleukin-21-Rezeptor Aktivität	106
5.3.7	CX3C-Chemokinrezeptor 1 Aktivität.....	107

5.4	<i>Limitationen</i>	108
5.5	<i>Zusammenfassung</i>	109
	Literaturverzeichnis	111
	Danksagung	128

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
ACS	Akutes Koronarsyndrom
ADP	Adenosindiphosphat
AMI	Akuter Myokardinfarkt
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
AV	Atrioventrikulär
BMI	Body-Mass-Index
BP	Band Pass
BSA	Rinderserum-Albumin
BV 510	Brilliant Violet 510
CCL	C-C Chemokin-Ligand
CCR	C-C Chemokin-Rezeptor
CCS	Chronisches Koronarsyndrom
CD	Cluster of Differentiation = Unterscheidungsgruppen
CI	Konfidenzintervall
CK	Kreatinkinase
cMoPs	Gemeinsame monozytäre Vorläuferzellen
CMPs	Gemeinsamen myeloische Vorläuferzellen
CPT	Cell Preparation Tube
CX3CL	CX3C Chemokin-Ligand
CX3CR	CX3C Chemokin-Rezeptor
CXCL	C-X-C Chemokin Ligand
Cy5.5 / Cy7	Cyanin 5.5 / Cyanin 7
DAMPs	Schadensassoziierte molekulare Muster
DEG	Differentiell exprimiertes Gen
DES	Medikament-freisetzender Stent
DNA / DNS	Desoxyribonucleic acid / Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease

EDTA	Dinatrium-Ethylendiamin-Tetraacetat
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
EKG	Elektrokardiogramm
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting = Durchflusszytometrie
Fc	Fragment kristallisierbar
FC	Fold change
FDR	Falscherkennungsrate
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtstreulicht
G	Erdbeschleunigung
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor
GMPs	Makrophagen- und Granulozyten-Progenitorzellen
HSPCs	Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen
ICAM	Interzelluläres-Adhäsions-Molekül
IL	Interleukin
IQR	Interquartilsabstand
KHK	Koronare Herzkrankheit
LFA-1	Lymphozyten-Funktion-assoziiertes-Antigen-1
lncRNA	Lange nicht-kodierende RNA
LP	Long Pass
LPS	Lipopolysaccharide
Ly-6C	Lymphozyten Antigen 6 Komplex
M-CSF	Monozyten-Kolonie-stimulierender-Faktor
Mac-1	Makrophagen-1-Antigen
MACS	Magnetische Zellseparation
MAPK	Mitogenaktivierten Proteinkinase
MDPs	Monozyten-Makrophagen-Dendriten-Progenitorzellen
MI	Myokardinfarkt
MINOCA	Myokardinfarkt mit nichtobstruktiven Koronararterien
mRNA	Messenger RNA
NF- κ B	Nukleärer Faktor Kappa B
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NSTEMI	Nicht-ST-Strecken-Hebungs-Myokardinfarkt

PBMCs	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCI	Perkutane Koronarintervention
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	Thrombozyten-Endothelzellen-Zell-Adhäsionsmolekül-1
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PRRs	Mustererkennungsrezeptoren
PSGL-1	P-Selektin-Glykoprotein-Liganden-1
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RBC	Rote Blutkörperchen
RNA / RNS	Ribonucleic acid / Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPM	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
snoRNA	Kleine nukleolare RNA
SSC	Seitwärtsstreulicht
STEMI	ST-Strecken-Hebungs-Myokardinfarkt
TGF- β	Transformierende Wachstumsfaktor β
TNF α	Tumornekrose Faktor α
VCAM	Vaskuläres-Zell-Adhäsions-Molekül
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VLA-4	Very late antigen-4

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Monozytäre Adhäsionskaskade.....	28
Abbildung 2: Inflammation im akuten Myokardinfarkt.....	32
Abbildung 3: Emissionsspektrum des Fluorochroms Brilliant Violet 510.....	59
Abbildung 4: Emissionsspektren der Fluorochrome FITC, PE, PerCP-Cy5.5 und PE-Cy7.	60
Abbildung 5: Emissionsspektren der Fluorochrome APC und APC-Cy7.....	61
Abbildung 6: Differenzierung monozytärer Subpopulationen.	62
Abbildung 7: Bestimmung der Reinheit und Thrombozyten Kontamination der CD14 ⁺ Isolation.	63
Abbildung 8: Differentialblutbild. Verlauf von Blut-Leukozyten bei STEMI vs. CCS.	72
Abbildung 9: Differentialblutbild. Verlauf von Neutrophilen Granulozyten im Blut bei STEMI vs. CCS.....	73
Abbildung 10: Differentialblutbild. Verlauf von Blut-Lymphozyten bei STEMI vs. CCS.	73
Abbildung 11: Differentialblutbild. Verlauf von Blut-Monozyten bei STEMI vs. CCS.....	74
Abbildung 12: Durchflusszytometrie. Verlauf von Blut-Monozyten bei STEMI vs. CCS.	75
Abbildung 13: Durchflusszytometrie. Verlauf monozytärer Subpopulationen.....	76
Abbildung 14: Durchflusszytometrie. Reinheit der sequenzierten Monozyten-Isolate.	77
Abbildung 15: Durchflusszytometrie. Thrombozyten Kontamination der sequenzierten Monozyten-Isolate.....	77
Abbildung 16: Differentielle Expression STEMI Tag 0 versus CCS.....	79
Abbildung 17: Differentielle Expression STEMI Tag 3 versus CCS.....	83
Abbildung 18: Differentielle Expression STEMI Tag 3 versus STEMI Tag 0.....	86

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien	37
Tabelle 2: In der Durchflusszytometrie verwendete monoklonale Primärantikörper .	38
Tabelle 3: In der Durchflusszytometrie verwendetes Streptavidin-Konjugat	39
Tabelle 4: Im MACS-Verfahren eingesetzte Antikörper-gekoppelte Magnetbeads ..	39
Tabelle 5: In der Durchflusszytometrie verwendete Beads	40
Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien	40
Tabelle 7: Verwendete Komplett-Systeme	41
Tabelle 8: Verwendete Laborgeräte	42
Tabelle 9: Verwendete Software und deren Anwendung	42
Tabelle 10: In der Durchflusszytometrie markierte Zelltypen	56
Tabelle 11: In der Durchflusszytometrie verwendete Fluorochrome.....	58
Tabelle 12: Charakteristika des gesamten Studienkollektivs.	67
Tabelle 13: Charakteristika des sequenzierten Studienkollektivs.	69
Tabelle 14: Vermehrt exprimierte Gene STEMI Tag 0 versus CCS.	78
Tabelle 15: Vermindert exprimierte Gene STEMI Tag 0 versus CCS.	80
Tabelle 16: „Molekulare Funktionen“ – Signifikante Anreicherungen der vermehrt exprimierten Gene STEMI Tag 0 versus CCS.	80
Tabelle 17: „Biologische Prozesse“ - Signifikante Anreicherungen der vermehrt exprimierten Gene STEMI Tag 0 versus CCS.	81
Tabelle 18: „Molekulare Funktionen“ - Signifikante Anreicherungen der vermindert exprimierten Gene STEMI Tag 0 versus CCS.	81
Tabelle 19: „Biologische Prozesse“ - Signifikante Anreicherungen der vermindert exprimierten Gene STEMI Tag 0 versus CCS.	82
Tabelle 20: Vermehrt exprimierte Gene STEMI Tag 3 versus CCS.	82
Tabelle 21: Vermindert exprimierte Gene STEMI Tag 3 versus CCS.	84
Tabelle 22: „Biologische Prozesse“ - Signifikante Anreicherungen der vermehrt exprimierten Gene STEMI Tag 3 versus CCS.	84
Tabelle 23: „Biologische Prozesse“ - Signifikante Anreicherungen der vermindert exprimierten Gene STEMI Tag 3 versus CCS.	85
Tabelle 24: Vermehrt exprimierte Gene STEMI Tag 3 versus STEMI Tag 0.....	85

Tabelle 25: Vermindert exprimierte Gene STEMI Tag 3 versus STEMI Tag 0.	86
Tabelle 26: „Molekulare Funktionen“ – Signifikante Anreicherungen der vermehrt exprimierten Gene STEMI Tag 3 versus STEMI Tag 0.	87
Tabelle 27: „Biologische Prozesse“ - Signifikante Anreicherungen der vermehrt exprimierten Gene STEMI Tag 3 versus STEMI Tag 0.	88
Tabelle 28: „Molekulare Funktionen“ - Signifikante Anreicherungen der vermindert exprimierten Gene STEMI Tag 3 versus STEMI Tag 0.	89
Tabelle 29: „Biologische Prozesse“ - Signifikante Anreicherungen der vermindert exprimierten Gene STEMI Tag 3 versus STEMI Tag 0.	89

Zusammenfassung

Im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes entsteht eine sterile kardiale Wunde. Diese bedingt eine systemische inflammatorische Antwort und die Rekrutierung hunderttausender Monozyten in das Infarktareal. In der frühen inflammatorischen Phase phagozytieren die bereitgestellten Monozyten nekrotische Zellen und Debris und setzen Entzündungsmediatoren frei, in der darauffolgenden reparativen Phase spielen sie eine entscheidende Rolle für die Bildung einer kollagenreichen Narbe.

Es stellte sich die Frage, ob für eine optimale Heilungsphase nach einem Myokardinfarkt nicht nur vermehrt (quantitative Veränderungen), sondern auch phänotypisch verschiedene Monozyten (qualitative Veränderungen) bereitgestellt werden. Das Ziel dieser explorativen Arbeit war die Charakterisierung der phänotypischen Veränderungen zirkulierender klassischer, inflammatorischer (CD14-positiver) Blut-Monozyten nach einem akuten Myokardinfarkt beim Menschen.

Mittels Transkriptom-Sequenzierung isolierter CD14-positiver Blut-Monozyten bei Patienten mit akutem ST-Strecken-Elevations-Infarkt zu zwei verschiedenen Zeitpunkten wurden die Genexpressionsänderungen im Zuge der inflammatorischen Antwort untersucht. Als Kontrollgruppe dienten Patienten mit einem chronischem Koronarsyndrom.

Die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung zeigen eine hochsignifikante differentielle Expression zahlreicher Gene in CD14-positiven Blut-Monozyten sowohl im Verlauf nach einem Myokardinfarkt als auch im Vergleich zu Patienten mit chronischem Koronarsyndrom. Die Analyse zeigt bei den Blut-Monozyten im Anschluss an eine myokardiale Ischämie zunächst pro-inflammatorische und später entzündungslimitierende Anpassungen. Insbesondere die differentielle Expression der Gene CYP19A1, THBS1, CLU, TRPM6, MTUS1, CRIP2, IL1R2, IL1R1, IL1RAP, IL18R1, IL18RAP, IL21R und CX3CR1 deutet auf eine wichtige Beteiligung an der phänotypischen Regulation der monozytären Immunantwort hin.

Diese Ergebnisse assoziativer Natur zeigen in ihrer Gesamtheit eine phänotypische Dynamik der zirkulierenden Blut-Monozyten nach einem Myokardinfarkt und können als wichtige Grundlage für weitere Folgeprojekte zu bisher ungenügend erforschten pathophysiologischen Abläufen nach stattgehabtem Myokardinfarkt dienen.

Abstract

Myocardial infarction inflicts a sterile wound on the heart. The following systemic inflammatory response results in recruitment of hundreds of thousands of monocytes to the infarcted heart. Recruited monocytes remove necrotic cells and debris, release inflammatory mediators, and play a pivotal role in the sequential phases of cardiac injury and repair.

This raised the question whether an optimal postischemic healing apart from an increased number of monocytes (quantitative changes) requires the supply of phenotypically different monocytes (qualitative changes). The objective of this exploratory study was to characterize phenotypical changes in circulating classical, inflammatory (CD14-positive) human blood monocytes during myocardial infarction. Performing transcriptomic profiling of CD14-positive human blood monocytes isolated from patients with ST-elevation myocardial infarction at two different time points, we studied changes in gene expression during the inflammatory response. As control group we enrolled patients with chronic coronary syndrome.

RNA-sequencing results show highly significant differential expression of numerous genes in CD14-positive monocytes. Those changes occurred during the course of myocardial infarction and also in comparison to patients with chronic coronary syndrome. Analysis revealed pro-inflammatory adaptations in the early inflammatory phase following myocardial ischemia and anti-inflammatory changes toward the end of the inflammatory phase. Specifically, differential expression of genes CYP19A1, THBS1, CLU, TRPM6, MTUS1, CRIP2, IL1R2, IL1R1, IL1RAP, IL18R1, IL18RAP, IL21R and CX3CR1 indicates their importance for the regulation of the monocytic immune response.

Taken together the results show phenotypical dynamics of circulating human blood monocytes after acute myocardial infarction. They can serve as a reference for further investigations of pathophysiological alterations after myocardial infarction.

1 Einleitung

1.1 Akuter Myokardinfarkt

1.1.1 Definition

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist definiert als Akkumulation atherosklerotischer Plaques in den Koronararterien und kann anhand der klinischen Präsentation in akute Koronarsyndrome (ACS) und chronische Koronarsyndrome (CCS) unterteilt werden. Als CCS werden die folgenden klinischen Manifestationen der KHK laut aktuellen Leitlinien definiert (Knuuti et al., 2020): Stabile pektanginöse Beschwerden, Luftnot, eine neu aufgetretene Herzinsuffizienz oder linksventrikuläre Dysfunktion bei Verdacht auf Bestehen einer KHK. Ferner eine stabile oder fehlende Symptomatik bei Patienten nach stattgehabtem ACS oder nach Revaskularisation, pektanginöse Beschwerden bei Verdacht auf eine vasospastische oder mikrovaskuläre Erkrankung sowie eine per Screening diagnostizierte asymptomatische KHK. Im Gegensatz dazu werden heutzutage unter dem ACS die Krankheitsbilder STEMI, NSTEMI und instabile Angina pectoris subsummiert (Braunwald & Morrow, 2013; Collet et al., 2021; Ibanez et al., 2018; Thygesen et al., 2018).

Der akute Myokardinfarkt (AMI) ist definiert als Nekrose von Kardiomyozyten im klinischen Kontext einer akuten myokardialen Ischämie (Collet et al., 2021). Ein ST-Strecken-Hebungs-Myokardinfarkt (STEMI) ist definiert als AMI mit ST-Strecken-Elevationen in mindestens zwei zusammenhängenden elektrokardiographischen Ableitungen, während ein AMI ohne ST-Strecken-Elevationen als Nicht-ST-Strecken-Elevations-Infarkt (NSTEMI) bezeichnet wird (Thygesen et al., 2018).

1.1.2 Epidemiologie

Die koronare Herzkrankheit (KHK) stellt seit Jahren weltweit die führende Todesursache dar. Im Jahr 2019 war sie für 16 % und damit 9,14 Millionen aller weltweit Verstorbenen verantwortlich (GBD 2019 Collaborators, 2020). Im Jahr 2018 starben in Deutschland 18 % und damit 170 000 Menschen an den Folgen einer koronaren Herzerkrankung. Darunter hatten 46 000 und damit 5 % aller in

Deutschland Verstorbenen einen AMI erlitten (Statistisches Bundesamt, 2020). Die Prävalenz akuter Herzinfarkte steigt mit dem Lebensalter, was trotz sinkender Inzidenzen aufgrund der Alterung der Gesellschaft auch zukünftig steigende Fallzahlen erwarten lässt (Benjamin et al., 2019). Trotz sinkender Mortalität nach einem STEMI in den letzten 20 Jahren (Gale et al., 2014; Etienne Puymirat et al., 2012) beträgt diese in Europa weiterhin bis zu 10 % (Ibanez et al., 2018). Ferner ist die koronare Herzerkrankung mittlerweile die häufigste Ursache einer Herzinsuffizienz in Industrienationen (Benjamin et al., 2019; Gheorghiade et al., 2006).

1.1.3 Pathophysiologie

Die Mehrheit der AMIs sind Komplikationen einer koronaren Herzerkrankung. Circa vier Fünftel aller akuten Koronarsyndrome gehen auf die Formation einer koronaren Atherothrombose zurück (Crea & Libby, 2017). Deren häufigste Ursachen sind Rupturen und Erosionen atherosklerotischer Plaques in den Koronargefäßen (Jia et al., 2013). Infarkte, welche auf diese Genese zurückzuführen sind, werden als Typ 1 Myokardinfarkte klassifiziert (Thygesen et al., 2018). Die Folge ist eine distal der Gefäßokklusion entstehende Ischämie. Bereits 10 bis 15 Minuten nach Beginn der Ischämie entstehen die ersten strukturellen Schäden im Infarktareal, welche bei ausbleibender Reperfusion in myokardialen Nekrosen resultieren (Jennings & Ganote, 1974). Im Falle einer vollständigen Gefäßokklusion entsteht ein transmuraler Infarkt, während aus einer subtotalen Okklusion eine Infarzierung der myokardialen Innenschicht resultiert. Erstere liegt den meisten STEMIs zugrunde und Letztere präsentiert sich in der Regel als NSTEMI (Srikanth & Ambrose, 2012). Männer und junge Patienten erleiden häufiger STEMIs als Frauen und ältere Patienten (Khera et al., 2015).

Zirka ein Fünftel der akuten Koronarsyndrome sind nicht auf eine Koronarthrombose zurückzuführen. Die Ursache solcher Infarkte kann ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und -angebot sein (Myokardinfarkt Typ 2) und auf atherosklerotische und nicht-atherosklerotische Erkrankungen zurückzuführen sein. Wenn im Rahmen eines plötzlichen Herztods ischämietypische Symptome und neue ischämietypische EKG-Veränderungen auftreten, jedoch vor Todeseintritt keine Blutentnahme und Bestimmung der Biomarker erfolgen konnte, wird die Diagnose eines Typ 3 Myokardinfarktes gestellt. In Assoziation zu koronaren Interventionen oder Bypass-

Operationen auftretende ischämische Myokardschäden werden als Myokardinfarkte Typ 4 oder Typ 5 bezeichnet. (Thygesen et al., 2018)

Bei Vorliegen eines AMI und Fehlen einer obstruktiven Koronarstenose in der Koronarangiographie wird zudem von einem Myokardinfarkt mit nichtobstruktiven Koronararterien (MINOCA) gesprochen (Agewall et al., 2017).

1.1.4 Klinik und Diagnostik

Das Einsetzen der myokardialen Ischämie führt zum Beginn der Symptomatik. Diese ist üblicherweise charakterisiert durch Brustschmerzen oder retrosternales Druckgefühl mit akutem Beginn und teils Ausstrahlung in benachbarte Körperregionen. Die häufigsten Projektionsorte des ischämischen Schmerzes sind nach absteigender Häufigkeit die linke obere Extremität, der Unterkiefer sowie Rücken und Oberbauch. Die Schmerzen sind klassischerweise bewegungsunabhängig, diffus und in der körperlichen Untersuchung durch Palpation nicht beeinflussbar. Ferner kann es zu vegetativer Begleitsymptomatik wie Todesangst, Übelkeit und Erbrechen kommen. Neben Palpitationen kann es als symptomatisches Korrelat eines kardiogenen Schocks zu Dyspnoe, Blässe und letztlich zum Bewusstseinsverlust und Kreislaufstillstand kommen. Jedoch kann ein AMI insbesondere bei Menschen mit autonomer diabetischer Neuropathie mit atypischen Symptomkonstellationen oder gar symptomlos verlaufen (Thygesen et al., 2018).

Für die Diagnose eines AMI muss eine dynamische Erhöhung des kardialen Troponins sowie der Nachweis einer myokardialen Ischämie anhand von Symptomatik, EKG-Veränderungen oder Bildgebung vorliegen. Folglich sind Anamnese, körperliche Untersuchung, Elektrokardiographie, Labordiagnostik und bildgebende Diagnostik essenziell für die Diagnose eines AMI. Mittels gezielter Anamnese lassen sich neben der eben genannten Symptomatik auch Ischämie- und Komplikationsrisiko der Patienten eruieren. Mit der initialen körperlichen Untersuchung können insbesondere Frühkomplikationen wie akute Herzinsuffizienz und ein kardiogener Schock erkannt werden. Die erste apparative Diagnostik stellt das 12-Kanal-EKG dar, welches nach geltenden Leitlinien innerhalb von zehn Minuten nach Erstkontakt angefertigt und interpretiert werden sollte (Collet et al., 2021). Es dient zunächst der Unterscheidung zwischen NSTEMI und STEMI und im weiteren Verlauf dem kontinuierlichen Monitoring. Bei NSTEMIs kann das EKG normal sein, in der Mehrheit der Patienten

kommt es jedoch zu ST-Strecken-Senkungen, transienten ST-Strecken-Hebungen oder T-Wellen Veränderungen. Für die Diagnose eines STEMI müssen ST-Strecken-Elevationen in mindestens zwei zusammenhängenden elektrokardiographischen Ableitungen vorliegen. Bei Patienten mit Links- oder Rechtsschenkelblock oder mit ventrikulären Schrittmachern kann die Diagnose eines STEMI erschwert sein. Diese Patienten sollten bei klinischem Verdacht auf eine fortbestehende myokardiale Ischämie bis zum Beweis des Gegenteils wie STEMI Patienten behandelt werden (Ibanez et al., 2018). Arrhythmien und AV-Blockaden stellen weitere unspezifische EKG-Veränderungen dar, die mit einem AMI assoziiert sein können. Der elektrokardiographischen Untersuchung sollte sich, sobald verfügbar, eine Blutentnahme zur Biomarker Bestimmung anschließen. Dabei sollte eine sequenzielle Bestimmung des kardialen Troponins vorzugsweise mit hochsensitiven Assays durchgeführt werden. Kardiale Troponine weisen im Vergleich zu anderen Laborparametern wie Kreatinkinase und Myoglobin eine höhere Sensitivität und Spezifität für den Nachweis einer kardiomyozytären Schädigung auf. Bei klinischem Anhalt für eine myokardiale Ischämie gilt die dynamische Erhöhung des kardialen Troponins über der 99. Perzentile gesunder Individuen als Nachweis eines AMI (Collet et al., 2021). Der Diagnose eines AMI schließt sich eine Koronarangiographie an, welche sowohl diagnostisch als auch therapeutisch von großer Bedeutung ist. Im Falle eines STEMI sollte diese so schnell wie möglich erfolgen, bei einem NSTEMI sollte sie innerhalb von 24 Stunden durchgeführt werden. Neben der Koronarangiographie stellt vor allem die Echokardiographie eine wichtige bildgebende Diagnostik dar. Sie dient der Darstellung infarkttypischer Veränderungen wie regionaler Wandbewegungsstörungen und möglicher Differentialdiagnosen und Komplikationen eines AMI.

1.1.5 Therapie

Das akuttherapeutische Ziel ist die Limitation des ischämischen Myokardschadens durch die Reduktion des akuten Sauerstoffdefizits im betroffenen Infarktareal und die Verkürzung der Ischämiezeit. Die unterstützende medikamentöse Behandlung von Schmerz und Unruhezuständen dient hierbei der Ökonomisierung der Herzarbeit und resultiert in einem verminderten Sauerstoffbedarf. Hierfür werden in Abhängigkeit der Symptomatik insbesondere Analgetika, Anxiolytika und Antiemetika verabreicht. Der

Erhalt und die Steigerung der Perfusion erhöhen hingegen das Sauerstoffangebot im Infarktareal. Im Falle einer atherothrombotischen Genese wird hierfür der Eindämmung einer zunehmenden Gefäßokklusion durch Thrombozytenaggregationshemmung und Antikoagulation eine entscheidende Rolle zuteil. Im Falle eines STEMI soll laut geltenden Leitlinien sowohl eine duale Thrombozytenaggregationshemmung mit Acetylsalicylsäure und ADP-Rezeptor-Hemmern als auch eine Antikoagulation mit Heparinen erfolgen (Ibanez et al., 2018). Im Falle eines NSTEMI sollte in Abhängigkeit des Blutungs- und Ischämierisikos eine einfache oder duale Thrombozytenaggregationshemmung sowie eine Antikoagulation mit Heparinen erfolgen (Collet et al., 2021).

Durch Wiederherstellung der Blutzufuhr in der initialen Phase des Myokardinfarkts können Infarktareale gerettet werden, welche durch die Ischämie noch keine irreversible Schädigung erfahren haben. Die primäre perkutane Koronarintervention (PCI) stellt beim AMI und insbesondere beim STEMI die bevorzugte Reperfusionstrategie dar. Sie sollte bei STEMI Patienten stets so früh wie möglich erfolgen. Dabei sollte die Durchführung der PCI innerhalb von zwei Stunden nach Diagnosestellung und innerhalb von zwölf Stunden nach Symptombeginn angestrebt werden (Ibanez et al., 2018). Sollte Letzteres nicht möglich sein, ist in Ausnahmefällen eine alternative medikamentöse Fibrinolyse indiziert. Jene sollte innerhalb von zehn Minuten nach Diagnose und idealerweise bereits im präklinischen Setting erfolgen. Anschließend muss der Patient dennoch einem Koronarinterventionszentrum zugeführt werden. Denn auch nach Fibrinolyse muss eine PCI je nach Erfolg der Thrombolyse entweder unmittelbar oder innerhalb von 24 Stunden erfolgen. Die PCI sollte nach derzeitigem Erkenntnisstand bevorzugt über einen radialen Zugang (Jolly et al., 2011; Valgimigli, Frigoli, et al., 2018) und mit Implantation von Drug-eluting-Stents (DES) der neusten Generation (Garot et al., 2017; Palmerini et al., 2014; Urban et al., 2015) erfolgen. Der interventionellen Reperfusion schließt sich eine intensivmedizinische Überwachung für ein bis zwei Tage mit Monitoring, laborchemischer Verlaufskontrolle, Elektro- und Echokardiographie an.

Im Anschluss an die geschilderte Akuttherapie sollte eine Lebensstilmodifikation sowie Pharmakotherapie zur Sekundärprävention und Vermeidung eines ungünstigen kardialen Remodelings erfolgen. Empfohlene Lebensstilinterventionen sind Nikotinkarenz, mediterrane Ernährung, Gewichtsreduktion und Steigerung der

körperlichen Aktivität (Anderson et al., 2016; Chow et al., 2010; Piepoli et al., 2016). Unter die pharmakologische Therapie nach erlittenem AMI fällt die duale Thrombozytenaggregationshemmung mit Aspirin und einem ADP-Rezeptor-Hemmer. Sie ist nach erfolgter PCI grundsätzlich für zwölf Monate indiziert und kann in Dauer und Zusammensetzung je nach Blutungs- und Ischämierisiko sowie Komorbiditäten der Patienten modifiziert werden (Valgimigli, Bueno, et al., 2018). Sie dient der Vermeidung einer In-Stent-Restenose und sollte nach Beendigung als lebenslange Monotherapie mit Aspirin fortgeführt werden (Antithrombotic Trialists et al., 2009). Zudem ist bei allen Patienten ohne Kontraindikationen eine Langzeittherapie mit oralen Betablockern indiziert, welche bei hämodynamisch stabilen Patienten innerhalb der ersten 24 Stunden begonnen werden sollte (Bugiardini et al., 2016; Goldberger et al., 2015). Weiterhin ist der frühzeitige Beginn einer lipidsenkenden pharmakologischen Therapie mittels Statinen oder alternativer Lipidsenker indiziert (Baigent et al., 2005). Zur Vermeidung eines ungünstigen kardialen Remodelings und zusätzlich zur Behandlung einer etwaigen Hypertension kommen ACE-Hemmer oder Sartane bei allen Patienten nach AMI zur Anwendung (Heart Outcomes Prevention Evaluation Study et al., 2000).

1.1.6 Komplikationen

Ein AMI stellt ein lebensbedrohliches Ereignis dar und kann zu zahlreichen Früh- und Spätkomplikationen führen. Abhängig von der Größe und der Lokalisation des Infarkts können plötzlicher Herztod, kardiogener Schock, schwere Herzrhythmusstörungen, akute und chronische Herzinsuffizienz, Herzwandrupturen und Ventrikelaneurysmen mögliche Folgen eines AMI sein.

Der kardiogene Schock ist definiert als persistierende Hypotension im euvolämen Zustand mit Zeichen einer Hypoperfusion, verursacht durch eine kritische Verminderung der kardialen Pumpleistung. Er tritt in 6-10 % aller STEMIs auf und geht mit einer Krankenhausmortalität von über 50 % einher (Goldberg, Spencer, Gore, Lessard, & Yarzebski, 2009). Im Falle eines kardiogenen Schocks muss frühestmöglich die Genese der verminderten kardialen Pumpleistung evaluiert und behandelt werden. So sind ausgedehnte Myokardinfarkte mit konsekutiv großem Verlust von kontraktilem Myokard sowie Herzrhythmusstörungen mögliche Ursachen. Neben einer überbrückenden, kontrollierten Volumentherapie und kurzzeitigen

pharmakologischen Kreislaufstabilisierung durch Vasokonstriktoren und Inotropika hat die schnellstmögliche Reperfusion durch eine primäre PCI oberste Priorität (Ibanez et al., 2018).

Erfreulicherweise haben stetig verbesserte invasive und medikamentöse Behandlungsmöglichkeiten in den letzten Jahrzehnten zu einer stetigen Reduktion der Mortalität nach einem AMI geführt (Fox, Evans, Larson, Kannel, & Levy, 2004; E. Puymirat et al., 2017; Yeh et al., 2010). Dadurch ist jedoch die Prävalenz der Herzinsuffizienz als Folge eines Myokardinfarktes deutlich gestiegen (Elgendy, Mahtta, & Pepine, 2019; Gheorghiade et al., 2006). Diese stellt mit einer geschätzten Inzidenz von 10-40 % die häufigste Komplikation eines AMI dar (Weir, McMurray, & Velazquez, 2006). Sie bedingt eine dramatisch erhöhte Mortalität im Vergleich zu Herzinfarktpatienten ohne konsekutive Herzinsuffizienz (Desta et al., 2015). Pathophysiologisch liegt ihr sowohl der infarktbedingte Verlust kontraktiven Myokards zugrunde, als auch unvorteilhaftes kardiales Remodeling, welches oft auch das nicht infarzierte Myokard betrifft (Sutton & Sharpe, 2000).

1.2 Monozyten und Makrophagen

Monozyten sind Zellen des mononukleär-phagozytären Systems und entspringen gemeinsamen myeloischen Vorläuferzellen (common myeloid progenitors = CMPs) (Guilliams et al., 2014). Letztere differenzieren sich im Rahmen der Monozytopoese zu Makrophagen- und Granulozyten-Progenitorzellen (granulocyte and macrophage progenitors = GMPs) (Akashi, Traver, Miyamoto, & Weissman, 2000). Aus diesen wiederum gehen Monozyten-Makrophagen-Dendriten-Progenitorzellen hervor (monocyte-macrophage/dendritic cell precursors = MDPs). Die Differenzierung von MDPs zu Monozyten erfolgt über eine Entwicklung zu gemeinsamen monozytären Vorläuferzellen (common monocyte progenitors = cMoPs) (Hettinger et al., 2013). Jedoch stellt die Entstehung reifer Monozyten nach diesem strikt hierarchischen Modell eine Vereinfachung der tatsächlichen Vorgänge dar. Neue Untersuchungen haben bei multipotenten hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen eine ausgeprägte Heterogenität gezeigt. Zudem finden, abhängig von äußeren Einflussfaktoren, Differenzierungen hin zu einem bestimmten Zelltyp früher und dynamischer als im beschriebenen hierarchischen Modell statt (Guilliams, Mildner, &

Yona, 2018; Liu et al., 2019). Während die beschriebene Myelopoese im homöostatischen Zustand größtenteils im Knochenmark erfolgt, findet im Rahmen inflammatorischer Erkrankungen wie einem AMI auch eine verstärkte extramedulläre Myelopoese, vor allem in der Milz, statt (F. Leuschner et al., 2012).

Monozyten und Makrophagen sind durch eine große Heterogenität und Plastizität gekennzeichnet. Der Großteil der Monozyten zirkuliert nach seiner Reifung im Knochenmark nur für kurze Zeit im peripheren Blut. Anschließend emigrieren die meisten in das extravaskuläre Gewebe, wo sie entweder Antigene phagozytieren und zu Lymphknoten transportieren oder unter inflammatorischen Einflüssen zu phagozytotischen Makrophagen oder dendritischen Zellen ausdifferenzieren (Jakubzick et al., 2013). Im peripheren Blut des Menschen haben sie einen Anteil von 3-7 % an allen zirkulierenden Leukozyten, was einer Konzentration von 250 – 850 Zellen / μl entspricht.

Monozyten und Makrophagen sind maßgeblich an der Initiation und Regulation inflammatorischer Prozesse beteiligt und zählen neben neutrophilen Granulozyten zu den primären Entzündungszellen. Entzündungsreaktionen sind sowohl für die Abwehr von Krankheitserregern als auch für die Beseitigung und Reparatur von sterilen Gewebsschäden unabdingbar.

Durch die Expression von Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) haben sie die Fähigkeit, Entzündungsinduktoren zu erkennen. Als diese fungieren einerseits molekulare Komponenten von Krankheitserregern sowie andererseits Moleküle, welche Gewebsschäden anzeigen. Durch die Aktivierung der PRRs werden auf der einen Seite in Monozyten selbst Effektorfunktionen ausgelöst und auf der anderen Seite durch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren die inflammatorische Reaktion verstärkt (Murphy & Weaver, 2018a, 2018b).

Phagozytose und das Prozessieren von invadierenden Mikroorganismen sowie toten Zellen und Zelldebris stellen die wohl wichtigsten Effektorfunktionen von Monozyten dar. Ferner sezernieren sie aufgrund differentieller Aktivierung und unterschiedlicher phänotypischer Subtypen teils gegensätzlich wirkende Mediatoren. Durch Produktion von verschiedenen Zytokinen können sie damit sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Funktionen übernehmen und so die konsekutiven Phasen einer Entzündung dirigieren. Zu den Mediatoren zählen Chemokine, Gerinnungs- und

thrombogene Faktoren, toxische Radikale, Proteasen, pro-angiogene sowie Wachstumsfaktoren (Murphy & Weaver, 2018c).

Zusammenfassend leisten Monozyten und Makrophagen durch ihre vielseitigen Funktionen einen entscheidenden Beitrag zur Wundheilung und Gewebsreparation. Außerdem wird ihnen eine außerordentliche Rolle als erste Abwehrlinie der angeborenen Immunität zuteil und durch die Befähigung zur Antigenpräsentation stellen sie ein Bindeglied zur erworbenen Immunantwort dar.

Aus der maßgeblichen Partizipation an den beschriebenen physiologischen Prozessen resultiert jedoch auch ihre immunopathologische Bedeutung in adversen Heilungsprozessen und überschießenden inflammatorischen Reaktionen.

1.2.1 Subpopulationen von Monozyten

Zur Erfüllung der vielseitigen und wie bereits angedeutet teils gegenläufigen Aufgaben, existieren innerhalb der heterogenen Gruppe der humanen Blut-Monozyten mindestens drei unterschiedliche Subtypen:

- klassische inflammatorische CD14⁺ CD16⁻ Monozyten
- intermediäre CD14⁺ CD16⁺ Monozyten
- nicht-klassische CD14^{low} CD16⁺ Monozyten.

Humane klassische und intermediäre Monozyten entsprechen am ehesten den murinen inflammatorischen Ly6C^{high} Monozyten, während die humanen nicht-klassischen Monozyten überwiegend murinen Ly6C^{low} Monozyten entsprechen. Durch Studien an Mäusen konnte gezeigt werden, dass Ly6C^{low} Monozyten aus Ly6C^{high} Monozyten hervorgehen (Yona et al., 2013). Beim Menschen entwickeln sich unter Einfluss des Monozyten-Kolonie-stimulierenden-Faktors (M-CSF) aus den klassischen zunächst intermediäre und anschließend nicht-klassische Monozyten (Korkosz, Bukowska-Strakova, Sadis, Grodzicki, & Siedlar, 2012; Patel et al., 2017).

CD14⁺ CD16⁻ Monozyten:

Die klassischen pro-inflammatorischen CD14⁺ CD16⁻ Monozyten stellen beim Menschen die zahlenmäßig größte Subpopulation dar und machen 80 – 90 % aller Blut-Monozyten aus. Sie zeichnen sich durch starke Expression des LPS Co-Rezeptors CD14 und des Chemokin-Rezeptors CCR2 sowie schwache Expression

von CX3CR1 aus. Im nicht-inflammatorischen Grundzustand patrouillieren sie im extravaskulären Gewebe auf der Suche nach Antigenen, um diese zu Lymphknoten zu transportieren (Jakubzick et al., 2013). Unter inflammatorischen Einflüssen werden sie zum Ort der Entzündung rekrutiert und differenzieren dort zu pro-inflammatorischen Makrophagen (Auffray, Sieweke, & Geissmann, 2009; Sager & Nahrendorf, 2016; Wong et al., 2011).

CD14⁺ CD16⁺ Monozyten:

Dieser intermediäre Subtyp macht beim Menschen circa 2-11 % der Blut-Monozyten aus und zeichnet sich durch starke Expression von CD14 und moderater Expression des Fc γ Rezeptors CD16 aus. Ferner verfügen sie über eine schwache Expression von CCR2 und CCR5, sowie starker Expression von CX3CR1. Außerdem exprimieren sie die Fc γ Rezeptoren CD64 und CD32, produzieren große Mengen inflammatorischer Zytokine, wie Tumornekrose Faktor α (TNF α) und Interleukin 1 β (IL-1 β), und weisen eine starke phagozytotische Aktivität auf. Auch sie verweilen nur kurz im peripheren Blut und akkumulieren und differenzieren sich in inflammatorisch aktivem Gewebe (Gerhardt & Ley, 2015; Grage-Griebenow et al., 2001; Wong et al., 2011).

CD14^{low} CD16⁺ Monozyten:

Die nicht-klassischen CD14^{low} CD16⁺ Monozyten machen beim Menschen circa 10-20 % der Blut-Monozyten aus und zeichnen sich durch schwache Expression von CD14 und CCR2 sowie starker Expression von CD16 und CX3CR1 aus. Sie patrouillieren im intravaskulären Raum und spielen eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der endothelialen Homöostase (Carlin et al., 2013). Außerdem verfügen sie über geringe phagozytotische Aktivität und produzieren keine pro-inflammatorischen Zytokine (Auffray et al., 2009; Gerhardt & Ley, 2015; Wong et al., 2011).

1.2.2 Subpopulationen von Makrophagen

Makrophagen bilden die wichtigste phagozytierende Zellpopulation und kommen als residente Gewebsmakrophagen in nahezu allen Geweben vor, so auch im gesunden Myokard. Im gesunden Myokard machen sie die größte Fraktion der Leukozyten aus

(Epelman, Lavine, & Randolph, 2014). Neue Studien implizieren eine ausgeprägte Heterogenität der residenten kardialen Makrophagen selbst im Grundzustand (S. Epelman et al., 2014). Im Gegensatz zur früheren Annahme, bei gewebsresidenten Makrophagen handele es sich um differenzierte Monozyten, ist mittlerweile bekannt, dass kardiale und andere residente Makrophagen in der Embryonalentwicklung sowohl entstehen als auch in das Gewebe gelangen (Hashimoto et al., 2013; Schulz et al., 2012; Yona et al., 2013). Diese erhalten sich in der myokardialen Homöostase überwiegend durch in-situ Proliferation und unabhängig von Blut-Monozyten (S. Epelman et al., 2014; Heidt et al., 2014). Im gesunden Herzen dienen sie dem Erhalt der Homöostase, indem sie eindringende Pathogene, untergehende Zellen und Debris phagozytieren, ohne inflammatorische Reaktionen auszulösen, anti-entzündliche Faktoren freisetzen sowie Angiogenese und Fibrose fördern (Pinto, Godwin, & Rosenthal, 2014).

Jedoch resultiert eine ischämische Schädigung des Myokards in einer unmittelbaren Induktion einer starken Entzündungsreaktion und dem Untergang der ortsansässigen Makrophagen (Heidt et al., 2014). Durch die Freisetzung pro-inflammatorischer Faktoren, welche unter anderem die lokale Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen bewirken, wird die Extravasation zahlreicher Leukozyten aus dem Blutstrom in das Infarktareal ermöglicht. Bereits nach wenigen Stunden invadieren somit neutrophile Granulozyten in großer Zahl das Infarktareal und nach einem Tag akkumulieren vermehrt pro-inflammatorische Monozyten am Ort der Entzündung (M. Nahrendorf et al., 2007). Letztere erreichen ihren zahlenmäßigen Höhepunkt am zweiten bis dritten Tag nach Infarkt und differenzieren sich zu pro-inflammatorischen Makrophagen-Phänotypen, welche die untergegangenen gewebsresidenten Makrophagen ersetzen. Diese entzündungsfördernden Makrophagen wurden bisher unter dem sogenannten M1-Subtyp subsummiert. Doch deuten mittlerweile viele Untersuchungen daraufhin, dass es sich dabei um eine Vereinfachung der wirklichen in-vivo Zustände handelt, und es sich selbst beim Subtyp der M1-Makrophagen um eine heterogene Gruppe handelt (Matthias Nahrendorf & Swirski, 2016). Nichtsdestotrotz besteht Konsens darüber, dass diese Makrophagen in den ersten 5 Tagen nach dem Infarkt gemeinsam mit Neutrophilen dem Abbau extrazellulärer Matrix, nekrotischer Zellen und Debris dienen, wofür sie fibrolytische Proteasen und freie Radikale freisetzen sowie Phagozytose betreiben. Dieser frühen

inflammatorischen Phase schließt sich ab dem dritten bis fünften Tag eine späte reparative Phase an, welche sich durch eine phänotypische Veränderung der Makrophagen im Infarktreal charakterisiert. Die entzündungsbegrenzenden und pro-reparativen Makrophagen zeichnen sich vor allem durch pro-angiogene und pro-fibrogene Effekte aus. Dadurch wird die Blutzufuhr zum entstehenden Granulationsgewebe gewährleistet und die Bildung einer kollagen-basierten Narbe gesteuert (Sager, Kessler, & Schunkert, 2017).

1.2.3 Monozytäre Adhäsionskaskade

Da sich viele Effektorfunktionen von Monozyten im extravasalen Raum ereignen, ist eine kontinuierliche Diapedese notwendig. Dafür rollen die Monozyten zunächst auf dem aktivierten Endothel, woraufhin Adhäsion, laterale Lokomotion und letztendlich Transmigration folgen. Für diesen schrittweisen Prozess sind monozytär-endotheliale Interaktionen verschiedener Adhäsionsmoleküle, monozytäre Integrine und luminal auf dem Endothel gebundener Chemokine notwendig (siehe Abbildung 1).

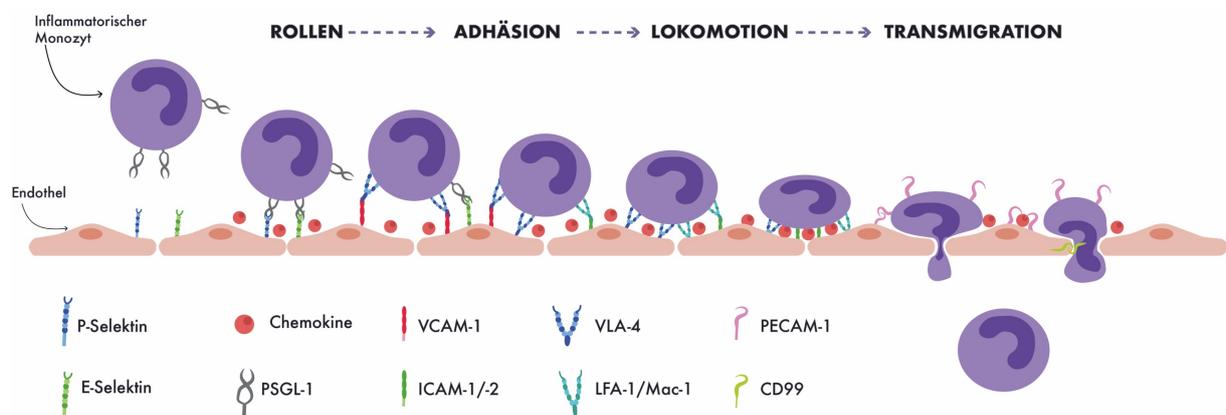


Abbildung 1: Monozytäre Adhäsionskaskade. Zu sehen ist eine schematische Darstellung der sequenziellen monozytär-endothelialen Interaktionen im Rahmen der Diapedese. Durch Interaktion der endothelialen P- und E-Selektine mit monozytär exprimiertem PSGL-1 kommt es zum langsamen Rollen der Monozyten auf dem Endothel. Durch Chemokin-Aktivierung steigt die Affinität des monozytären Integrins VLA-4 für VCAM-1 und es kommt zur festen Adhäsion der Monozyten auf dem Endothel. Durch Interaktion der monozytären Integrine LFA-1 und Mac-1 mit den endothelialen Adhäsionsmolekülen ICAM-1 und ICAM-2 kommt es zur lateralen Lokomotion. Die anschließende amöboide Transmigration der Monozyten bis in das subendotheliale Gewebe erfolgt durch homophile Interaktion der monozytären und endothelialen Adhäsionsmoleküle PECAM-1 sowie der monozytären und endothelialen Transmembranproteine CD99. Basierend auf (Gerhardt & Ley, 2015).

Rollen und Adhäsion

Im Falle einer akuten myokardialen Ischämie aktiviert die unmittelbar induzierte Entzündungskaskade Endothelzellen über freigesetztes IL-1 β und TNF α . Dies führt zu einer verstärkten endothelialen Expression von Adhäsionsmolekülen wie P- und E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 sowie der luminalen Präsentation von gebundenen Chemokinen (Gerhardt & Ley, 2015).

Monozyten exprimieren den P-Selektin-Glykoprotein-Liganden-1 (PSGL-1), welcher der hauptsächliche Ligand für Selektine ist (Mestas & Ley, 2008). Dieser wird auf murinen inflammatorischen Ly6C^{high} Monozyten stärker exprimiert als auf Ly6C^{low} Monozyten und trägt zur selektiven Akkumulation inflammatorischer Monozyten bei (An et al., 2008). Durch die Interaktion von PSGL-1 mit endothelial exprimierten Selektinen wird eine lockere Bindung gewährleistet, die ein langsames Rollen der Monozyten auf dem Endothel initiiert. Durch diese Annäherung werden verstärkte monozytär-endotheliale Interaktionen und letztlich eine integrin-vermittelte, feste Adhäsion ermöglicht.

Die Bindung von PSGL-1 an P-Selektin sowie die Interaktion von luminal auf dem Endothel gebundenen C-C und C-X-C Chemokinen mit entsprechenden Chemokin-Rezeptoren auf rollenden Monozyten führen zur Aktivierung von monozytären Integrinen (Luscinskas et al., 2000; Ma, Plow, & Geng, 2004). An der Aktivierung der Integrine beteiligte Chemokine sind u.a. CCL2, CCL5, CXCL8, CX3CL1 (Gerszten et al., 1999; Poller, Nahrendorf, & Swirski, 2020). Bei Integrinen handelt es sich um Zelloberflächen-Rezeptoren, welche bei Aktivierung ihre Bindungsaffinität für ihre entsprechenden Liganden erhöhen (Luo, Carman, & Springer, 2007). Das monozytäre Integrin „very late antigen-4“ (VLA-4) bindet an das auf zytokin-stimuliertem Endothel exprimierte Vaskuläre-Zell-Adhäsions-Molekül-1 (VCAM-1). In einer Konformation niedriger Affinität unterstützt VLA-4 das Rollen der Monozyten, durch Aktivierung und Affinitätssteigerung für VCAM-1 vermittelt es die feste Adhäsion der Monozyten auf dem Endothel (Alon et al., 1995; Gerhardt & Ley, 2015; Meerschaert & Furie, 1995; Mestas & Ley, 2008).

Lokomotion und Transmigration

Der festen Adhäsion folgt eine Polarisierung und laterale Lokomotion der Monozyten entlang der Gefäßwand bis zum Ort der transendothelialen Migration. Für diesen

Prozess interagieren die monozytären Integrine Lymphozyten-Funktion-assoziiertes-Antigen-1 (LFA-1) und Makrophagen-1-Antigen (Mac-1) mit den endothelial exprimierten Interzellulären-Adhäsions-Molekülen-1 und 2 (ICAM-1 / -2) (A. R. Schenkel, Mamdouh, & Muller, 2004). Nach Erreichen der interendothelialen Zellkontakte beginnt die amöboide Transmigration der Monozyten bis in das subendotheliale Gewebe. Die Passage durch die Zellkontakte erfolgt von luminal nach abluminal sequentiell zunächst mithilfe der homophilen Interaktion des monozytären Thrombozyten-Endothelzellen-Zell-Adhäsionsmolekül-1 (PECAM-1) mit dem endothelialen PECAM-1 und anschließend mit der homophilen Interaktion der monozytären und endothelialen Transmembranproteine CD99 (Alan R. Schenkel, Mamdouh, Chen, Liebman, & Muller, 2002).

1.3 Inflammation im akuten Myokardinfarkt

Ein AMI hat die unmittelbare Induktion einer inflammatorischen Reaktion und die Rekrutierung hunderttausender Leukozyten ins Infarktareal zur Folge. Die für Heilung und Narbenbildung unabdingbare Entzündungsreaktion gliedert sich grob in eine frühe pro-inflammatorische resorptive Phase und eine späte anti-inflammatorische reparative Phase (siehe Abbildung 2). Auf beide soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

1.3.1 Frühe inflammatorische Phase:

Durch die Ischämie kommt es im Infarktareal durch den ubiquitären Zelluntergang zur Freisetzung von schadensassoziierten Molekülen (DAMPs), welche starke inflammatorische Induktoren darstellen. Dadurch aktivierte residente Makrophagen, Mastzellen und Kardiomyozyten produzieren u.a. $IL-1\beta$, $IL-6$, $TNF\alpha$, $CCL2$ und $CXCL2$ (Frangogiannis, 2004; Frangogiannis et al., 2007; Gwechenberger et al., 1999; Poller et al., 2020; Soehnlein & Lindbom, 2010). Zudem produzieren kardiale Fibroblasten GM-CSF (Anzai et al., 2017). Ferner werden Endothelzellen aktiviert und erhöhen konsekutiv die Expression von Adhäsionsmolekülen, was gemeinsam mit vermehrt freigesetzten Chemokinen zu einer drastisch erhöhten leukozytären Extravasation aus dem Blutstrom in das Infarktareal führt. Dies bewirkt bereits in den

ersten Stunden nach Infarzierung eine Akkumulation von neutrophilen Granulozyten im geschädigten Areal, welche mit der Phagozytose toten Gewebes beginnen und weitere pro-inflammatorische Zytokine sezernieren (Frangogiannis, Smith, & Entman, 2002; M. Nahrendorf et al., 2007; Swirski & Nahrendorf, 2013).

Kurz darauf, bereits ab dem ersten Tag nach Infarkt, beginnt eine starke Invasion inflammatorischer Monozyten. Bei Mäusen werden zur Deckung des erhöhten Bedarfs Monozyten in der frühen Phase vor allem aus der Milz freigesetzt. Sie bildet ein extramedulläres Reservoir für Monozyten, ermöglicht dadurch eine unmittelbare Bereitstellung großer Mengen Monozyten und ist an der postinfarziell gesteigerten Myelopoese beteiligt (Florian Leuschner et al., 2012; Anja M. van der Laan et al., 2013). Vom infarzierten Herz freigesetzte pro-inflammatorische Mediatoren gelangen über den Blutkreislauf zum Knochenmark und nehmen dort entscheidenden Einfluss auf Stammzellen und die Stammzellnische. So wird zusammenfassend die Stammzellproliferation und Differenzierung zu myeloiden Progenitorzellen gefördert (Pittet, Nahrendorf, & Swirski, 2014; Poller et al., 2020). Vom ischämischen Herzen in den Blutkreislauf freigesetztes IL-1 β aktiviert hämatopoetische Stammzellen und moduliert die Stammzellnische, was zu einer erhöhten postinfarziellen Hämatopoese führt (Sager et al., 2015). Dabei kommt es zur höchsten Proliferationsrate von CCR2⁺ myeloiden Subtypen hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen (hematopoietic stem and progenitor cells = HSPCs), welche den Großteil der zu extramedullären Blutbildungsstellen migrierenden HSPCs ausmachen und sich letztlich zu CCR2⁺ Monozyten differenzieren (Dutta et al., 2015). Für die selektive Freisetzung der HSPCs und pro-inflammatorischer Monozyten aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf ist eine Chemokin / Chemokin-Rezeptor Interaktion zwischen CCL2 und CCR2 erforderlich (Serbina & Pamer, 2006; Shi et al., 2011). Die höchsten Serumwerte erreichen die klassischen inflammatorischen Blut-Monozyten bei Infarktpatienten am zweiten postinfarziellen Tag (Tsujioka et al., 2009). Die Freisetzung von in der Milz gebildeten Monozyten erfolgt durch eine Interaktion zwischen Angiotensin-II und dem Angiotensin-II-Rezeptor-1 (Leuschner et al., 2010). Der Austritt der Monozyten aus der Zirkulation in das Infarktareal erfolgt ebenfalls durch Aktivierung von CCR2 exprimierenden Monozyten durch CCL2 und führt so in der frühen Phase nach Infarkt zu einer selektiven Rekrutierung pro-entzündlicher Phänotypen in das ischämische Myokard (Dewald et al., 2005). Im ischämischen Myokard akkumulieren CD14⁺ CD16⁻

Monozyten in der frühen inflammatorischen Phase in der Grenzzone des Infarkts (Anja M. van der Laan et al., 2013). Dort beteiligen sie sich durch Proteolyse und Phagozytose an der Resorption nekrotischer Zellen und Debris sowie der extrazellulären Matrix.

Die frühe inflammatorische Phase ist durch eine Akkumulation von sowohl Neutrophilen als auch inflammatorischen Monozyten im Infarkt gekennzeichnet. Ab dem dritten Tag beginnt jedoch die Zahl der neutrophilen Granulozyten im Infarktareal zu sinken und nach einer Woche sind neutrophile Granulozyten weitgehend abhanden. Dennoch spielen sie scheinbar eine entscheidende Rolle bei der Einleitung der zweiten Phase der Entzündung. Durch Sekretionsprodukte beeinflussen sie Monozyten und Makrophagen, sich zu pro-reparativen Phänotypen zu differenzieren (Horckmans et al., 2017).

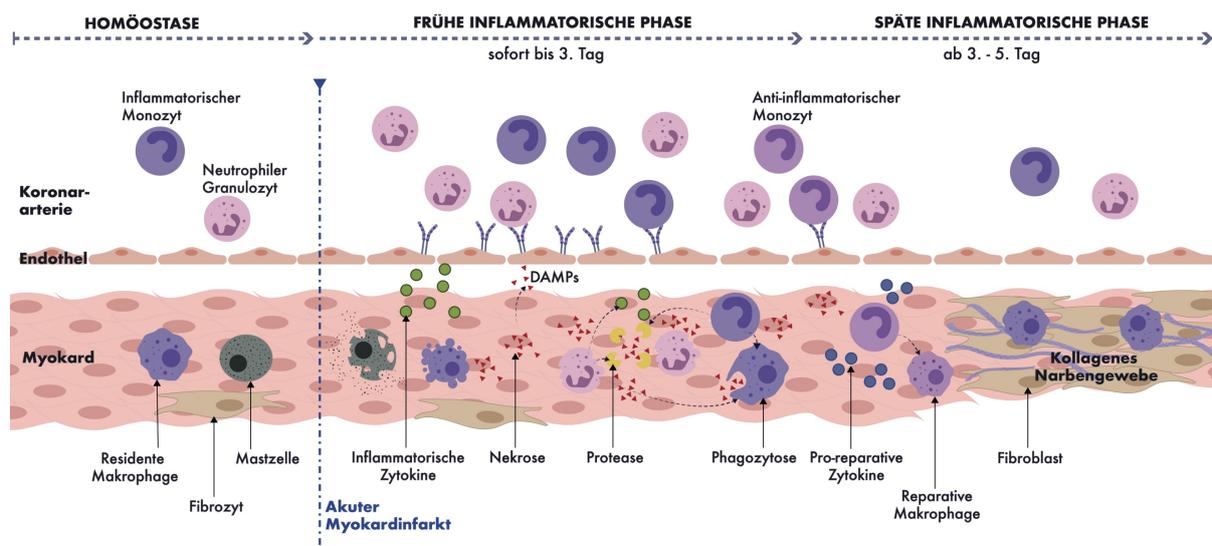


Abbildung 2: Inflammation im akuten Myokardinfarkt. Zu sehen ist eine schematische Darstellung der sequenziellen inflammatorischen Phasen nach einem AMI. Durch die myokardiale Ischämie werden intrazelluläre Moleküle nekrotischer Kardiomyozyten freigesetzt und fungieren als entzündungsinduzierende schadensassoziierte molekulare Muster (DAMPs). Aktivierte Mastzellen, residente Makrophagen und Fibroblasten sezernieren pro-inflammatorische Zytokine. Das aktivierte Endothel exprimiert Adhäsionsmoleküle, welche in der frühen inflammatorischen Phase zur Rekrutierung zahlreicher neutrophiler Granulozyten und inflammatorischer Monozyten aus dem Blutkreislauf führen. Diese sezernieren Zytokine, Proteasen und phagozytieren tote Zellen und Debris. Nach circa 3 Tagen geht die frühe resorptive Phase in eine spätere reparative Phase über. Dabei wandeln sich pro-inflammatorische zu pro-reparativen Makrophagen um, welche entzündungsdämpfende Zytokine sezernieren. Fibroblasten proliferieren und synthetisieren eine kollagenreiches Narbengewebe. Basierend auf (Poller et al., 2020).

1.3.2 Späte inflammatorische Phase:

Der dritte bis fünfte Tag nach Infarkt markiert den Übergang der frühen resorptiven Phase zu einer reparativen Heilungsphase, welche zum Ziel hat, das abgebaute infarzierte Gewebe durch kollagenes Narbengewebe zu ersetzen. Dafür nimmt die Konzentration neutrophiler Granulozyten ab und ein phänotypischer Wandel der inflammatorischen Makrophagen hin zu reparativen Makrophagen ermöglicht den Beginn der Vernarbungsprozesse im heilenden Myokard. Diese reparativen Makrophagen produzieren anti-inflammatorische, pro-reparative Zytokine wie Interleukin 10 (IL-10) und Transforming Growth Factor β (TGF- β), sowie pro-angiogene Faktoren wie vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (VEGF) und fördern die Angiogenese und die Synthese extrazellulärer Matrix (M. Nahrendorf et al., 2007).

1.3.3 Immunopathologische Bedeutung von Monozyten im akuten Myokardinfarkt

Ein optimaler Heilungsprozess nach stattgehabter ischämischer Myokardschädigung führt zum notwendigen Abbau der irreversibel geschädigten Zellen unter bestmöglicher Schonung der erhaltungsfähigen Kardiomyozyten. Dafür ist ein Gleichgewicht zwischen entzündungsfördernden und -begrenzenden Effekten notwendig, welches im idealen Fall durch eine sequentielle Beteiligung zunächst inflammatorischer und anschließend reparativer Immunzellen gewährleistet wird.

Wenn inflammatorische und resorptive Effekte nicht ausreichend limitiert beziehungsweise nicht rechtzeitig beendet werden, erfolgt über den notwendigen Abbau des nekrotischen Gewebes hinaus eine Zerstörung erhaltungsfähiger Zellen und extrazellulärer Matrix. Lokale Folgen sind die weitere Ausdehnung der Infarktnarbe sowie ein Stabilitätsverlust des Infarktareals. Diese bedeuten einen vermeidbaren Verlust von kontraktilen Myokard sowie ein erhöhtes Risiko für Ventrikelrupturen und -aneurysmen.

Selbst nicht von der Ischämie betroffenen Myokard wird durch die inflammatorische Kaskade in Mitleidenschaft gezogen. Dort kommt es zeitlich verzögert, mit den höchsten Zahlen um den zehnten Post-Infarkt Tag, zu einem Anstieg der monozytären Rekrutierung sowie Proliferation von residenten Makrophagen (Lee et al., 2012). Zwar

handelt es sich um deutlich weniger Monozyten als im Infarktkern, jedoch bedingt die monozytäre Infiltration auch im entfernten Myokard erhöhte Entzündungsmediatoren und proteolytische Aktivität. Folge der ubiquitären kardialen inflammatorischen Prozesse ist potenziell ein adverses linksventrikuläres Remodeling und eine konsekutive chronische Herzinsuffizienz (Lee et al., 2012; Sager et al., 2016).

Entscheidend für die bestmögliche Funktionserhaltung des infarzierten Myokards ist neben dem rechtzeitigen Übergang von der frühen inflammatorischen Phase zur reparativen Phase auch eine balancierte Rekrutierung inflammatorischer Immunzellen. Die exzessive Rekrutierung myeloider Zellen verhindert einen optimalen Heilungsprozess und beeinflusst kardiales Remodeling negativ. Diese Zellpopulationen unterliegen bei vorhandenen Komorbiditäten, wie der Atherosklerose, oft erheblichen Veränderungen im Vergleich zu gesunden Individuen. Im Mausmodell führt die Ly6C^{high} Monozytose in atherosklerotischen Mäusen zur prolongierten monozytären Präsenz im Infarktreal und einem verspäteten Übergang der inflammatorischen in die reparative Phase (Panizzi et al., 2010). Erhöhte Serumwerte von Monozyten bei Infarktpatienten zeigen eine inverse Korrelation mit der postinfarziellen Ejektionsfraktion (Tsujioka et al., 2009) und erhöhte Serumwerte von Neutrophilen und Monozyten konnten als unabhängige Risikofaktoren für die Entwicklung postinfarzieller Komplikationen wie einer chronischen Herzinsuffizienz identifiziert werden (Kyne et al., 2000; Yuichiro Maekawa et al., 2002).

Zusammenfassend führt eine verstärkte und prolongierte inflammatorische Reaktion auf einen Myokardinfarkt nicht zu der gewünschten Begrenzung des ischämisch bedingten Schadens, sondern zu einer Ausdehnung auf umgebendes und sogar entferntes gesundes myokardiales Gewebe. Als Folge treten auch heutzutage noch bei vielen Patienten nach einem AMI vermeidbare früh- und langzeitliche Komplikationen auf.

1.3.4 Postischämische Inflammation als therapeutisches Angriffsziel

Obwohl die Mortalität und Morbidität von Myokardinfarktpatienten durch stetige Fortschritte in pharmakologischer und interventioneller Therapie in den letzten Dekaden deutlich gesenkt werden konnte, existieren bisher noch keine etablierten therapeutische Interventionen zur Optimierung der inflammatorischen Prozesse nach einem akuten Infarkt. Da Makrophagen und Monozyten trotz ihres schädlichen

Potentials im Heilungsprozess unentbehrliche Funktionen übernehmen, bedarf es für eine erfolgreiche Verbesserung der postinfarziellen Inflammation selektiver Angriffspunkte. Eine unselektive Entzündungshemmung als Therapieoption erscheint dagegen als wenig erfolgsversprechend. So zeigt die Hemmung des NF- κ B Signalwegs über steroidale oder nicht steroidale Medikamente keine Verbesserung des klinischen Outcomes (Heusch, 2013).

Präklinische Daten und klinische Studien suggerieren allerdings ein großes Potential für zielgerichtete pharmakologische Einflussnahmen auf den postinfarziellen Heilungsprozess. Jedoch zeigte weder eine Inhibition der mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) durch Losmapimod, noch eine Einflussnahme auf das Komplementsystem mittels Pexelizumab eine Verbesserung des klinischen Outcomes von Infarkt-Patienten (Apex Ami Investigators et al., 2007; O'Donoghue et al., 2016). Eine Interleukin-6 Inhibition durch Tocilizumab zeigte bisher ebenfalls keine eindeutige Verbesserung des klinischen Outcomes bei STEMI-Patienten (Anstensrud, 2020; Anstensrud et al., 2019).

Die Behandlung von STEMI-Patienten mit Colchicin scheint hingegen einen positiven Effekt auf die Infarktgröße zu haben und wird derzeit in größeren klinischen Studien evaluiert (Deftereos et al., 2015). Auch eine anti-IL-1 β Behandlung vermindert die postinfarzielle Leuko- und Monozytose sowie deren Rekrutierung in das ischämische Herz und resultiert bei Mäusen in verbesserter Infarktheilung und kardialem Remodeling (Sager et al., 2015). Die Behandlung mit dem, gegen IL-1 β gerichteten, monoklonalen Antikörper Canakinumab zeigte beim Menschen in der CANTOS Studie eine signifikante Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse (Ridker et al., 2017). Die Auswirkung dieser Behandlung auf das humane postinfarzielle Remodeling wurde allerdings noch nicht untersucht.

Die Stilllegung endothelialer Adhäsionsmoleküle vermindert die monozytäre Rekrutierung in das Myokard und führt im Mausmodell zu einer Erhaltung der postinfarziellen Ejektionsfraktion (Sager et al., 2016). Auch die Beeinflussung der postinfarziellen monozytären Rekrutierung beim Menschen durch den P-Selektin Antagonisten Inclacumab zeigte in der SELECT-ACS Studie eine signifikante Reduktion des myokardialen Schadens im Rahmen eines NSTEMIs (Stähli et al., 2016).

1.4 Ziel der Arbeit

Die Grundlage der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten für Patienten mit AMI ist die genaue Kenntnis der zugrundeliegenden physiologischen und pathophysiologischen Prozesse. Aussichtsreiche Angriffspunkte für therapeutische Optimierungen der inflammatorischen Prozesse nach einem akuten Herzinfarkt stellen die Bereitstellung und Aktivierung von im Blut zirkulierenden Monozyten sowie deren Diapedese im ischämischen Myokard dar. Die Rekrutierung der Blut-Monozyten zum Infarkt bedarf endothelialer Prozesse sowie einer einerseits quantitativ und andererseits qualitativ veränderten Bereitstellung von Blut-Monozyten. Denn abgesehen von der zahlenmäßig gesteigerten Bereitstellung ist die monozytäre Expression von Adhäsionsmolekülen die entscheidende Voraussetzung für die drastisch erhöhte monozytäre Diapedese ins ischämische Myokard. Weiterhin ist für eine optimale postinfarzielle Heilungsphase außer der steigenden Zahl der monozytären Zellen im ischämischen Myokard auch ihr Phänotyp von großer Relevanz.

Das Ziel dieser explorativen Arbeit ist die Identifikation bisher beim Menschen nicht oder nicht ausreichend beschriebener phänotypischer Veränderungen in inflammatorischen CD14-positiven humanen Blut-Monozyten nach einem AMI. Mittels Transkriptom-Sequenzierung isolierter CD-14-positiver Blut-Monozyten bei Patienten mit STEMI sollen deren Expressionsänderungen im Zuge der inflammatorischen Antwort aufgedeckt werden. Als Kontrollgruppe dienen Patienten mit einer chronischen koronaren Herzerkrankung, um insbesondere akute Expressionsänderung im Myokardinfarkt zu identifizieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen als Ausgangspunkt für weitere Studien zur Untersuchung der funktionellen Relevanz der aufgedeckten Expressionsänderungen dienen.

2 Material

2.1 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Hauptsitz	Katalognummer
Dinatrium-Ethylendiamin-Tetraacetat Lösung (EDTA- Na_2), 0.5 M	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA	E7889
Ethanol absolut EMPLURA®	Merck	Darmstadt, Deutschland	818760
Gibco™ D-PBS (1X), ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA	14190144
Gibco™ PBS (10X), pH 7.4	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA	70011044
QIAzol-Lysereagenz	Qiagen	Hilden, Deutschland	79306
RBC-Lyse-Puffer (10X)	BioLegend	San Diego, CA, USA	420301
Rinderserum-Albumin (BSA) Pulver	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA	A2153
Trypanblau Lösung, 0,4 %	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA	93595

Puffer und Lösungen:

1X PBS (phosphatgepufferte Salzlösung):

Endkonzentration von 1 mM KH_2PO_4 , 0.16 M NaCl, 2.97 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.4 bei Raumtemperatur

100 ml 10X Gibco™ PBS (Thermo Fisher Scientific)

ad 1000 ml Millipore® Wasser
Lagerung bei Raumtemperatur

MACS- / FACS-Puffer:

Endkonzentration von 0,5 % BSA, 2 mM EDTA bei Raumtemperatur
2,5 g BSA (Sigma-Aldrich)
2 ml EDTA-Na₂ (Sigma-Aldrich)
ad 500 ml 1X Gibco™ D-PBS (Thermo Fisher Scientific)
Lagerung bei 4 °C

1X RBC-Lyse-Puffer:

1 ml 10X RBC-Lyse-Puffer (BioLegend)
ad 9ml dH₂O
Lagerung bei Raumtemperatur

70 % v/v Ethanol:

35 ml Ethanol absolut EMPLURA® (Merck)
ad 50 ml DNase/RNase-freies Wasser
Lagerung bei Raumtemperatur

2.2 Antikörper, Proteinkonjugate, MicroBeads

Tabelle 2: In der Durchflusszytometrie verwendete monoklonale Primärantikörper

Antikörper	Klon	Wirt / Isotyp	Hersteller	Hauptsitz	Katalog- nummer
APC anti-human CD11b	ICRF44	Maus / IgG1, κ	BioLegend	San Diego, CA, USA	301350
APC / Cyanine7 anti- human CX3CR1	2A9-1	Ratte / IgG2b, κ	BioLegend	San Diego, CA, USA	341616
Biotin anti-human CD19	HIB19	Maus / IgG1, κ	BioLegend	San Diego, CA, USA	302204

Biotin anti-human CD20	2H7	Maus / IgG2b, κ	BioLegend	San Diego, CA, USA	302350
Biotin anti-human CD3	UCHT1	Maus / IgG2a, κ	BioLegend	San Diego, CA, USA	300404
Biotin anti-human CD56	5.1H11	Maus / IgG1, κ	BioLegend	San Diego, CA, USA	362536
Biotin anti-human CD66b	G10F5	Maus / IgM, κ	BioLegend	San Diego, CA, USA	305120
FITC anti-human CD14	HCD14	Maus / IgG1, κ	BioLegend	San Diego, CA, USA	325604
PE anti-human CD16	3G8	Maus / IgG1, κ	BioLegend	San Diego, CA, USA	302008
PerCP / Cyanine5.5 anti-human CD41	HIP8	Maus / IgG1, κ	BioLegend	San Diego, CA, USA	303720
PE/Cyanine7 anti-human CD192 (CCR2)	K036C2	Maus / IgG2a, κ	BioLegend	San Diego, CA, USA	357212

Tabelle 3: In der Durchflusszytometrie verwendetes Streptavidin-Konjugat

Konjugat	Hersteller	Hauptsitz	Katalognummer
Streptavidin-Brilliant Violet 510™	BioLegend	San Diego, CA, USA	405233

Tabelle 4: Im MACS-Verfahren eingesetzte Antikörper-gekoppelte Magnetbeads

Beads	Wirt / Isotyp	Hersteller	Hauptsitz	Katalognummer
Anti-human CD14 MicroBeads	Maus / IgG2a	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland	130-050-201

Tabelle 5: In der Durchflusszytometrie verwendete Beads

Beads	Hersteller	Hauptsitz	Katalognummer
BD FACSDiva™ CS&T Research Beads	Becton Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA	655051
OneComp™ eBeads Kompensationsbeads	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA	01-1111-42

2.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Hauptsitz	Katalognummer
BD Vacutainer® CPT™ Röhrchen 8ml, Na ₃ -Citrat	Becton Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA	362782
Eppendorf Safe-Lock Tubes	Eppendorf	Hamburg, Deutschland	0030120086
Eppendorf Safe-Lock Tubes (PCR clean)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland	0030123328
Falcon® Durchflusszytometerröhrchen	Corning	Corning, NY, USA	352002
Falcon® konische Zentrifugenröhrchen	Corning	Corning, NY, USA	352099 352070
LS Columns	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland	130-042-401
Pre-Separation Filters (30 µm)	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland	130-041-407

RNase Away™ Dekontaminierungsreagenz	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA	10328011
RNaseZap™ RNase- Dekontaminationstücher	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA	AM9786
S-Monovette® 9 ml, K3 EDTA	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland	02.1066.001
BD FACSTM Clean Solution	Becton Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA	340345
BD FACSTM Rinse Solution	Becton Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA	340346

2.4 Komplett-Systeme (Kits)

Tabelle 7: Verwendete Komplett-Systeme

Komplett-System	Hersteller	Herstellersitz	Katalognummer
RNeasy® Mini Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland	74106
TruSeq® Stranded Total RNA	Illumina	San Diego, CA, USA	20020597
RNase-Free DNase Set	Qiagen	Hilden, Deutschland	79254

2.5 Laborgeräte

Tabelle 8: Verwendete Laborgeräte

Laborgerät	Typ	Hersteller	Hauptsitz
Durchflusszytometer	LSRFortessa™	Becton Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA
Magnetische Einheit für MACS-Verfahren	QuadroMACS™ Separator	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
Trägereinheit für MACS-Verfahren	MACS MultiStand	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
Zählkammer			
Zentrifuge	Heraeus® Megafuge® 2.0 R	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA

2.6 Software

Tabelle 9: Verwendete Software und deren Anwendung

Entwickler	Software	Anwendung	Entwicklersitz
Becton Dickinson	FlowJo™ Version 8 für macOS	Datenauswertung Durchflusszytometrie	Franklin Lakes, NJ, USA
Becton Dickinson	BD FACSDiva™ Version 9	Messung Durchflusszytometrie	Franklin Lakes, NJ, USA
GraphPad Software	GraphPad Prism® Version 8 für macOS	Statistische Datenauswertung	San Diego, CA, USA

2.7 Datenbanken

National Center for Biotechnology Information (NCBI) - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Genom Browser „Ensembl“ - <http://www.ensembl.org>

Gen Datenbank „GeneCards“ - <https://www.genecards.org>

2.8 Online Software

ToppFun (ToppGene Suite) - <https://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp>

3 Methoden

3.1 Studienkollektiv

Vor Beginn des Patienteneinschlusses genehmigte die Ethikkommission der Technischen Universität München das Studienprotokoll (Antrag 235/16 S vom 16.05.2016). Ein Arzt klärte alle Patienten vor Einschluss ausführlich über die Studie auf. Sie konnten Fragen mit einem Arzt besprechen, erhielten ein Patienteninformationsblatt und erteilten Ihre schriftliche Einwilligung. Die freiwillige Teilnahme an der Studie hatte keinerlei Einfluss auf Art und Ablauf der jeweiligen Behandlung der Patienten. Die Durchführung der Studie erfolgte nach den Vorgaben der „Guten Klinischen Praxis“ sowie der Deklaration von Helsinki. Ferner erfolgte eine Pseudonymisierung aller Studiendaten.

3.1.1 Gruppen und Einschlusszeiträume

Experimentalgruppe:

In die Experimentalgruppe wurden Patienten mit einem akuten STEMI eingeschlossen, welche sich im Zeitraum von September 2016 bis Februar 2018 in den Notaufnahmen des Klinikums rechts der Isar und des Deutschen Herzzentrums München vorstellten. Alle Patienten in diesem Zeitraum, welche die Ein- und Ausschlusskriterien erfüllten, wurden bei organisatorischer Umsetzbarkeit und Zustimmung unabhängig von Alter und Geschlecht rekrutiert.

Kontrollgruppe:

In die Kontrollgruppe wurden alters- und geschlechtsangepasste Patienten mit einem chronischen Koronarsyndrom (CCS) eingeschlossen, welche die Ambulanz des Deutschen Herzzentrums München im Zeitraum von Februar 2017 bis Februar 2018 für eine Routinekontrolle aufsuchten.

3.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Experimentalgruppe:

Als Einschlusskriterien galten: Ein akuter STEMI mit einer Revaskularisation in der Folge sowie ein Symptombeginn innerhalb der letzten 12 Stunden. Ferner der Nachweis einer atherothrombotischen Genese (Typ 1 Myokardinfarkt) in der perkutanen Koronarintervention.

Als Ausschlusskriterien galten: Ein kardiogener Schock, eine linksventrikuläre Ejektionsfraktion unter 35 %, chronische oder entzündliche Erkrankungen sowie Medikamente, welche Blutleukozytenzahlen beeinflussen (Cortisol, Chemotherapeutika, etc.). Ferner andere Genesen des Myokardinfarktes (Typen 2 bis 5).

Kontrollgruppe:

Als Einschlusskriterien galten: Ein chronisches Koronarsyndroms mit stabiler Symptomatik.

Als Ausschlusskriterien galten: Ein AMI oder ein Myokardinfarkt in der Vorgeschichte, eine eingeschränkte linksventrikuläre Ejektionsfraktion, chronische oder entzündliche Erkrankungen sowie Medikamente, welche Blutleukozytenzahlen beeinflussen (Cortisol, Chemotherapeutika, etc.).

3.1.3 Erhobene Patientendaten

Anamnestische Daten:

Im Rahmen des stationären bzw. ambulanten Aufenthaltes erfolgten eine sorgfältige Anamnese und Durchsicht der Patientenakte. Folgende Informationen wurden standardisiert zu allen Patienten eingeholt:

- Alter und Geschlecht
- Kardiovaskuläre Risikofaktoren
 - Dyslipidämie
 - Arterielle Hypertonie
 - Aktiver oder zurückliegender Nikotinkonsum: Erfassung der Packungsjahre
 - Diabetes mellitus

- Körpergröße und Gewicht
- Positive Familienanamnese: Atherosklerosebedingtes Ereignis bei männlichen bzw. weiblichen Verwandten ersten Grades vor dem 55. bzw. 65. Lebensjahr.
- Apoplex oder Myokardinfarkt in der Vorgeschichte
 - In der Kontrollgruppe führte ein AMI in der Vorgeschichte zum Studienausschluss (siehe 3.1.2), ein stattgehabter Apoplex in der Vorgeschichte wurde jedoch für die demographische Auswertung berücksichtigt.
 - In der Experimentalgruppe wurde ein in der Vorgeschichte stattgehabter AMI oder Apoplex für die demographische Auswertung berücksichtigt.
- Symptombeginn bei STEMI-Patienten und Stabilität der Symptomatik bei CCS-Patienten
- Dauermedikation
 - In der Kontrollgruppe wurde sowohl die vor als auch nach der ambulanten Vorstellung bestehende Dauermedikation mit im Folgenden genannten Medikamenten erfasst.
 - In der Experimentalgruppe wurde sowohl die bei Aufnahme bestehende Dauermedikation als auch die Entlassmedikation mit im Folgenden genannten Medikamenten erfasst.
 - Acetylsalicylsäure
 - Clopidogrel, Ticagrelor, Prasugrel
 - Betablocker
 - RAAS-Inhibitoren
 - Statine
 - Calciumantagonisten
 - Diuretika

Untersuchungsergebnisse:

Im Zuge der Behandlung der Patienten wurden allgemeine und apparative Untersuchungen durchgeführt. Folgende Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden im Rahmen der Studie ausgewertet:

- Vitalparameter und Ergebnisse der allgemeinen körperlichen Untersuchung zum Ausschluss eines kardiogenen Schocks
- Herzenzyme und Retentionsparameter im zeitlichen Verlauf bei Infarktpatienten zur Charakterisierung des Studienkollektivs
- Elektrokardiographie zum Diagnosezeitpunkt bei Infarktpatienten zur Diagnosesicherung
- Echokardiographie zum Ausschluss einer eingeschränkten linksventrikulären Ejektionsfraktion

Behandlungsergebnisse:

Alle Infarktpatienten erhielten eine Revaskularisation über eine perkutane Koronarintervention. Im Rahmen dieser erfolgte sowohl die angiographische Diagnosesicherung als auch die Lokalisation der infarzierten Koronararterie. Die Diagnosesicherung wurde zur Überprüfung des Einschlusskriteriums ST-Hebungs-Infarkt mit atherothrombotischer Genese herangezogen. Die Lokalisation der infarzierten Koronararterie wurde zur Charakterisierung des Studienkollektivs ausgewertet.

3.2 Probengewinnung

3.2.1 Zeitpunkte

Bei den STEMI-Patienten wurden in Abhängigkeit der stationären Verweildauer bis zu drei Blutproben entnommen. Die erste Blutprobe wurde so früh wie möglich entnommen: bei Vorstellung in der Notaufnahme oder bis maximal sechs Stunden nach koronarer Revaskularisation (Tag 0). Die zweite Probe wurde 72 Stunden (Tag 3) und die dritte 120 Stunden nach Aufnahme (Tag 5) entnommen. An zusätzlichen Zeitpunkten erfolgte Blutentnahmen durch die Klinik wurden in die Auswertung miteinbezogen.

Bei den eingeschlossenen CCS-Patienten wurde im Rahmen des ambulanten Aufenthaltes eine Blutprobe entnommen.

3.2.2 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte durch periphere Venenpunktion oder während der perkutanen Koronarintervention über die eingebrachte Gefäßschleuse. Es wurden je Entnahme folgende Probenbehältnisse befüllt:

- Vier 8ml BD Vacutainer® CPT™ Röhrchen zur Isolierung von Blut-Monozyten
- Eine 9 ml EDTA-Monovette® zur Isolierung von Plasma
- Eine 2,7 ml EDTA-Monovette® zur Erstellung eines Differentialblutbildes

Die CPT™ Röhrchen wurden nach der Entnahme bei Raumtemperatur transportiert und unmittelbar prozessiert. Die EDTA-Monovette® zur Isolierung von Plasma wurde bei 4 °C gekühlt, transportiert und ebenfalls unmittelbar prozessiert. Die Probe zur Erstellung des Differentialblutbildes wurde an das jeweilige hausinterne Institut für Laboratoriumsmedizin versandt und dort analysiert.

3.3 Leukozyten- und Plasmaisolation

3.3.1 Leukozyten-Isolation

Zunächst wurden 160 µl EDTA-Vollblut aus der 9 ml EDTA-Monovette® in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Davon wurde zur Bestimmung der absoluten Zellzahl 10 µl in ein Eppendorf Gefäß überführt (siehe 3.3.2). Zu den verbleibenden 150 µl wurden 5000 µl 1X RBC-Lyse-Puffer gegeben. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 10 ml 1X PBS gestoppt. Es folgte eine Zentrifugation bei 400 G und 4 °C für 8 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde in ein Durchflusszytometrie Röhrchen überführt und bis zur Immunphänotypisierung bei 4 °C gelagert (siehe 3.6.2).

3.3.2 Konzentrationsbestimmung

Zu den 10 µl EDTA-Blut für die Zellzahlbestimmung (siehe 3.3.1) wurden 190 µl 1X RBC-Lyse-Puffer gegeben. Es folgte eine dreiminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Dadurch wurde eine Lyse der Erythrozyten sowie eine Verdünnung von 1:20 erreicht. In einer Neubauer-Zählkammer wurden zwei Proben des Lysats

mittels Pipette in die beiden separaten Kammern eingebracht. Alle acht befüllten Eckquadrate wurden ausgezählt, aus den Ergebnissen wurde der Mittelwert gebildet. Durch Multiplikation desselben mit dem Faktor 10 und dem Verdünnungsfaktor 20 wurde die Konzentration der Leukozyten pro μl errechnet.

3.3.3 Plasma-Isolation

Die EDTA-Monovette[®] wurde bei 2000 G und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Die resultierende obere Plasmaportion wurde abgenommen und in 2 ml Eppendorf Gefäße überführt. Die Lagerung des Plasmas erfolgte bei -80 °C.

3.4 Monozyten-Isolation

3.4.1 Dichtegradienten-Zentrifugation

Die Separation der mononukleären Zellen des peripheren Blutes erfolgte mit dem Vacutainer[®] CPT[™] System von Becton Dickinson. Bei dem System handelt es sich um sterile, evakuierte Blutentnahme Röhrchen mit integrierter Natrium-Citrat-Lösung, Polyester Separationsgel und Ficoll[™]-Hypaque-Dichtegradientenflüssigkeit. Diese können an gängige Blutentnahme Systeme adaptiert werden. Das enthaltene Separationsgel verhindert bei der Blutentnahme das Vermischen des antikoagulierten Blutes mit der Dichtegradientenflüssigkeit. Ferner trennt es nach der Zentrifugation der Röhrchen die mononukleären Zellen dauerhaft von den restlichen Blutzellen ab.

Bei der Ficoll[™]-Separation handelt es sich um eine modifizierte isopyknische Dichtegradienten-Zentrifugation. Die Dichtegradientenflüssigkeit enthält das synthetische Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer Ficoll[™] sowie Natriumdiatrizoat („Hypaque“) und weist in den verwendeten CPT[™] Röhrchen eine Dichte von 1,077 g/ml auf. Damit ordnen sich bei einer Zentrifugation von Vollblut mononukleäre Zellen und Thrombozyten aufgrund ihres geringeren Dichtebereichs über der Gradientenflüssigkeit an. Die Erythrozyten und die meisten Granulozyten hingegen liegen nach der Zentrifugation aufgrund ihres höheren Dichtebereichs unterhalb des Mediums. (W. Luttmann, K. Bratke, M. Küpper, & D. Myrtek, 2014, pp. 52-61)

Dichtegradienten-Zentrifugation:

Die CPT™ Röhrcchen wurden bei der Blutentnahme mit jeweils 8 ml befüllt und unmittelbar mehrmals invertiert. Es folgte eine 30-minütige Zentrifugation derselben bei 1600 G, Raumtemperatur und mit Bremse. Oberhalb der Gelbarriere resultierte ein Überstand aus Plasma sowie eine Interphase mit den mononukleären Zellen. Letztere wurden im Plasma durch Invertieren der Röhrcchen resuspendiert.

Plasma Verwurf:

Die Suspensionen aus Plasma, PBMCs und Thrombozyten aller Röhrcchen wurden in einem Zentrifugenröhrcchen zusammengeführt und mit 1X PBS auf 50 ml aufgefüllt. Es schloss sich eine erneute mehrmalige Inversion an. Im Anschluss wurde das Zentrifugenröhrcchen bei 300 G und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde mit einer Vakuumpumpe aspiriert, das Zellpellet vorsichtig in 160 µl MACS-Puffer resuspendiert.

3.4.2 Immunomagnetische Separation

Die Isolierung CD14⁺ Blut-Monozyten aus der Zellsuspension mononukleärer Zellen erfolgte mittels immunomagnetischer Separation. Dafür wurde das MACS Verfahren der Firma Miltenyi Biotec gewählt und die Monozyten mit anti-CD14 MicroBeads magnetisch markiert. Dabei handelt es sich um monoklonale Antikörper gegen das Oberflächenantigen CD14, welche mit superparamagnetischen Dextran-umhüllten Eisenoxid Nanopartikeln konjugiert sind. Diese Markierung ermöglicht anschließend die Positiv-Selektion der Monozyten bei Durchfluss durch ein starkes Magnetfeld. Dafür werden mit ferromagnetischen, plastikbeschichteten Stahlkugeln gefüllte Separationssäulen in einen starken Permanentmagneten eingebracht. Nach Entfernung aus dem Magnetfeld werden die Monozyten aus den Säulen gespült. Eine Wiederholung des Vorgangs erhöht die Reinheit des Isolats. (Miltenyi Biotec, 2020; Miltenyi, Muller, Weichel, & Radbruch, 1990; Zähringer, 2020)

Magnetische Markierung:

Zur Resuspension des Zellpellets aus 3.4.1 wurden auf Eis 40 µl anti-CD14 MicroBeads hinzugegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 4 °C und anschließender Hinzugabe von 2 ml MACS-Puffer folgte eine Zentrifugation bei 4 °C

und 300 G für 10 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert.

Magnetische Separation:

Die Separationssäule „LS Column“ wurde in der magnetischen Einheit „QuadroMACS™“ aufgehängt und über einem Auffangröhrchen platziert. Auf die Separationssäule wurde ein „30µm Pre-Separations“ Filter angebracht. Im Anschluss wurde sie mit 3 ml MACS-Puffer gespült. Sobald das Reservoir der Separationssäule leer war, wurde die Zellsuspension auf die Separationssäule pipettiert. Das Zentrifugenröhrchen der Zellsuspension wurde mit 1 ml MACS-Puffer gespült und dieser ebenfalls auf die Separationssäule aufgebracht. Nach Durchfluss der Zellsuspension erfolgte eine dreimalige Spülung mit je 3 ml MACS-Puffer. Nach vollständigem Abfluss wurde die Separationssäule aus der magnetischen Einheit entfernt und unmittelbar auf ein 15 ml Zentrifugenröhrchen platziert. Der Filter wurde entfernt und 5 ml MACS-Puffer in das Reservoir pipettiert. Durch Aufsetzen und Drücken des Spritzenkolbens wurden die Zellen mit dem Puffer in das Zentrifugenröhrchen gespült. Es schloss sich eine 10-minütige Zentrifugation des Röhrchens bei 300 G und 4 °C an. Im Anschluss wurde der Überstand aspiriert und das Zellpellet erneut in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Zur Erhöhung der Reinheit des Isolats wurden die beschriebenen Schritte mit einer neuen Separationssäule wiederholt. Nach Abschluss wurde das Zellpellet in 5000 µl MACS-Puffer resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl (siehe 3.4.3) wurden daraus 10 µl in ein Eppendorf Gefäß überführt und zur durchflusszytometrischen Überprüfung der Reinheit des Isolats (siehe 3.6.2) wurden 300 µl in ein Durchflusszytometrie Röhrchen überführt.

3.4.3 Konzentrationsbestimmung

Durch Hinzugabe von 40 µl Trypanblau zu dem 10 µl Aliquot des Monozyten-Isolats (siehe 3.4.2) erfolgte eine Verdünnung von 1:5. In einer Neubauer-Zählkammer wurden zwei Proben der Suspension mittels Pipette in die beiden separaten Kammern eingebracht. Nach Zählung der acht Eckquadrate beider Kammern wurde der Mittelwert gebildet. Durch Multiplikation desselben mit dem Faktor 10 und dem Verdünnungsfaktor 5 wurde die Konzentration der Monozyten pro µl errechnet.

3.5 RNA-Isolierung

Die RNA wurde mittels einer Kombination aus Flüssig-Flüssig-Extraktion durch die „single-step“ Methode (Chomczynski & Sacchi, 1987) und Festphasenextraktion durch selektive Adsorption an eine Silikagel Membran isoliert. Für Erstere wurde das QIAzol[®]-Lysereagenz der Firma Qiagen verwendet. Dabei handelt es sich um eine monophasische phenolhaltige Guanidin-Isothiocyanat-Lösung. Sie bewirkt eine Lyse der Zellen und durch das enthaltene Guanidin-Isothiocyanat eine unmittelbare Denaturierung und effektive Inaktivierung der RNasen (Chirgwin, Przybyla, MacDonald, & Rutter, 1979). Die Lysate der während des Patienteneinschlusses gesammelten Blutproben konnten damit bei -80 °C gelagert werden. Nach Ende der Einschlussphase wurde die RNA-Extraktion aller Proben gemeinsam fortgesetzt. Die Zugabe von Chloroform und eine Zentrifugation resultieren in der Auftrennung des Lysats in drei Phasen. Durch das saure Milieu separiert sich die RNA im farblosen wässrigen Überstand von Proteinen und kleinen DNA-Fragmenten in der unteren organischen Phenol-Chloroform Phase sowie von größeren DNA-Fragmenten in der weißen Interphase (Chomczynski & Sacchi, 2006; Mülhardt, 2013). Die RNA wurde mit der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und unter Verwendung des RNeasy[®]-Mini-Kits der Firma Qiagen weiter purifiziert. Nach Zugabe von Ethanol erfolgt dabei eine selektive Adsorption der RNA an eine in Zentrifugationssäulen befindliche Silikagel Membran. Ungebundene Zellbestandteile werden durch wiederholte Spülungen mit Guanidinthiocyanat-haltigen Hochsalzpuffern und Zentrifugationen in einer Mikrozentrifuge entfernt. Dadurch erfolgt eine Anreicherung von RNA mit über 200 Nukleotiden. DNA-Kontaminationen wurden während der Purifikation mit dem RNase-Free DNase Set der Firma Qiagen entfernt. Dieses ermöglicht eine Inkubation der membrangebundenen RNA mit DNase I. Die DNase wird anschließend durch Zugabe eines Puffers und Zentrifugation entfernt. Im letzten Schritt erfolgt die Elution der purifizierten RNA von der Silicagel Membran mit RNase-freiem Wasser. (Qiagen, 2009, 2019; Tan & Yiap, 2009)

3.5.1 Aliquotportionierung

Die Gesamtzahl der isolierten Blut-Monozyten ergab sich aus der Multiplikation der errechneten Monozyten Konzentration mit dem Restvolumen der Isolation nach

Entnahme der Aliquots für die Durchflusszytometrie und die Zellzählung (siehe 3.4.2). Für die weiteren Isolationsschritte wurde festgelegt, dass je $1,5 \times 10^6$ Monozyten in 300 μ l QIAzol-Lysereagenz lysiert und gelagert werden sollten. Durch Division der Gesamtzahl an isolierten Monozyten durch $1,5 \times 10^6$ ergab sich die Anzahl der Aliquots. Durch Multiplikation derselben mit 300 wurde das Volumen der benötigten QIAzol-Lysereagenz berechnet.

3.5.2 Lagerung und Probenauswahl

Die lysierten Monozyten-Isolate aller eingeschlossenen Patienten wurden gemeinsam bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Nach Abschluss des Patienteneinschlusses wurden für die Transkriptomsequenzierung je 20 STEMI- und CCS-Patienten ausgewählt. Von jedem ausgewählten Patienten wurden die Blutproben vom Aufnahmetag und dem dritten Tag für die Transkriptomanalyse verwendet. Die RNA-Extraktion der 60 Proben erfolgte nach Auswahl gemeinsam. Anschließend erfolgte der gemeinsame Versand aller 60 RNA-Isolate an die DZHK-Shared Expertise Plattform (SE031) des Standortes Heidelberg / Mannheim (siehe 3.7).

Auswahlkriterien STEMI-Patienten:

Für die Auswahl mussten erfolgreich prozessierte Blutproben vom Aufnahmetag und Tag 3 vorhanden sein. Die Blutentnahme am Aufnahmetag musste unter 10h nach Symptombeginn und unter 3h nach Revaskularisation erfolgt sein. Die in der Durchflusszytometrie bestimmte Reinheit der Monozyten-Isolate musste über 90 % liegen.

Auswahlkriterien CCS-Patienten:

Nach Auswahl der geeigneten STEMI-Patienten wurden 20 geschlechts- und altersangepasste CCS-Patienten ausgewählt, deren Monozyten-Isolate in der Durchflusszytometrie eine Reinheit über 90 % aufwiesen.

3.5.3 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Lyse:

Das Monozyten-Isolat (siehe 3.4.2) wurde bei 300 G und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in dem berechneten

Volumen QIAzol-Lysereagenz resuspendiert (siehe 3.5.1). Durch repetitives Pipettieren erfolgten eine Homogenisierung und Lyse der isolierten Monozyten. Je 300 µl Lysat wurden in ein RNase-freies Eppendorf Gefäße überführt und bei -80 °C gelagert.

Phasenseparation:

Die ausgewählten Lysate (siehe 3.5.2) wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und mit 700 µl QIAzol-Lysereagenz auf 1 ml aufgefüllt. Nach Hinzugabe von 200 µl Chloroform wurden diese für 15 Sekunden geschüttelt. Es folgte eine 3-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und eine Zentrifugation bei 12000 G und 4 °C für 15 Minuten. Es resultierten drei sichtbare Phasen. Der wässrige Überstand wurde vorsichtig und ohne Mitnahme der Interphase in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Das Volumen des überführten Überstandes wurde gemessen.

3.5.4 Festphasenextraktion

Adsorption:

Zu der separierten wässrigen Phase wurde eine äquivalente Menge 70 % Ethanol hinzugegeben (circa 400 µl). Nach unmittelbarer Durchmischung mittels Pipette wurden bis zu 700 µl des Lysats auf eine RNeasy-Säule transferiert, welche in einem Sammelgefäß platziert wurden. Es schloss sich eine Zentrifugation bei 12000 RPM für 30 Sekunden an. Das im Sammelgefäß aufgefangene Eluat wurde verworfen. Der Rest des Lysats wurde auf dieselbe RNeasy-Säule gegeben, diese erneut zentrifugiert und das Eluat abermals verworfen.

Reinigung:

Nach Hinzugabe von 350 µl RW1-Puffer auf die RNeasy-Säulen wurden diese bei 12000 RPM für 30 Sekunden zentrifugiert und das Eluat verworfen. In ein Mikroreaktionsgefäß wurden 70 µl RDD-Puffer vorgelegt und 10 µl DNase I Stammlösung hinzugegeben. Die resultierenden 80 µl DNase Inkubationslösung wurde direkt auf die Membran der RNeasy Säulen gegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden erneut 350 µl RW1-Puffer auf die RNeasy-Säulen pipettiert, diese bei 12000 RPM für 30 Sekunden zentrifugiert und das Eluat verworfen. Es folgte eine Reinigung der Säulen mit 500 µl RPE-Puffer und

anschließender Zentrifugation bei 12000 RPM für 30 Sekunden. Das Eluat wurde abermals verworfen und der Vorgang mit weiteren 500 µl RPE-Puffer und anschließender Zentrifugation für 2 Minuten wiederholt. Im Anschluss wurden die Säulen in ein neues Sammelgefäß eingesetzt und das alte verworfen. Es folgte eine 1-minütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit.

Elution:

Die Sammelgefäße wurden wieder mitsamt Eluat verworfen und die RNeasy-Säulen in ein 1,5 ml RNase-freies Mikroreaktionsgefäß eingesetzt. Nach Auftragen von 50 µl RNase-freiem Wasser direkt auf die Membran der RNeasy-Säulen folgte eine Zentrifugation bei 12000 RPM für 1 Minute. Die Proben wurden unmittelbar bei -80 °C eingefroren.

3.6 Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der Reinheit der Monozyten-Isolate wurde nach jeder Isolation eine differenzierte Zellanalyse der gewonnenen Zellen mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Zusätzlich wurde von jeder Probe ein Aliquot mit lysiertem EDTA-Vollblut analysiert. Die Analysen wurden mit einem Multi-Farben-Durchflusszytometer LSRFortessa der Firma Becton Dickinson durchgeführt. Bei diesem Gerät werden die zu differenzierenden Zellen mittels hydrodynamischer Fokussierung in einen laminaren Probenstrom zentriert und durchfließen somit einzeln in Reihe die Messküvette. In dieser passieren die Zellen orthogonal zur Flussrichtung strahlende Laser. Das LSRFortessa verfügt über drei Laser: einen violetten der Wellenlänge 405 nm, einen blauen der Wellenlänge 488 nm und einen roten der Wellenlänge 640 nm. Bei Auftreffen des monochromatischen Lichts auf die Zellen entsteht für jede Zelle ein charakteristisches Streulicht sowie simultan für jedes gebundene Fluorochrom ein charakteristisches Fluoreszenzlicht. In Strahlungsrichtung der Laser abgelenktes Licht wird vom Vorwärtsstreulicht Detektor (Forward Scatter Detektor) erfasst und ist ein Maß für die relative Größe der gemessenen Zelle. Der Seitwärtsstreulicht Detektor (Side Scatter Detektor) misst das an intrazellulären Bestandteilen im 90°-Winkel abgelenkte Licht und ist somit ein Maß für die Granularität der Zelle. Durch Markierung der zu messenden Zellen mit monoklonalen

Antikörpern und Konjugation der Antikörper mit Fluorochromen ist eine weitergehende Differenzierung möglich. Letztere absorbieren einen Teil der Laserstrahlung und emittieren Licht höherer Wellenlänge, wobei jedes Fluorochrom ein spezifisches Absorptions- und Emissionsspektrum aufweist. Das erfasste Fluoreszenzlicht wird über eine Reihe von dichroitischen Spiegeln und Filtern in absteigender Wellenlänge aufgetrennt. Die verbauten „Longpass“-Spiegel (LP-Spiegel) lassen Licht oberhalb einer spezifischen Wellenlänge passieren und reflektieren kurzwelligere Spektralanteile zum nächstniedrigeren LP-Spiegel. Passierende Lichtanteile strahlen hinter dem Spiegel auf Bandpass-Filter, welche nur Wellenlängenanteile einer definierten Bandbreite um einen bestimmten Mittelwert passieren lassen. Nach dieser weiteren Einengung werden die durchstrahlenden Wellenlängen von Photomultipliern erfasst, welche somit spektralbereichsspezifisch sind. Das LSRFortessa™ verfügt über eine parallele Laseranordnung mit separaten optischen Kollektionssystemen für jeden Laser. Dies erlaubt eine simultane Messung von Fluorochromen mit überlappenden Emissionsspektren bei Exzitation durch unterschiedliche Laser. (BD Biosciences, 2009; Werner Luttmann, Kai Bratke, Michael Küpper, & Daniel Myrtek, 2014)

3.6.1 Antikörper

Zur Immunphänotypisierung der Zelltypen wurden zunächst T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Natürliche Killerzellen sowie Granulozyten mittels biotinylierter monoklonaler Primärantikörper markiert. Diese wurden anschließend einfarbig mittels fluoreszenzgekoppeltem Streptavidin sekundärmarkiert. Thrombozyten erhielten eine fluoreszenzgekoppelte monoklonale Primärmarkierung des Oberflächenantigens CD41, myeloide Zellen des Antigens CD11b. Monozyten wurden zur weiteren Differenzierbarkeit anhand Ihrer Oberflächenantigene CD14, CD16, CD192 (CCR2) sowie CX3CR1 mittels monoklonaler fluoreszenzgekoppelter Primärantikörper mehrfarbig markiert (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: In der Durchflusszytometrie markierte Zelltypen

Zelltyp	Oberflächenantigen	Primäre Markierung	Sekundäre Markierung
T-Lymphozyten	CD3	Biotin	BV 510

B-Lymphozyten	CD19	
	CD20	
NK-Zellen	CD56	
Granulozyten	CD66b	
Thrombozyten	CD41	PerCP / Cyanine5.5
Myeloide Zellen	CD11b	APC
Monozyten	CD14	FITC
	CD16	PE
	CD192 (CCR2)	PE / Cyanine7
	CX3CR1	APC / Cyanine7

3.6.2 Markierung der Oberflächenantigene

Biotinylierung:

Es wurde eine erste Antikörpermischung für die primäre Markierung der Proben angesetzt. Dafür wurden in einem Durchflusszytometrie Röhrchen 143 µl FACS-Puffer vorgelegt und je 1,5 µl der folgenden monoklonalen Primärantikörper der Firma BioLegend hinzugegeben:

- Maus anti-human CD3 Biotin
- Maus anti-human CD19 Biotin
- Maus anti-human CD20 Biotin
- Maus anti-human CD56 Biotin
- Maus anti-human CD66b Biotin.

Nach Durchmischen mittels Laborschüttler wurden je 50 µl der ersten Antikörpermischung zu den 300 µl der Resuspension des lysierten Vollbluts (siehe 3.3.1) sowie zu den 300 µl des Monozyten-Isolates (siehe 3.4.2) gegeben. Nach Durchmischen folgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis und bedeckt mit Aluminiumfolie. Im Anschluss wurden je 1000 µl FACS-Puffer zu den Proben gegeben. Nach einer Zentrifugation bei 300 G und 4 °C für 10 Minuten wurden die Überstände vorsichtig aspiriert. Die Zellpellets wurden gelöst und in je 300 µl FACS-Puffer resuspendiert.

Sekundärmarkierung:

Für die zweite Antikörpermischung wurden 140 µl FACS-Puffer in einem Durchflusszytometrie Röhrchen vorgelegt und 1,5 µl des Streptavidin-Brilliant Violet 510 Konjugats (BioLegend) hinzugefügt. Des Weiteren wurden je 1,5 µl folgender monoklonaler Primärantikörper desselben Herstellers hinzugefügt:

- Maus anti-human CD14 FITC
- Maus anti-human CD16 PE
- Maus anti-human CCR2 PE / Cyanine7
- Ratte anti-human CX3CR1 APC / Cyanine7
- Maus anti-human CD11b APC
- Maus anti-human CD41 PerCP / Cyanine5.5.

Nach Durchmischen mittels Laborschüttler wurden je 50 µl der zweiten Antikörpermischung zu den resuspendierten Proben gegeben. Nach erneutem Durchmischen folgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis unter Aluminiumfolie. Im Anschluss wurden je 1000 µl FACS-Puffer zu den Proben gegeben und dieselben bei 300 G und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden erneut vorsichtig aspiriert und die Zellpellets in je 300 µl FACS-Puffer resuspendiert.

3.6.3 Kompensation

Es erfolgte eine Mehrfarbenmessung mit sieben Fluorochromen. Die Exzitation erfolgte simultan und räumlich getrennt durch den violetten, blauen und roten Laser. Die Fluorochrome wurden so kombiniert, dass durch die separaten optischen Kollektionssysteme sowie die Longpass-Spiegel und Bandpass-Filter das Emissionslicht jedes Fluorochroms weitestgehend nur durch einen Photomultiplier detektiert wurde (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: In der Durchflusszytometrie verwendete Fluorochrome. Es ist aufgelistet, welche Fluorochrome durch den entsprechenden Laser exzitiert werden. Außerdem ist für jedes Fluorochrom aufgeführt, welche Longpass-Spiegel (LP) und Bandpass-Filter (BP) den spezifischen Photomultipliern vorgeschaltet sind.

Exzitations- Laser	Fluorochrom	Emissions- maximum	LP- Spiegel	BP- Filter	Photo- multiplier
Violett (405 nm)	BV 510	510 nm	475 LP	525/50	A

Blau (488 nm)	PE / Cyanine7	774 nm	750 LP	780/60	A
	PerCP / Cyanine5.5	690 nm	685 LP	695/40	B
	PE	575 nm	550 LP	575/26	C
	FITC	525 nm	505 LP	530/30	D
Rot (640 nm)	APC / Cyanine7	774 nm	750 LP	780/60	A
	APC	660 nm	keiner	670/14	B

Durch den violetten Laser wurde einzig das Fluorochrom Brilliant Violet 510 angeregt. Aufgrund des räumlich getrennten optischen Kollektionssystem mussten somit keine Emissionsüberlappungen mit anderen Fluorochromen berücksichtigt werden (siehe Abbildung 3).

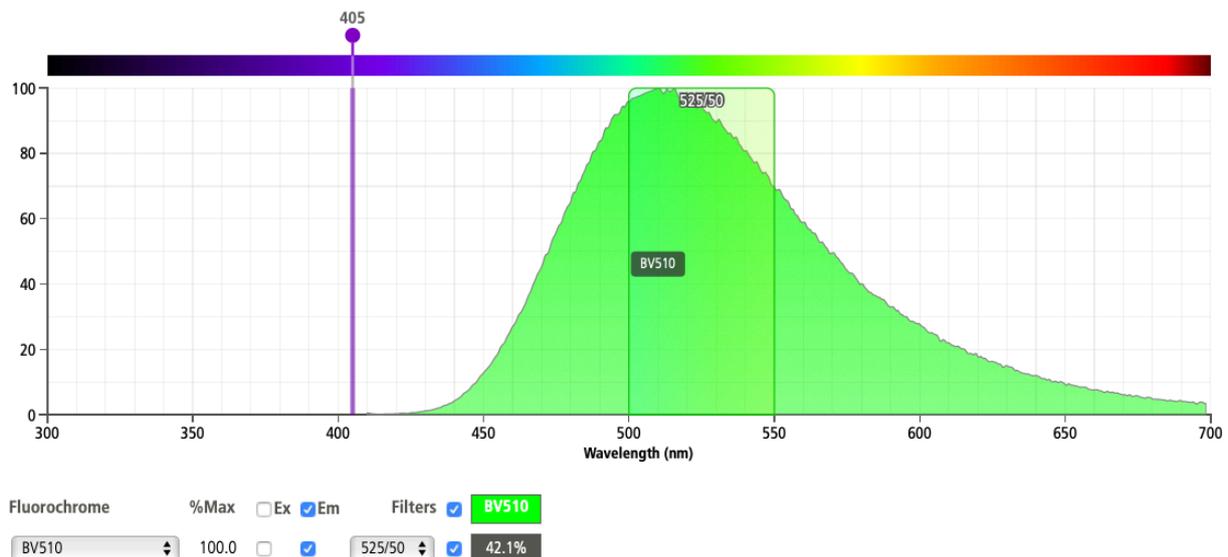


Abbildung 3: Emissionsspektrum des Fluorochroms Brilliant Violet 510. Gezeigt ist das Emissionsspektrum von BV510 (grüne Kurve) nach Exzitation durch monochromatisches Licht der Wellenlänge 405 nm (vertikale Linie). Weiter ist der Spektralbereich des spezifischen Bandpass-Filters eingezeichnet (farbiges Rechteck). Erstellt mit dem BD Spectrum Viewer (BD Biosciences).

Die Exzitation der Fluorochrome FITC, PE, PerCP/Cyanine5.5 und PE/Cyanine7 erfolgte gemeinsam durch den blauen Laser. Die Überlappung der Emissionsspektren im selben optischen Kollektionssystem resultiert in einer Detektion von Fluoreszenzlicht mehrerer Fluorochrome an den spezifischen Photomultipliern (siehe Abbildung 4). Analog dazu führte die Exzitation von APC und APC/Cyanine7 durch den roten Laser zu Signalüberlappungen im Detektionssystem (siehe Abbildung 5). Zur Vermeidung falsch positiver Signale war eine Kompensation notwendig. Diese erfolgte automatisiert mittels der FACSDiva Software von Becton Dickinson. Dazu

wurden OneComp™ Kompensationsbeads von Thermo Fischer Scientific verwendet. Dabei handelt es sich um ein Gemisch aus sphärischen Partikeln, von welchen eine Hälfte murine monoklonale Antikörper bindet und die andere nicht. Damit lassen sich bei Inkubation mit den verwendeten fluoreszenzmarkierten Antikörpern einfarbig markierte Positivkontrollen sowie ungefärbte Negativkontrollen erstellen. Für die automatische Kompensation werden ungefärbte Negativkontrollen, sowie anschließend für jedes verwendete Fluorochrom einfarbig markierte Positivkontrollen gemessen. Nach Einspeisung aller positiven und negativen Kontrollen wird die Kompensation durch das Programm kalkuliert und kann im Anschluss für alle durchgeführten Messungen verwendet werden.

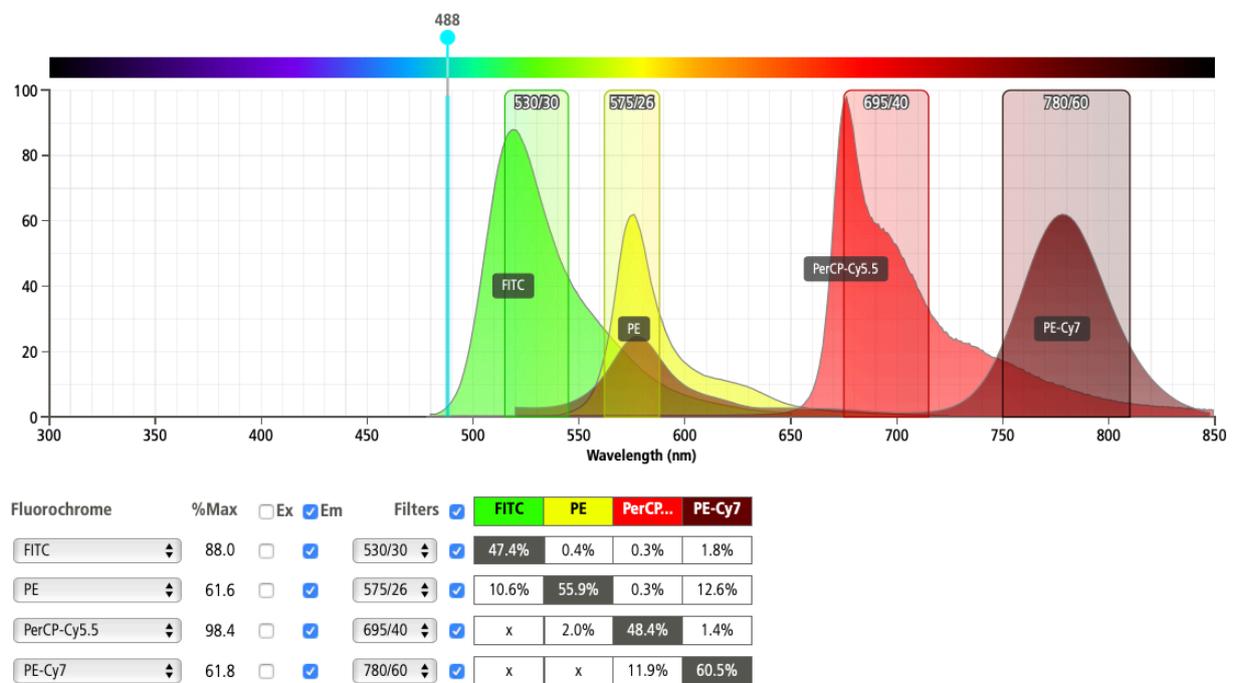


Abbildung 4: Emissionsspektren der Fluorochrome FITC, PE, PerCP-Cy5.5 und PE-Cy7. Gezeigt sind die Emissionsspektren der Fluorochrome FITC, PE, PerCP/Cyanine5.5 und PE/Cyanine7 (ausgefüllte Kurven) nach Exzitation durch monochromatisches Licht der Wellenlänge 488 nm (vertikale Linie). Durch Vorschaltung der Bandpass-Filter (farbige Rechtecke) wird die spektrale Überlappung am Photomultiplier reduziert. Die Tabelle zeigt den vom Photomultiplier erfassten Anteil der Emission des spezifischen Fluorochroms (dunkel hinterlegt). Zusätzlich sind die prozentualen Anteile der unspezifisch detektierten Emissionen der restlichen Fluorochrome angegeben (hell hinterlegt). Erstellt mit dem BD Spectrum Viewer (BD Biosciences).

Kompensationsmessung:

In Durchflusszytometrie Röhrcchen wurden für jedes Fluorochrom 300 µl FACS-Puffer vorgelegt. Nach Zugabe von je 20 µl Kompensationsbeads wurde je 1 µl des entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörpers hinzugegeben. Nach

Durchmischen mittels Laborschüttler schloss sich eine 15-minütige Inkubation auf Eis unter Aluminiumfolie an. Im Anschluss wurden je 1000 µl FACS-Puffer zu den Proben gegeben und dieselben bei 400 G und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig aspiriert und die Pellets in je 600 µl FACS-Puffer resuspendiert. Es folgte die Messung der Negativkontrolle und der Positivkontrollen am Durchflusszytometer.

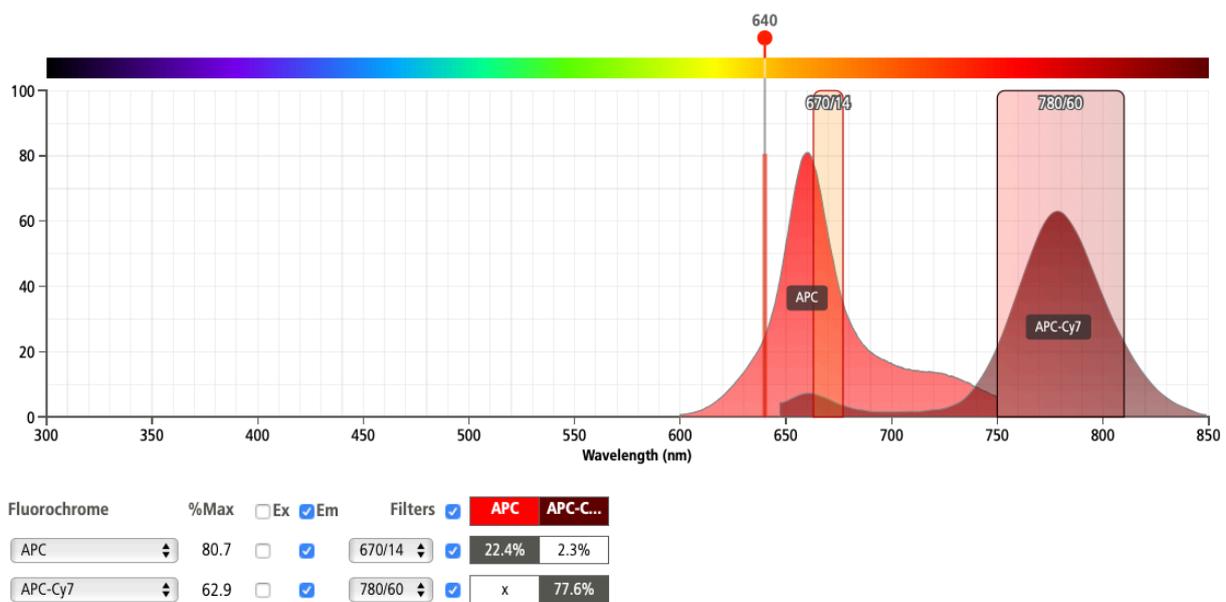


Abbildung 5: Emissionsspektren der Fluorochrome APC und APC-Cy7. Gezeigt sind die Emissionsspektren der Fluorochrome APC und APC/Cyanine7 (ausgefüllte Kurven) nach Exzitation durch monochromatisches Licht der Wellenlänge 640 nm (vertikale Linie). Durch Vorschaltung der Bandpass-Filter (farbige Rechtecke) wird die spektrale Überlappung am Photomultiplier reduziert. Die Tabelle zeigt den vom Photomultiplier erfassten Anteil der Emission des spezifischen Fluorochroms (dunkel hinterlegt). Zusätzlich ist der prozentuale Anteil der unspezifisch detektierten Emission des anderen Fluorochroms angegeben (hell hinterlegt). Erstellt mit dem BD Spectrum Viewer (BD Biosciences).

3.6.4 Datenauswertung

Die Messung der je zwei Proben erfolgte direkt im Anschluss an die Markierung der Oberflächenantigene (siehe 3.6.2). Es wurde das gesamte Volumen der Proben für die Messungen verwendet. Die Daten wurden exportiert und nach Ende der Einschussphase mithilfe der Software FlowJo™ von Becton Dickinson ausgewertet. Zur Auswertung werden die Messergebnisse der Durchflusszytometrie in zweidimensionalen Streudiagrammen betrachtet.

Vollblutprobe:

Zunächst wird in einem Punktwolkendiagramm das Seitwärtsstreulicht gegen das Vorwärtsstreulicht aufgetragen. Somit lassen sich die erfassten Zellpopulationen anhand ihrer Größe und Granularität auftrennen. Es lassen sich Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten voneinander abgrenzen (siehe Abbildung 6 A). Es wird ein Fenster um die Monozyten Population gesetzt und ein weiteres Punktwolkendiagramm erstellt, welches nur die innerhalb des Fensters liegenden Zellen integriert. Diese können nun anhand ihrer Fluoreszenzmarkierung weiter differenziert werden. Dazu werden die einfarbig markierten Oberflächenantigene

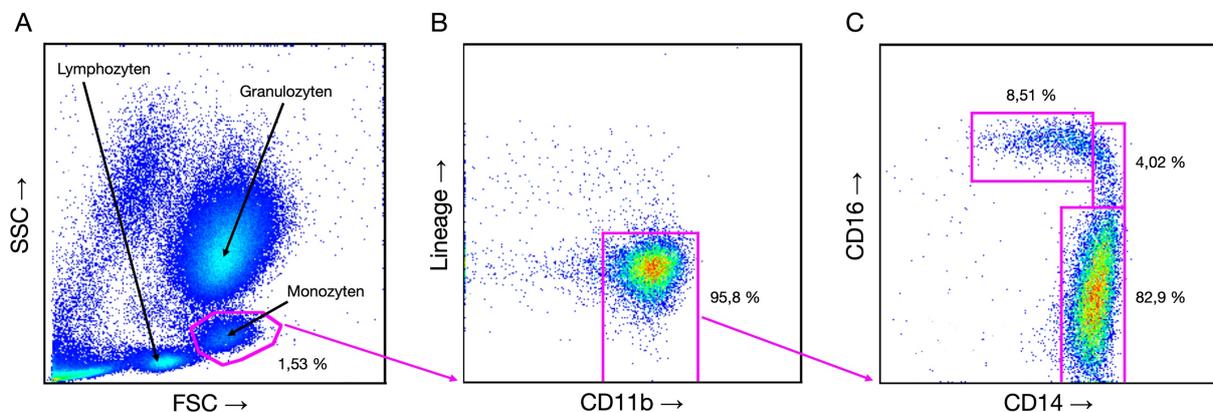


Abbildung 6: Differenzierung monozytärer Subpopulationen. Exemplarische Streudiagramme aus lysiertem fluoreszenzmarkiertem Vollblut. (A) Differenzierung aller durchflusszytometrisch erfasster Ereignisse anhand ihrer Größe (FSC = Vorwärtsstreulicht) und Granularität (SSC = Seitwärtsstreulicht). Es lassen sich Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten voneinander abgrenzen (Beschriftung). Der Anteil der im Fenster erfassten Zellen an allen Ereignissen beträgt 1,53 %. (B) Differenzierung der in A im Fenster eingeschlossenen Zellen anhand der Expression von CD11b. „Lineage“ = einfarbig mit BV510 gefärbte Zellen (T-, B-, NK-Zellen, Granulozyten). 95,8 % der in A integrierten Zellen exprimieren CD11b. (C) Differenzierung der in B im Fenster eingeschlossenen Monozyten anhand der Expression von CD14 und CD16. Erstellt aus in der Studie eingeschlossenen Patientenproben mit der Software FlowJo.

CD3, CD19, CD20, CD56, CD66b gegen CD11b aufgetragen. Dies ermöglicht eine Abgrenzung der CD11b exprimierenden Monozyten von anderen Zellpopulationen (siehe Abbildung 6 B). Im nächsten Schritt wird ein Fenster um die CD11b positiven Monozyten gesetzt und diese in einem neuen Streudiagramm weiter differenziert. Dafür wird CD16 gegen CD14 aufgetragen. Dies ermöglicht eine Differenzierung der drei monozytären Subpopulationen (siehe Abbildung 6 C). Zur statistischen Auswertung wurden die für die Proben bestimmten absoluten Zellkonzentrationen herangezogen (siehe 3.3.2). Für jedes Fenster berechnet die Software den prozentualen Anteil der innerhalb des Fensters liegenden Ereignisse an allen Ereignissen des Streudiagramms. Durch Multiplikation der prozentualen Anteile der

Zellpopulationen mit der Gesamtzellkonzentration wurde die Konzentration der betrachteten Zellpopulation berechnet.

Isolationsprobe:

Zur Überprüfung der Reinheit der erfolgten CD14⁺ Isolation wurde in einem Punktwolkendiagramm das Seitwärtsstreulicht gegen CD14 markierte Zellen aufgetragen. Durch Setzen eines Fensters um die CD14 positive Zellpopulation berechnet die Software den prozentualen Anteil der innerhalb des Fensters liegenden Zellen an allen gemessenen Zellen der Probe (siehe Abbildung 7A). Zu Überprüfung der Kontamination der CD14⁺ Isolation mit Thrombozyten und Thrombozyten-Monozyten-*doublers* wurde in einem Punktwolkendiagramm CD41 gegen CD14 aufgetragen. Hierdurch kann der Anteil CD41 positiver CD14 negativer Thrombozyten sowie CD41 und CD14 positiver *doublers* aus Thrombozyten und Monozyten an allen isolierten Zellen bestimmt werden (siehe Abbildung 7B).

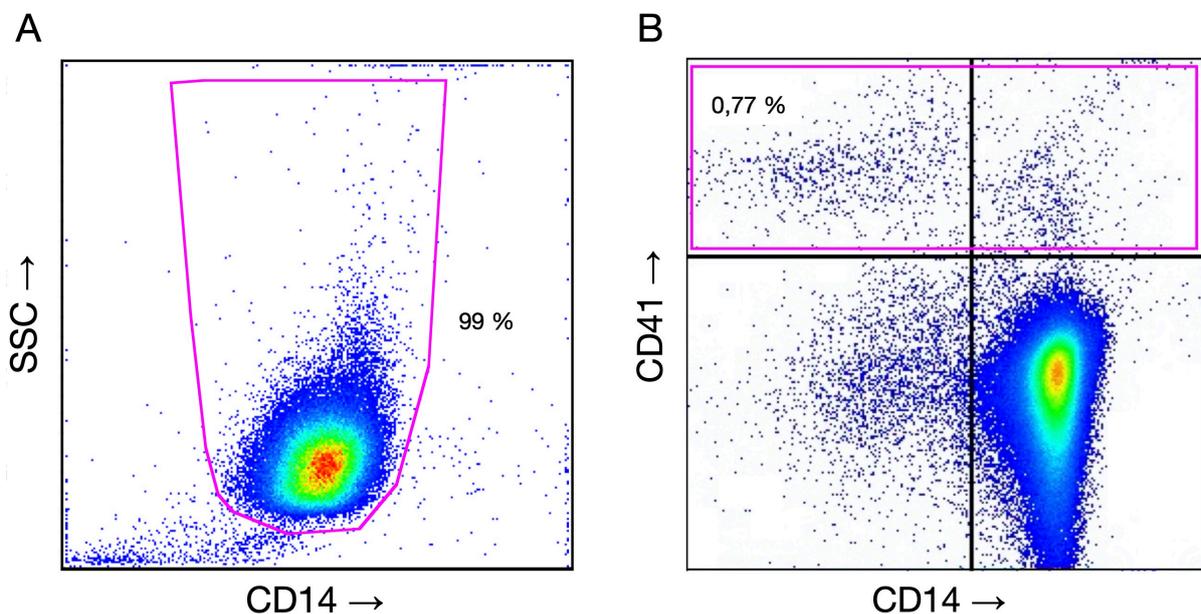


Abbildung 7: Bestimmung der Reinheit und Thrombozyten Kontamination der CD14⁺ Isolation. Exemplarische Streudiagramme aus fluoreszenzmarkierten Isolationsproben. **(A)** Auftragung aller durchflusszytometrisch erfassten Ereignisse nach Granularität (SSC = Seitwärtsstreulicht) und CD14 Expression. 99 % aller Ereignisse der Isolationsprobe sind CD14 positiv. **(B)** Auftragung aller durchflusszytometrisch erfassten Ereignisse nach CD41 und CD14 Expression. 0,77 % aller Ereignisse der Isolationsprobe sind CD41 positiv. Erstellt aus in der Studie eingeschlossenen Patientenproben mit der Software FlowJo.

3.7 Transkriptomanalyse

3.7.1 Transkriptomsequenzierung

Die Qualitäts- und Quantitätsbestimmung sowie die RNA-Sequenzierung der isolierten und versandten RNA wurde durch die DZHK-Shared Expertise Plattform (SE031) des Standortes Heidelberg / Mannheim durchgeführt.

Dafür wurden die Proben mittels dem Agilent Fragment Analyzer System und dem Agilent DNF-471 RNA Kit analysiert. Nach der Library Präparation mit dem Illumina TruSeq TotalRNA Stranded Kit erfolgte die RNA-Sequenzierung für 2 x 100bp Reads auf einer Illumina HiSeq2000 Plattform.

3.7.2 Aufarbeitung der Transkriptomdaten und funktionelle Analyse

Die Aufarbeitung und funktionelle Analyse der Transkriptomdaten wurde von Dr. Baiba Vilne von der Bioinformatics Research Unit der Riga Stradins University durchgeführt.

Nach einer standardisierten Qualitätskontrolle der Rohdaten der RNA-Sequenzierung unter Verwendung der Software *FastQC* folgte eine Kürzung der gelesenen Fragmente (*reads*) mit der Software *Trimmomatic*. Anschließend erfolgte die Zuordnung zum humanen Referenzgenom mit der Software *STAR aligner* sowie eine Qualitätskontrolle der Zuordnung mit der Software *Qualimap*.

Daraufhin erfolgte die Dekonvolution der Fragment Daten in Gen Daten unter Verwendung der Software *featureCounts*. Mit der Software *edgeR package* wurden *features* mit geringen Zählungen (median <10) entfernt und die Rohdaten der Lesung mit der *Trimmed mean of M-values* (TMM) Methode normalisiert. Es erfolgte der Vergleich der normalisierten Genexpressionsdaten der drei Gruppen (CCS-Patienten, Patienten am Infarkttag und Patienten am dritten Tag nach Infarkt) mittels LIMMA t-Teststatistik mit Benjamini-Hochberg-Korrektur für multiple Testprobleme (BH oder Falscherkennungsrate (FDR)) zur Berechnung der differentiell exprimierten Gene (DEGs). Gene wurden als differentiell exprimiert definiert, wenn die relative Genexpression (*fold change* (FC)) mindestens um den Faktor 2 verändert war,

entsprechend einem \log_2 der Genexpressionsänderung kleiner -1 oder größer 1 ($-1 \geq \log_2FC \geq 1$). Dafür wurde ein p -Wert von ≤ 0.05 bei einer Falscherkennungsrate von $< 0.25\%$ zwischen den jeweiligen beiden Vergleichsgruppen vorausgesetzt. Die Visualisierung der DEGs als *Volcano plot* erfolgte unter Verwendung der Software *ggplot2 R package*. Anschließend erfolgte die Analyse der signifikanten funktionellen Anreicherung der DEGs in den Gen Ontologie Annotationskategorien „molekulare Funktionen“ und „biologische Prozesse“ mittels der Software *ToppFun* der Website *ToppGene Suite*.

3.7.3 Auswertung der Genexpressionsanalyse

Von den differentiell exprimierte Gene (DEGs) mit einer relativen Veränderung der Genexpression um mindestens den Faktor 8 ($-3 \geq \log_2FC \geq 3$) wurden jeweils die zehn am stärksten differentiell exprimierten Gene weitergehend analysiert. In den Transkriptomvergleichen, die keine oder weniger als drei DEGs mit einer relativen Veränderung der Genexpression um mindestens den Faktor 8 ergaben, wurden die zehn am stärksten differentiell exprimierten Gene mit einer relativen Veränderung der Genexpression um mindestens den Faktor 4 ($-2 \geq \log_2FC \geq 2$) weitergehend analysiert. Ferner wurden alle weitergehend betrachteten DEGs auf eine differentielle Expression in den jeweils anderen Vergleichsgruppen untersucht.

Die Auswertung der näher betrachteten DEGs umfasste eine Recherche in den Genom Datenbanken *Ensembl* und *GeneCards* sowie eine Literaturrecherche zum entsprechenden Gen in der *PubMed* Datenbank.

3.8 Statistische Auswertungen

Die digitale Dokumentation der erfassten Studiendaten erfolgte mittels der Software Excel der Firma Microsoft. Statistische Analysen erfolgten mit der Software Prism der Firma GraphPad. Für kategoriale nominal-skalierte Merkmale wurden absolute und relative Häufigkeiten berechnet. Vergleiche kategorialer Merkmale erfolgten mit dem Exakten Test nach Fisher. Für quantitative stetig-skalierte Merkmale wurden bei symmetrischer Verteilung Mittelwert und Standardabweichung bestimmt und bei asymmetrischer Verteilung Median sowie Spannweite oder Interquartilsabstand. Bei normalverteilten quantitativen Merkmalen wurde eine einfache Varianzanalyse mit

anschließendem Holm-Šídák-Test verwendet. Bei fehlender Normalverteilung in den analysierten quantitativen Merkmalen erfolgten Vergleiche von zwei Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test. Vergleiche von drei oder mehr ungepaarten Gruppen nicht normalverteilter quantitativer Merkmale erfolgten mit dem Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Test. Vergleiche von drei oder mehr gepaarten Gruppen nicht normalverteilter quantitativer Merkmale erfolgten mit einer *Mixed-Effects-Analyse* mit Greenhouse-Geisser Korrektur und anschließendem Dunnett- oder Tukey-Test.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des Studienkollektivs

Insgesamt konnten im Einschlusszeitraum 32 STEMI-Patienten und 30 CCS-Patienten für die Studienteilnahme rekrutiert werden. Aus dem gesamten Studienkollektiv wurden jeweils 20 STEMI- und CCS-Patienten für den Transkriptomvergleich ausgewählt (siehe 3.5.2).

4.1.1 Patientencharakteristika

Gesamtes Studienkollektiv:

Der Vergleich der demographischen Daten (siehe Tabelle 12) zeigt eine Überrepräsentation männlicher Studienteilnehmer sowohl in der Experimentalgruppe (STEMI-Patienten) als auch in der Kontrollgruppe (Patienten mit chronischem Koronarsyndrom). Diese spiegelt die epidemiologischen Unterschiede zwischen den Geschlechtern bei STEMI wider. Da die Patienten mit CCS geschlechtsadaptiert zu den STEMI-Patienten in die Kontrollgruppe eingeschlossen wurden, findet sich diese Überrepräsentation auch in der Kontrollgruppe wieder. Hervorzuhebende Unterschiede zwischen STEMI- und CCS-Patienten bestehen unter anderem beim Nikotinkonsum. Unter den STEMI-Patienten gaben 75 % einen Nikotinkonsum an und 50 % einen aktiven Konsum. Auf der anderen Seite gaben nur 63 % der CCS-Patienten einen Nikotinkonsum an und lediglich 10 % einen aktiven Konsum. Ferner bestanden Unterschiede bei der Dauermedikation, welche bei den STEMI Patienten vor der stationären Behandlung und bei den CCS Patienten vor der ambulanten Vorstellung und somit vor Patienteneinschluss eingenommen wurde. Bis auf Ticagrelor wurden alle erfassten Medikamente unter den CCS-Patienten häufiger eingenommen. Besonders große Unterschiede finden sich bei der dauerhaften Einnahme von Acetylsalicylsäure und Statinen vor stationärer beziehungsweise ambulanter Behandlung.

Tabelle 12: Charakteristika des gesamten Studienkollektivs. Nominal-skalierte Merkmale sind als absolute (relative) Häufigkeit angegeben. Symmetrisch verteilte stetig-skalierte Merkmale sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Asymmetrisch verteilte stetig-skalierte Merkmale sind als Median

[Interquartilsabstand] angegeben.

Merkmal	STEMI	CCS	p-Wert
Patientenzahl	32	30	
Geschlecht			
männlich	28 (87,5 %)	25 (83,3 %)	
weiblich	4 (12,5 %)	5 (16,7 %)	
Alter in Jahren	61 ± 14	65 ± 11	p=0,14
Kardiovaskuläre Risikofaktoren			
Dyslipidämie	22 (69 %)	26 (87 %)	p=0,13
Arterielle Hypertonie	22 (69 %)	26 (87 %)	p=0,13
Aktiver Nikotinkonsum	16 (50 %)	3 (10 %)	p=0,0008
Sistierter Nikotinkonsum	8 (25 %)	16 (53 %)	p=0,04
Diabetes mellitus	6 (19 %)	10 (33 %)	p=0,25
Body-Mass-Index	27,6 ± 4,6	27,8 ± 5,0	p=0,86
Positive Familienanamnese	7 (22 %)	4 (13 %)	p=0,51
Stattgehabter Myokardinfarkt / Apoplex	7 (22 %)		
Stattgehabter Apoplex		6 (20 %)	p>0,99
Dauermedikation vor Aufnahme (STEMI) / vor ambulanter Vorstellung (CCS)			
Acetylsalicylsäure	10 (31 %)	24 (83 %)	p<0,0001
Clopidogrel	2 (6 %)	9 (31 %)	p=0,02
Ticagrelor	3 (9 %)	0 (0 %)	p=0,24
Prasugrel	0 (0 %)	0 (0 %)	p=1
Betablocker	10 (31 %)	19 (66 %)	p=0,01
RAAS-Inhibitoren	14 (44 %)	21 (72 %)	p=0,04
Statine	8 (25 %)	21 (72 %)	p=0,0003
Calciumantagonisten	4 (12 %)	5 (17 %)	p=0,72
Diuretika	7 (22 %)	10 (34 %)	p=0,39
Nierenfunktion			
Kreatinin in mg/dl	1,06 ± 0,26		
Glomeruläre Filtrationsrate in ml/min	75 ± 18		
Infarzierte Koronararterie			
Ramus interventricularis anterior	17 (53 %)		

Ramus circumflexus	3 (9 %)		
Rechte Koronararterie	12 (38 %)		
<hr/>			
Herzenzyme			
<hr/>			
Maximalwert Kreatinkinase in U/l			
CK-Gesamt	1485 [3328-734]		
CK-MB	180 [353-109]		
<hr/>			
Dauermedikation bei Entlassung (STEMI) / nach ambulanter Vorstellung (CCS)			
Acetylsalicylsäure	32 (100 %)	29 (100 %)	p=1
Clopidogrel	5 (16 %)	10 (34 %)	p=0,14
Ticagrelor	20 (63 %)	0 (0 %)	p<0,0001
Prasugrel	7 (22 %)	0 (0 %)	p=0,01
Betablocker	32 (100 %)	25 (86 %)	p=0,05
RAAS-Inhibitoren	31 (97 %)	25 (86 %)	p=0,18
Statine	32 (100 %)	29 (100 %)	p=1
Calciumantagonisten	4 (13 %)	6 (21 %)	p=0,50
Diuretika	19 (59 %)	15 (52 %)	p=0,61

Patienten des Transkriptomvergleichs:

Die Gegenüberstellung der demographischen Merkmale der für den Transkriptomvergleich ausgewählten Patienten (siehe 3.5.2) ist in Tabelle 13 zusammengefasst. Die Überrepräsentation des männlichen Geschlechts in beiden Gruppen ist analog zum Gesamtkollektiv. Die Differenz beim Risikofaktor Rauchen und insbesondere beim aktiven Konsum ist deutlicher ausgeprägt als im Gesamtkollektiv. Die Differenz der bei Aufnahme dauerhaft eingenommenen Medikamente entspricht der unter allen Patienten.

Tabelle 13: Charakteristika des sequenzierten Studienkollektivs. Nominal-skalierte Merkmale sind als absolute (relative) Häufigkeit angegeben. Symmetrisch verteilte stetig-skalierte Merkmale sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Asymmetrisch verteilte stetig-skalierte Merkmale sind als Median [Interquartilsabstand] angegeben.

Merkmal	STEMI	CCS	p-Wert
Patientenzahl	20	20	
Geschlecht			
männlich	17 (85 %)	16 (80 %)	

weiblich	3 (15 %)	4 (20 %)	
Alter in Jahren	59 ± 14	61 ± 11	p=0,49
Kardiovaskuläre Risikofaktoren			
Dyslipidämie	12 (60 %)	17 (85 %)	p=0,16
Arterielle Hypertonie	16 (80 %)	17 (85 %)	p>0,99
Aktiver Nikotinkonsum	12 (60 %)	1 (5 %)	p=0,0004
Sistierter Nikotinkonsum	5 (25 %)	11 (55 %)	p=0,11
Diabetes mellitus	5 (25 %)	6 (30 %)	p>0,99
Body-Mass-Index	27,7 ± 4,8	28,5 ± 5,0	p=0,64
Positive Familienanamnese	5 (25 %)	4 (20 %)	p>0,99
Stattgehabter Myokardinfarkt / Apoplex	4 (20 %)		
Stattgehabter Apoplex		3 (15 %)	p>0,99
Dauermedikation bei Aufnahme (STEMI) / vor ambulanter Vorstellung (CCS)			
Acetylsalicylsäure	6 (30 %)	15 (75 %)	p=0,01
Clopidogrel	1 (5 %)	6 (30 %)	p=0,09
Ticagrelor	1 (5 %)	0 (0 %)	p>0,99
Prasugrel	0 (0 %)	0 (0 %)	p=1
Betablocker	8 (40 %)	12 (60 %)	p=0,34
RAAS-Inhibitoren	10 (50 %)	13 (65 %)	p=0,52
Statine	4 (20 %)	14 (70 %)	p=0,004
Calciumantagonisten	3 (15 %)	5 (25 %)	p=0,69
Diuretika	4 (20 %)	7 (35 %)	p=0,48
Nierenfunktion			
Kreatinin in mg/dl	1,02 ± 0,18		
Glomeruläre Filtrationsrate in ml/min	79 ± 16		
Infarzierte Koronararterie			
Ramus interventricularis anterior	12 (60 %)		
Rechte Koronararterie	8 (40 %)		
Herzenzyme			
Maximalwert Kreatinkinase in U/l			
CK-Gesamt	1395 [4480-826]		
CK-MB	163 [332-101]		

Dauermedikation bei Entlassung (STEMI) / nach ambulanter Vorstellung (CCS)			
Acetylsalicylsäure	20 (100 %)	20 (100 %)	p=1
Clopidogrel	3 (15 %)	5 (25 %)	p=0.69
Ticagrelor	11 (55 %)	0 (0 %)	p=0.0001
Prasugrel	6 (30 %)	0 (0 %)	p=0.02
Betablocker	20 (100 %)	17 (85 %)	p=0.23
RAAS-Inhibitoren	20 (100 %)	16 (80 %)	p=0.11
Statine	20 (100 %)	20 (100 %)	p=1
Calciumantagonisten	3 (15 %)	6 (30 %)	p=0.45
Diuretika	13 (65 %)	10 (50 %)	p=0.52

4.1.2 Anzahl und Zeitpunkte der Blutentnahmen bei STEMI-Patienten

Anzahl der gewonnenen Blutproben:

Unter allen eingeschlossenen STEMI-Patienten konnte von 25 (78 %) eine zweite Blutentnahme am dritten Tag und von 12 (38 %) eine dritte Blutentnahme am fünften Tag eingeholt werden.

Abstände zwischen Blutentnahmen:

Die Blutentnahmen am dritten Tag erfolgten im Gesamtkollektiv durchschnittlich 72 Stunden nach der ersten Entnahme mit einer Standardabweichung von 7,1 Stunden. Die Proben am fünften Tag erfolgten durchschnittlich 118 Stunden nach der ersten Entnahme mit einer Standardabweichung von 3,9 Stunden. In der Transkriptomgruppe war bei allen ausgewählten 20 STEMI-Patienten eine zweite Entnahme im Abstand von durchschnittlich 71 Stunden zur ersten erfolgt, mit einer Standardabweichung von 5,7 Stunden.

Symptombeginn bis Blutentnahme:

Der mediane Abstand zwischen anamnestisch eruiertem Symptombeginn und erster Blutentnahme betrug im Gesamtkollektiv der Patienten 3,5 Stunden mit einem Minimum von 1,3 und einem Maximum von 14 Stunden. In der Transkriptomgruppe betrug der Median dieses Intervalls 3,5 Stunden mit einem Minimum von 1,3 und einem Maximum von 9 Stunden.

4.2 Quantitative Veränderungen von Blut-Leukozyten nach Myokardinfarkt

4.2.1 Blut-Leukozyten

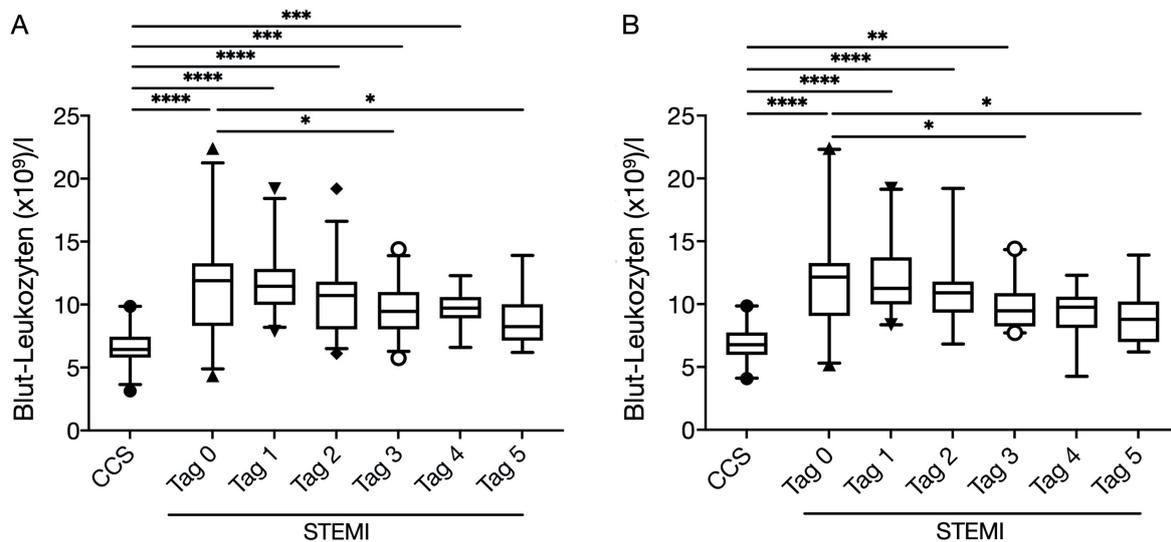


Abbildung 8: Differentialblutbild. Verlauf von Blut-Leukozyten bei STEMI vs. CCS. Gezeigt ist die Anzahl von Blut-Leukozyten bei Patienten mit CCS und der Verlauf bei Patienten mit STEMI. Dargestellt als Box-Plot mit Median und Interquartilsabstand (Box). Punkte außerhalb des 5. und 95. Perzentils (Whisker) sind als Symbole dargestellt. Für die ungepaarten Vergleiche zwischen CCS Patienten und STEMI Patienten wurde der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Test, für die gepaarten Vergleiche der Tage 1-5 mit Tag 0 der STEMI Patienten eine *Mixed-Effects*-Analyse mit anschließendem Dunnett-Test verwendet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. (A) Gesamtes Studienkollektiv; CCS, $n=30$; STEMI, $n=32$. (B) Sequenzierte Proben; CCS, $n=20$; STEMI, $n=20$.

In der Experimentalgruppe zeigen sich im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte Zahlen der Blut-Leukozyten ab dem Tag des stattgehabten STEMIs mit konstanter Regredienz im Verlauf. An den späteren Zeitpunkten nach Infarkt findet sich eine an Tag 3 und Tag 5 signifikante Abnahme der Blut-Leukozyten im Vergleich zur initialen Erhöhung am Infarkttag (siehe Abbildung 8).

4.2.2 Neutrophile Granulozyten im Blut

Bei STEMI Patienten zeigt sich eine deutliche und signifikante Erhöhung der neutrophilen Granulozyten im Blut im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die meisten neutrophilen Granulozyten zirkulieren am Infarkttag. Im Verlauf kommt es zu einem Abfall der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten, bereits am dritten Tag nach

Infarkt zeigt sich ein signifikanter Rückgang im Vergleich zum Infarkttag (siehe Abbildung 9).

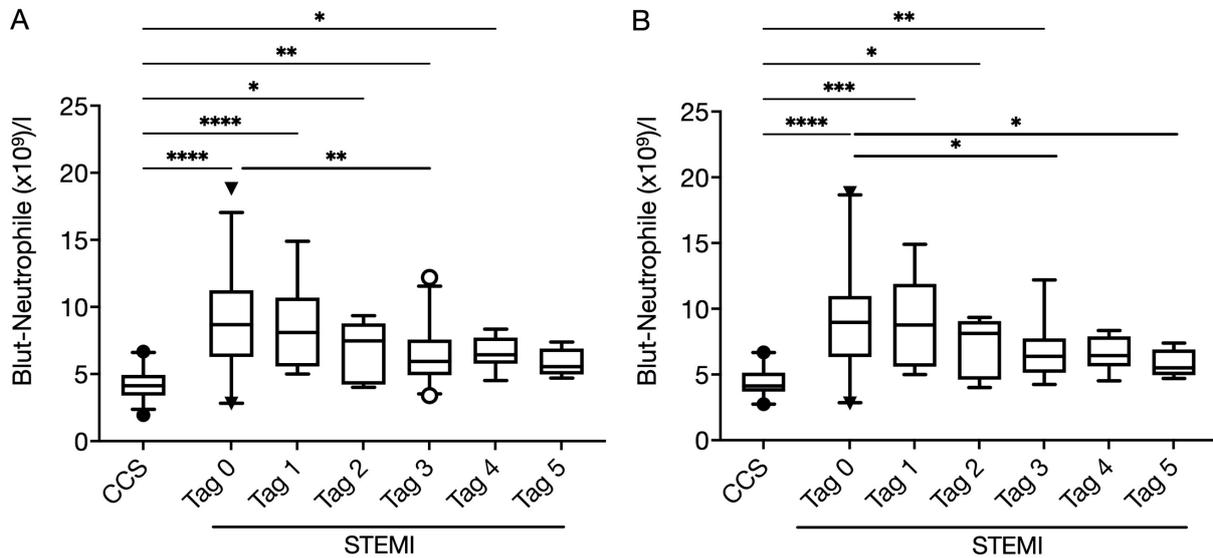


Abbildung 9: Differentialblutbild. Verlauf von Neutrophilen Granulozyten im Blut bei STEMI vs. CCS. Gezeigt ist die Anzahl von Neutrophilen Granulozyten im Blut im Differentialblutbild bei CCS-Patienten und der Verlauf bei STEMI-Patienten. Dargestellt als Box-Plot mit Median und Interquartilsabstand (Box). Punkte außerhalb des 5. und 95. Perzentils (Whisker) sind als Symbole dargestellt. Für die ungepaarten Vergleiche zwischen CCS Patienten und STEMI Patienten wurde der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Test, für die gepaarten Vergleiche der Tage 1-5 mit Tag 0 der STEMI Patienten eine *Mixed-Effects-Analyse* mit anschließendem Dunnett-Test verwendet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. (A) Gesamtes Studienkollektiv; CCS, $n=30$; STEMI, $n=32$. (B) Sequenzierte Proben; CCS, $n=20$; STEMI, $n=20$.

4.2.3 Blut-Lymphozyten

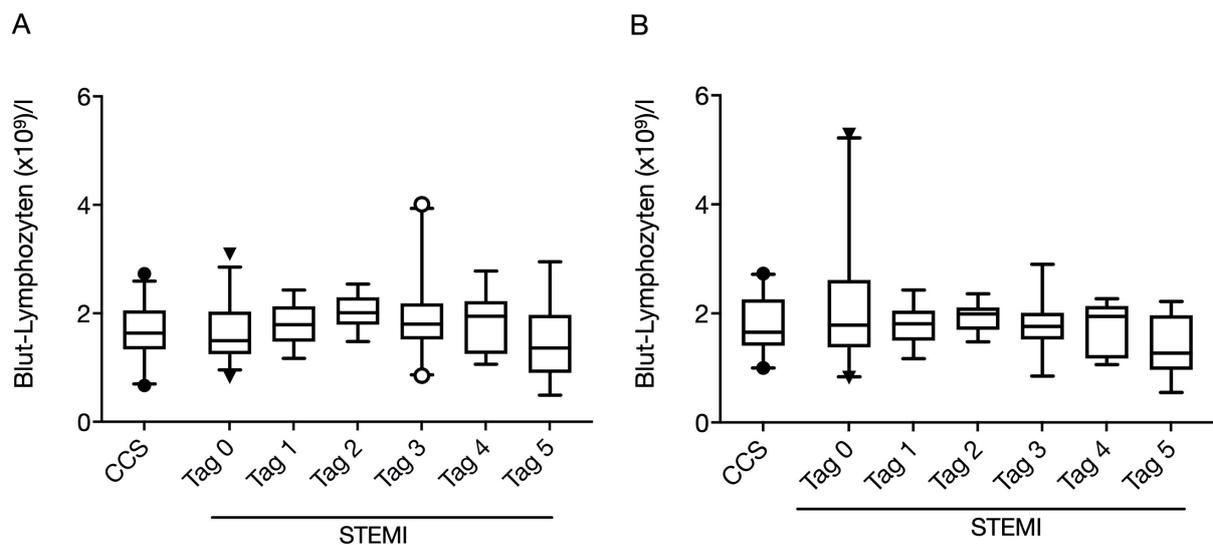


Abbildung 10: Differentialblutbild. Verlauf von Blut-Lymphozyten bei STEMI vs. CCS. Gezeigt ist die Anzahl von Blut-Lymphozyten im Differentialblutbild bei CCS-Patienten und der Verlauf bei STEMI-Patienten. Dargestellt als Box-Plot mit Median und Interquartilsabstand (Box). Punkte außerhalb des 5. und 95. Perzentils (Whisker) sind

als Symbole dargestellt. Für die ungepaarten Vergleiche zwischen CCS Patienten und STEMI Patienten wurde der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Test, für die gepaarten Vergleiche der Tage 1-5 mit Tag 0 der STEMI Patienten eine *Mixed-Effects-Analyse* mit anschließendem Dunn-Test verwendet. (A) Gesamtes Studienkollektiv; CCS, n=30; STEMI, n=32. (B) Sequenzierte Proben; CCS, n=20; STEMI, n=20.

Der Zahl der Blut-Lymphozyten bei STEMI Patienten zeigte weder im Vergleich zu CCS Patienten noch im zeitlichen Verlauf signifikante Veränderungen (siehe Abbildung 10).

4.2.4 Blut-Monozyten

Im Differentialblutbild zeigt die Experimentalgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte Monozytenzahlen. Am zweiten Tag nach Infarkt zirkulieren bei den STEMI Patienten die meisten Monozyten im Blut. Zudem zeigt sich am ersten bis dritten Tag nach Infarkt ein signifikanter Anstieg der Blut-Monozyten im Vergleich zum Infarkttag (siehe Abbildung 11).

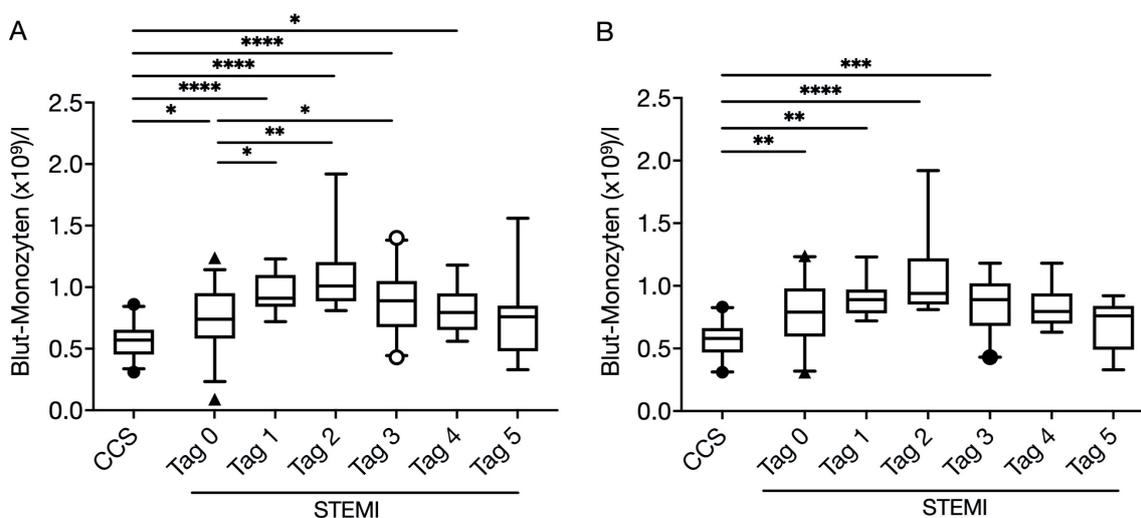


Abbildung 11: Differentialblutbild. Verlauf von Blut-Monozyten bei STEMI vs. CCS. Gezeigt ist die Anzahl von Blut-Monozyten im Differentialblutbild bei CCS-Patienten und der Verlauf bei STEMI-Patienten. Dargestellt als Box-Plot mit Median und Interquartilsabstand (Box). Punkte außerhalb des 5. und 95. Perzentils (Whisker) sind als Symbole dargestellt. Für die ungepaarten Vergleiche zwischen CCS Patienten und STEMI Patienten wurde der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Test, für die gepaarten Vergleiche der Tage 1-5 mit Tag 0 der STEMI Patienten eine *Mixed-Effects-Analyse* mit anschließendem Dunn-Test verwendet: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001. (A) Gesamtes Studienkollektiv; CCS, n=30; STEMI, n=32. (B) Sequenzierte Proben; CCS, n=20; STEMI, n=20.

In der Durchflusszytometriebestimmung zeigen die STEMI-Patienten in der ersten und der zweiten Blutentnahme im Vergleich zu den CCS-Patienten ebenfalls signifikant

erhöhte Monozytenzahlen. Die höchsten Zahlen zirkulierender Monozyten ergaben sich in den Proben vom dritten Tag nach Infarkt (siehe Abbildung 12).

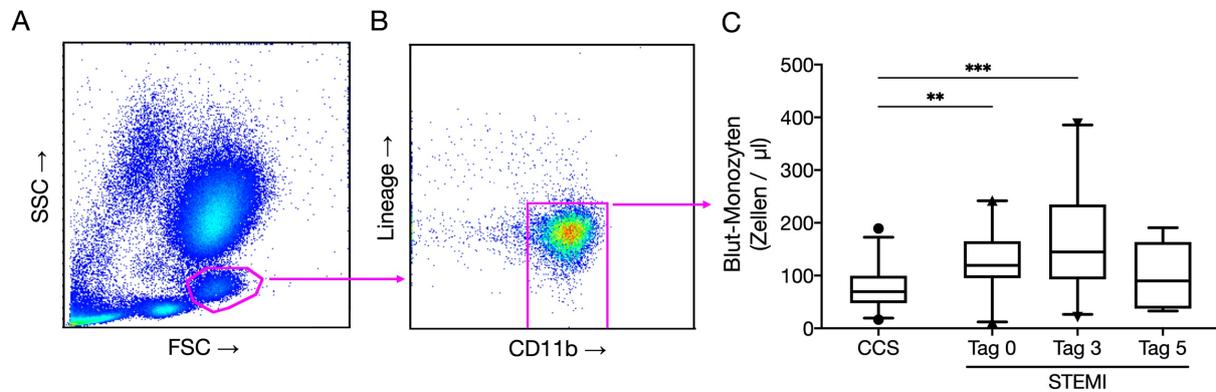


Abbildung 12: Durchflusszytometrie. Verlauf von Blut-Monozyten bei STEMI vs. CCS. (A) Darstellung der Zellen nach Größe (FSC) und Granularität (SSC) mittels Durchflusszytometrie. Abgrenzung von Monozyten (violettes Fenster). (B) Differenzierung nach CD11b und Lineage-Marker Expression. (C) Darstellung der durchflusszytometrisch bestimmten absoluten Konzentration von Blut-Monozyten bei STEMI-Patienten (n=32) am Tag des Infarkts sowie nach 72 und 120 Stunden im Vergleich zu CCS-Patienten (n=30). Dargestellt als Box-Plot mit Median und Interquartilsabstand (Box). Punkte außerhalb des 5. und 95. Perzentils (Whisker) sind als Symbole dargestellt. Für die ungepaarten Vergleiche zwischen CCS Patienten und STEMI Patienten wurde der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Test, für die gepaarten Vergleiche aller Zeitpunkte der STEMI Patienten eine *Mixed-Effects*-Analyse mit anschließendem Tukey-Test verwendet: **p<0,01, ***p<0,001. Erstellt mit den Softwares FlowJo und Prism.

Monozytäre Subpopulationen:

Die Erhöhung der gesamten Blut-Monozyten nach STEMI mit Höhepunkt am dritten Postinfarkt Tag findet sich auch bei den einzelnen Subgruppen wieder. Am deutlichsten findet sich diese Tendenz bei den klassischen $CD14^+ CD16^-$ Monozyten, welche am Tag des Infarkts und am dritten Tag nach Infarkt im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht sind (siehe Abbildung 13 D). Die intermediären $CD14^+ CD16^+$ Monozyten sind am dritten Tag nach Infarkt einerseits im Vergleich zur Kontrollgruppe und andererseits im Vergleich zum Infarkttag und zum fünften Tag nach Infarkt signifikant erhöht (siehe Abbildung 13 B).

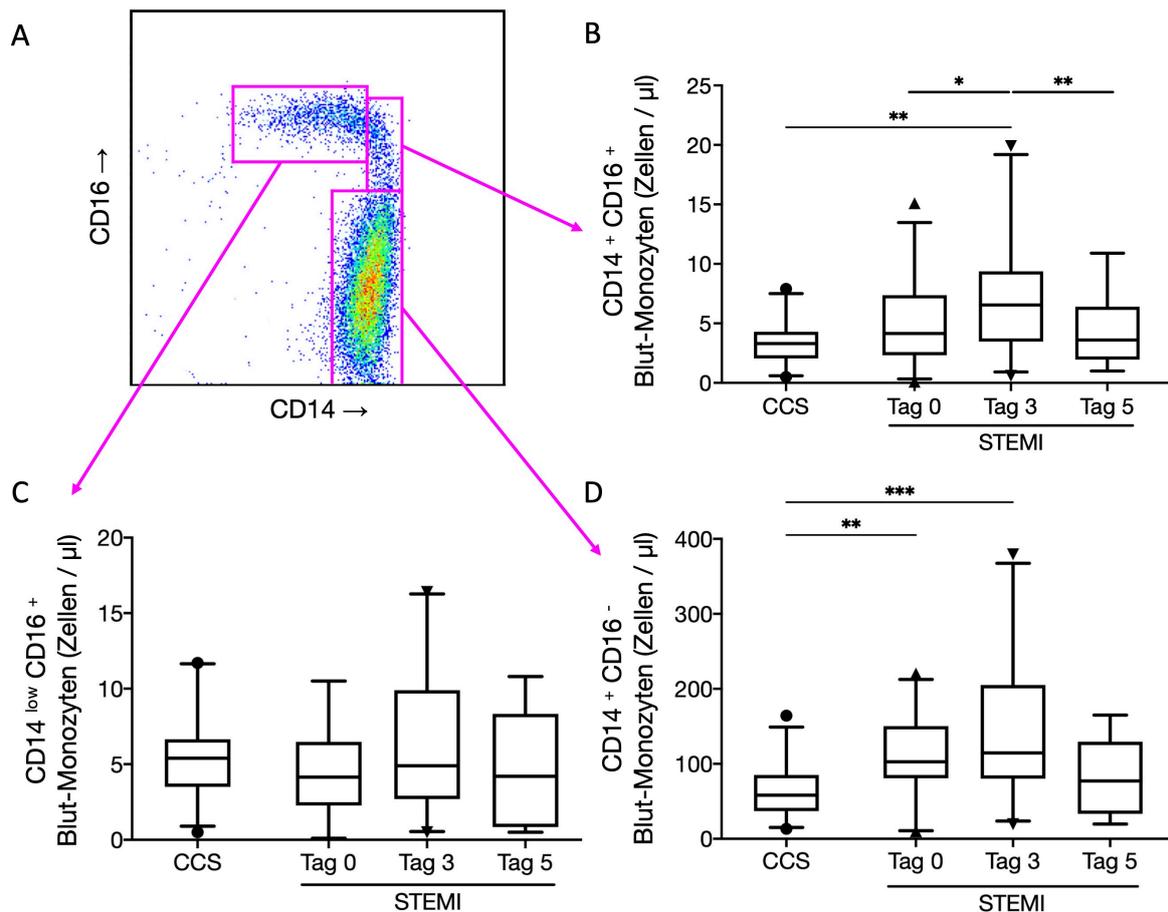


Abbildung 13: Durchflusszytometrie. Verlauf monozytärer Subpopulationen. Durchflusszytometrische Differenzierung der Monozyten anhand der CD14 und CD16 Expression (A). Darstellung der durchflusszytometrisch bestimmten absoluten Zahlen von CD14⁺CD16⁻ (D), CD14⁺CD16⁺ (B) und CD14^{low}CD16⁺ (C) Blut-Monozyten bei STEMI-Patienten (n=32) am Tag des Infarkts sowie nach 72 und 120 Stunden im Vergleich zu CCS-Patienten (n=30). (B, C, D) Dargestellt als Box-Plot mit Median und Interquartilsabstand (Box). Punkte außerhalb des 5. und 95. Perzentils (Whisker) sind als Symbole dargestellt. Für die ungepaarten Vergleiche zwischen CCS Patienten und STEMI Patienten wurde der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Test, für die gepaarten Vergleiche aller Zeitpunkte der STEMI Patienten eine *Mixed-Effects*-Analyse mit anschließendem Tukey-Test verwendet: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Erstellt mit den Softwares FlowJo und Prism.

4.3 Qualitative Veränderungen von Blut-Monozyten nach Myokardinfarkt

4.3.1 Reinheit der Monozytenisolate

Die Reinheit der CD14 Zellisolation aller isolierten Proben betrug durchschnittlich $96,1 \pm 3,6$ %. Die Reinheit aller Isolationen für die Transkriptomsequenzierung betrug durchschnittlich $97 \pm 1,8$ % mit einem Minimum von 90,7 % (siehe Abbildung 14). Die mediane Kontamination der CD14 Zellisolation aller isolierten Proben mit Thrombozyten oder Thrombozyten-Monozyten-*doublets* betrug 0,6 [0,4-1,3] % mit einem Maximum von 5,2 % (siehe Abbildung 15).

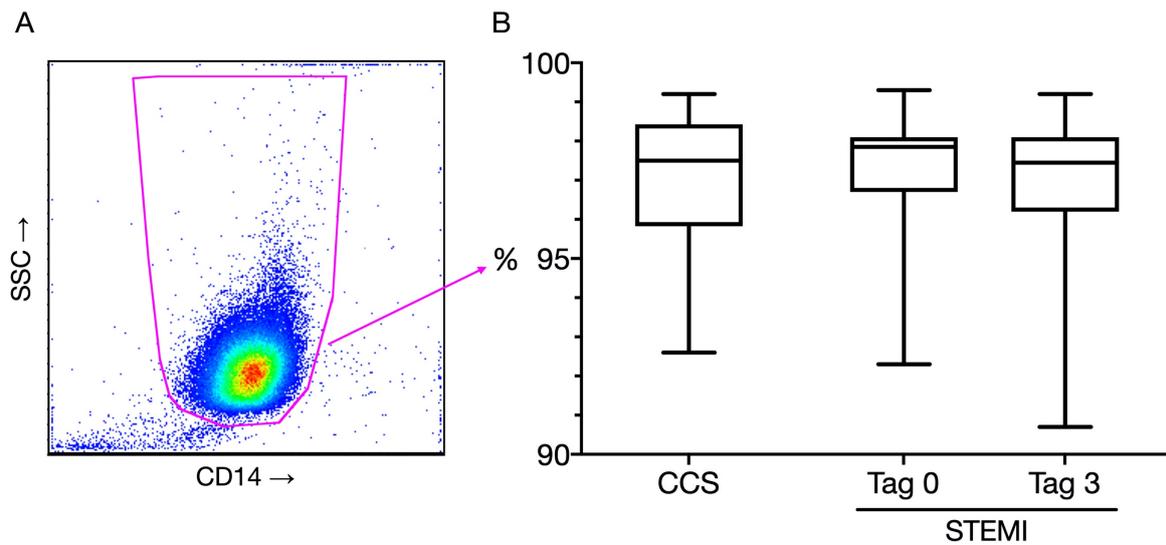


Abbildung 14: Durchflusszytometrie. Reinheit der sequenzierten Monozyten-Isolate. (A) Streudiagramm der fluoreszenzmarkierten Isolationsprobe. Auftragung aller durchflusszytometrisch erfassten Ereignisse nach Granularität (SSC) und CD14 Expression. Erstellt mit der Software FlowJo. (B) Gezeigt ist der prozentuale Anteil der CD14 positiven Zellen an allen durchflusszytometrisch erfassten Ereignissen in den Isolaten von CCS-Patienten (n=20) sowie STEMI-Patienten am Tag des Infarkts (n=20) und nach drei Tagen (n=20). Dargestellt als Box-Plot mit Median und Interquartilsabstand (Box), sowie Minimum und Maximum (Whisker). Für die Vergleiche aller Isolationsproben wurde eine einfach Varianzanalyse mit anschließendem Holm-Šidák-Test verwendet. Erstellt mit der Software Prism.

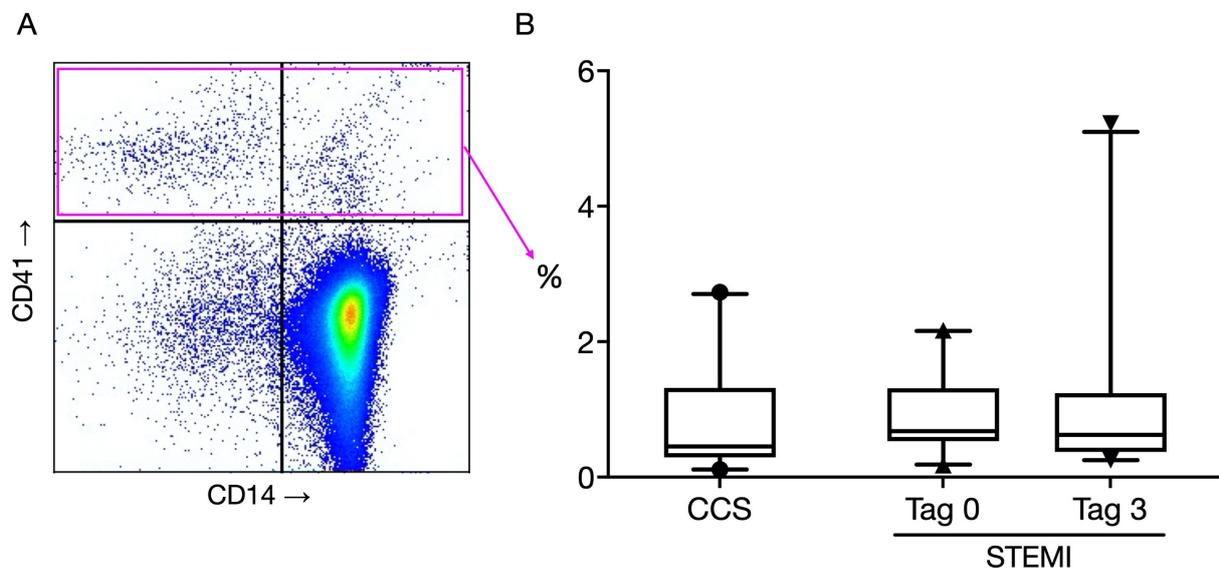


Abbildung 15: Durchflusszytometrie. Thrombozyten Kontamination der sequenzierten Monozyten-Isolate. (A) Streudiagramm der fluoreszenzmarkierten Isolationsprobe. Auftragung aller durchflusszytometrisch erfassten Ereignisse nach Granularität CD41 und CD14 Expression. Erstellt mit der Software FlowJo. (B) Gezeigt ist der prozentuale Anteil der CD41 positiven Zellen an allen durchflusszytometrisch erfassten Ereignissen in den Isolaten von CCS-Patienten (n=20) sowie STEMI-Patienten am Tag des Infarkts (n=20) und nach drei Tagen (n=20). Dargestellt als Box-Plot mit Median und Interquartilsabstand (Box). Punkte außerhalb des 5. und 95. Perzentils (Whisker) sind als Symbole dargestellt. Für die Vergleiche aller Isolationsproben wurde der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Test verwendet. Erstellt mit der Software Prism.

4.3.2 Differentiell exprimierte Gene und funktionelle Anreicherung

Differentielle Expression wurden bei einem p-Wert < 0.05 und einer Falscherkennungsrate (FDR) $< 0.25\%$ definiert als relative Veränderung der Genexpression um mindestens den Faktor 2, entsprechend einem \log_2 der Genexpressionsänderung kleiner -1 oder größer 1 . Die Analyse der funktionellen Anreicherung der differentiell exprimierten Gene für Gen Ontologie Annotationen ergab eine Vielzahl von signifikanten Anreicherungen in allen drei Vergleichen. Differentiell exprimierte Gene und deren funktionelle Anreicherung sind im Folgenden gemeinsam bei den entsprechenden Vergleichen aufgeführt.

4.3.2.1 STEMI Tag 0 versus CCS:

Differentiell exprimierte Gene:

Der Vergleich der Genexpression in Blut-Monozyten von Patienten mit einem STEMI am Infarkttag mit denen der Kontrollgruppe mit chronischem Koronarsyndrom ergab eine differentielle Expression von 1708 Genen. Davon zeigten 285 (17 %) Gene bei den Infarktpatienten eine vermehrte Expression und 1423 (83 %) Gene eine verminderte Expression (siehe Abbildung 16).

Unter allen vermehrt exprimierten Genen zeigten 30 (11 %) Gene eine mehr als 4-fach und darunter 10 (4 %) Gene eine mehr als 8-fach erhöhte Expression. Letztere sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Vermehrt exprimierte Gene STEMI Tag 0 versus CCS. Dargestellt sind vermehrt exprimierte Gene mit einer relativen Expressionsänderung > 8 bzw. $\log_2(\text{fold change}) > 3$ in Blut-Monozyten von STEMI-Patienten am Tag des Infarktes im Vergleich zu Blut-Monozyten der Kontrollgruppe mit CCS.

Gen	log2 Fold Change	p-Wert	q-Wert (FDR)
LINC00599	4.56	3.05E-04	9.22E-04
CYP19A1	3.82	3.24E-07	1.83E-06
SLC12A1	3.81	3.96E-03	9.35E-03
CTD-2033D15.2	3.67	3.11E-06	1.43E-05
THBS1	3.49	5.39E-08	3.74E-07
PSPHP1	3.42	1.36E-02	2.80E-02
C15orf54	3.28	9.69E-07	4.96E-06
RP11-625L16.3	3.28	2.40E-07	1.41E-06

RP11-462P6.1	3.21	5.36E-08	3.73E-07
IL18R1	3.04	2.44E-05	9.24E-05

Unter allen vermindert exprimierten Genen zeigten 126 (9 %) Gene eine mehr als 4-fach und darunter 9 (0,6 %) Gene eine mehr als 8-fach verminderte Expression. Letztere sind in Tabelle 15 aufgeführt.

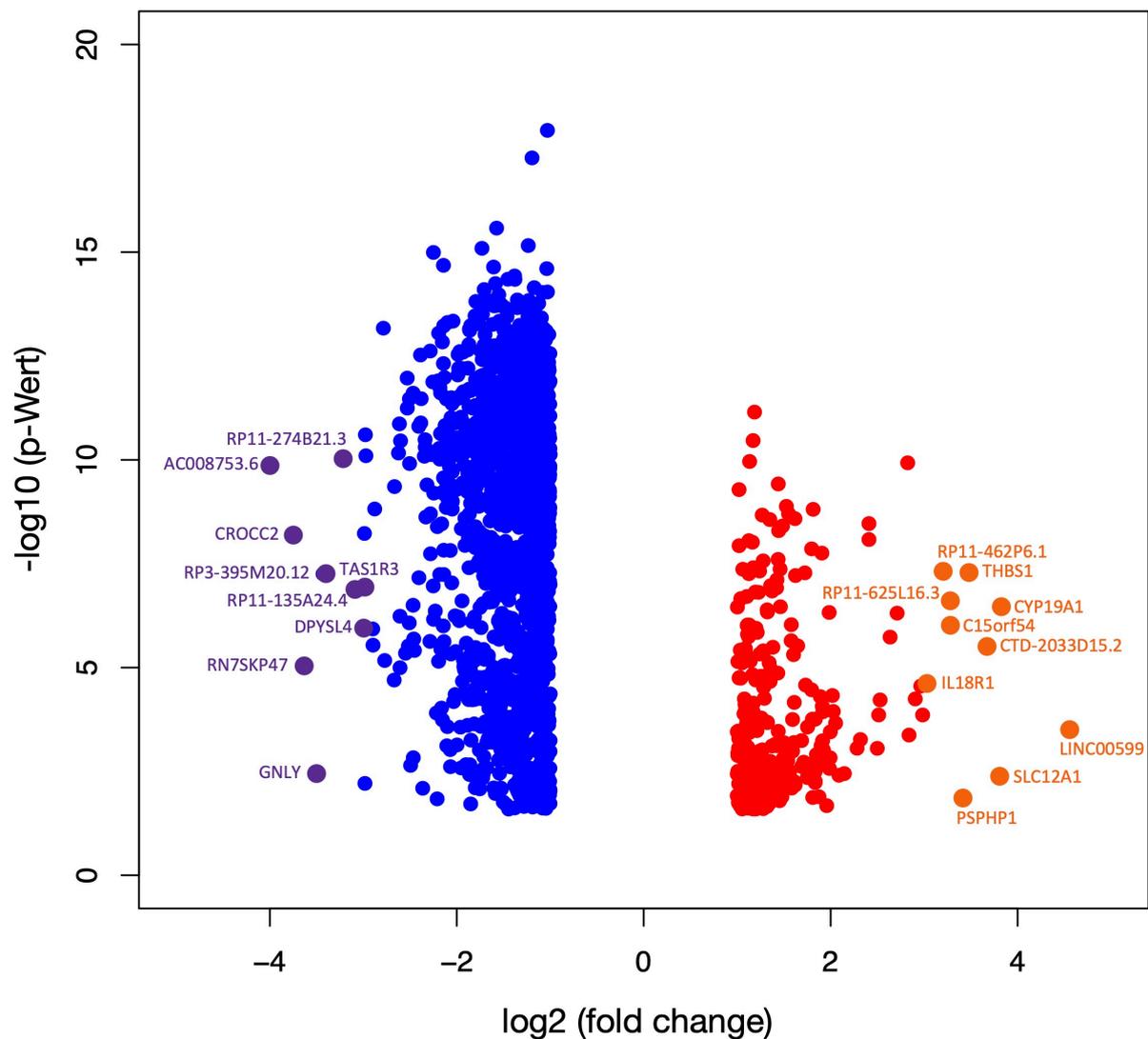


Abbildung 16: Differentielle Expression STEMI Tag 0 versus CCS. Volcano Plot mit logarithmischer Darstellung der statistischen Signifikanz (p-Wert) gegen die relative Veränderung der Genexpression (fold change) in Blut-Monozyten von STEMI-Patienten am Tag des Infarktes im Vergleich zu Blut-Monozyten der Kontrollgruppe. Dargestellt sind alle differentiell exprimierten Gene mit einer relativen Zunahme der Genexpression > 2 (rot) sowie mit einer relativen Abnahme der Genexpression $< 0,5$ (blau). Zudem sind nur differentiell exprimierte Gene mit $p < 0,025$ dargestellt. Differentiell exprimierte Gene mit einer relativen Genexpressionsänderung > 8 (orange) und $< 0,125$ (lila) sind annotiert.

Tabelle 15: Vermindert exprimierte Gene STEMI Tag 0 versus CCS. Dargestellt sind vermindert exprimierte Gene mit einer relativen Expressionsänderung < 0.125 bzw. $\log_2(\text{fold change}) < -3$ am Tag des Infarkts im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Gen	log2 Fold Change	p-Wert	q-Wert (FDR)
AC008753.6	-3.99	1.39E-10	2.38E-09
CROCC2	-3.76	6.13E-09	5.59E-08
RN7SKP47	-3.64	8.50E-06	3.53E-05
GNLY	-3.50	3.32E-03	0.007971
RP3-395M20.12	-3.43	5.56E-08	3.84E-07
RP11-274B21.3	-3.22	8.60E-11	1.64E-09
RP11-135A24.4	-3.09	1.38E-07	8.54E-07
TAS1R3	-3.03	1.29E-07	8.08E-07
DPYSL4	-3.00	1.15E-06	5.79E-06

Funktionelle Anreicherung der differentiell exprimierten Gene:

Die Einordnung der vermehrt exprimierten Gene in Blut-Monozyten von Patienten mit einem akuten STEMI am Infarkttag im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe ergab eine signifikante Anreicherung in 16 Annotationen der Kategorie „molekulare Funktionen“ und 49 Annotationen der Kategorie „biologische Prozesse“. Die zehn signifikantesten angereicherten „molekularen Funktionen“ sind in Tabelle 16 aufgeführt, die zehn signifikantesten angereicherten „biologischen Prozesse“ in Tabelle 17.

Tabelle 16: „Molekulare Funktionen“ – Signifikante Anreicherungen der vermehrt exprimierten Gene STEMI Tag 0 versus CCS. Dargestellt sind die zehn signifikantesten angereicherten Annotationen der vermehrt exprimierten Gene im Vergleich des Infarkttags mit der Kontrollgruppe in der Kategorie „molekulare Funktionen“.

GO:ID	Beschreibung	p-Wert	q-Wert (FDR)
GO:0004908	interleukin-1 receptor activity	5.34E-10	2.99E-07
GO:0004955	prostaglandin receptor activity	3.21E-07	8.96E-05
GO:0004954	prostanoid receptor activity	5.01E-07	9.34E-05
GO:0004953	icosanoid receptor activity	2.70E-06	3.77E-04
GO:0001609	G protein-coupled adenosine receptor activity	1.38E-05	1.55E-03
GO:0060089	molecular transducer activity	2.24E-05	1.90E-03

GO:0004896	cytokine receptor activity	2.38E-05	1.90E-03
GO:0004888	transmembrane signaling receptor activity	9.19E-05	6.10E-03
GO:0038023	signaling receptor activity	9.82E-05	6.10E-03
GO:0017159	pantetheine hydrolase activity	1.21E-04	6.73E-03

Tabelle 17: „Biologische Prozesse“ - Signifikante Anreicherungen der vermehrt exprimierten Gene STEMI Tag 0 versus CCS. Dargestellt sind die zehn signifikantesten angereicherten Annotationen der vermehrt exprimierten Gene im Vergleich des Infarkttags mit der Kontrollgruppe in der Kategorie „biologische Prozesse“.

GO:ID	Beschreibung	p-Wert	q-Wert (FDR)
GO:0022414	reproductive process	5.34E-10	2.99E-07
GO:0000003	reproduction	3.21E-07	8.96E-05
GO:0006954	inflammatory response	5.01E-07	9.34E-05
GO:0002544	chronic inflammatory response	2.70E-06	3.77E-04
GO:0001775	cell activation	1.38E-05	1.55E-03
GO:0050900	leukocyte migration	2.24E-05	1.90E-03
GO:0006952	defense response	2.38E-05	1.90E-03
GO:0050869	negative regulation of B cell activation	9.19E-05	6.10E-03
GO:0045321	leukocyte activation	9.82E-05	6.10E-03
GO:0071396	cellular response to lipid	1.21E-04	6.73E-03

Die Einordnung der vermindert exprimierten Gene in diesem Vergleich ergab signifikante Anreicherungen in 3 Annotationen der Kategorie „molekulare Funktionen“ und in 2 Annotationen der Kategorie „biologische Prozesse“, welche in Tabelle 18 und Tabelle 19 aufgeführt sind.

Tabelle 18: „Molekulare Funktionen“ - Signifikante Anreicherungen der vermindert exprimierten Gene STEMI Tag 0 versus CCS. Dargestellt sind die signifikant angereicherten Annotationen der vermindert exprimierten Gene im Vergleich des Infarkttags mit der Kontrollgruppe in der Kategorie „molekulare Funktionen“.

GO:ID	Beschreibung	p-Wert	q-Wert (FDR)
GO:0030695	GTPase regulator activity	1.03E-06	1.81E-03
GO:0060589	nucleoside-triphosphatase regulator activity	2.16E-06	1.90E-03

GO:0005096	GTPase activator activity	5.52E-05	3.24E-02
------------	---------------------------	----------	----------

Tabelle 19: „Biologische Prozesse“ - Signifikante Anreicherungen der vermindert exprimierten Gene STEMI Tag 0 versus CCS. Dargestellt sind die signifikant angereicherten Annotationen der vermindert exprimierten Gene im Vergleich des Infarkttags mit der Kontrollgruppe in der Kategorie biologische Prozesse.

GO:ID	Beschreibung	p-Wert	q-Wert (FDR)
GO:0006342	chromatin silencing	7.14E-06	4.74E-02
GO:0045814	negative regulation of gene expression, epigenetic	1.38E-05	4.74E-02

4.3.2.2 STEMI Tag 3 versus CCS:

Differentiell exprimierte Gene:

Der Vergleich der Genexpression in Blut-Monozyten von STEMI-Patienten am dritten Tag nach Infarkt mit denen der Kontrollgruppe ergab eine differentielle Expression von 1113 Genen (siehe Abbildung 17).

Von diesen zeigten 116 (10 %) bei den Infarktpatienten eine vermehrte und 997 (90 %) eine verminderte Expression. Von allen vermehrt exprimierten Genen zeigten 10 (9 %) eine mehr als 4-fach und 2 (1,7 %) eine mehr als 8-fach erhöhte Expression. Diese sind in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 20: Vermehrt exprimierte Gene STEMI Tag 3 versus CCS. Dargestellt sind vermehrt exprimierte Gene mit einer relativen Expressionsänderung > 4 bzw. $\log_2(\text{fold change}) > 2$ am dritten Tag nach Infarkt im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Gen	log2 Fold Change	p-Wert	q-Wert (FDR)
SLC12A1	4.32	5.52E-04	2.04E-03
CYP19A1	3.52	1.46E-06	1.12E-05
LINC00599	2.89	4.47E-03	1.29E-02
CLU	2.86	6.21E-08	7.60E-07
ANXA3	2.35	9.71E-06	5.73E-05
METTL7B	2.30	1.16E-04	5.09E-04
TRPM6	2.27	3.85E-04	1.48E-03
MTUS1	2.16	6.89E-04	2.48E-03
FAM196A	2.13	1.32E-03	4.43E-03

IL18R1	2.00	3.97E-04	1.52E-03
--------	------	----------	----------

Von allen vermindert exprimierten Genen zeigten 72 (7 %) eine mehr als 4-fach und 5 (0,5 %) eine mehr als 8-fach verminderte Expression. Letztere sind in Tabelle 21 aufgeführt.

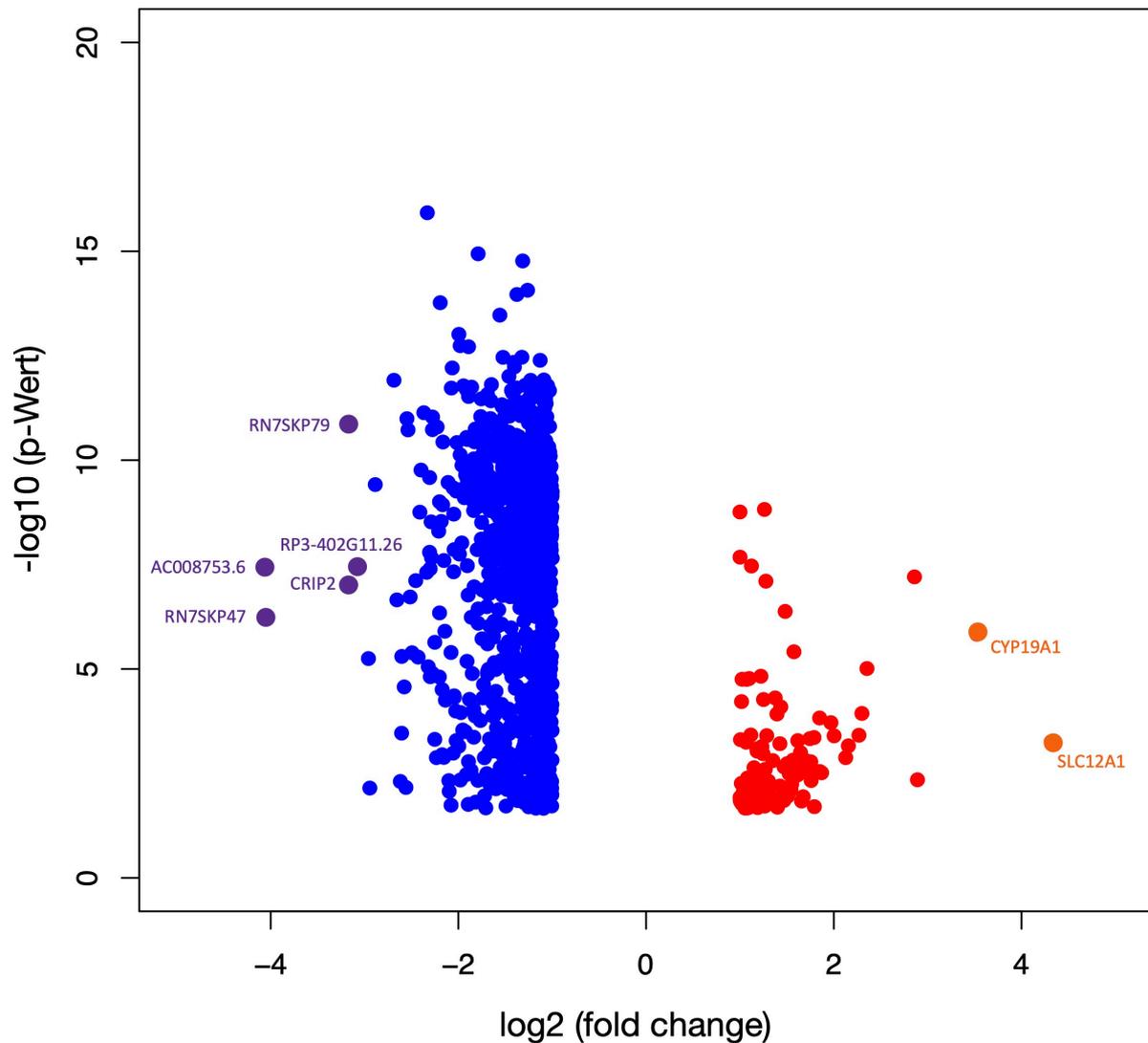


Abbildung 17: Differentielle Expression STEMI Tag 3 versus CCS. Volcano Plot mit logarithmischer Darstellung der statistischen Signifikanz (p-Wert) gegen die relative Veränderung der Genexpression (fold change) am dritten Tag nach Infarkt im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dargestellt sind alle differentiell exprimierten Gene mit einer relativen Zunahme der Genexpression > 2 (rot) sowie mit einer relativen Abnahme der Genexpression $< 0,5$ (blau). Zudem sind nur differentiell exprimierte Gene mit $p < 0,025$ dargestellt. Differentiell exprimierte Gene mit einer relativen Genexpressionsänderung > 8 (orange) und $< 0,125$ (lila) sind annotiert.

Tabelle 21: Vermindert exprimierte Gene STEMI Tag 3 versus CCS. Dargestellt sind vermindert exprimierte Gene mit einer relativen Expressionsänderung < 0.125 bzw. $\log_2(\text{fold change}) < -3$ am dritten Tag nach Infarkt im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Gen	log2 Fold Change	p-Wert	q-Wert (FDR)
RN7SKP47	-4.07	5.67E-07	4.96E-06
AC008753.6	-4.06	3.40E-08	4.68E-07
RN7SKP79	-3.16	1.34E-11	2.75E-09
CRIP2	-3.15	9.55E-08	1.10E-06
RP3-402G11.26	-3.07	3.88E-08	5.22E-07

Funktionelle Anreicherung der differentiell exprimierten Gene:

Die Einordnung der vermehrt exprimierten Gene in Blut-Monozyten von STEMI-Patienten am dritten Tag nach Infarkt im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe ergab eine signifikante Anreicherung in 4 Annotationen der Kategorie „biologische Prozesse“, welche in Tabelle 22 aufgeführt sind.

Tabelle 22: „Biologische Prozesse“ - Signifikante Anreicherungen der vermehrt exprimierten Gene STEMI Tag 3 versus CCS. Dargestellt sind die signifikant angereicherten Annotationen der vermehrt exprimierten Gene im Vergleich des dritten Tags nach Infarkt mit der Kontrollgruppe in der Kategorie biologische Prozesse.

GO:ID	Beschreibung	p-Wert	q-Wert (FDR)
GO:0048246	macrophage chemotaxis	9.09E-05	4.46E-02
GO:0002677	negative regulation of chronic inflammatory response	9.69E-05	4.46E-02
GO:0006935	chemotaxis	9.98E-05	4.46E-02
GO:0042330	taxis	1.02E-04	4.46E-02

Die Einordnung der vermindert exprimierten Gene in diesem Vergleich ergab signifikante Anreicherungen in 4 Annotationen der Kategorie „biologische Prozesse“, welche in Tabelle 23 aufgeführt sind.

Tabelle 23: „Biologische Prozesse“ - Signifikante Anreicherungen der vermindert exprimierten Gene STEMI Tag 3 versus CCS. Dargestellt sind die signifikant angereicherten Annotationen der vermindert exprimierten Gene im Vergleich des dritten Tags nach Infarkt mit der Kontrollgruppe in der Kategorie biologische Prozesse.

GO:ID	Beschreibung	p-Wert	q-Wert (FDR)
GO:0000183	chromatin silencing at rDNA	1.98E-05	3.41E-02
GO:0034723	DNA replication-dependent nucleosome organization	2.08E-05	3.41E-02
GO:0006335	DNA replication-dependent nucleosome assembly	2.08E-05	3.41E-02
GO:0051290	protein heterotetramerization	2.44E-05	3.41E-02

4.3.2.3 STEMI Tag 3 versus STEMI Tag 0:

Differentiell exprimierte Gene:

Der Vergleich der Genexpression in Blut-Monozyten von STEMI-Patienten am dritten Tag nach Infarkt mit denen des Infarkttags ergab eine differentielle Expression von 144 Genen (siehe Abbildung 18).

Von diesen zeigten 44 (31 %) am dritten Tag eine vermehrte und 100 (69 %) eine verminderte Expression. Von allen vermehrt exprimierten Genen zeigten 3 (7 %) eine mehr als 4-fach erhöhte Expression. Diese sind in Tabelle 24 aufgeführt.

Tabelle 24: Vermehrt exprimierte Gene STEMI Tag 3 versus STEMI Tag 0. Dargestellt sind vermehrt exprimierte Gene mit einer relativen Expressionsänderung > 4 bzw. \log_2 (fold change) > 2 am dritten Tag nach Infarkt im Vergleich zum Infarkttag.

Gen	log2 Fold Change	p-Wert	q-Wert (FDR)
RP11-486B10.4	2.73	2.04E-05	2.05E-03
RP11-588K22.2	2.16	2.91E-04	1.23E-02
GPR20	2.01	7.81E-05	5.25E-03
DPYSL4	1.90	1.39E-03	3.35E-02
CLU	1.77	1.47E-03	3.46E-02

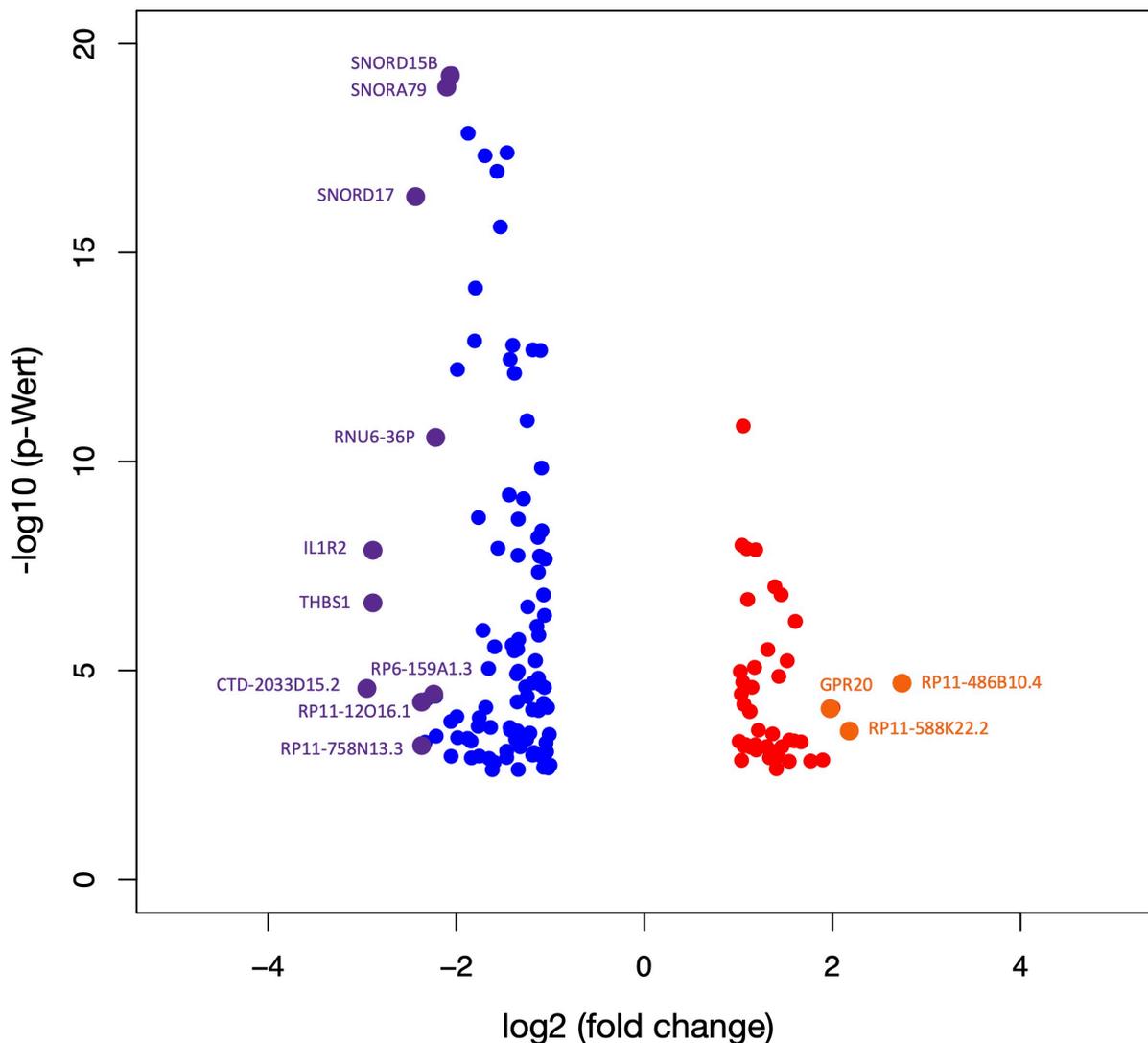


Abbildung 18: Differentielle Expression STEMI Tag 3 versus STEMI Tag 0. Volcano Plot mit logarithmischer Darstellung der statistischen Signifikanz (p-Wert) gegen die relative Veränderung der Genexpression (fold change) am dritten Tag nach Infarkt im Vergleich zum Tag des Infarkts. Dargestellt sind alle differentiell exprimierte Gene mit einer relativen Zunahme der Genexpression > 2 (rot) sowie mit einer relativen Abnahme der Genexpression $< 0,5$ (blau). Zudem sind nur differentiell exprimierte Gene mit $p < 0,025$ dargestellt. Differentiell exprimierte Gene mit einer relativen Genexpressionsänderung > 4 (orange) und $< 0,25$ (lila) sind annotiert.

Von allen vermindert exprimierten Genen zeigten 15 (15 %) eine mehr als 4-fach verminderte Expression. Letztere sind in Tabelle 25 aufgeführt.

Tabelle 25: Vermindert exprimierte Gene STEMI Tag 3 versus STEMI Tag 0. Dargestellt sind die zehn am stärksten vermindert exprimierten Gene mit einer relativen Expressionsänderung < 0.25 bzw. $\log_2(\text{fold change}) < -2$ am dritten Tag nach Infarkt im Vergleich zum Infarkttag.

Gen	log2 Fold Change	p-Wert	q-Wert (FDR)
CTD-2033D15.2	-2.96	2.54E-05	2.38E-03
IL1R2	-2.90	1.25E-08	7.46E-06
THBS1	-2.90	2.50E-07	8.75E-05

SNORD17	-2.43	4.16E-17	9.69E-14
SNORA73B	-2.40	4.11E-25	8.61E-21
RP11-758N13.3	-2.33	5.19E-04	1.76E-02
RP11-12O16.1	-2.32	4.92E-05	3.74E-03
SNORA12	-2.30	2.27E-24	2.38E-20
RNU6-36P	-2.22	2.47E-11	2.47E-08
RP6-159A1.3	-2.22	4.14E-05	3.32E-03

Funktionelle Anreicherung der differentiell exprimierten Gene:

Die Einordnung der vermehrt exprimierten Gene in Blut-Monozyten von Patienten mit einem akuten STEMI am dritten Tag nach Infarkt im Vergleich zu denen des Infarkttags ergab eine signifikante Anreicherung in 18 Annotationen der Kategorie „molekulare Funktionen“ und in 19 Annotationen der Kategorie „biologische Prozesse“. Die elf signifikantesten angereicherten „molekularen Funktionen“ vermehrt exprimierter Gene sind in Tabelle 26 aufgeführt, die zehn signifikantesten angereicherten „biologischen Prozesse“ in Tabelle 27.

Tabelle 26: „Molekulare Funktionen“ – Signifikante Anreicherungen der vermehrt exprimierten Gene STEMI Tag 3 versus STEMI Tag 0. Dargestellt sind die elf signifikantesten angereicherten Annotationen der vermehrt exprimierten Gene im Vergleich des dritten Tags nach Infarkt mit dem Infarkttag in der Kategorie „molekulare Funktionen“.

GO:ID	Beschreibung	p-Wert	q-Wert (FDR)
GO:0047805	cytidylate cyclase activity	2.68E-06	4.79E-04
GO:0060089	molecular transducer activity	5.50E-05	4.43E-03
GO:0004383	guanylate cyclase activity	7.43E-05	4.43E-03
GO:0004016	adenylate cyclase activity	4.49E-04	1.97E-02
GO:0016849	phosphorus-oxygen lyase activity	6.04E-04	1.97E-02
GO:0009975	cyclase activity	6.61E-04	1.97E-02
GO:0004888	transmembrane signaling receptor activity	1.15E-03	2.45E-02
GO:0016247	channel regulator activity	1.56E-03	2.45E-02
GO:0000170	sphingosine hydroxylase activity	1.66E-03	2.45E-02

GO:0001532	interleukin-21 receptor activity	1.66E-03	2.45E-02
GO:0016495	C-X3-C chemokine receptor activity	1.66E-03	2.45E-02

Tabelle 27: „Biologische Prozesse“ - Signifikante Anreicherungen der vermehrt exprimierten Gene STEMI Tag 3 versus STEMI Tag 0. Dargestellt sind die zehn signifikantesten angereicherten Annotationen der vermehrt exprimierten Gene im Vergleich des dritten Tags nach Infarkt mit dem Infarkttag in der Kategorie „biologische Prozesse“.

GO:ID	Beschreibung	p-Wert	q-Wert (FDR)
GO:0002313	mature B cell differentiation involved in immune response	2.795E-6	3.146E-3
GO:0045321	leukocyte activation	5.417E-6	3.146E-3
GO:0002335	mature B cell differentiation	6.295E-6	3.146E-3
GO:0001775	cell activation	2.489E-5	9.326E-3
GO:0002366	leukocyte activation involved in immune response	3.985E-5	1.016E-2
GO:0002263	cell activation involved in immune response	4.150E-5	1.016E-2
GO:0002252	immune effector process	5.679E-5	1.016E-2
GO:0030183	B cell differentiation	5.981E-5	1.016E-2
GO:0019932	second-messenger-mediated signaling	6.099E-5	1.016E-2
GO:0006955	immune response	1.517E-4	2.274E-2

Die Einordnung der vermindert exprimierten Gene in diesem Vergleich ergaben signifikante Anreicherungen in 88 Annotationen der Kategorie „molekulare Funktionen“ und in 122 Annotationen der Kategorie „biologische Prozesse“. Die zehn signifikantesten angereicherten „molekulare Funktionen“ vermindert exprimierter Gene sind in Tabelle 28 aufgeführt, die zehn signifikantesten angereicherten „biologischen Prozesse“ in Tabelle 29.

Tabelle 28: „Molekulare Funktionen“ - Signifikante Anreicherungen der vermindert exprimierten Gene STEMI Tag 3 versus STEMI Tag 0. Dargestellt sind die zehn signifikantesten angereicherten Annotationen der vermindert exprimierten Gene im Vergleich des dritten Tags nach Infarkt mit dem Infarkttag in der Kategorie „molekulare Funktionen“.

GO:ID	Beschreibung	p-Wert	q-Wert (FDR)
GO:0004908	interleukin-1 receptor activity	6.045E-5	1.07E-02
GO:0019966	interleukin-1 binding	7.765E-5	1.07E-02
GO:0004896	cytokine receptor activity	3.257E-4	1.87E-02
GO:0019955	cytokine binding	4.839E-4	1.87E-02
GO:0005154	epidermal growth factor receptor binding	1.114E-3	1.87E-02
GO:0001786	phosphatidylserine binding	1.114E-3	1.87E-02
GO:0019838	growth factor binding	1.229E-3	1.87E-02
GO:0070851	growth factor receptor binding	1.254E-3	1.87E-02
GO:1901680	sulfur-containing amino acid secondary active transmembrane transporter activity	1.503E-3	1.87E-02
GO:0015327	cystine:glutamate antiporter activity	1.503E-3	1.87E-02

Tabelle 29: „Biologische Prozesse“ - Signifikante Anreicherungen der vermindert exprimierten Gene STEMI Tag 3 versus STEMI Tag 0. Dargestellt sind die zehn signifikantesten angereicherten Annotationen der vermindert exprimierten Gene im Vergleich des dritten Tags nach Infarkt mit dem Infarkttag in der Kategorie „biologische Prozesse“.

GO:ID	Beschreibung	p-Wert	q-Wert (FDR)
GO:0008285	negative regulation of cell proliferation	7.056E-6	7.584E-3
GO:0030728	ovulation	9.724E-6	7.584E-3
GO:0045595	regulation of cell differentiation	1.751E-5	8.478E-3
GO:2000659	regulation of interleukin-1-mediated signaling pathway	2.174E-5	8.478E-3
GO:0051093	negative regulation of developmental process	4.216E-5	1.297E-2

GO:0071345	cellular response to cytokine stimulus	6.857E-5	1.297E-2
GO:0001865	NK T cell differentiation	7.797E-5	1.297E-2
GO:0001775	cell activation	8.028E-5	1.297E-2
GO:0007167	enzyme linked receptor protein signaling pathway	8.912E-5	1.297E-2
GO:0042127	regulation of cell proliferation	9.302E-5	1.297E-2

5 Diskussion

5.1 Quantitative Veränderungen

Die Auswertung der Differentialblutbilder der eingeschlossenen STEMI-Patienten zeigen im Anschluss an den AMI im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung zirkulierender Leukozyten (siehe Abbildung 8). Die Zahl von im Blut zirkulierenden Leukozyten ist ein seit Langem einfach zu bestimmender und allseits verfügbarer Parameter systemischer Entzündungsreaktionen. Die postinfarzielle Leukozytose spiegelt die systemische inflammatorische Reaktion auf die kardiale Ischämie wider. Aus dem infarzierten Myokard freigesetzte Entzündungsmediatoren führen zur Bereitstellung hunderttausender Leukozyten aus medullärer und extramedullärer Hämatopoese, welche für die Heilung des myokardialen Schadens unabdingbar sind (siehe 1.3). Die Entwicklung einer Leukozytose bei Patienten im Anschluss an einen AMI und die starke Assoziation steigender Leukozytenzahlen mit einer schlechten Prognose wurde bereits vielfach gezeigt (Furman et al., 1996; Lowe, Machado, Krol, Barton, & Forbes, 1985).

Im Rahmen der postischämischen Leukozytose findet eine fein abgestimmte sequenzielle Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und der heterogenen monozytären Subtypen statt. Die frühe inflammatorische Phase bis zum dritten Tag nach einem AMI ist bestimmt durch die verstärkte Rekrutierung von Neutrophilen und pro-inflammatorischen Monozyten. Mit dem Einsetzen der späten reparativen Phase ab dem dritten bis fünften Tag hingegen kommt es zu einer zunehmenden Rekrutierung anti-inflammatorischer Monozyten und zu einer abnehmenden Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in das infarzierte Myokard (siehe 1.3). Die Auswertung der Differentialblutbilder zeigt eine deutliche Zunahme der neutrophilen Granulozyten im Blut bereits ab dem Infarkttag (siehe Abbildung 9). Diesem sehr frühen Anstieg der Blut-Neutrophilen folgt ein rascher Rückgang der Serumlevel bereits ab dem ersten bis zweiten Tag nach Infarkt. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass erhöhte Blutwerte neutrophiler Granulozyten nach AMI mit erhöhten Komplikationen wie Herzinsuffizienz assoziiert sind (Coller, 2005; Kyne et al., 2000).

Auch bei den Blut-Monozyten zeigen die Differentialblutbilder einen deutlichen Anstieg nach AMI bereits ab dem Infarkttag, jedoch erreichen die Serumlevel der Monozyten im Gegensatz zum beschriebenen Verlauf der neutrophilen Granulozyten im Blut ihren Höhepunkt um den zweiten Postinfarkt Tag (siehe Abbildung 11). Die durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigen neben dem Anstieg der Gesamtzahl der zirkulierenden Monozyten (siehe Abbildung 12) auch eine signifikante Zunahme zirkulierender klassischer inflammatorischer CD14⁺ CD16⁻ Monozyten bei STEMI-Patienten mit Höhepunkt am dritten Tag nach Infarkt (siehe Abbildung 13 D). Diese Dynamik entspricht den Ergebnissen anderer Studien (Tsujioka et al., 2009). Sowohl für die Höchstwerte der gesamten zirkulierenden Monozyten als auch für die der zirkulierenden klassischen inflammatorischen Monozyten konnte eine Assoziation zu Komplikationen, Outcome und dem Erhalt von Myokardfunktion und Ejektionsfraktion hergestellt werden (Y. Maekawa et al., 2002; A. M. van der Laan et al., 2012; Zhou et al., 2016). Auch die zirkulierenden intermediären CD14⁺ CD16⁺ Monozyten zeigen diese dynamischen quantitativen Veränderungen. Die Zunahme klassischer und intermediärer zirkulierender Monozyten bis zum dritten Tag nach Infarkt mit anschließendem Abfall deutet auf die spezifische Bereitstellung pro-inflammatorischer Monozyten in der frühen inflammatorischen Phase hin. Da es sich bei den klassischen Monozyten um die zahlenmäßig größte Subpopulation handelt, entspricht diese Dynamik weitestgehend dem Verlauf der Gesamtzahl der Monozyten. Bei den nicht-klassischen CD14^{low} CD16⁺ Monozyten zeigt sich in der durchgeführten durchflusszytometrischen Analyse im Zeitverlauf nach stattgehabtem STEMI keine signifikante Veränderung. In anderen Studien konnte für nicht klassische Monozyten ein Abfall unmittelbar nach Infarkt und ein Anstieg im Rahmen der späten inflammatorischen Phase gezeigt werden (Marsh et al., 2021; Tsujioka et al., 2009). Die Dynamik dieser zahlenmäßig kleinen monozytären Subpopulation konnte in dieser Untersuchung mutmaßlich aufgrund der kleinen Fallzahl und den fehlenden späteren Zeitpunkten nicht reproduziert werden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die verstärkte Rekrutierung nicht-klassischer, pro-reparativer Monozyten im Rahmen der späten reparativen Phase nach Infarkt durch eine Zunahme dieser monozytären Subtypen im Blut ab dem dritten bis fünften Tag unterstützt wird.

5.2 Differentiell exprimierte Gene

Die in hohem Maße differentielle Genexpression in zirkulierenden Blut-Monozyten im Rahmen eines akuten STEMIs zeigt dynamische phänotypische und funktionelle Veränderungen der bereitgestellten Monozyten im Zuge der inflammatorischen Antwort auf die Ischämie. Diese sollen im Folgenden genauer betrachtet und diskutiert werden. Die Betrachtung der Genexpressionsvergleiche zwischen Patienten mit AMI und Patienten mit chronischem Koronarsyndrom zeigt dabei insbesondere starke pro-inflammatorische Expressionsänderungen. Der Vergleich der monozytären Genexpression am Tag des Infarkts mit der Expression am dritten Tag nach Infarkt zeigt die Dynamik der phänotypischen Anpassung der Monozyten.

5.2.1 Vermehrte Expression STEMI Tag 0 versus CCS:

Der Vergleich der Blut-Monozyten von Patienten mit einem akuten ST-Hebungs-Infarkt am Tag des Infarkts mit denen von Patienten mit einem chronischem Koronarsyndrom ergibt die meisten und am stärksten vermehrt exprimierten Gene aller Vergleiche (siehe 4.3.2.1). Dies deutet auf die unmittelbare starke phänotypische Anpassung der akut bereitgestellten Monozyten im Zuge des Infarkts hin. Unter den am Infarkttag am stärksten vermehrt exprimierten Genen finden sich in der Literatur Beschreibungen zur Expression in Monozyten oder im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen für die Gene CYP19A1, THBS1 und IL18R1. Auf diese wird im Späteren genauer eingegangen (siehe 5.2.7, 5.2.8 und 5.3.5). Für die Gene LINC00599, CTD-2033D15.2, SLC12A1 und PSPHP1 finden sich Beschreibungen in der Literatur, jedoch nicht zur Expression in Monozyten oder im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen. Für die Gene C15orf54, RP11-462P6.1 und RP11-625L16.3 findet sich keine Beschreibung in der Literatur.

LINC00599

Bei dem Gen mit der stärksten Expressionszunahme LINC00599 (RNCR3) handelt es sich um eine lange intergene nicht-kodierende RNA (lncRNA). Auch am dritten Tag nach Infarkt findet sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine vermehrte Expression von LINC00599. Verschiedene Studien implizieren eine regulatorische Beteiligung an unterschiedlichen biologischen Prozessen wie retinaler Entwicklung (Blackshaw et al.,

2004) und neuronaler Differenzierung (Mercer et al., 2010) sowie eine atheroprotektive Rolle in der vaskulären Atherogenese (Shan et al., 2016). In der Literatur ist zudem eine vermehrte Expression von LINC00599 im Transkriptom des Vollbluts von aktiven Rauchern im Vergleich zum Transkriptom des Vollbluts ehemaliger Raucher beschrieben (Parker et al., 2017). Die konsistente Erhöhung dieser nicht kodierenden RNA bei den Infarktpatienten an beiden Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrollgruppe könnte daher auch auf den vermehrten Nikotinkonsum im sequenzierten Patientenkollektiv zurückzuführen sein. Von den 20 sequenzierten STEMI-Patienten gaben 12 (60 %) einen aktiven Nikotinkonsum an, während dies von den 20 sequenzierten CCS-Patienten nur 1 (5 %) Teilnehmer angab (siehe Tabelle 13).

CTD-2033D15.2, SLC12A1

CTD-2033D15.2 ist eine lncRNA, welche in der Literatur weitestgehend unbeschrieben ist. In einer kürzlich publizierten Studie zur Assoziation von CTD-2033D15.2 und der Tumorgenese der intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas wurde eine Bindung von microRNAs durch CTD-2033D15.2 vermutet und eine vermehrte Expression der entsprechenden Ziel mRNAs gezeigt. In einer funktionellen Anreicherungsanalyse zeigte sich bei der Expression der microRNA Zielgene eine Anreicherung bei biologischen Prozessen der Zelldifferenzierung (Ding et al., 2020).

Das SLC12A1 Gen ist konsistent an beiden Zeitpunkten nach Infarkt vermehrt exprimiert und kodiert den Na⁺/K⁺/Cl⁻ Symporter NKCC2. Eine NKCC2 Expression ist bisher hauptsächlich in den Epithelzellen der Niere beschrieben, wo das Transportprotein für die NaCl Rückresorption eine entscheidende Rolle spielt (Markadieu & Delpire, 2014). Eine Beteiligung an der Regulation des Zellvolumens in nicht renalen Zellen ähnlich des NKCC1 wäre somit denkbar.

Die Erhöhung beider Gene könnte folglich auf unspezifisch gesteigerte zelluläre Prozesse zurückzuführen sein.

PSPHP1, C15orf54, RP11-462P6.1, RP11-625L16.3

PSPHP1 ist die mRNA des Phosphoserin-Phosphatase-Pseudogens 1 und ist nur im Vergleich des Infarkttags zur Kontrollgruppe differentiell exprimiert. Bisher finden sich in der Literatur Beschreibungen einer differentiellen Expression von PSPHP1 im

Rahmen verschiedener nicht kardiovaskulärer Erkrankungen (Akil et al., 2006; Kuo et al., 2007; Planitzer, Machl, Rueckels, & Kubbies, 1998).

C15orf54 und RP11-462P6.1 sind lncRNAs, RP11-625L16.3 ist eine antisenseRNA. Diese drei Gene sind nur im Vergleich zwischen Infarkttag und Kontrollgruppe vermehrt exprimiert. In der Literatur findet sich bisher keine Beschreibung dieser Gene.

Die verstärkte Expression der genannten Gene im Kontext eines Myokardinfarktes ist somit derzeit nicht zu erklären. Zur besseren Einordnung sind weitere Studien zur biologischen Funktion und zur Beteiligung an Physiologie und Pathophysiologie der monozytären Funktion notwendig.

5.2.2 Verminderte Expression STEMI Tag 0 versus CCS:

Am Infarkttag werden in den Monozyten von Patienten mit AMI im Vergleich zu CCS-Patienten ebenfalls zahlreiche Gene vermindert exprimiert. Unter den am stärksten vermindert exprimierten Genen am Infarkttag im Vergleich zur Kontrollgruppe finden sich in der Literatur eine Beschreibung zur Expression in Monozyten für das Gen GNLY. Für die Gene AC008753.6, CROCC2, TAS1R3 und DPYSL4 finden sich Beschreibungen in der Literatur, jedoch nicht zur Expression in Monozyten oder im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen. Für die Gene RN7SKP47, RP11-274B21.3, RP3-395M20.12 und RP11-135A24.4 findet sich keine Beschreibung in der Literatur.

GNLY

Das protein-kodierende Gen GNLY ist im Vergleich zur Kontrollgruppe am Infarkttag ($\log_2(\text{fc}) = -3,50$) und am dritten Tag nach Infarkt ($\log_2(\text{fc}) = -2,56$) stark vermindert exprimiert. Es kodiert für Granulysin, einem Peptid mit einer 15kDa und einer 9kDa Isoform, welche beide in T-, NK-, NKT-Zellen und PBMCs exprimiert werden. Erste hat pro-apoptotische und zytotoxische Effekte, während letztere die monozytäre Differenzierung aktiviert (Clayberger et al., 2012; Persic et al., 2012).

AC008753.6

Das Gen AC008753.6 ist im Vergleich zur Kontrollgruppe konsistent sowohl am Infarkttag als auch am dritten Tag nach Infarkt stark herunterreguliert. Es handelt sich

um eine lange intergene nicht-kodierende RNA (lncRNA), deren verminderte Expression in der Literatur bisher lediglich in Patienten mit akuter myeloischer Leukämie beschrieben wurde (Y. Wang, 2019).

CROCC2

Auch bei dem Gen *CROCC2* zeigte sich eine im Vergleich zur Kontrollgruppe konsistent verminderte Expression sowohl am Infarkttag ($\log_2(\text{fc}) = -3,76$) als auch am dritten Tag nach Infarkt ($\log_2(\text{fc}) = -2,2$). Es handelt sich um ein protein-kodierendes Gen, welches in der Literatur im Zusammenhang von kardiovaskulären Erkrankungen bisher nicht erwähnt wird.

TAS1R3

Das Gen *TAS1R3* ist im Vergleich zur Kontrollgruppe an beiden Zeitpunkten nach Infarkt vermindert exprimiert. Es kodiert für den G-Protein-gekoppelten T1R3 Rezeptor, welcher erstmals in gustatorischem Gewebe beschrieben wurde, jedoch in einer Vielzahl von Geweben und Zellen exprimiert wird. Die Rolle einer differentiellen Expression in Monozyten ist bisher nicht beschrieben, T1R3 Knockout-Mäuse zeigen jedoch eine gesteigerte kardiale Autophagie (Kokabu et al., 2015).

DPYSL4

Das Gen *DPYSL4* ist ein protein-kodierendes Gen, welches für das Dihydropyrimidinase-related Protein-4 kodiert. Es findet sich eine konsistent verminderte Expression sowohl am Infarkttag ($\log_2(\text{fc}) = -3$) als auch am dritten Tag nach Infarkt ($\log_2(\text{fc}) = -1,16$) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Am Tag 3 nach Infarkt besteht im Vergleich zum Infarkttag eine vermehrte Expression ($\log_2(\text{fc}) = 1,9$). In der Literatur findet sich bisher keine Beschreibung einer monozytären Expression von *DPYSL4*. In Tumorzellen und Präadipozyten wurde eine vermehrte Expression von *DPYSL4* mit vermehrter ATP Produktion und erhöhtem Sauerstoffverbrauch assoziiert, während der *DPYSL4* Knockdown die Energieproduktion verminderte (Nagano et al., 2018). In einer anderen Arbeit konnte der Einfluss der *DPYSL4* Expression auf Zellproliferation und -differenzierung gezeigt werden (Yasukawa et al., 2013). Der Einfluss der nach Infarkt im Vergleich zur Kontrollgruppe insgesamt verminderten, jedoch im Zeitverlauf zunehmenden Expression von *DPYSL4* auf die

Differenzierung und den metabolischen Haushalt der zirkulierenden Blut-Monozyten ist bisher nicht erforscht.

RN7SKP47, RP11-274B21.3, RP3-395M20.12, RP11-135A24.4

Bei den Genen RN7SKP47, RP11-274B21.3, RP3-395M20.12 und RP11-135A24.4 handelt es sich um zwei Pseudogene und zwei lange nicht-kodierende RNAs (lncRNA). Alle vier Gene sind im Vergleich zur Kontrollgruppe an beiden Zeitpunkten nach Infarkt vermindert exprimiert.

5.2.3 Vermehrte Expression STEMI Tag 3 versus CCS:

Drei Tage nach stattgehabtem Infarkt findet sich im Vergleich zu Patienten mit chronischem Koronarsyndrom in den Blut-Monozyten von STEMI-Patienten eine stark vermehrte Expression zahlreicher Gene. Dies zeigt die fortwährende Regulation der Immunantwort über phänotypisch veränderte Blut-Monozyten. Unter den am dritten Postinfarkt Tag am stärksten vermehrt exprimierten Genen finden sich in der Literatur Beschreibungen zur Expression in Monozyten oder im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen für die Gene CYP19A1, CLU, TRPM6 und MTUS1. Auf diese wird daher in einem späteren Textabschnitt genauer eingegangen (siehe 5.2.7, 5.2.9, 5.2.10 und 5.2.11). Für die Gene LINC00599, SLC12A1, ANXA3 und METTL7B finden sich Beschreibungen in der Literatur, jedoch nicht zur Expression in Monozyten oder im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen. Auf die Gene LINC00599 und SLC12A1 wurde bereits eingegangen (siehe 5.2.1). Für das Gen FAM196A findet sich keine Beschreibung in der Literatur.

ANXA3, METTL7B

ANXA3 und METTL7B sind sowohl am Tag des Infarkts als auch am dritten Tag nach Infarkt jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe vermehrt exprimiert. Keines der zwei Gene zeigt eine differentielle Expression zwischen den beiden Zeitpunkten nach Infarkt. Beide Gene sind protein-kodierend. ANXA3 kodiert für Annexin A3 und ist an calciumabhängiger Phospholipid-Bindung beteiligt, eine Expression in Makrophagen ist bekannt, deren Rolle allerdings nicht genau verstanden (Nishiura et al., 2014). Bisher gibt es in der Literatur vor allem Untersuchungen der Expression von ANXA3 in neutrophilen Granulozyten, da es in diesen Leukozyten am stärksten exprimiert wird

(Toufiq et al., 2020). METTL7B kodiert für das Methyltransferase-like Protein 7B und ist in der Literatur im Zusammenhang inflammatorischer Prozesse bisher unbeschrieben.

FAM196A

FAM196A (INSYN2) ist ein protein-kodierendes Gen, welches nur am dritten Tag nach Infarkt vermehrt exprimiert wird.

5.2.4 Verminderte Expression STEMI Tag 3 versus CCS:

Es finden sich drei Tage nach Infarkt in den Monozyten von STEMI-Patienten im Vergleich zu CCS-Patienten auch zahlreiche vermindert exprimierte Gene. Unter den am stärksten vermindert exprimierten Genen am dritten Postinfarkt Tag im Vergleich zur Kontrollgruppe finden sich in der Literatur Beschreibungen zur Expression in Monozyten oder im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen für das Gen CRIP2. Auf dieses wird daher in einem späteren Textabschnitt genauer eingegangen (siehe 5.2.12). Für die Gene AC008753.6 findet sich eine Beschreibung in der Literatur, jedoch nicht zur Expression in Monozyten oder im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen. Es wurde bereits beschrieben (siehe 5.2.2). Für die Gene RN7SKP47, RN7SKP79, RP3-402G11.26 findet sich keine Beschreibung in der Literatur. Die Gene RN7SKP47 und RN7SKP79 sind Pseudogene, das Gen RP3-402G11.26 eine antisense-RNA.

5.2.5 Vermehrte Expression STEMI Tag 3 versus STEMI Tag 0:

Betrachtet man bei Patienten mit einem akuten STEMI die Veränderung der Genexpression am dritten Postinfarkt Tag im Vergleich zum Infarkttag zeigt sich die zeitliche Dynamik der funktionellen und phänotypischen Anpassungen der Monozyten. Unter den am stärksten vermehrt exprimierten Genen am dritten Postinfarkt Tag im Vergleich zum Infarkttag finden sich in der Literatur eine Beschreibung für das Gen GPR20, jedoch nicht zur Expression in Monozyten oder im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen. Für die Gene RP11-486B10.4 und RP11-588K22.2 findet sich keine Beschreibung in der Literatur.

GPR20

Das Gen GPR20 ist ein protein-kodierendes Gen, welches für den G-Protein-gekoppelten Rezeptor 20 kodiert und ebenfalls am Tag nach Infarkt im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert exprimiert ist.

RP11-486B10.4, RP11-588K22.2

Das Gen RP11-486B10.4 ist ein Pseudogen, bei RP11-588K22.2 handelt es sich um eine lange nicht-kodierende RNA (lncRNA), welche auch am Tag nach Infarkt im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert exprimiert ist.

5.2.6 Verminderte Expression STEMI Tag 3 versus STEMI Tag 0:

Die Veränderung der funktionellen und phänotypischen Anpassungen der Monozyten am dritten Infarkttag im Vergleich zum Tag des Infarkts spiegelt sich auch in der verminderten Expression zahlreicher Gene wider. Unter den am stärksten vermindert exprimierten Genen am dritten Postinfarkt Tag im Vergleich zum Infarkttag finden sich in der Literatur Beschreibungen zur Expression in Monozyten oder im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen für die Gene IL1R2 und THBS1. Auf diese wird daher in einem späteren Textabschnitt genauer eingegangen (siehe 5.3.4 und 5.2.8). Für die Gene CTD-2033D15.2 (siehe 5.2.1), SNORD17 und SNORA12 findet sich eine Beschreibung in der Literatur, jedoch nicht zur Expression in Monozyten oder im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen. Für die Gene SNORA73B, RP11-758N13.3, RNU6-36P, RP11-12O16.1, RP6-159A1.3 findet sich keine Beschreibung in der Literatur. RP11-758N13.3 und RNU6-36P sind Pseudogene.

SNORD17, SNORA73B, SNORA12

Die Gene SNORD17, SNORA73B und SNORA12 sind kleine nukleolare RNAs (snoRNA), welche am dritten Tag nach Infarkt sowohl im Vergleich zum Infarkttag als auch im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert exprimiert sind. Sie sind nicht-kodierende RNAs, sind jedoch an der Modifikation anderer RNAs beteiligt.

5.2.7 CYP19A1

Bei CYP19A1 handelt es sich um eine protein-kodierende RNA, welche das Enzym Aromatase kodiert. Es findet sich eine stark vermehrte Expression in Blut-Monozyten

von Infarktpatienten an beiden untersuchten Zeitpunkten nach Infarkt im Vergleich zu CCS-Patienten (siehe Tabelle 14 und Tabelle 20). Die Aromatase katalysiert die Umwandlung von Testosteron zu Östrogen und ist somit das entscheidende Enzym zur Bereitstellung von Östrogen. Neben der überwiegenden Östrogenproduktion in Plazenta und Gonaden dient die ubiquitäre Expression der Aromatase der lokalen Östrogensynthese. Auch auf Immunzellen und die inflammatorische Antwort nimmt die Wirkung der Östrogene einen entscheidenden regulatorischen Einfluss (Blakemore & Naftolin, 2016). Endothelzellen humaner Koronararterien exprimieren Aromatase und Östrogenrezeptoren (Diano et al., 2018) und regulieren darüber unter anderem Zell-Adhäsions-Moleküle und die Adhäsion von Monozyten (Cid et al., 1994; Curatola, Huang, & Naftolin, 2012). Auch Monozyten exprimieren Östrogenrezeptoren und dies in erhöhtem Maß nach Differenzierung zu dendritischen Zellen (Kovats, 2015). Von gesunden Spendern gewonnenen zirkulierende Blut-Monozyten zeigen nur eine sehr geringe Aromatase Expression, während *in vitro* aus Monozyten differenzierte Makrophagen und kultivierte von Monozyten abstammende THP-1 Zellen eine starke Expression zeigen (Schmidt, Kreuz, Loffler, Scholmerich, & Straub, 2000; Watanabe, Ohno, & Wachi, 2017). Die konsistente starke Überexpression der Aromatase an beiden Zeitpunkten nach Herzinfarkt im Vergleich zur Kontrollgruppe könnte daher auf eine Differenzierung der zirkulierenden Blut-Monozyten bereits vor der Diapedese ins infarzierte Myokard hindeuten.

5.2.8 THBS1

THBS1 kodiert für Thrombospondin 1 und ist am Tag des Infarktes sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe als auch zum dritten Postinfarkt-Tag überexprimiert (siehe Tabelle 14 und Tabelle 25). Es handelt sich um ein adhäsives Glykoprotein, welches Zell-Zell und Zell-Matrix-Interaktionen beeinflusst. In klassischen Monozyten zeigt sich im Genexpressionsvergleich sowohl mit intermediären als auch mit nicht-klassischen Monozyten eine deutlich erhöhte Expression von Thrombospondin 1 (Wong et al., 2011). Außerdem induziert Thrombospondin die Expression der Zell-Adhäsions-Moleküle VCAM-1 und ICAM-1 auf Endothelzellen und verstärkt damit die Adhäsion der auf dem Endothel rollenden Monozyten (Narizhneva et al., 2005). Die vermehrte Expression unmittelbar nach einem Myokardinfarkt impliziert damit eine phänotypisch bedingte Steigerung der Extravasation zirkulierender Blut-Monozyten

in das ischämische Areal zu diesem Zeitpunkt. Ferner deutet die vermehrte Expression im Vergleich zu Tag 3 nach Infarkt eine phänotypische Differenzierung hin zu klassischen pro-inflammatorischen Monozyten in der frühen Phase nach Infarkt an.

5.2.9 CLU

Das Gen CLU ist an beiden Zeitpunkten nach Infarkt im Vergleich zur Kontrollgruppe konsistent vermehrt exprimiert. Am Infarkttag findet sich zunächst eine leicht vermehrte Expression ($\log_2(\text{fc}) = 1,1$), am dritten Postinfarkt Tag findet sich hingegen eine stark vermehrte Expression im Vergleich zu CCS-Patienten ($\log_2(\text{fc}) = 2,86$) und auch im Vergleich zum Infarkttag ($\log_2(\text{fc}) = 1,77$). CLU ist ein protein-kodierendes Gen, welches für Clusterin kodiert. Eine Expression von Clusterin findet sich in einer Vielzahl von Geweben und ist assoziiert mit verbesserter Heilung und vermindertem Zelluntergang nach myokardialer Ischämie (Pereira et al., 2018). Eine kürzlich publizierte Studie konnte sowohl eine vermehrte Expression von Clusterin in Monozyten und Makrophagen nach Hypoxie als auch eine vermehrte Invasion von Monozyten in Nieren von Clusterin-Knockout Mäusen nach einem ischämischen Reperfusionsschaden zeigen (Weng et al., 2021). Ferner konnten die Autoren zeigen, dass sieben Tage nach Ischämie die Rekrutierung von Monozyten sowie pro-inflammatorische Differenzierung in Wildtyp Mäusen im Vergleich zu den Knockout Mäusen signifikant vermindert war. Die im Zeitverlauf nach einem AMI zunehmende Expression von Clusterin in zirkulierenden Blut-Monozyten impliziert somit eine beginnende Limitierung der monozytären Extravasation sowie Beendigung der Differenzierung zu pro-inflammatorischen Monozyten. Die Rolle der Clusterin Expression in Monozyten für die postischämische Myokardheilung stellt somit einen vielversprechenden Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen dar.

5.2.10 TRPM6

TRPM6 ist sowohl am Tag des Infarkts als auch am dritten Tag nach Infarkt jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe vermehrt exprimiert. Es zeigt sich keine differentielle Expression zwischen den beiden Zeitpunkten nach Infarkt. TRPM6 kodiert für einen Magnesium-Ionen-Kanal und wird bekanntermaßen vor allem im Verdauungstrakt und den Nieren exprimiert (Voets et al., 2004). Die entscheidende Beteiligung an der Aufrechterhaltung der Magnesium Homöostase auf systemischer Ebene ist gut

erforscht. Zudem deuten Studien aber auch auf eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Magnesium Homöostase auf zellulärer Ebene hin. Im immunologischen Kontext konnte in humanen Monozyten eine vermehrte Expression von TRPM6 unter oxidativem Stress gezeigt werden (Wuensch et al., 2010). TRPM6 ist wohlmöglich an der magnesiumvermittelten Immunzellaktivierung beteiligt (Brandao, Deason-Towne, Perraud, & Schmitz, 2013). Die vermehrte Expression von TRPM6 in humanen zirkulierenden Blut-Monozyten im Kontext eines Myokardinfarktes könnte somit auf eine magnesiumvermittelte Aktivierung der Monozyten hinweisen. Weitere Untersuchungen auch in Hinblick auf eine Beeinflussung dieses Mechanismus stellen einen weiteren interessanten Ansatz für Folgeprojekte dar.

5.2.11 MTUS1

MTUS1 wird nur am dritten Tag nach Infarkt im Vergleich zur Kontrollgruppe vermehrt exprimiert, es zeigt sich keine differentielle Expression zwischen dem Infarkttag und der Kontrollgruppe oder zwischen beiden Zeitpunkten nach Infarkt. MTUS1 ist ein protein-kodierendes Gen und kodiert für das Mitochondriale Tumorsuppressor 1 Protein. MTUS1 Knockout Mäuse entwickeln eine spontane kardiale Hypertrophie und vermehrte Zellproliferation (Zuern et al., 2012). Eine weitere Arbeit konnte zeigen, dass der Knockdown von MTUS1 zu einer p38 MAPK-vermittelten erhöhten Expression des Zelladhäsionsmoleküls E-Selektin und des Chemokin Liganden 2 (CCL2) in Endothelzellen führt und MTUS1 somit neben seiner bekannten tumorsuppressiven Wirkung vermutlich auch eine protektive Rolle gegen die endotheliale pro-inflammatorische Antwort spielt (Y. Wang et al., 2016). Bisher findet sich keine Beschreibung der differentiellen Expression von MTUS1 in Monozyten oder in Zusammenhang mit einer kardialen Ischämie, jedoch deuten die bisherigen Studien auf eine nicht zu vernachlässigende Rolle in der Regulation inflammatorischer Prozesse hin. Die Frage, ob MTUS1 in Monozyten ähnliche limitierende Auswirkungen auf Zelladhäsions- und Extravasationsprozesse hat wie in Endothelzellen, bleibt zu beantworten. Möglicherweise deutet die vermehrte Expression von MTUS1 am dritten Tag nach Infarkt auf eine beginnende phänotypisch bedingte Limitation der monozytären Diapedese in das Infarktareal hin. Auch die MTUS1 Expression in Monozyten stellt folglich einen vielversprechenden Ansatz für weitere Studien dar.

5.2.12 CRIP2

Das Gen CRIP2 kodiert für das Cystein-reiche Protein 2 und wird sowohl am Tag 0 ($\log_2(\text{fc}) = -2,67$) als auch am Tag 3 nach Infarkt ($\log_2(\text{fc}) = -3,15$) stark vermindert exprimiert. Eine verminderte Expression von CRIP2 im Blut von Myokardinfarkt Patienten wurde bereits in einer anderen Arbeit beschrieben (Zhao, Wu, Li, Li, & Jin, 2018). Die Bedeutung einer differentiellen Expression in Monozyten ist bisher nicht erforscht und könnte Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen sein.

5.3 Gen Ontologie

Für das weitere Verständnis der phänotypischen und funktionellen Veränderungen der zirkulierenden Blut-Monozyten nach stattgehabtem Myokardinfarkt konnten die zahlreichen differentiell exprimierten Gene einer Vielzahl von molekularen Funktionen und biologischen Prozessen zugeordnet werden. Dies erlaubt die Assoziation der differentiellen Expression mit möglichen zugrundeliegenden funktionellen Veränderungen in zirkulierenden Blut-Monozyten im Rahmen eines akuten Herzinfarktes.

5.3.1 STEMI Tag 0 versus CCS

Am Infarkttag finden sich im Vergleich zur Kontrollgruppe vor allem signifikante funktionelle Anreicherungen der vermehrt exprimierten Gene für die Aktivität diverser Rezeptoren (siehe Tabelle 16). Funktionell angereicherte biologische Prozesse umfassen Reproduktion, Immunantwort, Leukozyten-Aktivierung und -Migration (siehe Tabelle 17). Die vermindert exprimierte Gene ergaben eine Anreicherung für unspezifische molekulare Funktionen und biologische Prozesse wie GTPase und Nukleosid-Triphosphatase-Aktivität (siehe Tabelle 18 und Tabelle 19). Diese funktionelle Anreicherung legt die deutliche phänotypische und funktionelle Veränderung der zirkulierenden Blut-Monozyten im frühen Stadium nach einem Myokardinfarkt dar, welche vor allem die verstärkte Expression von Rezeptoren betrifft. Die Aktivierung und Rekrutierung der für die inflammatorische Heilung nach Infarkt essentiellen Monozyten ist in großem Maße von Rezeptor-Liganden-

Interaktionen abhängig. Daher unterstützt die funktionelle Anreicherungsanalyse die Hypothese, dass diese phänotypische Variabilität eine entscheidende Rolle an der Feinabstimmung der Immunantwort spielt.

5.3.2 STEMI Tag 3 versus CCS:

Am Tag 3 nach Infarkt im Vergleich zur Kontrollgruppe fanden sich signifikante Anreicherungen der vermehrt exprimierten Gene für Makrophagen Chemotaxis und negative Regulation einer chronischen Immunantwort (siehe Tabelle 22). Bei den zugrundeliegenden differentiell exprimierten Genen handelt es sich um CYP19A1, EDNRB, MTUS1, IL10 und FN1. Für die vermindert exprimierten Gene finden sich Anreicherungen in unspezifischen biologischen Prozessen (siehe Tabelle 23). Insbesondere die funktionelle Anreicherung in der Annotation negative Regulation einer chronischen Immunantwort suggeriert eine beginnende Limitation der pro-inflammatorischen Monozyten Funktionen am dritten Postinfarkt Tag im Sinne einer Einleitung der späten pro-reparativen Phase. Bemerkenswert ist, dass diese Veränderung bereits in zirkulierenden Blut-Monozyten zu beobachten ist.

5.3.3 STEMI Tag 3 versus STEMI Tag 0:

Am dritten Tag nach Infarkt findet sich im Vergleich zum Infarkttag eine signifikante funktionelle Anreicherung der vermehrt exprimierten Gene für verschiedene Enzymaktivitäten wie Guanylatcyclasen (Gene GUCY1A1 und GUCY1B1), Interleukin-21-Rezeptor Aktivität sowie CX3C-Chemokinrezeptor 1 Aktivität (siehe Tabelle 26, 5.3.6 und 5.3.7). Die funktionell angereicherten biologischen Prozesse umfassen unter anderem Leukozyten Aktivierung und Immunantwort (siehe Tabelle 27). Die vermindert exprimierten Gene sind funktionell unter anderem angereichert in Interleukin-1-Rezeptor Aktivität und EGFR Bindung (Gene EREG und AREG), siehe Tabelle 28 und Tabelle 29. Somit zeigt die Einordnung nach Gen Ontologie eine deutliche dynamische Anpassung der Phänotypen und Funktionen der zirkulierenden Blut-Monozyten im Zeitverlauf nach einem AMI. Die mögliche Bedeutung Interleukin-Rezeptor-Aktivitäten soll im Folgenden näher betrachtet werden.

5.3.4 Interleukin-1-Rezeptor Aktivität

Am Infarkttag findet sich in zirkulierenden Blut-Monozyten eine hochsignifikante funktionelle Anreicherung der vermehrt exprimierten Gene für Interleukin-1 Rezeptor Aktivität sowie ebenfalls eine signifikante Anreicherung für Interleukin-1 Bindung. Diese basiert unter anderem auf einer signifikant vermehrten Expression von IL1R1, IL1RAP und IL1R2 am Infarkttag sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe als auch für IL1R1 und IL1R2 im Vergleich zum dritten Postinfarkt Tag. Interleukin-1 β nimmt eine zentrale gut erforschte Rolle in inflammatorischen Signalprozessen ein. Im Rahmen der myokardialen Ischämie kommt es durch Inflammasom-Aktivierung zur konsekutiven Caspase-1 abhängigen Aktivierung und Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 β und Interleukin-18 (Prabhu & Frangogiannis, 2016). Steigende Serumkonzentrationen von IL-1 β und seine Effekte auf Monozyten spielen eine entscheidende Rolle für die hämatopoetische Bereitstellung und Rekrutierung der zirkulierenden Blut-Monozyten zum Infarktareal, siehe 1.3.1 und 1.3.4. (Sager et al., 2015). Ferner ist die pro-inflammatorische Modulation von Leukozyten durch IL-1 Interaktion gut erforscht. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass nach einem Myokardinfarkt zunächst IL1R1 exprimierende pro-inflammatorische Ly6C^{high} Monozyten und anschließend IL1R2 exprimierende Leukozyten rekrutiert werden (Saxena et al., 2013). Die Rekrutierung dieser Zellen war dabei in IL1R1 knockout Mäusen stark vermindert. Neben diesen unmittelbaren Auswirkungen von IL-1 auf Monozyten, welche vor allem der akuten inflammatorischen Reaktion auf den Myokardschaden dienen, sind auch langfristige Modulationen der monozytären Funktionen unter IL-1 bekannt. Aktuelle Studien zeigen weitreichende Auswirkungen der Interleukin-1 β -Exposition auf Monozyten im Sinne einer Modulation der *trained immunity* (Soehnlein & Libby, 2021). Die vermehrte Expression des IL-1-Rezeptor-Komplex in zirkulierenden Blut-Monozyten am Tag des Myokardinfarkts im Vergleich zur Kontrollgruppe und zum dritten Postinfarkt Tag deutet auf eine vermehrte Aktivierbarkeit und Modulierbarkeit der Blut-Monozyten durch Interleukin-1 in der frühen postinfarziellen Phase hin. Die verminderte Expression des Rezeptor-Komplexes zum späteren postinfarziellen Zeitpunkt suggeriert eine möglicherweise abnehmende Interleukin-1 abhängige Rekrutierung von Blut-Monozyten. Alternativ wäre eine phänotypisch reduzierte pro-inflammatorische Aktivier- und Modulierbarkeit durch Interleukin-1 im Sinne einer

Einleitung der späten anti-inflammatorischen Phase denkbar. Die Abhängigkeit der selektiven Rekrutierung pro-inflammatorischer und pro-reparativer Monozyten unter Beeinflussung von IL1R1 und IL1R2 könnte einen wichtigen Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen darstellen.

5.3.5 Interleukin-18-Rezeptor Aktivität

IL18R1 kodiert für den Interleukin-18-Rezeptor 1, welcher IL-18 spezifisch bindet. IL18RAP kodiert das akzessorische Interleukin-18-Rezeptor-Protein und ist an der IL-18-abhängigen Signaltransduktion beteiligt, welche die Aktivierung des NF- κ B und MAPK Signalwegs induziert (Tsutsumi et al., 2014). Dieser Rezeptorkomplex ist in den zirkulierenden Blut-Monozyten von STEMI-Patienten sowohl am Tag des Infarkts als auch am dritten Tag nach Infarkt jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe vermehrt exprimiert. Zwischen den beiden Zeitpunkten nach Infarkt findet sich keine signifikante differentielle Expression.

Im Rahmen der myokardialen Ischämie kommt es neben Sekretion von Interleukin-1 β zur Sekretion des pro-inflammatorischen Interleukin-18 (siehe 5.3.4). Interleukin-18 gehört zur IL-1-Familie und moduliert über die Stimulation des IL-18 Rezeptors ebenfalls die Funktion von Monozyten und Makrophagen (Garlanda, Dinarello, & Mantovani, 2013). Es ist ferner mit zahlreichen inflammatorischen Erkrankungen assoziiert (Nariai et al., 2019). Im Zuge einer myokardialen Ischämie nimmt IL-18 ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Regulation der inflammatorischen Reaktion ein und hat somit auch einen starken Einfluss auf einen zusätzlichen inflammatorisch bedingten myokardialen Schaden (Garlanda et al., 2013; Pomerantz, Reznikov, Harken, & Dinarello, 2001). Die konsistente Überexpression des Interleukin-18-Rezeptors an beiden Zeitpunkten nach Infarkt suggeriert die pro-inflammatorische Modulation der Blut-Monozyten durch die postinfarziell gesteigerte Serumkonzentration von Interleukin-18. Der Interleukin-18 Rezeptor könnte ein interessanter Ansatzpunkt für die Beeinflussung der postinfarziellen inflammatorischen Reaktion sein.

5.3.6 Interleukin-21-Rezeptor Aktivität

Am dritten Tag nach Infarkt findet sich im Vergleich zum Infarkttag eine signifikante Anreicherung der Annotation Interleukin-21-Rezeptor Aktivität. Dieser liegt eine

signifikant vermehrte Expression des Gens IL21R am Tag 3 nach Infarkt zugrunde. Das für den IL-21-Rezeptor kodierende Gen wird am Infarkttag sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe als auch im Vergleich zum dritten Tag nach Infarkt signifikant vermindert exprimiert.

Interleukin-21 ist ein Zytokin mit pleiotroper Wirkung und bisher wenig erforschter Rolle im akuten Herzinfarkt. Am Mausmodell konnte eine verstärkte neutrophile Invasion in das Infarktareal unter IL-21 Einfluss sowie eine Attenuierung von Infarktgröße und Verbesserung der postinfarziellen kardialen Funktion unter Neutralisation von IL-21 gezeigt werden (K. Wang et al., 2018).

Eine kürzlich publizierte Arbeit zeigte eine vermehrte Expression des IL-21 Rezeptors in murinen pro-reparativen Ly6C^{low} Monozyten. Ferner zeigten die Autoren eine verstärkte Apoptose dieser pro-reparativen Monozyten unter Einfluss von IL-21. Konsekutiv war das Überleben und die kardiale Funktion nach einem Myokardinfarkt in IL-21 Knockout Mäusen und unter Applikation von IL-21-neutralisierendem Protein verbessert. (Kubota et al., 2021)

In humanen Monozyten und Makrophagen konnte zudem eine IL-21 induzierte Steigerung der Phagozytose gezeigt werden (Vallieres & Girard, 2017).

Die am Infarkttag signifikant verminderte und am dritten Tag nach Infarkt signifikant verstärkte Interleukin-21-Rezeptor Expression in zirkulierenden Blut-Monozyten impliziert auf der einen Seite eine vermehrte Bereitstellung pro-reparativer monozytärer Phänotypen zu Beginn der späten inflammatorischen Phase. Auf der anderen Seite deutet es auf ein bisher unzureichend erforschtes potenzielles therapeutisches Ziel hin. Die Beeinflussung der IL-21/IL-21-Rezeptor Interaktion im Zuge der postinfarziellen kardialen Wundheilung stellt einen möglichen Ansatz für weitere Studien dar.

5.3.7 CX3C-Chemokinrezeptor 1 Aktivität

Am dritten Tag nach Infarkt zeigt sich im Vergleich zum Infarkttag eine vermehrte Expression von CX3CR1 ($\log_2(\text{fc}) = 1,39$). CX3CR1 kodiert für den CX3C-Chemokinrezeptor 1. In der späten pro-reparativen Phase nach Myokardinfarkt erfolgt im Myokard eine vermehrte Freisetzung des Chemokins CX3CL1 und eine konsekutive Rekrutierung anti-inflammatorischer Monozyten mittels CX3CL1 / CX3CR1 Interaktion. Die vermehrte Expression des CX3C-Chemokinrezeptor 1 in

zirkulierenden Blut-Monozyten am dritten Tag nach Infarkt im Vergleich zum Infarkttag könnte auf die vermehrte Bereitstellung dieser pro-reparativen monozytären Subpopulationen oder eine dynamische Veränderung zirkulierender Blut-Monozyten zu pro-reparativen Phänotypen in der späten inflammatorischen Phase hindeuten.

5.4 Limitationen

Moderne Hochdurchsatzmethoden wie das RNA-Sequencing eröffnen die Möglichkeit wie in dieser Arbeit explorative Untersuchungen neuer Fragestellung mit hoher Genauigkeit und Generierung großen Mengen statistisch signifikanter Daten durchzuführen. Jedoch ist es essenziell bei der Interpretation der Datensätze mögliche Limitationen zu beachten.

Bei der Betrachtung der gesamten differentiellen Genexpression zweier unterschiedlicher Kollektive, in dieser Arbeit STEMI- und CCS-Patienten, müssen etwa demographische Unterschiede beachtet werden. Diese bestehen insbesondere für aktiven Nikotinkonsum sowie Dauermedikation (siehe 4.1.1). Neben dem Gen LINC00599, welches an beiden Zeitpunkten in Patienten-Monozyten vermehrt exprimiert wird und zu welchem sich in der Literatur eine vermehrte Expression unter Rauchern findet (siehe 5.2.1), könnten auch weitere Gene unter Einfluss von Medikation und Lebensstil differentiell exprimiert sein. Zudem besteht möglicherweise aufgrund der Überrepräsentation männlicher Studienteilnehmer sowohl in der Experimental- als auch der Kontrollgruppe eine limitierte Übertragbarkeit auf die Allgemeinbevölkerung.

Zudem zeigt sich in der allgemeinen Betrachtung der differentiellen Genexpression in allen drei Vergleichen ein deutliches zahlenmäßiges Überwiegen der vermindert exprimierten Gene gegenüber den vermehrt exprimierten Genen. In den beiden Vergleichen der Blut-Monozyten der STEMI Patienten mit denen der CCS Patienten wäre jedoch zu erwarten, dass durch die starke Aktivierung der Blut-Monozyten die Genexpression bei STEMI Patienten im Vergleich zunimmt und mehr Gene vermehrt exprimiert werden als vermindert. Jedoch liefert diese Arbeit viele Hinweise darauf, dass neben einer Aktivierung auch eine Differenzierung der zirkulierenden Monozyten stattfindet. Eine solche Differenzierung hätte neben der erhöhten Expression zahlreicher Gene auch eine Herabregulierung vieler Gene zur Folge. Möglicherweise

führt die Zelldifferenzierung bei Monozyten von STEMI Patienten trotz Aktivierung zu einem Überwiegen der vermindert exprimierten Gene im Vergleich zu sich nicht differenzierenden Blut-Monozyten der CCS Patienten.

Ferner muss bei der Interpretation beachtet werden, dass die für die RNA-Sequenzierung isolierten Blut-Monozyten in allen Gruppen mit einer hohen Reinheit CD14 positiv (durchschnittlich $97 \pm 1,8$ %) sind. Damit stammt die sequenzierte RNA der Isolate von zwei der drei unterschiedlichen monozytären Subtypen, den klassischen pro-inflammatorischen CD14⁺ CD16⁻ Monozyten und den intermediären CD14⁺ CD16⁺ Monozyten. Jedoch wurde bei der Interpretation der phänotypischen Veränderungen die Genexpression beider Subtypen gemeinsam betrachtet. Die Veränderung der absoluten Zahlen dieser beiden Subtypen folgt in etwa derselben Dynamik. Eine veränderte Genexpression könnte aber dennoch sowohl durch eine Veränderung der Phänotypen als auch durch eine veränderte Zusammensetzung dieser Subpopulationen in der isolierten und sequenzierten RNA beeinflusst sein.

5.5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser explorativen Arbeit war die Charakterisierung der phänotypischen Veränderungen zirkulierender Blut-Monozyten nach einem AMI.

Die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung zeigen anhand einer Vielzahl hochsignifikanter differentiell exprimierter Gene, dass sich im Anschluss an einen STEMI die zirkulierenden CD14-positiven Blut-Monozyten phänotypisch stark von denen der Kontrollgruppe ohne akute myokardiale Ischämie unterscheiden. Zudem impliziert die signifikante Veränderung der Genexpression zwischen dem Infarkttag und dem dritten nach Infarkt multiple phänotypische Veränderungen dieser Monozyten im Zeitverlauf nach einem STEMI.

Die Analyse der funktionellen Anreicherung der differentiell exprimierten Gene in Gen-Ontologie Annotationen zeigt, dass die phänotypischen Veränderungen insbesondere Rezeptoraktivität, Zellaktivierung und -differenzierung, Interleukin-Bindung, Leukozyten-Migration und Effektorprozesse der Immunantwort betreffen. Insgesamt sprechen die Ergebnisse für eine sehr deutliche pro-inflammatorische Veränderung zirkulierender CD14-positiver Blut-Monozyten im Anschluss an eine myokardiale

Ischämie sowie für eine funktionelle entzündungslimitierende Anpassung der Blut-Monozyten am dritten Tag nach Infarkt.

Diese Ergebnisse deuten zusammenfassend darauf hin, dass zusätzlich zur zahlenmäßig gesteigerten Bereitstellung auch eine phänotypische Dynamik der zirkulierenden Blut-Monozyten von großer Bedeutung für die komplex gesteuerte postinfarzielle inflammatorischen Antwort ist. Insbesondere die Gene CYP19A1, THBS1, CLU, TRPM6, MTUS1, CRIP2, IL1R2, IL1R1, IL1RAP, IL18R1, IL18RAP, IL21R und CX3CR1 scheinen eine wichtige Beteiligung an der monozytären Immunantwort auf einen AMI zu haben. Zwar sind die Daten assoziativer Natur und können keine kausalen Zusammenhänge abbilden, jedoch können sie als wichtige Grundlage für weitere Folgeprojekte zu bisher ungenügend erforschten pathophysiologische Abläufe nach stattgehabtem Myokardinfarkt dienen. Ferner können sie auf potenzielle diagnostische und therapeutische Ansatzpunkte für die Optimierung der inflammatorischen Antwort auf einen AMI hinweisen.

Literaturverzeichnis

- Agewall, S., Beltrame, J. F., Reynolds, H. R., Niessner, A., Rosano, G., Caforio, A. L., De Caterina, R., Zimarino, M., Roffi, M., Kjeldsen, K., Atar, D., Kaski, J. C., Sechtem, U., Tornvall, P., & Pharmacotherapy, W. G. o. C. (2017). ESC working group position paper on myocardial infarction with non-obstructive coronary arteries. *European Heart Journal*, 38(3), 143-153. doi:10.1093/eurheartj/ehw149
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., & Weissman, I. L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, 404(6774), 193-197. doi:10.1038/35004599
- Akil, H., Bunney, W., Choudary, P., Evans, S., Jones, E., Li, J., Lopez, J., Lyons, D., Molnar, M., & Myers, R. (2006). Genes and pathways differentially expressed in bipolar disorder and/or major depressive disorder. In: Google Patents.
- Alon, R., Kassner, P. D., Carr, M. W., Finger, E. B., Hemler, M. E., & Springer, T. A. (1995). The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *Journal of Cell Biology*, 128(6), 1243-1253. doi:10.1083/jcb.128.6.1243
- An, G., Wang, H., Tang, R., Yago, T., McDaniel, J. M., McGee, S., Huo, Y., & Xia, L. (2008). PSGL-1 is highly expressed on Ly-6Chi monocytes and a major determinant for Ly-6Chi monocyte recruitment to sites of atherosclerosis in mice. *Circulation*, 117(25), 3227. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.771048
- Anderson, L., Thompson, D. R., Oldridge, N., Zwisler, A. D., Rees, K., Martin, N., & Taylor, R. S. (2016). Exercise-based cardiac rehabilitation for coronary heart disease. *Cochrane Database Syst Rev*(1), CD001800. doi:10.1002/14651858.CD001800.pub3
- Anstensrud, A. K. (2020). *Il-6 inhibition in acute ST-elevation myocardial infarction*. Paper presented at the ESC Congress 2020. <https://esc365.escardio.org/Congress/ESC-CONGRESS-2020-The-Digital-Experience/Late-Breaking-Science-in-Acute-Coronary-Syndromes-1/224225-il-6-inhibition-in-acute-st-elevation-myocardial-infarction>
- Anstensrud, A. K., Woxholt, S., Sharma, K., Broch, K., Bendz, B., Aakhus, S., Ueland, T., Amundsen, B. H., Damås, J. K., Hopp, E., Kleveland, O., Stensæth, K. H., Opdahl, A., Kløw, N. E., Seljeflot, I., Andersen, G., Wiseth, R., Aukrust, P., & Gullestad, L. (2019). Rationale for the ASSAIL-MI-trial: a randomised controlled trial designed to assess the effect of tocilizumab on myocardial salvage in patients with acute ST-elevation myocardial infarction (STEMI). *Open Heart*, 6(2), e001108. doi:10.1136/openhrt-2019-001108
- Antithrombotic Trialists, C., Baigent, C., Blackwell, L., Collins, R., Emberson, J., Godwin, J., Peto, R., Buring, J., Hennekens, C., Kearney, P., Meade, T., Patrono, C., Roncaglioni, M. C., & Zanchetti, A. (2009). Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet*, 373(9678), 1849-1860. doi:10.1016/S0140-6736(09)60503-1
- Anzai, A., Choi, J. L., He, S., Fenn, A. M., Nairz, M., Rattik, S., McAlpine, C. S., Mindur, J. E., Chan, C. T., Iwamoto, Y., Tricot, B., Wojtkiewicz, G. R., Weissleder, R., Libby, P., Nahrendorf, M., Stone, J. R., Becher, B., & Swirski, F. K. (2017). The infarcted myocardium solicits GM-CSF for the detrimental oversupply of

- inflammatory leukocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 214(11), 3293-3310. doi:10.1084/jem.20170689
- Apex Ami Investigators, Armstrong, P. W., Granger, C. B., Adams, P. X., Hamm, C., Holmes, D., Jr., O'Neill, W. W., Todaro, T. G., Vahanian, A., & Van de Werf, F. (2007). Pexelizumab for acute ST-elevation myocardial infarction in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA*, 297(1), 43-51. doi:10.1001/jama.297.1.43
- Auffray, C., Sieweke, M. H., & Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, 27, 669-692. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132557
- Baigent, C., Keech, A., Kearney, P. M., Blackwell, L., Buck, G., Pollicino, C., Kirby, A., Sourjina, T., Peto, R., Collins, R., Simes, R., & Cholesterol Treatment Trialists, C. (2005). Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*, 366(9493), 1267-1278. doi:10.1016/S0140-6736(05)67394-1
- BD Biosciences. (2009, 03/2010). BD LSRFortessa Cell Analyzer User's Guide. Retrieved from https://static.bdbiosciences.com/documents/BD_LSRFortessa_cell_analyzer_user_guide.pdf
- BD Biosciences. (2020). Spectrum Viewer. Retrieved from <https://www.bdbiosciences.com/en-eu/applications/research-applications/multicolor-flow-cytometry/product-selection-tools/spectrum-viewer>
- Benjamin, E. J., Muntner, P., Alonso, A., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P., Chamberlain, A. M., Chang, A. R., Cheng, S., & Das, S. R. (2019). Heart disease and stroke Statistics-2019 update a report from the American Heart Association. *Circulation*.
- Blackshaw, S., Harpavat, S., Trimarchi, J., Cai, L., Huang, H., Kuo, W. P., Weber, G., Lee, K., Fraioli, R. E., Cho, S. H., Yung, R., Asch, E., Ohno-Machado, L., Wong, W. H., & Cepko, C. L. (2004). Genomic analysis of mouse retinal development. *PLoS Biology*, 2(9), E247. doi:10.1371/journal.pbio.0020247
- Blakemore, J., & Naftolin, F. (2016). Aromatase: Contributions to Physiology and Disease in Women and Men. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 31(4), 258-269. doi:10.1152/physiol.00054.2015
- Brandao, K., Deason-Towne, F., Perraud, A. L., & Schmitz, C. (2013). The role of Mg²⁺ in immune cells. *Immunologic Research*, 55(1-3), 261-269. doi:10.1007/s12026-012-8371-x
- Braunwald, E., & Morrow, D. A. (2013). Unstable angina: is it time for a requiem? *Circulation*, 127(24), 2452-2457. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001258
- Bugiardini, R., Cenko, E., Ricci, B., Vasiljevic, Z., Dorobantu, M., Kedev, S., Vavlukis, M., Kalpak, O., Puddu, P. E., Gustiene, O., Trninic, D., Knezevic, B., Milicic, D., Gale, C. P., Manfrini, O., Koller, A., & Badimon, L. (2016). Comparison of Early Versus Delayed Oral beta Blockers in Acute Coronary Syndromes and Effect on Outcomes. *American Journal of Cardiology*, 117(5), 760-767. doi:10.1016/j.amjcard.2015.11.059
- Carlin, L. M., Stamatiades, E. G., Auffray, C., Hanna, R. N., Glover, L., Vizcay-Barrena, G., Hedrick, C. C., Cook, H. T., Diebold, S., & Geissmann, F. (2013). Nr4a1-dependent Ly6Clow monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell*, 153(2), 362-375. doi:10.1016/j.cell.2013.03.010

- Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J., & Rutter, W. J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, *18*(24), 5294-5299. doi:10.1021/bi00591a005
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, *162*(1), 156-159. doi:10.1006/abio.1987.9999
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols*, *1*(2), 581-585. doi:10.1038/nprot.2006.83
- Chow, C. K., Jolly, S., Rao-Melacini, P., Fox, K. A., Anand, S. S., & Yusuf, S. (2010). Association of diet, exercise, and smoking modification with risk of early cardiovascular events after acute coronary syndromes. *Circulation*, *121*(6), 750-758. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.891523
- Cid, M. C., Kleinman, H. K., Grant, D. S., Schnaper, H. W., Fauci, A. S., & Hoffman, G. S. (1994). Estradiol enhances leukocyte binding to tumor necrosis factor (TNF)-stimulated endothelial cells via an increase in TNF-induced adhesion molecules E-selectin, intercellular adhesion molecule type 1, and vascular cell adhesion molecule type 1. *Journal of Clinical Investigation*, *93*(1), 17-25. doi:10.1172/JCI116941
- Clayberger, C., Finn, M. W., Wang, T., Saini, R., Wilson, C., Barr, V. A., Sabatino, M., Castiello, L., Stroncek, D., & Krensky, A. M. (2012). 15 kDa granulysin causes differentiation of monocytes to dendritic cells but lacks cytotoxic activity. *Journal of Immunology*, *188*(12), 6119-6126. doi:10.4049/jimmunol.1200570
- Coller, B. S. (2005). Leukocytosis and ischemic vascular disease morbidity and mortality: is it time to intervene? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *25*(4), 658-670. doi:10.1161/01.ATV.0000156877.94472.a5
- Collet, J. P., Thiele, H., Barbato, E., Barthelémy, O., Bauersachs, J., Bhatt, D. L., Dendale, P., Dorobantu, M., Edvardsen, T., Folliguet, T., Gale, C. P., Gilard, M., Jobs, A., Juni, P., Lambrinou, E., Lewis, B. S., Mehilli, J., Meliga, E., Merkely, B., Mueller, C., Roffi, M., Rutten, F. H., Sibbing, D., Siontis, G. C. M., & Group, E. S. C. S. D. (2021). 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *European Heart Journal*, *42*(14), 1289-1367. doi:10.1093/eurheartj/ehaa575
- Crea, F., & Libby, P. (2017). Acute Coronary Syndromes: The Way Forward From Mechanisms to Precision Treatment. *Circulation*, *136*(12), 1155-1166. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029870
- Curatola, A. M., Huang, K., & Naftolin, F. (2012). Dehydroepiandrosterone (DHEA) inhibition of monocyte binding by vascular endothelium is associated with sialylation of neural cell adhesion molecule. *Reproductive Sciences*, *19*(1), 86-91. doi:10.1177/1933719111414210
- Deftereos, S., Giannopoulos, G., Angelidis, C., Alexopoulos, N., Filippatos, G., Papoutsidakis, N., Sianos, G., Goudevenos, J., Alexopoulos, D., Pyrgakis, V., Cleman, M. W., Manolis, A. S., Tousoulis, D., & Lekakis, J. (2015). Anti-Inflammatory Treatment With Colchicine in Acute Myocardial Infarction: A Pilot Study. *Circulation*, *132*(15), 1395-1403. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.017611

- Destaf, L., Jernberg, T., Löfman, I., Hofman-Bang, C., Hagerman, I., Spaak, J., & Persson, H. (2015). Incidence, temporal trends, and prognostic impact of heart failure complicating acute myocardial infarction. The SWEDHEART Registry (Swedish Web-System for Enhancement and Development of Evidence-Based Care in Heart Disease Evaluated According to Recommended Therapies): a study of 199,851 patients admitted with index acute myocardial infarctions, 1996 to 2008. *JACC Heart Fail*, 3(3), 234-242. doi:10.1016/j.jchf.2014.10.007
- Dewald, O., Zymek, P., Winkelmann, K., Koerting, A., Ren, G., Abou-Khamis, T., Michael, L. H., Rollins, B. J., Entman, M. L., & Frangogiannis, N. G. (2005). CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circulation Research*, 96(8), 881-889. doi:10.1161/01.RES.0000163017.13772.3a
- Diano, S., Horvath, T. L., Mor, G., Register, T., Adams, M., Harada, N., & Naftolin, F. (2018). Aromatase and estrogen receptor immunoreactivity in the coronary arteries of monkeys and human subjects. *Menopause*, 25(11), 1201-1207. doi:10.1097/GME.0000000000001219
- Ding, J., Li, Y., Zhang, Y., Fan, B., Li, Q., Zhang, J., & Zhang, J. (2020). Identification of key lncRNAs in the tumorigenesis of intraductal pancreatic mucinous neoplasm by coexpression network analysis. *Cancer Med*, 9(11), 3840-3851. doi:10.1002/cam4.2927
- Dutta, P., Sager, H. B., Stengel, K. R., Naxerova, K., Courties, G., Saez, B., Silberstein, L., Heidt, T., Sebas, M., Sun, Y., Wojtkiewicz, G., Feruglio, P. F., King, K., Baker, J. N., van der Laan, A. M., Borodovsky, A., Fitzgerald, K., Hulsmans, M., Hoyer, F., Iwamoto, Y., Vinegoni, C., Brown, D., Di Carli, M., Libby, P., Hiebert, S. W., Scadden, D. T., Swirski, F. K., Weissleder, R., & Nahrendorf, M. (2015). Myocardial Infarction Activates CCR2(+) Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cell Stem Cell*, 16(5), 477-487. doi:10.1016/j.stem.2015.04.008
- Elgendy, I. Y., Mahtta, D., & Pepine, C. J. (2019). Medical Therapy for Heart Failure Caused by Ischemic Heart Disease. *Circulation Research*, 124(11), 1520-1535. doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.313568
- Epelman, S., Lavine, K. J., Beaudin, A. E., Sojka, D. K., Carrero, J. A., Calderon, B., Brija, T., Gautier, E. L., Ivanov, S., Satpathy, A. T., Schilling, J. D., Schwendener, R., Sergin, I., Razani, B., Forsberg, E. C., Yokoyama, W. M., Unanue, E. R., Colonna, M., Randolph, G. J., & Mann, D. L. (2014). Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity*, 40(1), 91-104. doi:10.1016/j.immuni.2013.11.019
- Epelman, S., Lavine, K. J., & Randolph, G. J. (2014). Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity*, 41(1), 21-35. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.013
- Fox, C. S., Evans, J. C., Larson, M. G., Kannel, W. B., & Levy, D. (2004). Temporal trends in coronary heart disease mortality and sudden cardiac death from 1950 to 1999: the Framingham Heart Study. *Circulation*, 110(5), 522-527. doi:10.1161/01.CIR.0000136993.34344.41
- Frangogiannis, N. G. (2004). Chemokines in the ischemic myocardium: from inflammation to fibrosis. *Inflammation Research*, 53(11), 585-595. doi:10.1007/s00011-004-1298-5
- Frangogiannis, N. G., Dewald, O., Xia, Y., Ren, G., Haudek, S., Leucker, T., Kraemer, D., Taffet, G., Rollins, B. J., & Entman, M. L. (2007). Critical Role of Monocyte Chemoattractant Protein-1/CC Chemokine Ligand 2 in the Pathogenesis of

- Ischemic Cardiomyopathy. *Circulation*, 115(5), 584-592. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.646091
- Frangogiannis, N. G., Smith, C. W., & Entman, M. L. (2002). The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovascular Research*, 53(1), 31-47. doi:10.1016/s0008-6363(01)00434-5
- Furman, M. I., Becker, R. C., Yarzebski, J., Savegeau, J., Gore, J. M., & Goldberg, R. J. (1996). Effect of elevated leukocyte count on in-hospital mortality following acute myocardial infarction. *American Journal of Cardiology*, 78(8), 945-948. doi:10.1016/s0002-9149(96)00473-0
- Gale, C. P., Allan, V., Cattle, B. A., Hall, A. S., West, R. M., Timmis, A., Gray, H. H., Deanfield, J., Fox, K. A., & Feltbower, R. (2014). Trends in hospital treatments, including revascularisation, following acute myocardial infarction, 2003-2010: a multilevel and relative survival analysis for the National Institute for Cardiovascular Outcomes Research (NICOR). *Heart*, 100(7), 582-589. doi:10.1136/heartjnl-2013-304517
- Garlanda, C., Dinarello, C. A., & Mantovani, A. (2013). The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*, 39(6), 1003-1018. doi:10.1016/j.immuni.2013.11.010
- Garot, P., Morice, M. C., Tresukosol, D., Pocock, S. J., Meredith, I. T., Abizaid, A., Carrie, D., Naber, C., Iniguez, A., Talwar, S., Menown, I. B. A., Christiansen, E. H., Gregson, J., Copt, S., Hovasse, T., Lurz, P., Maillard, L., Krackhardt, F., Ong, P., Byrne, J., Redwood, S., Windhovel, U., Greene, S., Stoll, H. P., Urban, P., & Investigators, L. F. (2017). 2-Year Outcomes of High Bleeding Risk Patients After Polymer-Free Drug-Coated Stents. *Journal of the American College of Cardiology*, 69(2), 162-171. doi:10.1016/j.jacc.2016.10.009
- GBD 2019 Collaborators. (2020). Ischaemic heart disease—Level 3 cause. *Lancet*, 396, S90-S91. Retrieved from <https://www.thelancet.com/pb-assets/Lancet/gbd/summaries/diseases/ischaemic-heart-disease.pdf>
- Gerhardt, T., & Ley, K. (2015). Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovascular Research*, 107(3), 321-330. doi:10.1093/cvr/cvv147
- Gerszten, R. E., Garcia-Zepeda, E. A., Lim, Y. C., Yoshida, M., Ding, H. A., Gimbrone, M. A., Jr., Luster, A. D., Luscinskas, F. W., & Rosenzweig, A. (1999). MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature*, 398(6729), 718-723. doi:10.1038/19546
- Gheorghide, M., Sopko, G., De Luca, L., Velazquez, E. J., Parker, J. D., Binkley, P. F., Sadowski, Z., Golba, K. S., Prior, D. L., Rouleau, J. L., & Bonow, R. O. (2006). Navigating the crossroads of coronary artery disease and heart failure. *Circulation*, 114(11), 1202-1213. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.623199
- Goldberg, R. J., Spencer, F. A., Gore, J. M., Lessard, D., & Yarzebski, J. (2009). Thirty-year trends (1975 to 2005) in the magnitude of, management of, and hospital death rates associated with cardiogenic shock in patients with acute myocardial infarction: a population-based perspective. *Circulation*, 119(9), 1211-1219. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.814947
- Goldberger, J. J., Bonow, R. O., Cuffe, M., Liu, L., Rosenberg, Y., Shah, P. K., Smith, S. C., Jr., Subacius, H., & Investigators, O. (2015). Effect of Beta-Blocker Dose on Survival After Acute Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 66(13), 1431-1441. doi:10.1016/j.jacc.2015.07.047
- Grage-Griebenow, E., Zawatzky, R., Kahlert, H., Brade, L., Flad, H., & Ernst, M. (2001). Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood

- monocytes. *European Journal of Immunology*, 31(1), 48-56. doi:10.1002/1521-4141(200101)31:1#60;48::aid-immu48#62;3.0.co;2-5
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S. H., Onai, N., Schraml, B. U., Segura, E., Tussiwand, R., & Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nature Reviews: Immunology*, 14(8), 571-578. doi:10.1038/nri3712
- Guilliams, M., Mildner, A., & Yona, S. (2018). Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity*, 49(4), 595-613. doi:10.1016/j.immuni.2018.10.005
- Gwechenberger, M., Mendoza, L. H., Youker, K. A., Frangogiannis, N. G., Smith, C. W., Michael, L. H., & Entman, M. L. (1999). Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation*, 99(4), 546-551. doi:10.1161/01.cir.99.4.546
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M. B., Leboeuf, M., Becker, C. D., See, P., Price, J., Lucas, D., Greter, M., Mortha, A., Boyer, S. W., Forsberg, E. C., Tanaka, M., van Rooijen, N., García-Sastre, A., Stanley, E. R., Ginhoux, F., Frenette, P. S., & Merad, M. (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*, 38(4), 792-804. doi:10.1016/j.immuni.2013.04.004
- Heart Outcomes Prevention Evaluation Study, I., Yusuf, S., Sleight, P., Pogue, J., Bosch, J., Davies, R., & Dagenais, G. (2000). Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. *New England Journal of Medicine*, 342(3), 145-153. doi:10.1056/NEJM20001203420301
- Heidt, T., Courties, G., Dutta, P., Sager, H. B., Sebas, M., Iwamoto, Y., Sun, Y., Silva, N. D., Panizzi, P., Laan, A. M. v. d., Swirski, F. K., Weissleder, R., & Nahrendorf, M. (2014). Differential Contribution of Monocytes to Heart Macrophages in Steady-State and After Myocardial Infarction. *Circulation Research*, 115(2), 284-295. doi:doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.303567
- Hettinger, J., Richards, D. M., Hansson, J., Barra, M. M., Joschko, A. C., Krijgsveld, J., & Feuerer, M. (2013). Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nature Immunology*, 14(8), 821-830. doi:10.1038/ni.2638
- Heusch, G. (2013). Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic. *Lancet*, 381(9861), 166-175. doi:10.1016/s0140-6736(12)60916-7
- Horckmans, M., Ring, L., Duchene, J., Santovito, D., Schloss, M. J., Drechsler, M., Weber, C., Soehnlein, O., & Steffens, S. (2017). Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype. *European Heart Journal*, 38(3), 187-197. doi:10.1093/eurheartj/ehw002
- Ibanez, B., James, S., Agewall, S., Antunes, M. J., Bucciarelli-Ducci, C., Bueno, H., Caforio, A. L. P., Crea, F., Goudevenos, J. A., Halvorsen, S., Hindricks, G., Kastrati, A., Lenzen, M. J., Prescott, E., Roffi, M., Valgimigli, M., Varenhorst, C., Vranckx, P., Widimsky, P., & Group, E. S. C. S. D. (2018). 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*, 39(2), 119-177. doi:10.1093/eurheartj/ehx393

- Jakubzick, C., Gautier, E. L., Gibbings, S. L., Sojka, D. K., Schlitzer, A., Johnson, T. E., Ivanov, S., Duan, Q., Bala, S., & Condon, T. (2013). Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity*, 39(3), 599-610. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.007
- Jennings, R. B., & Ganote, C. E. (1974). Structural changes in myocardium during acute ischemia. *Circulation Research*, 35 Suppl 3, 156-172.
- Jia, H., Abtahian, F., Aguirre, A. D., Lee, S., Chia, S., Lowe, H., Kato, K., Yonetsu, T., Vergallo, R., Hu, S., Tian, J., Lee, H., Park, S. J., Jang, Y. S., Raffel, O. C., Mizuno, K., Uemura, S., Itoh, T., Kakuta, T., Choi, S. Y., Dauerman, H. L., Prasad, A., Toma, C., McNulty, I., Zhang, S., Yu, B., Fuster, V., Narula, J., Virmani, R., & Jang, I. K. (2013). In vivo diagnosis of plaque erosion and calcified nodule in patients with acute coronary syndrome by intravascular optical coherence tomography. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(19), 1748-1758. doi:10.1016/j.jacc.2013.05.071
- Jolly, S. S., Yusuf, S., Cairns, J., Niemela, K., Xavier, D., Widimsky, P., Budaj, A., Niemela, M., Valentin, V., Lewis, B. S., Avezum, A., Steg, P. G., Rao, S. V., Gao, P., Afzal, R., Joyner, C. D., Chrolavicius, S., Mehta, S. R., & group, R. t. (2011). Radial versus femoral access for coronary angiography and intervention in patients with acute coronary syndromes (RIVAL): a randomised, parallel group, multicentre trial. *Lancet*, 377(9775), 1409-1420. doi:10.1016/S0140-6736(11)60404-2
- Khera, S., Kolte, D., Gupta, T., Subramanian, K. S., Khanna, N., Aronow, W. S., Ahn, C., Timmermans, R. J., Cooper, H. A., Fonarow, G. C., Frishman, W. H., Panza, J. A., & Bhatt, D. L. (2015). Temporal Trends and Sex Differences in Revascularization and Outcomes of ST-Segment Elevation Myocardial Infarction in Younger Adults in the United States. *Journal of the American College of Cardiology*, 66(18), 1961-1972. doi:10.1016/j.jacc.2015.08.865
- Knuuti, J., Wijns, W., Saraste, A., Capodanno, D., Barbato, E., Funck-Brentano, C., Prescott, E., Storey, R. F., Deaton, C., Cuisset, T., Agewall, S., Dickstein, K., Edvardsen, T., Escaned, J., Gersh, B. J., Svitil, P., Gilard, M., Hasdai, D., Hatala, R., Mahfoud, F., Masip, J., Muneretto, C., Valgimigli, M., Achenbach, S., Bax, J. J., & Group, E. S. C. S. D. (2020). 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *European Heart Journal*, 41(3), 407-477. doi:10.1093/eurheartj/ehz425
- Kokabu, S., Lowery, J. W., Toyono, T., Seta, Y., Hitomi, S., Sato, T., Enoki, Y., Okubo, M., Fukushima, Y., & Yoda, T. (2015). Muscle regulatory factors regulate T1R3 taste receptor expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 468(4), 568-573. doi:10.1016/j.bbrc.2015.10.142
- Korkosz, M., Bukowska-Strakova, K., Sadis, S., Grodzicki, T., & Siedlar, M. (2012). Monoclonal antibodies against macrophage colony-stimulating factor diminish the number of circulating intermediate and nonclassical (CD14++ CD16+/CD14+ CD16++) monocytes in rheumatoid arthritis patient. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 119(22), 5329-5330. doi:10.1182/blood-2012-02-412551
- Kovats, S. (2015). Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cellular Immunology*, 294(2), 63-69. doi:10.1016/j.cellimm.2015.01.018

- Kubota, A., Suto, A., Suga, K., Iwata, A., Tanaka, S., Suzuki, K., Kobayashi, Y., & Nakajima, H. (2021). Inhibition of Interleukin-21 prolongs the survival through the promotion of wound healing after myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *159*, 48-61. doi:10.1016/j.yjmcc.2021.06.006
- Kuo, C. H., Miyazaki, D., Nawata, N., Tominaga, T., Yamasaki, A., Sasaki, Y., & Inoue, Y. (2007). Prognosis-determinant candidate genes identified by whole genome scanning in eyes with pterygia. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *48*(8), 3566-3575. doi:10.1167/iovs.06-1149
- Kyne, L., Hausdorff, J. M., Knight, E., Dukas, L., Azhar, G., & Wei, J. Y. (2000). Neutrophilia and congestive heart failure after acute myocardial infarction. *American Heart Journal*, *139*(1 Pt 1), 94-100. doi:10.1016/s0002-8703(00)90314-4
- Lee, W. W., Marinelli, B., van der Laan, A. M., Sena, B. F., Gorbатов, R., Leuschner, F., Dutta, P., Iwamoto, Y., Ueno, T., Begieneman, M. P., Niessen, H. W., Piek, J. J., Vinegoni, C., Pittet, M. J., Swirski, F. K., Tawakol, A., Di Carli, M., Weissleder, R., & Nahrendorf, M. (2012). PET/MRI of inflammation in myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, *59*(2), 153-163. doi:10.1016/j.jacc.2011.08.066
- Leuschner, F., Panizzi, P., Chico-Calero, I., Lee, W. W., Ueno, T., Cortez-Retamozo, V., Waterman, P., Gorbатов, R., Marinelli, B., Iwamoto, Y., Chudnovskiy, A., Figueiredo, J. L., Sosnovik, D. E., Pittet, M. J., Swirski, F. K., Weissleder, R., & Nahrendorf, M. (2010). Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents the release of monocytes from their splenic reservoir in mice with myocardial infarction. *Circulation Research*, *107*(11), 1364-1373. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.227454
- Leuschner, F., Rauch, P. J., Ueno, T., Gorbатов, R., Marinelli, B., Lee, W. W., Dutta, P., Wei, Y., Robbins, C., Iwamoto, Y., Sena, B., Chudnovskiy, A., Panizzi, P., Keliher, E., Higgins, J. M., Libby, P., Moskowitz, M. A., Pittet, M. J., Swirski, F. K., Weissleder, R., & Nahrendorf, M. (2012). Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis. *Journal of Experimental Medicine*, *209*(1), 123-137. doi:10.1084/jem.20111009
- Leuschner, F., Rauch, P. J., Ueno, T., Gorbатов, R., Marinelli, B., Lee, W. W., Dutta, P., Wei, Y., Robbins, C., Iwamoto, Y., Sena, B., Chudnovskiy, A., Panizzi, P., Keliher, E., Higgins, J. M., Libby, P., Moskowitz, M. A., Pittet, M. J., Swirski, F. K., Weissleder, R., & Nahrendorf, M. (2012). Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis. *Journal of Experimental Medicine*, *209*(1), 123-137. doi:10.1084/jem.20111009
- Liu, Z., Gu, Y., Chakarov, S., Bleriot, C., Kwok, I., Chen, X., Shin, A., Huang, W., Dress, R. J., Dutertre, C. A., Schlitzer, A., Chen, J., Ng, L. G., Wang, H., Liu, Z., Su, B., & Ginhoux, F. (2019). Fate Mapping via Ms4a3-Expression History Traces Monocyte-Derived Cells. *Cell*, *178*(6), 1509-1525 e1519. doi:10.1016/j.cell.2019.08.009
- Lowe, G. D., Machado, S. G., Krol, W. F., Barton, B. A., & Forbes, C. D. (1985). White blood cell count and haematocrit as predictors of coronary recurrence after myocardial infarction. *Thrombosis and Haemostasis*, *54*(3), 700-703. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4089799>

- Luo, B. H., Carman, C. V., & Springer, T. A. (2007). Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annual Review of Immunology*, *25*, 619-647. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141618
- Luscinskas, F. W., Gerszten, R. E., Garcia-Zepeda, E. A., Lim, Y. C., Yoshida, M., Ding, H. A., Gimbrone, M. A., Jr., Luster, A. D., & Rosenzweig, A. (2000). C-C and C-X-C chemokines trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *902*(1), 288-293. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06324.x
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., & Myrtek, D. (2014). Durchflusscytometrie. In *Der Experimentator: Immunologie* (pp. 73-101). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., & Myrtek, D. (2014). Zellseparation. In *Der Experimentator: Immunologie* (pp. 51-72). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Ma, Y. Q., Plow, E. F., & Geng, J. G. (2004). P-selectin binding to P-selectin glycoprotein ligand-1 induces an intermediate state of alphaMbeta2 activation and acts cooperatively with extracellular stimuli to support maximal adhesion of human neutrophils. *Blood*, *104*(8), 2549-2556. doi:10.1182/blood-2004-03-1108
- Maekawa, Y., Anzai, T., Yoshikawa, T., Asakura, Y., Takahashi, T., Ishikawa, S., Mitamura, H., & Ogawa, S. (2002). Prognostic significance of peripheral monocytois after reperfused acute myocardial infarction:a possible role for left ventricular remodeling. *Journal of the American College of Cardiology*, *39*(2), 241-246. doi:doi:10.1016/S0735-1097(01)01721-1
- Maekawa, Y., Anzai, T., Yoshikawa, T., Asakura, Y., Takahashi, T., Ishikawa, S., Mitamura, H., & Ogawa, S. (2002). Prognostic significance of peripheral monocytois after reperfused acute myocardial infarction:a possible role for left ventricular remodeling. *Journal of the American College of Cardiology*, *39*(2), 241-246. doi:10.1016/s0735-1097(01)01721-1
- Markadieu, N., & Delpire, E. (2014). Physiology and pathophysiology of SLC12A1/2 transporters. *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology*, *466*(1), 91-105. doi:10.1007/s00424-013-1370-5
- Marsh, S. A., Park, C., Redgrave, R. E., Singh, E., Draganova, L., Boag, S. E., Spray, L., Ali, S., Spyridopoulos, I., & Arthur, H. M. (2021). Rapid fall in circulating non-classical monocytes in ST elevation myocardial infarction patients correlates with cardiac injury. *FASEB Journal*, *35*(5), e21604. doi:10.1096/fj.202100240R
- Meerschaert, J., & Furie, M. B. (1995). The adhesion molecules used by monocytes for migration across endothelium include CD11a/CD18, CD11b/CD18, and VLA-4 on monocytes and ICAM-1, VCAM-1, and other ligands on endothelium. *Journal of Immunology*, *154*(8), 4099-4112. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7535821>
- Mercer, T. R., Qureshi, I. A., Gokhan, S., Dinger, M. E., Li, G., Mattick, J. S., & Mehler, M. F. (2010). Long noncoding RNAs in neuronal-glia fate specification and oligodendrocyte lineage maturation. *BMC Neuroscience*, *11*, 14. doi:10.1186/1471-2202-11-14
- Mestas, J., & Ley, K. (2008). Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine*, *18*(6), 228-232. doi:10.1016/j.tcm.2008.11.004

- Miltenyi Biotec. (2020). CliniMACS® CD14 Product Line. Retrieved from <https://www.miltenyibiotec.com/US-en/products/clinimacs-cd14-product-line.html#130-019-101>
- Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W., & Radbruch, A. (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*, *11*(2), 231-238. doi:10.1002/cyto.990110203
- Mülhardt, C. (2013). RNA. In *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics* (pp. 115-131). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Murphy, K., & Weaver, C. (2018a). Die angeborene Immunität. In *Janeway Immunologie* (pp. 47-93). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Murphy, K., & Weaver, C. (2018b). Die induzierten Reaktionen der angeborenen Immunität. In *Janeway Immunologie* (pp. 95-173). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Murphy, K., & Weaver, C. (2018c). Grundbegriffe der Immunologie. In *Janeway Immunologie* (pp. 3-46). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Nagano, H., Hashimoto, N., Nakayama, A., Suzuki, S., Miyabayashi, Y., Yamato, A., Higuchi, S., Fujimoto, M., Sakuma, I., Beppu, M., Yokoyama, M., Suzuki, Y., Sugano, S., Ikeda, K., Tatsuno, I., Manabe, I., Yokote, K., Inoue, S., & Tanaka, T. (2018). p53-inducible DPYSL4 associates with mitochondrial supercomplexes and regulates energy metabolism in adipocytes and cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(33), 8370-8375. doi:10.1073/pnas.1804243115
- Nahrendorf, M., & Swirski, F. K. (2016). Abandoning M1/M2 for a network model of macrophage function. *Circulation Research*, *119*(3), 414-417. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309194
- Nahrendorf, M., Swirski, F. K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J. L., Libby, P., Weissleder, R., & Pittet, M. J. (2007). The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *Journal of Experimental Medicine*, *204*(12), 3037-3047. doi:10.1084/jem.20070885
- Nariai, Y., Kamino, H., Obayashi, E., Kato, H., Sakashita, G., Sugiura, T., Migita, K., Koga, T., Kawakami, A., Sakamoto, K., Kadomatsu, K., Nakakido, M., Tsumoto, K., & Urano, T. (2019). Generation and characterization of antagonistic anti-human interleukin (IL)-18 monoclonal antibodies with high affinity: Two types of monoclonal antibodies against full-length IL-18 and the neoepitope of inflammatory caspase-cleaved active IL-18. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *663*, 71-82. doi:10.1016/j.abb.2019.01.001
- Narizhneva, N. V., Razorenova, O. V., Podrez, E. A., Chen, J., Chandrasekharan, U. M., DiCorleto, P. E., Plow, E. F., Topol, E. J., & Byzova, T. V. (2005). Thrombospondin-1 up-regulates expression of cell adhesion molecules and promotes monocyte binding to endothelium. *FASEB Journal*, *19*(9), 1158-1160. doi:10.1096/fj.04-3310fje
- Nishiura, H., Yamanegi, K., Kawabe, M., Kato-Kogoe, N., Yamada, N., & Nakasho, K. (2014). Annexin A3 plays a role in cytoplasmic calcium oscillation by extracellular calcium in the human promyelocytic leukemia HL-60 cells differentiated by phorbol-12-myristate-13-acetate. *Experimental and Molecular Pathology*, *97*(2), 241-246. doi:10.1016/j.yexmp.2014.07.010
- O'Donoghue, M. L., Glaser, R., Cavender, M. A., Aylward, P. E., Bonaca, M. P., Budaj, A., Davies, R. Y., Dellborg, M., Fox, K. A., Gutierrez, J. A., Hamm, C., Kiss, R.

- G., Kovar, F., Kuder, J. F., Im, K. A., Lepore, J. J., Lopez-Sendon, J. L., Ophuis, T. O., Parkhomenko, A., Shannon, J. B., Spinar, J., Tanguay, J. F., Ruda, M., Steg, P. G., Theroux, P., Wiviott, S. D., Laws, I., Sabatine, M. S., Morrow, D. A., & Investigators, L.-T. (2016). Effect of Losmapimod on Cardiovascular Outcomes in Patients Hospitalized With Acute Myocardial Infarction: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, *315*(15), 1591-1599. doi:10.1001/jama.2016.3609
- Palmerini, T., Biondi-Zoccai, G., Della Riva, D., Mariani, A., Sabate, M., Smits, P. C., Kaiser, C., D'Ascenzo, F., Frati, G., Mancone, M., Genereux, P., & Stone, G. W. (2014). Clinical outcomes with bioabsorbable polymer- versus durable polymer-based drug-eluting and bare-metal stents: evidence from a comprehensive network meta-analysis. *Journal of the American College of Cardiology*, *63*(4), 299-307. doi:10.1016/j.jacc.2013.09.061
- Panizzi, P., Swirski, F. K., Figueiredo, J.-L., Waterman, P., Sosnovik, D. E., Aikawa, E., Libby, P., Pittet, M., Weissleder, R., & Nahrendorf, M. (2010). Impaired Infarct Healing in Atherosclerotic Mice With Ly-6Chi Monocytosis. *Journal of the American College of Cardiology*, *55*(15), 1629-1638. doi:10.1016/j.jacc.2009.08.089
- Parker, M. M., Chase, R. P., Lamb, A., Reyes, A., Saferali, A., Yun, J. H., Himes, B. E., Silverman, E. K., Hersh, C. P., & Castaldi, P. J. (2017). RNA sequencing identifies novel non-coding RNA and exon-specific effects associated with cigarette smoking. *BMC Medical Genomics*, *10*(1), 58. doi:10.1186/s12920-017-0295-9
- Patel, A. A., Zhang, Y., Fullerton, J. N., Boelen, L., Rongvaux, A., Maini, A. A., Bigley, V., Flavell, R. A., Gilroy, D. W., Asquith, B., Macallan, D., & Yona, S. (2017). The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, *214*(7), 1913-1923. doi:10.1084/jem.20170355
- Pereira, R. M., Mekary, R. A., da Cruz Rodrigues, K. C., Anaruma, C. P., Ropelle, E. R., da Silva, A. S. R., Cintra, D. E., Pauli, J. R., & de Moura, L. P. (2018). Protective molecular mechanisms of clusterin against apoptosis in cardiomyocytes. *Heart Failure Reviews*, *23*(1), 123-129. doi:10.1007/s10741-017-9654-z
- Persic, V., Ruzic, A., Miletic, B., Samsa, D. T., Rakic, M., Rajjevic, D., Pejcinovic, V. P., Eminovic, S., Zaputovic, L., & Laskarin, G. (2012). Granulysin Expression in Lymphocytes that Populate the Peripheral Blood and the Myocardium after an Acute Coronary Event. *Scandinavian Journal of Immunology*, *75*(2), 231-242. doi:10.1111/j.1365-3083.2011.02646.x
- Piepoli, M. F., Hoes, A. W., Agewall, S., Albus, C., Brotons, C., Catapano, A. L., Cooney, M. T., Corra, U., Cosyns, B., Deaton, C., Graham, I., Hall, M. S., Hobbs, F. D. R., Lochen, M. L., Lollgen, H., Marques-Vidal, P., Perk, J., Prescott, E., Redon, J., Richter, D. J., Sattar, N., Smulders, Y., Tiberi, M., van der Worp, H. B., van Dis, I., Verschuren, W. M. M., Binno, S., & Group, E. S. C. S. D. (2016). 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association

- for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *European Heart Journal*, 37(29), 2315-2381. doi:10.1093/eurheartj/ehw106
- Pinto, A. R., Godwin, J. W., & Rosenthal, N. A. (2014). Macrophages in cardiac homeostasis, injury responses and progenitor cell mobilisation. *Stem Cell Res*, 13(3 Pt B), 705-714. doi:10.1016/j.scr.2014.06.004
- Pittet, M. J., Nahrendorf, M., & Swirski, F. K. (2014). The journey from stem cell to macrophage. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1319, 1-18. doi:10.1111/nyas.12393
- Planitzer, S. A., Machl, A. W., Rueckels, M., & Kubbies, M. (1998). Identification of a novel c-DNA overexpressed in Fanconi's anemia fibroblasts partially homologous to a putative L-3-phosphoserine-phosphatase. *Gene*, 210(2), 297-306. doi:10.1016/s0378-1119(98)00083-3
- Poller, W. C., Nahrendorf, M., & Swirski, F. K. (2020). Hematopoiesis and Cardiovascular Disease. *Circulation Research*, 126(8), 1061-1085. doi:doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.315895
- Pomerantz, B. J., Reznikov, L. L., Harken, A. H., & Dinarello, C. A. (2001). Inhibition of caspase 1 reduces human myocardial ischemic dysfunction via inhibition of IL-18 and IL-1beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(5), 2871-2876. doi:10.1073/pnas.041611398
- Prabhu, S. D., & Frangogiannis, N. G. (2016). The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circulation Research*, 119(1), 91-112. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303577
- Puymirat, E., Simon, T., Cayla, G., Cottin, Y., Elbaz, M., Coste, P., Lemesle, G., Motreff, P., Popovic, B., Khalife, K., Labeque, J. N., Perret, T., Le Ray, C., Orion, L., Jouve, B., Blanchard, D., Peycher, P., Silvain, J., Steg, P. G., Goldstein, P., Gueret, P., Belle, L., Aissaoui, N., Ferrieres, J., Schiele, F., Danchin, N., Usik, U., & investigators, F.-M. (2017). Acute Myocardial Infarction: Changes in Patient Characteristics, Management, and 6-Month Outcomes Over a Period of 20 Years in the FAST-MI Program (French Registry of Acute ST-Elevation or Non-ST-Elevation Myocardial Infarction) 1995 to 2015. *Circulation*, 136(20), 1908-1919. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030798
- Puymirat, E., Simon, T., Steg, P. G., Schiele, F., Guéret, P., Blanchard, D., Khalife, K., Goldstein, P., Cattan, S., Vaur, L., Cambou, J.-P., Ferrières, J., Danchin, N., USIC, U., & FAST MI Investigators, f. t. (2012). Association of Changes in Clinical Characteristics and Management With Improvement in Survival Among Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction. *JAMA*, 308(10), 998-1006. doi:10.1001/2012.jama.11348
- Qiagen. (2009). QIAzol Handbook. Retrieved from <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=61c3ddb-d-69c1-4b68-ab89-a428f14a9245&lang=en>
- Qiagen. (2019). RNeasy Mini Handbook. Retrieved from <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en>
- Ridker, P. M., Everett, B. M., Thuren, T., MacFadyen, J. G., Chang, W. H., Ballantyne, C., Fonseca, F., Nicolau, J., Koenig, W., Anker, S. D., Kastelein, J. J. P., Cornel, J. H., Pais, P., Pella, D., Genest, J., Cifkova, R., Lorenzatti, A., Forster, T., Kobalava, Z., Vida-Simiti, L., Flather, M., Shimokawa, H., Ogawa, H., Dellborg, M., Rossi, P. R. F., Troquay, R. P. T., Libby, P., & Glynn, R. J. (2017).

- Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *New England Journal of Medicine*, 377(12), 1119-1131. doi:10.1056/NEJMoa1707914
- Sager, H. B., Heidt, T., Hulsmans, M., Dutta, P., Courties, G., Sebas, M., Wojtkiewicz, G. R., Tricot, B., Iwamoto, Y., Sun, Y., Weissleder, R., Libby, P., Swirski, F. K., & Nahrendorf, M. (2015). Targeting Interleukin-1beta Reduces Leukocyte Production After Acute Myocardial Infarction. *Circulation*, 132(20), 1880-1890. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016160
- Sager, H. B., Hulsmans, M., Lavine, K. J., Moreira, M. B., Heidt, T., Courties, G., Sun, Y., Iwamoto, Y., Tricot, B., Khan, O. F., Dahlman, J. E., Borodovsky, A., Fitzgerald, K., Anderson, D. G., Weissleder, R., Libby, P., Swirski, F. K., & Nahrendorf, M. (2016). Proliferation and Recruitment Contribute to Myocardial Macrophage Expansion in Chronic Heart Failure. *Circulation Research*, 119(7), 853-864. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309001
- Sager, H. B., Kessler, T., & Schunkert, H. (2017). Monocytes and macrophages in cardiac injury and repair. *Journal of Thoracic Disease*, 9(Suppl 1), S30-S35. doi:10.21037/jtd.2016.11.17
- Sager, H. B., & Nahrendorf, M. (2016). Inflammation: a trigger for acute coronary syndrome. *Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 60(3), 185-193. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27273431>
- Saxena, A., Chen, W., Su, Y., Rai, V., Uche, O. U., Li, N., & Frangogiannis, N. G. (2013). IL-1 induces proinflammatory leukocyte infiltration and regulates fibroblast phenotype in the infarcted myocardium. *Journal of Immunology*, 191(9), 4838-4848. doi:10.4049/jimmunol.1300725
- Schenkel, A. R., Mamdouh, Z., Chen, X., Liebman, R. M., & Muller, W. A. (2002). CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nature Immunology*, 3(2), 143-150. doi:10.1038/ni749
- Schenkel, A. R., Mamdouh, Z., & Muller, W. A. (2004). Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nature Immunology*, 5(4), 393-400. doi:10.1038/ni1051
- Schmidt, M., Kreutz, M., Loffler, G., Scholmerich, J., & Straub, R. H. (2000). Conversion of dehydroepiandrosterone to downstream steroid hormones in macrophages. *Journal of Endocrinology*, 164(2), 161-169. doi:10.1677/joe.0.1640161
- Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S. E., Pollard, J. W., Frampton, J., Liu, K. J., & Geissmann, F. (2012). A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science*, 336(6077), 86-90. doi:10.1126/science.1219179
- Serbina, N. V., & Pamer, E. G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature Immunology*, 7(3), 311-317. doi:10.1038/ni1309
- Shan, K., Jiang, Q., Wang, X. Q., Wang, Y. N., Yang, H., Yao, M. D., Liu, C., Li, X. M., Yao, J., Liu, B., Zhang, Y. Y., J, Y., & Yan, B. (2016). Role of long non-coding RNA-RNCR3 in atherosclerosis-related vascular dysfunction. *Cell Death & Disease*, 7(6), e2248. doi:10.1038/cddis.2016.145
- Shi, C., Jia, T., Mendez-Ferrer, S., Hohl, T. M., Serbina, N. V., Lipuma, L., Leiner, I., Li, M. O., Frenette, P. S., & Pamer, E. G. (2011). Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to

- circulating toll-like receptor ligands. *Immunity*, 34(4), 590-601. doi:10.1016/j.immuni.2011.02.016
- Soehnlein, O., & Libby, P. (2021). Targeting inflammation in atherosclerosis - from experimental insights to the clinic. *Nat Rev Drug Discov*. doi:10.1038/s41573-021-00198-1
- Soehnlein, O., & Lindbom, L. (2010). Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature Reviews: Immunology*, 10(6), 427-439. doi:10.1038/nri2779
- Srikanth, S., & Ambrose, J. A. (2012). Pathophysiology of coronary thrombus formation and adverse consequences of thrombus during PCI. *Current Cardiology Reviews*, 8(3), 168-176. doi:10.2174/157340312803217247
- Stähli, B. E., Gebhard, C., Duchatelle, V., Cournoyer, D., Petroni, T., Tanguay, J. F., Robb, S., Mann, J., Guertin, M. C., Wright, R. S., P, L. L. A., & Tardif, J. C. (2016). Effects of the P-Selectin Antagonist Inclacumab on Myocardial Damage After Percutaneous Coronary Intervention According to Timing of Infusion: Insights From the SELECT-ACS Trial. *J Am Heart Assoc*, 5(11). doi:10.1161/jaha.116.004255
- Statistisches Bundesamt. (2020, 13.11.2020). Todesursachenstatistik 2018. Retrieved from <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?operation=previous&levelindex=2&step=2&titel=Ergebnis&levelid=1605299368752&acceptscookies=false#abreadcrumb>
- Sutton, M. G. S. J., & Sharpe, N. (2000). Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circulation*, 101(25), 2981-2988. doi:doi:10.1161/01.CIR.101.25.2981
- Swirski, F. K., & Nahrendorf, M. (2013). Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science*, 339(6116), 161-166. doi:10.1126/science.1230719
- Tan, S. C., & Yiap, B. C. (2009). DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *J Biomed Biotechnol*, 2009, 574398. doi:10.1155/2009/574398
- Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., Chaitman, B. R., Bax, J. J., Morrow, D. A., White, H. D., & Group, E. S. D. (2018). Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *European Heart Journal*, 40(3), 237-269. doi:10.1093/eurheartj/ehy462
- Toufiq, M., Roelands, J., Alfaki, M., Syed Ahamed Kabeer, B., Saadaoui, M., Lakshmanan, A. P., Bangarusamy, D. K., Murugesan, S., Bedognetti, D., Hendrickx, W., Al Khodor, S., Terranegra, A., Rinchai, D., Chaussabel, D., & Garand, M. (2020). Annexin A3 in sepsis: novel perspectives from an exploration of public transcriptome data. *Immunology*, 161(4), 291-302. doi:10.1111/imm.13239
- Tsujioka, H., Imanishi, T., Ikejima, H., Kuroi, A., Takarada, S., Tanimoto, T., Kitabata, H., Okochi, K., Arita, Y., Ishibashi, K., Komukai, K., Kataiwa, H., Nakamura, N., Hirata, K., Tanaka, A., & Akasaka, T. (2009). Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 54(2), 130-138. doi:10.1016/j.jacc.2009.04.021
- Tsutsumi, N., Kimura, T., Arita, K., Ariyoshi, M., Ohnishi, H., Yamamoto, T., Zuo, X., Maenaka, K., Park, E. Y., Kondo, N., Shirakawa, M., Tochio, H., & Kato, Z.

- (2014). The structural basis for receptor recognition of human interleukin-18. *Nat Commun*, 5, 5340. doi:10.1038/ncomms6340
- Urban, P., Meredith, I. T., Abizaid, A., Pocock, S. J., Carrie, D., Naber, C., Lipiecki, J., Richardt, G., Iniguez, A., Brunel, P., Valdes-Chavarri, M., Garot, P., Talwar, S., Berland, J., Abdellaoui, M., Eberli, F., Oldroyd, K., Zambahari, R., Gregson, J., Greene, S., Stoll, H. P., Morice, M. C., & Investigators, L. F. (2015). Polymer-free Drug-Coated Coronary Stents in Patients at High Bleeding Risk. *New England Journal of Medicine*, 373(21), 2038-2047. doi:10.1056/NEJMoa1503943
- Valgimigli, M., Bueno, H., Byrne, R. A., Collet, J. P., Costa, F., Jeppsson, A., Juni, P., Kastrati, A., Kolh, P., Mauri, L., Montalescot, G., Neumann, F. J., Petricevic, M., Roffi, M., Steg, P. G., Windecker, S., Zamorano, J. L., Levine, G. N., Group, E. S. C. S. D., Guidelines, E. S. C. C. f. P., & Societies, E. S. C. N. C. (2018). 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS: The Task Force for dual antiplatelet therapy in coronary artery disease of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *European Heart Journal*, 39(3), 213-260. doi:10.1093/eurheartj/ehx419
- Valgimigli, M., Frigoli, E., Leonardi, S., Vranckx, P., Rothenbuhler, M., Tebaldi, M., Varbella, F., Calabro, P., Garducci, S., Rubartelli, P., Briguori, C., Ando, G., Ferrario, M., Limbruno, U., Garbo, R., Sganzerla, P., Russo, F., Nazzaro, M., Lupi, A., Cortese, B., Ausiello, A., Ierna, S., Esposito, G., Ferrante, G., Santarelli, A., Sardella, G., de Cesare, N., Tosi, P., van 't Hof, A., Omerovic, E., Brugaletta, S., Windecker, S., Heg, D., Juni, P., & Investigators, M. (2018). Radial versus femoral access and bivalirudin versus unfractionated heparin in invasively managed patients with acute coronary syndrome (MATRIX): final 1-year results of a multicentre, randomised controlled trial. *Lancet*, 392(10150), 835-848. doi:10.1016/S0140-6736(18)31714-8
- Vallieres, F., & Girard, D. (2017). Mechanism involved in interleukin-21-induced phagocytosis in human monocytes and macrophages. *Clinical and Experimental Immunology*, 187(2), 294-303. doi:10.1111/cei.12886
- van der Laan, A. M., Hirsch, A., Robbers, L. F., Nijveldt, R., Lommerse, I., Delewi, R., van der Vleuten, P. A., Biemond, B. J., Zwaginga, J. J., van der Giessen, W. J., Zijlstra, F., van Rossum, A. C., Voermans, C., van der Schoot, C. E., & Piek, J. J. (2012). A proinflammatory monocyte response is associated with myocardial injury and impaired functional outcome in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: monocytes and myocardial infarction. *American Heart Journal*, 163(1), 57-65 e52. doi:10.1016/j.ahj.2011.09.002
- van der Laan, A. M., ter Horst, E. N., Delewi, R., Begieneman, M. P. V., Krijnen, P. A. J., Hirsch, A., Lavaei, M., Nahrendorf, M., Horrevoets, A. J., Niessen, H. W. M., & Piek, J. J. (2013). Monocyte subset accumulation in the human heart following acute myocardial infarction and the role of the spleen as monocyte reservoir. *European Heart Journal*, 35(6), 376-385. doi:10.1093/eurheartj/eh331
- Voets, T., Nilius, B., Hoefs, S., van der Kemp, A. W., Droogmans, G., Bindels, R. J., & Hoenderop, J. G. (2004). TRPM6 forms the Mg²⁺ influx channel involved in intestinal and renal Mg²⁺ absorption. *Journal of Biological Chemistry*, 279(1), 19-25. doi:10.1074/jbc.M311201200

- Wang, K., Wen, S., Jiao, J., Tang, T., Zhao, X., Zhang, M., Lv, B., Lu, Y., Zhou, X., Li, J., Nie, S., Liao, Y., Wang, Q., Tu, X., Mallat, Z., Xia, N., & Cheng, X. (2018). IL-21 promotes myocardial ischaemia/reperfusion injury through the modulation of neutrophil infiltration. *British Journal of Pharmacology*, *175*(8), 1329-1343. doi:10.1111/bph.13781
- Wang, Y. (2019). Comprehensive long non-coding RNA expression profiling by RNA sequencing reveals potential biomarkers for acute myeloid leukemia risk. *Cancer Biomarkers*, *26*(1), 93-108. doi:10.3233/CBM-190215
- Wang, Y., Dai, X., Liu, Y., Li, J., Liu, Z., Yin, P., Chen, J., Wang, Y., Wang, N., & Zhang, P. (2016). MTUS1 silencing promotes E-selectin production through p38 MAPK-dependent CREB ubiquitination in endothelial cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *101*, 1-10. doi:10.1016/j.yjmcc.2016.10.012
- Watanabe, M., Ohno, S., & Wachi, H. (2017). Effect of beta-agonist on the dexamethasone-induced expression of aromatase by the human monocyte cells. *Endocr Connect*, *6*(2), 82-88. doi:10.1530/EC-16-0099
- Weir, R. A., McMurray, J. J., & Velazquez, E. J. (2006). Epidemiology of heart failure and left ventricular systolic dysfunction after acute myocardial infarction: prevalence, clinical characteristics, and prognostic importance. *American Journal of Cardiology*, *97*(10A), 13F-25F. doi:10.1016/j.amjcard.2006.03.005
- Weng, X., Zhao, H., Guan, Q., Shi, G., Feng, S., Gleave, M. E., Nguan, C. C., & Du, C. (2021). Clusterin regulates macrophage expansion, polarization and phagocytic activity in response to inflammation in the kidneys. *Immunology and Cell Biology*, *99*(3), 274-287. doi:10.1111/imcb.12405
- Wong, K. L., Tai, J. J., Wong, W. C., Han, H., Sem, X., Yeap, W. H., Kourilsky, P., & Wong, S. C. (2011). Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*, *118*(5), e16-31. doi:10.1182/blood-2010-12-326355
- Wuensch, T., Thilo, F., Krueger, K., Scholze, A., Ristow, M., & Tepel, M. (2010). High glucose-induced oxidative stress increases transient receptor potential channel expression in human monocytes. *Diabetes*, *59*(4), 844-849. doi:10.2337/db09-1100
- Yasukawa, M., Ishida, K., Yuge, Y., Hanaoka, M., Minami, Y., Ogawa, M., Sasaki, T., Saito, M., & Tsuji, T. (2013). Dpysl4 is involved in tooth germ morphogenesis through growth regulation, polarization and differentiation of dental epithelial cells. *International Journal of Biological Sciences*, *9*(4), 382-390. doi:10.7150/ijbs.5510
- Yeh, R. W., Sidney, S., Chandra, M., Sorel, M., Selby, J. V., & Go, A. S. (2010). Population Trends in the Incidence and Outcomes of Acute Myocardial Infarction. *New England Journal of Medicine*, *362*(23), 2155-2165. doi:10.1056/NEJMoa0908610
- Yona, S., Kim, K. W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guillemins, M., Misharin, A., Hume, D. A., Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E., & Jung, S. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*, *38*(1), 79-91. doi:10.1016/j.immuni.2012.12.001
- Zähringer, H. (2020). PRODUKTÜBERSICHT: ZELLISOLIERUNGS-KITS. *Laborjournal*, *3/2020*, 52-55. Retrieved from https://www.laborjournal.de/epaper/LJ_20_03.pdf

- Zhao, Q., Wu, K., Li, N., Li, Z., & Jin, F. (2018). Identification of potentially relevant genes for myocardial infarction using RNA sequencing data analysis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *15*(2), 1456-1464. doi:10.3892/etm.2017.5580
- Zhou, X., Liu, X. L., Ji, W. J., Liu, J. X., Guo, Z. Z., Ren, D., Ma, Y. Q., Zeng, S., Xu, Z. W., Li, H. X., Wang, P. P., Zhang, Z., Li, Y. M., Benefield, B. C., Zawada, A. M., Thorp, E. B., Lee, D. C., & Heine, G. H. (2016). The Kinetics of Circulating Monocyte Subsets and Monocyte-Platelet Aggregates in the Acute Phase of ST-Elevation Myocardial Infarction: Associations with 2-Year Cardiovascular Events. *Medicine (Baltimore)*, *95*(18), e3466. doi:10.1097/MD.0000000000003466
- Zuern, C., Krenacs, L., Starke, S., Heimrich, J., Palmetshofer, A., Holtmann, B., Sendtner, M., Fischer, T., Galle, J., Wanner, C., & Seibold, S. (2012). Microtubule associated tumor suppressor 1 deficient mice develop spontaneous heart hypertrophy and SLE-like lymphoproliferative disease. *International Journal of Oncology*, *40*(4), 1079-1088. doi:10.3892/ijo.2011.1311

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen, die zum erfolgreichen Abschluss dieser Dissertation beigetragen haben, herzlich bedanken.

Zunächst möchte ich mich bei Professor Heribert Schunkert bedanken, dass ich meine Dissertation am Deutschen Herzzentrum München unter seiner Leitung anfertigen konnte. Die hervorragenden Voraussetzungen für die notwendige Forschungsarbeit und das exzellente wissenschaftliche Netzwerk haben maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Professor Hendrik Sager für die anhaltende hervorragende Unterstützung meiner Dissertation. Seine motivierende und konstruktive Betreuung meines Projekts, sein wissenschaftlicher Einfluss und seine wertvolle Vernetzung ermöglichten mir maßgeblich den Abschluss dieser Arbeit. Außerdem möchte ich mich bei Professor Lars Mägdefessel für die motivierende und wertvolle Mitbetreuung dieser Dissertation als Mentor bedanken.

Ein weiterer besonderer Dank gilt Julia Hinterdobler für die vielen Korrekturen meiner Arbeit und für die zahlreichen bereichernden fachlichen und methodischen Anregungen. Mein Dank gilt auch Dr. Anna-Lena Steinsiek und allen anderen aktuellen und früheren Mitarbeitenden der AG Sager und AG Schunkert, die über die Jahre als Ansprechpersonen im Labor und als Freunde stets mit guten Ratschlägen, wertvollem Feedback und unerlässlicher tatkräftiger Unterstützung diese Arbeit ermöglicht haben.

Darüber hinaus möchte ich der Deutschen Herzstiftung e.V. für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit mit dem Kaltenbach-Doktorandenstipendium danken.

Abschließend möchte ich meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Freund für die unermüdliche bedingungslose und liebevolle Hilfe und Motivation in jeder noch so schwierigen Phase meiner Dissertation danken. Ohne diesen Rückhalt hätte ich diese Arbeit niemals abschließen können.