

**Beurteilung des Aktivierungszustandes zirkulierender Monozyten anhand einer
Oberflächenmarker-Analyse bei NSTEMI-Patienten**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Annkathrin zur Heiden
aus Frankfurt am Main

Gießen (2020)

Aus dem Campus Kerckhoff der Justus-Liebig-Universität Gießen
und ihres Fachbereichs Medizin

Gutachter: PD Dr. Christian Troidl

Gutachter: Prof. Dr. Ralph Schermuly

Tag der Disputation: 04. Mai 2021

Meinen lieben Eltern

*„Es muss von Herzen kommen, was auf Herzen wirken soll“
- Johann Wolfgang von Goethe*

Inhaltsverzeichnis

<u>EINLEITUNG.....</u>	6
DEFINITION UND KLASSIFIZIERUNG DES AKUTEN KORONARSYNDROMS (ACS)	6
PATHOGENESE DES ACS	9
DIAGNOSTIK DES ACS	11
BIOMARKER IN DER DIAGNOSTIK DES AKUTEN ACS	13
RELEVANZ DER MONOZYTEN FÜR DAS ACS	18
FRAGESTELLUNG/ZIELSETZUNG	23
<u>MATERIAL & METHODEN</u>	24
MATERIAL	24
REAGENZIEN	24
ANTIKÖRPER.....	25
GERÄTELISTE.....	26
GEBRAUCHSMATERIALIEN	26
SPEZIELLE VERBRAUCHSMATERIALIEN: BLUTENTNAHME.....	27
STUDIENPOPULATION	28
EIN- & AUSSCHLUSSKRITERIEN.....	28
ETHIKVOTUM	29
DATENSCHUTZ.....	29
BLUTENTNAHME.....	30
ISOLATION DER “PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS”	31
DURCHFLUSSZYTOMETRIE	33
EDTA-VOLLBLUTANALYSE	37
OBERFLÄCHENMARKERANALYSE	41
BIOSTATISTISCHE AUSWERTUNG	45
BIOINFORMATISCHE AUSWERTUNG.....	47
<u>ERGEBNISSE.....</u>	49
PATIENTENCHARAKTERISTIKA.....	49
VOLLBLUTANALYSEN.....	51
BIOSTATISTISCHE AUSWERTUNG DER OBERFLÄCHENMARKERANALYSE	55

BIOINFORMATISCHE AUSWERTUNG DER OBERFLÄCHENMARKERANALYSE	58
VERGLEICH DER ERGEBNISSE DER VERSCHIEDENEN AUSWERTUNGSMETHODEN	67
<u>DISKUSSION</u>	<u>68</u>
PRAKTIKABILITÄT DER METHODE	70
MONOZYTENSUBPOPULATIONEN	79
BEDEUTUNG/SCHLUSSFOLGERUNG.....	95
LIMITATIONEN.....	97
AUSBLICK.....	98
<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>100</u>
<u>SUMMARY.....</u>	<u>101</u>
<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</u>	<u>102</u>
<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</u>	<u>103</u>
<u>NUTZUNGSGENEHMIGUNG FÜR ABBILDUNGEN AUS FREMDQUELLEN.....</u>	<u>108</u>
<u>TABELLENVERZEICHNIS</u>	<u>111</u>
<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>113</u>
<u>ANHANG.....</u>	<u>127</u>
<u>PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....</u>	<u>202</u>
<u>ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION.....</u>	<u>203</u>
<u>DANKSAGUNG</u>	<u>204</u>

Einleitung

Definition und Klassifizierung des akuten Koronarsyndroms (ACS)

In Deutschland führen kardiovaskuläre Ereignisse und Erkrankungen mit ca. 40% die Liste der häufigsten Todesursachen an (Statistisches Bundesamt, 2015). Neben der koronaren Herzkrankheit (KHK) ist auch der akute Myokardinfarkt zu nennen. Die Situation in Deutschland ist repräsentativ für die der westlichen Industrienationen, in denen kardiovaskuläre Erkrankungen einen Anteil von 50% an der Gesamtzahl der Todesursachen ausmachen (WHO, 2013). Darüber hinaus wird erwartet, dass die kardiovaskuläre Erkrankungen ab 2020 auch in den Schwellenländern zu den führenden Todesursachen zählen werden (Achenbach and Hamm, 2012).

Die Lebenszeitprävalenz für das Auftreten einer KHK ist für Männer doppelt so hoch wie für Frauen und beläuft sich auf 30%. Bei Frauen liegt sie bei 15%, wobei die Inzidenz mit dem Alter bei beiden Geschlechtern steigt. Dabei manifestiert sich eine KHK initial in der Hälfte der Fälle in Form eines akuten Koronarsyndroms (ACS). In 40% der Fälle tritt eine Angina pectoris auf und in bis zu 10% der Fälle versterben die Patienten akut an einem plötzlichen Herztod (Herold, 2015a).

Das klassische Leitsymptom des ACS ist der retrosternale Brustschmerz. Dieser wird von Patienten als Enge- bzw. Druckgefühl im Bereich des Thorax wahrgenommen. Die jährliche Prävalenz an Patienten, die aufgrund von Brustschmerzen einen Arzt konsultieren, beläuft sich in Deutschland auf 1 – 2%. Bei diesem Kollektiv kommt in der Mehrzahl der Fälle eine extrakardiale Ursache als Auslöser in Betracht. Lediglich in 20 – 30% der Fälle, in denen sich Patienten mit Brustschmerz in der Notaufnahme vorstellen, liegt ein ACS vor (Leick et al., 2011).

Bei dem ACS werden folgende zwei Gruppierungen unterschieden:

1. ST-Hebungsinfarkt (STEMI)

2. Akutes Koronarsyndrom ohne ST-Hebung (NSTEMI-ACS): Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI) und instabile Angina pectoris (IAP)

Von den 20 – 30%, die sich mit einem akuten kardial bedingten Brustschmerzereignis in der Notaufnahme vorstellen, handelt es sich in 5 – 10% der Fälle um einen STEMI, in 15 – 20% der Fälle um einen NSTEMI und in 10% der Fälle um eine instabile Angina pectoris (Roffi et al., 2015). Im weiteren Verlauf liegt das Hauptaugenmerk auf dem NSTEMI. Der STEMI wird aufgrund der differentialdiagnostischen Relevanz kurz beleuchtet.

Bei einem STEMI handelt es sich definitionsgemäß um einen Myokardinfarkt, der im Elektrokardiogramm (EKG) mit einer Elevation der ST-Strecke einhergeht, welche eine Persistenz von mindestens 20 Minuten nicht unterschreitet (Roffi et al., 2015). Dabei besteht ein totaler Verschluss eines oder mehrerer Koronargefäße, sodass Kardiomyozyten aufgrund einer akuten myokardialen Ischämie nekrotisch werden. Klinisch präsentiert sich der Patient mit entweder einem neu aufgetretenen, einem prolongierten oder einem intensivierten Angina-Pectoris-Anfall. Antianginosa (Nitrate, Calcium-Antagonisten etc.) führen zu keiner deutlichen Verbesserung der Symptomatik. Das klinische Erscheinungsbild stellt in Zusammenschau mit dem EKG-Befund einen Notfall dar, der eine sofortige Therapie erforderlich macht. Ziel ist dabei die Reperfusion des betroffenen Gefäßes.

Im Gegensatz zu diesen eindeutigen Kriterien zeichnet sich das NSTEMI-ACS durch eine Vielzahl von Veränderungen der ST-Strecke im EKG aus. Selbst bei einem physiologischen EKG-Befund kann ein NSTEMI-ACS nicht immer sicher ausgeschlossen werden. Die Variationen der ST-Strecken schließen folgende Erscheinungen ein: Sehr häufig sind dynamische Veränderungen der ST-Strecke, die eine Senkung umfassen können. Darüber hinaus kann es zu einer T-Wellen Negativierung kommen. Die beiden EKG-Veränderungen sind Zeichen für das Vorliegen einer Ischämie. Dabei ist neben der Anzahl der Ableitungen mit ST-Strecken Senkungen auch deren Ausmaß von großer Bedeutung, da dieses unmittelbar mit der Ausdehnung und der Schwere der Ischämie

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

korreliert (Achenbach and Hamm, 2012). Nichtsdestotrotz weist das EKG in ca. ein Drittel der Fälle keine Pathologien auf.

Neben dem EKG bedarf es jedoch weiterer Diagnostik, um das NSTEMI-ACS weiter zu differenzieren. Hierbei hilft die Bestimmung von kardialen Troponin. Kommt es im Verlauf nach einem kardialen Ereignis zu einem dynamischen Anstieg des kardialen Troponins ohne wesentliche ST-Strecken-Hebung, handelt es sich um einen Nicht-ST-Hebungsinfarkt. Ursächlich ist in den meisten Fällen ein inkompletter Verschluss eines Koronargefäßes. Bei einer IAP hingegen kommt es zu keinem Anstieg des Troponins über den Schwellenwert hinaus (Schofer et al., 2014).

Das klinische Bild eines NSTEMI-Patienten ist oftmals genauso variabel wie dessen EKG. Es reicht von einem weitestgehend beschwerdefreien Patienten bis zu Patienten mit einer akuten kardialen Dekompensation, dessen Folge eine hämodynamische Instabilität sein kann. Dazwischen existieren vielfältige atypischen Symptome: Dazu zählen u.a. eine stark ausgeprägte vegetative Symptomatik (Palpitationen, Herzrasen, innere Unruhe, Übelkeit, Schwindel, etc), die Ausstrahlung von Schmerzen in das Epigastrium oder Synkopen. Kombinationen dieser Symptome sind insbesondere bei sehr jungen (25 – 40 Jahre) als auch sehr alten Patienten (>75 Jahre) zu finden (Canto et al., 2002). Ebenso wurde eine zunehmend atypische Symptomatik bei Frauen, niereninsuffizienten und dementen Patienten beobachtet (MacKay et al., 2011). Schließlich handelt es sich bei 20% der Infarkte um stumme Infarkte ohne jegliche Symptomatik. Diese treten insbesondere bei Patienten mit Polyneuropathien im Rahmen eines Diabetes mellitus auf (Herold, 2015b). Aufgrund der hohen Variabilität spielt die individuelle Risikostratifizierung insbesondere bei einem NSTEMI eine entscheidende Rolle bei der weiteren Therapieplanung. Therapeutische Maßnahmen bewegen sich dementsprechend zwischen den Extremen einer zeitnahen invasiven Intervention bis hin zu einem konservativen Prozedere.

Bei dem hier besprochenen ACS wurde eine Plaqueruptur als ursächlich angesehen. Diese stellt im Rahmen der klinischen Klassifikation der verschiedenen Infarkttypen lediglich einen Typus dar. Bei dem hier beschriebenen Typ I handelt es sich um den am häufigsten

auftretenden Typus. Der Vollständigkeit halber sind in Tabelle 1 weitere Ursachen für einen Myokardinfarkt aufgeführt. (Schofer et al., 2014).

Infarkttyp	Ursache
Typ I	Ischämisches Ereignis, das zu einem spontanen MI führt (Plaqueruptur, Dissektion etc.)
Typ II	Bedingt durch eine Ischämie, die zu einem verminderten Sauerstoffangebot bzw. zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch führt (Koronarspasmus, Anämie, Koronarembolie, Arrhythmie etc.)
Typ III	Plötzlicher Herztod
Typ IV	a) MI im Rahmen einer minimal invasiven, kardialen Intervention b) MI als Folge einer Stentthrombose
Typ V	Myokardinfarkt im Verlauf einer CABG

Tabelle 1: Klassifikation der verschiedenen MI-Typen (Paiva et al., 2015)

Pathogenese des ACS

Die fortschreitende Atherosklerose der Koronarien im Rahmen einer KHK ist die häufigste Ursache für einen Myokardinfarkt (Leick et al., 2011). Bei einer Atherosklerose handelt es sich um einen chronischen, inflammatorischen Prozess des Endothels (Libby, 2002). Initial kommt es im Bereich des Endothels zu einer Dysfunktion. Dadurch ist dieses adhäsiver, sodass sich vermehrt Zellen an der Gefäßwand ablagern. Neben Thrombozyten sind hier vor allem Monozyten zu nennen. Letztere verlassen das Gefäßsystem, wandern in die Tunica media, entwickeln sich zu Makrophagen und sind wesentlich an der Entstehung von Plaques beteiligt.

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

In Abhängigkeit von der Anzahl der stenosierte Gefäße handelt es sich um eine 1-, 2- bzw. 3-Gefäßerkrankung. Des Weiteren wird der Grad der Stenose beurteilt. Eine signifikante Stenose besteht bei einer Verminderung des Koronardurchmessers von 50 – 74%. Besteht eine Obstruktion > 75%, wird diese als kritische Stenose bezeichnet (Herold, 2015a). Der Grad der Stenose entscheidet über das Ausmaß der Koronarinsuffizienz distal der Engstelle. Wenn es im Verlauf einer Atherosklerose der Koronarien zu einer Plaqueruptur kommt, kann der sich bildende Thrombus akut ein Koronargefäß verschließen und zu einer Nekrose der Kardiomyozyten führen.

Das Risiko einer Plaqueruptur im Rahmen einer Atherosklerose wird durch bestimmte auslösende Ursachen begünstigt. Dazu zählen neben einer plötzlichen Kraftanstrengung auch Stress-Situationen mit immensen Blutdruckschwankungen. Ein erhöhtes Risiko von bis zu 20% liegt außerdem bei einer instabilen Angina pectoris. Darüber hinaus lässt sich aufgrund der zirkadianen Rhythmik und der damit verbundenen Zunahme der Gerinnungsaktivität insbesondere in den Morgenstunden (6 – 12 Uhr) die erhöhte Inzidenz (bis zu 40%) von Infarkten erklären (Herold, 2015a).

Es lassen sich spezifische Risikofaktoren identifizieren, die den Progress der Atherosklerose begünstigen. Bereits 1978 konnten im Rahmen der großangelegten, prospektiven PROCAM-Studie mit insgesamt 50.000 Probanden im Alter von 16 – 78 folgende relevante Merkmale charakterisiert werden: Neben dem Lebensalter sind das Geschlecht, der Lipidmetabolismus (LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin), die Konzentration der Triglyceride sowie der Konsum von Tabak, der systolische Blutdruck, Komorbiditäten wie Diabetes mellitus und eine positive Familienanamnese bezogen auf das frühzeitig Auftreten von Myokardinfarkten bei Verwandten 1. Grades zu nennen (Gefäßerkrankungen, 1979). Darüber hinaus ist der Body-Mass-Index (BMI) von besonderem Interesse für die Risikostratifizierung. Als Konsequenz der besagten Studie wurde der interaktive PROCAM-Risiko-Score (<http://www.assmann-stiftung.de/procam-studie/procam-tests/>) konzipiert, mit dessen Hilfe das individuelle kardiale Risiko berechnet werden kann.

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Busse et al. konnte nachweisen, dass der Risikofaktor männliches Geschlecht einen direkten Einfluss auf weitere Risikofaktoren hat. Bei Frauen tritt der Risikofaktor Gesamtcholesterin seltener auf als bei Männern (50% vs. 53%). Das männliche Geschlecht beeinflusst negativ den systolischen Blutdruck (43% vs. 53%). Am größten ist der Unterschied für den Risikofaktor BMI. Dort beträgt der Einfluss des Geschlechts auf den zuvor genannten Risikofaktor mehr als 20% (Zentrum, 2005).

Die deutsche Gefäßliga e.V. hat darüber hinaus eine weitere Klassifikation der Risikofaktoren vorgenommen. Zu den Risikofaktoren 1. Ordnung zählen neben den Cholesterinwerten, hoher Blutdruck, Stoffwechselstörungen auch der Konsum von Tabak. Wohingegen Übergewicht, Stress und der Mangel an Bewegung zu den Risikofaktoren 2. Ordnung zählen. Die Klassifikation unterscheidet sich insbesondere hinsichtlich ihres Ausmaßes der Gefährdung. So sind Patienten, die lediglich einen Risikofaktor der 1. Ordnung aufweisen, bereits viermal so stark gefährdet wie eine Person ohne Risikofaktoren (Zentrum, 2005).

Diagnostik des ACS

Eine zügige Diagnostik ist bei Verdacht auf ein ACS unabwendbar und im Wesentlichen sowohl für die kurzfristige als auch für die langfristige Prognose entscheidend. Dabei fordert die Leitlinie „*Management of acute coronary syndromes in patients without persistent ST-segment elevation*“ die Durchführung und die qualifizierte Beurteilung eines 12-Kanal-EKGs innerhalb der ersten 10 Minuten nach dem ersten medizinischen Kontakt. Dabei ist bereits eine Differenzierung zwischen einem STEMI und einem NSTEMI-ACS möglich (Denmark et al., 2019). Ein 12-Kanal-EKG, das bereits in der präklinischen Phase angefertigt wird, kann die Zeit zwischen der Ankunft im Krankenhaus bis zur endgültigen Reperfusionstherapie um bis zu 60 Minuten verkürzen (Brainard et al., 2005).

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Bei stabilen Patienten ohne Risikomerkmale wie dynamische ST-Streckenveränderungen und/oder relevante Komorbiditäten bietet sich als weiteres nicht-invasives, bildgebendes Verfahren die transthorakale Echokardiographie (TTE), ein kardiales MRT oder ein Multidetektoren-CT (MDCT) an. Die ersten beiden Methoden ermöglichen eine dynamische Evaluation des Herzens. Letztere macht eine Aussage über die anatomische Beschaffenheit. Diese Methoden sind alle zeitaufwendiger als ein 12-Kanal-EKG.

Weiterhin sollte eine ärztliche Anamnese erhoben werden, die neben der Akutanamnese auch die vegetative Anamnese, die Vorerkrankungen und die Medikamentenanamnese sowie die Familienanamnese erfragt. Ziel ist dabei eine Risikostratifizierung mittels des GRACE-Scores. Dieser Score bietet die genaueste Risikostratifizierung sowohl bei der Aufnahme, bei der Entlassung als auch ein Jahr nach einem Myocardinfarkt und ist somit wegweisend für die folgenden Therapieentscheidungen (Roffi et al., 2015).

Eine fokussierte körperliche Untersuchung ist häufig nicht wegweisend, sie sollte jedoch dazu genutzt werden, nicht kardiale Ursachen auszuschließen. Die Anzahl der möglichen, extrakardialen Differentialdiagnosen ist vielfältig. Zu den vital-bedrohlichen Differentialdiagnosen gehören folgende: Aortendissektion, Lungenembolie, Pneumothorax, Ösophagusruptur (Hamm et al., 2005). Neben der naheliegenden Untersuchung des Herzens und der Lunge sollte auch das Abdomen und die Extremitäten untersucht werden. Bei dem Herzen ist im Besonderen auf Herzgeräusche zu achten. Im Bereich der Lunge sind neu aufgetretene, feuchte Rasselgeräusche verdächtig für das Vorliegen einer pulmonalen Stauung im Rahmen einer akuten Linksherzinsuffizienz. Des Weiteren kann die Inspektion der Extremitäten Aufschluss über eine akute kardiale Dekompensation liefern. Da eine atypische Symptomatik im Bereich des Epigastriums nicht ungewöhnlich ist, sollte dieses ebenfalls symptomorientiert untersucht werden. Abschließend sollte eine orientierende neurologische Untersuchung durchgeführt werden (Leick et al., 2011).

Biomarker in der Diagnostik des akuten ACS

Neben der klinischen Beurteilung und der zeitnahen Auswertung eines 12-Kanal-EKGs wird die Diagnose eines NSTEMI-ACS durch die Bestimmung von Biomarkern vervollständigt. Dabei zeichnen sich Biomarker allgemein durch bestimmte Kriterien aus, wobei insbesondere die Spezifität und Sensitivität von besonderer Relevanz sind. Weitere Eigenschaften von Biomarkern sind im Folgenden aufgelistet (Rosenblatt et al., 2012):

- frühen, gleichmäßigen, kontinuierlichen Freisetzung (Kinetik)
- konstante Clearance
- Quantitative Analyse
- schnelle und kostengünstige Bestimmung
- Konsequenz für das weitere klinische Vorgehen und/oder prognostische Relevanz

Unter Berücksichtigung dieser Kriterien existieren verschiedene kardiale Biomarker unterschiedlichsten Ursprungs. Einen Überblick über die verschiedenen Mechanismen, aus denen sich ihre Eignung als Biomarker ableitet, ist in Abbildung 1 dargestellt. Neben dem kardialen Troponin existieren eine Reihe weiterer Biomarker, von denen lediglich CK-MB und Copeptin in die Empfehlungen der ESC Leitlinie „*Management of acute coronary syndromes in patients without persistent ST-segment elevation*“ aufgenommen wurden. Die Freisetzungskinetik der genannten Biomarker ist in Abbildung 2 dargestellt. Im Folgenden wird nun auf einzelne Biomarker eingegangen.

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

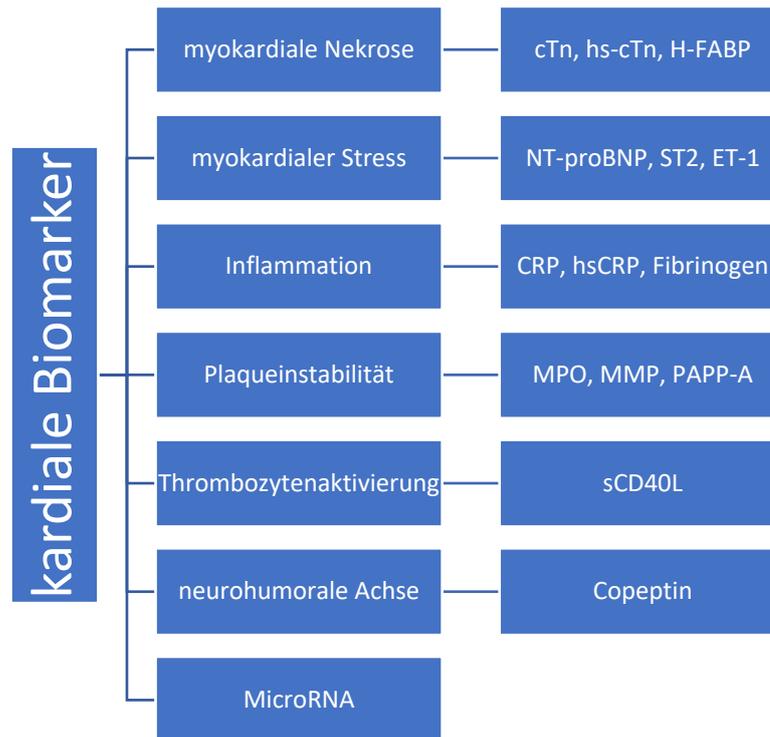


Abbildung 1: Aufteilung der kardialen Biomarkern nach pathophysiologischen Gesichtspunkten (cTn: cardiac troponin; hs-cTn: high sensitivity cardiac troponin; NT-proBNP: n-terminal-pro-brain natriuretic peptide; ST2: ; ET-1: Endothelin-1; CRP: C-reactive peptide; hs-CRP: high sensitivity C-reactive peptide, MPO: myeloperoxidase; MMP: matrix metalloprotease; PaPP-A: pregnancy-associated plasma protein-A; sCD40L: soluble CD40 ligand) (Wang et al., 2017), (Liebetrau et al., 2015a)

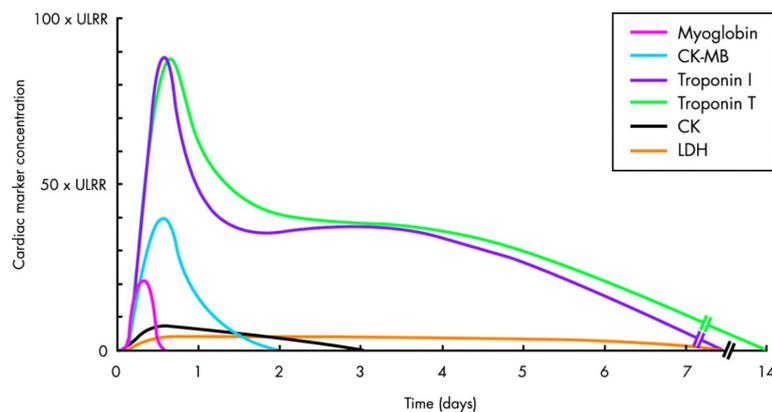


Abbildung 2: Freisetzungskinetik verschiedener kardialer Biomarker über die Zeit in Abhängigkeit von den Referenzbereichen (ULRR: upper limit of reference range) (French and White, 2004)

Troponin

Troponin ist ein Proteinkomplex, der an der Regulation der Myozytenkontraktion beteiligt ist. Demnach liegt der Proteinkomplex unter physiologischen Bedingungen ausschließlich intrazellulär vor. Man unterscheidet insgesamt drei Untereinheiten des Troponins: Troponin I (cTNI) besitzt eine inhibitorische Komponente und verhindert als solche die Bindung von Myosin an Aktin. Troponin T (cTNT) führt zu einer Bindung an Myosin und Troponin C (TNC) fungiert als Calciumsensor. Die ersten beiden Untereinheiten sind kardiospezifisch, da sie lediglich in Kardiomyozyten exprimiert werden (Liebtrau et al., 2014). Werden die Kardiomyozyten nekrotisch und verliert die Zellmembran ihre Integrität, dann sind die besagten Proteinkomplexe nach einem bestimmten Zeitintervall im Blut nachzuweisen. Dies geschieht in der Regel mit einer Latenz von zwei bis vier Stunden. Troponin kann Tage später (4 – 7 Tage bei cTNI, 10 – 14 Tage bei cTNT) noch nachgewiesen werden bevor es renal ausgeschieden wird (Sharma and Imteyaz, 2012).

Die ESC Leitlinie „*Management of acute coronary syndromes in patients without persistent ST-segment elevation*“ aus dem Jahr 2015 verlangt die Bestimmung des kardialen Biomarkers Troponin, also des Troponin I und/oder des Troponin T. Dieses ermöglicht erst die Unterscheidung zwischen einem NSTEMI und dem Vorliegen einer instabilen Angina pectoris. Es handelt sich bei der Bestimmung von kardialem Troponin um den Goldstandard in der Diagnostik eines ACS.

Seit Einführung der Radioimmuntests für kardiale Troponine in den 1990ern hat sich deren Sensitivität im Verlauf der Jahre um mehr als das Hundertfache verbessert. Lag die Nachweisgrenze von Troponin in den Tests der ersten Generation noch bei 0,5 ng/ml, so können heute die ultra-sensitiven Troponin-Tests für Troponin I ab einer Konzentration von 0,006 ng/ml nachweisen (Bhoi et al., 2014). Die exakten Grenzwerte sind dabei variabel und unterscheiden sich bei verschiedenen Troponin-Tests aufgrund von unterschiedlichen Testprotokollen. Der Grenzwert für eine pathologische Troponinkonzentration im Blut orientiert sich an der 99. Perzentile.

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Die Sensitivität von Troponin kann darüber hinaus durch serielle Bestimmungen gesteigert werden. So gibt die Dynamik des gemessenen kardiales Troponins Aufschluss über eine akute im Vergleich zu einer chronischen Erhöhung des kardialen Troponins und damit über eine Ischämie von Kardiomyozyten. (Garg et al., 2017). Diese Tatsache findet auch Berücksichtigung in der aktuellen Leitlinie, die folglich einen 0h/3h Algorithmus empfiehlt. Darüber hinaus existiert ein 0h/1h Algorithmus (Neumann et al., 2016). Die Zahlenwerte beziehen sich auf die Zeitpunkte der Blutentnahme und somit die Bestimmung der kardialen Troponine. Der zuletzt genannte Algorithmus wird verwendet, wenn zum Zeitpunkt Null bereits ein stark erhöhter Troponinwert registrierbar ist. Zeigt sich eine relevante Troponindynamik (abhängig von dem verwendeten Test) nach einer Stunde, so ist dies ein wichtiger Hinweis auf das Vorhandensein eines Myokardinfarktes (Roffi et al., 2015). Somit erhalten 80% der Patienten innerhalb von sechs Stunden nach dem initialen Ereignis eine eindeutige Diagnose (Rosenblatt et al., 2012). Die serielle Bestimmung von Troponin sowie die Verwendung von hs-cTn Tests erhöht den positiv prädiktiven Wert für das Vorliegen eines Myokardinfarktes relevant (Neumann et al., 2016). Ob es bei der Dynamik der ermittelten Troponinwerte auf die relative oder die absolute Veränderung ankommt, wird derzeit noch kontrovers diskutiert. Gegenstand der Forschung sind derzeit zeitlich effizientere Protokolle zum Ausschluss eines ACS sowie adjustierte Test, um die Aussagekraft bei multimorbiden Patienten zu erhöhen.

Kreatininkinase

Die Kreatininkinase (CK) ist neben Aspartat Transaminase (AST) und Laktat Dehydrogenase (LDH) der älteste Biomarker in der Diagnostik des ACS (Eggers et al., 2004). Weder LDH noch AST sind jedoch kardioselektiv und spielen heute keine Rolle mehr in der Diagnostik eines Myokardinfarktes. Die CK stellt in Myozyten Kreatininphosphat bereit als kurzfristige Energiereserve. Somit ist sie im Cytosol dieser Zellen anzutreffen. Insgesamt werden vier Isoenzyme unterschieden:

- CK-MB: Muscle-Brain-type Kreatininkinase, die vorwiegend im Myocard lokalisiert ist. Ihr Anteil an der Gesamt-CK beträgt 6 – 20%.
- CK-BB: Brain-type Kreatininkinase, die insbesondere im zentralen Nervensystem vorkommt.

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

- CK-MM: Muscle-type Kreatininkinase, die überwiegend in der quergestreiften Skelettmuskulatur vorkommt.
- CK-MiMi 1 und 2: Mitochondrien type, die vorwiegend in den Mitochondrien lokalisiert sind.

Aufgrund der Kardioselektivität der CK-MB besteht die Möglichkeit, diese Kinase als diagnostischen Biomarker bei einem Myocardinfarkt im peripheren Blut zu bestimmen. Dabei korreliert die Höhe des Anstiegs der CK-MB mit dem Ausmaß der Nekrose des Myokardinfarktes (Herold, 2015b). Kinetische Analyse konnte zeigen, dass die CK-MB 4 – 8 Stunden nach einem initialen Ereignis nachweisbar ist und ihr Maximum nach 18 – 24 Stunden erreicht (Wo et al., 1992).

Copeptin

Bei Copeptin handelt es sich um ein Derivat des Präprovasopressins, aus dem sich außerdem das Anti-diuretische Hormon (ADH) und das Neurophysin II ableiten. ADH spielt eine zentrale Rolle bei der endogenen Osmoregulation und somit auch bei der kardiovaskulären Homöostase. Somit ist ADH sowohl bei einem niedrigen Blutdruck als auch bei einer Herzinsuffizienz erhöht. Da das besagte Hormon jedoch sehr instabil ist und eine geringe Halbwertszeit hat, die 15 Minuten nicht überschreitet, eignet es sich weder als diagnostischer noch als prognostischer Biomarker. Copeptin hingegen, welches aus dem gleichen Präkursor-Protein hervorgeht, hat eine länger Halbwertszeit (Sharma and Imteyaz, 2012). Bereits sehr früh nach einem initialen Ereignis sind steigende Copeptin-Werte zu verzeichnen, noch bevor Troponin nachzuweisen ist. Aufgrund der kinetischen Eigenschaften von Copeptin eignet es sich als komplementärer Marker für einen frühzeitigen Ausschluss eines ACS. Darüber hinaus zeigte die einmalige Bestimmung von Troponin in Verbindung mit Copeptin in der Notaufnahme bei Patienten mit Verdacht auf ACS keine Unterlegenheit im Vergleich zu seriellen Bestimmungen von Troponin alleine (Möckel et al., 2015). Außerdem ermöglicht die Bestimmung von Copeptin eine Aussage über die Mortalität nach einem kardialen Ereignis sowie über das Risiko, eine Herzinsuffizienz im weiteren Verlauf zu entwickeln (Wang et al., 2017). Folglich besteht die Empfehlung, Copeptin immer zusätzlich zum hsTn mitzubestimmen (Roffi et al., 2015).

Relevanz der Monozyten für das ACS

Neben den in der Klinik etablierten kardialen Biomarkern gibt es weitere Biomarker, die derzeit noch Gegenstand aktueller Forschung sind (siehe Abbildung 2). Dabei spielen die inflammatorischen Biomarker und damit die Monozyten und ihre Subpopulationen eine zunehmend wichtigere Rolle (Wang et al., 2017). Diverse Studien suggerieren einen zusätzlichen Erkenntnisgewinn durch den komplementären Einsatz von inflammatorischen Biomarkern in der Diagnostik des ACS ((Bassuk et al., 2004), (Weber et al., 2007)). Bereits 1920 konnte eine Korrelation zwischen der absoluten Leukozytenzahl und der KHK hergestellt werden (C.S. Keefer, 1928).

Bei Monozyten handelt es sich um mononukleäre Zellen, die zu der Population der Leukozyten gehören. Die Entdeckung der mononukleären Zellen geht auf Elie Metchnikoff im Jahre 1882 zurück (Nahrendorf et al., 2010). Der Anteil der Monozyten an der Gesamtleukozytenzahl beträgt ca. 4 - 8% (Johnston, 1988). Sie entwickeln sich aus oligopotenten myeloischen Stammzellen, welche sich wiederum aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen entwickeln. Monozyten haben einen Durchmesser von 5–20 µm. Trotz der Größe weisen diese Zelle relativ wenig Zytoplasma auf. Die Zelle wird durch einen einen bohnenförmigen Nucleus dominiert. Funktionell gehören sie als phagozytierende Zellen zum angeborenen Immunsystem. Die Lebensdauer von zirkulierenden Monozyten in der Blutbahn beträgt im Mittel 1 – 3 Tage, danach wandern diese Zellen in das Gewebe ein und entwickeln sich zu Makrophagen oder dendritischen Zellen (Auffray et al., 2009).

Die Existenz von einzelnen Subpopulationen der Monozyten wurden zuerst im Jahre 2001 bei Mäusen nachgewiesen (Palframan et al., 2001). Entscheidend für die Differenzierung der Gruppen waren dabei folgende Oberflächenmarker: CD115⁺ und CD11b wurden eingesetzt, um Monozyten zu identifizieren. Die Differenzierung der monozytären Subpopulationen erfolgte anhand der Oberflächenmarker Ly-6C und CD43. Weitere zentrale Oberflächenmarker zur Differenzierung der Subpopulationen sind die Chemokinrezeptoren CCR2 und CX₃CR1 (Ziegler-Heitbrock, 2014). Bereits zwei Jahre später erfolgte eine weiterführende Charakterisierung der Untergruppen bezüglich ihrer

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Funktion (Geissmann et al., 2003). Da die Oberflächenmarker für die Differenzierung der Subpopulationen nicht spezifisch für Monozyten sind, sind die beiden erstgenannten Marker (CD115⁺ und CD11b) unabkömmlich für die Identifikation von Monozyten.

Nachdem die Subpopulation der Monozyten in der Maus etabliert waren, verlagerte sich der Forschungsschwerpunkt auf die Monozytensubpopulationen des Menschen. Bei einem Vergleich der Genexpression zwischen Maus und Mensch mittels Microarrays offenbarte sich, dass eine große Ähnlichkeit zwischen den Expressionsmustern beider Gattungen besteht (Ingersoll et al., 2010). Die korrespondierenden Untergruppen sind in Tabelle 2 dargestellt. Daraus lässt sich ableiten, dass das Mausmodell eine Möglichkeit darstellt, um auf das Verhalten der menschlichen Monozyten zu schließen (Ziegler-Heitbrock, 2014).

Subpopulationen	Mensch	Maus
klassischen Monozyten	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻⁻	Ly-6C ⁺⁺ CD43 ⁺
intermediären Monozyten	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	Ly-6C ⁺⁺ CD43 ⁺⁺
nicht-klassischen Monozyten	CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺	Ly-6C ⁺ CD43 ⁺⁺

Tabelle 2: Monozytensubpopulationen in verschiedenen Spezies inklusive der relevanten Oberflächenmarker zur Differenzierung zwischen den Subpopulationen

Wenn die Monozytenpopulationen sich bezüglich ihrer Genexpression unterscheiden, liegt die Vermutung nahe, dass sie sich auch bezüglich ihrer funktionellen Eigenschaften und somit auch hinsichtlich ihrer Oberflächenmarker unterscheiden (Gren et al., 2015). Einschließlich der 1970er Jahre konnten Monozyten lediglich hinsichtlich ihrer Größe und Dichte kategorisiert werden. Erst mit dem Einsatz der Durchflusszytometrie wurde es möglich, verschiedene Oberflächenmarker nachzuweisen. Das erste Durchflusszytometer wurde zwar bereits Anfang der 70er Jahre des vergangenen Jahrhunderts in Betrieb genommen, aber es dauerte noch weitere zwanzig Jahre bevor Ende der 90er Jahre eine differenziertere Betrachtung der Monozyten erfolgte. Infolge dessen bestand die Notwendigkeit einer einheitlichen Nomenklatur, die eine eindeutige einheitliche Bezeichnung der jeweiligen Untergruppe ermöglichte. Ziegler-Heitbrock et

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

al. befasste sich in seiner Arbeit „*Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood*“ mit eben dieser. Dabei sei angemerkt, dass die besagte Nomenklatur, die von dem „*Nomenclature Committee of the International Union of Immunological Societies*“ bestätigt wurde, keinen Anspruch auf Vollständigkeit erhebt, da die Forschung in diesem Bereich keineswegs abgeschlossen ist. Die Nomenklatur sieht für die drei Subgruppen folgende Terminologie vor: klassisch, intermediär und nicht-klassisch (Ziegler-Heitbrock, 2014). Die Einteilung erfolgte anhand von zytometrisch bestimmbaren Oberflächenmarkern (s. Tabelle 3). Relevant waren dabei insbesondere die Oberflächenmarker CD14 und CD16, die bei allen Subgruppen in unterschiedlich starker Ausprägung vorhanden sind. Bei CD14 handelt es sich um ein Korezeptor für die Erkennung von bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS). Als „Pattern-Recognition-Receptor“ ist CD14 entscheidend für das angeborene Immunsystem (Kitchens, 2000). CD16 ist ein Fc γ Rezeptor Typ III und damit relevant für Phagozytoseprozesse (Zhang et al., 2000).

Subpopulationen	Klassifikation	Häufigkeiten
klassische Monozyten	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻⁻	80 – 95%
intermediäre Monozyten	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	2 – 11%
nicht-klassische Monozyten	CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺	2 - 8%

Tabelle 3: Nomenklatur und Häufigkeiten der Monozytensubpopulationen im Blut (Ziegler-Heitbrock, 2014)

Untersuchungen zu den transkriptionellen Vorgängen in den einzelnen Subpopulationen zeigten eine 83%ige Übereinstimmung und somit eine große Ähnlichkeit (Ancuta et al., 2009). Jedoch gibt es auch Unterschiede in der Expressionshäufigkeiten einzelner Oberflächenmarker und Proteine. In einer Studie von Wong et al. konnte mit Hilfe von Genexpressionsanalysen nachgewiesen werden, dass verschiedene Gene unterschiedlich stark exprimiert werden (Wong et al., 2011). Gren et al. identifizierte insgesamt 83 Gene, deren Expression zwischen den einzelnen Subgruppen stark variierte (Gren et al., 2015). Damit konnten Rückschlüsse auf die funktionellen Eigenschaften der Subpopulationen geschlossen werden.

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Die klassischen Monozyten zeigten in Transkriptions- und Genexpressionsanalysen eine große Vielseitigkeit hinsichtlich ihrer proinflammatorischen Eigenschaften (Segura et al., 2018). Dabei wurden Gene zur Erkennung von bakteriellen Komponenten und mit antimikrobiellen Funktionen vermehrt transkribiert (Boyette et al., 2017). Die nicht-klassischen Monozyten nehmen eine wichtige Rolle in der frühzeitigen Immunabwehr wahr (Kratofil et al., 2017): Eine vermehrte Genexpression im Bereich der Gene für das Zytoskelett erklärt die ausgeprägte Motilität dieser Zellen (Kiliszek et al., 2012). Sie wandern entlang des Gefäßsystems. In der Subpopulation der intermediären Monozyten sind insbesondere Gene für den Major Histocompatibility Complex II (MHC II) stark ausgeprägt (Wong et al., 2011). Dies lässt auf eine zentrale Rolle bei der Antigenpräsentation und damit bei der T-Zell-Aktivierung schließen.

Bei den angeführten Studien wurden die Monozytensubpopulationen hauptsächlich im stationären Zustand bei gesunden Probanden beobachtet. Jedoch wurde bereits aus den funktionellen Eigenschaften der Subpopulationen ersichtlich, dass sie nicht nur eine zentrale Rolle bei der Abwehr von Infektionskrankheiten haben sondern auch bei inflammatorischen Erkrankungen. 1970 konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass die Proliferation der Monozyten im Knochenmark als Folge von entzündlichen Stimuli ansteigt und zu einer Monozytose führt (Yang et al., 2014). Umfangreiche klinische Studien suggerieren, dass kardiovaskulären Erkrankungen und insbesondere Myokardinfarkte mit einer relevanten Monozytose (Abrahão Afiune Neto, Antonio de Pádua Mansur and Everly P. S. G. Gomes, 2006). Somit kommt der Monozytose im Rahmen kardiovaskuläre Erkrankungen eine wesentliche Rolle in der Risikostratifizierung zu. Ein Anstieg der Monozyten liefert somit nach Ausschluss anderer Ursachen einen ersten Hinweis auf das Vorliegen einer KHK (Rogacev et al., 2012). Madjid et al. konnte zeigen, dass die initialen Leukozytenzahlen abhängig sind von der Schwere und dem Ausmaß des ACS. Bei einer instabilen Angina Pectoris wurden weniger Leukozyten registriert als bei einem akuten Myokardinfarkt. Die niedrigsten Monozytenzahlen wurden bei der stabilen KHK beobachtet (Madjid et al., 2004).

Bei einer differenzierteren Betrachtung der Monozytensubpopulationen im Rahmen des akuten Myokardinfarktes ist die Studienlage zu diesem Zeitpunkt noch sehr vage oder

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

z.T. widersprüchlich. Tsujioka et al. sieht die klassischen Monozyten als ausschlaggebenden negativen prognostischen Faktor für die Rettung von myokardialem Gewebe sowie für die Erholung der Auswurfleistung des linken Ventrikels nach einem Myokarinfarkt (Tsujioka et al., 2009). Damit übereinstimmend zeigte Ozdogru et al., dass die Zahl der CD14⁺ Monozyten im Falle eines STEMI oder NSTEMI signifikant höher ansteigen (Ozdogru et al., 2007).

Zum jetzigen Zeitpunkt wurden die meisten der genannten Studien an gesunden Probanden durchgeführt. Deswegen existierte wenig Gewissheit über den Phänotyp der Monozytensubpopulationen von Patienten mit ACS bzw. NSTEMI. Ein differenziertes Verständnis der Heterogenität der Subpopulationen stellt jedoch eine wichtige Grundlage für die Identifizierung potentiell komplementärer Biomarker dar. Die große Anzahl an Studien zu Monozyten und deren Subpopulation zeigt zudem das Potential dieses Forschungsgebietes. Des Weiteren wird die Relevanz dieses Forschungsfeldes weiter gesteigert durch die Bedeutsamkeit des ACS für die westliche Bevölkerung und den damit verbundenen Komplikationen sowohl aus medizinischer als auch aus wirtschaftlicher Sicht.

Fragestellung/Zielsetzung

Leukozyten und insbesondere Monozyten nehmen eine zentrale Rolle im Verlauf eines Myokardinfarktes ein. Ich fokussierte mich weiterhin auf die monozytären Subpopulationen. Darauf aufbauend traf ich die Annahme, dass Monozyten im Rahmen eines ACS und insbesondere eines NSTEMIs eine andersartige Genexpression und somit einen anderen Aktivierungszustand aufweisen würde, welcher sich in dem Oberflächenrezeptorprofil der einzelnen Subpopulationen widerspiegeln würde.

Das Ziel dieser Studie war die Immunphänotypisierung der Monozytensubpopulation von Patienten mit NSTEMI mittels einer umfassenden, durchflusszytometrisch-basierten Oberflächenmarkeranalyse. Ich erhoffte mir damit umfassende Einblicke in die Veränderungen der Oberflächenexpressionsprofile der einzelnen Subpopulationen bei NSTEMI Patienten im Vergleich zu Patienten mit einem Ausschluss einer KHK. Die Experimente erfolgten vor dem Hintergrund der Anwendbarkeit der Ergebnisse für die Optimierung der Diagnostik und Prognose eines NSTEMIs.

Material & Methoden

Material

Reagenzien

Name des Reagenzes	Hersteller
Dulbecco's PBS (10x) ohne Calcium und Magnesium	c.c.pro, Oberdorla, Deutschland
Aqua B. Braun Spüllösung	B. Braun, Melsungen, Deutschland
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	c.c.pro, Oberdorla, Deutschland
Fötales Kälberserum (FKS)	c.c.pro, Oberdorla, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO) Hybri-Max	SIGMA, Saint Louis, Missouri, USA
Incidin Plus	Ecolab Inc., Saint Paul, Minnesota, USA
Cell Wash Buffer	BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Cell Staining Buffer	BioLegend; San Diego, California, USA
UltraPure™ 0.5M EDTA, ph 8.0	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Human TruStain FcX Fc Receptor Blocking Solution	BioLegend; San Diego, California, USA
ArC™ Amine Reactive Compensation Bead Kit	Invitrogen; Carlsbad, Californien, USA
BD FACS™ Lysing Solution	BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA
FACSFlow Sheath Solution	BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA
FACSClean Solution	BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Name des Reagenzes	Hersteller
AO/PI Cell Viability Kit für Luna-FL Automated Cell Counter mit Acridinorange und Propidiumiodid	Biozym Scientific, Wien, Österreich

Tabelle 4: verwendete Reagenzien

Antikörper

Name des Antikörpers	Hersteller
CD14-Alexa488 Clone M5E2	BioLegend; San Diego, California, USA
CD16-Pacific Blue Clone 3G8	BioLegend; San Diego, California, USA
Aqua Dye	Invitrogen; Carlsbad, Californien, USA
Lypoplate™ Screening Panel – Alexa Flour 647	BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA
CD11b-Alexa647 Clone ICRF44	BioLegend; San Diego, California, USA
CD66b-PerCP-Cy5.5 Clone G10F5	BioLegend; San Diego, California, USA
7-Color-Immunophenotyping Kit (human) <ul style="list-style-type: none"> • CD14-FITC • CD56-PE • CD16-PE • CD4-PerCP • CD19-Pe-Vio • CD3-APC • CD8-APC-Vio770 • CD45-VioBlue 	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland

Tabelle 5: verwendete Antikörper

Geräteliste

Gerät	Hersteller
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Wesseling
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Wesseling
Luna-FL™ Automated Cell Counter	Logos Biosystems, Gyunggi-Do, Korea
MSC-Advantage™ biologische Sicherheitswerkbank der Klasse II	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
LS6000 Stickstofftank	Airgas, Radnor, Pennsylvania, USA
Labor-Kühlschrank Lcv 4010-21 (4°C)	Liebherr MediLine, Frankfurt am Main, Deutschland
Gefrierschrank -80°C	Heraeus, Werheim, Deutschland
FACSVerse™ Flow Cytometer	BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA

Tabelle 6: verwendete Geräte

Gebrauchsmaterialien

Material	Hersteller
15ml Cellstar ^R Polypropylen Röhren (Zentrifugenröhren)	Greiner Bio-One International, Gremsmünster, Österreich
50ml Cellstar ^R Polypropylen Röhren (Zentrifugenröhren)	Greiner Bio-One International, Gremsmünster, Österreich
Cryo.S™ Einfrierröhren	Greiner Bio-One International, Gremsmünster, Österreich
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter mit 2 Propanol für 1 – 2ml Cryo-Tubes	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Microplate, 96-well	BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Plate Sealer für 96-Well-Platte	Corning; Corning, New York, USA

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Material	Hersteller
Cell Strainer 70µm, steril	Corning; Corning, New York, USA
Trucount™ Tubes	BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA
BD Cytometer Setup and Tracking Beads	BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA
SPHERO™ Rainbow Calibration Particles (8 Peak)	BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA

Tabelle 7: verwendete Gebrauchsmaterialien

Spezielle Verbrauchsmaterialien: Blutentnahme

Material	Hersteller
Vacutainer Cell Preparation Tube mit Natriumcitrat	BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Monovetten: Serum, Hämatologie, Gerinnungsanalytik	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 8: verwendete Materialien für die Blutentnahme

Studienpopulation

In den Landkreisen Giessen, Wetteraukreis, Lahn-Dill-Kreis und Hoch-Taunus-Kreis erleiden ca. 1500 Menschen pro Jahr einen Herzinfarkt. Um eine zeitnahe Diagnostik und vor allem Therapie zu ermöglichen, bildete sich das Netzwerk „Herzinfarkt“, dessen Zentrum die Kerckhoff Klinik Bad Nauheim ist. Aus den benannten Landkreisen rekrutierten sich dementsprechend auch die Probanden dieser Studie, welche im Zeitraum von Mai bis Oktober 2016 nach eingehender Prüfung der Eignung als Studienpatienten eingeschlossen wurden.

Ein- & Ausschlusskriterien

Die Auswahl der Probanden erfolgte nach umfassender Prüfung der Ein- und Ausschlusskriterien, die im Folgenden aufgeführt sind. Der Studieneinschluss erfolgte nach mündlicher Aufklärung durch qualifiziertes Personal und schriftlicher Einwilligung der Patienten.

Einschlusskriterien

Die Einschlusskriterien für die NSTEMI-Kohorte sahen eine laborchemischen sowie eine elektrokardiographische Diagnostik des NSTEMIs vor entsprechend der ESC Leitlinie „*Management of acute coronary syndromes in patients without persistent ST-segment elevation*“ aus dem Jahr 2015 (Roffi et al., 2015). Die Kontrollkohorte betreffend, bedurfte es einen nicht-invasiven und/oder einen invasiven Ausschluss einer koronaren Herzerkrankung. Bei einer nicht-invasiven Diagnostik handelte es sich um ein kardiales MRT, eine Myokardszintigraphie oder eine medikamentöse Stress-Echokardiographie. Bei einem invasiven Vorgehen handelte es sich um einen Ausschluss mittels einer Koronarangiographie.

Ausschlusskriterien

Mit der Festlegung der Ausschlusskriterien wurde die Absicht verfolgt, eine anderweitige Aktivierung der Monozyten auszuschließen. Folglich war ein Patient als Studienpatient ungeeignet, wenn er unter einer chronisch-inflammatorischen Erkrankung, einer Autoimmunerkrankung sowie einer akuten oder chronischen Infektion litt. Weiterhin waren Patienten mit malignen Erkrankungen ebenfalls von der Studie ausgeschlossen. Darüber hinaus war das Fehlen einer schriftlichen Einwilligung ebenfalls ein Ausschlusskriterium.

Ethikvotum

Das Studienprotokoll für die Blutentnahmen und deren Verarbeitung wurde durch die Ethikkommission bei der Landesärztekammer Hessen geprüft und ein Ethikvotum (**FF 17/2011: BioACS – prospektive Evaluierung neuer biochemischer Marker bei akutem Koronarsyndromen in der frühen Phase der Diagnostik und bei sequentieller Testung, 22.03.2011**) wurde für die projektbezogenen Untersuchungen erteilt. Der Originalwortlaut findet sich im Anhang (Abbildung 16 – Abbildung 18). Das Votum befand sich darüber hinaus in Übereinkunft mit den „good clinical practice/international conference on harmonisation“ Guidelines (ICH Harmonised Tripartite Guideline, 1996).

Datenschutz

Die Grundlage des Konzepts zum Schutz der sensiblen Patientendaten des Kerckhoff-Biomarkerregisters (BioReg) bildete die Stellungnahme zu Humanbiobanken für die Forschung des Deutschen Ethikrates unter dem Vorsitz von Herrn Prof. Schmidt-Jortzig (Ethikrat, n.d.). Im Einzelnen definierte der Deutsche Ethikrat fünf Säulen bezüglich des Datenschutzes für Humanbiobanken:

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

1. Etablierung eines Datenschutzgeheimnisses
2. Festlegung der Nutzung
3. Einbeziehung von Ethikkommissionen
4. Qualitätssicherung beim Datenschutzgeheimnis
5. Transparenz der Ziele und Verfahrensweisen der Biobank

Patienten wurden in einem ihnen verständlichen Aufklärungsgespräch über die Inhalte der Studie und somit über die Verwendung ihres Biomaterials informiert. Darüber hinaus bestand die Möglichkeit, jederzeit die Einwilligung schriftlich wieder zurückzuziehen. Die Stellungnahme wurde ergänzt durch das generische Datenschutzkonzept für Biomaterialbanken (Version 1.0) der Telematikplattform für Medizinische Forschungsnetze e.V. (Biomaterialbanken, 2006) sowie der Berufsordnung für Ärztinnen und Ärzte in Hessen (§ 15 Abs. 3) mit Stand 1.11.2015 (Berufsausübung, 2015). Darüber hinaus wurde im Rahmen der schriftlichen Einwilligung eine Einverständniserklärung für die Speicherung der Patientendaten in pseudonymisierter Form eingeholt. Da das Biomaterial der Probanden bereits 2016 in die Biodatenbank des Franz-Groedel-Instituts eingepflegt wurde, fielen dieses nicht unter die aktuelle Datenschutz-Grundverordnung.

Blutentnahme

Bei den Probanden der NSTEMI-Kohorte erfolgte die Blutentnahme im Herzkatheterlabor vor der Herzkatheteruntersuchung. In der NSTEMI-Kohorte (n=6) handelte es sich somit bei dem verwendeten Biomaterial um 120ml peripher-arteriellen Blutes inklusive 3ml peripher-venösen Blutes. Diese Konstellation erlaubte einen Vergleich der Monozytensubpopulationen in den verschiedenen Schenkeln des Kreislaufs. In der Kontroll-Kohorte (n=6) erfolgte die Blutentnahme peripher-venös nach dem Ausschluss einer KHK. Die Verteilung des Blutes auf die einzelnen Blutentnahmeröhrchen stellt sich wie in Tabelle 9 aufgeführt dar.

Studientyp	max. Probenumfang	Probenmaterial
Screening	120 ml	15 CPT-Röhrchen (7ml)
		1 EDTA-Röhrchen (3ml, venös) 1 EDTA-Röhrchen (3ml, arteriell)

Tabelle 9: Probenmaterial

Isolation der „Peripheral Blood Mononuclear Cells“

Unmittelbar nach der Blutentnahme wurde mit der Isolation der „Peripheral Blood Mononuclear Cells“ (PBMC) begonnen gemäß laborinternen etablierter Standardarbeitsanweisung (SOP) des Franz-Groedel-Instituts der Kerckhoff Klinik Bad Nauheim. Bei PBMCs handelt es sich hauptsächlich um Lymphozyten, Monozyten und basophile Granulozyten. Die einzelnen Populationen sind relativ zueinander in Abbildung 3 dargestellt.

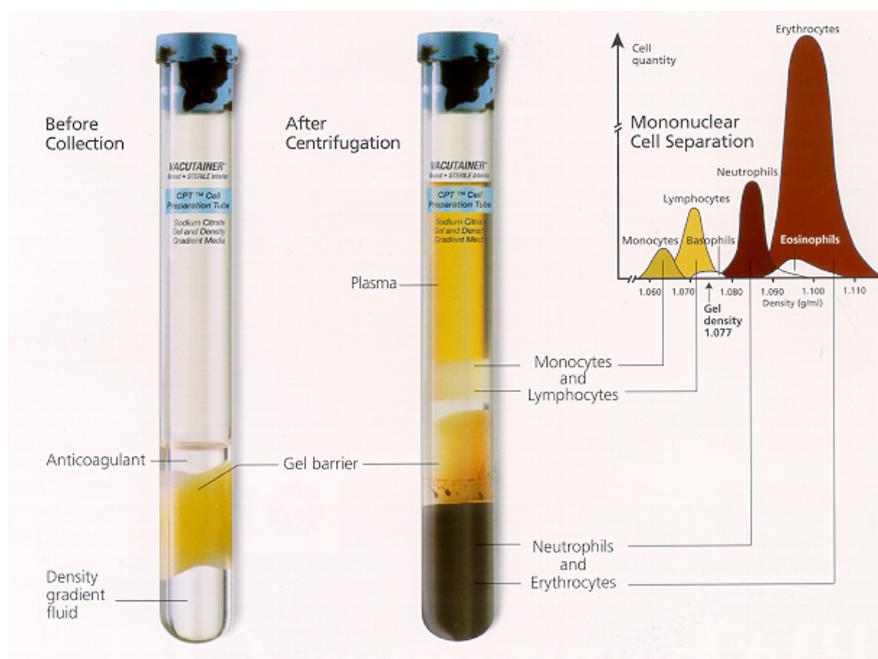


Abbildung 3: Konzept der „Cell Preparation Tubes“ (CPT) und Zusammensetzung der PBMC, die sich nach Zentrifugation zwischen dem Überstand und der Gelbarriere befinden. Zu den PBMC zählen neben den Monozyten auch Lymphozyten (Blood and System, n.d.)

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Das Blut der Probanden wurde in *Cell Preparation Tubes* (CPT, BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) zentrifugiert (1650G, 20 Minuten, 22°C). Das Medium, das bereits im CPT enthalten war, fungierte als Dichtegradient, der die PBMCs von den restlichen korpuskulären Bestandteilen des Blutes trennte. Die integrierte Gelbarriere verhinderte eine erneute Durchmischung der Monozyten und Lymphozyten mit den neutrophilen Granulozyten und Erythrozyten. Der Überstand, der vor allem die PBMC enthielt, wurde mit Phosphate-buffered saline (1x PBS) verdünnt und erneut zentrifugiert (300G, 10 Minuten, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit den PBMC resuspendiert mit 1x PBS und abermals zentrifugiert (300G, 10 Minuten, 4°C).

Zuvor wurde die Gesamtzellzahl der PBMCs mit Hilfe eines Luna-FL™ Automated Fluorescence Cell Counter mit einem AO/PI Färbe-Kit (Biozym Scientific, Wien, Österreich) bestimmt. Bei der Färbung handelte es sich um die Fluoreszenzfarbstoffe Acridinorange und Propidiumiodid. Acridinorange weist Nukleinsäuren, DNA und RNA nach, indem es interkalierend wirkt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff kann die Zellmembran überwinden. Propidiumiodid ist ebenfalls ein Nukleinsäureinterkalator und kommt somit auch bei der Diskriminierung der Zellviabilität zum Einsatz. Im Unterschied zu Acridinorange ist Propidiumiodid nicht permeabel für die Zellmembran. Somit gelangt dieser Farbstoff nur in die Nähe von Nukleinsäuren, DNA und RNA von toten Zellen mit defekter Zellmembran. Aufgrund dieser Eigenschaften war die besagte Fluoreszenzfarbstoffkombination in der Lage, eine quantitative Aussage bei einer Zell-Überlebensanalyse über primäre Zellen (u.a. PBMC) zu treffen.

Nach dem zweiten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand erneut verworfen. Das Pellet wurde unter Verwendung des Einfriermediums resuspendiert. Dieses Medium bestand zu fünfzig Prozent aus einem Nährmedium (RPMI 1640, c.c.pro, Oberdorla, Deutschland), zu vierzig Prozent aus fetalem Kälberserum (FKS, c.c.pro, Oberdorla, Deutschland) und zu zehn Prozent aus Dimethylsulfoxid (DMSO, SIGMA, Saint Louis, Missouri, USA). Bei dem oben genannten Nährmedium handelte es sich um ein Zellkulturmedium u.a. für Leukozyten. Es beinhaltete neben einem Hydrogencarbonat-Puffersystem, Glucose, Salze, Aminosäure und Vitamine. Als pH-Indikator wurde Phenolrot verwendet. FKS verhinderte bei der Kryokonservierung die Entstehung von zellulären Schäden. Bei DMSO handelte es sich um Dimethylsulfoxid, welches als zusätzliches Frostschutzmittel fungierte. Als solches verhinderte es eine

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Eiskristallbildung während der Kryokonservierung, welche die empfindlichen PBMCs ansonsten zerstört hätte.

Abschließend wurden Aliquots zu je 10×10^6 Zellen pro Portion gebildet. Diese wurden dann in extra dafür vorgesehene Einfrierröhrchen (Cryo.STM Einfrierröhrchen, Greiner Bio-One International, Gremsmünster, Österreich) überführt und eingefroren. Dafür wurden die Einfrierröhrchen in vorgekühlte Gefrierbehälter (Mr. Frosty™ Gefrierbehälter mit 2 Propanol für 1-2ml Cryo-Tubes, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) einsortiert und für mindestens 24 Stunden in einem Kühlschrank bei -80°C tiefgekühlt bevor sie dann in die Stickstoff-Gasphase überführt wurden. Die Gefrierbehälter sorgten dabei für eine kontrollierte, langsame Abkühlung der Proben und verhinderten so eine Kristallbildung wie sie bei einer unkontrollierten Abkühlung entstanden wäre. Damit war die Aufbereitung der Zellen für die durchflusszytometrische Analyse vorerst abgeschlossen.

Durchflusszytometrie

Bei einem Durchflusszytometer handelt es sich um „eine automatisierte Licht- und Fluoreszenzmikroskopie an Einzelzellen im kontinuierlichen Probendurchfluss“ (Böhmler, n.d.) für Zellen der Größe $0,4 - 50\mu\text{m}$. Für die Durchflusszytometrie sind vier Grundpfeilern essentiell: Trägerflüssigkeit, Optik, Kompensation und Datenverarbeitung.

Mit Hilfe einer Trägerflüssigkeit passierten die Zellen einzeln die Optik, welche aus Lasern bestand. Beim Durchtritt der Zelle durch die Laserstrahlen regten diese selektiv die Fluorochrom-gekoppelten Antikörper auf der gefärbten Zelle zur Emission von Licht an. Dabei wurden unterschiedliche Fluorochrome durch unterschiedliche Wellenlängen angeregt. Das emittierte Licht wies eine längere Wellenlänge auf als die des Lasers. Mit Hilfe von optischen Filtern und Spiegeln, die selektiv für einen Wellenlängenbereich durchlässig waren, wurde das Licht einem bestimmten Kanal mit dem entsprechenden Detektor zugeleitet. In den Detektoren, die als Photomultiplier-Tubes bezeichnet

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

wurden, fand darüber hinaus eine Verstärkung des Lichtsignals statt, welches dann von einer Software registriert und ausgewertet wurde. Abschließend generierte die Software für jede Messung eine FCS-Datei („*Flow Cytometry Standard*“).

Weiterhin wurde die Streuung des Laserstrahles selbst gemessen. Das Vorwärtsstreulicht (engl. *forward scatter*, FSC) wurde in Richtung des Lasers gemessen und erlaubte eine Aussage über den Umfang der passierenden Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (engl: *side scatter*, SSC) wurde in 90° zum einfallenden Licht gemessen und ermöglichte eine Aussage über die Granularität der Zelle und somit über ihre Komplexität. Insgesamt ließ sich die Morphologie der Zelle mit Hilfe des Streulichts beschreiben.

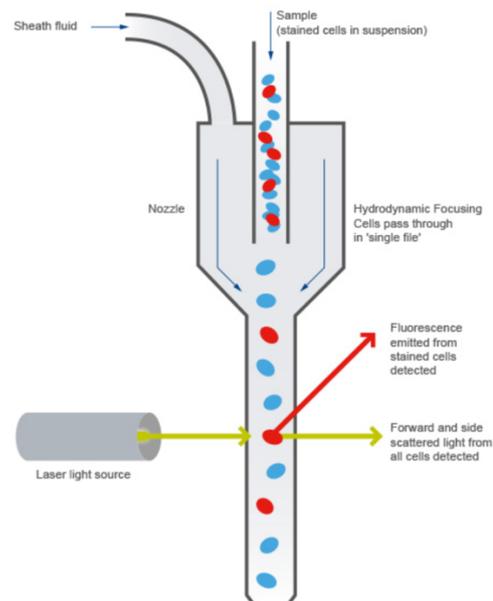


Abbildung 4: Übersichtsdarstellung zur Verdeutlichung der Prinzipien eines Durchflusszytometers (*Introduction to flow cytometry, n.d.*)

Im Verlauf wird im Einzelnen auf die Grundpfeiler der Durchflusszytometrie und die konkreten Einstellungen eingegangen, so wie sie in der vorliegenden Studie zur Anwendung kamen. Bei den Experimenten wurde ausschließlich ein Durchflusszytometer (FACSVerse flow cytometer, BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) verwendet. Dabei wurde das Ziel verfolgt, eine umfassende Oberflächenmarkeranalyse bei Monozyten durchzuführen.

Flüssigkeiten

Neben dem Probenpuffer, der die zu messenden gefärbten Zellen enthielt, spielte die Trägerflüssigkeit (FACSFlow Sheath Solution, BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) eine zentrale Rolle. Sie war für die hydrodynamische Fokussierung der einzelnen Zellen verantwortlich, die letztlich eine laminare Strömung erzeugte, sodass die Zellen die Laserstrahlen einzeln passierten. Dieses physikalische Phänomen folgte dem Bernoulli-Effekt.

Optik

Das FACSVerse (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) arbeitete mit insgesamt drei verschiedenen Lasern und acht Detektionskanälen sowie einem eignen Detektionskanal für den FSC. In Tabelle 10 sind die verschiedenen Laser mit den jeweiligen Wellenlängen aufgeführt.

Laser	Wellenlänge [nm]
Blau	488
Rot	640
Violett	405

Tabelle 10: Optik des Durchflusszytometers FACSVerse (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA)

Die technischen Voraussetzungen des FACSVerse (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) ermöglichten somit eine detaillierte Aussage bezüglich folgender Parameter: Neben der Größe und der Granularität konnte auch die Fluoreszenzintensität von verschiedenen Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gemessen werden.

Eine durchflusszytometrische Messung verschiedener Fluorochrome innerhalb einer Probe wurde durch die verschiedenen Exzitation- und Emissionsmaxima ermöglicht. Dies ist exemplarisch für AlexaFluor 647 in Abbildung 19 im Anhang dargestellt. Jedoch konnte es je nach verwendetem Fluorochrome trotzdem zu einer spektralen Überlappung

kommen, die es galt, zu vermeiden. Bei einer spektralen Überlappung handelte es sich um die Überlappung der Emissionsbereiche verschiedener Fluorochrome. Diese konnte durch den Einsatz von feinen Filtern minimiert werden.

Kompensation

Da sich eine spektrale Überlappung nicht immer vermeiden ließ, bedurfte es einer Kompensation, die von dem Durchflusszytometer (FACSVerse flow cytometer, BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) selbstständig durchgeführt wurde. Dadurch, dass das Emissionsmaximum in das Filterspektrum eines anderen Detektors mit hineinreichen konnte, wurden in diesem Detektor fälschlicherweise Ereignisse registriert. Bei einer Kompensation wurde der entsprechende Fluoreszenzanteil identifiziert und bei der Auswertung berücksichtigt.

Um diesen umfangreichen Prozess nicht täglich durchführen zu müssen, aber trotzdem die Qualität und Reproduzierbarkeit der Werte zu wahren, wurden „*Cytometer Setup and Tracking Beads*“ (CS&T Beads, BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) verwendet. Dabei handelte es sich um drei verschiedene Polystyrol-Beads mit verschiedenen Fluoreszenzintensitäten sowie eine Mischung aus verschiedenen Fluorochrome, die einen weiten Exzitations- sowie Emissionsbereich abdeckten. Die verwendeten CS&T Beads (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) waren mit den eingesetzten Fluorochromen (Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 488, Pacific Blue, FITC, PE, PerCP, Pe-Vio770, APC, APC-Vio770, VioBlue, PerCP-Cy 5.5) kompatibel. Abgesehen von der garantierten Reproduzierbarkeit bezüglich der Durchflusszytometerkonfiguration, wurde auch die Funktionstüchtigkeit („*performance checking*“) überprüft. Die Beads kamen täglich zur Kalibrierung im Rahmen der „*Performance Quality Control*“ zum Einsatz. Zusätzlich enthielt jedes Lypoplate™ Screening Panel (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) eine Probe mit „*Rainbow Calibration Beads*“ (8 Peaks) zur Verifizierung der Durchflusszytometer-Einstellung und somit als Kontrolle für die CS&T Beads.

Datenverarbeitung

Die Messung der Daten erfolgte mit der Software FACSuite Version 1.0 (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Die abschließende Auswertung der FCS-Dateien wurde mit der Software FACSDiva Version 6.1.3 (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) durchgeführt. Dabei wurden hauptsächlich zwei graphische Darstellungsmethoden verwendet: Das Histogramm stellte eine Häufigkeitsverteilung bezüglich der Fluoreszenzintensität dar und erlaubte somit einen direkten annähernd proportionalen Rückschluss auf die gebundenen Fluorochrom-gekoppelten Antikörper. Des Weiteren zeigte das Verteilungsdiagramm (engl.: *scatter plot*) die Ereignisse in Abhängigkeit von zwei verschiedenen Merkmalen. Bei den Merkmalen handelte es sich um die gebundenen Fluorochrome-gekoppelten Antikörper, FSC oder SSC. Mit dieser Methode ließen sich verschiedene Population identifizieren. Um zwischen den einzelnen Populationen zu differenzieren, wurde der „*Region of Interest*“ (ROI) markiert und isoliert in einem gesonderten Verteilungsdiagramm dargestellt. Das sogenannte „*Gating*“ wird für die jeweiligen Experimente in den entsprechenden Kapiteln genauer erläutert.

EDTA-Vollblutanalyse

Eine durchflusszytometrische Analyse des EDTA-Vollblutes wurde durchgeführt, um eine Aussage über die initialen Monozytenverhältnisse inklusive der Subpopulationen vor der Kryokonservierung zu erhalten. Dies wurde später mit dem Verhältnis der Subpopulationen der Monozyten nach dem Auftauen der Proben verglichen. Weiterhin sollte die Vergleichbarkeit der Monozytenpopulationen bezüglich der verschiedenen Entnahmeorte (arteriell vs. venös) in den beiden Kohorten verglichen werden.

Für die Vollblutanalyse wurde 400µl EDTA-Vollbut benötigt. Pro Probe wurden zwei Trucount™ Tubes (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) benötigt. Diese speziellen Röhrechen waren essentiell, damit die in der Probe enthaltene Zellen später durchflusszytometrisch gezählt werden konnten. Dafür enthielten die Trucount™ Tubes (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) eine bekannte Anzahl an Kugeln

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

(engl. *beads*). Durch den Vergleich von Kugeln zu gezählten Zellen, konnte auf die absolute Anzahl von Zellen in der Probe geschlossen werden. In je ein Trucount™ Tubes (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) wurde 50 bzw. 100µl Vollblut pipettiert. In das erste Röhrchen mit der geringeren Menge an Vollblut wurde ein Antikörpercocktail zur Identifizierung von Monozyten hinzugegeben, welcher aus 5µl CD14 (BioLegend; San Diego, California, USA), 5µl CD16 (BioLegend; San Diego, California, USA), 3µl CD11b (BioLegend; San Diego, California, USA), 3µl CD66b (BioLegend; San Diego, California, USA) bestand. In das zweite Röhrchen wurden 10µl eines fertig zusammengestellten Antikörpercocktails (7-Color Immunophenotyping Cocktail, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland) mit insgesamt sieben Antikörpern pipettiert: CD14, CD56, CD16, CD4, CD19, CD3, CD8, CD45. Dieser Antikörpercocktail ermöglichte eine immunologische Charakterisierung und Differenzierung der enthaltenen Leukozyten im Probenmaterial. Die Notwendigkeit der Durchführung von zwei getrennten Färbungen des Vollblutes ergab sich daraus, dass in dem Antikörpercocktail der Antikörper CD56 (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland) als auch CD16 (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland) mit dem gleichen Fluorochrom (hier: PE) markiert waren und somit von dem gleichen Detektor registriert wurden, sodass eine differenzierte Betrachtung ausgeschlossen war. In dem erstgenannten Färbeprotokoll hingegen war CD16 (BioLegend; San Diego, California, USA) mit dem Fluorochrom Pacific Blue markiert. Darüber hinaus wurde dieses Protokoll durch die Antikörper CD11b (BioLegend; San Diego, California, USA) und CD66b (BioLegend; San Diego, California, USA) ergänzt, welche eine Abgrenzung der Monozytenpopulation zu natürlichen Killer-Zellen und Granulozyten erlaubten. Die verwendeten Antikörper mit ihren Fluorochromen sind in Tabelle 11 und Tabelle 12 dargestellt.

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Fluorochrome	Exzitationsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]	Filter	Laser [nm]
CD14-Alexa Fluor 488	495	519	527/32	488 (blau)
CD16-Pacific Blue	401	452	448/44	405 (violett)
CD11b-Alexa Fluor 647	650	668	660/10	640 (rot)
Cd66b-PerCP- Cy5.5	482	695	700/54	488 (blau)

Tabelle 11: EDTA-Vollblutanalyse, Monozytencocktail, erstes Röhrchen

Fluorochrome	Exzitationsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]	Filter	Laser [nm]
CD14-FITC	490	517	527/32	488 (blau)
CD16-PE	565	575	586/42	488 (blau)
CD56-PE	565	575	586/42	488 (blau)
CD4-PerCP	482	675	700/54	488 (blau)
CD19-Pe- Vio770	565	776	783/56	488 (blau)
CD3-APC	652	660	660/10	640 (rot)
CD8-APC- Vio770	652	775	783/56	640 (rot)
CD45VioBlue	400	452	448/45	405 (violett)

Tabelle 12: EDTA-Vollblutanalyse, Antikörpercocktail, zweites Röhrchen

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Nach der Inkubationszeit (erster Röhrchen: 20 Minuten, Raumtemperatur, im Dunklen; zweites Röhrchen: 10 Minuten, Raumtemperatur, im Dunklen) wurde ein Puffer (BD FACS™ Lysing Solution, BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) hinzugefügt, der eine Lyse der Erythrozyten bewirkte, sodass im Anschluss direkt die durchflusszytometrische Messung erfolgen konnte. Mit Hilfe der Software FACSDiva Version 6.3.1. (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) wurden die Daten ausgewertet. Das Vorgehen zur Identifizierung der Monozyten Subpopulationen ist in Abbildung 20 im Anhang dargestellt.

Oberflächenmarkeranalyse

Bei einem Lypoplate™ Screening Panel (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) handelte es sich um ein „Human Cell Surface Marker Screening Panel“. Dieses besteht aus drei 96-Well Platten mit insgesamt 242 lyophilisierten, monoklonalen Antikörpern, die gegen humane Oberflächenmarker gerichtet waren (siehe Abbildung 21 im Anhang). In den 96-Well Platten waren außerdem sowohl Maus- als auch Ratten-Isotypen-Kontrollen (Platte 3) enthalten. Jedes Well beinhaltete 2,75µg des jeweiligen Antikörpers, sodass die Menge für 5 – 6 Tests ausreichte. Als Sekundärantikörper dienten AlexaFluor® 647 konjugierte Ziege-anti-Maus Immunglobuline (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) und AlexaFluor® 647 konjugierte Ziege-anti-Ratte Immunglobuline (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Abweichend von dem Herstellerprotokoll für die Oberflächenmarkeranalyse wurde bei dieser Studie mittels der Zugabe von zusätzlichen Antikörpern zur Identifizierung der Monozytenpopulationen das Protokoll modifiziert. Neben einer indirekten Färbung der Zellen für die Oberflächenmarkeranalyse, erfolgte die Färbung mit dem CD14/CD16 Mastermix (BioLegend; San Diego, California, USA) direkt über Fluorochromgekoppelte Antikörper. Die verwendeten Antikörper mit ihren Fluorochromen sowie deren optische Eigenschaften sind in Tabelle 13 dargestellt. Insgesamt handelte es sich um eine neue Methode, auf deren Versuchsablauf im Folgenden eingegangen wird.

Fluorochrome	Exzitationsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]	Filter	Laser [nm]
Lypoplate™ Screening Panel-Alexa Fluor 647	650	668	660/10	640 (rot)
CD14-Alexa Fluor 488	495	519	527/32	488 (blau)
CD16-Pacific Blue	401	452	448/44	405 (violett)

Tabelle 13: Oberflächenmarkeranalyse, Antikörpercocktail

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Um den Einfluss unspezifischer Antikörperbindung zu minimieren, beinhaltete das Analyseset Isotypenkontrollen für die Primärantikörper (Maus & Ratte). Diese unterschieden sich in ihrem Aufbau nicht von den Primärantikörpern. Lediglich das Epitop, das sie banden, kam nicht beim Menschen vor. Zudem wurden eine „*Fluoreszenz Minus One*“ (FMO) Kontrolle für das Fluorochrome Alexa647 eingesetzt.

Das Protokoll für die Oberflächenmarkeranalyse sowie der anschließenden Messung durch das Durchflusszytometer konnte in insgesamt sieben Abschnitte gegliedert werden.

1. Fc-Rezeptor-Blocking der PBMCs
2. Bindung der Primärantikörper
3. Bindung des Sekundärantikörpers
4. Bindung des CD14/CD16 Mastermixes
5. Bindung des AquaDye Mastermixes
6. Durchflusszytometrische Analyse der 96-Well Platten
7. Auswertung der FACS-Daten

Bevor das Oberflächenanalyseset mit den 242 monoklonalen Antikörpern zum Einsatz kam, mussten zuerst die kryokonservierten Proben vorbereitet werden. Bei dem im Folgenden aufgeführten Protokoll handelte es sich um die Anweisung für die Aufarbeitung einer Probandenprobe.

Alle Arbeitsschritte bis auf das Zentrifugieren und die Analyse im Durchflusszytometer fanden unter keimarmen Bedingungen unter einer Sicherheitsbank statt. Zuerst wurde der Färbepuffer für die Zellen (*Cell Staining Buffer*, BioLegend; San Diego, California, USA) mit 5mM EDTA (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) angesetzt. Dieser diente später als Waschpuffer für die überschüssigen Antikörper nach der Inkubation. Bei dem besagten Puffer handelte es sich um einen optimierten Waschpuffer, der extra für die Arbeit mit immunfluoreszenten Färbungen bei Zellsuspensionen ausgelegt war. Dabei verhinderte insbesondere das fötale Kälberserum (FKS) sowie

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Natriumazid (NaN_3) eine unspezifische Bindung der verwendeten Antikörper bzw. das Abdecken oder die Internalisierung zellulärer Antigene. EDTA verhinderte darüber hinaus als Chelator die Inhibition von Metalloproteasen und somit auch die Inaktivierung durch Schwermetallionen. Außerdem wurde PBS mit 5mM EDTA (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) angesetzt. Weiterhin wurde der AquaDye Mastermix (Invitrogen; Carlsbad, Californien, USA) hergestellt, indem er im Verhältnis 1:1000 mit einem Waschpuffer (*Cell Wash Buffer*, BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) verdünnt wurde. Mit Hilfe dieses Mastermixes konnte eine Aussage über die Viabilität der einzelnen Zelle getroffen werden. Für den CD14/CD16 Mastermix wurden Alexa-Fluor® 488 anti-human CD 14 (BioLegend; San Diego, California, USA) und PacificBlue anti-human CD 16 (BioLegend; San Diego, California, USA) mit einem Färbepuffer für diese Zellen (*Cell Staining Buffer*, BioLegend; San Diego, California, USA) und 5mM EDTA (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) verdünnt. Dieser Mastermix erlaubte die Identifizierung und Unterscheidung der Monozytensubpopulationen. Der Sekundär-Antikörper-Mastermix Maus sowie der Sekundär-Antikörper-Mastermix Ratte wurden ebenfalls mit einem Färbepuffer für diese Zellen (*Cell Staining Buffer*, BioLegend; San Diego, California, USA) und 5mM EDTA (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) verdünnt.

Anschließend wurden die kryokonservierten PBMCs zügig in einem Zellbad bei 37°C aufgetaut. Um schnell und effektiv eine Einzel-Zell-Suspension herzustellen, wurden die PBMCs durch ein Sieb (70µm Cell Strainer, Corning; Corning, New York, USA) gefiltert. Zusätzlich wurden die leeren Cryo-Einfriereröhrchen mit PBS/5mM EDTA ausgespült und durch das gleiche Sieb zu der Zellsuspension dazugegeben. Dann wurde je nach Zelldichte erneute PBS/5mM EDTA dazu gegeben. Das Zentrifugenröhrchen mit der Zellsuspension wurde zentrifugiert (300G, 15min, 4°C). Anschließend wurden die Zellen in 10µl Zellsuspension automatisiert mit Hilfe eines Zellzählgerätes (*Luna-FLTM Automated Cell Counter*; Logos Biosystems, Gyunggi-Do, Korea) gezählt. Das restliche Probenmaterial wurde bis 50ml mit PBS/5mM EDTA aufgefüllt und erneut zentrifugiert (300G, 15min, 4°C).

Danach wurde das Zellpellet in einer Lösung (Human TruStain FcX Fc Receptor Blocking Solution, BioLegend; San Diego, California, USA), die die freien Fc-Fragmente

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

blockierte, resuspendiert (3µl pro 100µl Zellsuspension). Fc-Rezeptoren sind auf vielen Zellen anzutreffen und somit auch auf PBMCs und den Monozyten im Speziellen vertreten. Die oben genannte Lösung sollte falsch-positive Ereignisse aufgrund von ungerichteter Antikörperbindungen durch die Fc-Rezeptoren minimieren. Das Gemisch inkubierte für 20 Minuten bei Raumtemperatur, bevor die Zellsuspension zu je 100µl in die Wells pipettiert wurde.

Daraufhin wurde 20µl des Primärantikörper (Lypoplate™ Screening Panels-Alexa Flour 647, BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) pro Well gemäß Vorlage (siehe Abbildung 21) hinzugefügt. Die Zellsuspension mit dem Primärantikörper wurde gemischt und inkubierte für 20 Minuten bei 4°C im Dunklen. Dann schloss sich ein Waschvorgang an. Dafür wurden 100µl Färbepuffer (*Cell Staining Buffer*, BioLegend; San Diego, California, USA) dazugegeben und die Platte wurde zentrifugiert (500G, 7min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die Platte vorsichtig abgetupft. Daraufhin wurde der gleiche Waschvorgang noch einmal wiederholt mit dem einzigen Unterschied, dass die dabei entstandenen Pellets in 200µl Färbepuffer (*Cell Staining Buffer*, BioLegend; San Diego, California, USA) resuspendiert wurden.

Im Anschluss wurden 100µl des Sekundär-Antikörper-Mastermix (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) pro Well dazugegeben. Dieser musste nun ebenfalls wie der Primärantikörper für 20 Minuten bei 4°C im Dunklen inkubieren. Hierauf schlossen sich wieder zwei Waschvorgänge an, die in ihrem Ablauf mit den beiden vorherigen Waschvorgängen übereinstimmten.

Darauffolgend wurden dann die Pellets in CD14/CD16-Mastermix resuspendiert. Die Platten mussten anschließend für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubieren. Im stetigen Fortgang schloss sich ein weiterer Waschvorgang an, bei dem die Pellets zuerst in 100µl Färbepuffer (*Cell Staining Buffer*, BioLegend; San Diego, California, USA) resuspendiert bevor die Platten dann zentrifugiert (500G, 7min, 4°C) wurden. Der Überstand wurde verworfen und die Platten mit Papierhandtüchern abgetupft.

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

In einem letzten Schritt wurde 100µl des AquaDye-Mastermix (Invitrogen; Carlsbad, Californien, USA) pro Well dazugegeben. Daraufhin mussten die Platten ein letztes Mal im Dunkeln bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubieren. Abschließend fand noch ein letzter Waschvorgang statt, der sich in seinem Ablauf nicht von dem vorherigen unterschied, bevor die Zellen dann in 150µl Färbepuffer (*Cell Staining Buffer*, BioLegend; San Diego, California, USA) aufgenommen und der durchflusszytometrischen Messung zugeführt wurden.

Abschließend konnte die Messung beginnen. Dabei erstellte die Software FACSuite Version 1.0 (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) pro gemessenes Well eine FCS-Datei. Die Messeinstellungen wurden dabei wie folgt konfiguriert: Die Akquisition der Probe wurde entweder nach der Aufnahme von 30.000 Monozyten oder nach einer Minute gestoppt. Die generierten Daten wurden dann mit der Software FACSDiva Version 6.3.1. (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) ausgewertet. Das Vorgehen ist in Abbildung 22 im Anhang exemplarisch für einen Oberflächenmarker dargestellt.

Biostatistische Auswertung

Die Auswertung der Ergebnisse der Oberflächenmarkeranalyse erfolgte mittels der Software FACSDiva Version 6.3.1. (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) und lieferte jeweils eine Datei mit allen Rohdaten für jeden Patienten. Diese Rohdaten wurden normalisiert mittels der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) für die Isotypenkontrollen. Dabei wurde die Differenz zwischen der MFI der Oberflächenmarker und der MFI der Isotypenkontrollen gebildet. Mit diesen normalisierten Daten wurden fortan alle weiteren Berechnungen durchgeführt.

Zunächst wurde der Median der einzelnen Subpopulation für jeden Oberflächenmarker berechnet. Daran schloss sich der Kohortenvergleich an, bei dem jede Subpopulation getrennt voneinander behandelt wurde. Dennoch war die Vorgehensweise für alle Subpopulation die Gleiche. Zuerst wurden die Oberflächenmarker, deren Median eine

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

MFI < 100 aufwies, herausgefiltert. Dieser Grenzwert sollte verhindern, dass ein mögliches Hintergrundrauschen die Ergebnisse verfälschte. Auf diejenigen Oberflächenmarker, bei denen der Median eine MFI > 100 aufwies, wurde ein Man-Whitney-U-Test angewandt. Bei den beiden Kohorten – NSTEMI und Ausschluss-KHK – handelt es sich um unabhängige Populationen. Der Unterschied zwischen den Werten für die MFI in den beiden Kohorten wurde als signifikant angesehen, wenn die Bedingung p-Wert < 0,05 erfüllt war. Für die Oberflächenmarker, die diese Bedingung erfüllten, wurde anschließend der Quotient („fold-change“; FC) bezogen auf die beiden Kohorten berechnet. Dabei sollten unter den Oberflächenmarkern mit einem signifikanten Unterschied ihrer MFI diejenigen identifiziert werden, deren Fluoreszenzintensitätsunterschied maximal groß war. Als Toleranzgrenze bezüglich des FCs wurden folgende Grenzen festgelegt: >1,5 bzw. <0,75. Eine Übersicht der Vorgehensweise bezüglich der statistischen Auswertung stellt Abbildung 5 dar.

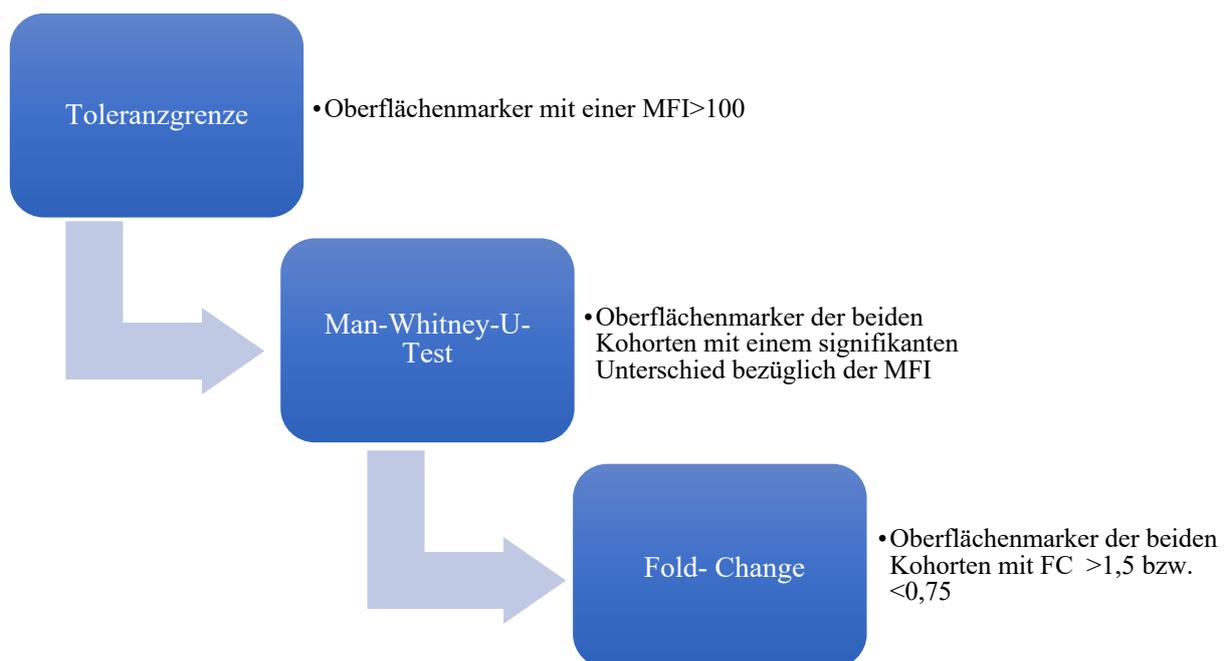


Abbildung 5: Entscheidungspfad für die biostatistische Auswertung. Bei der angegebenen MFI handelt es sich jeweils um die normalisierte MFI (MFI abzüglich Isotypen-MFI)

Bioinformatische Auswertung

Die bioinformatische Auswertung wurde mittels einer „*Gene set enrichment analysis*“ (GSEA) durchgeführt. Für die Analyse wurde auf die Molecular Signatures Database v6.0 (MSigDB) zurückgegriffen. Diese beinhaltet 17.779 Gensets, welche wiederum in acht große Untergruppen eingeteilt wurden. Für die hier vorliegende Studie wurde die Untergruppe zur Genontologie (C5) verwendet. Diese beinhaltet neben Gensets zur molekularen Funktion sowohl Gensets zu zellulären Bestandteilen als auch zu biologischen Prozessen (Subramanian et al., 2005).

Die GSEA wurde jeweils für alle Subpopulationen der Monozyten vergleichend in beiden Kohorten durchgeführt. Als Datensatz dienten die erhobenen Daten der Oberflächenmarkeranalyse (242 Oberflächenmarker). Um die Oberflächenmarker mit den Genets abgleichen zu können, bedurfte es einer einheitlichen Bezeichnung. In diesem Fall wurde ein AFFYMETRIX.Chip verwendet mit 56671 verschiedenen Annotationen. Die Phenotypen wurden einheitlich benannt: 1 für NSTEMI und 0 für Ausschluss-KHK.

Für die Analyse wurde zunächst eine sortierte Liste erstellt, bei der die Oberflächenmarker entsprechend ihrer Expression geordnet wurden. Anhand dieser Liste wurde der Anreicherungswert („*Enrichment Score*“; ES) berechnet auf der Grundlage einer Summenstatistik. Die Berechnung erfolgte in Anlehnung an den Kolmogorov-Smirnov-Test. Der ES beschreibt die maximale Abweichung von 0. Damit wurde eine Aussage darüber getroffen, ob ein Oberflächenmarker in der Liste des Datensatzes über- (positiver ES) oder unterrepräsentiert (negativer ES) war. Die Normalisierung des ES erfolgte durch das Geneset selbst und lieferte den normalisierten Anreicherungswert („*normalized Enrichment Score*“; NES).

Um die Signifikanz des ES bzw. des NES einzuschätzen, erfolgte die Berechnung des p-Wertes mittels Permutationen des Phänotyps (entweder NSTEMI oder Ausschluss-KHK). Die Zahl der Permutationen wurde im Verlauf gesteigert (10, 100, 1000, 10000). Der ES wurde jeweils neu berechnet. Dabei entstand eine Null-Verteilung für den ES. Eine solche um null symmetrische Verteilung liegt vor, wenn negative und positive Werte jeweils dieselbe Wahrscheinlichkeit besitzen. Der p-Wert berechnete sich dann aus dem initial

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

berechnetem ES bezogen auf die Null-Verteilung. Die Ergebnisse beziehen sich auf die Analyse mit 10000 Permutationen. Die Statistik wurde ergänzt durch die Berechnung der Falscherkennungsrate („*false discovery rate*“; FDR). Die FDR sollte gemäß der Empfehlung des Software Providers nicht über 25% liegen, wenn mit der Analyse beabsichtigt wurde, Hypothesen zu generieren.

Weiterhin ließ sich die Aussagekraft des ES bzw. des NES durch ein weiteres statistisches Verfahren genauer beschreiben. Dieses wurde als „*Leading Edge Analysis*“ (LEA) bezeichnet. Beispiele dafür befinden sich im Anhang (Abbildung 34 – Abbildung 65). Graphisch wurden durch die LEA die Oberflächenmarker charakterisiert, die zur ES beitrugen. Numerisch setzte sich die LEA aus drei Werten zusammen. „*Tags*“ bezeichneten dabei den prozentualen Anteil der Oberflächenmarker eines Gensets, die zu der „*Leading Edge*“ einer Subpopulation gehörten. Somit gab dieser statistische Wert an, wie viele Oberflächenmarker eines Gensets zum ES beitragen. Die „*List*“ gab an, welcher Anteil der sortierten Liste zu der „*Leading Edge*“ Subpopulation gehörten. Dies ermöglichte eine Aussage darüber, wo in der Liste der ES zu erwarten war. Kleinere Werte bedeuteten, dass nur wenige Oberflächenmarker in den Extrembereichen zu finden waren. Beide statistischen Werte trugen wiederum zum „*Signal*“ bei. Dieser statistische Wert machte eine Aussage bezüglich der Signalstärke des ES. Wenn sich die Oberflächenmarker eines Gensets innerhalb der ersten Position der sortierten Liste befanden und wenn von dem Genset viele Oberflächenmarker vorhanden waren, äußerte sich dies in einer hohen Signalstärke. Wenn das Genset über die ganze Liste verteilt war, dann verringerte sich die Signalstärke. Somit erlaubte die bioinformatische Auswertung der GSEA (Subramanian et al., 2005) neben einer qualitativen auch eine quantitative Aussage.

Ergebnisse

Patientencharakteristika

Insgesamt wurden 12 Patienten in die Studie eingeschlossen jeweils 6 Patienten mit NSTEMI und 6 Patienten mit einem Ausschluss einer KHK. Bezüglich der kardiovaskulären Risikofaktoren war ein Diabetes mellitus ein Ausschlusskriterium, da dieser mit einer Immunschwäche einhergeht.

	NSTEMI	Ausschluss-KHK	p-Wert
Probanden, n	6	6	
Geschlecht, n (%)	4 (66,7)	4 (66,7)	1
Alter, Median (IQR)	82 (57 - 82,25)	56 (49 - 62,75)	0,063
kardiovaskuläre Risikofaktoren			
arterielle Hypertension, n (%)	5 (83,3)	2 (33,3)	0,639
Body-Mass-Index, Median (IQR)	26 (23,5 - 28,25)	28,5 (23,25 - 36,76)	0,453
Raucher, n (%)	2 (33,3)	2 (33,3)	1
positive Familienanamnese, n (%)	1 (16,7)	0 (0)	

Tabelle 14: Patientencharakteristika I

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

	NSTEMI	Ausschluss-KHK
Probanden, n	6	6
laborchemische Parameter		
initiales Troponin [ng/l], Median (IQR)	29,3 (20,25 - 85,33)	-
initiales CK [U/l], Median (IQR)	389 (360 - 671)	-
initiales CK-MB [U/l], Median (IQR)	29 (26 - 50)	-
Klassifikation des MI		
Typ 1, n (%)	4 (66,7)	0
Typ 2, n (%)	2 (33,3)	0
KHK		
1-Gefäß KHK, n (%)	1 (16,67)	0
2-Gefäß KHK, n (%)	0 (0)	0
3-Gefäß KHK, n (%)	3 (50)	0

Tabelle 15: Patientencharakteristika II

Patienten mit NSTEMI

Insgesamt wurden 6 Patienten mit einem klinisch gesicherten NSTEMI in die Studie eingeschlossen. Auffällig dabei war, dass der Anteil der Männer (66%) unter den Studienpatienten dominierte. Das Alter dieser Patienten wies keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kohorten auf ($p=0,0632$). Darüber hinaus befanden sich alle Patienten überwiegend in dem Stadium des Präadipositas. Bezüglich des Nikotinabusus, stach ins Auge, dass es keinen Unterschied zwischen den beiden Kohorten diesbezüglich gab. Des Weiteren zeigte sich, dass lediglich die Patienten in der NSTEMI-Kohorte eine positive Familienanamnese aufwiesen. Darunter war zu verstehen, dass mindestens ein Verwandter 1. Grades einen Herzinfarkt in frühen Jahren erlitten hat (Frauen < 55 Jahre, Männer < 45 Jahre). Die Kohorte mit den NSTEMI-Patienten wies eine positive Troponindynamik auf. Hinsichtlich des Schweregrades der KHK fiel auf, dass die Mehrzahl der NSTEMI-Patienten an einer 3-Gefäß-KHK litt.

Patienten ohne KHK

Insgesamt wurden 6 Patienten mit einem gesicherten Ausschluss einer KHK in die Studie eingeschlossen. Die Patienten wiesen überwiegend einen Präadipositas auf gemessen am

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Body-Mass-Index (BMI). Weiterhin wies eine geringe Zahl der Patienten eine arterielle Hypertonie auf. Der Unterschied zwischen den beiden Kohorten war jedoch nicht signifikant ($p=0,6388$). Der Nikotinabusus fiel etwas geringer aus als in der NSTEMI-Kohorte. Entsprechend der Einschlusskriterien für die Kontrollgruppe wies keiner der Patienten eine manifeste KHK auf.

Vollblutanalysen

Bei dem Vollblut handelte es sich um unbehandeltes EDTA-Blut, welches einer durchflusszytometrischen Analyse zur Beurteilung der Monozytensubpopulationen unterzogen wurde. Bereits visuell zeigte sich im Verteilungsdiagramm unter Verwendung der fluoreszenzmarkierten Oberflächenantikörper CD14 und CD16 eine Verteilung der Monozyten auf drei Gruppen (siehe Abbildung 20 im Anhang). Dabei bildeten die $CD14^{++} CD16^{-}$ Monozyten die größte Population. Die mittlere Gruppe wurde gebildet von $CD14^{+} CD16^{++}$ Monozyten. Darüber hinaus war der Übergang zur kleinsten Subpopulation der Monozyten fließend und nicht immer eindeutig abgrenzbar.

In dieser Studie wurden die Vollblutproben (EDTA-Blut) aus den folgenden Gründen gesammelt: Zum einen wurde damit der Zweck verfolgt, eine Aussage über die Verteilung der einzelnen Subpopulationen der Monozyten treffen zu können sowohl im Vergleich der beiden Kohorten als auch, um einen potentiellen Einfluss der Kryokonservierung auf die Monozytenverteilung zu identifizieren. Darüber hinaus war eine durchflusszytometrische Vollblutanalyse obligatorisch, da die Blutentnahme bei den Patienten der NSTEMI-Kohorte peripher-arteriell und die in der Kohorte mit den Patienten mit einer A.-KHK peripher-venös erfolgte. Um die Vergleichbarkeit wiederherzustellen, wurde in der zuerst genannten Kohorte sowohl eine arterielle als auch eine venöse Vollblutprobe (EDTA-Blut; arteriell: 3ml; venös: 3ml) abgenommen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt. Sowohl im venösen Blut wie auch im arteriellen Blut fanden sich eine vergleichbare Verteilung der einzelnen Subpopulation. Dabei stellten die klassischen Monozyten die größte Gruppe mit ungefähr 90% dar. Die

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

restlichen 10% Prozent verteilten sich ca. hälftig auf die nicht-klassische und die intermediäre Subpopulationen. Nach Anwendung des Man-Whithney-U-Test bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich der unterschiedlichen Entnahmeorte ($p_{\text{klassisch}}=0,78$; $p_{\text{nicht-klassisch}}=0,46$; $p_{\text{intermediär}}=0,40$). Dies verdeutlichte, dass es keinen Anhalt für eine geänderte Verteilung der Monozytensubpopulationen abhängig von der Art der Blutentnahme (arteriell vs. venös) gab.

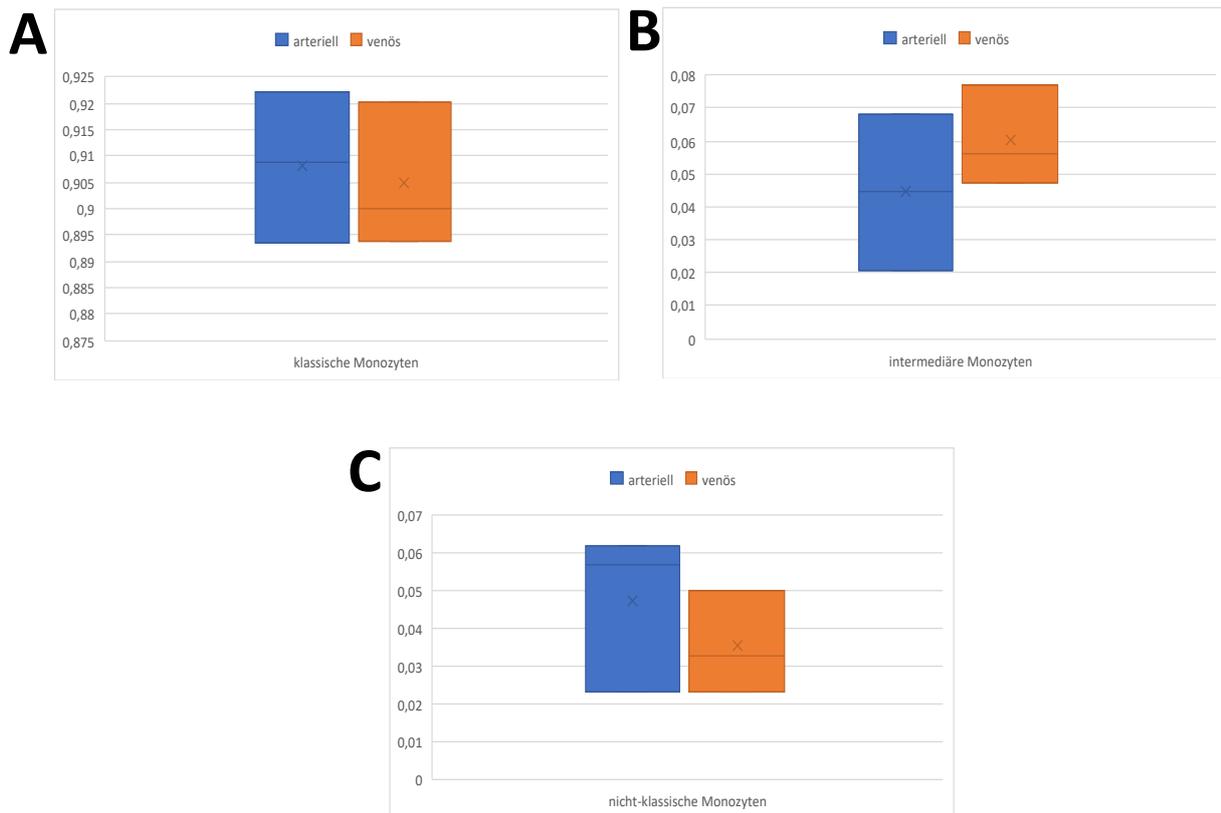


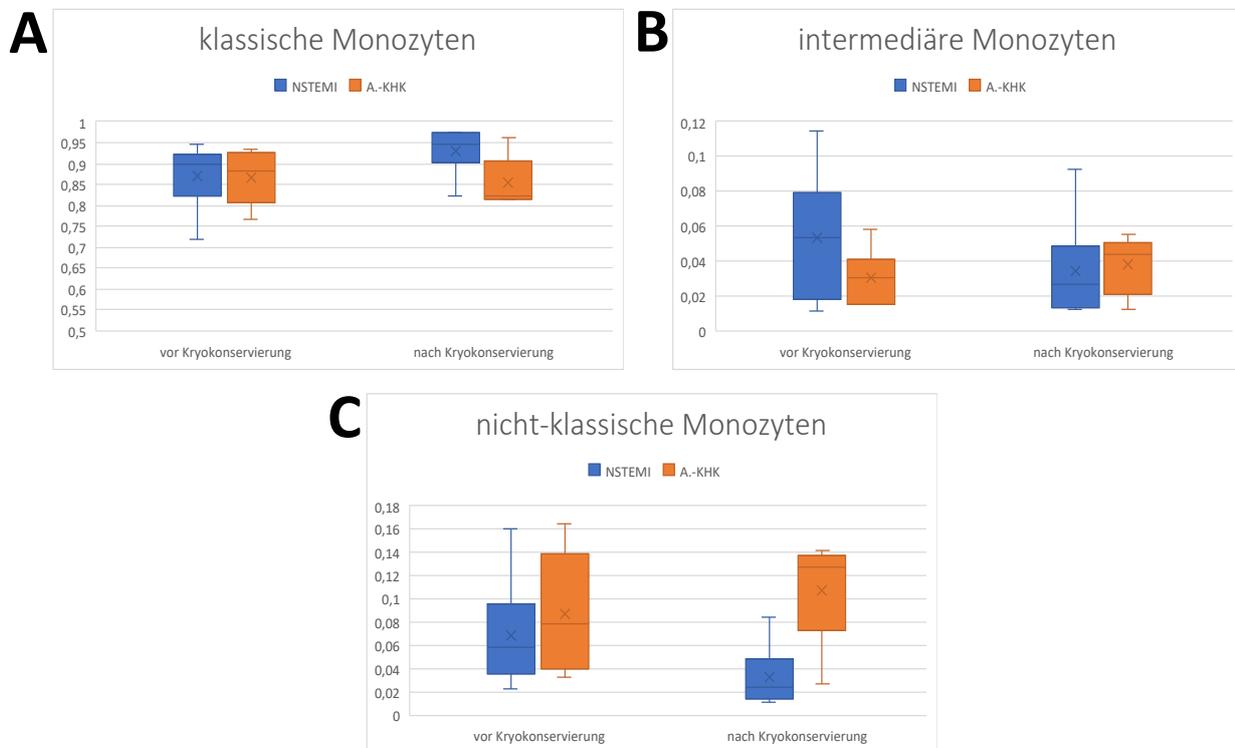
Abbildung 6: Vergleich der Verteilung der Monozytensubpopulationen [%] bezüglich der Art der Blutentnahme (arteriell vs. venös). A: klassischen Subpopulation ($p=0,78$); B: intermediären Subpopulation ($p=0,46$); C: nicht-klassischen Subpopulation ($p=0,40$)

Neben der Vergleichbarkeit bezüglich des Abnahmeortes (arteriell vs. venös) wurde in dieser Studie auch der Einfluss der Kryokonservierung auf die Monozyten nachgegangen. Der Vergleich erfolgte unter der Voraussetzung, dass alle Proben auf die gleiche Art und Weise prozessiert wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt. Dabei handelt es sich jeweils um die Verteilung der Monozyten in den einzelnen Subpopulationen vor dem Einfrieren und nach dem Auftauen. Aus Abbildung 7 geht hervor, dass es keinen

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

signifikanten Unterschied bezüglich der Kryokonservierung weder in der NSTEMI- noch in der A.-KHK-Kohorte gab.

Im Vergleich der beiden Kohorten war vor der Kryokonservierung der Anteil der nicht-klassischen Monozyten in der A.-KHK-Kohorte höher als in der Kohorte mit den NSTEMI-Patienten. Die Population der klassischen Monozyten war in beiden Kohorten ungefähr gleich. Bei den Beobachtungen handelte es sich um Tendenzen, da sich keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Kohorten vor der Kryokonservierung zeigte. Bei der Verteilung der Monozyten nach der Kryokonservierung änderten sich die Verhältnisse der einzelnen Subpopulationen. Der Anteil der nicht-klassischen Monozyten in der A.-KHK-Kohorte war höher als in der Kohorte mit den NSTEMI-Patienten. Genau reziprok verhielt es sich mit den klassischen Monozyten. Deren Anteil war in der NSTEMI-Kohorte höher. Nun zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Monozyten nach der Kryokonservierung. Dieser betraf die klassische und die nicht-klassische Population der Monozyten. Der Sachverhalt ist in Abbildung 7 graphisch dargestellt



Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Abbildung 7: Vergleich der Monozytensubpopulationen [%] bezüglich der Kryokonservierung (vor dem Einfrieren und nach dem Auftauen) und der Kohorten (NSTEMI vs. A.-KHK):

Kryokonservierung [$p_{\text{klassisch, NSTEMI}}=0,092$; $p_{\text{klassisch, A.-KHK}}=0,47$; $p_{\text{intermediär, NSTEMI}}=0,093$; $p_{\text{intermediär, A.-KHK}}=0,485$; $p_{\text{nicht-klassisch, NSTEMI}}=0,573$; $p_{\text{nicht-klassisch, A.-KHK}}=0,47$].

Kohortenvergleich vor Kryokonservierung [$p_{\text{klassisch, vor Kryokonservierung}}=0,937$; $p_{\text{intermediär, vor Kryokonservierung}}=0,31$; $p_{\text{nicht-klassisch, vor Kryokonservierung}}=0,393$].

Kohortenvergleich nach Kryokonservierung [$p_{\text{klassisch, nach Kryokonservierung}}=0,03$; $p_{\text{intermediär, nach Kryokonservierung}}=0,378$; $p_{\text{nicht-klassisch, nach Kryokonservierung}}=0,02$].

Bevor mit der Durchführung der Oberflächenmarkeranalyse begonnen wurde, wurde nach dem Auftauen die Größe und die Viabilität der einzelnen Proben gemessen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den beiden Kohorten bezüglich dieser beiden Parameter (siehe Abbildung 8).

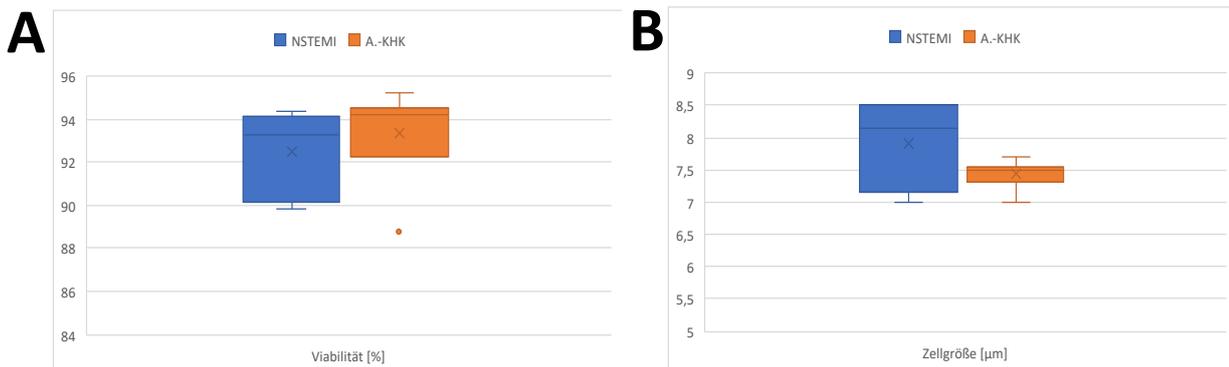


Abbildung 8: Viabilität [%] (A) und Zellgröße [µm] (B) der PBMCs in beiden Kohorten nach der Kryokonservierung [$p_{\text{Viabilität}}=0,519$; $p_{\text{Zellgröße}}=0,146$].

Biostatistische Auswertung der Oberflächenmarkeranalyse

Mittels des Lypoplate™ Screening Panel (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) konnte ein Oberflächenmarkeranalyse von insgesamt 242 Oberflächenmarkern mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern und durchflusszytometrischen Methoden durchgeführt werden. Nach einer umfangreichen biostatistischen Auswertung der Daten zeigten 30 Oberflächenmarker einen signifikanten Unterschied bezüglich ihrer Expression in den beiden Kohorten. Diese sind in Abbildung 9 – Abbildung 11 jeweils für die einzelnen Subpopulationen dargestellt.

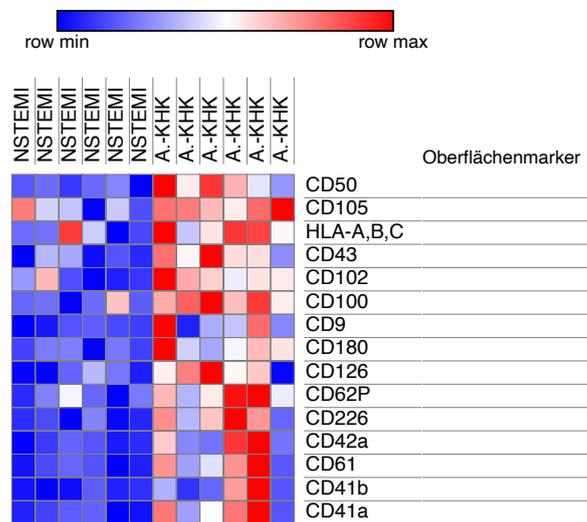


Abbildung 9: Oberflächenmarker der **klassischen** Subpopulation, deren Expression sich signifikant unterscheidet ($p < 0,05$) in den beiden Kohorten. (rot=hoch, pink=moderat, hell-blau=niedrig, dunkel-blau=sehr niedrig)

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

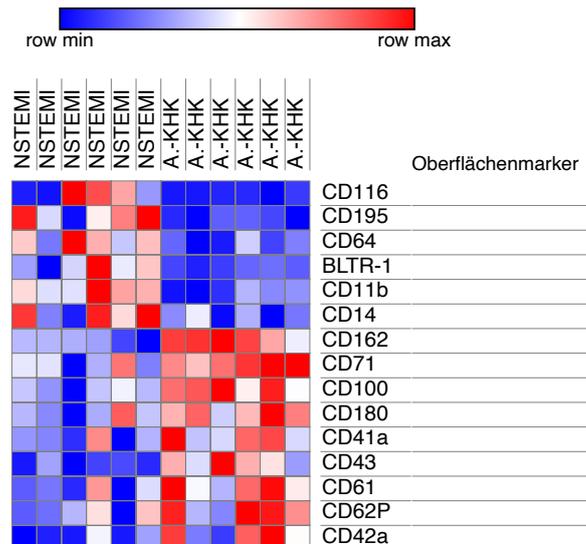


Abbildung 10: Oberflächenmarker der **intermediären** Subpopulation, deren Expression sich signifikant unterscheidet ($p < 0,05$) in den beiden Kohorten. (rot=hoch, pink=moderat, hellblau=niedrig, dunkel-blau=sehr niedrig)

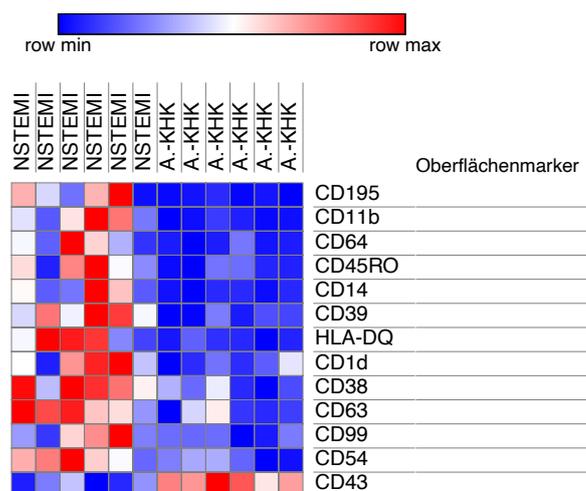


Abbildung 11: Oberflächenmarker der **nicht-klassischen** Subpopulation, deren Expression sich signifikant unterscheidet ($p < 0,05$) in den beiden Kohorten. (rot=hoch, pink=moderat, hellblau=niedrig, dunkel-blau=sehr niedrig)

In der Population der klassischen Monozyten, die die größte der drei Subpopulationen darstellte, waren die Oberflächenmarker in der NSTEMI-Kohorte tendenziell herunterreguliert. Bei den signifikant regulierten Oberflächenmarkern, die sich ausschließlich in der klassischen Subpopulation fanden, handelte es sich um HLA-A,B,C, CD9 („transmembrane 4 protein“, TM4), CD41b („integrin subunit alpha 2b“, ITGA2B), CD42a („glycoprotein IX platelet“, GP9), CD50 („intercellular adhesion molecule 3“,

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

ICAM3), CD102 („*intercellular adhesion molecule 2*“, ICAM2), CD105 („*endoglin*“) und CD226 („*DNAX accessory molecule 1*“, DNAM-1). Wohingegen BLTR-1, CD71 („*transferrin receptor*“, TFRC), CD116 („*colony stimulating factor 2 receptor alpha subunit*“, CSF2RA) und CD162 („*selectin P ligand*“, SELPLG) alleinig in der Subpopulation der intermediären Monozyten zu finden waren. HLA-DQ, CD1d, CD38 („*cyclic ADP ribose hydrolase*“, ADP-RC1), CD39 („*ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1*“, ENTPD1), CD45RO („*protein tyrosine phosphatase receptor type C*“, PTPRC), CD54 („*intercellular adhesion molecule 1*“, ICAM1) und CD63 fanden sich nur in der nicht-klassischen Subpopulation. Auffällig war zudem, dass Nummer sechs der NSTEMI-Probanden ein anderes Expressionsmuster für die genannten Oberflächenmarker aufwies im Vergleich zu den restlichen NSTEMI-Probanden.

Des Weiteren imponierte die Überschneidung der Oberflächenmarker in der klassischen und der intermediären sowie in der intermediären und der nicht-klassischen Subpopulation. Dabei stimmten fünf Oberflächenmarker in der klassischen und intermediären Subpopulation (CD180, CD100 („*semaphorin 4D*“, SEMA4D), CD62P („*selectin P*“, SELP), CD61 („*integrin subunit beta 3*“, ITGB3), CD43 („*sialophorin*“) sowie fünf weitere in der intermediären und der nicht-klassischen Subpopulation (CD195 („*C-C motif chemokine receptor 5*“, CCR5), CD64 („*Fc fragment of IgG receptor Ia*“, FCGR1A), CD43 („*sialophorin*“), CD14 („*lipopolysaccharid receptor*“, LPSR), CD11b („*integrin subunit alpha M*“, ITGAM)) überein. Die fünf zuletzt genannten Oberflächenmarker wurden insbesondere von Monozyten exprimiert. Darüber hinaus war CD43 in allen Subpopulationen signifikant exprimiert. Hinsichtlich der Expression von CD43 wies die intermediäre Subpopulation in der NSTEMI-Kohorte die größte MFI (Median der MFI: 13479) auf, gefolgt von der nicht-klassischen Subpopulation (Median der MFI: 7390) und der klassischen Subpopulation (Median der MFI: 5838). Die Expression von CD43 in den verschiedenen Subpopulationen sowie die Expression der anderen Oberflächenmarker finden sich im Anhang (Abbildung 29 – Abbildung 33).

Um den Erkenntnisgewinn des durchgeführten Screenings zu maximieren, wurde darüber hinaus eine GSEA durchgeführt. Diese erlaubte eine Identifikation von Oberflächenmarker, die eine funktionelle Gruppe bildeten.

Bioinformatische Auswertung der Oberflächenmarkeranalyse

Klassische Monozyten

Für die Durchführung der GSEA für die klassische Subpopulation der Monozyten wurden die Daten der Oberflächenrezeptoranalyse verwendet. Die verwendete Datenbank C5 der MSigDB v6.0 bestand ursprünglich aus 5917 Gensets, von denen 5511 Gensets aufgrund des gewählten Filters (Gensetgröße > 10) herausgefiltert wurden. Die verbleibenden 406 Gensets wurden für die bioinformatische Auswertung verwendet. Bezüglich der Größe der verwendeten Gensets betrug der Median 17 und das Maximum 146. Eine Übersicht der Expression der einzelnen Oberflächenmarker in den beiden Kohorten findet sich in Abbildung 23 im Anhang.

In der NSTEMI-Kohorte waren von 406 Gensets insgesamt 89 hochreguliert. Die statistische Signifikanz der hochregulierten Gensets ist in Tabelle 16 dargestellt. Detaillierte Informationen zu den einzelnen Gensets findet sich in Tabelle 25 im Anhang.

Statistik	Anzahl der Gensets
signifikant hochregulierten Gensets ($p < 0,05$)	7
signifikant hochregulierten Gensets ($p < 0,01$)	7
signifikant hochregulierten Gensets mit einer $FDR < 0,25$	5
<ul style="list-style-type: none"> • Median der „Tags“ [%] • Median der „List“ [%] • Median der Signalstärke [%] 	42
	11
	44

Tabelle 16: statistische Ergebnisse der GSEA für die **klassische** Subpopulation der NSTEMI-Kohorte

Einen Überblick über die Gensets, die in der klassischen Subpopulation signifikant hochreguliert waren, sowie der beteiligten Oberflächenmarker, die zu dem ES beitrugen,

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

liefert Abbildung 12. Die CD-Klassifikation der in Abbildung 12 aufgeführten Oberflächenmarker findet Tabelle 22 im Anhang.

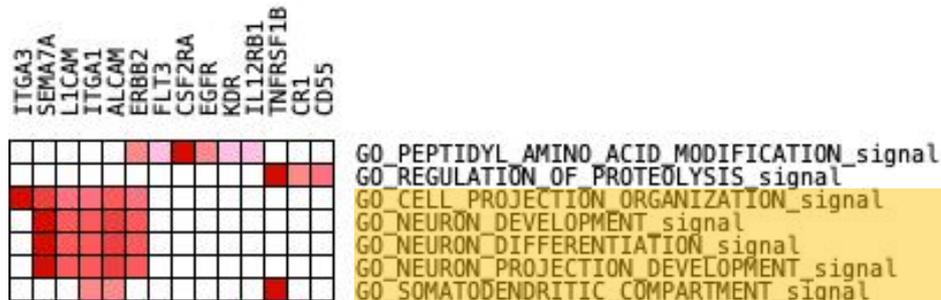


Abbildung 12: Übersicht über die hochregulierten Gensets ($p < 0,05$) inklusive der Oberflächenmarker der ES Subgruppe für die **klassische** Subpopulation. Die farblich hervorgehobenen Gensets weisen eine $FDR < 0,25$ auf. Die Expression der Oberflächenmarker ist farblich dargestellt (rot=hoch, pink=moderat, hell-blau=niedrig, dunkel-blau=sehr niedrig).

In Abbildung 12 zeigt sich, dass einige Oberflächenmarker in mehreren Gensets vertreten waren. Dieser Aspekt wird in Abbildung 24 im Anhang anhand von konkreten Zahlen verdeutlicht.

Aus Abbildung 12 und Abbildung 24 wird deutlich, dass die Mehrzahl der Gensets eine funktionelle Gruppe bildeten, die unter dem Aspekt der Entwicklung und Differenzierung von Neuronen subsummiert werden konnte. Die Grafiken mit den ES der signifikant hochregulierten Gensets ($p < 0,05$ & $FDR < 25\%$) mit allen dazugehörigen Oberflächenmarker befindet sich im Anhang (Abbildung 34 – Abbildung 38).

Intermediäre Monozyten

Für die GSEA der intermediären Subpopulation der Monozyten wurden die Daten der Oberflächenrezeptoranalyse verwendet. Die verwendete Datenbank C5 der MSigDB v6.0 bestand ursprünglich aus 5917 Gensets, von denen 5520 Gensets aufgrund des gewählten Filters (Gensetgröße > 10) herausgefiltert wurden. Die verbleibenden 397 Gensets wurden für die bioinformatische Auswertung verwendet. Bezüglich der Größe der verwendeten Gensets betrug der Median 17 und das Maximum 144. Eine Übersicht der Expression der einzelnen Oberflächenmarker in den beiden Kohorten findet sich in Abbildung 25.

In der NSTEMI-Kohorte waren von 397 Gensets insgesamt 133 hochreguliert. Die statistische Signifikanz der hochregulierten Gensets ist in Tabelle 17 dargestellt. Detaillierte Informationen zu den einzelnen Gensets findet sich in Tabelle 26 im Anhang.

Statistik	Anzahl der Gensets
signifikant hochregulierten Gensets (p<0,05)	27
signifikant hochregulierten Gensets (p<0,01)	27
signifikant hochregulierten Gensets mit einer FDR<0,25	21
<ul style="list-style-type: none"> • Median der „Tags“ [%] • Median der „List“ [%] • Median der Signalstärke [%] 	28
	11
	30

Tabelle 17: statistische Ergebnisse der GSEA für **intermediären** Subpopulation der NSTEMI-Kohorte

Einen Überblick über alle Gensets, die in der klassischen Subpopulation signifikant hochreguliert waren, sowie der Oberflächenmarker, die zu dem ES beitragen, liefert Abbildung 13. Die CD-Klassifikation der in Abbildung 13 aufgeführten Oberflächenmarker findet sich in Tabelle 23 im Anhang.

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

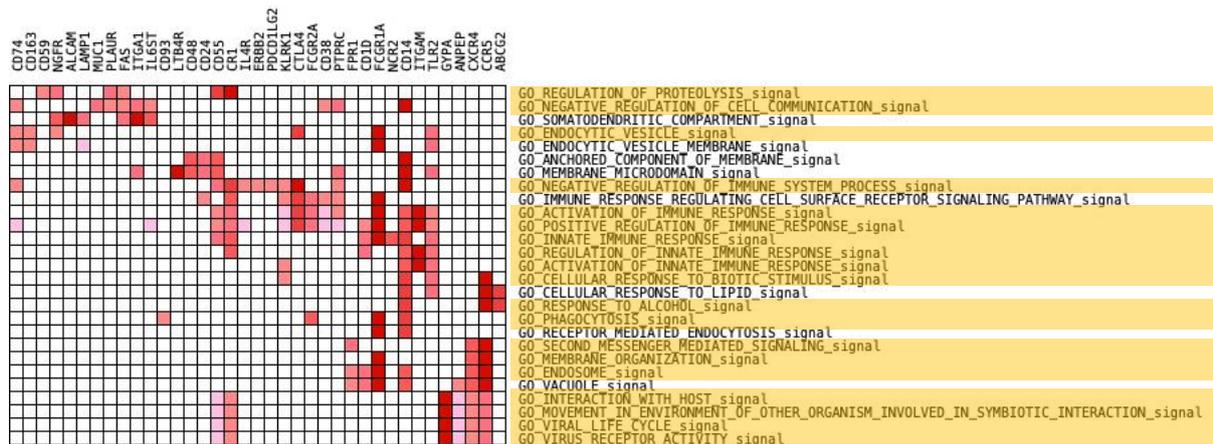


Abbildung 13: Übersicht über die hochregulierten Gensets ($p < 0,05$) inklusive der Oberflächenmarker der ES Subgruppe für die **intermediäre** Subpopulation. Die farblich hervorgehobenen Gensets weisen eine $FDR < 0,25$ auf. Die Expression der Oberflächenmarker ist farblich dargestellt (rot=hoch, pink=moderat, hell-blau=niedrig, dunkel-blau=sehr niedrig)

In Abbildung 13 zeigt sich, dass einige Oberflächenmarker in mehreren Gensets vertreten waren. Dieser Aspekt wird in Abbildung 26 im Anhang anhand von konkreten Zahlen verdeutlicht. Die Grafiken mit den ES der signifikant hochregulierten Gensets ($p < 0,05$ & $FDR < 25\%$) mit ihren dazugehörigen Oberflächenmarker befindet sich im Anhang (Abbildung 39 – Abbildung 57).

Aus Abbildung 13 und Abbildung 26 wird deutlich, dass die signifikanten Gensets im Wesentlichen zwei größere funktionelle Gruppen zuzuordnen waren. Die erste Gruppe umfasst hauptsächlich Gensets, die für das Immunsystem entscheidend waren. Der Schwerpunkt der zweiten großen Gruppe lag im transmembranösen Transport (Phagozytose, Vesikeltransportes und -sekretion). Die Gensets, die den beiden Gruppen zuzuordnen sind, sind in Tabelle 18 dargestellt.

Gruppe	Gensets
Immunsystem	GO_NEGATIVE_REGULATION_OF_IMMUN_SYSTEM_PROCESS
	GO_IMMUN_RESPONSE_REGULATING_CELL_SURFACE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY
	GO_ACTIVATION_OF_IMMUN_RESPONSE
	GO_POSITIVE_REGULATION_OF_IMMUN_RESPONSE

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Gruppe	Gensets
	GO_INNATE_IMMUN_RESPONSE GO_REGULATION_OF_INNATE_IMMUNE_RESPONSE GO_ACTIVATION_OF_INNATE_IMMUNE_RESPONSE GO_CELLULAR_RESPONSE_TO_BIOTIC_STIMULUS GO_CELLULAR_RESPONSE_TO_LIPID
Transmembranöser Transport	GO_ENDOCYTIC_VESICLE GO_ENDOCYTIC_VESICLE_MEMBRANE GO_PHAGOCYTOSIS GO_RECEPTOR_MEDIATED_ENDOCYTOSIS GO_SECOND_MESSENGER_MEDIATED_SIGNALING GO_MEMBRANE_ORGANIZATION GO_MEMBRANE_ORGANIZATION GO_ENDOSOME GO_VACUOLE

Tabelle 18: Gruppierung der signifikant hochregulierten Gensets in der intermediären Subpopulation

Nicht-Klassische Monozyten

Für die GSEA der nicht-klassischen Subpopulation der Monozyten wurden die Daten der Oberflächenrezeptoranalyse verwendet. Die verwendete Datenbank C5 der MSigDB v6.0 bestand ursprünglich aus 5917 Gensets, von denen 5520 Gensets aufgrund des gewählten Filters (Gensetgröße > 10) herausgefiltert wurden. Die verbliebenen 397 Gensets wurden für die bioinformatische Auswertung verwendet. Bezüglich der Größe der verwendeten Gensets betrug der Median 17 und das Maximum 144. Eine Übersicht der Expression der einzelnen Oberflächenmarker in den beiden Kohorten findet sich in Abbildung 27.

In der NSTEMI-Kohorte waren von 397 Gensets insgesamt 223 hochreguliert. Die statistische Signifikanz der hochregulierten Gensets ist in Tabelle 19 dargestellt. Detaillierte Informationen zu den einzelnen Gensets findet sich in Tabelle 27 im Anhang.

Statistik	Anzahl der Gensets
signifikant hochregulierten Gensets (p<0,05)	35
signifikant hochregulierten Gensets (p<0,01)	35
signifikant hochregulierten Gensets mit einer FDR<0,25	8
<ul style="list-style-type: none"> • Median der „Tags“ [%] 	50
<ul style="list-style-type: none"> • Median der „List“ [%] 	26
<ul style="list-style-type: none"> • Median der Signalstärke [%] 	61

Tabelle 19: statistische Ergebnisse der GSEA für **nicht-klassische** Subpopulation der NSTEMI-Kohorte

Einen Überblick über alle Gensets, die in der klassischen Subpopulation signifikant hochreguliert waren, sowie der Oberflächenmarker, die zu dem ES beitrugen, liefert Abbildung 14. Die CD-Klassifikation der Abbildung 14 aufgeführten Oberflächenmarker findet sich in Tabelle 24 im Anhang.

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

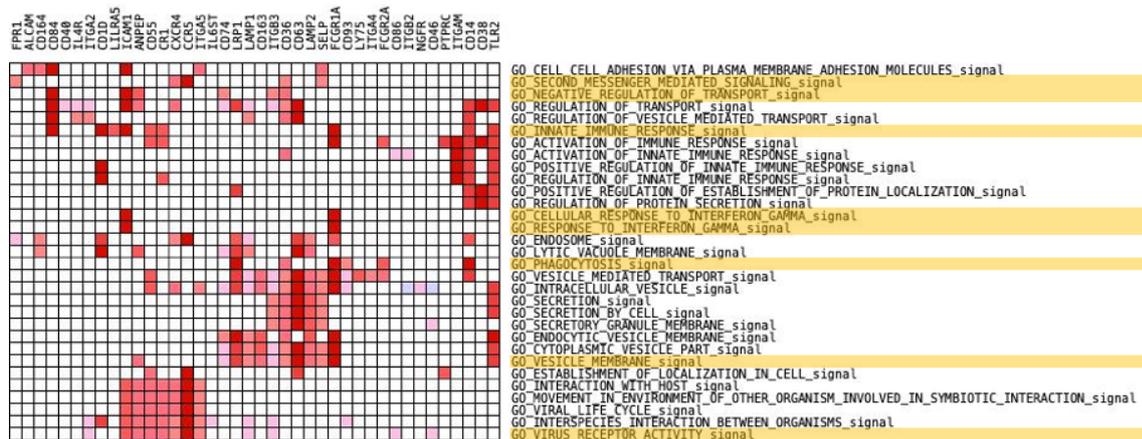


Abbildung 14: Übersicht über die hochregulierten Gensets ($p < 0,05$) inklusive der Oberflächenmarker der ES Subgruppe für die **nicht-klassische** Subpopulation. Die farblich hervorgehobenen Gensets weisen eine $FDR < 0,25$ auf. Die Expression der Oberflächenmarker ist farblich dargestellt (rot=hoch, pink=moderat, hell-blau=niedrig, dunkel-blau=sehr niedrig).

In Abbildung 14 zeigt sich, dass einige Oberflächenmarker in mehreren Gensets vertreten waren. Dieser Aspekt wird in Abbildung 28 anhand von konkreten Zahlen verdeutlicht. Die Grafiken mit den ES der signifikant hochregulierten Gensets ($p < 0,05$ & $FDR < 25\%$) mit all ihren dazugehörigen Oberflächenmarker befinden sich im Anhang (Abbildung 58 – Abbildung 65).

Die Mehrzahl der Gensets unter den signifikanten Gensets ($p < 0,05$) lassen sich in drei größere Gruppen gliedern. Bei der ersten Gruppe lag der Schwerpunkt auf dem Immunsystem. Die zweite Gruppe umfasste hauptsächlich die Entstehung und Zusammensetzung von Endozytose-Vesikel, wohingegen der Schwerpunkt der dritten Gruppe auf der Interaktion von körpereigenem und körperfremden Material lag. In Tabelle 20 sind die Gensets zusammengefasst, die die funktionellen Gruppen bilden.

Gruppe	Gensets
Immunsystem	GO_INNATE_IMMUNE_RESPONSE
	GO_ACITVATION_OF_IMMUNE_RESPONSE
	GO_ACITVATION_OF_INNATE_IMMUNE_RESPONSE

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Gruppe	Gensets
	<p>GO_POSITIVE_REGULATION_OF_INNATE_IMMUNE_RESPONSE</p> <p>GO_REGULATION_OF_INNATE_IMMUNE_RESPONSE</p>
Endozytose	<p>GO_CELL_CELL_ADHESION_VIA_PLASMA_MEMBRANE_ADHESION_MOLECULES</p> <p>GO_REGULATION_OF_TRANSPORT</p> <p>GO_REGULATION_OF_VESICLE_MEDIATED_TRANSPORT</p> <p>GO_VESICLE_MEDIATED_TRANSPORT</p> <p>GO_VESICLE_MEMBRANE</p> <p>GO_PHAGOCYTOSIS</p> <p>GO_ENDOCYTIC_VESICLE_MEMBRANE</p> <p>GO_INTRACELLULAR_VESICLE</p> <p>GO_CYTOPLASMIC_VESICLE_PART</p> <p>GO_ENDOSOME</p> <p>GO_LYTIC_VACUOLE_MEMBRANE</p> <p>GO_REGULATION_OF_PROTEIN_SECRETION, GO_SECRETION</p> <p>GO_SECRETION_BY_CELL</p> <p>GO_SECRETORY_GRANULE_MEMBRANE</p>
Interaktion von körpereigenem und körperfremden Material	<p>GO_ESTABLISHMENT_OF_LOCALIZATION_IN_THE_CELL</p> <p>GO_INTERACTION_WITH_HOST</p> <p>GO_MOVEMENT_IN_ENVIRONMENT_OF_OTHER_ORGANISM_INVOLVED_IN_SYMBIOTIC_INTERACTION</p>

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Gruppe	Gensets
	GO_VIRAL_LIFE_CIRCLE GO_INTERSPECIES_INTERACTION_BETWEEN_ORGANISMS GO_VIRUS_RECEPTOR_ACTIVITY.

Tabelle 20: Gruppierung der signifikant hochregulierten Gensets in der nicht-klassischen Subpopulation

Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Auswertungsmethoden

Neben den Unterschieden bezüglich der relevanten Oberflächenmarkern bezogen auf die zwei verschiedenen Auswertungen fanden sich auch zahlreiche Übereinstimmungen. Bei den Oberflächenmarkern, die sowohl in der biostatistischen als auch in der bioinformatischen Auswertung auftraten, handelte es sich in der intermediären Subpopulation um BLTR-1, CD11b („*integrin alpha M*“, ITGAM), CD14 („*lipopolysaccharid receptor*“, LPSR), CD64 („*Fc fragment of IgG receptor Ia*“, FCGR1A), CD195 („*C-C motif chemokine receptor 5*“, CCR5) und in der nicht-klassischen Subpopulation um CD1d, CD11b („*integrin alpha M*“, ITGAM), CD14 („*lipopolysaccharid receptor*“, LPSR), CD38 („*cyclic ADP ribose hydrolase*“, ADP-RC1), CD45RO („*protein tyrosine phosphatase receptor type C*“, PTPRC), CD54 („*intercellular adhesion molecule 1*“, ICAM1), CD63, CD64 („*Fc fragment of IgG receptor Ia*“, FCGR1A), CD195 („*C-C motif chemokine receptor 5*“, CCR5).

In der klassischen Subpopulation existierte keine Überschneidung von Oberflächenmarkern hinsichtlich der beiden Auswertungen.

Der Oberflächenmarker CD43 („*sialophorin*“), der in allen drei Subpopulationen in der biostatistischen Auswertung signifikant reguliert war, war in der bioinformatischen Auswertung nicht relevant. Dafür lieferte die zuletzt genannte Auswertung andere Oberflächenmarker, die in allen drei Subpopulationen zu finden waren. Dabei handelte es sich um CD35, CD55 und CD166 („*activated leukocyte cell adhesion molecule*“).

Diskussion

Das akute Koronarsyndrom und dessen Komplikationen stellen in Deutschland sowie in der westlichen Welt die häufigste Todesursache dar. Der Goldstandard in der Diagnostik ist die Bestimmung von cTnT und/oder cTnI. Da es sich sowohl bei der Atherosklerose als auch bei dem daraus resultierenden Myokardinfarkt um inflammatorische Ereignisse handelt, treten die Leukozyten und dabei insbesondere die Monozyten immer mehr in den Fokus der Forschung. Bisher ist wenig bekannt über den differenzierten Aktivierungszustand der Monozytensubpopulationen im Rahmen eines NSTEMI. Ich habe mich mit der Charakterisierung des Phänotyps der monozytären Subpopulationen nach deren Aktivierung befasst.

In die vorliegende Studie wurden je 6 Patienten pro Kohorte (NSTEMI vs. Ausschluss-KHK) eingeschlossen. Die erste Kohorte setzt sich zusammen aus Patienten mit einem laborchemischen und elektrokardiographisch diagnostizierten NSTEMI. Als Kontrollgruppe dienten sechs Patienten mit einem Ausschluss einer KHK. Aus dem peripher entnommenen 120 ml Vollblut der Patienten wurde die PBMC isoliert und kryokonserviert. Anschließend wurde eine Oberflächenmarkeranalyse durchgeführt, die neben Isotypenkontrollen 242 Antikörper gegen die verschiedensten Oberflächenmarker beinhaltete. Die Analysen erfolgte mittels Durchflusszytometer. Für die Auswertung der Daten wurde die Software FACSDiva Version 6.3.1. (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) verwendet. Microsoft Excel wurde für die statistische Auswertung benutzt. Für die bioinformatische Auswertung wurde GSEA (Broad Institute, Inc., Massachusetts Institute of Technology, and Regents of the University of California) verwendet.

Der Vergleich der Monozytenverhältnisse bezogen auf die einzelnen Subpopulationen vor dem Einfrieren und nach dem Auftauen zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$). Jedoch gab es einen signifikanten Unterschied bei der relativen Verteilung der klassischen und der nicht-klassischen Subpopulation im Kohorten-Vergleich. Aus der statistischen Auswertung gingen die im Anhang in den Abbildung 29 – Abbildung 33 dargestellten Oberflächenmarker hervor, deren Oberflächenrezeptorexpression sich signifikant in den

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Kohorten unterschied. Insgesamt handelte es sich dabei um 15 Oberflächenmarker in der klassischen, 15 Oberflächenmarker in der intermediären und 13 Oberflächenmarker in der nicht-klassischen Subpopulation. Insbesondere in der intermediären und der nicht-klassischen Subpopulation fanden sich zahlreiche Übereinstimmungen bezüglich der Oberflächenmarker.

Einige dieser Oberflächenmarker wurden in der bioinformatischen Auswertung bestätigt. Darüber hinaus waren insbesondere in der nicht-klassischen und in der intermediären Subpopulation Oberflächenmarker signifikant hochreguliert, die im Zusammenhang mit dem Prozess der Phagozytose standen. Im weiteren Verlauf erfolgt die Diskussion der angewandten Methode sowie deren Ergebnisse.

Praktikabilität der Methode

Die Oberflächenmarkeranalyse diente der Immunphänotypisierung der Monozytensubpopulationen

Das Lypoplate™ Screening Panel BD (Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) stellte die einmalige Möglichkeit dar, 242 humane Oberflächenmarker zeitgleich zu analysieren. Somit wurde damit eine umfassende Oberflächenmarkeranalyse ermöglicht. Die Analyse folgte dabei dem Prinzip eines Proteomik-Ansatzes unter der Bedingung, dass das Oberflächenrezeptorprofil der Monozyten das Ergebnis der intrazellulär ablaufenden Prozesse darstellte. Damit eine solche Oberflächenmarkeranalyse realisierbar war, mussten einige Voraussetzungen erfüllt sein. Im Besonderen musste ein leistungsfähiges Durchflusszytometer mit der entsprechenden Rechenkapazität zur Verfügung stehen.

Durchflusszytometer sind inzwischen bereits seit ca. 40 Jahren auf dem Markt, aber erst seit wenigen Jahren verfügen diese über Hochdurchsatzverfahren, bei denen mehrere Parameter gleichzeitig ausgewertet werden können (Robinson et al., 2012). Diese Voraussetzung ist essentiell für die Suche nach neuen Biomarkern für Diagnostik, Therapie und Prognostik. Im Laufe der Jahre kam man von dem Weg der hypothesenbasierten Biomarkersuche ab und verfolgte einen Proteomik-Ansatz (Paczesny et al., 2014). Dieser bot einige Vorteile: Neben einer umfassenderen Suche erlaubte diese Methode auch eine unvoreingenommene Herangehensweise. Somit wurden auch Biomarker in Betracht gezogen, die bei einem hypothesenbasierten Ansatz durch das Raster gefallen wären. Dabei eröffneten sich insbesondere für die Durchflusszytometrie sowohl in der Forschung wie auch in der Klinik gänzlich neue Anwendungsbereiche. Dies lag an den Möglichkeiten, die die Durchflusszytometrie mit sich brachte: Zum einen konnten aufgrund der verwendeten Antikörper mittels Fluorochrome bereits kleinste Mengen eines Analyten nachgewiesen werden. Außerdem bestand die Möglichkeit, neben der Zellmorphologie und Zellgröße auch den Aktivierungszustand der Zelle zu beschreiben. Konsekutiv ließen sich auch Subpopulationen definieren. Diese Eigenschaften machte man sich insbesondere bei der Phänotypisierung von Immunzellen zu Nutze, um immunologische Prozesse besser

nachvollziehen und überwachen zu können (Daniell, 2012). Anwendungsbereiche der Durchflusszytometrie fanden sich darüber hinaus auf dem Gebiet der Transplantationsmedizin (Maguire et al., 2015), in der Rheumatologie (Peng et al., 2015) sowie in der Pädiatrie (Paczesny et al., 2014), um nur einige wenige zu nennen. Damit stellte die Durchflusszytometrie eine gut etablierte Methode im Umgang mit Immunzellen dar. Auf dieser Grundlage basierte auch die vorliegende Studie.

Nach Modifikation der unspezifischen Oberflächenmarkeranalyse konnte die Identifikation der Monozytensubpopulationen direkt erfolgen

Aus den genannten Gründen kam in dieser Studie für die umfangreiche antikörperbasierte Oberflächenmarkeranalyse zur Charakterisierung der Monozyten im Rahmen eines NSTEMIs ebenfalls eine durchflusszytometrische Auswertung zum Einsatz. Da das Lypoplate™ Screening Panel BD (Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) nicht spezifisch für eine Zelllinie war, wurde das Protokoll des Herstellers laborintern so modifiziert, dass im konkreten Fall nach der Auswertung direkt die Werte der einzelnen Analyten für die jeweiligen Subpopulationen der Monozyten angezeigt wurden, ohne dass vorher die Monozyten aufwendig aus den PBMCs isoliert werden mussten. Bei dieser Modifikation handelte es sich um ein Alleinstellungsmerkmal dieser Methode, welche eine zusätzliche Effizienzsteigerung mit sich brachte.

Weder Blutentnahmeorte noch Kryokonservierung hatten einen signifikanten Einfluss auf die Monozytensubpopulationen

Bei dem Material, das bei der Oberflächenmarkeranalyse zum Einsatz kam, handelte sich um periphere Blutproben von sechs Patienten mit NSTEMI und sechs weiteren Patienten mit einem Ausschluss einer KHK. Die Blutproben wurden nicht nur peripher-venös sondern auch peripher-arteriell entnommen. Ein durchflusszytometrischer Vergleich der verschiedenen Blutprobenarten (arteriell vs. venös) in der NSTEMI-Kohorte zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Verteilung der Monozytensubpopulation gab [$p_{\text{klassisch}}=1,0$; $p_{\text{nicht-klassisch}}=0,400$; $p_{\text{intermediär}}=0,400$].

Die aus dem Vollblut isolierten PBMCs wurden bis zur Durchführung der Oberflächenmarkeranalyse kryokonserviert. Dabei wurde aus einem Vergleich der

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Verteilung der Monozyten vor dem Einfrieren und nach dem schonenden Auftauen ersichtlich, dass es keine signifikanten Unterschiede in den einzelnen Subpopulationen gab bezüglich der Kryokonservierung [$p(\text{NSTEMI}_{\text{klassisch}})=0,092$; $p(\text{NSTEMI}_{\text{nicht-klassisch}})=0,093$; $p(\text{NSTEMI}_{\text{intermediär}})=0,485$; $p(\text{A.-KHK}_{\text{klassisch}})=0,470$; $p(\text{A.-KHK}_{\text{nicht-klassisch}})=0,470$; $p(\text{A.-KHK}_{\text{intermediär}})=0,575$]. Diese Ergebnisse deckten sich mit laborintern erhobenen Daten: Mit Hilfe einer FACS-Analyse der mit AquaDye inkubierten PBMCs konnte gezeigt werden, dass es durch die Kryokonservierung zwar zu einem geringen Verlust der Viabilität der Zellen kam, dieser sich aber mit steigender Dauer der Konservierung relativierte. Nach zehn Tagen Lagerung bei -80°C lebten noch 91,3% der PBMCs der Probe. Im Vergleich dazu betrug der Prozentsatz an vitalen PBMCs in einer Probe, die nach 412 Tagen wieder aufgetaut wurde, 87,0%. Darüber hinaus konnte Kleeberger et al. bereits 1998 nachweisen, dass selbst eine Kryokonservierung von bis zu 12 Jahren keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebensrate der Zellen hat (Kleeberger et al., 1999). Diese Erkenntnis wurde bestätigt durch die Arbeiten von Lockmann et al. Er konnte mit seiner Arbeitsgruppe nachweisen, dass die PBMC nach der Kryokonservierung auch ihre phänotypischen Eigenschaften beibehielten (Lockmann and Schön, 2013).

Für die Oberflächenmarkeranalyse wurden die den löslichen Antikörpern überlegenen lyophilisierte Antikörper verwendet

Zum jetzigen Zeitpunkt gab es wenig Literatur, die sich mit dem Einsatz eines „Lypoplate™ Screening Panel BD (Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) befusste. Dies lag daran, dass die Methode relativ neu und zudem sehr kostspielig war. Villanova et al. konnte jedoch zeigen, dass die Oberflächenmarkeranalyse mit lyophilisierten Antikörpern hinsichtlich der Sensitivität sowie der Reproduzierbarkeit gegenüber einer konventionellen durchflusszytometrischen Analyse mit löslichen Antikörpern überlegen war (Villanova et al., 2013). Außerdem wiesen lyophilisierte Antikörper eine höhere Stabilität auf verglichen mit konventionellen, löslichen Antikörpern (Villanova et al., 2013). Darüber hinaus wies Villanova et al. nach, dass mit deren Verwendung im Vergleich zu Antikörperlösungen eine erhöhte Fluoreszenzintensität verbunden war (Villanova et al., 2013). Um die Tatsache zu berücksichtigen, dass bei einer sehr geringen MFI kein Unterschied zwischen der Fluoreszenz des gebundenen Antikörpers und der Autofluoreszenz der Zelle selbst

festzustellen war, wurde ein unterer Schwellenwert für die weitere Selektion der Werte festgelegt: Oberflächenmarker mit einer MFI <100 wurden für die weitere Auswertung nicht berücksichtigt. Der Hersteller machte weder Angaben noch sprach er Empfehlungen zu der Höhe eines solchen Schwellenwertes aus, sodass die Höhe der Grenze sich nach dem laborinternen Erfahrungswert mit dieser Methode richtete. Auch eine ausgiebige Literaturrecherche lieferte keinen Hinweis auf eine solche Grenze.

Das „rechteckige Gating“ führte zu einer homogenen Aufteilung der Monozytensubpopulationen

Aus dem umfangreichen Screening folgte ein nach abgeschlossener durchflusszytometrischer Analyse enorm komplexer Datensatz, der wiederum eigener Programme zur Auswertung bedurfte. In der Literatur werden verschiedene Methoden bezüglich der Auswertung der durchflusszytometrischen Daten kontrovers diskutiert.

Eine Cluster-Analyse mittels einer Heatmap stellte eine erste Möglichkeit dar, sich dem Datensatz zu nähern und Trends zu identifizieren insbesondere in Bezug auf zwei verschiedene Kohorten (Murphy, 1985). Es handelte sich jedoch nicht um eine quantitative Methode und bedurfte einer weiteren statistischen Auswertung. Ein quantitativer Ansatz, der die am häufigsten verwendete Methode zur Auswertung komplexer durchflusszytometrischer Daten darstellte, war das „Gating“ (Herzenberg et al., 2006). Unter „Gating“ versteht man die selektive Auswahl einzelner Populationen von Interesse. Es handelte sich dabei um einen kaskadenartigen Vorgang, bei dem die Population immer weiter eingegrenzt wurden unter Verwendung verschiedener Antikörper. Die größte Herausforderung bei diesem Verfahren bestand darin, die Monozytenpopulation sicher von anderen Zellpopulationen abzugrenzen sowie die Subpopulationen der Monozyten sicher zu identifizieren. Dies erfolgte mittels FSC/SSC sowie verschiedener Antikörper (CD11, CD14, CD16). Um die Reinheit der einzelnen Subpopulationen der Monozyten zu erhöhen, postulierte Graham et al. ein „Gating“ unter zu Hilfenahme von insgesamt sechs Antikörpern (CD11, CD14, CD16, CD36, CCR2, HLA-DR), welches die Reinheit im Mittel um 8% stiegen ließ (Thomas et al., 2017). Dem gegenüber stand ein hoher zeitlicher Aufwand sowie ein hoher finanzieller Aufwand hinsichtlich der Vielzahl der verwendeten Antikörper, welcher bei der bereits sehr

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

umfangreichen Oberflächenmarkeranalyse nicht zu realisieren war. Adam et al. verglich verschiedene „Gating“-Strategien (rechteckiges vs. trapezoides „Gating“, siehe Abbildung 15) und konnte zeigen, dass die undefinierte Subpopulation der Monozyten, die durch den Vergleich der beiden „Gating“-Strategien entstand, überwiegend Eigenschaften der intermediären Monozyten aufwies (Zawada et al., 2015). Zudem wurde in der Literatur häufiger das rechteckige „Gating“ verwendet, welches die zuvor genannte, undefinierte Subpopulation in die Subpopulation der intermediären Monozyten einschloss. Entsprechend der wenigen Angaben in der Literatur entschied ich mich ebenfalls für das rechteckige „Gating“.

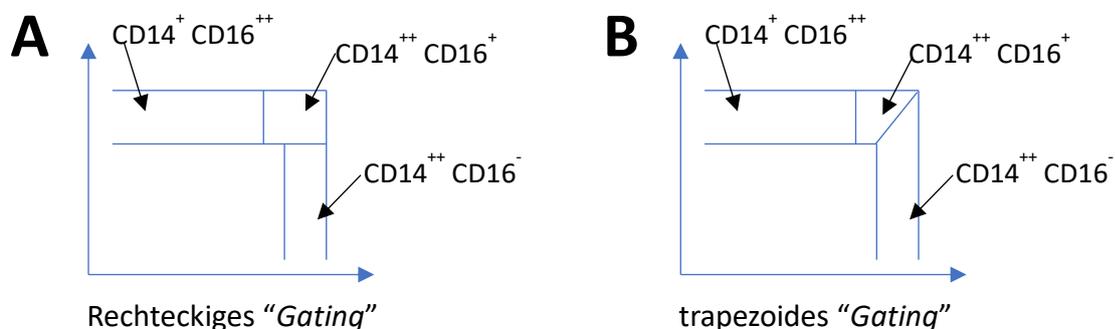


Abbildung 15: verschiedene "Gating"-Strategien (Die Monozyten sind hier nicht dargestellt, die Beschriftung gibt an, in welchem „Gate“ welche Subpopulation zu finden ist: klassische Monozyten ($CD14^{++} CD16^+$), intermediäre Monozyten ($CD14^{++} CD16^+$) und nicht-klassische Monozyten ($CD14^+ CD16^{++}$))

Der biostatistische und der bioinformatische Ansatz setzten verschiedene Schwerpunkte bei der Auswertung der Daten

Nachdem die Subpopulationen mit Hilfe der Software FACSDiva Version 6.3.1. (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) identifiziert waren, bedurfte es einer weiterführenden Auswertung der Oberflächenmarkeranalyse in Bezug auf die Subpopulationen. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Herangehensweisen gewählt, um dem Format des Screenings gerecht zu werden. Zuerst wurde eine klassische, biostatistische Auswertung durchgeführt mit dem Ziel, einzelne Oberflächenmarker zu identifizieren, deren Expression sich in den beiden Kohorten signifikant unterschied. Von besonderem Interesse waren dabei Oberflächenmarker, deren Expression sich in mehr als

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

einer Subpopulation ähnelte, da dies für ein erkrankungsspezifisches Merkmal sprechen könnte.

Für die Angabe zur Lage der Werte wurde der Median gewählt, da die Stichproben ($n=6$) klein war. Der Median wurde gerade bei kleinen Stichproben weniger von extremen Werten beeinflusst als das arithmetische Mittel (Lange and Bender, 2007). Dementsprechend wurde weiterhin für die deskriptive Statistik der Interquartilsabstand gewählt. Als statistisches Testverfahren diente der Man-Whitney-U-Test. Dabei handelte es sich um die aussagekräftigste, nicht-parametrische Alternative im Vergleich zum T-Test (Paszkowski-Rogacz et al., 2010). Der Man-Whitney-U-Test ist genauso wie der Median weniger anfällig für extreme Werte, sodass die Ergebnisse somit wenig verfälscht wurden.

Die hier vorgestellte biostatistische Auswertung lieferte neue, eindrucksvolle Erkenntnisse, war jedoch bei einem solch umfangreichen Datensatz – wie er bei der hier vorgestellten Oberflächenmarkeranalyse entstand – alleine nicht aussagekräftig. McDermott et al. kamen zu dem Schluss, dass eine Kombination aus einem statistischen sowie einem Datenbank-basiertem Ansatz am erfolgversprechendsten sei (Mcdermott et al., 2013). Mit letzterem ist eine Vorgehensweise gemeint, bei der bereits etablierte Datenbanken verwendet wurden, um ein differenzierteres Ergebnis bezüglich biologischer Interaktionen und Prozessen zu erhalten. Wu et al. gingen soweit, dass sie bei einem Screening mit einem Proteomik-Ansatz von einer systematischen Wissenschaft sprach, die eine Auswertung unter Berücksichtigung von Interaktionen und Signalwegen bedurfte (Peng et al., 2015). Eine Methode, die diesen Ansprüchen unter logischen Gesichtspunkten gerecht wurde, war die GSEA. Die GSEA für die Werte der Oberflächenmarkeranalyse wurde hier mittels der Software des Broad Institute, Inc. des Massachusetts Institute of Technology durchgeführt (Subramanian et al., 2005). Dafür wurde die MSigDB Datenbank v6.0 (Stand April 2017) verwendet.

Der größte Unterschied zur biostatistischen Auswertung war, dass die bioinformatische Methode sich nicht auf einzelne Oberflächenmarker beschränkte, sondern sich auf funktionelle Gruppen fokussierte. Dies war sinnvoll für die Auswertung von Screeningergebnissen, da es nur wenige Oberflächenmarker gab, die einen großen

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Unterschied bezüglich der MFI im Kohortenvergleich aufwiesen (siehe biostatistische Auswertung). Jedoch gab es einige Oberflächenmarker, die einen geringeren Unterschied diesbezüglich aufweisen. Wenn diese Oberflächenmarker zudem zu einer funktionellen Gruppe gehörten, erhielt dieses Ergebnis eine neue Aussagekraft.

Während andere Programme wie „DAVID“ (Sherman et al., 2007), „KEGG pathway“ (Kanehisa et al., 2009) und „cytoscape“ (Shannon et al., 2003) zur Auswertung benutzerdefinierte Bedingungen bezüglich der erhobenen Daten benötigten, stellte dies für die GSEA kein Hindernis dar. Aufgrund der Summenstatistik, die für die GSEA verwendet wurde, wurden auch Oberflächenmarker bei der Berechnung des ES berücksichtigt, die eine geringere MFI aufwiesen (Paszkowski-Rogacz et al., 2010). Bei dieser statistischen Methode handelte es sich um einen nicht-parametrischen Test, der aufgrund seiner Konzeption sensibel gegenüber kleinen Unterschieden in dem Datensatz war (Paszkowski-Rogacz et al., 2010). Aufgrund dieser Besonderheiten sind die Einsatzmöglichkeiten der GSEA in der Forschung sehr vielfältig. Zu den Anwendungsgebieten zählen u.a. Forschungsbereiche wie die Onkologie (Academica et al., 2015), die Gynäkologie (Cha et al., 2010) sowie die Dermatologie (Swindell et al., 2015).

Dass die Anwendung der GSEA in der vorliegenden Studie legitim war, darauf ging bereits die Veröffentlichung zur Beschreibung des Algorithmus, der für die Genexpressionsanalyse verwendet wurde, ein. Die aktuellste Version der GSEA (Version 6.2) fand bereits Anwendung für Datensätze, die im Rahmen von Proteomik-Analysen aus dem Serum gewonnen wurden (Subramanian et al., 2005). Gren et al. bediente sich ebenfalls dieser Methode bei gesunden Probanden und konnte damit zeigen, dass sich die Subpopulationen der Monozyten insbesondere in Genen unterschieden, die für Oberflächenmarker und immunregulatorische Prozesse kodierten (Gren et al., 2015). Aufgrund der genannten Vorteile wurde in der vorliegenden Studie ebenfalls eine GSEA mit dem Datensatz der umfangreichen Oberflächenmarkeranalyse durchgeführt, um signifikant hochregulierte funktionelle Gruppen von Oberflächenmarkern zu identifizieren mit Hinblick auf die Pathogenese, Diagnostik und Prognose bei NSTEMIs.

Zusammenfassend lag die Stärke der biostatistischen Auswertung in der Identifizierung derjenigen Oberflächenmarker, deren Expression einen besonders großen Unterschied im

Kohortenvergleich aufwiesen. Die GSEA hingegen beleuchtete nicht die einzelnen Oberflächenmarker, sondern wertete die Ergebnisse hinsichtlich funktioneller Gruppen und unter Berücksichtigung etablierter Signalwegen aus. Dass die Auswertungen bezüglich ihrer Ergebnisse (hier: signifikanter Oberflächenmarker) nicht vollends übereinstimmen mussten, lag an den verschiedenen Schwerpunkten. Beide Ansätze hatten jedoch ihre eigene Legitimation, wie sich im Verlauf zeigen wird.

Die vermehrte Expression von proinflammatorischen Oberflächenmarkern bestätigten die Praktikabilität der Methode

Die Ergebnisse dieser Studie bestätigten die Anwendbarkeit sowie die korrekte Durchführung und Auswertung der Methode. Es war zu erwarten, dass bei einem akuten inflammatorischen Ereignis wie dem eines NSTEMIs tendenziell proinflammatorische Oberflächenmarker hoch- bzw. antiinflammatorische herunterreguliert sein würden. Darüber hinaus war anzunehmen, dass Oberflächenmarker, die für die Migration der Monozyten verantwortlich waren, ebenfalls hochreguliert sein sollten. Mit diesen Annahmen beschäftigte sich auch Ruparelia et al.. Sie stellte die Hypothese auf, dass ein akuter Myokardinfarkt inflammatorische und proliferatorische Signalwege sowohl in der Maus als auch beim Menschen aktiviere. Bei den in ihrer Studie relevanten Genen handelte es sich um die Gene für CD14 („*lipopolysaccharid receptor*“, LPSR), LGALS1, CD11b („*integrin alpha M*“, ITGAM), CD163, CD119 („*interferon gamma receptor 1*“, IFNGR1), CYBB sowie CD282 („*toll like receptor 2*“, TLR2) (Ruparelia et al., 2015). Diese konnten sowohl beim Menschen wie auch bei der Maus beobachtet werden. Die meisten der genannten Oberflächenmarker waren auch in der vorliegenden Studie relevant.

Die vorliegende Studie ging noch einen Schritt weiter, welcher in der Studie von Ruparelia et al nicht berücksichtigt wurde. In der vorliegenden Studie wurden darüber hinaus die Art des Myokardinfarktes genauer definiert und die Subpopulation der Monozyten mit in Betracht gezogen. Dieser Umstand vermag es, genauere wertvolle Informationen für das Krankheitsbild (NSTEMI) und dessen Risikostratifizierung zu liefern insbesondere vor dem Hintergrund, dass ein NSTEMIs im Vergleich zu einem STEMIs deutlich diffiziler zu diagnostizieren war. Bei den signifikanten Oberflächenmarkern der drei Subpopulationen handelt es sich u.a. um Oberflächenmarker, die an der Aktivierung des Immunsystems (CD14, CD32, CD35,

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

CD55, CD64, CD282) beteiligt waren. Darüber hinaus waren Oberflächenmarker signifikant reguliert, die eine wesentliche Rolle bei der Zelladhäsion und -migration (CD11b, CD43, CD54, CD61, CD62P, CD102, CD226), Zellaktivierung (CD63, CD105, CD116, CD273) sowie bei der Zellrekrutierung (CD184, CD195, BLTR-1) spielten. Darüber hinaus erlaubten die Ergebnisse der GSEA ebenfalls ganz neue Einblicke bezüglich der Phänotypisierung der Monozytensubpopulationen bei Patienten mit einem NSTEMI. Die Verteilung der genannten Oberflächenmarker auf die beiden Kohorten sowie auf die einzelnen Subpopulationen waren von besonderem Interesse. Auf beides soll im weiteren Verlauf eingegangen werden.

Monozytensubpopulationen

Die Monozytensubpopulationen weisen unter Verwendung der Fluorochromegekoppelten Antikörper CD14 & CD16 eine charakteristische Verteilung auf: Dabei stellen die klassischen Monozyten die größte Gruppe mit ungefähr 90% dar. Die restlichen 10% Prozent verteilen sich ca. hälftig auf die nicht-klassische und die intermediäre Subpopulation auf (Ziegler-heitbrock et al., 2014). Dieses Verteilungsmuster konnte in der vorliegenden Studie reproduziert werden und wich nicht signifikant von den Literaturwerten ab (siehe Abbildung 21).

Subpopulationen	Klassifikation	Häufigkeiten (Literatur)	Häufigkeiten (Experimentell)
klassisch	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻⁻	80 – 95%	82,1 – 94,65%
intermediär	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	2 – 11%	3,07 – 5,36%
nicht-klassisch	CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺	2 - 8%	3,17 – 12,7%

Tabelle 21: Häufigkeiten der Monozytensubpopulationen im Blut

NSTEMI-Patienten wiesen weniger nicht-klassischen Monozyten auf

Im Kohortenvergleich vor und nach der Kryokonservierung existierten in der klassischen ($p=0,03$) wie auch in der nicht-klassischen ($p=0,02$) Subpopulation nach dem Auftauen signifikante Unterschiede. Diese Unterschiede in den beiden Kohorten deuteten sich bereits vor der Kryokonservierung insbesondere in der nicht-klassischen Subpopulation an. Es handelte sich hierbei um einen Trend, da diese Unterschiede vor dem Einfrieren noch nicht signifikant waren ($p_{\text{klassisch}}=0,937$; $p_{\text{nicht-klassisch}}=0,393$). Insbesondere der Anteil der nicht-klassischen Monozyten stieg in der Kohorte mit den Patienten ohne KHK an. Dieser fiel hingegen in der NSTEMI-Kohorte ab. Die Veränderungen wurden jeweils kompensiert durch den Anstieg der klassischen Monozyten in der NSTEMI-Kohorte bzw. deren Abfall in der Ausschluss-KHK-Kohorte.

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Ähnliche Beobachtungen gab es für Patienten mit einem STEMI: Im Vergleich zu einer stabilen KHK wiesen Patienten mit einem STEMI mehr klassische Monozyten auf (Zhou et al., 2016). Zhao et al. konnte 2010 im Rahmen einer Genexpressionsanalyse nachweisen, dass im direkten Vergleich mit den klassischen Monozyten in der Subpopulation der nicht-klassischen Monozyten mehr proapoptotischen Gene in ihrer Expression hochreguliert waren (Zhao et al., 2010). Des Weiteren war die Population der klassischen Monozyten besser vor reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) geschützt, da sie im Rahmen ihrer inflammatorischen Aktivität häufiger ROS ausgesetzt waren bei der Bekämpfung von Pathogenen (Zhao et al., 2009).

Mit Hinblick auf Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose als Kriterien des Reifegrades einer Zelle wiesen klassische Monozyten aufgrund ihrer antiapoptotischen und proliferativen Eigenschaften einen geringeren Reifegrad als die CD16-positiven Monozyten auf (Wong et al., 2011). Letztere zeichneten sich insbesondere durch antiproliferative und proapoptotische Eigenschaften aus, wobei die nicht-klassischen Monozyten den höchsten Reifegrad aufwiesen (Ancuta et al., 2009). Sunderkötter et al. konnte bei Mäusen zeigen, dass Ly-6C^{high} Monozyten (ähnlich der klassischen Monozyten) eine Vorstufe der Ly-6C^{low} Monozyten (ähnlich der nicht-klassischen Monozyten) darstellten. Ly-6C^{high} Monozyten wanderten aus dem Knochenmark aus und entwickeln sich weiter zu Ly-6C^{low} Monozyten, indem sie diesen Rezeptor weitestgehend verloren (Sunderkötter et al., 2004). Die Dauer für diese Transition variierte je nach Aktivität des Immunsystems. Im Gegensatz dazu konnte Shantsila et al. im Rahmen von Untersuchungen bezüglich der Monozytopoese nachweisen, dass bereits während der Entwicklung der Monozyten alle drei Untergruppen vorzufinden waren (Shantsila et al., 2011). Folglich stand dies im Kontrast zu der These, dass es sich bei den einzelnen Untergruppen um verschiedene Entwicklungsstufen der Monozyten handele. Hoffmann et al. kombinierte die unterschiedlichen Thesen zu der Reifetheorie der Monozyten und sah in der intermediären Monozyten ein Übergangspopulation zwischen der klassischen und der nicht-klassischen Monozyten (Hoffmann et al., 2020).

Auch in den vorliegenden Daten zeigte sich, dass in der NSTEMI-Kohorte der Anteil der nicht-klassischen Monozyten geringer war als in der Kontrollgruppe. Eine potentielle Erklärung für den Rückgang der nicht-klassischen Monozyten in der NSTEMI-Kohorte

könnte womöglich in der erhöhten Anfälligkeit dieser Subpopulation gegenüber inflammatorischen Reizen, welche mit der vermehrten Bildung von ROS einhergehen, begründet sein. Wahrscheinlicher erscheint jedoch, dass – entsprechend den Auslegungen von Wong et al. – die Monozytenpopulation im Rahmen eines NSTEMIs ein vermindertes Reifestadium auswies. Denkbar wäre, dass die reifen nicht-klassischen Monozyten bereits das Gefäßsystem verlassen hatten, während simultan vermehrt noch unreife klassische Monozyten mobilisiert wurden. Dies könnte darüber hinaus auch erklären, warum der Anteil der klassischen Monozyten, die sich im Gefäßsystem befanden, höher war. Unter Berücksichtigung der Oberflächenmarkeranalyse unterstützten die vorliegenden Daten die Theorie der Reifestadien.

Der Phänotyp der aktivierten Monozytensubpopulationen ist in der NSTEMI-Kohorte der inflammatorischen Phase zuzuordnen

Italiani et al. konnte zeigen, dass die Monozyten nach der Aktivierung ihren Phänotyp änderten. Bei der in vitro Analyse der transkriptionellen Vorgänge von aktivierten Monozyten ließen sich vier Phasen identifizieren: die Rekrutierungsphase (I), die Initiationsphase (II), die Differenzierungsphase (III) und die Auflösungsphase (IV), wobei die inflammatorische Phase (Phase I-III) von Gene dominiert wurde, deren Produkte Bestandteil von inflammatorischen Signalwegen waren (Italiani et al., 2014). In der vorliegenden Studie konnten die Unterschiede in der Oberflächenmarkerexpression der Subpopulationen nach der Aktivierung der Monozyten im Rahmen eines NSTEMIS dargestellt werden. Beim Vergleich der vorliegenden Oberflächenrezeptorprofile der Subpopulationen mit den einzelnen Aktivierungsphasen, die in der Studie von Italiani et al. beschrieben wurden, zeigte sich, dass die Monozyten sich überwiegend in der „inflammatorischen Phase“ (Phase I & II) (Italiani et al., 2014) befanden. Dabei handelte es sich um eine frühe Phase im Rahmen der Aktivierung von Monozyten. Um welche Oberflächenmarker es sich dabei im Einzelnen handelte, darauf wird im Verlauf eingegangen werden. Entscheidende Kriterien für die Auswahl der signifikant regulierten Oberflächenmarker waren ein geringer Bekanntheitsgrad der selbigen gemessen an der Anzahl der verfügbaren Publikationen sowie die Relevanz und die Funktion des Oberflächenmarkers selbst

Die einzelnen Subpopulationen unterschieden sich bezüglich ihrer signifikant regulierten Oberflächenmarker im Kohortenvergleich

In der NSTEMI-Kohorte waren zahlreiche proinflammatorische Oberflächenmarker hochreguliert. Darüber hinaus konnte ich potentiell neue Oberflächenmarker identifizieren, die eine Diskriminierung zwischen den einzelnen Subpopulationen bei Vorliegen eines NSTEMIs erlaubten. Folgende Oberflächenmarker waren nur in einer Subpopulation signifikant reguliert. In der klassischen Subpopulation handelte es sich dabei um CD9 („*Transmembrane 4 protein*“, TM4), CD41b („*integrin subunit alpha 2b*“, ITGA2B), CD50 („*intercellular adhesion molecule 3*“, ICAM3), CD102 („*intercellular adhesion molecule 2*“, ICAM2), CD105 („*endoglin*“), CD126 („*interleukin 6 receptor*“, IL6R), CD226 („*DNAX accessory molecule 1*“, DNAM1), HLA-A,B,C. In der klassischen Subpopulation traten somit Oberflächenmarker auf, die eine wichtige Rolle für die Zelladhäsion spielen. Interleukine vermitteln darüber hinaus eine Zellaktivierung. Die Tatsache, dass in dieser Subpopulation die Oberflächenmarker tendenziell herunterreguliert waren, zeigte am ehesten die Unreife dieser Zellen. CD71 („*Transferrin receptor protein 1*“, TFRC), CD162 („*P-selectin glycoprotein ligand 1*“, SELPLG) und BLTR-1 fanden sich hingegen in der intermediären Subpopulation. Dabei handelte es sich um Oberflächenmarker, die relevant sind für die Zellproliferation, Zelladhäsion sowie Zellrekrutierung. Für die nicht-klassischen Subpopulation waren CD1d, CD38 („*cyclic ADP ribose hydrolase*“, ADP-RC1), CD45RO („*protein tyrosine phosphatase receptor type C*“, PTPRC), CD54 („*intercellular adhesion molecule 1*“, ICAM1), CD63, CD99 und HLA-DQ charakteristisch. Diese Oberflächenmarker spielen eine Rolle bei der Zellaktivierung (CD1d, CD45RO, CD63), -adhäsion (CD38, CD54) und -migration (CD99).

Um die Robustheit dieser Oberflächenmarker zu zeigen und mit Hinblick auf funktionelle Aspekte folgte eine GSEA. Dabei wurden folgende der zuvor genannten Oberflächenmarker durch die GSEA bestätigt: BLTR-1 wurde in der intermediären Subpopulation und CD1d, CD38 („*cyclic ADP ribose hydrolase*“, ADP-RC1), CD45RO („*protein tyrosine phosphatase receptor type C*“, PTPRC), CD54 („*intercellular adhesion molecule 1*“, ICAM1) sowie CD63 wurden in der nicht-klassischen Subpopulation nachgewiesen. In der klassischen Subpopulation gab es keine Übereinstimmung bei den

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

beiden Auswertungen. Bei den genannten Oberflächenmarkern handelte es sich um noch unbekannte Oberflächenmarker in Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen.

In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass es sich bei BLTR-1 um ein Chemokin handelte, das für die Regulation von Chemotaxis und Zytokinfreisetzung verantwortlich war (Poeckel and Funk, 2010). De Hoog et al. konnte darüber hinaus ebenfalls in einem Mausmodell zeigen, dass die Inhibition von BLTR-1 zu einer Reduktion der Infarktgröße führte aufgrund einer verminderten Anzahl proinflammatorischer Zytokine, die mit einer verminderten proinflammatorischen Immunantwort einhergingen (De Hoog et al., 2015).

CD1d, CD45RO und CD63 spielen vor allem eine Rolle in der Zellaktivierung. Der Oberflächenmarker CD45RO gehört zu der Familie der Oberflächenmarker CD45. Dabei handelte es sich um eine Protein-Tyrosin-Phosphatase, von der drei Isoformen aufgrund von alternativem Splicing existierten und die darüber hinaus relevant für die Zelldifferenzierung war (Saunders and Johnson, 2010). Der Oberflächenmarker CD1d auf Monozyten beeinflusste die Zellaktivierung durch die Präsentation von lipiden Antigenen für natürliche Killerzellen (Loffredo et al., 2014). CD63 gehörte zu der Familie der Tetraspanine und war als solches an der Regulation des intrazellulären Proteintransports beteiligt (Pols and Klumperman, 2009). Tippett et al. konnte für gesunde Probanden zeigen, dass die Monozyten im Verlauf ihrer Entwicklung den zuvor genannten Oberflächenmarker internalisierten, sodass seine Oberflächenexpression bei nicht-klassischen Monozyten am geringsten ausgeprägt war. Diese Ergebnisse standen im Einklang mit den hier vorliegenden Daten. Die neue Erkenntnis bestand jedoch darin, dass in der nicht-klassischen Subpopulation ein signifikanter Expressionsunterschied bezüglich dieser Oberflächenmarker zwischen den beiden Kohorten existierte. Demzufolge könnte der inflammatorische Reiz des NSTEMIs zu einer deutlich eingeschränkten Internalisierung von CD63 führen.

Anders verhielt es sich mit dem Oberflächenmarker CD38. Dieser beeinflusste die Prognose einer KHK negativ: So konnte in einem ex-vivo Modell gezeigt werden, dass CD38 zu einer Verminderung von endothelalem NADP(H) führte und damit durch eine

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

negative Beeinträchtigung der endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) eine verminderte Vasodilatation der Koronarien bewirkte (Boslett et al., 2017).

Die Datenlage bezüglich des Oberflächenmarkers CD54 war weniger eindeutig. Einerseits wurde CD54 als Oberflächenmarker propagiert, der das Risiko für einen Myokardinfarkt erhöhte, da CD54 verantwortlich war für Zelladhäsion und eine verminderte koronare Flussgeschwindigkeit (Hu et al., 2017). Andererseits kam eine Metaanalyse zu dem Schluss, dass es sich bei diesem Oberflächenmarker um einen protektiven Faktor bei einem Myokardinfarkt handelte (Liu et al., 2018). Hiermit zeigte sich der weiterführende Forschungsbedarf bezüglich dieses Oberflächenmarkers.

Oberflächenmarker für die Phagozytose waren bereits initial bei Ankunft in der Notaufnahme insbesondere bei nicht-klassischen Monozyten hochreguliert

In der bioinformatischen Auswertung mit Schwerpunkt auf die funktionellen Gruppen fiel auf, dass insbesondere Gensets in der nicht-klassischen Subpopulation hochreguliert waren, die dem Zweck der Phagozytose dienten. Folglich wurde deutlich, dass das Oberflächenrezeptorprofil hauptsächlich der nicht-klassischen aber auch der intermediären Subpopulation der NSTEMI-Kohorte nicht nur aus proinflammatorische sondern auch aus Oberflächenmarker, die die Inflammation begrenzen, bestand.

Djudjevic et al. zeigte, dass die Phagozytoseaktivität und -kapazität bei PBMCs von Patienten mit einer akuten, myokardialen Verletzung bei Aufnahme am höchsten und bereits am ersten Tag rückläufig war (P.M. et al., 2001). Dabei versteht sich Phagozytose als ein Prozess bestehend aus Zelladhäsion, Diapedese, Chemotaxis, Aufnahme von Partikeln, die zu einer Freisetzung von Granula/Vesikel sowie von „reactive oxygen species“ (ROS) führt. Saha et al. zeigte, dass diese Mikrovesikel bioaktive Moleküle (Proteine, mRNA, miRNA) enthielten, die eine entscheidende Rolle in der interzellulären Kommunikation und Zellaktivierung spielten (Saha et al., 2016).

Folglich stellt sich die Frage, ob die Mikrovesikel wichtige Information hinsichtlich einer erweiterten Risikostratifizierung oder der Prognose liefern könnten. Mikrovesikel, die aus Monozyten freigesetzt wurden, erlaubten als einzige Mikrovesikel eine unabhängige

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Vorhersage der kardiovaskulären Prognose von STEMI-Patienten (Chiva-Blanch et al., 2017a). In einer Langzeitstudie von Chiva-Blanch konnte gezeigt werden, dass erhöhte Level an monozytären aber auch thrombozytären Mikrovesikel mit einer erhöhten Inzidenz an Herzinsuffizienzen einherging nach einem akuten myokardialen Ereignis (Chiva-Blanch et al., 2017b). Dabei war die Fracht der Mikrovesikel entscheidend für den weiteren Verlauf (Inflammation vs. Reparatur) (Suades et al., 2015).

Die zuvor genannten Studien befassten sich nur mit Monozyten im Allgemeinen oder Leukozyten bei Patienten, die entweder retrospektiv ein STEMI bzw. prospektiv ein nicht weiter nicht differenziertes akutes myokardiales Ereignis erlitten hatten. Die Relevanz von Mikrovesikel wurde dennoch deutlich. Es handelt sich dabei um Produkte, die am Ende eines Prozesses stehen. Das Ziel sollte es jedoch sein, den Fokus auf den Beginn dieser Prozesse zulegen. Zum jetzigen Zeitpunkt war in der Literatur wenig bekannt bezüglich monozytärer Rezeptoren, die die Phagozytose nekrotischer Kardiomyozyten initiieren und steigern im Rahmen eines NSTEMIs. Die vorliegende Studie konnte zeigen, wie die Phagozytoseaktivität auf die einzelnen Subpopulationen der Monozyten verteilt war und welche Oberflächenmarker eine zentrale Rolle dabei einnahmen.

Die Phagozytose im Infarktgebiet ist eine grundlegende Voraussetzung für die Beendigung des inflammatorischen Reizes und somit für die Einleitung der Heilung des Myokards (Frangogiannis, 2008). Dehn et al. zeigte in einem in vitro Experimenten und in einem Mausmodell, dass CD36 nicht nur verantwortlich war für eine frühzeitige Phagozytose, sondern dass sich in Abwesenheit von CD36 weniger Monozyten zu Makrophagen differenzierten (Dehn and Thorp, 2018). Dies wirkte sich günstig auf das Überleben nach einem Myokardinfarkt aus.

Gemäß der Zellkulturergebnisse von Buechler et al. war CD163 ebenfalls involviert in den Prozess der Phagozytose und damit in den Übergang zwischen Inflammation und Reparatur mit Schwerpunkt auf der antiinflammatorischen Immunantwort (Buechler et al., 2000). Der Oberflächenmarker CD163 war dabei von besonderem Interesse, da er sich ausschließlich in der monozytären Zelllinie wiederfand. Neuere Studien von Guo et al. widerlegten die atheroprotektive Eigenschaften von CD163. Guo et al. zeigte, dass CD163 mitverantwortlich war für die Progression von Plaques und im Zuge dessen die

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Angiogenese im Plaque und damit die Rekrutierung weiterer Immunzellen förderte (Guo et al., 2018). Erneut wurde deutlich, wie komplex die Pathogenese der Atherosklerose ist.

Darüber hinaus existierten neben den protektiven Oberflächenmarker im Rahmen der Phagozytose auch weitere Oberflächenmarker mit einem ungünstigen Effekt für die weitere Prognose eines Myokardinfarktes. Ein wichtiges Beispiel war CD32 („*Fc fragment of IgG receptor IIa*“, FCGR2A), ein Oberflächenmarker, der Inflammation induziert und aggraviert im Rahmen eines ACS (Anania et al., 2019).

Die Oberflächenmarker CD91 und CD93 hatten einen regulierenden Einfluss auf die Phagozytose im Mausmodell (Dimitrova et al., 2017). Darüber hinaus wurden hohe Spiegel der löslichen Form des Oberflächenmarkers CD93 (sCD93) als unabhängiger, negativer prognostischer Faktor im Rahmen eines ACS identifiziert (Youn et al., 2014). Die erhöhten Spiegel von sCD93 führten Youn et al. auf einen frühzeitigen Verlust dieses Oberflächenmarkers bei Monozyten zurück. Die Expression dieses Oberflächenmarkers war am stärksten ausgeprägt auf den intermediären, gefolgt von den nicht-klassischen Monozyten. Somit blieb offen, ob der Abnahmezeitpunkt zu früh im Verlauf des kardialen Ereignisses lag oder ob die Freisetzung von sCD93 nicht durch andere Zellen erfolgte (endotheliale Zellen, Leukozyten), die ebenfalls diesen Oberflächenmarker exprimierten.

Der Abnahmezeitpunkt in der vorliegenden Studie wurde früh gewählt und lag unmittelbar bei Ankunft in der Notaufnahme. Umso erstaunlicher war es und das konnte diese Studie zeigen, dass bereits relevante Oberflächenmarker, die im Zusammenhang mit der Phagozytose bzw. deren Regulation standen, in der NSTEMI-Kohorte signifikant hochreguliert waren. Somit waren bereits zu Beginn der Aktivierung der Monozyten Oberflächenmarker (CD36, CD91, CD163) insbesondere auf nicht-klassischen zirkulierenden Monozyten nachweisbar, deren Aufgabe die Eingrenzung bzw. im Verlauf die Beendigung des inflammatorischen Reizes sein würde. Dies war insbesondere mit Hinblick auf die Prognose und dem damit einhergehenden Remodeling von besonderer Relevanz.

Bei den intermediären und den nicht-klassischen Monozyten zeigten sich Überschneidungen hinsichtlich der signifikant regulierten Oberflächenmarker

Interessanterweise fanden sich neben den Oberflächenmarkern, die nur in einer Subpopulation auftraten, auch eine Vielzahl an Oberflächenmarker, deren Expression sich in mehr als nur einer Subpopulation signifikant unterschied. Bei den Überschneidungen in der klassischen und der intermediären Subpopulation handelte es sich um CD41a („*integrin subunit alpha 2a*“, ITGA2A), CD42a („*glycoprotein IX*“, GP9), CD43 („*sialophorin*“), CD61 („*integrin beta 3*“, ITGB3), CD62P („*P-selectin*“, SELP), CD100 („*semaphorin 4D*“, SEMA4D) und CD180. Die genannten Oberflächenmarker sind hauptsächlich relevant für die Zelladhäsion. Sowohl in der intermediären als auch in der nicht-klassischen Subpopulation fanden sich CD11b („*integrin alpha M*“, ITGAM), CD14 („*lipopolysaccharid receptor*“, LPSR), CD43 („*sialophorin*“), CD64 („*Fc gamma receptor Ia*“, FCGR1A), CD195 („*C-C motif chemokine receptor 5*“, CCR5). Diese Oberflächenmarker spielen eine Rolle bei der Zellrekrutierung (CD195), Zelladhäsion (CD11b, CD43) und bei der Phagozytose (CD64). Eine Dopplung der Oberflächenmarker in der klassischen und der nicht-klassischen Subpopulation gab es nur für CD43.

Die Überschneidungen zwischen die einzelnen Subpopulationen könnte ein weiteres Indiz dafür sein, dass es sich bei den Subpopulationen um ein Kontinuum handelt. Die größten Übereinstimmungen fanden sich dabei in der intermediären und der nicht-klassischen Subpopulation. Folglich waren die intermediäre und die nicht-klassische Subpopulation sich sehr ähnlich und glichen sich mehr als die intermediäre und die klassische bzw. die nicht-klassische und die klassische Subpopulation. Von den genannten Oberflächenmarkern wurden CD11b, CD64 und CD195 durch die bioinformatische Auswertung bestätigt.

Der Oberflächenmarker CD195 ist ein Chemokin-Rezeptor. Zamilpa et al. zeigte in einem Mausmodell, dass eine Depletion von CD195 mit einem vermehrten Remodeling-Prozess einherging, da weniger Monozyten das Infarktgebiet erreichten und weniger T-Zellen aktiviert wurden, sodass es zu keiner adäquaten Heilung mit Narbenbildung kommen konnte (Zamilpa et al., 2011). Diese Arbeit verdeutlichte die Relevanz einer zeitnahen funktionierenden Rekrutierung der Monozyten. Bei dem Oberflächenmarker CD11b handelt es sich um eine alpha Integrin Untereinheit, welche sowohl mit verantwortlich

war für die Zelladhäsion als auch für die Phagozytose von in Komplementfaktoren eingehüllten Partikel (Chen et al., 2019).

Bei dem Oberflächenmarker CD64 handelt es sich um das Fc Fragment des IgG Rezeptors Ia. Dieser Oberflächenmarker wurde bereits als Biomarker für die Diagnostik bzw. als Surrogatmarker im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (Matt et al., 2015) oder dem systemischen Lupus erythematosus (Kikuchi-Taura et al., 2015) diskutiert. Ein ähnliches Verhalten bezüglich CD64 wurde von Clanchy et al. beschrieben. Mit Hilfe einer ex vivo Stimulation mit Interferon γ , einem proinflammatorischen Zytokin, konnte gezeigt werden, dass die Monozyten mit einem Anstieg der Expression von CD64 reagieren (Clanchy, 2016).

Die differenzierte Betrachtung der einzelnen Subpopulationen führte zur Identifizierung von Subpopulationen-überschreitende erkrankungsspezifische Merkmale

Aufgrund der großen Ähnlichkeit der intermediären und der nicht-klassischen Monozyten im aktivierten Zustand (hier: NSTEMI) war fraglich, ob eine differenzierte Betrachtung dieser beiden Subpopulation einen Mehrwert erbrachte. Insbesondere in der bioinformatischen Auswertung, bei der der Fokus auf den funktionellen Aspekten der Subpopulationen lag, stimmten zahlreiche signifikant regulierte Gensets in den beiden Subpopulationen überein. Somit könnte die intermediäre Subpopulation als Transferphase zwischen der klassischen und der nicht-klassischen Subpopulation angesehen werden. Wobei sich der Schwerpunkt in den vorliegenden Daten in Richtung der nicht-klassischen Subpopulation verschoben hatte. Nichtsdestotrotz war die intermediäre Subpopulation nicht weniger bedeutend.

Auch in der Literatur fanden sich widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der monozytären Subpopulationen im Rahmen der kardiovaskulärer Risikostratifizierung. Rogacev et al. konnte zeigen, dass die nicht-klassischen Monozyten bei Erkrankungen, die mit einem inflammatorischen Zustand einhergingen, eine besondere Rolle in der Pathogenese einnahmen (Rogacev et al., 2015). Weiterhin konnte die Gruppe um Rogacev nachweisen, dass die intermediären Subpopulation einen unabhängigen

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Risikofaktor für die Vorhersage von kardiovaskulären Ereignissen darstellte (Rogacev et al., 2012). Bei sequenziellen Bestimmungen der Monozytensubpopulationen bei Patienten nach STEMI wurden ebenfalls die intermediären Monozyten als unabhängiger zuverlässiger Risikofaktor bestätigt: Diese erreichten am zweiten Tag nach dem Ereignis (hier: STEMI) ihren Höhepunkt und ihre Konzentration war noch für weitere fünf Tage erhöht (Zhou et al., 2016). Tsujioka et al. identifizierte hingegen die klassischen Monozyten als unabhängigen Risikofaktor für das Ausmaß der untergegangenen Kardiomyozyten im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes (Tsujioka et al., 2009). In der vorliegenden Studie spielte die klassische Subpopulation eine eher untergeordnete Rolle bei der Aktivierung der Monozyten, da die signifikant exprimierten Oberflächenmarker in der NSTEMI-Kohorte herunterreguliert waren.

Aufgrund der nicht eindeutigen Studienlage bezüglich der Subpopulationen stellte sich weiterhin die Frage nach der Notwendigkeit der Differenzierung der Monozyten, da es Oberflächenmarker gab, deren Expression sich in der NSTEMI-Kohorte signifikant in allen drei Subpopulation von denen in der Kontrollgruppe unterschied. Bei diesen Oberflächenmarker handelte es sich um CD43 gemäß der biostatistischen Auswertung. Dieser wurde durch die Oberflächenmarker CD35 („*complement C3b/C4b receptor 1*“, CR1), CD55 („*complement decay accelerating factor*“, DAF) und CD166 („*activated leukocyte cell adhesion molecule*“, ALCAM) aus der bioinformatischen Auswertung ergänzt.

Die drei zuletzt genannten Oberflächenmarker spielen eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion und in der Regulation des Komplementsystems. Das Komplementsystem ist beteiligt an der Pathogenese der Atherosklerose (Torzewski et al., 1998). Vries et al. konnte in einem ex vivo Modell zeigen, dass eine verminderte Expression von CD35 mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko korrelierte, da dadurch die Beseitigung von Lipoproteinen und freien Immunkomplexen vermindert war (de Vries et al., 2017). Ähnlich sah es mit der Datenlage für die anderen beiden hier genannten Oberflächenmarker aus. Der Oberflächenmarker CD55 war bei Patienten mit Diabetes Typ 2 und makrovaskulären Erkrankungen vermindert. Zudem konnten in einem in vitro Experimente gezeigt werden, dass CD55 bei der Gabe von Statinen signifikant anstieg (Ma et al., 2009). Dementsprechend deutete eine verminderte Regulation des

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Komplementsystems auf ein erhöhtes Ausmaß an komplement-induziertem Schaden hin. Erstaunlich war dabei, dass zum einen diese vier Oberflächenmarker von allen Subpopulation in der NSTEMI-Kohorte signifikant exprimiert wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe. Darüber hinaus war die Hälfte dieser Oberflächenmarker (CD35, CD55) durch ihre regulatorischen Effekte für die Eingrenzung der Inflammation verantwortlich.

Der Oberflächenmarker CD166 wurde im Kontext von kardiovaskulären Erkrankungen noch nicht beschrieben. Dieser Oberflächenmarker ist an der Regulation von Zelladhäsion und Zellmigration beteiligt und wurde in diesem Zusammenhang mehrfach mit der Entstehung von Malignomen in Verbindung gebracht (Smith et al., 2017) (Xiao et al., 2016). Der Oberflächenmarker CD43 ist ebenfalls an der Zelladhäsion und -rekrutierung in das Gebiet der Inflammation beteiligt (Alisson-Silva et al., 2019). Im Rahmen von Infektionen konnte in einem „knock-out“ Mausmodell gezeigt werden, dass eine verminderte Expression von CD43 mit einer Dysregulation des Immunsystems und folglich mit einer geringeren, monozytären Infiltration einherging (Alisson-Silva et al., 2019).

Auffällig war nichtsdestotrotz, dass sowohl CD43 als auch die drei zuvor genannten Oberflächenmarker sich in ihrer Expression signifikant in allen Subpopulation unterschieden im Vergleich zur Kontrollkohorte. Folglich war anzunehmen, dass es sich bei diesen CD35⁺/CD43⁻/CD55⁺/CD166⁺-Monozyten um eine erkrankungsspezifische Subpopulation handeln könnte.

Monozyten nahmen eine zentrale Rolle in der erweiterten Risikostratifizierung bei einem NSTEMI ein

Die Relevanz von Monozyten im Rahmen von akuten kardialen Ereignissen wurde mehrfach hervorgehoben. Insbesondere die Tatsache, dass Monozyten von der Entwicklung der Atherosklerose bis zum Zeitpunkt des Myokardinfarktes eine zentrale Rolle während der Inflammation spielten, zeigte die Sinnhaftigkeit und Notwendigkeit eines oder mehrerer komplementärer Biomarker zur Beurteilung der Aktivierung des Immunsystems. Der Fokus der aktuellen Forschung lag u.a. auf der Suche nach inflammatorischen Biomarkern für die Risikostratifizierung von kardiovaskulären

Erkrankungen. Dies zeigte sich auch anhand der Aktualität der Arbeiten zu einzelnen Oberflächenmarkern. Die vorliegende Studie ging dabei explizit auf das Oberflächenrezeptorprofil der einzelnen Subpopulation im Rahmen eines NSTEMIs ein. Der Fokus auf eine NSTEMI-Kohorte war dabei besonders relevant, da die Diagnose eines NSTEMIs im Vergleich zu dem eindrücklichen klinischen und diagnostischen Bild eines STEMI deutlich schwieriger war. Im weiteren Verlauf wird abschließend auf die Eignung der Monozyten sowie ihrer Subpopulationen als komplementäre Biomarker bei der Risikostratifizierung eingegangen werden.

Zu den Merkmalen, in denen die Monozyten mit den etablierten, kardiovaskulären Biomarkern übereinstimmten, zählten folgende: Die Anzahl der Monozyten im peripheren Blut war ausreichend hoch, um sie dort effizient nachzuweisen (Nahrendorf et al., 2010). Außerdem stieg ihre Zahl entsprechend der Schwere und des Ausmaßes des akuten Koronarsyndroms initial nach dem ischämischen Ereignis. (Madjid et al., 2004). Darüber hinaus konnte eine laborinterne Forschungsgruppe um Liebetrau et al. zeigen, dass Monozyten neben neutrophilen Granulozyten mit die ersten Zellen waren, die bereits nach zwei Stunden in das Infarktgebiet einwanderten (Liebetrau et al., 2015b). Dies war von besonderer Relevanz, da die Anzahl der apoptotischen Kardiomyozyten aufgrund von Hypoxie ihren Höhepunkt erst nach viereinhalb Stunden erreichten, während die meisten nekrotischen Zellen nach 24 Stunden zu finden waren (Liebetrau et al., 2015b).

Die frühzeitige Einwanderung in das Infarktgebiet wurde gewährleistet durch eine zeitnahe selektive Rekrutierung (Van Der Laan et al., 2014). Verantwortlich dafür waren Chemokine. In der vorliegenden Studie war bezüglich der Chemokine insbesondere die Oberflächenmarker CD195, CD184 und BLTR-1 signifikant erhöht in der nicht-klassischen bzw. in der intermediären Subpopulation.

Neben der zeitnahen Rekrutierung spielte auch der Aufenthaltsort der Monozyten vor dem ischämischen, kardialen Ereignis eine wesentliche Rolle für eine zeitnahe Rekrutierung. Im Gegensatz zu den klassischen Monozyten wanderten die nicht-klassischen Monozyten kontinuierlich durch das Gefäßsystem, sodass sie dementsprechend schneller – innerhalb von einer Stunde – auf inflammatorische Reize

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

reagieren konnten (Geissmann et al., 2003). Die klassischen Monozyten hingegen bedurften einer längeren Aktivierung und Rekrutierung (Shi and Pamer, 2014). Ein Reservoir für Monozyten bildete u.a. die Milz. Darüber hinaus konnten Van Der Laan et al. das Vorhandensein von myeloiden Progenitorzellen in der Milz von Mäusen nachweisen, die eine extramedulläre Monozytopoese ermöglichten (Van Der Laan et al., 2014). Dies begünstigte die Entstehung einer Monozytose im Rahmen eines Myokardinfarktes (Nahrendorf et al., 2010). Maekawa et al. konnte zeigen, dass eine Monozytenzahl $\geq 900/\text{mm}^3$ ein unabhängiger Risikofaktor sowohl für Pumpversagen und linksventrikuläre Aneurysmata darstellte (Maekawa et al., 2002). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Studie von Panizzi et al., der zudem nachweisen konnte, dass die Persistenz der Monozyten im ischämischen Gebiet im Rahmen einer Monozytose gesteigert und somit die Dauer der damit verbundenen Inflammation verlängert war, wodurch das Remodeling begünstigt wurde (Panizzi et al., 2010).

Steht bei der Bestimmung einer Monozytopoese die Monozytenpopulation als Ganzes im Zentrum der Betrachtung, so bedurfte es keiner zusätzlichen Anforderungen das Labor betreffend, da diese routinemäßig im Rahmen des großen Blutbildes mitbestimmt wurden. Dennoch existierten diverse Einflussfaktoren, die diesen Wert beeinflussen konnten. Hierbei waren neben infektiösen Erkrankungen (Wu et al., 2013) auch autoimmune Prozesse (Swindell et al., 2015) sowie maligne Erkrankungen (Ziegler-Heitbrock, 2014) zu nennen. Aus diesem Grund empfahl es sich, eine differenziertere Immunophänotypisierung vorzunehmen. Wurden darüber hinaus die einzelnen Subpopulationen der Monozyten identifiziert, stieg der Informationsgehalt. Dieser Zugewinn an Information wurde durch ein zeitintensiveres Protokoll erkaufte. Jedoch lieferte bereits eine einmalige Bestimmung der Monozytensubpopulationen sowie einzelner Oberflächenmarker bei Ankunft in der Notaufnahme relevante Informationen, die sich – wie diese Studie zeigte – signifikant von den Ergebnissen in der Kontrollgruppe unterschieden. Diese Tatsache war von besonderer Relevanz insbesondere in der initialen Phase nach Ankunft in der Notaufnahme, in der das diagnostische Fenster der Troponin-Tests lag und noch keine Aussage bezüglich einer relevanten Dynamik möglich war. Somit konnte die Messung und Charakterisierung von Monozytensubpopulationen als komplementärer Biomarker die Aussagekraft der etablierten Biomarker erhöhen, da zusätzliche wertvolle Informationen bezüglich des kardialen Ereignisses erlangt wurden.

Die Immunphänotypisierung lieferte einen entscheidenden Mehrwert bei NSTEMI-Patienten

Zusammenfassend war die verringerte Anzahl in der Subpopulation der nicht-klassischen Monozyten der NSTEMI-Kohorte im Vergleich zur Kontrollgruppe am ehesten auf das fortgeschrittene Reifestadium dieser Population zurückzuführen. Ein Großteil dieser reifen nicht-klassischen Monozyten – so schien es – hatte bereits das Gefäßsystem verlassen. Bekräftigt wurde diese Vermutung durch die Tatsache, dass insbesondere in der besagten Subpopulation ein Oberflächenmarker besonders stark exprimiert war, der für die Rekrutierung von Monozyten verantwortlich war (CD195). Zudem wurde in der NSTEMI-Kohorte ein vergleichsweise höherer Anteil an klassischen Monozyten verzeichnet, welcher sich am ehesten kompensatorisch auf eine vermehrte Aktivierung aufgrund eines inflammatorischen Reizes (hier: NSTEMI) zurückführen ließ.

Die zeitnahe Diapedese der nicht-klassischen Monozyten aus dem Gefäßsystem wurde dadurch erleichtert, dass diese Subpopulation bereits im Gefäßsystem zirkuliert und nicht erst aus einem Reservoir rekrutiert werden mussten, wie es der Fall bei den klassischen Monozyten war. Die Diapedese beginnt mit der Zelladhäsion. Dafür fanden sich eine Vielzahl signifikant exprimierter Oberflächenmarker (CD11b, CD38, CD41a, CD42a, CD43, CD54, CD61, CD62P, CD100, CD162, CD166, CD180). Erstaunlich war darüber hinaus, dass bereits zu einem so frühen Zeitpunkt im Verlauf eines NSTEMIs Oberflächenmarker für die Phagozytose signifikant hoch reguliert waren (CD32, CD36, CD63, CD64, CD91, CD93, CD163).

Obwohl die Reifetheorie anhand der vorliegenden Ergebnisse nachvollzogen werden konnte, existierten dennoch Oberflächenmarker in allen Subpopulationen, deren Expression sich in der NSTEMI-Kohorte signifikant von der in der Kontroll-Kohorte unterschieden. Folglich ist anzunehmen, dass es sich bei den CD35⁺/CD43⁻/CD55⁺/CD166⁺-Monozyten um eine eigene erkrankungsspezifische Subpopulation handelte, da sie sich nur in der NSTEMI-Kohorte nachweisen ließ. Aus der dargelegten biologischen Funktion und der Pathogenese wurde der Erkenntnisgewinn für die Risikostratifizierung deutlich, den eine frühe Bestimmung dieser Oberflächenmarker in der akuten Phase mit sich brachte. Von besonderem Interesse für weiterführende Arbeiten waren dabei die Oberflächenmarker CD1d, CD32, CD35, CD36, CD38, CD43, CD45, CD54, CD55, CD63, CD64, CD91, CD163, CD166, CD195, BLTR-1. Die

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Auswahlkriterien richteten sich dabei nach dem Ergebnis der biostatistischen und bioinformatischen Auswertung sowie einem geringen Bekanntheitsgrad der Oberflächenmarker in der Literatur.

Bedeutung/Schlussfolgerung

Meine Studie befasste sich mit dem Phänotyp der einzelnen Monozytensubpopulationen nach deren Aktivierung im Rahmen eines NSTEMIs. Dabei stellte ich die Hypothese auf, dass es einen Unterschied zwischen dem Phänotyp der Monozytensubpopulationen unmittelbar nach einem NSTEMI und dem von Patienten mit dem Ausschluss einer KHK gäbe. Bei der Identifizierung des Aktivierungszustandes der monozytären Subpopulationen entschied ich mich bewusst für eine Immunphänotypisierung mittels Oberflächenmarkeranalyse, um postranskriptionelle und posttranslationale Einflüsse zu umgehen. Weiterhin modifizierte ich das gebrauchsfertige Lypoplate™ Screening Panel (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA), sodass unter zur Hilfenahme weiterer Antikörper direkt die monozytären Subpopulationen identifiziert werden konnten. Als Probanden wurden Patienten mit einem NSTEMI (n=6) ausgewählt. Die Kontrollgruppe bestand aus Probanden mit einem Ausschluss einer KHK (n=6).

Nach Durchführung der Oberflächenmarkeranalyse der einzelnen Subpopulationen sah ich mich in der Wahl der Methode bestätigt. Es war zu erwarten, dass zahlreiche Oberflächenmarker, die im Zusammenhang mit der Aktivierung des Immunsystems stehen, hochreguliert sein würden. In der vorliegenden Studie handelte es sich dabei um CD14, CD32, CD35, CD55, CD64, CD282. Darüber hinaus wurden Oberflächenmarker identifiziert, die alleinig in einer Subpopulation vorkamen und somit zusätzliche Information über diese Subpopulation lieferten und dabei bei der Diskriminierung der Subpopulation bei NSTEMI-Patienten hilfreich waren (intermediäre Subpopulation: CD71, CD162, BLTR-1; nicht-klassische Subpopulation: CD1d, CD38, CD45RO, CD54, CD63, CD99, HLA-DQ). Weiterhin ergaben sich insbesondere für die intermediäre und die nicht-klassische Subpopulation neue Erkenntnisse: Es gab zahlreiche Überschneidungen zwischen diesen beiden Subpopulationen bezüglich ihrer relevanten Oberflächenmarker (CD11b, CD14, CD43, CD64, CD195). Ich konnte nachweisen, dass die nicht-klassische Subpopulation bereits bei Aufnahme ins Krankenhaus bei den NSTEMI-Patienten ($p=0,02$) relevant reduziert war im Vergleich zu der Kontroll-Kohorte. Da diese Subpopulation im Vergleich zu der klassischen Subpopulation im Gefäßsystem zirkulierte, war anzunehmen, dass die nicht-klassischen Monozyten bereits begannen, das

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Gefäßsystem zu verlassen. Die Oberflächenmarker, die in der nicht-klassischen Subpopulation für eine vermehrte Zellaktivierung sprachen, waren CD1d, CD45RO, CD63. bzw. CD71 in der intermediären Subpopulation. Für eine selektive Rekrutierung sprach der hochregulierte Chemokinrezeptor CD195 in der nicht-klassischen und in der intermediären Subpopulation. Darüber hinaus fand sich BLTR-1, ein weiterer Chemokinrezeptor, in der intermediären Subpopulation. Diese Umstände erlaubten eine zeitnahe Rekrutierung der Zellen.

Weiterhin konnte ich zeigen, dass bereits bei Aufnahme ins Krankenhaus sowohl in der nicht-klassischen als auch in der intermediären Subpopulation Oberflächenmarker (CD32, CD36, CD63, CD64, CD91, CD163) signifikant hochreguliert waren, die im Zusammenhang mit der Phagozytose stehen. Erstaunlich war dabei, zu welchem frühem Zeitpunkt und mit welcher Deutlichkeit (Expressionsstärke) Oberflächenmarker für die Phagozytose auf den zirkulierenden Monozyten im Gefäßsystem nachzuweisen waren. Die Phagozytose ist u.a. dafür verantwortlich, dass die Inflammation im Myokard begrenzt wurde. Damit wurde bereits zu Beginn der Inflammation die Grundlage für die Reparatur gelegt. Bei der Aktivierung der Monozyten nach einem NSTEMI handelte es sich somit um einen fein regulierten Prozess, der sowohl auf die proinflammatorische als auch auf die antiinflammatorische Reaktion angewiesen war. Diese Tatsache verdeutlichte die Relevanz der genannten Oberflächenmarker vor dem Hintergrund der kardiovaskulären bedingten Mortalität.

Da es sich bei Monozyten um Zellen des menschlichen Immunsystems handelte, hatten auch andere inflammatorische Erkrankungen wie autoimmune oder maligne Erkrankungen einen Einfluss auf die Monozyten und deren Aktivierungszustand. Dennoch stellten die genannten Immunzellen inklusive der drei beschriebenen Subpopulationen mit den genannten Oberflächenmarkern eine sinnvolle Ergänzung in der Diagnostik des NSTEMIs dar, zumal damit eine neue Facette in der Diagnostik des NSTEMIs beleuchtet wurde. Setzte der positive Troponintest den Untergang von Kardiomyozyten voraus, so war die Diagnostik mittels Monozyten und ihrer Oberflächenmarker nicht zwangsläufig auf die Nekrose von Kardiomyozyten angewiesen. Schließlich konnte die differenzierte Betrachtung der Monozyten in der akuten Phase

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

helfen, die oftmals schwierig zu fällende Diagnose eines NSTEMIs zu stellen. Im Vergleich zu dem Bild eines STEMIs können sich Patienten mit einem NSTEMI mit einer Vielzahl unspezifischer Symptome präsentieren.

Mit Hinblick auf die Umsetzbarkeit dieser neuartigen Methode zur Bestimmung der Monozytensubpopulationen sowie ihres Oberflächenrezeptorprofils fiel auf, dass die durchflusszytometrische Bestimmung von Antigen-Antikörperkomplexen bereits in anderen Fachbereichen (Hämatologie, Infektiologie, Pädiatrie etc.) im klinischen Alltag etabliert war und routinemäßig eingesetzt wurde. Dieses Verfahren war somit für den klinischen Alltag geeignet. Weiterhin wurden bei dem auf der Phänotypisierung der Immunzellen basierenden Ansatz potentielle posttranskriptionelle sowie posttranslationale Modifikationen berücksichtigt im Vergleich zu einer reinen Genomanalyse. Darüber hinaus erlaubte ein akkurat zusammengestellter Antikörpermix für die entsprechenden Oberflächenmarker genauso eine Zeitersparnis wie ein standardisiertes Verfahren für das abschließende „*Gating*“. Lediglich die Isolierung der PBMCs aus peripherem Blut war zeitintensiver.

Somit konnten schlussendlich die Unterschiede bezüglich des Phänotyps der verschiedenen Monozytensubpopulation verdeutlicht werden. Daraus ergaben sich erste Anhalte für die Relevanz der monozytären Oberflächenmarker als potentiell neue, komplementäre Biomarker für die Risikostratifizierung im Rahmen des NSTEMIs unter dem Gesichtspunkt von klinischen, ökonomischen und logistischen Aspekten. Nun bedurfte es auf dieser Grundlage basierend weiterführender Studien diesbezüglich.

Limitationen

Bei der vorliegenden Studie spiegelte das Patientenkollektiv lediglich die Verhältnisse einer – wenn auch Hessens größter zusammenhängender – Intensivstation wieder. Weiterhin fußte eine wesentliche Einschränkung auf finanziellen Aspekten: So konnten für die Oberflächenmarkeranalyse nicht mehr Patienten eingeschlossen werden, da der

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Einsatz weiterer LypoplateTM Screening Panel (Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) mit erheblichen Kosten verbunden gewesen wäre, die das Budget der Studie überschritten hätten.

Weitere Limitationen lagen in der Zweidimensionalität sowie der subjektiven Komponente des „Gatings“ im Rahmen der Auswertung der Daten der Oberflächenmarkeranalyse, sodass eine interpersonelle Reproduzierbarkeit nicht gegeben war (Lowdell, 2001). Ein allgemein anerkanntes standardisiertes Verfahren für das „Gating“ existierte nicht.

Ausblick

Nachdem die Frage nach den Unterschieden in der Expression der Oberflächenmarker der Monozytensubpopulationen umfangreich analysiert wurde, kamen zahlreiche neue Fragen auf: Der nächste logische Schritt besteht in der Validierung und ggf. weiteren Eingrenzung der identifizierten Oberflächenmarker (hier insbesondere: CD1d, CD35, CD38, CD43, CD54, CD55, CD64, CD166, CD195, BLTR-1). Von Interesse war, ob einzelne Oberflächenmarker mit klinischen oder laborchemischen Parametern korreliert werden können und somit als unabhängige Risikofaktoren für die Risikostratifizierung dienen können. Dafür bedarf es ebenfalls – genauso wie für die Validierung – einer größeren Kohorte.

Weiterhin ist auch die Dynamik der ausgewählten Oberflächenmarker im Verlauf nach einen NSTEMI von Interesse, sodass sequenzielle Blutentnahmen in Erwägung gezogen werden sollten. Anschließend liegt die Überlegung nahe, eine quantitative, großangelegte Analyse der Oberflächenmarker zur Identifizierung entsprechender Grenzwerte für die verschiedenen Typen des ACS durchzuführen.

Nachdem einzelne Oberflächenmarker ausreichend validiert wurden sowohl für verschiedene Zeitpunkte im Verlauf eines NSTEMIs als auch in verschiedenen Kohorten,

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

sollte sich genauer der Erforschung der Signalkaskaden gewidmet werden, die zu einer vermehrten Expression der jeweiligen Oberflächenmarker führen. Von besonderem Interesse dabei sind die Reize, die zu einer vermehrten Expression der Oberflächenmarker innerhalb so kurzer Zeit führen.

Mit Hinblick auf die Praktikabilität der durchflusszytometrischen Bestimmung von Oberflächenmarkern einzelner Subpopulation im Rahmen von diagnostischen Maßnahmen in der Klinik sollte eine zeitliche Optimierung des Protokolls angestrebt werden. Insbesondere den manuellen zeitintensiven Schritt der PBMC Isolierung gilt es zu minimieren. Demnach ist es von Interesse, in wie weit eine differenzierte Oberflächenmarkerbestimmung von Monozyten aus dem Vollblut von Patienten ohne eine vorherige Isolierung der PBMCs praktikabel ist. Dabei stehen Überlegungen zu dem Umfang der Blutentnahme mit Hinblick auf eine ausreichend hohe Ausbeute an Monozyten genauso im Vordergrund wie die Tatsache, dass das Vorliegen von einer Vielzahl an Zellen vermehrt zu unspezifischen Bindungen der verwendeten Antikörper führt.

Zusammenfassung

Hintergrund: Das akute Koronarsyndrom und dessen Komplikationen stellen in der westlichen Welt die häufigste Todesursache dar. Mononukleäre Zellen sind dabei von steigender Relevanz, da sie selektiv aktiviert und rekrutiert werden und ihre Anzahl entsprechend der Schwere des ACS initial nach dem ischämischen Ereignis ansteigt. Diese Studie befasst sich mit der Phänotypisierung der Monozytensubpopulationen bei Patienten mit NSTEMI und Ausschluss-KHK.

Methoden: Blutentnahmen (120ml) erfolgten bei Aufnahme in der Notaufnahme. Die „*peripheral mononuclear cells*“ (PBMC) wurden isoliert und eine durchflusszytometrisch-basierte Oberflächenmarkeranalyse (Lypoplate™ Screening Panel, Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) wurde durchgeführt. Diese beinhaltet 242 Antikörper gegen humane Oberflächenmarker.

Ergebnisse: Der Anteil der nicht-klassischen Subpopulation ($p=0,02$) war signifikant reduziert in der NSTEMI-Kohorte. Zudem fanden sich signifikant regulierte Oberflächenmarker nur in der intermediären (BLTR-1) bzw. nur in der nicht-klassischen Subpopulation (CD1d, CD38, CD45RO, CD54, CD63). Außerdem fanden sich Oberflächenmarker in mehreren Subpopulationen (CD11b, CD64 und CD195), welche zudem in der bioinformatischen Auswertung bestätigt wurden. Die Oberflächenmarker CD35, CD43, CD55 und CD166 traten in allen Subpopulation auf. In der bioinformatischen Auswertung waren in der nicht-klassischen und intermediären Subpopulation sowohl pro- als auch antiinflammatorische Oberflächenmarker hochreguliert, die im Zusammenhang mit dem Prozess der Phagozytose standen (CD32, CD36, CD63, CD64, CD91, CD93, CD163).

Schlussfolgerung: Bei den CD35⁺/CD43⁻/CD55⁺/CD166⁺-Monozyten, die in allen Subpopulationen nachzuweisen waren, könnte es sich um eine krankheitsspezifische Population handeln. Die Diversität der signifikant regulierten Oberflächenmarkern sowie deren funktionelle Aspekte lieferten in dem fein regulierten pro- und antiinflammatorischen Prozess eines NSTEMIs zusätzliche wertvolle Informationen für die Risikostratifizierung. Diese Studie stellt somit eine fundierte Grundlage dar für die weitere Erforschung der genannten Oberflächenmarker als potentielle neue komplementäre Biomarker mit klinischer und ökonomischer Relevanz.

Summary

Background: The acute coronary syndrome and its complications are the leading cause of death in the Western world. The relevance of mononuclear cells is continuously rising based on their selective activation and extensive recruitment following the gravity and the magnitude of the initial acute coronary syndrome.

The aim of this study was to investigate the characteristic phenotype of monocytes and their subsets in patients with NSTEMI and without CAD.

Methods: 120 ml peripheral blood was withdrawn and peripheral mononuclear cells (PBMC) were isolated. A high-throughput flow cytometry-based Lypoplate™ Screening Panel (Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) was used, including 242 human cell surface markers.

Results: The amount of non-classical monocytes ($p=0,02$) was reduced. Looking at the single cell surface marker level, new cell surface marker exclusively in the intermediate subset (BLTR-1) and in the non-classical subset (CD1d, CD38, CD45RO, CD54, CD63) were revealed. There were significantly regulated cell surface markers found in the intermediate and the non-classical subset (CD11b, CD64, CD195) which were confirmed in the bioinformatical analysis. Moreover, the cell surface marker CD35, CD43, CD55 und CD166 were found in all three subsets. With regard to the intermediate and the non-classical subset, many cell surface marker (CD32, CD36, CD63, CD64, CD91, CD93, CD163) which were upregulated were related to phagocytosis.

Conclusion: The CD35⁺/CD43⁻/CD55⁺/CD166⁺-monocytes which were found in all three subsets were suspected to form a disease-specific population. Moreover, the diversity of the significantly regulated pro- and anti-inflammatory cell surface markers as well as their functional aspect provided important additional information with regard to risk stratification of NSTEMIs. Thus, this study offers a substantiated basis for further investigation concerning the use of the cell surface makers mentioned above as potentially new complementary biomarkers with clinical and economical relevance.

Abkürzungsverzeichnis

ACS	akutes Koronarsyndrom
ADH	antidiuretisches Hormon
AST	Aspartat Transaminase
CD	Cluster of Differentiation
CK	Kreatininkinase
CPT	Cell Preparation Tubes
cTNI	kardiales Troponin I
cTNT	kardiales Troponin T
ES	Enrichment Score
FCS-Datei	Flow-Cytometry-Standard Datei
FDR	Falscherkennungsrate
FKS	fetales Kälberserum
FSC	Forward Scatter
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
hs-cTN	high sensitivity cardiac Troponin
IAP	instabile Angina pectoris
KHK	koronare Herzkrankheit
LDH	Laktatdehydrogenase
LEA	Leading Edge Analysis
LPS	Lipopolysaccharid
MDCT	Multidetektoren-CT
NES	Normalized Enrichment Score
NESTE-ACS	akutes Koronarsyndrom ohne persistierende ST-Strecken-Erhöhung
NSTEMI	Nicht-ST-Strecken-Hebungsmyokardinfarkt
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
ROS	reaktiven Sauerstoffradikalen SOP
SSC	Sideward Scatter
STEMI	ST-Strecken-Hebungsmyokardinfarkt
TTE	transthorakale Echokardiographie

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufteilung der kardialen Biomarkern nach pathophysiologischen Gesichtspunkten	14
Abbildung 2: Freisetzungskinetik verschiedener kardialer Biomarker über die Zeit in Abhängigkeit von den Referenzbereichen	14
Abbildung 3: Konzept der „Cell Preparation Tubes“ (CPT) und Zusammensetzung der PBMC	31
Abbildung 4: Übersichtsdarstellung zur Verdeutlichung der Prinzipien eines Durchflusszytometers	34
Abbildung 5: Entscheidungspfad für die biostatistische Auswertung	46
Abbildung 6: Vergleich der Verteilung der Monozytensubpopulationen [%] bezüglich der Art der Blutentnahme (arteriell vs. venös)	52
Abbildung 7: Vergleich der Monozytensubpopulationen [%] bezüglich der Kryokonservierung (vor dem Einfrieren und nach dem Auftauen) und der Kohorten (NSTEMI vs. A.-KHK)	54
Abbildung 8: Viabilität [%] (A) und Zellgröße [µm] (B) der PBMCs in beiden Kohorten nach der Kryokonservierung	54
Abbildung 9: Oberflächenmarker der klassischen Subpopulation, deren Expression sich signifikant unterscheidet ($p < 0,05$) in den beiden Kohorten	55
Abbildung 10: Oberflächenmarker der intermediären Subpopulation, deren Expression sich signifikant unterscheidet ($p < 0,05$) in den beiden Kohorten	56
Abbildung 11: Oberflächenmarker der nicht-klassischen Subpopulation, deren Expression sich signifikant unterscheidet ($p < 0,05$) in den beiden Kohorten	56
Abbildung 12: Übersicht über die hochregulierten Gensets ($p < 0,05$) inklusive der Oberflächenmarker der ES Subgruppe für die klassische Subpopulation	59
Abbildung 13: Übersicht über die hochregulierten Gensets ($p < 0,05$) inklusive der Oberflächenmarker der ES Subgruppe für die intermediäre Subpopulation	61
Abbildung 14: Übersicht über die hochregulierten Gensets ($p < 0,05$) inklusive der Oberflächenmarker der ES Subgruppe für die nicht-klassische Subpopulation	64
Abbildung 15: verschiedene "Gating"-Strategien	74
Abbildung 16: Ethikvotum 1/3	128
Abbildung 17: Ethikvotum 2/3	128

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Abbildung 18: Ethikvotum 3/3	129
Abbildung 19: A: Excitationsmaximum und Emissionsspektrum von Alexa Fluor 647 nach Anregung durch den roten Laser (635nm).....	130
Abbildung 20: Auswertung einer EDTA-Vollblutprobe mit der Software FACSDiva 6.3.1.....	132
Abbildung 21: Übersicht der verwendeten Antikörper für die Oberflächenmarkeranalyse	134
Abbildung 22: Auswertungsschema der Oberflächenmarkeranalyse mit der Software FACSDiva Version 6.3.1.	135
Abbildung 23: Expression der Oberflächenmarker in den beiden Kohorten für die klassische Subpopulation.....	137
Abbildung 24: Häufigkeit der Oberflächenmarker der ES Subgruppe der signifikanten Gensets ($p < 0,05$) in der klassischen Subpopulation.....	138
Abbildung 25: Expression der Oberflächenmarker in den beiden Kohorten für die intermediäre Subpopulation	140
Abbildung 26: Häufigkeit der Oberflächenmarker der ES Subgruppe der signifikanten Gensets ($p < 0,05$) in der intermediären Subpopulation	141
Abbildung 27: Expression der Oberflächenmarker in den beiden Kohorten für die nicht- klassische Subpopulation.....	143
Abbildung 28: Häufigkeit der Oberflächenmarker der ES Subgruppe der signifikanten Gensets ($p < 0,05$) in der nicht-klassischen Subpopulation.....	144
Abbildung 29: Oberflächenmarker, deren Expression sich nur in der intermediären Subpopulation signifikant in den beiden Kohorten unterschieden.....	145
Abbildung 30: Oberflächenmarker, deren Expression sich nur in der klassischen Subpopulation signifikant in den beiden Kohorten unterschieden.....	145
Abbildung 31: Oberflächenmarker, deren Expression sich nur in der nicht-klassischen Subpopulation signifikant in den beiden Kohorten unterschieden.....	146
Abbildung 32: Oberflächenmarker, deren Expression sich in mehr als einer Subpopulation für die beiden Kohorten unterschied.....	147
Abbildung 33: Oberflächenmarker, deren Expression sich in mehr als einer Subpopulation für die beiden Kohorten unterschied.....	148
Abbildung 34: Darstellung des Gensets GO_NEURON_PROJECTION_DEVELOPMENT für die klassische Subpopulation.....	156

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Abbildung 35: Darstellung des Gensets GO_CELL_PROJECTION_ORGANIZATION für die klassische Subpopulation	157
Abbildung 36: Darstellung des Gensets GO_NEURON_DEVELOPMENT für die klassische Subpopulation.....	158
Abbildung 37: Darstellung des Gensets GO_NEURON_DIFFERENTIATION für die klassische Subpopulation.....	159
Abbildung 38: Darstellung des Gensets GO_SOMATODENTRITIC_COMPARTMENT für die klassische Subpopulation	160
Abbildung 39: Darstellung des Gensets GO_RESPONSE_TO_ALCOHOL für die intermediären Subpopulation	161
Abbildung 40: Darstellung des Gensets GO_ACTIVATION_OF_IMMUNE_RESPONSE für die intermediären Subpopulation.....	163
Abbildung 41: : Darstellung des Gensets GO_INTERACTION_WITH_HOST für die intermediären Subpopulation	165
Abbildung 42: Darstellung des Gensets GO_VIRAL_LIFE_CYCLE für die intermediären Subpopulation	166
Abbildung 43: Darstellung des Gensets GO_VIRUS_RECEPTOR_ACTIVITY für die intermediären Subpopulation	168
Abbildung 44: Darstellung des Gensets GO_REGULATION_OF_INNATE_IMMUNE_RESPONSE für die intermediären Subpopulation	169
Abbildung 45: Darstellung des Gensets GO_PHAGOCYTOSIS für die intermediären Subpopulation.....	170
Abbildung 46: Darstellung des Gensets GO_MOVEMENT_IN_ENVIRONMENT_OF_OTHER_ORGANISM_INVOLVED_IN_SYMBIOTIC_INTERACTION für die intermediären Subpopulation .	172
Abbildung 47: Darstellung des Gensets GO_INNATE_IMMUNE_RESPONSE für die intermediären Subpopulation	174
Abbildung 48: Darstellung des Gensets GO_ACTIVATION_OF_INNATE_IMMUNE_RESPONSE für die intermediären Subpopulation.....	175
Abbildung 49: Darstellung des Gensets GO_REGULATION_OF_PROTEOLYSIS für die intermediären Subpopulation	176

Abbildung 50: Darstellung des Gensets GO_NEGATIVE_REGULATION_OF_IMMUNE_SYSTEM_PROCESS für die intermediären Subpopulation	178
Abbildung 51: Darstellung des Gensets GO_MEMBRANE_ORGANIZATION für die intermediären Subpopulation	179
Abbildung 52: Darstellung des Gensets GO_NEGATIVE_REGULATION_OF_CELL_COMMUNICATION für die intermediären Subpopulation	181
Abbildung 53: Darstellung des Gensets GO_SECOND_MESSENGER_MEDIATED_SIGNALING für die intermediären Subpopulation.....	182
Abbildung 54: Darstellung des Gensets GO_POSITIVE_REGULATION_OF_IMMUNE_RESPONSE für die intermediären Subpopulation	184
Abbildung 55: Darstellung des Gensets GO_CELLULAR_RESPONSE_TO_BIOTIC_STIMULUS für die intermediären Subpopulation.....	185
Abbildung 56: Darstellung des Gensets GO_ENDOSOME für die intermediären Subpopulation.....	187
Abbildung 57: Darstellung des Gensets GO_ENDOCYTOTIC_VESICLE für die intermediären Subpopulation	188
Abbildung 58: Darstellung des Gensets GO_NEGATIVE_REGULATION_OF_TRANSPORT für die nicht-klassische Subpopulation.....	189
Abbildung 59: Darstellung des Gensets GO_INNATE_IMMUNE_RESPONSE für die nicht-klassische Subpopulation.....	191
Abbildung 60: Darstellung des Gensets GO_SECOND_MESSENGER_MEDIATED_SIGNALING für die nicht- klassische Subpopulation.....	192
Abbildung 61: Darstellung des Gensets GO_RESPONSE_TO_INTERFERON_GAMMA für die nicht-klassische Subpopulation.....	193

Abbildung 62: Darstellung des Gensets

GO_CELLULAR_RESPONSE_TO_INTERFERON_GAMMA für die **nicht-klassische** Subpopulation.....194

Abbildung 63: Darstellung des Gensets GO_VIRUS_RECEPTOR_ACTIVITY für die **nicht-klassische** Subpopulation.....196

Abbildung 64: Darstellung des Gensets GO_VESICLE_MEMBRANE für die **nicht-klassische** Subpopulation.....198

Abbildung 65: Darstellung des Gensets GO_PHAGOCYTOSIS für die **nicht-klassische** Subpopulation:199

Abbildung 66: Einwilligungserklärung für Probanden 1/2200

Abbildung 67: Einwilligungserklärung für Probanden 2/2201

Nutzungsgenehmigung für Abbildungen aus Fremdquellen

Abbildung 2:



Thank you for your order!

Dear A z H,

Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink® service.

Order Summary

Licensee: Ringstraße
Order Date: Jan 27, 2020
Order Number: 4757191286843
Publication: Heart
Title: Clinical implications of the new definition of myocardial infarction
Type of Use: Dissertation/Thesis
Order Total: 0.00 EUR

(Original Order Number: 501542491)

View or print complete [details](#) of your order and the publisher's terms and conditions.

Abbildung 3:

RE: Einverständniserklärung Bild

Vacutainer.de <Vacutainerde@bd.com>

Mi, 22.01.2020 14:20

An: Annkathrin z H <annkathrinzur.heid@live.de>

4 Anlagen (3 MB)

CPT NaCit gr ohne Hintergrund freigestellt.jpg; CPT Röhrchen kl ohne Hintergrund freigestellt.jpg; CPT folder photo.jpg; CPT Rö Grafik mit Beschriftung.jpg;

Sehr geehrte Frau zur Heiden,

gerne erhalten Sie von uns die Genehmigung, das BD Bildmaterial mit einem entsprechenden Verweis für Ihre Promotionsarbeit zu verwenden. Beiliegend finden Sie die Abbildungen, vielleicht ist die Auflösung besser, als wenn Sie die Bilder aus der pdf-Datei herauskopieren. Melden Sie sich, sollten Sie noch weiteres Bildmaterial benötigen. Gerne sind wir Ihnen behilflich.

Freundliche Grüße

Edith Rothermel

Marketing Assistant

BD, Preanalytical Systems

edith.rothermel@bd.com

Tullastraße 8-12,
69126 Heidelberg

Tel +49.6221.305.248
Fax +49.6221.305.377

bd.com

Abbildung 4:

Anything else... [Vorgang: 200122-002068]

Abcam Customer Service <orders@abcam.com>

Mi, 22.01.2020 13:15

An: annkathrinzur.heiden@live.de <annkathrinzur.heiden@live.de>

abcam

Referenznummer 200122-002068

Erstellungsdatum: Wednesday, Jan 22, 2020 - 12:58

Datum der letzten Aktualisierung: Wednesday, Jan 22, 2020 - 13:15

Betreff Anything else...

Unsere Antwort (E-Mail) Wednesday, Jan 22, 2020 - 13:15

Good Afternoon Annkathrin,

Thank you for getting in touch.

We are pleased to give permission for researchers to use diagrams and images from our website if used in thesis and educational aids only. However, we do request that the materials are not altered in any way and that Abcam is acknowledged.

I wish you every success with your thesis and research. I am happy to answer any further questions you have.

Best regards,

Best Regards,
James Jones

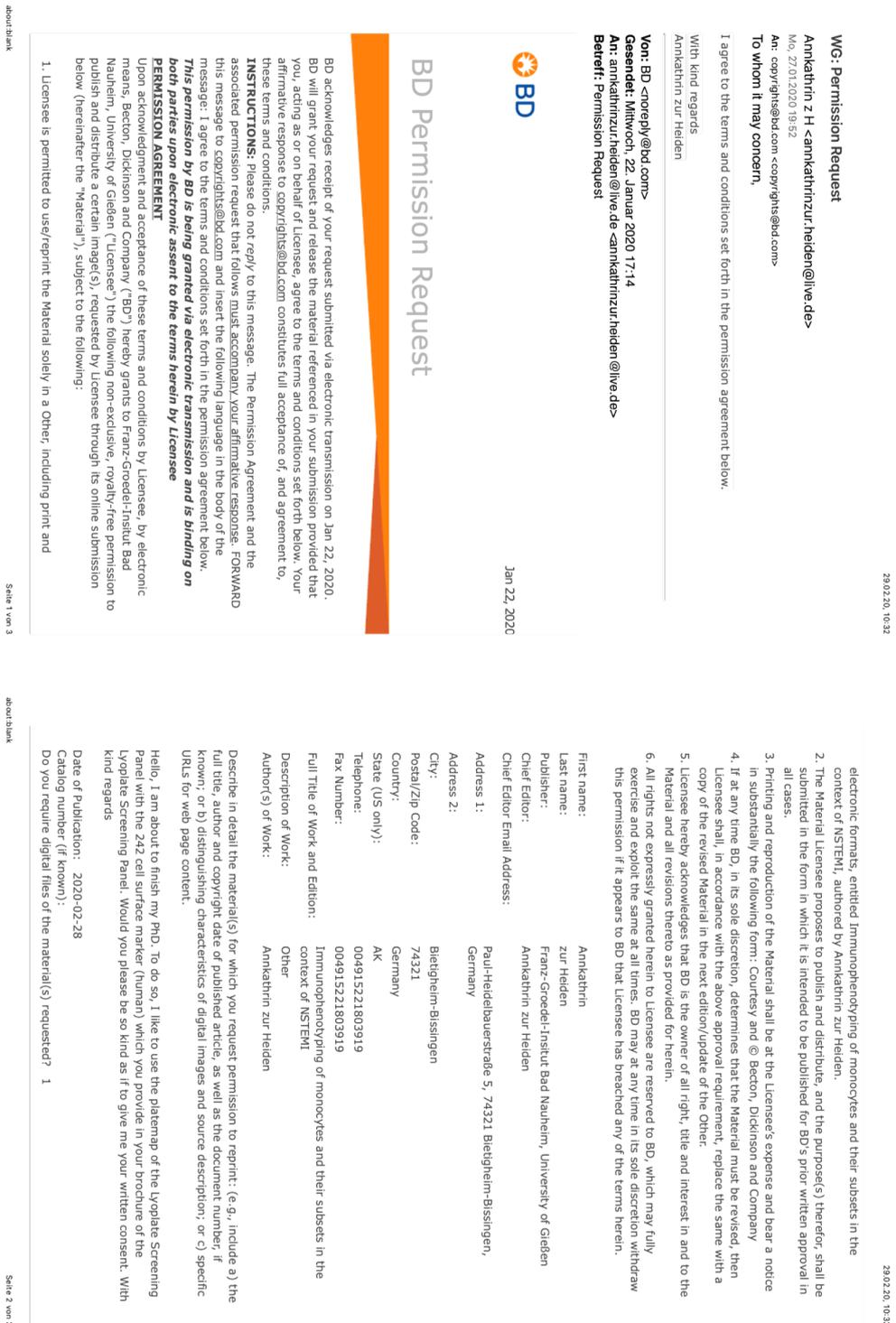
Customer Service Specialist

www.abcam.com

 +44(0)1223 696000

We are committed to continually improving our service and value your input. You may receive a 'HaveYourSay' survey email. Please share your thoughts.

Abbildung 22:



Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation der verschiedenen MI-Typen	9
Tabelle 2: Monozytensubpopulationen in verschiedenen Spezies	19
Tabelle 3: Nomenklatur und Häufigkeiten der Monozytensubpopulationen im Blut	20
Tabelle 4: verwendete Reagenzien	25
Tabelle 5: verwendete Antikörper	25
Tabelle 6: verwendete Geräte	26
Tabelle 7: verwendete Gebrauchsmaterialien.....	27
Tabelle 8: verwendete Materialien für die Blutentnahme	27
Tabelle 9: Probenmaterial.....	31
Tabelle 10: Optik des Durchflusszytometers FACSVerse	35
Tabelle 11: EDTA-Vollblutanalyse, Monozytencocktail, erstes Röhrchen	39
Tabelle 12: EDTA-Vollblutanalyse, Antikörpercocktail, zweites Röhrchen	39
Tabelle 13: Oberflächenmarkeranalyse, Antikörpercocktail	41
Tabelle 14: Patientencharakteristika I	49
Tabelle 15: Patientencharakteristika II	50
Tabelle 16: statistische Ergebnisse der GSEA für die klassische Subpopulation der NSTEMI-Kohorte.....	58
Tabelle 17: statistische Ergebnisse der GSEA für intermediären Subpopulation der NSTEMI-Kohorte.....	60
Tabelle 18: Gruppierung der signifikant hochregulierten Gensets in der intermediären Subpopulation.....	62
Tabelle 19: statistische Ergebnisse der GSEA für nicht-klassische Subpopulation der NSTEMI-Kohorte.....	63
Tabelle 20: Gruppierung der signifikant hochregulierten Gensets in der nicht- klassischen Subpopulation	66
Tabelle 21: Häufigkeiten der Monozytensubpopulationen im Blut	79
Tabelle 22: Übersicht über die Oberflächenmarker der ES Subgruppe der hochregulierten Gensets ($p < 0,05$) für die klassische Subpopulation.	136
Tabelle 23: Übersicht über die Oberflächenmarker der ES Subgruppe der hochregulierten Gensets ($p < 0,05$) für die intermediäre Subpopulation.	139

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Tabelle 24: Übersicht über die Oberflächemarker der ES Subgruppe der hochregulierten Gensets ($p < 0,05$) für die nicht-klassische Subpopulation.....	142
Tabelle 25: signifikant hochregulierte Gensets in der klassischen Subpopulation.....	149
Tabelle 26: signifikant hochregulierte Gensets in der intermediären Subpopulation .	152
Tabelle 27: signifikant hochregulierte Gensets in der nicht-klassischen Subpopulation	155

Literaturverzeichnis

- Abrahão Afiune Neto, Antonio de Pádua Mansur, S.D.A., Everly P. S. G. Gomes, J.A.F.R., 2006. Monocytosis is an Independent Risk Marker for Coronary Artery Disease. *Arq. Bras. Cardiol.* 86, 0–4. <https://doi.org/10.1590>
- Academica, L., Wu, B., Williams, K., 2015. *Cancer Informatics*. New York 14, 1–13. <https://doi.org/10.4137/CIN.S18965>. Received
- Achenbach, S., Hamm, C.W., 2012. Pocket-Leitlinie: Akutes Koronarsyndrom ohne ST-Hebung (NSTE-ACS). *Dtsch. Gesellschaft für Kardiol. – Herz- und Kreislaufforsch. e.V.*
- Alisson-Silva, F., Mantuano, N.R., Lopes, A.L., Vasconcelos-dos-Santos, A., Vale, A.M., Costa, M.M., Cannon, J.L., Oliveira, A.C., Todeschini, A.R., 2019. CD43 sialoglycoprotein modulates cardiac inflammation and murine susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *Sci. Rep.* 9, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45138-7>
- Anania, J.C., Chenoweth, A.M., Wines, B.D., MarkHogarth, P., 2019. The human FcγRII (CD32) family of leukocyte FCR in health and disease. *Front. Immunol.* 10, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00464>
- Ancuta, P., Liu, K.-Y., Misra, V., Wacleche, V.S., Gosselin, A., Zhou, X., Gabuzda, D., 2009. Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16⁺ and CD16⁻ monocyte subsets. *BMC Genomics* 10, 403. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-403>
- Auffray, C., Sieweke, M.H., Geissmann, F., 2009. Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 669–692. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132557>
- Bassuk, S.S., Rifai, N., Ridker, P.M., 2004. High-sensitivity C-reactive protein: Clinical importance. *Curr. Probl. Cardiol.* 29, 439–493. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2004.03.004>
- BD Lyoplate™ Screening Panels Human Cell Surface Markers/Mouse Cell Surface Markers BD Lyoplate™ Screening Panels Human and Mouse Cell Surface Markers, 2013.
- Berufsausübung, B.R., 2015. Berufsordnung für die Ärztinnen und Ärzte in Hessen 1998, 1–10.

- Bhoi, S., Galwankar, S., Vankar, S., Verma, P., 2014. High sensitivity troponins and conventional troponins at the bedside. *Int. J. Crit. Illn. Inj. Sci.* 4, 253. <https://doi.org/10.4103/2229-5151.141471>
- Biomaterialbanken, P., 2006. Ein generisches Datenschutzkonzept für Biomaterialbanken 1–98.
- Blood, P., System, R.N.A., n.d. Deutschland - Spezialsysteme für Molekulardiagnostik, Immunologie und Proteomics 34.
- Böhmler, A. (Beckman C., n.d. Grundlagen der Durchflusszytometrie: Einführung und Überblick.
- Boslett, J., Hemann, C., Christofi, F.L., Zweier, J.L., 2017. Characterization of CD38 in the major cell types of the heart: endothelial cells highly express CD38 with activation by hypoxia-reoxygenation triggering NAD(P)H depletion. *Am. J. Physiol. Physiol.* 314, C297–C309. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00139.2017>
- Boyette, L.B., MacEdo, C., Hadi, K., Elinoff, B.D., Walters, J.T., Ramaswami, B., Chalasani, G., Taboas, J.M., Lakkis, F.G., Metes, Di.M., 2017. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS One* 12, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176460>
- Brainard, A.H., Raynovich, W., Tandberg, D., Bedrick, E.J., 2005. The prehospital 12-lead electrocardiogram's effect on time to initiation of reperfusion therapy: A systematic review and meta-analysis of existing literature. *Am. J. Emerg. Med.* 23, 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2005.02.004>
- Buechler, C., Ritter, M., Orsó, E., Langmann, T., Klucken, J., Schmitz, G., 2000. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J. Leukoc. Biol.* 67, 97–103. <https://doi.org/10.1002/jlb.67.1.97>
- C.S. Keefer, W.H.R., 1928. Angina pectoris: a syndrome caused by anoxemia of the myocardium. *Arch Intern Med*, 41 41, 769–807.
- Canto, J.G., Fincher, C., Kiefe, C.I., Allison, J.J., Li, Q., Funkhouser, E., Centor, R.M., Selker, H.P., Weissman, N.W., 2002. Atypical presentations among medicare beneficiaries with unstable angina pectoris. *Am. J. Cardiol.* 90, 248–253. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(02\)02463-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(02)02463-3)
- Cha, S., Imielinski, M.B., Rejtar, T., Richardson, E.A., Thakur, D., Sgroi, D.C., Karger, B.L., 2010. In situ proteomic analysis of human breast cancer epithelial cells using laser capture microdissection: annotation by protein set enrichment analysis and

- gene ontology. *Mol Cell Proteomics* 9, 2529–2544. <https://doi.org/M110.000398>
[pii]r10.1074/mcp.M110.000398
- Chen, R., Ge, T., Jiang, W., Huo, J., Chang, Q., Geng, J., Shan, Q., 2019. Identification of biomarkers correlated with hypertrophic cardiomyopathy with co-expression analysis. *J. Cell. Physiol.* 1–10. <https://doi.org/10.1002/jcp.28762>
- Chiva-Blanch, G., Bratseth, V., Ritschel, V., Andersen, G., Halvorsen, S., Eritsland, J., Arnesen, H., Badimon, L., Seljeflot, I., 2017a. Monocyte-derived circulating microparticles (CD14+, CD14+/CD11b+ and CD14+/CD142+) are related to long-term prognosis for cardiovascular mortality in STEMI patients. *Int. J. Cardiol.* 227, 876–881. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.11.302>
- Chiva-Blanch, G., Laake, K., Myhre, P., Bratseth, V., Arnesen, H., Solheim, S., Badimon, L., Seljeflot, I., 2017b. Platelet-, monocyte-derived & tissue factor-carrying circulating microparticles are related to acute myocardial infarction severity. *PLoS One* 12, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172558>
- Clanchy, F.I.L., 2016. High-Affinity Fc Receptor Expression Indicates Relative Immaturity in Human Monocytes. *J. Interferon Cytokine Res.* 36, 279–90. <https://doi.org/10.1089/jir.2015.0060>
- Daniell, H., 2012. *NIH Public Access* 76, 211–220. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9767-z>. Plastid
- De Hoog, V.C., Bovens, S.M., De Jager, S.C.A., Van Middelaar, B.J., Van Duijvenvoorde, A., Doevendans, P.A., Pasterkamp, G., De Kleijn, D.P.V., Timmers, L., 2015. BLT1 antagonist LSN2792613 reduces infarct size in a mouse model of myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 108, 367–376. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv224>
- de Vries, M.A., Trompet, S., Mooijaart, S.P., Smit, R.A.J., Böhringer, S., Castro Cabezas, M., Jukema, J.W., 2017. Complement receptor 1 gene polymorphisms are associated with cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 257, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.12.017>
- Dehn, S., Thorp, E.B., 2018. Myeloid receptor CD36 is required for early phagocytosis of myocardial infarcts and induction of Nr4a1-dependent mechanisms of cardiac repair. *FASEB J.* 32, 254–264. <https://doi.org/10.1096/fj.201700450R>
- Denmark, K.T., Bax, J.J., Morrow, D.A., Task, A., Members, F., Kristian, C., Denmark, T., White, H.D., Zealand, N., Denmark, H.M., Uk, B., Germany, H.A.K., Germany, C.W.H., Januzzi, J.L., Angeles, M., Garcia, A., Uk, S.R.U., Cauty, J.M., Lyon, A.R.,

- Canada, P.J.D., Luis, J., Lindahl, B., Virmani, R., Marie, R., France, P.G.S., Patrick, T., Uk, K.A.A.F., 2019. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018) 237–269. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy462>
- Dimitrova, N., Zamudio, J.R., Jong, R.M., Soukup, D., Resnick, R., Sarma, K., Ward, A.J., Raj, A., Lee, J., Sharp, P.A., Jacks, T., 2017. Public Access NIH Public Access. PLoS One 32, 736–740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178059>
- Eggers, K.M., Oldgren, J., Nordenskjöld, A., Lindahl, B., 2004. Diagnostic value of serial measurement of cardiac markers in patients with chest pain: Limited value of adding myoglobin to troponin I for exclusion of myocardial infarction. *Am. Heart J.* 148, 574–581. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2004.04.030>
- Ethikrat, D., n.d. Humanbiobanken für die Forschung Stellungnahme.
- Frangogiannis, N.G., 2008. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol. Res.* 58, 88–111. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2008.06.007>
- French, J.K., White, H.D., 2004. Definition of Myocardial Infarction. *Biochemistry.*
- Garg, P., Morris, P., Fazlanie, A.L., Vijayan, S., Dancso, B., Dastidar, A.G., Plein, S., Mueller, C., Haaf, P., 2017. Cardiac biomarkers of acute coronary syndrome: from history to high-sensitivity cardiac troponin. *Intern. Emerg. Med.* 12, 147–155. <https://doi.org/10.1007/s11739-017-1612-1>
- Gefäßerkrankungen, H.-, 1979. Bei der PROCAM (Prospective Cardiovascular Münster) - Studie handelt es sich um eine große Beobachtungsstudie mit zum Risiko-Rechner.
- Geissmann, F., Jung, S., Littman, D.R., 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71–82. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00174-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00174-2)
- Gren, S.T., Rasmussen, T.B., Janciauskiene, S., Hakansson, K., Gerwien, J.G., Grip, O., 2015. A single-cell gene-expression profile reveals inter-cellular heterogeneity within human monocyte subsets. *PLoS One* 10, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144351>
- Guo, L., Harari, E., Smith, S.L., Otsuka, F., Gannon, R.L., Braumann, R.E., Dickinson, M.H., Jinnouchi, H., Kutys, R., Mori, H., Kutyna, M.D., Torii, S., Sakamoto, A., Cheng, Q., Kolodgie, F.D., Virmani, R., Finn, A. V., Akahori, H., Polavarapu, R., Karmali, V., Choi, C.U., Gupta, A., Sawan, M.A., Jenkins, A.L., Lipinski, M.J., Kim, J., Chhour, P., Cormode, D.P., De Vries, P.S., Grove, M.L., Boerwinkle, E., Morrison, A.C., Zhang, Y., Cao, Y., Arking, D.E., Erdmann, J., Sotoodehnia, N., 2018. CD163+ macrophages promote angiogenesis and vascular permeability accompanied by

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

- inflammation in atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 128, 1106–1124.
<https://doi.org/10.1172/JCI93025>
- Hamm, C.W., Arntz, H.-R., Bode, C., Giannitsis, E., Katus, H., Levenson, B., Nordt, T., Neumann, F.J., Tebbe, U., Zahn, R., 2005. Pocket-Leitlinien Akutes Koronarsyndrom (ACS).
- Herold, G. und M., 2015a. *Innere Medizin*. Köln.
- Herold, G. und M., 2015b. *Innere Medizin*. Köln.
- Herzenberg, Leonore a, Tung, J., Moore, W. a, Herzenberg, Leonard a, Parks, D.R., 2006. Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nat. Immunol.* 7, 681–685. <https://doi.org/10.1038/ni0706-681>
- Hoffmann, J., Fiser, K., Liebetrau, C., Staubach, N., Lipps, C., Nef, H.M., Möllmann, H., n.d. 1,7 *,.
- Hu, P., Dai, T., Yu, W., Luo, Y., Huang, S., 2017. Intercellular adhesion molecule 1 rs5498 polymorphism is associated with the risk of myocardial infarction. *Oncotarget* 8, 52594–52603. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17529>
- ICH Harmonised Tripartite Guideline, 1996. Guideline for good clinical practice E6(R1). ICH Harmon. Tripart. Guidel. 1996, i–53. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1012246>
- Ingersoll, M., Spanbroek, R., Lottaz, C., Gautier, E., Frankenberger, M., Hoffmann, R., Lang, R., Haniffa, M., Collin, M., Tacke, F., Habenicht, A.J., Ziegler-Heitbrock, L., Randolph, G.J., 2010. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 115, 10–20. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-235028.differential>
- Introduction to flow cytometry [WWW Document], n.d. URL <https://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>
- Italiani, P., Mazza, E.M.C., Lucchesi, D., Cifola, I., Gemelli, C., Grande, A., Battaglia, C., Biciato, S., Boraschi, D., 2014. Transcriptomic profiling of the development of the inflammatory response in human monocytes in vitro e87680. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087680>
- Johnston, R.B., 1988. Monocytes and Macrophages. *N. Engl. J. Med.* 318, 747–752. <https://doi.org/10.1056/NEJM198803243181205>
- Kanehisa, M., Goto, S., Furumichi, M., Tanabe, M., Hirakawa, M., 2009. KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* 38, 355–360. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp896>
- Kikuchi-Taura, A., Yura, A., Tsuji, S., Ohshima, S., Kitatoube, A., Shimizu, T., Nii, T.,

- Katayama, M., Teshigawara, S., Yoshimura, M., Kudo-Tanaka, E., Harada, Y., Matsushita, M., Hashimoto, J., Saeki, Y., 2015. Monocyte CD64 expression as a novel biomarker for the disease activity of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 24, 1076–1080. <https://doi.org/10.1177/0961203315579093>
- Kiliszek, M., Burzynska, B., Michalak, M., Gora, M., Winkler, A., Maciejak, A., Leszczynska, A., Gajda, E., Kochanowski, J., Opolski, G., 2012. Altered Gene Expression Pattern in Peripheral Blood Mononuclear Cells in Patients with Acute Myocardial Infarction. *PLoS One* 7, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050054>
- Kitchens, R.L., 2000. Role of CD14 in cellular recognition of bacterial lipopolysaccharides. *Chem. Immunol.* 74, 61–82.
- Kleeberger, C.A., Lyles, R.H., Margolick, J.B., Rinaldo, C.R., Phair, J.P., Giorgi, J. V., 1999. Viability and recovery of peripheral blood mononuclear cells cryopreserved for up to 12 years in a multicenter study. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6, 14–9.
- Kratofil, R.M., Kubes, P., Deniset, J.F., 2017. Monocyte conversion during inflammation and injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37, 35–42. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.308198>
- Lange, S., Bender, R., 2007. Median oder Mittelwert? *Dtsch. Med. Wochenschr.* 132 Suppl, 1–2. <https://doi.org/10.1055/s-2007-959024>
- Leick, J., Vollert, J., Möckel, M., Radke, P., Hamm, C., 2011. „Standard operating procedures“ zur Umsetzung der Leitlinien bei Patienten mit Brustschmerz. *Der Kardiol.* 5, 443–457. <https://doi.org/10.1007/s12181-011-0378-3>
- Libby, P., 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868–74. <https://doi.org/10.1038/nature01323>
- Liebetrau, C., Hoffmann, J., Dörr, O., Gaede, L., Blumenstein, J., Biermann, H., Pyttel, L., Thiele, P., Troidl, C., Berkowitsch, A., Rolf, A., Voss, S., Hamm, C.W., Nef, H., Möllmann, H., 2015a. Release kinetics of inflammatory biomarkers in a clinical model of acute myocardial infarction. *Circ. Res.* 116, 867–875. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.304653>
- Liebetrau, C., Hoffmann, J., Dörr, O., Gaede, L., Blumenstein, J., Biermann, H., Pyttel, L., Thiele, P., Troidl, C., Berkowitsch, A., Rolf, A., Voss, S., Hamm, C.W., Nef, H., Möllmann, H., 2015b. Release kinetics of inflammatory biomarkers in a clinical model of acute myocardial infarction. *Circ. Res.* 116, 867–875. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.304653>

- Liebetrau, C., Nef, H.M., Hamm, C.W., 2014. Troponin: More lessons to learn. *Eur. Heart J.* 35, 338–340. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh357>
- Liu, A., Wan, A., Feng, A., Rui, R., Zhou, B., 2018. ICAM-1 gene rs5498 polymorphism decreases the risk of coronary artery disease. *Med. (United States)* 97, 1–9. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000012523>
- Lockmann, A., Schön, M.P., 2013. Phenotypic and functional traits of peripheral blood mononuclear cells retained by controlled cryopreservation: Implications for reliable sequential studies of dynamic interactions with endothelial cells. *Exp. Dermatol.* 22, 358–359. <https://doi.org/10.1111/exd.12123>
- Loffredo, S., Staiano, R.I., Granata, F., Costantino, V., Borriello, F., Frattini, A., Lepore, M.T., Mangoni, A., Marone, G., Triggiani, M., 2014. Simplexide induces CD1d-dependent cytokine and chemokine production from human monocytes. *PLoS One* 9, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111326>
- Lowdell, M., 2001. Data analysis in flow cytometry 77, 705–713. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20901>.Data
- Ma, X.W., Chang, Z.W., Qin, M.Z., Sun, Y., Huang, H.L., He, Y., 2009. Decreased expression of complement regulatory proteins, CD55 and CD59, on peripheral blood leucocytes in patients with type 2 diabetes and macrovascular diseases. *Chin. Med. J. (Engl.)* 122, 2123–2128. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2009.18.009>
- MacKay, M.H., Ratner, P.A., Johnson, J.L., Humphries, K.H., Buller, C.E., 2011. Gender differences in symptoms of myocardial ischaemia. *Eur. Heart J.* 32, 3107–3114. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh358>
- Madjid, M., Awan, I., Willerson, J.T., Casscells, S.W., 2004. Leukocyte count and coronary heart disease: Implications for risk assessment. *J. Am. Coll. Cardiol.* 44, 1945–1956. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2004.07.056>
- Maekawa, Y., Anzai, T., Yoshikawa, T., Asakura, Y., Takahashi, T., Ishikawa, S., Mitamura, H., Ogawa, S., 2002. Prognostic significance of peripheral monocytosis after reperfused acute myocardial infarction: a possible role for left ventricular remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.* 39, 241–246. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(01\)01721-1](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(01)01721-1)
- Maguire, O., Jr., J.D.T., Shanahan, T.C., Wallace, P.K., Minderman, H., 2015. Flow Cytometry and Solid Organ Transplantation: A Perfect Match. *HHS Public Access* 43, 756–774. <https://doi.org/10.3109/08820139.2014.910022>.Flow

- Matt, P., Lindqvist, U., Kleinau, S., 2015. Elevated membrane and soluble CD64: A novel marker reflecting altered Fc α R function and disease in early rheumatoid arthritis that can be regulated by anti-rheumatic treatment. *PLoS One* 10, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137474>
- Mcdermott, J.E., Wang, J., Mitchell, H., Hafen, R., Ramey, J., Rodland, K.D., 2013. NIH Public Access 7, 37–51. <https://doi.org/10.1517/17530059.2012.718329>. Challenges
- Möckel, M., Searle, J., Hamm, C., Slagman, A., Blankenberg, S., Huber, K., Katus, H., Liebetrau, C., Müller, C., Müller, R., Peitsmeyer, P., Von Recum, J., Tajsic, M., Vollert, J.O., Giannitsis, E., 2015. Early discharge using single cardiac troponin and copeptin testing in patients with suspected acute coronary syndrome (ACS): A randomized, controlled clinical process study. *Eur. Heart J.* 36, 369–376. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu178>
- Murphy, R.F., 1985. Automated identification of subpopulations in flow cytometric list mode data using cluster analysis. *Cytometry* 6, 302–309. <https://doi.org/10.1002/cyto.990060405>
- Nahrendorf, M., Pittet, M.J., Swirski, F.K., 2010. Monocytes: Protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation* 121, 2437–2445. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.916346>
- Neumann, J.T., Sörensen, N.A., Ojeda, F., Schwemer, T., Lehmacher, J., Gönner, S., Jarsetz, N., Keller, T., Schaefer, S., Renné, T., Landmesser, U., Clemmensen, P., Makarova, N., Schnabel, R.B., Zeller, T., Karakas, M., Pickering, J.W., Than, M., Parsonage, W., Greenslade, J., Cullen, L., Westermann, D., Blankenberg, S., 2016. Immediate Rule-Out of Acute Myocardial Infarction Using Electrocardiogram and Baseline High-Sensitivity Troponin I. *Clin. Chem.* 63, 394–402. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.262659>
- Ozdogru, I., Inanc, M.T., Eryol, N.K., Dogan, A., Kaya, M.G., Gul, I., Kalay, N., 2007. CD14⁺ monocyte levels in subgroups of acute coronary syndromes. *Coron. Artery Dis.* 18, 519–22. <https://doi.org/10.1097/MCA.0b013e3282ef4e7c>
- P.M., D., N.N., A., D.D., B., A.L., D., S., P., G., S., 2001. Systemic response of peripheral blood leukocytes and their phagocytic activity during acute myocardial infarction. *Exp. Clin. Cardiol.* 6, 159–166.
- Paczesny, S., Duncan, C., Jacobsohn, D., Krance, R., Leung, K., Carpenter, P., Bollard, C., Renbarger, J., Cooke, K., 2014. Opportunities and challenges of proteomics in pediatric patients: Circulating biomarkers after hematopoietic stem cell

- transplantation as a successful example. *Proteomics - Clin. Appl.* 8, 837–850.
<https://doi.org/10.1002/prca.201400033>
- Paiva, L., Providência, R., Barra, S., Dinis, P., Faustino, A.C., Gonçalves, L., 2015. Universal definition of myocardial infarction: Clinical insights. *Cardiol.* 131, 13–21.
<https://doi.org/10.1159/000371739>
- Palframan, R.T., Jung, S., Cheng, G., Weninger, W., Luo, Y., Dorf, M., Littman, D.R., Rollins, B.J., Zweerink, H., Rot, A., von Andrian, U.H., 2001. Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J. Exp. Med.* 194, 1361–73. <https://doi.org/10.1084/jem.194.9.1361>
- 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. *J. Am. Coll. Cardiol.* 55, 1629–1638. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.08.089>
- Paszkowski-Rogacz, M., Slabicki, M., Pisabarro, M.T., Buchholz, F., 2010. PhenoFam-gene set enrichment analysis through protein structural information. *BMC Bioinformatics* 11, 254. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-254>
- Peng, X., Nelson, E.S., Maiers, J.L., Demali, K. a, 2015. *HHS Public Access* 28, 168–175. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386043-9.00005-0.New>
- Poeckel, D., Funk, C.D., 2010. The 5-lipoxygenase/leukotriene pathway in preclinical models of cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* 86, 243–253.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvq016>
- Pols, M.S., Klumperman, J., 2009. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp. Cell Res.* 315, 1584–1592. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2008.09.020>
- Robinson, J.P., Rajwa, B., Patsekin, V., Davisson, V.J., 2012. Computational analysis of high-throughput flow cytometry data. *Expert Opin. Drug Discov.* 7, 679–693.
<https://doi.org/10.1517/17460441.2012.693475>
- Roffi, M., Patrono, C., Collet, J.-P., Mueller, C., Valgimigli, M., Andreotti, F., Bax, J.J., Borger, M.A., Brotons, C., Chew, D.P., Gencer, B., Hasenfuss, G., Kjeldsen, K., Lancellotti, P., Landmesser, U., Mehilli, J., Mukherjee, D., Storey, R.F., Windecker, S., 2015. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur. Heart J.* 32, 2999–3054. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr236>
- Rogacev, K.S., Cremers, B., Zawada, A.M., Seiler, S., Binder, N., Ege, P., Große-Dunker,

- G., Heisel, I., Hornof, F., Jeken, J., Rebling, N.M., Ulrich, C., Scheller, B., Böhm, M., Fliser, D., Heine, G.H., 2012. CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes independently predict cardiovascular events: A cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J. Am. Coll. Cardiol.* 60, 1512–1520. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.07.019>
- Rogacev, K.S., Zawada, A.M., Hundsdorfer, J., Achenbach, M., Held, G., Fliser, D., Heine, G.H., 2015. Immunosuppression and monocyte subsets. *Nephrol. Dial. Transplant.* 30, 143–153. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfu315>
- Rosenblat, J., Zhang, A., Fear, T., 2012. Biomarkers of myocardial infarction: past, present and future. *Univ. West. Ont. Med. J.* 81, 23–25.
- Ruparelia, N., Godec, J., Lee, R., Chai, J.T., Dall'Armellina, E., McAndrew, D., Digby, J.E., Forfar, J.C., Prendergast, B.D., Kharbanda, R.K., Banning, A.P., Neubauer, S., Lygate, C.A., Channon, K.M., Haining, N.W., Choudhury, R.P., 2015. Acute myocardial infarction activates distinct inflammation and proliferation pathways in circulating monocytes, prior to recruitment, and identified through conserved transcriptional responses in mice and humans. *Eur. Heart J.* 36, 1923–1934. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv195>
- Saha, B., Momen-Heravi, F., Kodys, K., Szabo, G., 2016. MicroRNA cargo of extracellular vesicles from alcohol-exposed monocytes signals naive monocytes to differentiate into M2 macrophages. *J. Biol. Chem.* 291, 149–159. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.694133>
- Saunders, A.E., Johnson, P., 2010. Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45. *Cell. Signal.* 22, 339–348. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.10.003>
- Schofer, N., Hamm, C., Katus, H.A., Kelm, M., Blankenberg, S., 2014. Kommentar zur dritten allgemeinen definition des myokardinfarktes der gemeinschaftlichen ESC/ACCF/AHA/WHF task force. *Kardiologie* 8, 65–71. <https://doi.org/10.1007/s12181-013-0538-8>
- Segura, V., Valero, M., Cantero, L., Muñoz, J., Zarzuela, E., García, F., Aloria, K., Beaskoetxea, J., Arizmendi, J., Navajas, R., Paradela, A., Díez, P., Dégano, R., Fuentes, M., Orfao, A., García Montero, A., Garin-Muga, A., Corrales, F., Sánchez del Pino, M., 2018. In-Depth Proteomic Characterization of Classical and Non-Classical Monocyte Subsets. *Proteomes* 6, 8. <https://doi.org/10.3390/proteomes6010008>

- Shannon, P., Markiel, A., Owen Ozier, 2, Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T., 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303.metabolite>
- Shantsila, E., Wrigley, B., Tapp, L., Apostolakis, S., Montoro-Garcia, S., Drayson, M.T., Lip, G.Y.H., 2011. Immunophenotypic characterization of human monocyte subsets: Possible implications for cardiovascular disease pathophysiology. *J. Thromb. Haemost.* 9, 1056–1066. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04244.x>
- Sharma, N., Imteyaz, A., 2012. Biomarkers in Acute Myocardial Infarction. *J. Clin. Exp. Cardiol.* 3, 8. <https://doi.org/10.4172/2155-9880.1000222>
- Sherman, B.T., Huang, D.W., Tan, Q., Guo, Y., Bour, S., Liu, D., Stephens, R., Baseler, M.W., Lane, H.C., Lempicki, R.A., 2007. DAVID Knowledgebase: a gene-centered database integrating heterogeneous gene annotation resources to facilitate high-throughput gene functional analysis. *BMC Bioinformatics* 8, 426. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-426>
- Shi, C., Pamer, E.G., 2014. Monocyte Recruitment During Infection and Inflammation. *Nat Rev Immunol* 11, 762–774. <https://doi.org/10.1038/nri3070.Monocyte>
- Smith, N.R., Davies, P.S., Levin, T.G., Gallagher, A.C., Keene, D.R., Sengupta, S.K., Wiegand, N., El Rassi, E., Wong, M.H., 2017. Cell Adhesion Molecule CD166/ALCAM Functions Within the Crypt to Orchestrate Murine Intestinal Stem Cell Homeostasis. *Cmgh* 3, 389–409. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.12.010>
- Statistisches Bundesamt, 2015. Statistisches Bundesamt Gesundheit Todesursachen in Deutschland Gestorbene in Deutschland an ausgewählten Todesursachen. *Wirtsch. Stat.* 2.
- Suades, R., Padró, T., Badimon, L., 2015. The Role of Blood-Borne Microparticles in Inflammation and Hemostasis. *Semin Thromb Hemost* 41, 590–606. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1556591>
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., Mesirov, J.P., 2005. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 15545–15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
- Sunderkotter, C., Nikolic, T., Dillon, M.J., van Rooijen, N., Stehling, M., Drevets, D.A., Leenen, P.J.M., 2004. Subpopulations of Mouse Blood Monocytes Differ in

- Maturation Stage and Inflammatory Response. *J. Immunol.* 172, 4410–4417. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.7.4410>
- Swindell, W.R., Remmer, H.A., Sarkar, M.K., Xing, X., Barnes, D.H., Wolterink, L., Voorhees, J.J., Nair, R.P., Johnston, A., Elder, J.T., Gudjonsson, J.E., 2015. Proteogenomic analysis of psoriasis reveals discordant and concordant changes in mRNA and protein abundance. *Genome Med.* 7, 86. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0208-5>
- Thomas, G.D., Hamers, A.A.J., Nakao, C., Marcovecchio, P., Taylor, A.M., McSkimming, C., Nguyen, A.T., McNamara, C.A., Hedrick, C.C., 2017. Human Blood Monocyte Subsets. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37, 1548–1558. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309145>
- Torzewski, J., Torzewski, M., Bowyer, D.E., Frohlich, M., Koenig, W., Waltenberger, J., Fitzsimmons, C., Hombach, V., 1998. C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18, 1386–1392.
- 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. *J. Am. Coll. Cardiol.* 54, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.04.021>
- 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., 2014. Monocyte subset accumulation in the human heart following acute myocardial infarction and the role of the spleen as monocyte reservoir. *Eur. Heart J.* 35, 376–385. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh331>
- Villanova, F., Di Meglio, P., Inokuma, M., Aghaeepour, N., Perucha, E., Mollon, J., Nomura, L., Hernandez-Fuentes, M., Cope, A., Prevost, A.T., Heck, S., Maino, V., Lord, G., Brinkman, R.R., Nestle, F.O., 2013. Integration of Lyoplate Based Flow Cytometry and Computational Analysis for Standardized Immunological Biomarker Discovery. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065485>
- Wang, J., Tan, G.J., Han, L.N., Bai, Y.Y., He, M., Liu, H. Bin, 2017. Novel biomarkers for cardiovascular risk prediction. *J. Geriatr. Cardiol.* 14, 135–150. <https://doi.org/10.11909/j.issn.1671-5411.2017.02.008>

- Weber, M., Rabenau, B., Stanisch, M., Nef, H.M., Möllmann, H., Elsässer, A., Mitrovic, V., Heeschen, C., Hamm, C., 2007. Influence of sample type on soluble CD40 ligand assessment in patients with acute coronary syndromes. *Thromb. Res.* 120, 811–814. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2007.01.014>
- WHO, 2013. Häufigste Todesursachen in Europa: Faktenblatt 4.
- Wo, A.H.B., Wang, X.M., Gornet, T.G., Ordóñez-Llanos, J., 1992. Creatine kinase MB isoforms in patients with skeletal muscle injury: Ramifications for early detection of acute myocardial infarction. *Clin. Chem.* 38, 2396–2400.
- Wong, K.L., Tai, J.J.-Y., 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, e16–31. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-326355>
- Wu, J.Q., Ruth Sassé, T., Wolkenstein, G., Conceicao, V., Miranda Saksena, M., Soedjono, M., Perera, S.S., Wang, B., Dwyer, D.E., Saksena, N.K., 2013. Transcriptome analysis of primary monocytes shows global down-regulation of genetic networks in HIV viremic patients versus long-term non-progressors. *Virology* 435, 308–319. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.10.026>
- Xiao, M., Wang, X., Yan, M., Chen, W., 2016. A systematic evaluation for the potential translation of CD166-related expression as a cancer biomarker. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 16, 925–932. <https://doi.org/10.1080/14737159.2016.1211932>
- Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F., Wang, H., 2014. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark. Res.* 2, 1. <https://doi.org/10.1186/2050-7771-2-1>
- Youn, J.C., Yu, H.T., Jeon, J.W., Lee, H.S., Jang, Y., Park, Y.W., Park, Y.B., Shin, E.C., Ha, J.W., 2014. Soluble CD93 levels in patients with acute myocardial infarction and its implication on clinical outcome. *PLoS One* 9, 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096538>
- Zamilpa, R., Kanakia, R., Cigarroa, J., Dai, Q., Escobar, G.P., Martinez, H., Jimenez, F., Ahuja, S.S., Lindsey, M.L., 2011. CC chemokine receptor 5 deletion impairs macrophage activation and induces adverse remodeling following myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 300, H1418–H1426. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01002.2010>
- Zawada, A.M., Fell, L.H., Untersteller, K., Seiler, S., Rogacev, K.S., Fliser, D., Ziegler-Heitbrock, L., Heine, G.H., 2015. Comparison of two different strategies for human

- monocyte subsets gating within the large-scale prospective CARE FOR HOME Study. *Cytom. Part A* 87, 750–758. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22703>
- Zentrum, S., 2005. Risikofaktoren der KHK und Arteriosklerose : Beachtung im Rahmen der ambulanten ärztlichen Versorgung Zusammenfassung Einleitung 6, 63–70.
- Zhang, Y., Boesen, C.C., Radaev, S., Brooks, A.G., Fridman, W.H., Sautes-Fridman, C., Sun, P.D., 2000. Crystal structure of the extracellular domain of a human FcγRIII. *Immunity* 13, 387–395. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)00038-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)00038-8)
- Zhao, C., Tan, Y.-C., Wong, W.-C., Sem, X., Zhang, H., Han, H., Ong, S.-M., Wong, K.-L., Yeap, W.-H., Sze, S.-K., Kourilsky, P., Wong, S.-C., 2010. The CD14(+/low)CD16(+) monocyte subset is more susceptible to spontaneous and oxidant-induced apoptosis than the CD14(+)CD16(-) subset. *Cell Death Dis.* 1, e95. <https://doi.org/10.1038/cddis.2010.69>
- Zhao, C., Zhang, H., Wong, W.C., Sem, X., Han, H., Ong, S.M., Tan, Y.C., Yeap, W.H., Gan, C.S., Ng, K.Q., Koh, M.B.C., Kourilsky, P., Sze, S.K., Wong, S.C., 2009. Identification of novel functional differences in monocyte subsets using proteomic and transcriptomic methods. *J. Proteome Res.* 8, 4028–4038. <https://doi.org/10.1021/pr900364p>
- 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. *Med. (United States)* 95, e3466. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003466>
- Ziegler-Heitbrock, L., 2014. Reprint of: Monocyte subsets in man and other species. *Cell. Immunol.* 291, 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.06.008>
- Ziegler-heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Derek, N., Leenen, P.J.M., Liu, Y., Macpherson, G., Randolph, G.J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J.M., Lutz, M.B., Hart, D.N., 2014. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood 116, 5–7. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-258558>

Anhang

**Ethik-Kommission bei der
Landesärztekammer Hessen**

Landesärztekammer Hessen, Im Vogelsengesang 3, 60488 Frankfurt

Kerckhoff-Klinik GmbH
z. Hd. Herrn PD Dr. med. Holger Neß
Bonckestraße 2-8
61231 Bad Nauheim

Im Vogelsengesang 3 60488 Frankfurt am Main
Postfach 90 06 69 60446 Frankfurt am Main
Telefon (069) 97672-209
Teletax (069) 97672-377

Vorab per Telefax: 06032/9962927

Ihr Zeichen	(Bitte immer angeben) Unser Zeichen	Datum
	II/1/woe/ewa	20.06.2011
	FF 17/2011	

BioACS: Prospektive Evaluierung neuer biochemischer und zellulärer Marker bei akuten Koronarsyndromen in der frühen Phase der Diagnostik und bei sequentieller Testung

Studienprotokoll Version 1.1 vom 11.04.2011

Patienteninformation und Einverständniserklärung Version 1.1 vom 25.04.2011

Ihr Schreiben vom 26.04.2011, hier eingegangen am 02.05.2011

Sehr geehrter Herr Dr. Neß,

wir bestätigen den Eingang der o. a. Unterlagen. Damit sind die Forderungen der Ethik-Kommission aus dem Schreiben vom 18.04.2011 umgesetzt worden.

Gegen die Durchführung der Studie

BioACS: Prospektive Evaluierung neuer biochemischer Marker bei akuten Koronarsyndromen in der frühen Phase der Diagnostik und bei sequentieller Testung

bestehen nunmehr keine berufs-ethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

Die Ethik-Kommission bittet um zeitnahe Unterrichtung über alle schwerwiegenden oder unerwarteten unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten und die Sicherheit der Studienteilnehmer oder die Durchführung der Studie beeinträchtigen könnten. Dies gilt auch, wenn die Studie aus unvorhergesehenen Gründen abgebrochen wird.

Es wird weiterhin darauf hingewiesen, dass Änderungen oder Erweiterungen des Versuchsplanes der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und ggf. eine erneute Beratung erforderlich wird. Wir bitten, die einzureichenden Änderungen und/oder Erweiterungen der Studienunterlagen deutlich zu kennzeichnen.

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Abbildung 16: Ethikvotum 1/3

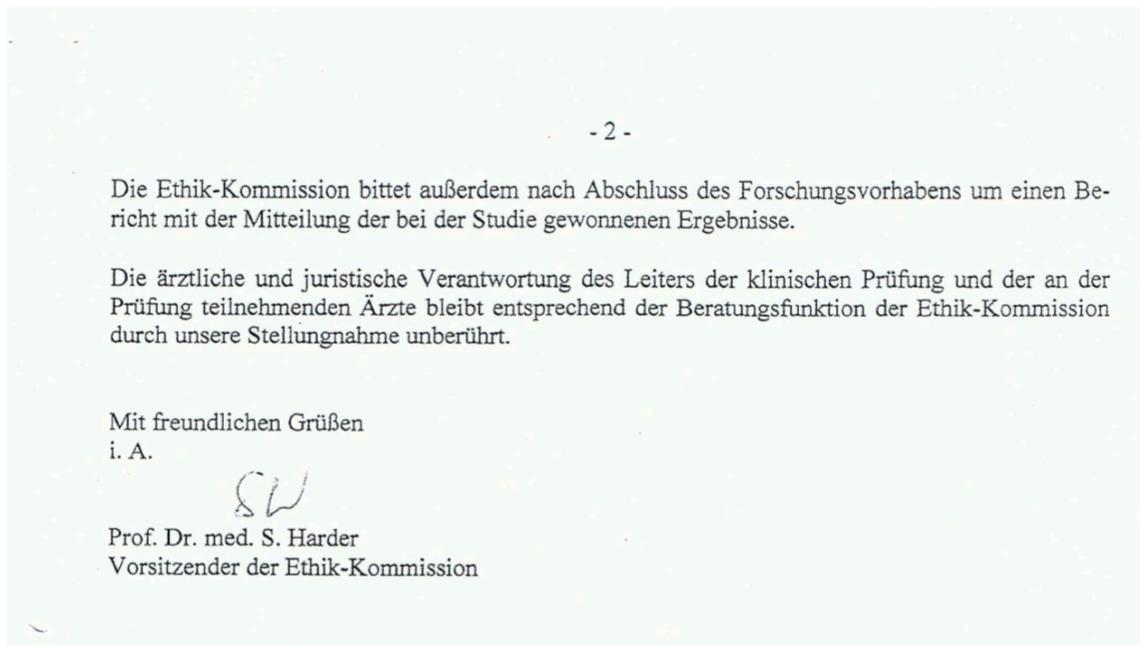


Abbildung 17: Ethikvotum 2/3

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Anlage zum Votum der Studie

Kerckhoff-Klinik GmbH / Herrn PD Dr. med. Holger Nef

BioACs: Prospektive Evaluierung neuer biochemischer Marker bei akuten Koronarsyndromen in der frühen Phase der Diagnostik und bei sequentieller Testung

FF 17/2011

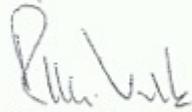
Mitglieder der Ethik-Kommission bei der Landesärztekammer Hessen, die in der Sitzung am **22. März 2011** ein Votum zu der oben bezeichneten Studie abgegeben haben.



Prof. Dr. med. Sebastian Harder
Klinischer Pharmakologe



PD Dr. med. Thomas Konrad
Endokrinologe



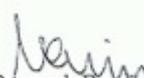
Prof. Dr. med. Werner Rettwitz-Volk
Kinder- und Jugendmediziner



Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Bratzke
Rechtsmediziner



Dr. iur. Annkatrin Helberg-Lubinski
Rechtsanwältin



Prof. Dr. med. Bernhard Bauer
Neurochirurg



Prof. Dr. med. Elke Jäger
Internistin



Dr. med. Jochen Graff
Klinischer Pharmakologe

Abbildung 18: Ethikvotum 3/3

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

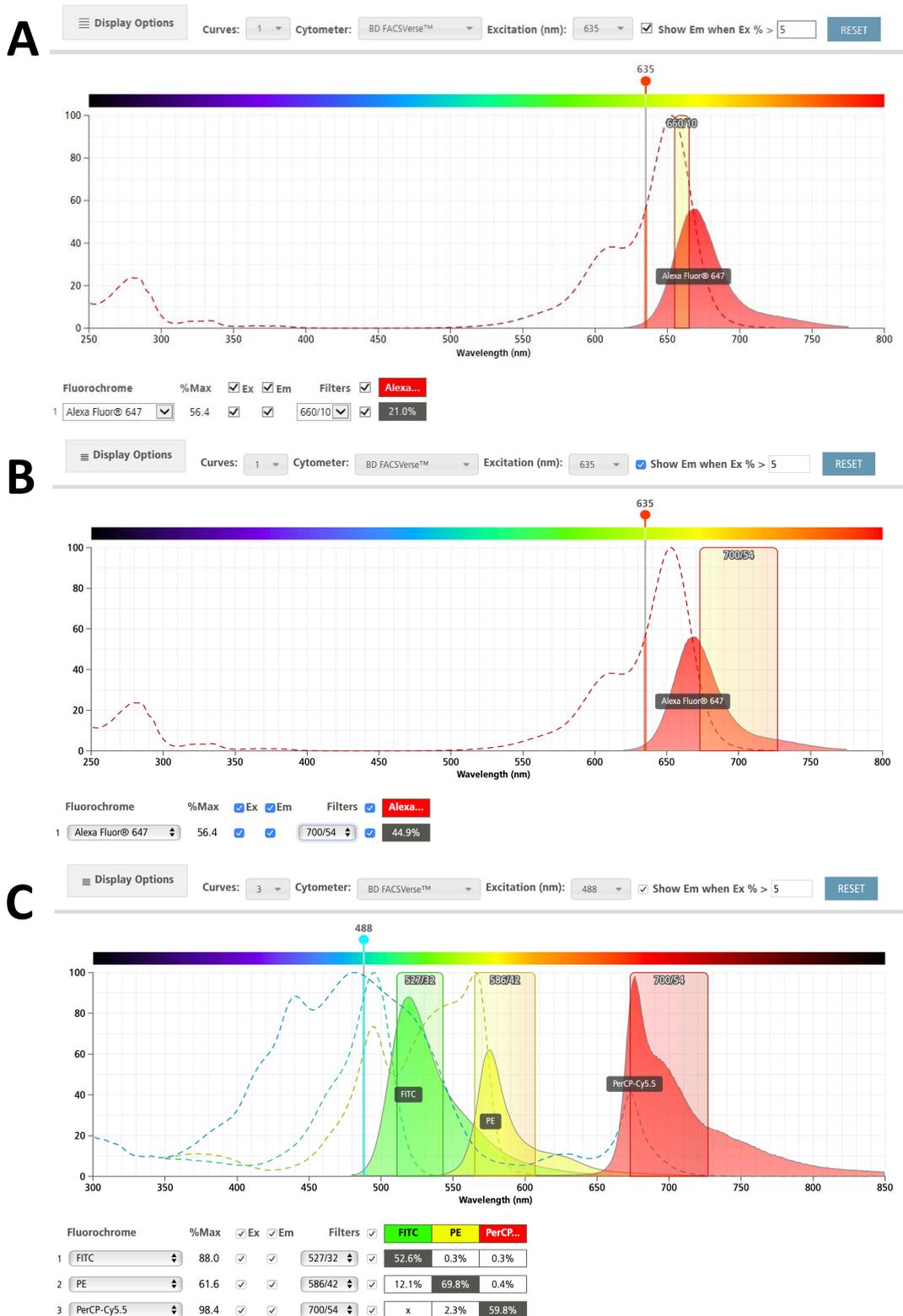


Abbildung 19: A: Excitationsmaximum (gestrichelte Linie) und Emissionsspektrum (durchgezogene Linie) von Alexa Fluor 647 nach Anregung durch den roten Laser (635nm). Der Filter 660/10 (rechteckiger Bereich) markiert die Wellenlänge, bei der die Emission von Alexa Fluor 647 von einem Detektor registriert wurde. Von dem Detektor wurden 21,0% des Emissionsbereichs von Alexa Fluor

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

647 registriert. Für die einzelnen Fluorochrome standen verschiedene Filter zur Verfügung. B: Auswahl eines neuen Filters (700/54 anstatt 660/10) für Alexa Fluor 647. Der Wellenlängenbereich, der durch den Detektor registriert wurde, war größer, sodass der Detektor 44,9% der Emission von Alexa Fluor 647 registrierte. C: Excitationsmaximum (gestrichelte Linie) und Emissionsspektrum (durchgezogene Linie) von FITC (grün), PE (gelb) und PerCP-Cy5.5 (rot) nach Anregung durch den blauen Laser (488nm). Bei den ausgewählten Fluorochromen und den verwendeten Filtern kam es insbesondere bei dem Filter 586/42 zu einer spektralen Überlappung der Emissionen von PE und FITC. 12,1% der Emission von FITC sowie 69,8% der Emission von PE wurden von einem Detektor registriert. Dies führte zu falsch-positiven Ergebnissen.

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

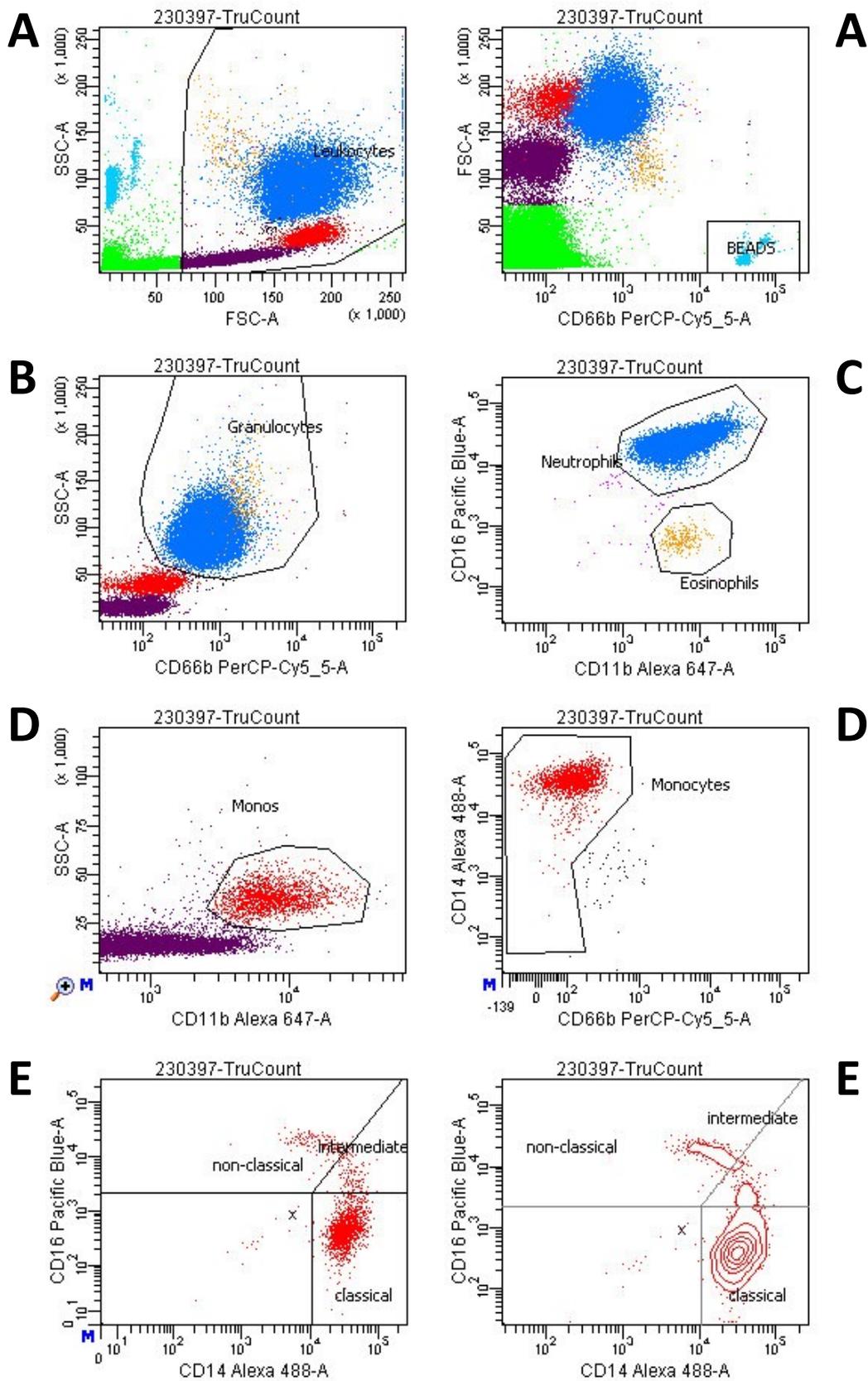


Abbildung 20: Auswertung einer EDTA-Vollblutprobe mit der Software FACSDiva 6.3.1. (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA); A: Das Vorwärtsstreulicht (engl. forward scatter, FSC)

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

wurde gegen das Seitwärtsstreulicht (engl. sideward scatter, SSC) bzw. CD66b aufgetragen, sodass sich die Population der verwendeten Kugeln (hellblaue Ereignisse) sehr genau gegen die restlichen Zellen abgrenzen ließ. Die grünen und violetten Ereignisse stellen Zelldetritus dar. B: Mit Hilfe des SSC und CD66b wurde die Population der Granulozyten (dunkelblaue Ereignisse) identifiziert. C: Mittels CD11b und CD16 war eine weitere Differenzierung der Granulozytenpopulation möglich. Die neutrophilen Granulozyten (dunkelblaue Ereignisse) zeigten eine höhere Fluoreszenzintensität bezüglich CD16 als die eosinophilen Granulozyten (gelben Ereignisse). D: Mittels CD11b und SSC sowie CD66b und CD14 ließ sich die Monozytenpopulation (rote Ereignisse) darstellen. E: Mittels CD14 und CD16 erfolgte die Differenzierung der Monozyten in klassische ($CD14^{++} CD16^{-}$), nicht-klassische ($CD14^{+} CD16^{++}$) und in die intermediäre ($CD14^{++} CD16^{+}$) Subpopulation

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Plate 1

Buffer	CD1a	CD1b	CD1d	CD2	CD3	CD4	CD4v4	CD5	CD6	CD7	CD8a
CD8b	CD9	CD10	CD11a	CD11b	CD11c	CD13	CD14	CD15	CD15s	CD16	CD18
CD19	CD20	CD21	CD22	CD23	CD24	CD25	CD26	CD27	CD28	CD29	CD30
CD31	CD32	CD33	CD34	CD35	CD36	CD37	CD38	CD39	CD40	CD41a	CD41b
CD42a	CD42b	CD43	CD44	CD45	CD45RA	CD45RB	CD45RO	CD46	CD47	CD48	CD49a
CD49b	CD49c	CD49d	CD49e	CD50	CD51/61	CD53	CD54	CD55	CD56	CD57	CD58
CD59	CD61	CD62E	CD62L	CD62P	CD63	CD64	CD66 (a,c,d,e)	CD66b	CD66f	CD69	CD70
CD71	CD72	CD73	CD74	CD75	CD77	CD79b	CD80	CD81	CD83	CD84	CD85

Plate 2

Buffer	CD86	CD87	CD88	CD89	CD90	CD91	CDw93	CD94	CD95	CD97	CD98
CD99	CD99R	CD100	CD102	CD103	CD105	CD106	CD107a	CD107b	CD108	CD109	CD112
CD114	CD116	CD117	CD118 (LIFR cptr)	CD119	CD120a	CD121a	CD121b	CD122	CD123	CD124	CD126
CD127	CD128b	CD130	CD134	CD135	CD137	CD137 Ligand	CD138	CD140a	CD140b	CD141	CD142
CD144	CD146	CD147	CD150	CD151	CD152	CD153	CD154	CD158a	CD158b	CD161	CD162
CD163	CD164	CD165	CD166	CD171	CD172b	CD177	CD178	CD180	CD181	CD183	CD184
CD193	CD195	CD196	CD197	CD200	CD205	CD206	CD209	CD220	CD221	CD226	CD227
CD229	CD231	CD235a	CD243 (p-glyco Protein)	CD244	CD255 (Tweak)	CD268	CD271	CD273	CD274	CD275 (B7-H2)	CD278

Plate 3

Buffer	CD279	CD282	CD305 (LAIR-1)	CD309	CD314 (NKG2D)	CD321 (F11 Rcptr)	CDw327	CDw328	CDw329	CD335 (NKP46)	CD336
CD337	CD338 (ABCG2)	CD340 (Her2)	$\alpha\beta$ TCR	β 2micro globulin	BLTR-1	CLIP	CMRF-44	CMRF-56	EGF Receptor	IMP Receptor	$\gamma\delta$ TCR
Hem. Prog. Cell	HLA-A,B,C	HLA-A2	HLA-DQ	HLA-DR	HLA-DR,DP,DQ	Invariant NKT	Disialo-ganglioside GD2	MIC A/B	NKB1	SSEA-1	SSEA-4
TRA-1-60	TRA-1-81	V β 23	V β 8	CD326	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
mIgM	mIgG1	mIgG2a	mIgG2b	mIgG3	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
CD49f	CD104	CD120b	CD132	CD201	CD210	CD212	CD267	CD294	SSEA-3	Cutaneous Lymph. Antigen	Integrin β 7
rIgM	rIgG1	rIgG2a	rIgG2b	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer
Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer

Abbildung 21: Übersicht der verwendeten Antikörper für die Oberflächenmarkeranalyse (BD Lyoplate™ Screening Panels Human Cell Surface Markers/Mouse Cell Surface Markers BD Lyoplate™ Screening Panels Human and Mouse Cell Surface Markers, 2013)

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

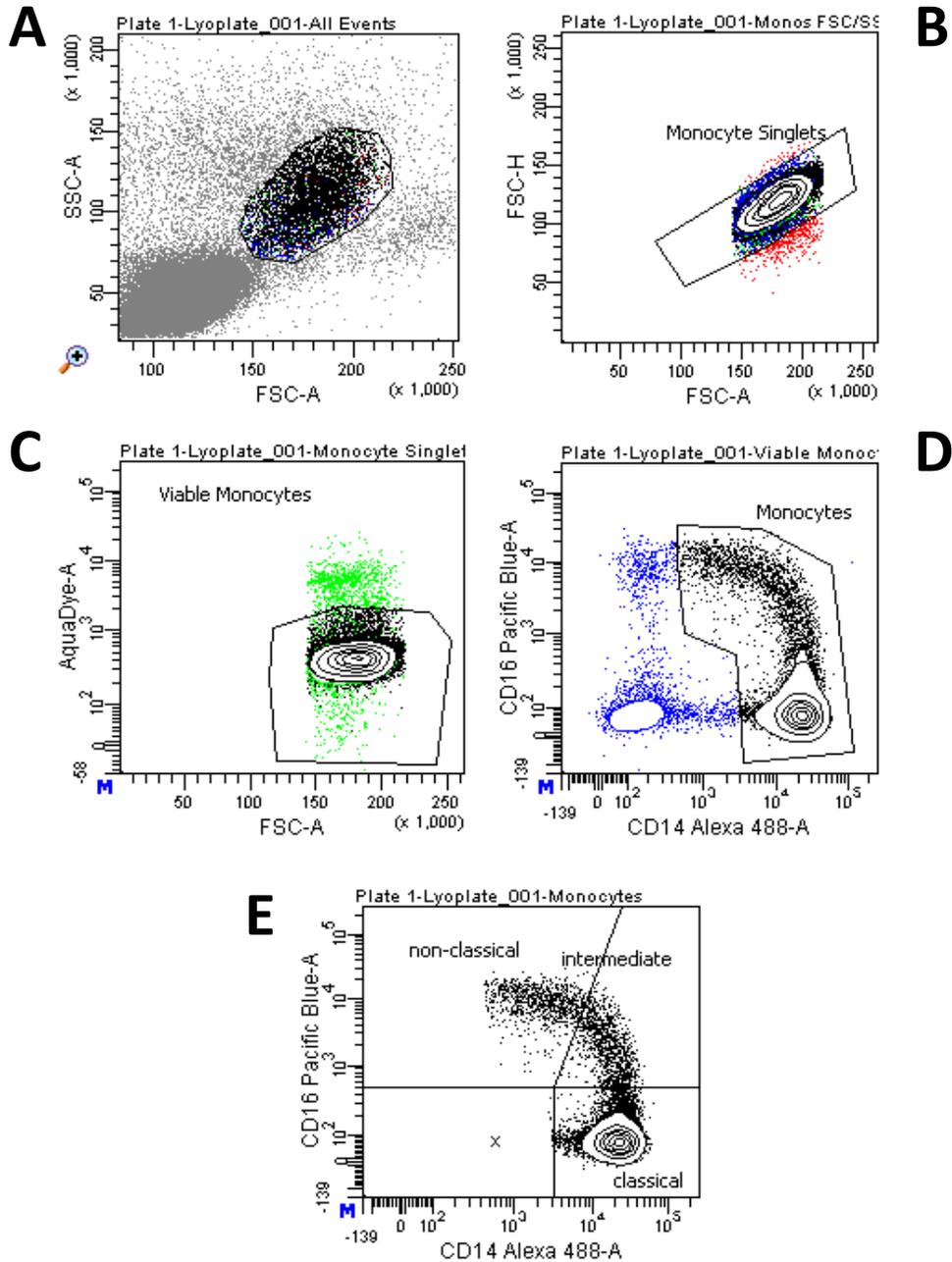


Abbildung 22: Auswertungsschema der Oberflächenmarkeranalyse mit der Software FACSDiva Version 6.3.1. (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA), A: Das Vorwärtsstreuung (engl. forward scatter, FSC) wurde gegen das Seitwärtsstreuung (engl.

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

sideward scatter, SSC) aufgetragen. Aufgrund der Komplexität der Monozyten (schwarze Ereignisse) traten diese hervor. B: Das Vorwärtsstreulicht wurde verwendet, um die verschiedenen Eigenschaften des Signals der Einzelzelle wiederzugeben. Dadurch konnten singuläre Monozyten (schwarze Ereignisse) erkannt werden. C: Das Vorwärtsstreulicht wurde gegen AquaDye (Invitrogen; Carlsbad, Californien, USA) aufgetragen. Dadurch ließen sich die lebenden von den toten Monozyten unterscheiden. D: Mittels CD14 und CD16 wurde eine Verunreinigung durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen, blaue Ereignisse) ausgeschlossen. E: Mittels CD14 und CD16 ließ sich die Monozytenpopulation weiter in die klassische (CD14⁺⁺ CD16⁻), in die intermediäre (CD14⁺⁺ CD16⁺) und die nicht-klassische (CD14⁺ CD16⁺⁺) Subpopulation aufspalten. Nun konnte die Ausprägung der einzelnen Oberflächenmarker in den Subpopulationen untersucht werden.

CD-Klassifikation	Alias
-	EGFR
CD108	SEMA7A
CD116	CSF2RA
CD120b	TNFRSF1B
CD135	FLT3
CD166	ALCAM
CD171	L1CAM
CD212	IL12RB1
CD309	KDR
CD340	ERBB2
CD35	CR1
CD49a	ITGA1
CD49e	ITGA3
CD55	-

*Tabelle 22: Übersicht über die Oberflächenmarker der ES Subgruppe der hochregulierten Gensets ($p < 0,05$) für die **klassische** Subpopulation. Die farblich hervorgehobenen Oberflächenmarker gehörten zu einem Genset, welches eine $FDR < 0,25$ aufwies.*

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

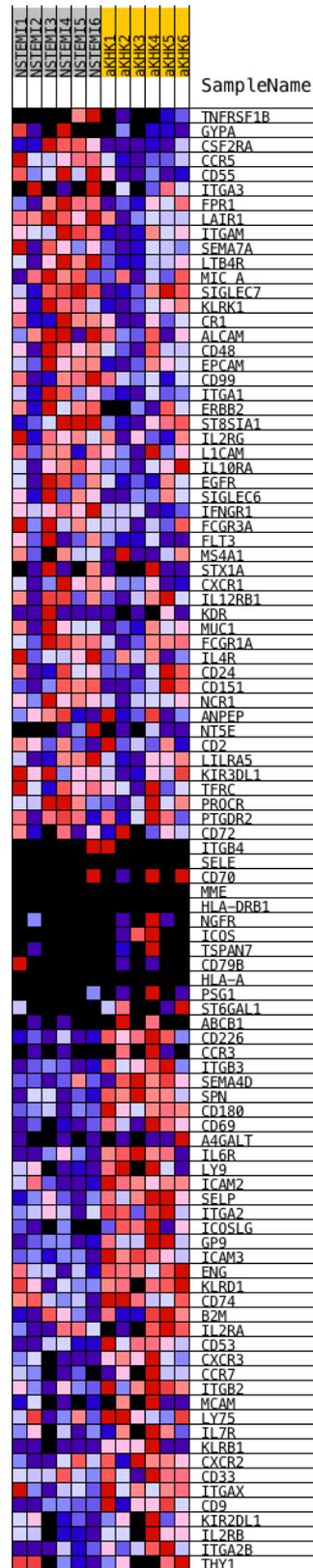


Abbildung 23: Expression der Oberflächenmarker in den beiden Kohorten für die **klassische** Subpopulation (rot=hoch, pink=moderat, hell-blau=niedrig, dunkel-blau=sehr niedrig)

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

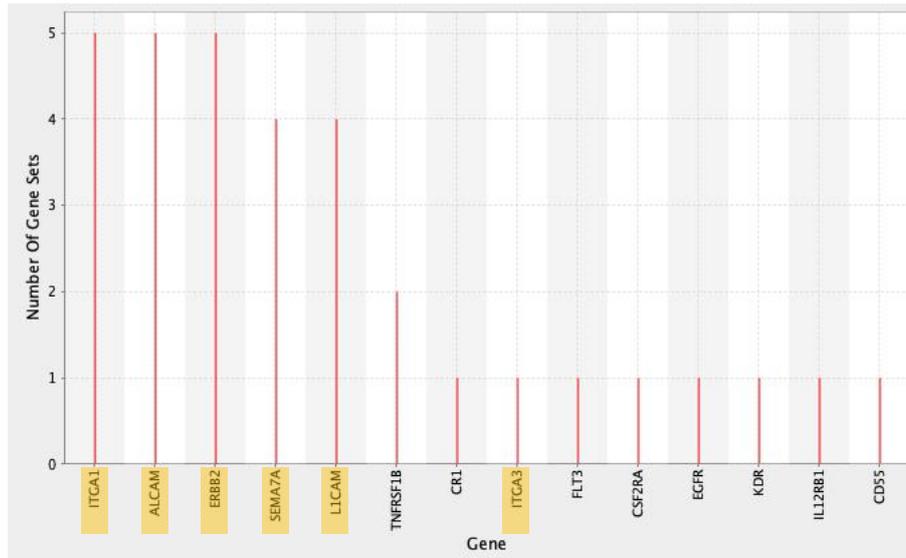


Abbildung 24: Häufigkeit der Oberflächenmarker der ES Subgruppe der signifikanten Gensets ($p < 0,05$) in der **klassischen** Subpopulation. Die farblich hervorgehobenen Oberflächenmarker waren in den Gensets enthalten, die eine $FDR < 0,25$ aufwiesen.

CD-Klassifikation	Alias
-	BLTR-1
-	FPR1
CD107a	LAMP1
CD11b	ITGAM
CD124	IL4R
CD13	ANPEP
CD130	IL6ST
CD14	LPSR
CD152	CTLA4
CD163	-
CD166	ALCAM
CD184	CXCR4
CD195	CCR5
CD1d	-
CD227	MUC1
CD235a	GYPA

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

CD-Klassifikation	Alias
CD24	-
CD271	NGFR
CD273	PDCD1LG2
CD282	TLR2
CD314	KLRK1
CD32	FCGR2A
CD336	NCR2
CD338	ABCG2
CD340	ERBB2
CD35	CR1
CD38	ADP-RC1
CD45	PTPRC
CD48	-
CD49a	ITGA1
CD55	DAF
CD59	-
CD64	FCGR1A
CD74	-
CD87	PLAUR
CD9	FAS5
CD93	-

*Tabelle 23: Übersicht über die Oberflächenmarker der ES Subgruppe der hochregulierten Gensets ($p < 0,05$) für die **intermediäre** Subpopulation. Die farblich hervorgehobenen Oberflächenmarker gehörten zu einem Genset, welches eine $FDR < 0,25$ aufwies.*

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

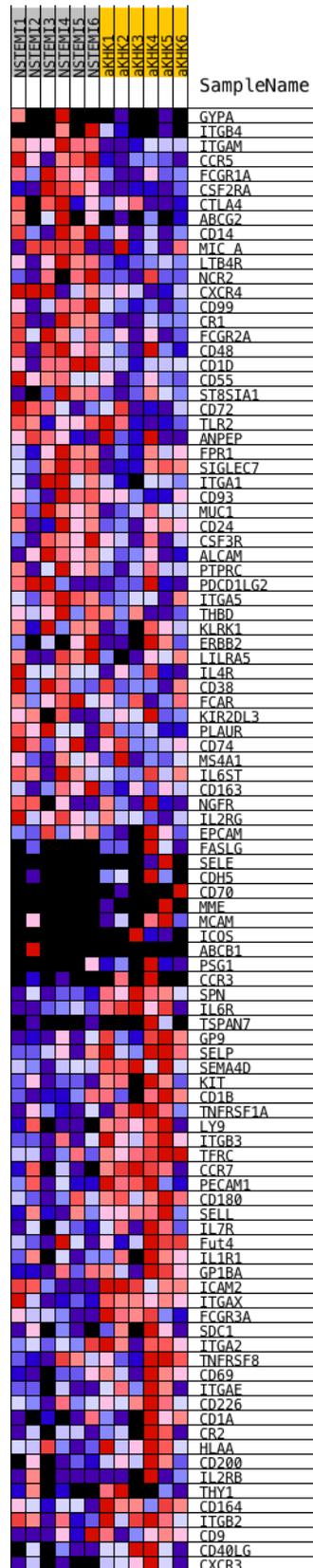


Abbildung 25: Expression der Oberflächenmarker in den beiden Kohorten für die **intermediäre** Subpopulation (rot=hoch, pink=moderat, hell-blau=niedrig, dunkel-blau=sehr niedrig)

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

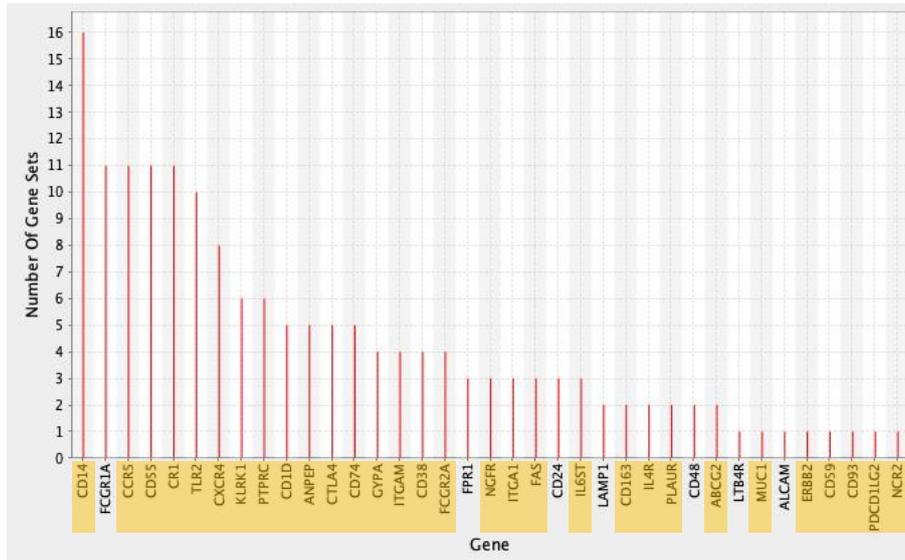


Abbildung 26: Häufigkeit der Oberflächenmarker der ES Subgruppe der signifikanten Gensets ($p < 0,05$) in der **intermediären** Subpopulation. Die farblich hervorgehobenen Oberflächenmarker waren in den Gensets enthalten, die eine $FDR < 0,25$ aufwiesen.

CD-Klassifikation	Alias
-	FPR1
CD	
CD107a	LAMP1
CD107b	LAMP2
CD11b	ITGAM
CD124	IL4R
CD13	ANPEP
CD130	IL6ST
CD14	LPSR
CD163	-
CD164	-
CD166	ALCAM
CD18	ITGB2
CD184	CXCR4
CD195	CCR5

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

CD-Klassifikation	Alias
CD1d	-
CD205	LY75
CD271	NGFR
CD282	TLR2
CD32	FCGR2A
CD35	CR1
CD36	-
CD38	ADP-RC1
CD38	-
CD40	TNFRSF4
CD45	PTPRC
CD46	-
CD49b	ITGA2
CD49d	ITGA4
CD49e	ITGA5
CD54	ICAM1
CD55	DAF
CD61	ITGB3
CD62	SELP
CD63	-
CD64	FCGR1A
CD74	-
CD84	-
CD85	LILRA5
CD86	-
CD91	LRP1
CD93	-

Tabelle 24: Übersicht über die Oberflächenmarker der ES Subgruppe der hochregulierten Gensets ($p < 0,05$) für die **nicht-klassische** Subpopulation. Die farblich hervorgehobenen Oberflächenmarker gehörten zu eine Genset, welches eine $FDR < 0,25$ aufwies.

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

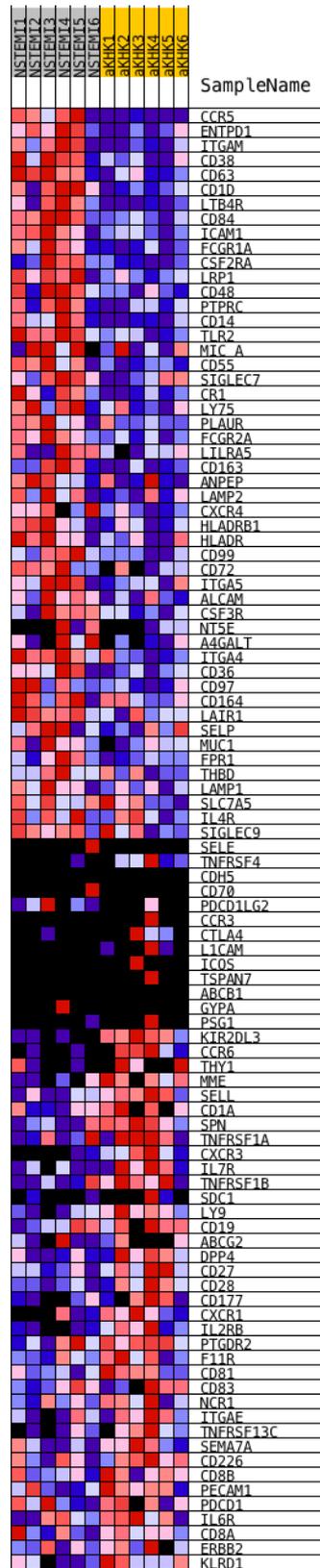


Abbildung 27: Expression der Oberflächenmarker in den beiden Kohorten für die **nicht-klassische** Subpopulation (rot=hoch, pink=moderat, hell-blau=niedrig, dunkel-blau=sehr niedrig)

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

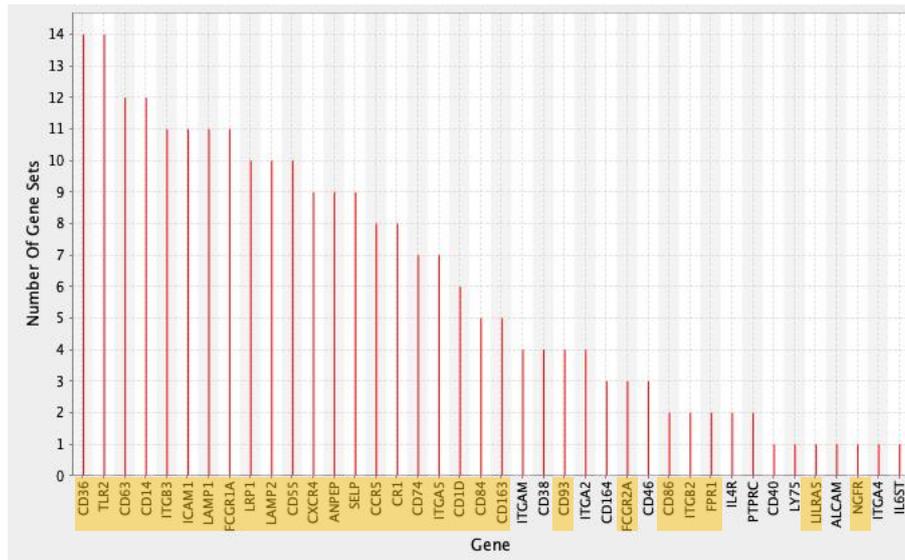


Abbildung 28: Häufigkeit der Oberflächenmarker der ES Subgruppe der signifikanten Gensets ($p < 0,05$) in der **nicht-klassischen** Subpopulation. Die farblich hervorgehobenen Oberflächenmarker waren in den Gensets enthalten, die eine $FDR < 0,25$ aufwiesen.

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

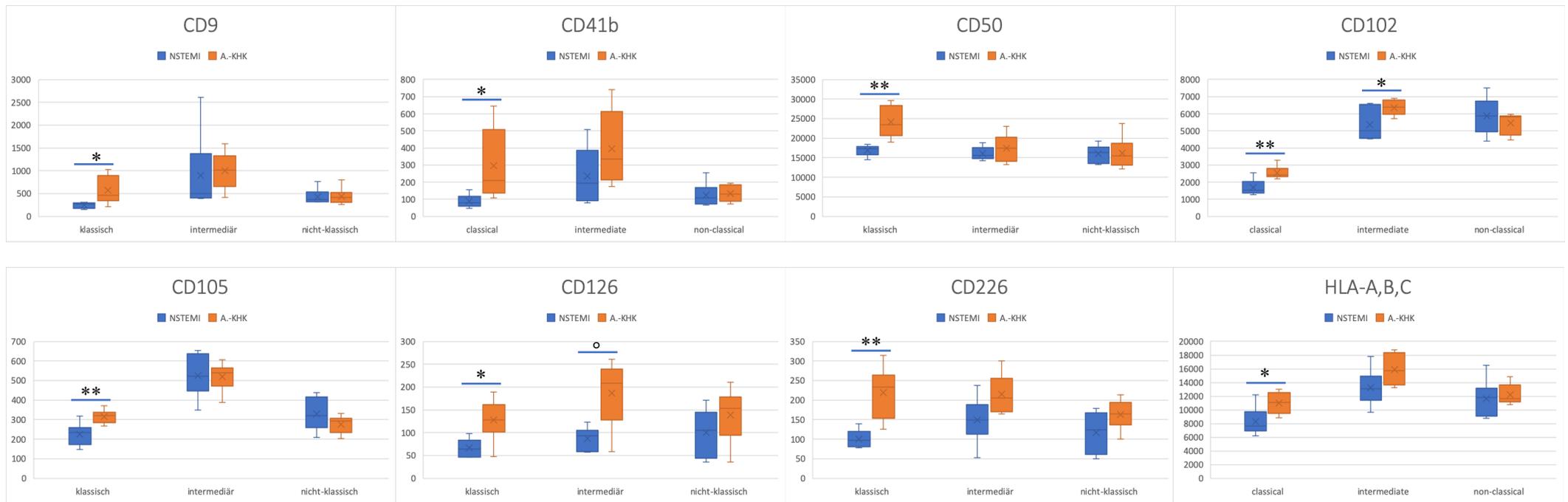


Abbildung 30: Oberflächenmarker, deren Expression sich nur in der **klassischen** Subpopulation signifikant in den beiden Kohorten unterschieden (*= $p < 0,05$ und $1,5 < FC < 0,75$, **= $p < 0,01$ und $1,5 < FC < 0,75$, ***= $p < 0,001$ und $1,5 < FC < 0,75$, °= $p < 0,05$ und $0,75 < FC < 1,5$, °°= $p < 0,05$ und $0,75 < FC < 1,5$)

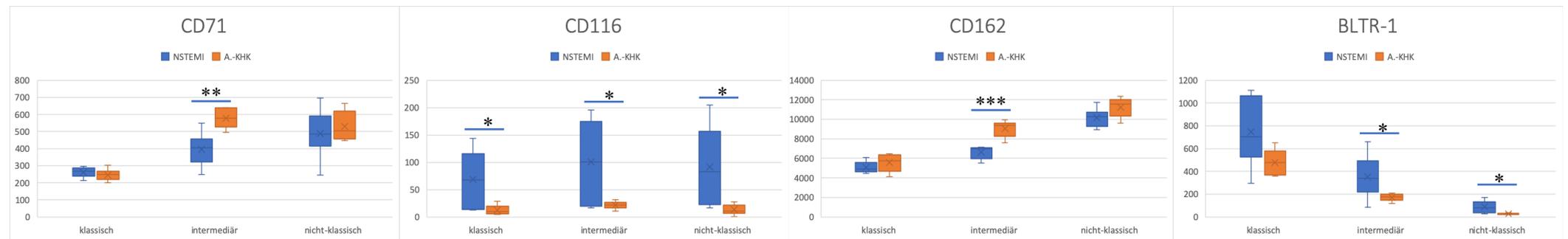


Abbildung 29: Oberflächenmarker, deren Expression sich nur in der **intermediären** Subpopulation signifikant in den beiden Kohorten unterschieden. Die Oberflächenmarker CD116 und BLTR-1 wurden hier aufgeführt, weil ihre Expression in den anderen Subpopulationen unterhalb der Untergrenze liegt. (*= $p < 0,05$ und $1,5 < FC < 0,75$, **= $p < 0,01$ und $1,5 < FC < 0,75$, ***= $p < 0,001$ und $1,5 < FC < 0,75$)

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

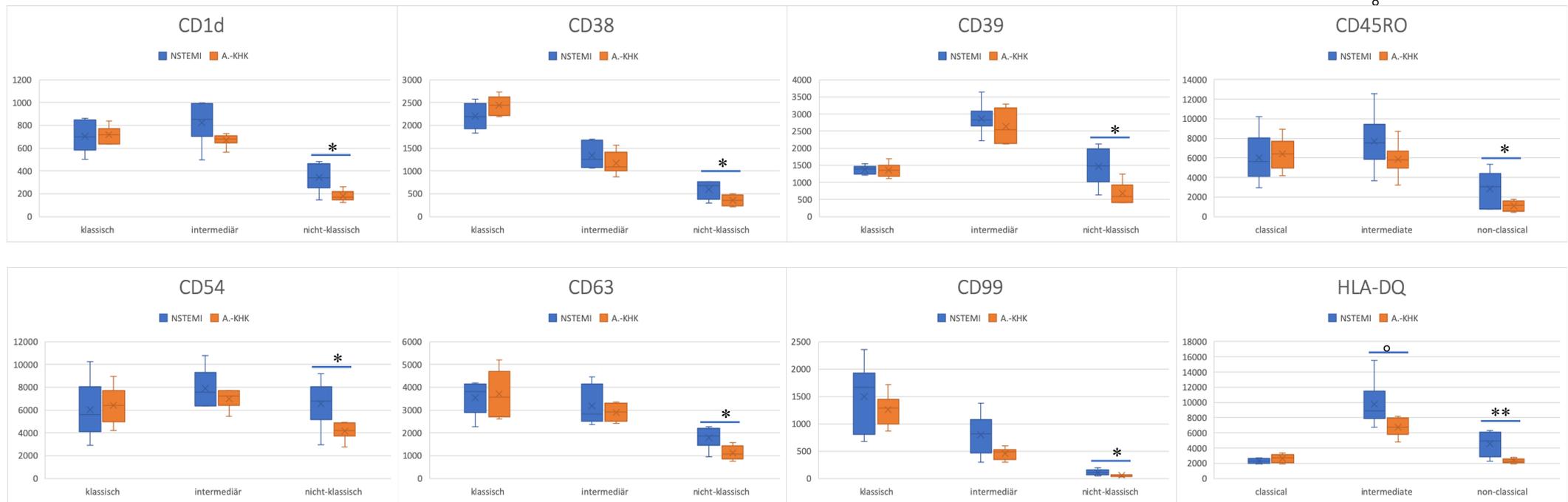


Abbildung 31: Oberflächenmarker, deren Expression sich nur in der **nicht-klassischen** Subpopulation signifikant in den beiden Kohorten unterschieden (*= $p < 0,05$ und $1,5 < FC < 0,75$, **= $p < 0,01$ und $1,5 < FC < 0,75$, ***= $p < 0,001$ und $0,75 < FC < 1,5$, °= $p < 0,05$ und $0,75 < FC < 1,5$, °°= $p < 0,05$ und $0,75 < FC < 1,5$, °°°= $p < 0,05$ und $0,75 < FC < 1,5$)

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

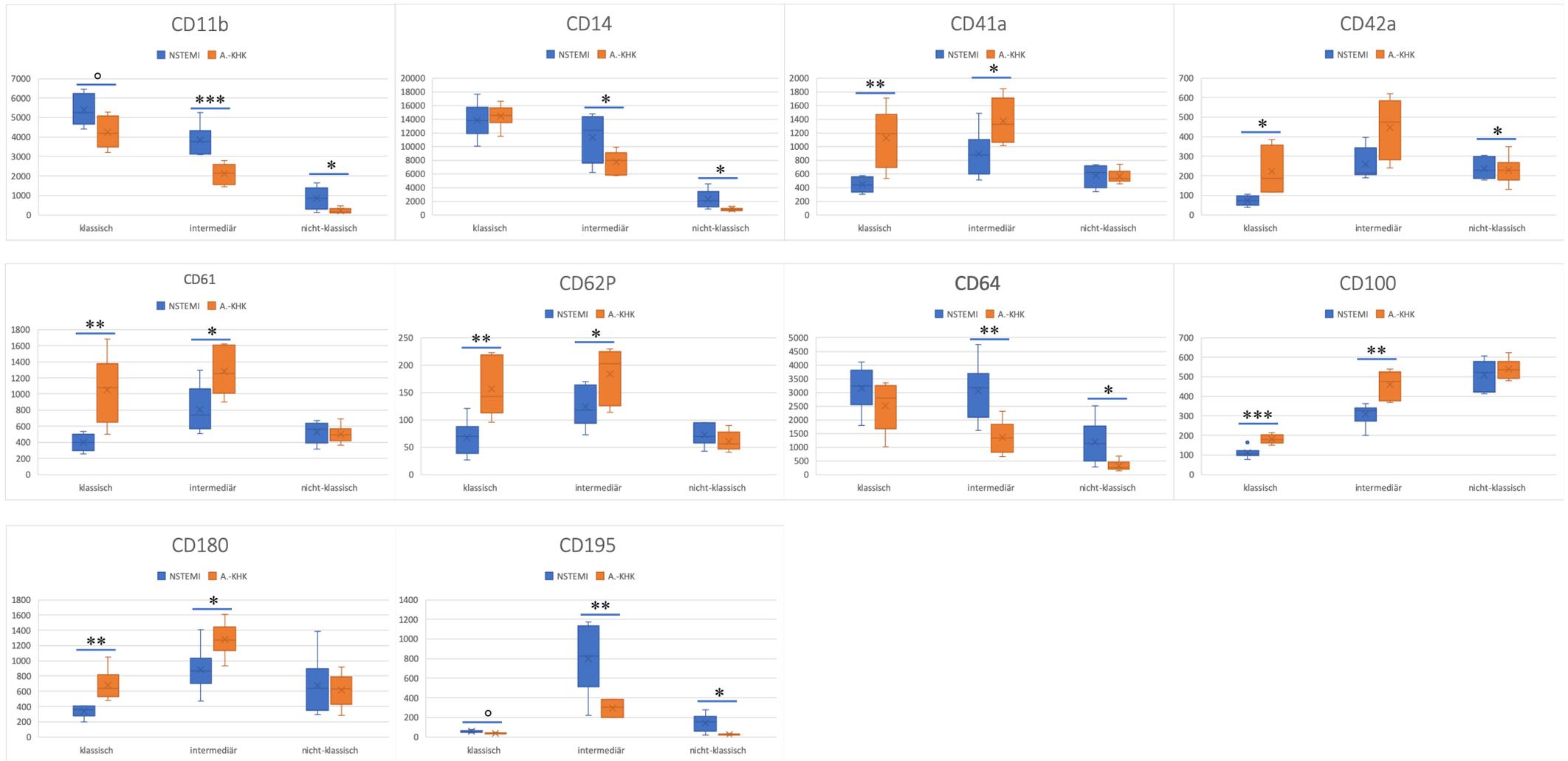


Abbildung 32: Oberflächenmarker, deren Expression sich in mehr als einer Subpopulation für die beiden Kohorten unterschied. (*= $p < 0,05$ und $1,5 < FC < 0,75$, **= $p < 0,01$ und $1,5 < FC < 0,75$, ***= $p < 0,001$ und $1,5 < FC < 0,75$, °= $p < 0,05$ und $0,75 < FC < 1,5$, °°= $p < 0,05$ und $0,75 < FC < 1,5$, °°°= $p < 0,05$ und $0,75 < FC < 1,5$)

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

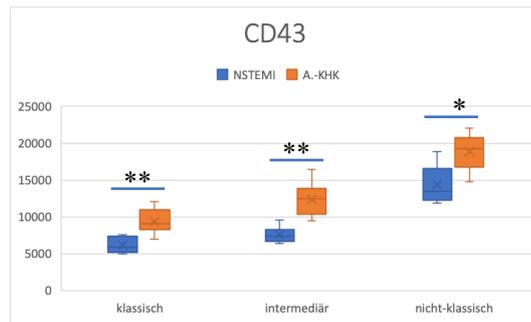


Abbildung 33: Oberflächenmarker, deren Expression sich in mehr als einer Subpopulation für die beiden Kohorten unterschied.
(*= $p < 0,05$ und $1,5 < FC < 0,75$, **= $p < 0,01$ und $1,5 < FC < 0,75$, ***= $p < 0,001$ und $1,5 < FC < 0,75$)

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

NAME	GRÖßE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
GO_C_P_O	14	0,513	19648378	0.0	0,017	0.1	23	tags=43%, list=11%, signal=45%
GO_N_P_D	10	0,669	19668137	0.0	0,034	0.1	23	tags=50%, list=11%, signal=53%
GO_S_C	11	0,471	1709417	0.0	0,038	0.3	19	tags=27%, list=9%, signal=28%
GO_N_D	12	0,541	17882576	0.0	0,047	0.3	23	tags=42%, list=11%, signal=44%
GO_N_D	12	0,541	17882576	0.0	0,063	0.3	23	tags=42%, list=11%, signal=44%
GO_P_A_A_M	13	0,626	15133476	0.0	0,339	1.0	34	tags=46%, list=16%, signal=52%
GO_R_O_P	13	0,592	13169199	0.0	1,000	1.0	14	tags=23%, list=7%, signal=23%

Tabelle 25: *signifikant hochregulierte Gensets in der klassischen Subpopulation (GO_CELL_PROJECTION_ORGANIZATION, GO_NEURON_PROJECTION_DEVELOPMENT, GO_SOMATODENDRITIC_COMPARTMENT, GO_NEURON_DIFFERENTIATION, GO_NEURON_DEVELOPMENT, GO_PEPTIDYL_AMINO_ACID_MODIFICATION, GO_REGULATION_OF_PROTEOLYSIS)*

NAME	GRÖßE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
GO_R_T_A	16	0,489	21484778	0.0	0	0.0	8	tags=19%, list=4%, signal=18%
GO_A_O_I_R	27	0,451	18192166	0.0	0,028	0.2	39	tags=41%, list=18%, signal=44%
GO_P_R_O_I_I_R	15	0,356	18538246	0.0	0,031	0.2	21	tags=27%, list=10%, signal=28%

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

NAME	GRÖÖE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
GO_I_W_H	28	0,418	18212498	0.0	0,033	0.2	22	tags=21%, list=10%, signal=21%
GO_V_L_C	27	0,424	18593732	0.0	0,039	0.2	22	tags=22%, list=10%, signal=22%
GO_V_R_A	26	0,430	17144567	0.0	0,044	0.3	22	tags=23%, list=10%, signal=23%
GO_R_O_I_I_R	18	0,387	17574359	0.0	0,044	0.3	21	tags=28%, list=10%, signal=28%
GO_P	10	0,510	17183528	0.0	0,049	0.3	26	tags=40%, list=12%, signal=43%
GO_M_I_E_O_O_O_I_S_I	27	0,424	18593732	0.0	0,051	0.2	22	tags=22%, list=10%, signal=22%
GO_I_I_R	31	0,385	19130491	0.0	0,077	0.2	21	tags=23%, list=10%, signal=21%
GO_A_O_I_I_R	11	0,372	16213663	0.0	0,118	0.5	35	tags=36%, list=17%, signal=41%
GO_R_O_P	13	0,429	15530146	0.0	0,182	0.7	61	tags=46%, list=29%, signal=61%
GO_N_R_O_I_S_P	22	0,415	15354592	0.0	0,202	0.7	43	tags=45%, list=20%, signal=51%

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

NAME	GRÖßE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
GO_M_O	19	0,391	15197808	0.0	0,204	0.7	12	tags=16%, list=6%, signal=15%
GO_N_R_O_C_C	23	0,364	14936855	0.0	0,217	0.7	53	tags=39%, list=25%, signal=47%
GO_S_M_M_S	10	0,484	14740038	0.0	0,218	0.7	23	tags=30%, list=11%, signal=32%
GO_P_R_O_I_R	42	0,355	14744416	0.0	0,226	0.7	45	tags=36%, list=21%, signal=36%
GO_C_R_T_B_S	14	0,455	1480835	0.0	0,229	0.7	35	tags=29%, list=17%, signal=32%
GO_E	27	0,377	14519477	0.0	0,232	0.7	23	tags=22%, list=11%, signal=22%
GO_E_V	15	0,432	14544138	0.0	0,243	0.7	47	tags=40%, list=22%, signal=48%
GO_V	35	0,313	13477705	0.0	0,396	0.8	23	tags=20%, list=11%, signal=19%
GO_R_M_E	16	0,347	13342826	0.0	0,412	0.9	8	tags=13%, list=4%, signal=12%
GO_E_V_M	11	0,377	13020917	0.0	0,446	0.9	58	tags=45%, list=27%, signal=59%

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

NAME	GRÖÖE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
GO_S_C	11	0,456	13082893	0.0	0,462	0.9	58	tags=55%, list=27%, signal=71%
GO_M_M	28	0,338	12732288	0.0	0,521	0.9	31	tags=29%, list=15%, signal=29%
GO_I_R_R_C_S_R_S_P	22	0,348	12195966	0.0	0,630	1.0	39	tags=36%, list=18%, signal=40%
GO_AC_O_M	15	0,394	12011037	0.0	0,666	1.0	28	tags=27%, list=13%, signal=29%
GO_C_R_T_L	20	0,406	11051761	0.0	0,882	1.0	21	tags=20%, list=10%, signal=20%

Tabelle 26: signifikant hochregulierte Gensets in der intermediären Subpopulation (GO_RESPONSE_TO_ALCOHOL, GO_ACTIVATION_OF_IMMUNE_RESPONSE, GO_POSITIVE_REGULATION_OF_INNATE_IMMUNE_RESPONSE, GO_INTERACTION_WITH_HOST, GO_VIRAL_LIFE_CYCLE, GO_VIRUS_RECEPTOR_ACTIVITY, GO_REGULATION_OF_INNATE_IMMUNE_RESPONSE, GO_PHAGOCYTOSIS, GO_MOVEMENT_IN_ENVIRONMENT_OF_OTHER_ORGANISM_INVOLVED_IN_SYMBIOTIC_INTERACTION, GO_INNATE_IMMUNE_RESPONSE, GO_ACTIVATION_OF_INNATE_IMMUNE_RESPONSE, GO_REGULATION_OF_PROTEOLYSIS, GO_NEGATIVE_REGULATION_OF_IMMUNE_SYSTEM_PROCESS, GO_MEMBRANE_ORGANIZATION, GO_NEGATIVE_REGULATION_OF_CELL_COMMUNICATION, GO_SECOND_MESSENGER_MEDIATED_SIGNALING, GO_POSITIVE_REGULATION_OF_IMMUNE_RESPONSE, GO_CELLULAR_RESPONSE_TO_BIOTIC_STIMULUS, GO_ENDOSOME, GO_ENDOCYTIC_VESICLE, GO_VACUOLE, GO_RECEPTOR_MEDIATED_ENDOCYTOSIS, GO_ENDOCYTIC_VESICLE_MEMBRANE, GO_SOMATODENDRITIC_COMPARTMENT, GO_MEMBRANE_MICRODOMAIN,

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

GO_IMMUNE_RESPONSE_REGULATING_CELL_SURFACE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY, GO_ANCHORED_COMPONENT_OF_MEMBRANE, GO_CELLULAR_RESPONSE_TO_LIPID)

NAME	GRÖßE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
GO_N_R_O_T	10	0,657	2.213.545	0.0	0,000	55	tags=60%, list=26%, signal=77%
GO_I_I_R	31	0,547	21.206.741	0.0	0,000	23	tags=29%, list=11%, signal=28%
GO_S_M_M_S	10	0,566	19.445.114	0.0	0,000	44	tags=50%, list=21%, signal=60%
GO_R_T_I_G	11	0,526	19.220.277	0.0	0,000	9	tags=18%, list=4%, signal=18%
GO_C_R_T_I_G	10	0,570	18.902.586	0.0	0,000	9	tags=20%, list=4%, signal=20%
GO_V_R_A	26	0,428	16.360.184	0.0	0,212	63	tags=46%, list=30%, signal=58%
GO_V_M	22	0,590	16.761.518	0.0	0,227	55	tags=55%, list=26%, signal=66%
GO_P	10	0,606	1.639.844	0.0	0,234	51	tags=60%, list=24%, signal=75%
GO_C_V_P	22	0,542	15.845.256	0.0	0,325	55	tags=50%, list=26%, signal=61%
GO_P_R_O_I_I_R	15	0,551	15.685.709	0.0	0,369	15	tags=27%, list=7%, signal=27%
GO_V_M_T	34	0,445	15.174.518	0.0	0,411	54	tags=44%, list=25%, signal=50%
GO_R_T_D	12	0,450	14.985.151	0.0	0,412	8	tags=17%, list=4%, signal=16%
GO_R_T_A	16	0,521	1.524.496	0.0	0,424	14	tags=25%, list=7%, signal=25%
GO_R_O_I_I_R	18	0,516	1.476.528	0.0	0,432	19	tags=28%, list=9%, signal=28%
GO_E_V_M	11	0,719	15.253.128	0.0	0,456	55	tags=73%, list=26%, signal=93%

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

NAME	GRÖÖE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
GO_C_C_A_V_P_M_A_M	16	0,516	14.456.574	0.0	0,575	42	tags=38%, list=20%, signal=43%
GO_E	27	0,505	13.654.094	0.0	0,619	46	tags=41%, list=22%, signal=45%
GO_L_V_M	10	0,631	14.030.108	0.0	0,632	55	tags=80%, list=26%, signal=103%
GO_S	13	0,475	13.775.944	0.0	0,633	54	tags=46%, list=25%, signal=58%
GO_V_L_C	27	0,393	13.468.213	0.0	0,635	32	tags=26%, list=15%, signal=27%
GO_R_T_A_C	11	0,407	13.695.873	0.0	0,638	8	tags=18%, list=4%, signal=18%
GO_E_O_L_I_C	17	0,535	13.946.271	0.0	0,638	17	tags=24%, list=8%, signal=24%
GO_II_W_H	28	0,385	13.369.632	0.0	0,648	32	tags=25%, list=15%, signal=26%
GO_P_R_O_E_O_P_L	17	0,507	135.128	0.0	0,650	15	tags=24%, list=7%, signal=23%
GO_M_I_E_O_O_O_I_I_S_I	27	0,393	13.468.214	0.0	0,656	32	tags=26%, list=15%, signal=27%
GO_S_G_M	10	0,478	13.540.734	0.0	0,657	63	tags=60%, list=30%, signal=81%
GO_S_B_C	13	0,475	13.775.945	0.0	0,661	54	tags=46%, list=25%, signal=58%
GO_R_O_V_M_T	14	0,556	1.318.874	0.0	0,662	53	tags=50%, list=25%, signal=62%
GO_I_I_B_O	39	0,345	1.332.028	0.0	0,663	54	tags=33%, list=25%, signal=36%
GO_A_O_I_R	27	0,522	13.231.853	0.0	0,663	22	tags=33%, list=10%, signal=32%
GO_R_O_P_S	15	0,549	14.103.644	0.0	0,664	15	tags=20%, list=7%, signal=20%
GO_A_O_I_I_R	11	0,617	13.247.179	0.0	0,676	62	tags=55%, list=29%, signal=73%
GO_I_V	42	0,338	13.787.049	0.0	0,691	63	tags=43%, list=30%, signal=49%
GO_R_O_S	20	0,504	12.999.692	0.0	0,713	56	tags=45%, list=26%, signal=55%

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

NAME	GRÖßE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
GO_R_O_T	41	0,361	12.265.853	0.0	0,936	56	tags=39%, list=26%, signal=43%

Tabelle 27: signifikant hochregulierte Gensets in der nicht-klassischen Subpopulation (GO_NEGATIVE_REGULATION_OF_TRANSPORT, GO_INNATE_IMMUNE_RESPONSE, GO_SECOND_MESSENGER_MEDIATED_SIGNALING, GO_RESPONSE_TO_INTERFERON_GAMMA, GO_CELLULAR_RESPONSE_TO_INTERFERON_GAMMA, GO_VIRUS_RECEPTOR_ACTIVITY, GO_VESICLE_MEMBRANE, GO_PHAGOCYTOSIS, GO_CYTOPLASMIC_VESICLE_PART, GO_POSITIVE_REGULATION_OF_INNATE_IMMUNE_RESPONSE, GO_VESICLE_MEDIATED_TRANSPORT, GO_RESPONSE_TO_DRUG, GO_RESPONSE_TO_ALCOHOL, GO_REGULATION_OF_INNATE_IMMUNE_RESPONSE, GO_ENDOCYTIC_VESICLE_MEMBRANE, GO_CELL_CELL_ADHESION_VIA_PLASMA_MEMBRANE_ADHESION_MOLECULES, GO_ENDOSOME, GO_LYTIC_VACUOLE_MEMBRANE, GO_SECRETION, GO_VIRAL_LIFE_CYCLE, GO_RESPONSE_TO_ACID_CHEMICAL, GO_ESTABLISHMENT_OF_LOCALIZATION_IN_CELL, GO_INTERACTION_WITH_HOST, GO_POSITIVE_REGULATION_OF_ESTABLISHMENT_OF_PROTEIN_LOCALIZATION, GO_MOVEMENT_IN_ENVIRONMENT_OF_OTHER_ORGANISM_INVOLVED_IN_SYMBIOTIC_INTERACTION, GO_SECRETORY_GRANULE_MEMBRANE, GO_SECRETION_BY_CELL, GO_REGULATION_OF_VESICLE_MEDIATED_TRANSPORT, GO_INTERSPECIES_INTERACTION_BETWEEN_ORGANISMS, GO_ACTIVATION_OF_IMMUNE_RESPONSE, GO_REGULATION_OF_PROTEIN_SECRETION, GO_ACTIVATION_OF_INNATE_IMMUNE_RESPONSE, GO_INTRACELLULAR_VESICLE, GO_REGULATION_OF_SECRETION, GO_REGULATION_OF_TRANSPORT)

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

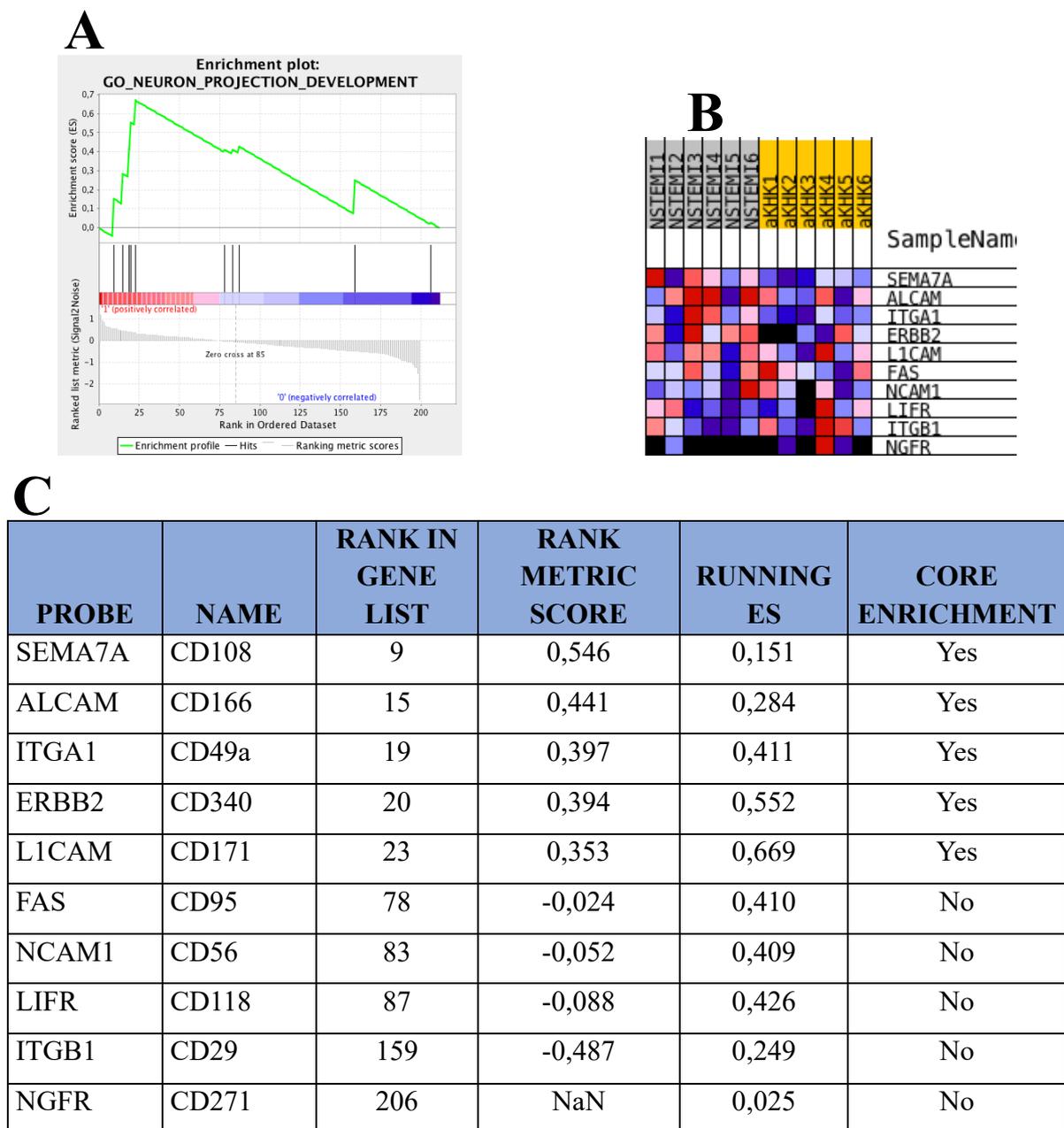
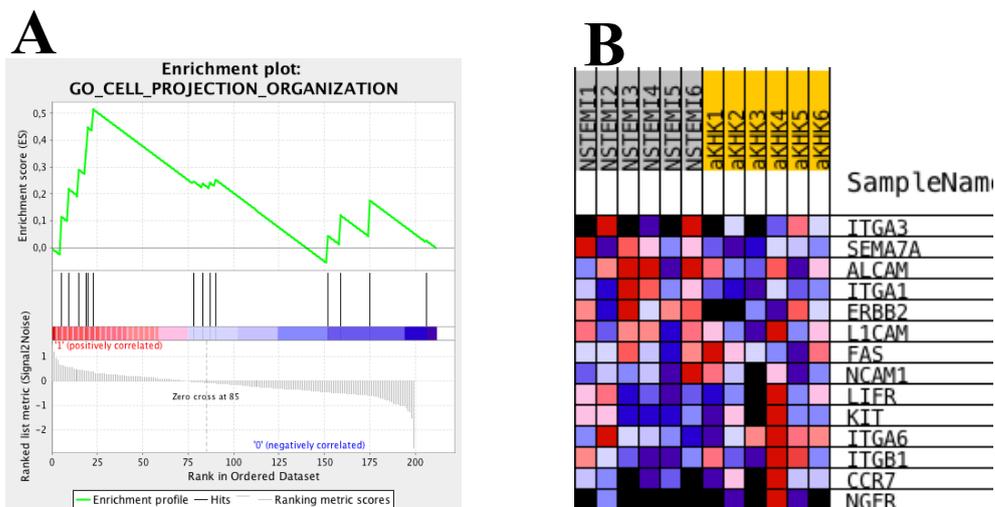


Abbildung 34: Darstellung des Gensets GO_NEURON_PROJECTION_DEVELOPMENT für die **klassische** Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset

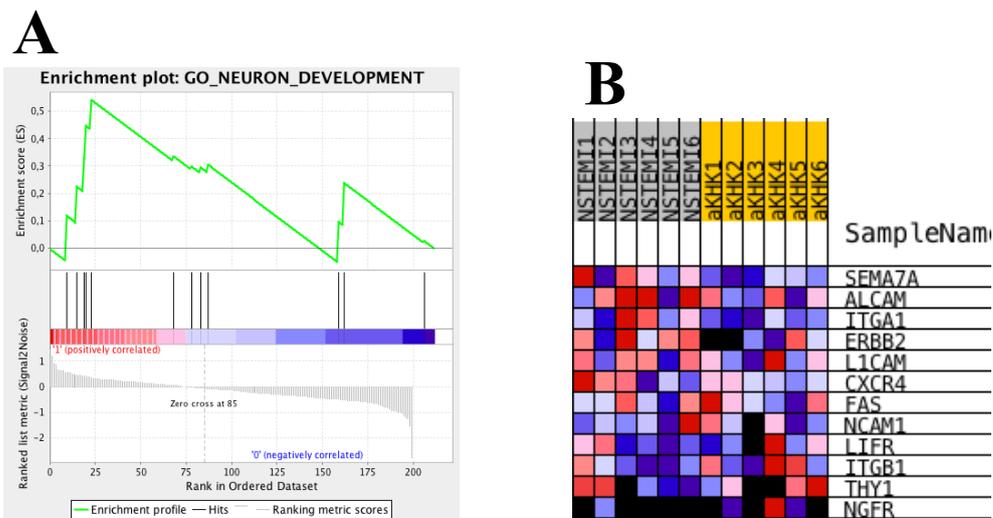
Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten



C

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
ITGA3	CD49c	5	0,640	0,114	Yes
SEMA7A	CD108	9	0,546	0,218	Yes
ALCAM	CD166	15	0,441	0,289	Yes
ITGA1	CD49a	19	0,397	0,361	Yes
ERBB2	CD340	20	0,394	0,447	Yes
L1CAM	CD171	23	0,353	0,513	Yes
FAS	CD95	78	-0,024	0,246	No
NCAM1	CD56	83	-0,052	0,237	No
LIFR	CD118	87	-0,088	0,241	No
KIT	CD117	90	-0,095	0,252	No
ITGA6	CD49f	152	-0,460	0,044	No
ITGB1	CD29	159	-0,487	0,120	No
CCR7	CD197	175	-0,598	0,175	No
NGFR	CD271	206	NaN	0,025	No

Abbildung 35: Darstellung des Gensets GO_CELL_PROJECTION_ORGANIZATION für die klassische Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset



C

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
SEMA7A	CD108	9	0,546	0,118	Yes
ALCAM	CD166	15	0,441	0,225	Yes
ITGA1	CD49a	19	0,397	0,328	Yes
ERBB2	CD340	20	0,394	0,446	Yes
L1CAM	CD171	23	0,353	0,541	Yes
CXCR4	CD184	68	0,047	0,335	No
FAS	CD95	78	-0,024	0,298	No
NCAM1	CD56	83	-0,052	0,293	No
LIFR	CD118	87	-0,088	0,305	No
ITGB1	CD29	159	-0,487	0,095	No
THY1	CD90	162	-0,509	0,237	No
NGFR	CD271	206	NaN	0,025	No

Abbildung 36: Darstellung des Gensets GO_NEURON_DEVELOPMENT für die **klassische** Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

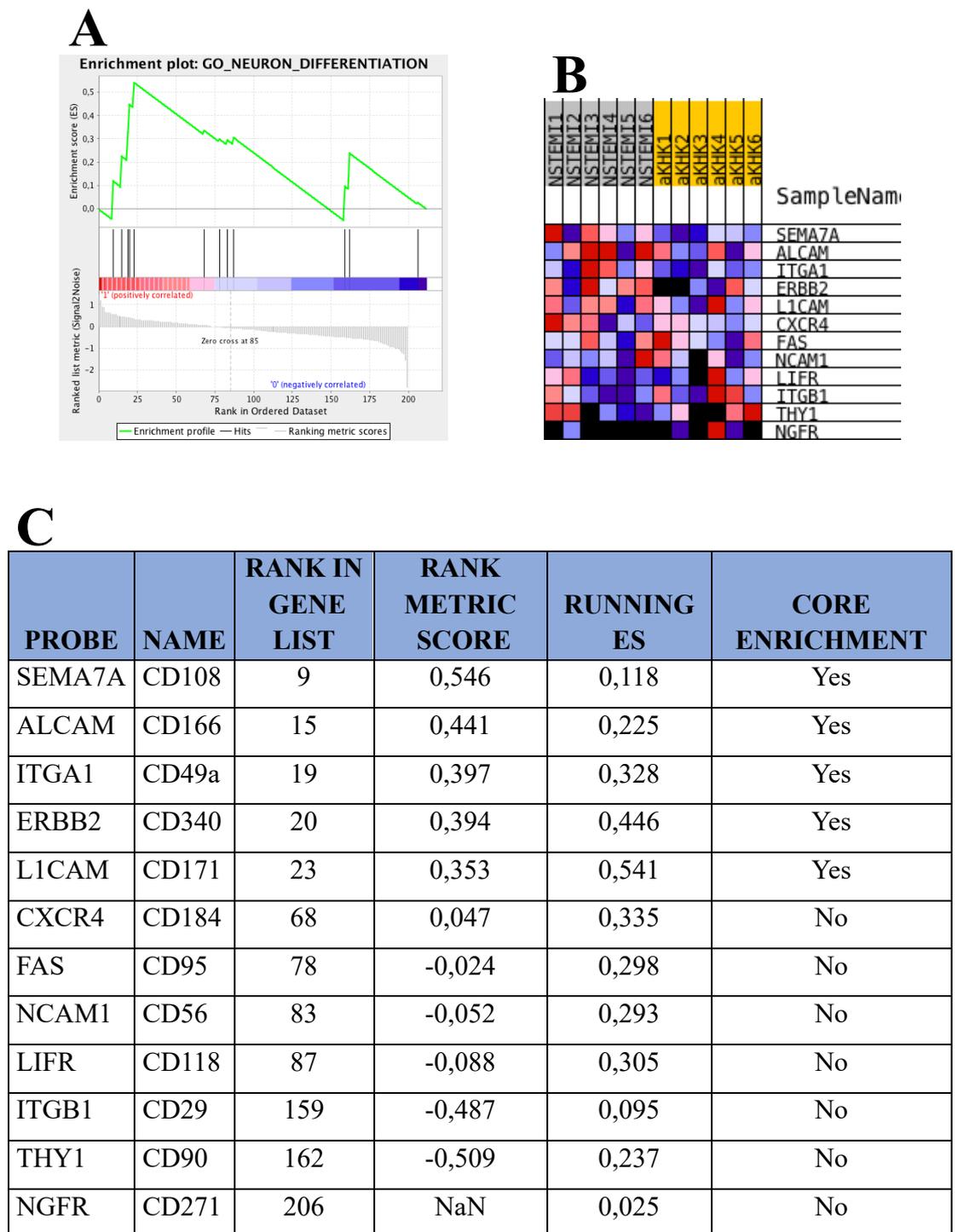
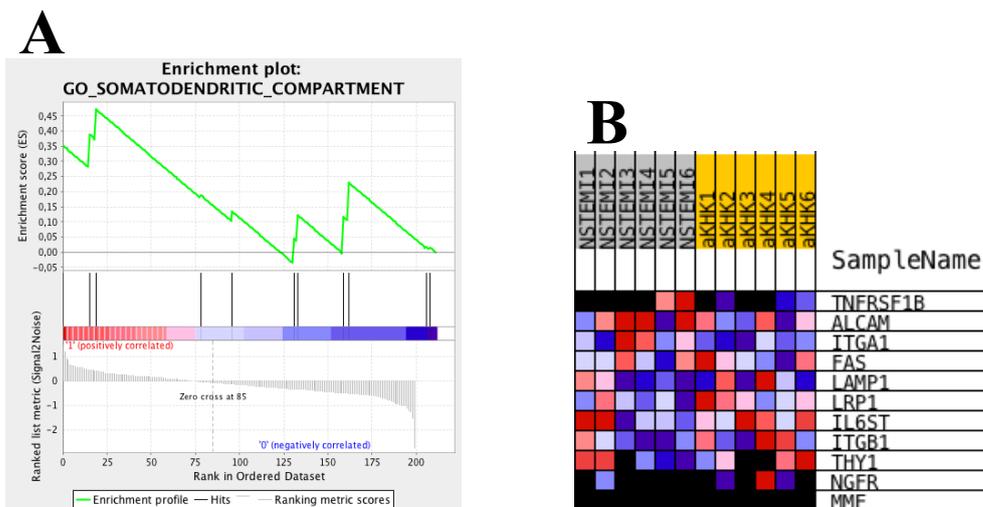


Abbildung 37: Darstellung des Gensets GO_NEURON_DIFFERENTIATION für die **klassische** Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

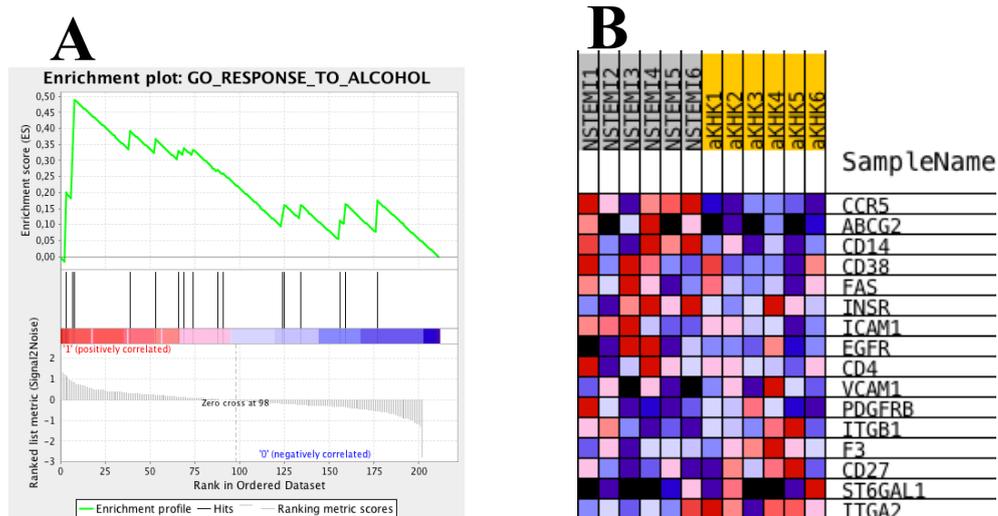


C

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
TNFRSF1B	CD120b	0	1,4507E+16	0,352	Yes
ALCAM	CD166	15	0,441	0,390	Yes
ITGA1	CD49a	19	0,397	0,471	Yes
FAS	CD95	78	-0,024	0,188	No
LAMP1	CD107a	96	-0,125	0,134	No
LRP1	CD91	131	-0,327	0,044	No
IL6ST	CD130	133	-0,339	0,122	No
ITGB1	CD29	159	-0,487	0,115	No
THY1	CD90	162	-0,509	0,229	No
NGFR	CD271	206	NaN	0,017	No
MME	CD10	208	NaN	0,015	No

Abbildung 38: Darstellung des Gensets GO_SOMATODENDRITIC_COMPARTMENT für die **klassische** Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten



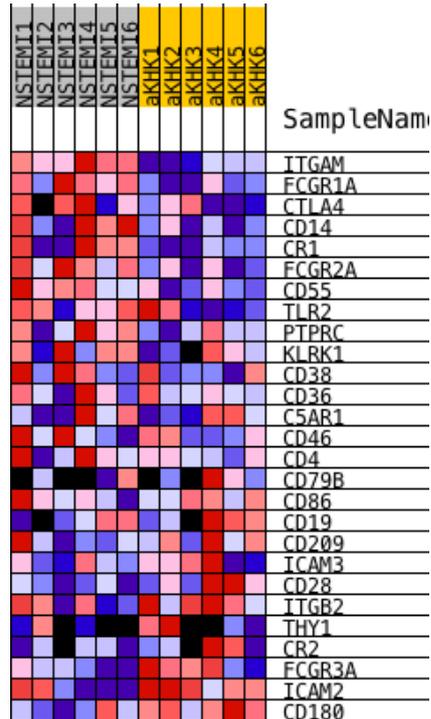
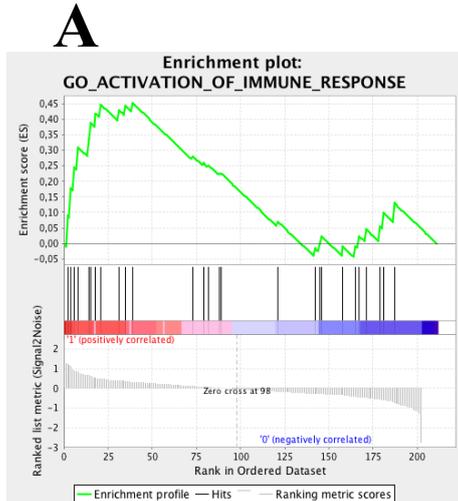
C

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
CCR5	CD195	3	1,1,801E+16	0,199	Yes
ABCG2	CD338	7	0,852	0,338	Yes
CD14	CD14	8	0,829	0,489	Yes
CD38	CD38	39	0,304	0,391	No
FAS	CD95	53	0,223	0,365	No
INSR	CD220	66	0,136	0,329	No
ICAM1	CD54	69	0,109	0,338	No
EGFR	EGF Receptor	74	0,085	0,333	No
CD4	CD4	88	0,012	0,269	No
VCAM1	CD106	91	0	0,259	No
PDGFRB	CD140b	124	-0,179	0,128	No
ITGB1	CD29	125	-0,179	0,161	No
F3	CD142	134	-0,228	0,161	No
CD27	CD27	156	-0,321	0,113	No
ST6GAL1	CD75	159	-0,338	0,164	No
ITGA2	CD49b	177	-0,532	0,173	No

Abbildung 39: Darstellung des Gensets GO_RESPONSE_TO_ALCOHOL für die *intermediären* Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

B

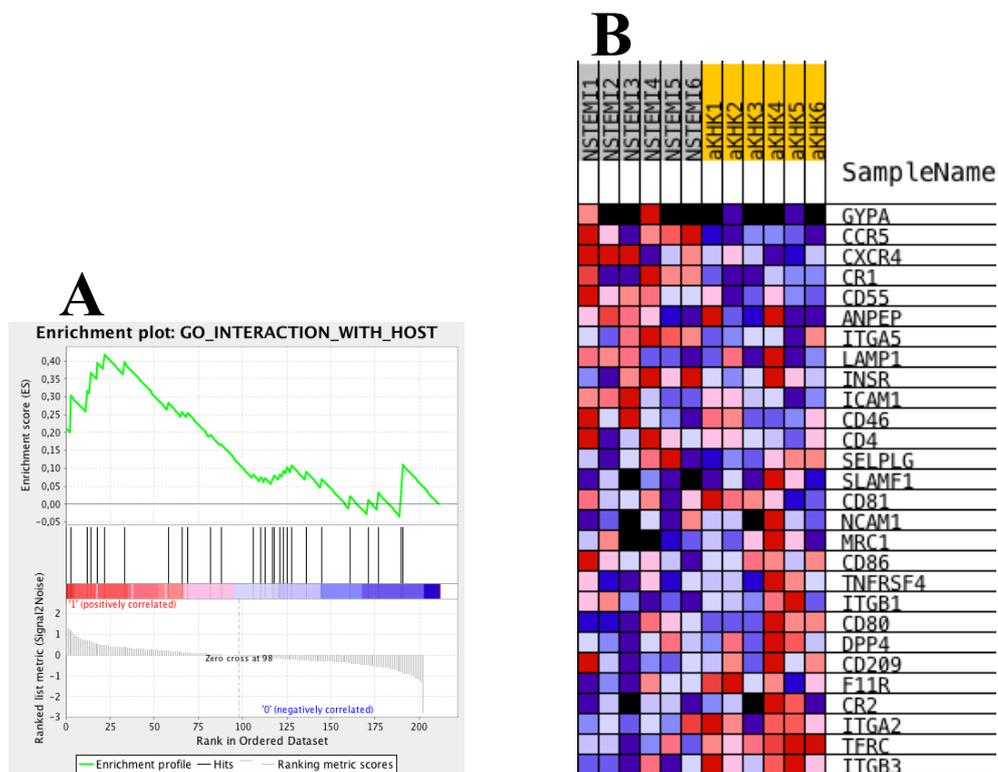


C

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
ITGAM	CD11b	2	1,2102E+16	0,090	Yes
FCGR1A	CD64	4	1,1063E+16	0,176	Yes
CTLA4	CD152	6	0,902	0,245	Yes
CD14	CD14	8	0,829	0,309	Yes
CR1	CD35	14	0,657	0,336	Yes
FCGR2A	CD32	15	0,616	0,387	Yes
CD55	CD55	18	0,504	0,418	Yes
TLR2	CD282	21	0,472	0,447	Yes
PTPRC	CD45	31	0,380	0,429	Yes
KLRK1	CD314	35	0,348	0,442	Yes
CD38	CD38	39	0,304	0,451	Yes
CD36	CD36	73	0,085	0,280	No
C5AR1	CD88	79	0,067	0,258	No
CD46	CD46	82	0,044	0,251	No
CD4	CD4	88	0,012	0,225	No

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
CD79B	CD79b	89	0,000	0,225	No
CD86	CD86	121	-0,149	0,070	No
CD19	CD19	142	-0,278	-0,015	No
CD209	CD209	145	-0,282	-0,003	No
ICAM3	CD50	146	-0,284	0,021	No
CD28	CD28	158	-0,331	-0,011	No
ITGB2	CD18	165	-0,420	-0,009	No
THY1	CD90	167	-0,445	0,023	No
CR2	CD21	171	-0,470	0,046	No
FCGR3A	CD16	179	-0,559	0,054	No
ICAM2	CD102	181	-0,580	0,097	No
CD180	CD180	187	-0,719	0,130	No

Abbildung 40: Darstellung des Gensets GO_ACTIVATION_OF_IMMUNE_RESPONSE für die intermediären Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset

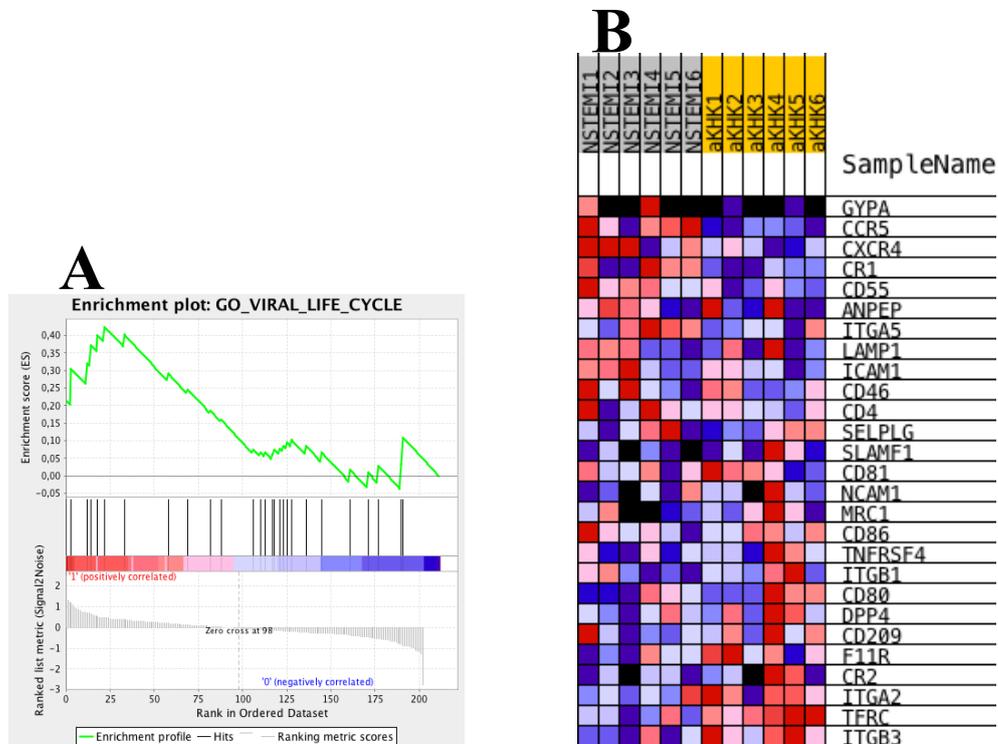


C

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
GYPA	CD235a	0	2,46073E+16	0,211	Yes
CCR5	CD195	3	1,18009E+16	0,302	Yes
CXCR4	CD184	12	0,676	0,316	Yes
CR1	CD35	14	0,657	0,367	Yes
CD55	CD55	18	0,504	0,394	Yes
ANPEP	CD13	22	0,465	0,418	Yes
ITGA5	CD49e	33	0,375	0,395	No
LAMP1	CD107a	58	0,199	0,282	No
INSR	CD220	66	0,136	0,256	No
ICAM1	CD54	69	0,109	0,254	No
CD46	CD46	82	0,044	0,193	No
CD4	CD4	88	0,012	0,167	No
SELPLG	CD162	106	-0,086	0,082	No
SLAMF1	CD150	110	-0,094	0,073	No
CD81	CD81	113	-0,120	0,073	No
NCAM1	CD56	117	-0,139	0,068	No
MRC1	CD206	118	-0,140	0,080	No
CD86	CD86	121	-0,149	0,082	No
TNFRSF4	CD134	123	-0,170	0,092	No
ITGB1	CD29	125	-0,179	0,101	No
CD80	CD80	128	-0,193	0,107	No
DPP4	CD26	136	-0,239	0,090	No
CD209	CD209	145	-0,282	0,070	No
F11R	CD321	161	-0,369	0,020	No
CR2	CD21	171	-0,470	0,012	No
ITGA2	CD49b	177	-0,532	0,030	No
TFRC	CD71	190	-0,805	0,034	No
ITGB3	CD61	191	-0,869	0,109	No

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

Abbildung 41: : Darstellung des Gensets *GO_INTERACTION_WITH_HOST* für die **intermediären** Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset



C

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
GYPA	CD235a	0	2,4607E+16	0,214	Yes
CCR5	CD195	3	1,1801E+16	0,305	Yes
CXCR4	CD184	12	0,676	0,321	Yes
CR1	CD35	14	0,657	0,372	Yes
CD55	CD55	18	0,504	0,400	Yes
ANPEP	CD13	22	0,465	0,424	Yes
ITGA5	CD49e	33	0,375	0,403	No
LAMP1	CD107a	58	0,199	0,290	No
ICAM1	CD54	69	0,109	0,246	No
CD46	CD46	82	0,044	0,184	No
CD4	CD4	88	0,012	0,159	No

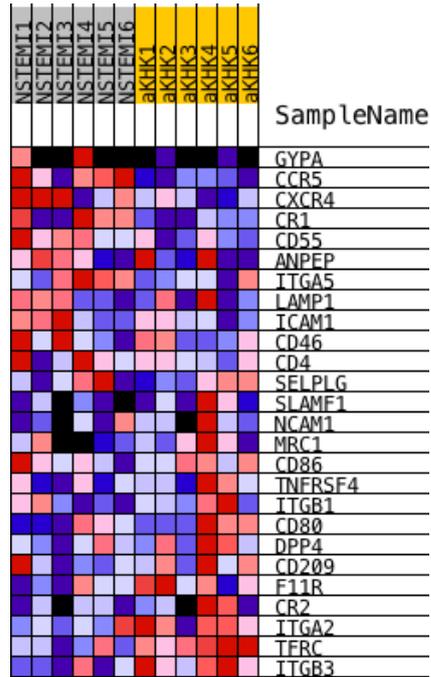
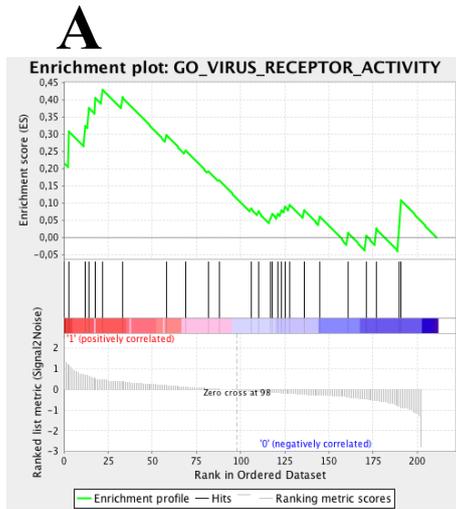
Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
SELPLG	CD162	106	-0,086	0,074	No
SLAMF1	CD150	110	-0,094	0,066	No
CD81	CD81	113	-0,120	0,066	No
NCAM1	CD56	117	-0,139	0,062	No
MRC1	CD206	118	-0,140	0,074	No
CD86	CD86	121	-0,149	0,076	No
TNFRSF4	CD134	123	-0,170	0,085	No
ITGB1	CD29	125	-0,179	0,095	No
CD80	CD80	128	-0,193	0,101	No
DPP4	CD26	136	-0,239	0,084	No
CD209	CD209	145	-0,282	0,065	No
F11R	CD321	161	-0,369	0,016	No
CR2	CD21	171	-0,470	0,009	No
ITGA2	CD49b	177	-0,532	0,028	No
TFRC	CD71	190	-0,805	0,033	No
ITGB3	CD61	191	-0,869	0,108	No

Abbildung 42: Darstellung des Gensets *GO_VIRAL_LIFE_CYCLE* für die **intermediären** Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

B



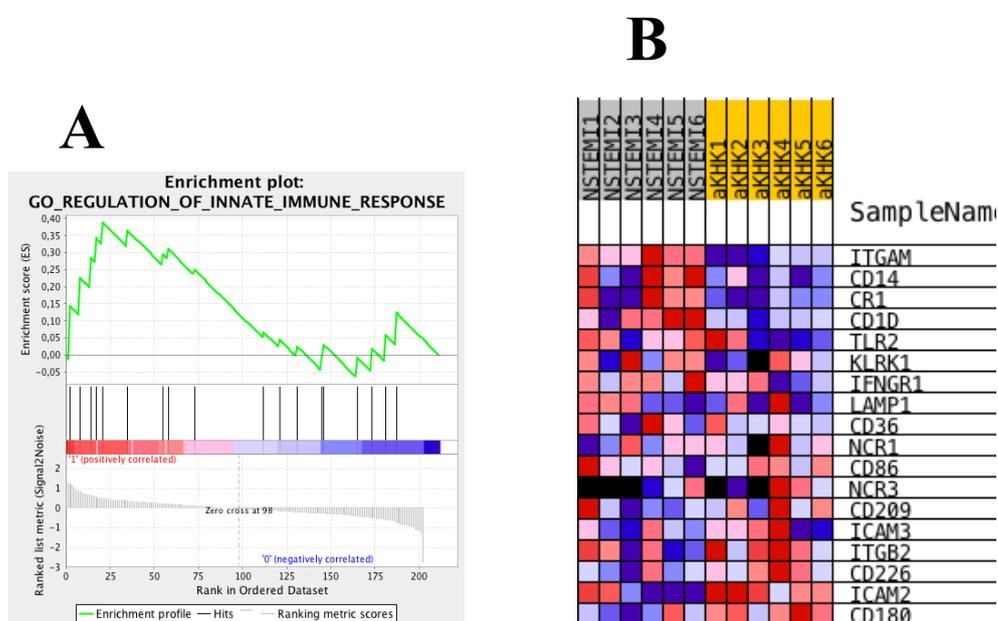
C

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
GYPA	CD235a	0	2,4607E+16	0,216	Yes
CCR5	CD195	3	1,1801E+16	0,309	Yes
CXCR4	CD184	12	0,676	0,325	Yes
CR1	CD35	14	0,657	0,377	Yes
CD55	CD55	18	0,504	0,405	Yes
ANPEP	CD13	22	0,465	0,430	Yes
ITGA5	CD49e	33	0,375	0,409	No
LAMP1	CD107a	58	0,199	0,298	No
ICAM1	CD54	69	0,109	0,253	No
CD46	CD46	82	0,044	0,193	No
CD4	CD4	88	0,012	0,167	No
SELPLG	CD162	106	-0,086	0,083	No
SLAMF1	CD150	110	-0,094	0,075	No
NCAM1	CD56	117	-0,139	0,055	No
MRC1	CD206	118	-0,140	0,067	No
CD86	CD86	121	-0,149	0,070	No

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
TNFRSF4	CD134	123	-0,170	0,079	No
ITGB1	CD29	125	-0,179	0,090	No
CD80	CD80	128	-0,193	0,096	No
DPP4	CD26	136	-0,239	0,079	No
CD209	CD209	145	-0,282	0,061	No
F11R	CD321	161	-0,369	0,013	No
CR2	CD21	171	-0,470	0,005	No
ITGA2	CD49b	177	-0,532	0,025	No
TFRC	CD71	190	-0,805	0,031	No
ITGB3	CD61	191	-0,869	0,108	No

Abbildung 43: Darstellung des Gensets *GO_VIRUS_RECEPTOR_ACTIVITY* für die *intermediären Subpopulation*: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset

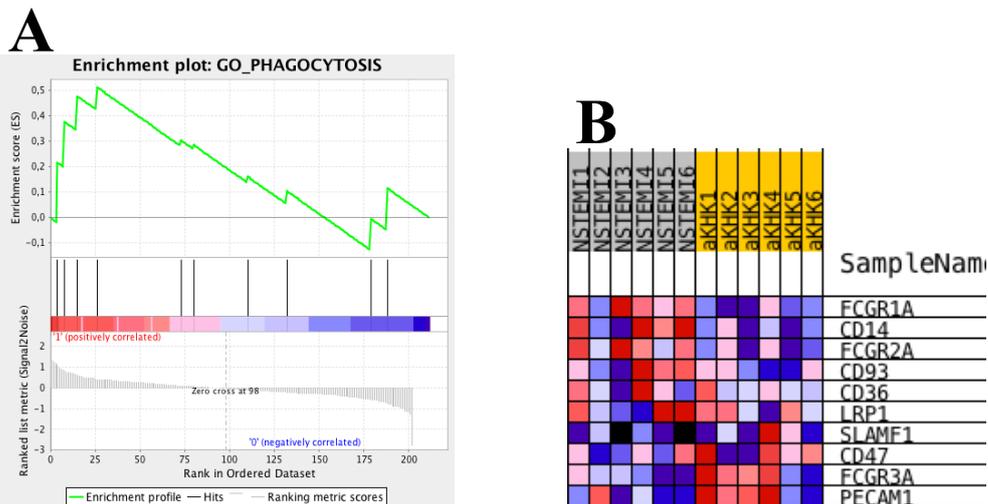


C

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
ITGAM	CD11b	2	1,2102E+16	0,144	Yes
CD14	CD14	8	0,829	0,225	Yes
CR1	CD35	14	0,657	0,283	Yes
CD1D	CD1d	17	0,542	0,342	Yes
TLR2	CD282	21	0,472	0,387	Yes
KLRK1	CD314	35	0,348	0,364	No
IFNGR1	CD119	55	0,221	0,295	No
LAMP1	CD107a	58	0,199	0,310	No
CD36	CD36	73	0,085	0,249	No
NCR1	CD335	112	-0,110	0,067	No
CD86	CD86	121	-0,149	0,045	No
NCR3	CD337	131	-0,206	0,025	No
CD209	CD209	145	-0,282	-0,006	No
ICAM3	CD50	146	-0,284	0,030	No
ITGB2	CD18	165	-0,420	-0,009	No
CD226	CD226	173	-0,503	0,019	No
ICAM2	CD102	181	-0,580	0,057	No
CD180	CD180	187	-0,719	0,124	No

Abbildung 44: Darstellung des Gensets *GO_REGULATION_OF_INNATE_IMMUNE_RESPONSE* für die **intermediären** Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten



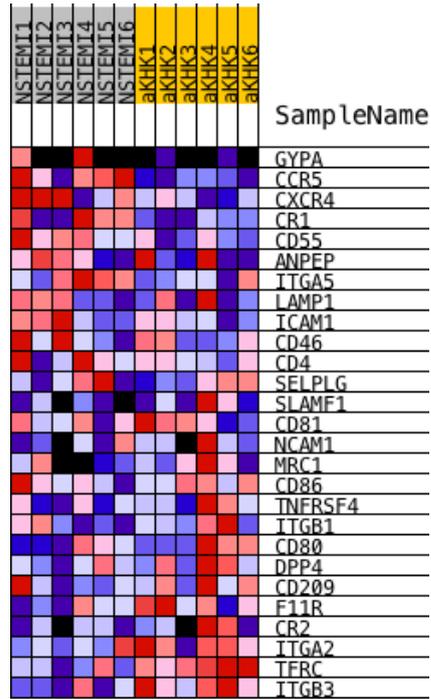
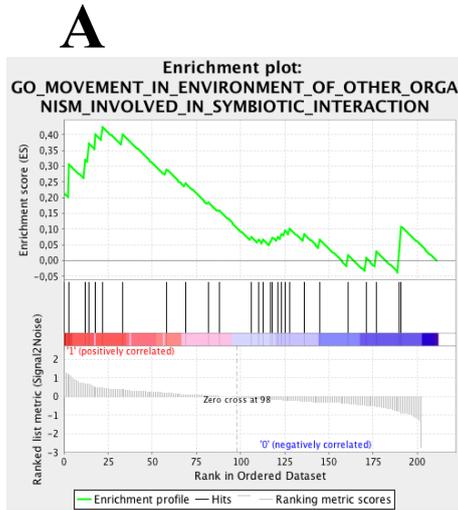
C

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
FCGR1A	CD64	4	1,1063E+16	0,214	Yes
CD14	CD14	8	0,829	0,374	Yes
FCGR2A	CD32	15	0,616	0,475	Yes
CD93	CDw93	26	0,403	0,510	Yes
CD36	CD36	73	0,085	0,301	No
LRP1	CD91	80	0,056	0,283	No
SLAMF1	CD150	110	-0,094	0,159	No
CD47	CD47	132	-0,220	0,102	No
FCGR3A	CD16	179	-0,559	-0,008	No
PECAM1	CD31	188	-0,763	0,114	No

Abbildung 45: Darstellung des Gensets GO_PHAGOCYTOSIS für die *intermediären* Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

B



C

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
GYPA	CD235a	0	2,4607E+16	0,214	Yes
CCR5	CD195	3	1,1801E+16	0,305	Yes
CXCR4	CD184	12	0,676	0,321	Yes
CR1	CD35	14	0,657	0,372	Yes
CD55	CD55	18	0,504	0,400	Yes
ANPEP	CD13	22	0,465	0,424	Yes
ITGA5	CD49e	33	0,375	0,403	No
LAMP1	CD107a	58	0,199	0,290	No
ICAM1	CD54	69	0,109	0,246	No
CD46	CD46	82	0,044	0,184	No
CD4	CD4	88	0,012	0,159	No
SELPLG	CD162	106	-0,086	0,074	No
SLAMF1	CD150	110	-0,094	0,066	No
CD81	CD81	113	-0,120	0,066	No
NCAM1	CD56	117	-0,139	0,062	No

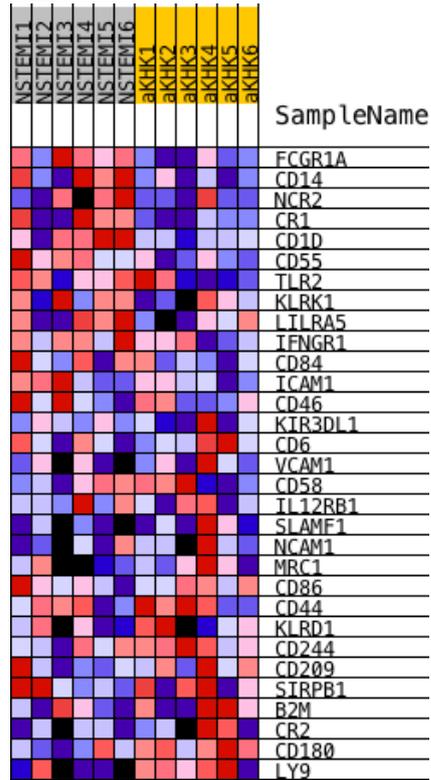
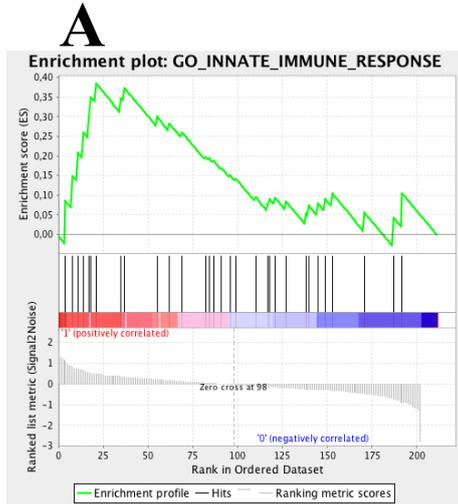
Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
MRC1	CD206	118	-0,140	0,074	No
CD86	CD86	121	-0,149	0,076	No
TNFRSF4	CD134	123	-0,170	0,085	No
ITGB1	CD29	125	-0,179	0,095	No
CD80	CD80	128	-0,193	0,101	No
DPP4	CD26	136	-0,239	0,084	No
CD209	CD209	145	-0,282	0,065	No
F11R	CD321	161	-0,369	0,016	No
CR2	CD21	171	-0,470	0,009	No
ITGA2	CD49b	177	-0,532	0,028	No
TFRC	CD71	190	-0,805	0,033	No
ITGB3	CD61	191	-0,869	0,108	No

Abbildung 46: Darstellung des Gensets *GO_MOVEMENT_IN_ENVIRONMENT_OF_OTHER_ORGANISM_INVOLVED_IN_SYMBIOTIC_INTERACTION* für die **intermediären** Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

B



C

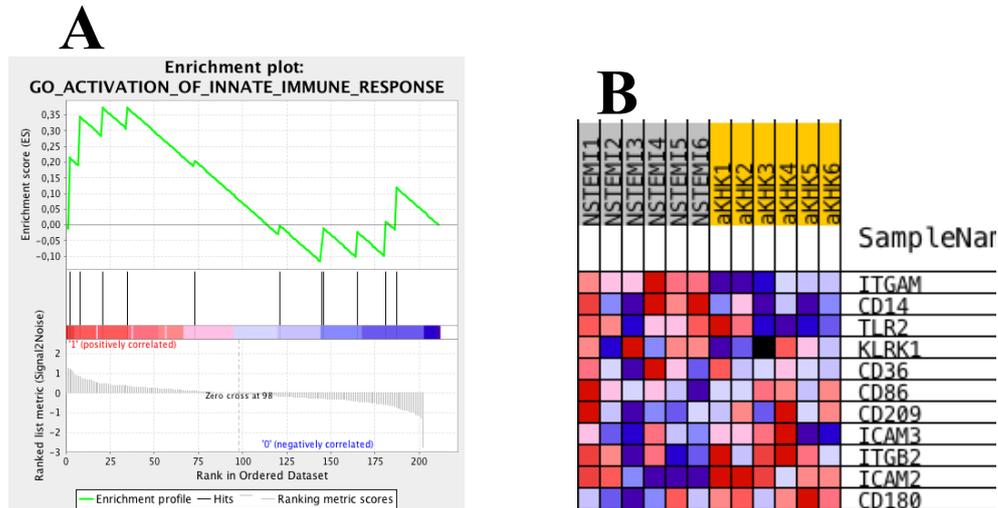
PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
FCGR1A	CD64	4	1,1063E+16	0,085	Yes
CD14	CD14	8	0,829	0,149	Yes
NCR2	CD336	11	0,713	0,207	Yes
CR1	CD35	14	0,657	0,260	Yes
CD1D	CD1d	17	0,542	0,301	Yes
CD55	CD55	18	0,504	0,350	Yes
TLR2	CD282	21	0,472	0,385	Yes
KLRK1	CD314	35	0,348	0,347	No
LILRA5	CD85	37	0,323	0,372	No
IFNGR1	CD119	55	0,221	0,300	No
CD84	CD84	62	0,161	0,282	No
ICAM1	CD54	69	0,109	0,260	No
CD46	CD46	82	0,044	0,198	No
KIR3DL1	NKB1	84	0,031	0,195	No

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
CD6	CD6	87	0,021	0,186	No
VCAM1	CD106	91	0,000	0,170	No
CD58	CD58	96	-0,023	0,150	No
IL12RB1	CD212	99	-0,035	0,142	No
SLAMF1	CD150	110	-0,094	0,096	No
NCAM1	CD56	117	-0,139	0,076	No
MRC1	CD206	118	-0,140	0,090	No
CD86	CD86	121	-0,149	0,093	No
CD44	CD44	127	-0,187	0,084	No
KLRD1	CD94	138	-0,256	0,053	No
CD244	CD244	140	-0,262	0,073	No
CD209	CD209	145	-0,282	0,078	No
SIRPB1	CD172b	149	-0,289	0,090	No
B2M	b2microglobulin	153	-0,313	0,104	No
CR2	CD21	171	-0,470	0,055	No
CD180	CD180	187	-0,719	0,042	No
LY9	CD229	192	-0,876	0,105	No

Abbildung 47: Darstellung des Gensets *GO_INNATE_IMMUNE_RESPONSE* für die **intermediären** Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

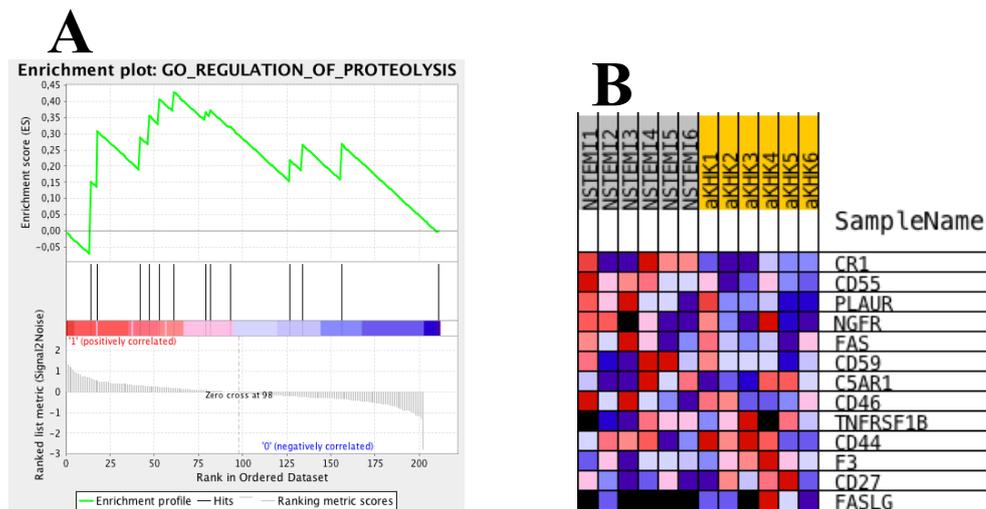


C

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
ITGAM	CD11b	2	1,2102E+16	0,215	Yes
CD14	CD14	8	0,829	0,344	Yes
TLR2	CD282	21	0,472	0,372	Yes
KLRK1	CD314	35	0,348	0,372	Yes
CD36	CD36	73	0,085	0,204	No
CD86	CD86	121	-0,149	-0,002	No
CD209	CD209	145	-0,282	-0,064	No
ICAM3	CD50	146	-0,284	-0,011	No
ITGB2	CD18	165	-0,420	-0,023	No
ICAM2	CD102	181	-0,580	0,011	No
CD180	CD180	187	-0,719	0,119	No

Abbildung 48: Darstellung des Gensets GO_ACTIVATION_OF_INNATE_IMMUNE_RESPONSE für die **intermediären** Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

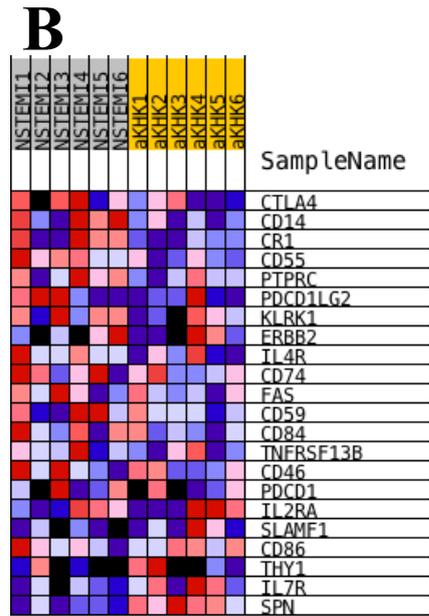
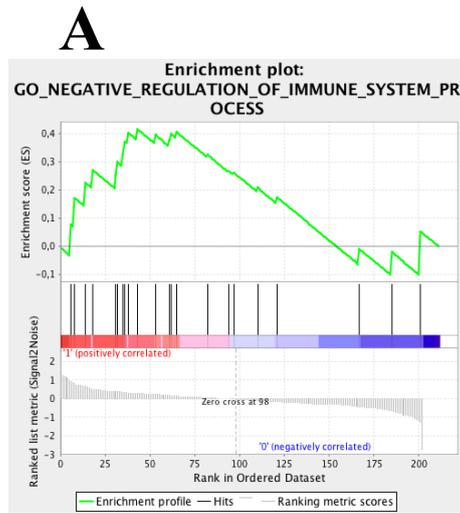


C

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
CR1	CD35	14	0,657	0,152	Yes
CD55	CD55	18	0,504	0,307	Yes
PLAUR	CD87	42	0,286	0,288	Yes
NGFR	CD271	47	0,262	0,356	Yes
FAS	CD95	53	0,223	0,407	Yes
CD59	CD59	61	0,171	0,429	Yes
C5AR1	CD88	79	0,067	0,366	No
CD46	CD46	82	0,044	0,371	No
TNFRSF1B	CD120b	93	0,000	0,321	No
CD44	CD44	127	-0,187	0,218	No
F3	CD142	134	-0,228	0,265	No
CD27	CD27	156	-0,321	0,268	No
FASLG	CD178	211	NaN	-0,186	No

Abbildung 49: Darstellung des Gensets GO_REGULATION_OF_PROTEOLYSIS für die intermediären Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten



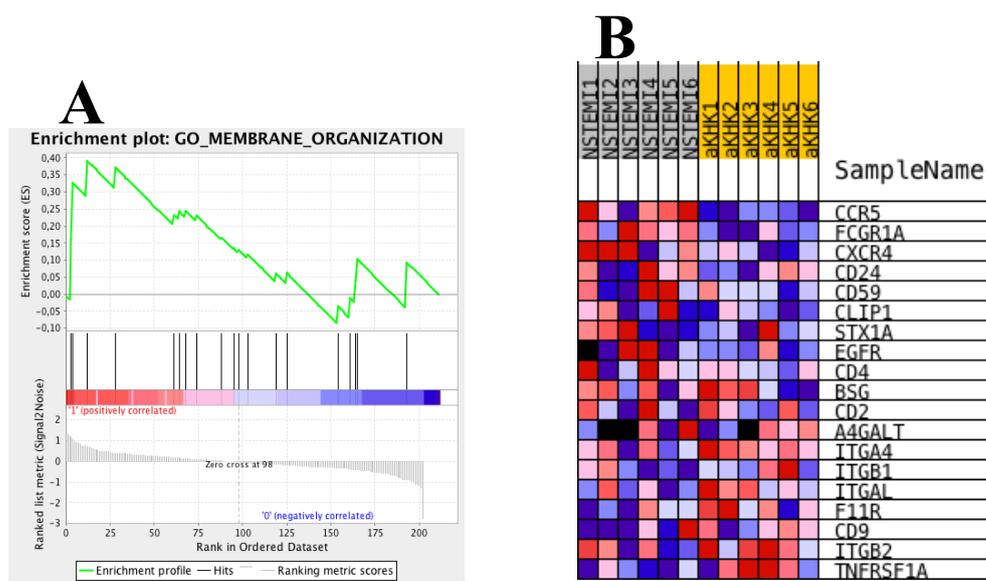
C

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
CTLA4	CD152	6	0,902	0,077	Yes
CD14	CD14	8	0,829	0,172	Yes
CR1	CD35	14	0,657	0,225	Yes
CD55	CD55	18	0,504	0,270	Yes
PTPRC	CD45	31	0,380	0,252	Yes
PDCD1LG2	CD273	32	0,379	0,298	Yes
KLRK1	CD314	35	0,348	0,330	Yes
ERBB2	CD340	36	0,342	0,371	Yes
IL4R	CD124	38	0,305	0,402	Yes
CD74	CD74	43	0,281	0,415	Yes
FAS	CD95	53	0,223	0,395	No
CD59	CD59	61	0,171	0,378	No
CD84	CD84	62	0,161	0,398	No
TNFRSF13B	CD267	65	0,142	0,404	No
CD46	CD46	82	0,044	0,325	No
PDCD1	CD279	94	0,000	0,267	No

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
IL2RA	CD25	97	-0,025	0,260	No
SLAMF1	CD150	110	-0,094	0,208	No
CD86	CD86	121	-0,149	0,173	No
THY1	CD90	167	-0,445	-0,010	No
IL7R	CD127	185	-0,650	-0,021	No
SPN	CD43	201	-1,264E+16	0,053	No

Abbildung 50: Darstellung des Gensets *GO_NEGATIVE_REGULATION_OF_IMMUNE_SYSTEM_PROCESS* für die intermediären Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset



C

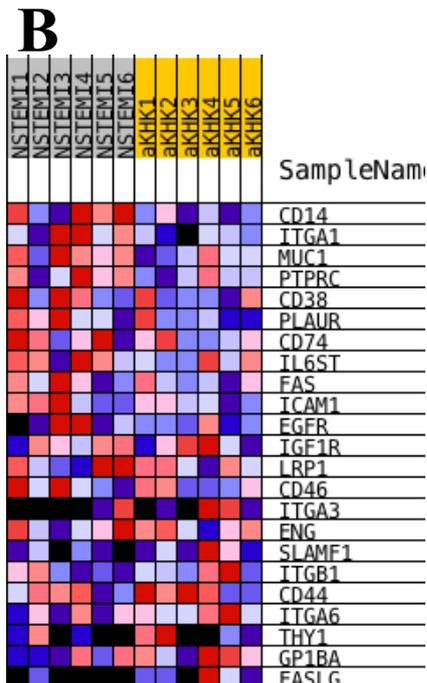
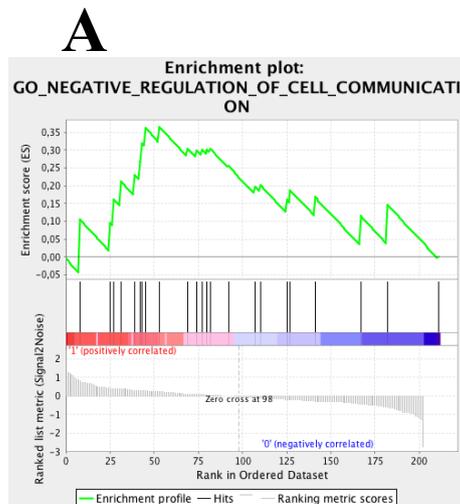
PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
CCR5	CD195	3	1,1801E+16	0,161	Yes
FCGR1A	CD64	4	1,1063E+16	0,327	Yes
CXCR4	CD184	12	0,676	0,391	Yes

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
CD24	CD24	28	0,391	0,372	No
CD59	CD59	61	0,171	0,232	No
CLIP1	CLIP	64	0,144	0,243	No
STX1A	HPC	68	0,110	0,244	No
EGFR	EGF Receptor	74	0,085	0,231	No
CD4	CD4	88	0,012	0,165	No
BSG	CD147	95	-0,003	0,135	No
CD2	CD2	98	-0,030	0,129	No
A4GALT	CD77	103	-0,056	0,117	No
ITGA4	CD49d	119	-0,147	0,061	No
ITGB1	CD29	125	-0,179	0,062	No
ITGAL	CD11a	154	-0,320	-0,035	No
F11R	CD321	161	-0,369	-0,011	No
CD9	CD9	164	-0,404	0,039	No
ITGB2	CD18	165	-0,420	0,102	No
TNFRSF1A	CD120a	193	-0,879	0,093	No

Abbildung 51: Darstellung des Gensets GO_MEMBRANE_ORGANIZATION für die **intermediären** Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten



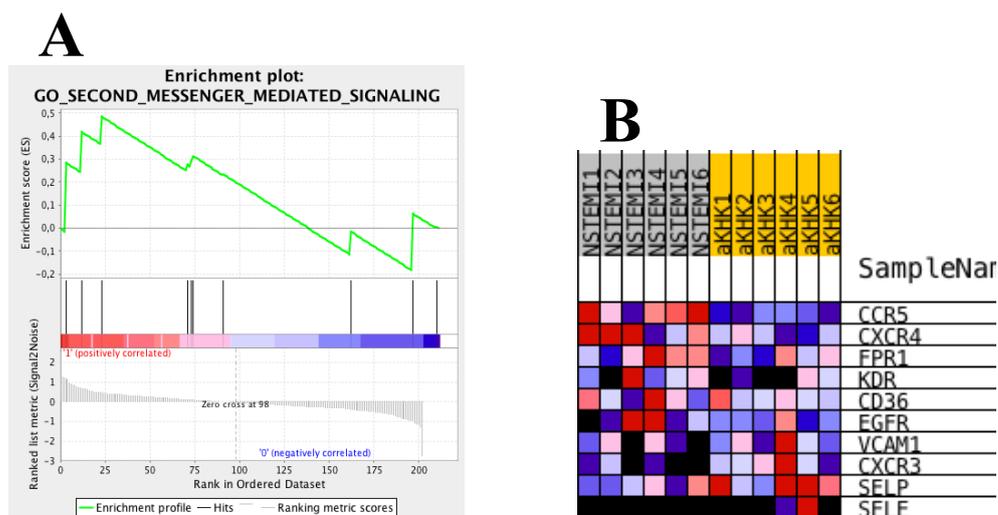
C

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
CD14	CD14	8	0,829	0,104	Yes
ITGA1	CD49a	25	0,430	0,096	Yes
MUC1	CD227	27	0,401	0,161	Yes
PTPRC	CD45	31	0,380	0,212	Yes
CD38	CD38	39	0,304	0,229	Yes
PLAUR	CD87	42	0,286	0,269	Yes
CD74	CD74	43	0,281	0,319	Yes
IL6ST	CD130	45	0,274	0,362	Yes
FAS	CD95	53	0,223	0,364	Yes
ICAM1	CD54	69	0,109	0,304	No
EGFR	EGF Receptor	74	0,085	0,298	No
IGF1R	CD221	77	0,076	0,301	No
LRP1	CD91	80	0,056	0,300	No
CD46	CD46	82	0,044	0,303	No
ITGA3	CD49c	92	0,000	0,255	No
ENG	CD105	107	-0,086	0,196	No
SLAMF1	CD150	110	-0,094	0,202	No

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
ITGB1	CD29	125	-0,179	0,160	No
CD44	CD44	127	-0,187	0,188	No
ITGA6	CD49f	141	-0,277	0,168	No
THY1	CD90	167	-0,445	0,114	No
GP1BA	CD42b	182	-0,602	0,146	No
FASLG	CD178	211	NaN	1,313	No

Abbildung 52: Darstellung des Gensets *GO_NEGATIVE_REGULATION_OF_CELL_COMMUNICATION* für die intermediären Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset



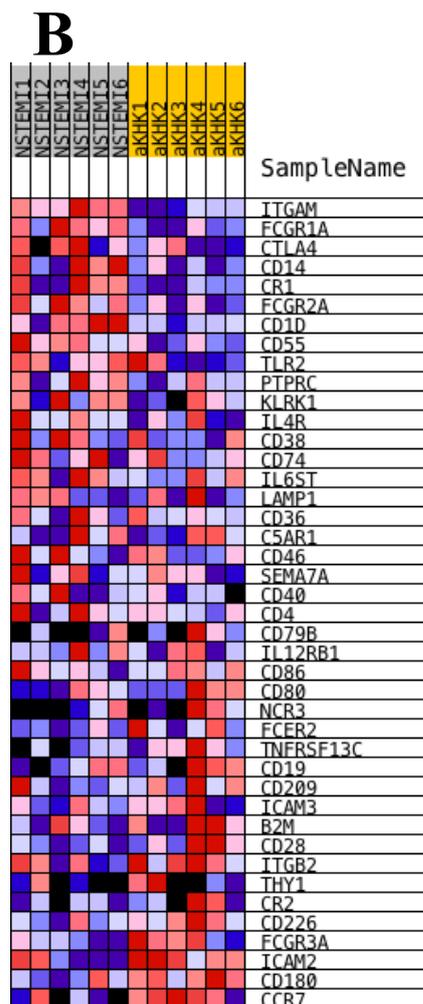
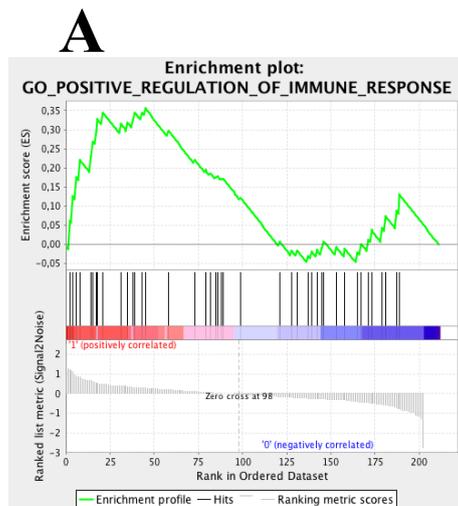
C

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
CCR5	CD195	3	1,1801E+16	0,285	Yes
CXCR4	CD184	12	0,676	0,417	Yes
FPR1	fMLP Receptor	23	0,458	0,484	Yes
KDR	CD309	71	0,091	0,274	No

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
CD36	CD36	73	0,085	0,291	No
EGFR	EGF Receptor	74	0,085	0,313	No
VCAM1	CD106	91	0,000	0,233	No
CXCR3	CD183	162	-0,385	-0,015	No
SELP	CD62P	197	-0,967	0,062	No
SELE	CD62E	210	NaN	0,005	No

Abbildung 53: Darstellung des Gensets GO_SECOND_MESSENGER_MEDIATED_SIGNALING für die **intermediären** Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset



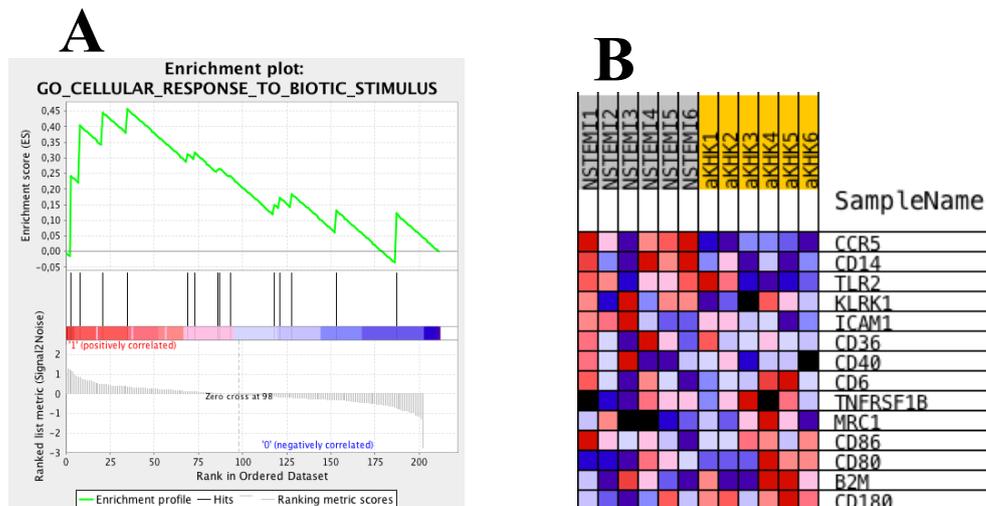
C

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
ITGAM	CD11b	2	1,2102E+16	0,063	Yes
FCGR1A	CD64	4	1,1063E+16	0,125	Yes
CTLA4	CD152	6	0,902	0,175	Yes
CD14	CD14	8	0,829	0,220	Yes
CR1	CD35	14	0,657	0,231	Yes
FCGR2A	CD32	15	0,616	0,269	Yes
CD1D	CD1d	17	0,542	0,296	Yes
CD55	CD55	18	0,504	0,327	Yes
TLR2	CD282	21	0,472	0,345	Yes
PTPRC	CD45	31	0,380	0,315	Yes
KLRK1	CD314	35	0,348	0,319	Yes
IL4R	CD124	38	0,305	0,326	Yes
CD38	CD38	39	0,304	0,344	Yes
CD74	CD74	43	0,281	0,344	Yes
IL6ST	CD130	45	0,274	0,355	Yes
LAMP1	CD107a	58	0,199	0,297	No
CD36	CD36	73	0,085	0,220	No
C5AR1	CD88	79	0,067	0,194	No
CD46	CD46	82	0,044	0,185	No
SEMA7A	CD108	85	0,028	0,175	No
CD40	CD40	86	0,027	0,177	No
CD4	CD4	88	0,012	0,172	No
CD79B	CD79b	89	0,000	0,172	No
IL12RB1	CD212	99	-0,035	0,121	No
CD86	CD86	121	-0,149	0,007	No
CD80	CD80	128	-0,193	-0,017	No
NCR3	CD337	131	-0,206	-0,016	No
FCER2	CD23	137	-0,242	-0,030	No

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
TNFRSF13C	CD268	139	-0,261	-0,020	No
CD19	CD19	142	-0,278	-0,015	No
CD209	CD209	145	-0,282	-0,009	No
ICAM3	CD50	146	-0,284	0,008	No
B2M	b2microglobulin	153	-0,313	-0,008	No
CD28	CD28	158	-0,331	-0,011	No
ITGB2	CD18	165	-0,420	-0,020	No
THY1	CD90	167	-0,445	0,001	No
CR2	CD21	171	-0,470	0,012	No
CD226	CD226	173	-0,503	0,038	No
FCGR3A	CD16	179	-0,559	0,043	No
ICAM2	CD102	181	-0,580	0,072	No
CD180	CD180	187	-0,719	0,087	No
CCR7	CD197	189	-0,780	0,129	No

Abbildung 54: Darstellung des Gensets GO_POSITIVE_REGULATION_OF_IMMUNE_RESPONSE für die **intermediären** Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset



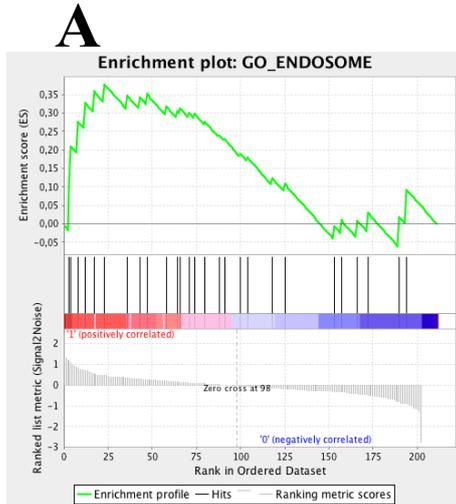
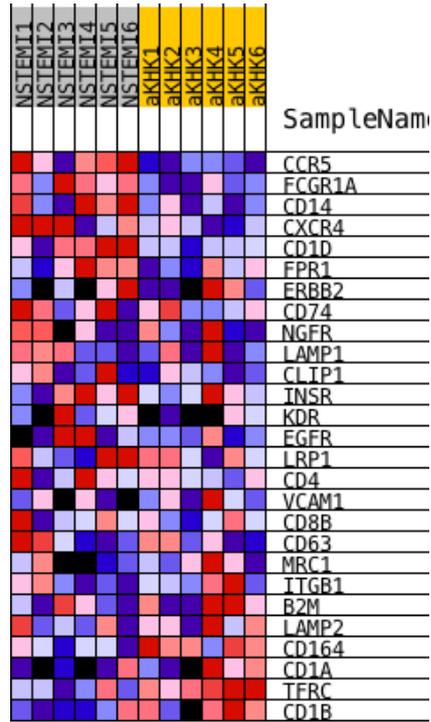
C

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
CCR5	CD195	3	1,1801E+16	0,242	Yes
CD14	CD14	8	0,829	0,403	Yes
TLR2	CD282	21	0,472	0,445	Yes
KLRK1	CD314	35	0,348	0,455	Yes
ICAM1	CD54	69	0,109	0,312	No
CD36	CD36	73	0,085	0,316	No
CD40	CD40	86	0,027	0,261	No
CD6	CD6	87	0,021	0,266	No
TNFRSF1B	CD120b	93	0,000	0,241	No
MRC1	CD206	118	-0,140	0,150	No
CD86	CD86	121	-0,149	0,172	No
CD80	CD80	128	-0,193	0,184	No
B2M	b2microglobulin	153	-0,313	0,131	No
CD180	CD180	187	-0,719	0,121	No

Abbildung 55: Darstellung des Gensets *GO_CELLULAR_RESPONSE_TO_BIOTIC_STIMULUS* für die **intermediären** Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

B



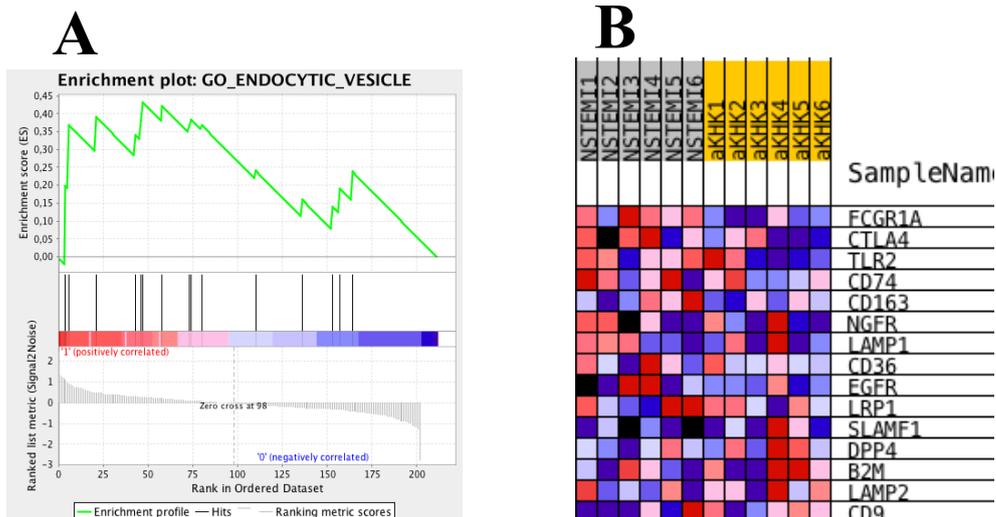
C

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
CCR5	CD195	3	1,1801E+16	0,101	Yes
FCGR1A	CD64	4	1,1063E+16	0,210	Yes
CD14	CD14	8	0,829	0,276	Yes
CXCR4	CD184	12	0,676	0,327	Yes
CD1D	CD1d	17	0,542	0,359	Yes
FPR1	fMLP receptor	23	0,458	0,377	Yes
ERBB2	CD340	36	0,342	0,346	No
CD74	CD74	43	0,281	0,342	No
NGFR	CD271	47	0,262	0,351	No
LAMP1	CD107a	58	0,199	0,317	No
CLIP1	CLIP	64	0,144	0,304	No
INSR	CD220	66	0,136	0,312	No
KDR	CD309	71	0,091	0,300	No
EGFR	EGF Receptor	74	0,085	0,297	No
LRP1	CD91	80	0,056	0,276	No

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
CD4	CD4	88	0,012	0,239	No
VCAM1	CD106	91	0,000	0,229	No
CD8B	CD8b	100	-0,041	0,189	No
CD63	CD63	104	-0,057	0,179	No
MRC1	CD206	118	-0,140	0,122	No
ITGB1	CD29	125	-0,179	0,108	No
B2M	b2microglobulin	153	-0,313	-0,007	No
LAMP2	CD107b	157	-0,330	0,009	No
CD164	CD164	166	-0,426	0,008	No
CD1A	CD1a	172	-0,498	0,031	No
TFRC	CD71	190	-0,805	0,018	No
CD1B	CD1b	194	-0,907	0,092	No

Abbildung 56: Darstellung des Gensets GO_ENDOSOME für die **intermediären** Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset



C

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
FCGR1A	CD64	4	1,1063E+16	0,197	Yes
CTLA4	CD152	6	0,902	0,369	Yes
TLR2	CD282	21	0,472	0,391	Yes
CD74	CD74	43	0,281	0,339	Yes
CD163	CD163	46	0,264	0,381	Yes
NGFR	CD271	47	0,262	0,432	Yes
LAMP1	CD107a	58	0,199	0,420	No
CD36	CD36	73	0,085	0,366	No
EGFR	EGF Receptor	74	0,085	0,383	No
LRP1	CD91	80	0,056	0,369	No
SLAMF1	CD150	110	-0,094	0,240	No
DPP4	CD26	136	-0,239	0,160	No
B2M	b2microglobulin	153	-0,313	0,140	No
LAMP2	CD107b	157	-0,330	0,190	No
CD9	CD9	164	-0,404	0,239	No

Abbildung 57: Darstellung des Gensets GO_ENDOCYTOTIC_VESICLE für die **intermediären** Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

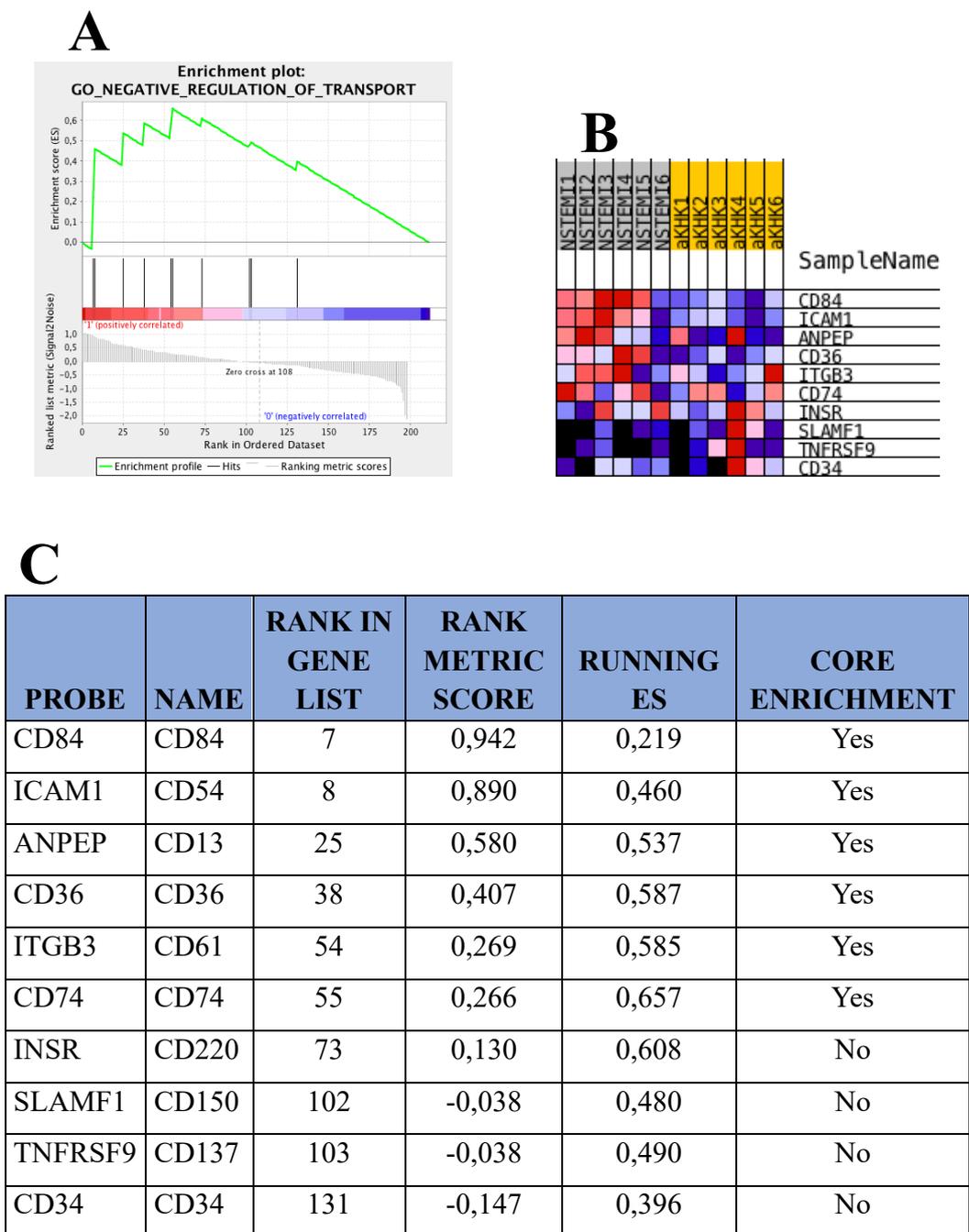
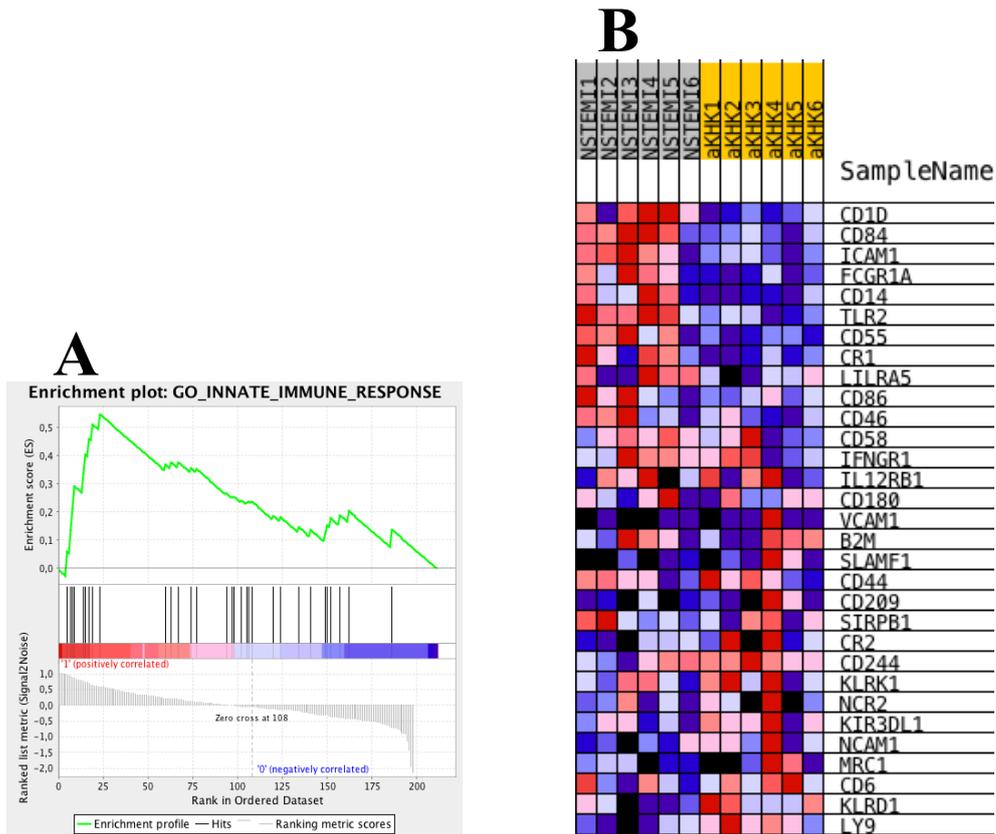


Abbildung 58: Darstellung des Gensets GO_NEGATIVE_REGULATION_OF_TRANSPORT für die **nicht-klassische** Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten



C

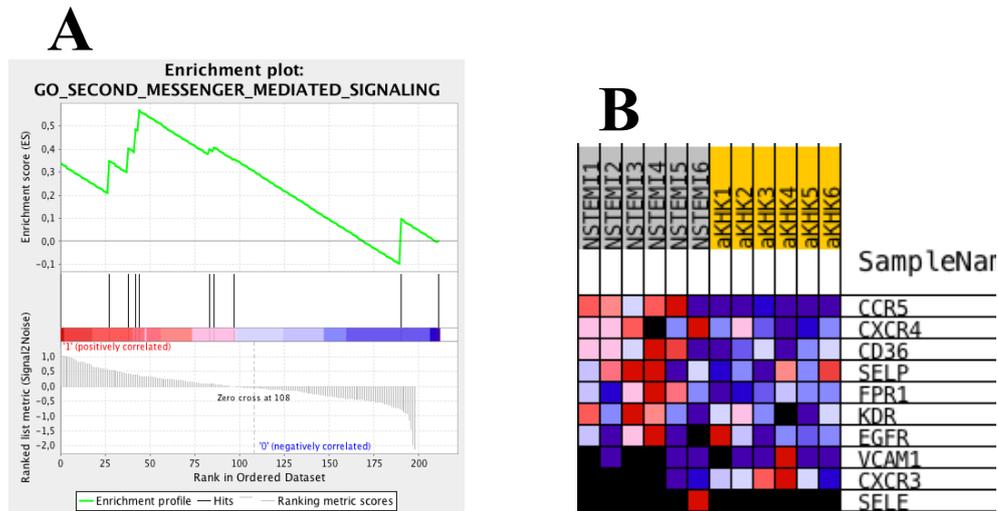
PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
CD1D	CD1d	5	0,973	0,058	Yes
CD84	CD84	7	0,942	0,136	Yes
ICAM1	CD54	8	0,890	0,215	Yes
FCGR1A	CD64	9	0,874	0,292	Yes
CD14	CD14	14	0,765	0,337	Yes
TLR2	CD282	15	0,748	0,403	Yes
CD55	CD55	17	0,706	0,460	Yes
CR1	CD35	19	0,637	0,511	Yes
LILRA5	CD85	23	0,598	0,547	Yes
CD86	CD86	60	0,226	0,368	No
CD46	CD46	63	0,217	0,376	No
CD58	CD58	67	0,192	0,377	No
IFNGR1	CD119	74	0,125	0,355	No

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
IL12RB1	CD212	77	0,105	0,353	No
CD180	CD180	94	0,007	0,265	No
VCAM1	CD106	97	0,000	0,254	No
B2M	b2microglobulin	98	-0,001	0,254	No
SLAMF1	CD150	102	-0,038	0,241	No
CD44	CD44	105	-0,042	0,234	No
CD209	CD209	106	-0,044	0,237	No
SIRPB1	CD172b	108	-0,057	0,237	No
CR2	CD21	120	-0,117	0,187	No
CD244	CD244	124	-0,122	0,181	No
KLRK1	CD314	134	-0,175	0,146	No
NCR2	CD336	141	-0,252	0,136	No
KIR3DL1	NKB1	149	-0,309	0,124	No
NCAM1	CD56	150	-0,315	0,152	No
MRC1	CD206	152	-0,349	0,177	No
CD6	CD6	157	-0,379	0,189	No
KLRD1	CD94	162	-0,416	0,203	No
LY9	CD229	186	-0,700	0,138	No

Abbildung 59: Darstellung des Gensets GO_INNATE_IMMUNE_RESPONSE für die **nicht-klassische** Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

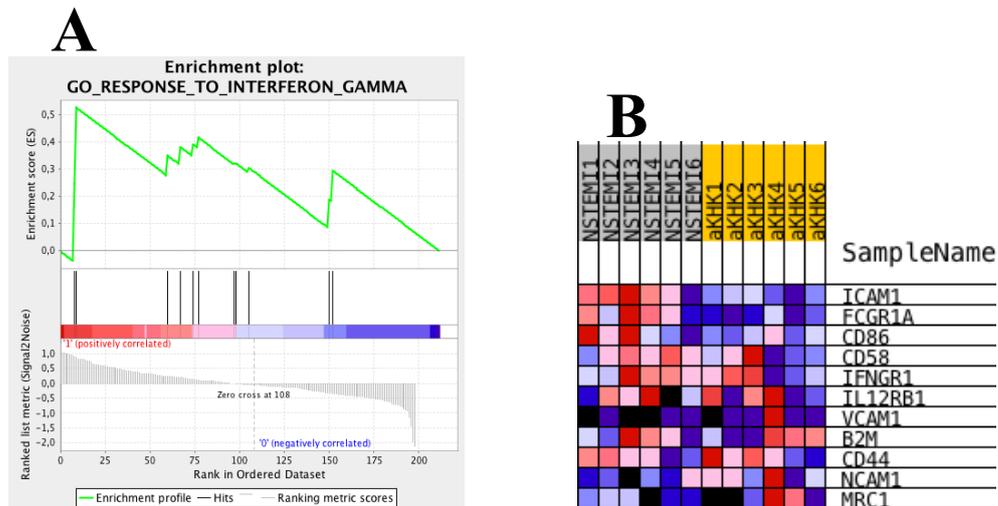


C

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
CCR5	CD195	0	1,32392E+16	0,338	Yes
CXCR4	CD184	27	0,548	0,349	Yes
CD36	CD36	38	0,407	0,403	Yes
SELP	CD62P	42	0,377	0,484	Yes
FPR1	fMLP receptor	44	0,340	0,566	Yes
KDR	CD309	83	0,081	0,399	No
EGFR	EGF Receptor	86	0,070	0,406	No
VCAM1	CD106	97	0,000	0,357	No
CXCR3	CD183	190	-0,764	0,096	No
SELE	CD62E	211	NaN	0,105	No

Abbildung 60: Darstellung des Gensets GO_SECOND_MESSENGER_MEDIATED_SIGNALING für die **nicht-klassische** Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten



C

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
ICAM1	CD54	8	0,890	0,246	Yes
FCGR1A	CD64	9	0,874	0,526	Yes
CD86	CD86	60	0,226	0,350	No
CD58	CD58	67	0,192	0,381	No
IFNGR1	CD119	74	0,125	0,391	No
IL12RB1	CD212	77	0,105	0,415	No
VCAM1	CD106	97	0,000	0,321	No
B2M	b2microglobulin	98	-0,001	0,321	No
CD44	CD44	105	-0,042	0,305	No
NCAM1	CD56	150	-0,315	0,187	No
MRC1	CD206	152	-0,349	0,294	No

Abbildung 61: Darstellung des Gensets GO_RESPONSE_TO_INTERFERON_GAMMA für die **nicht-klassische** Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

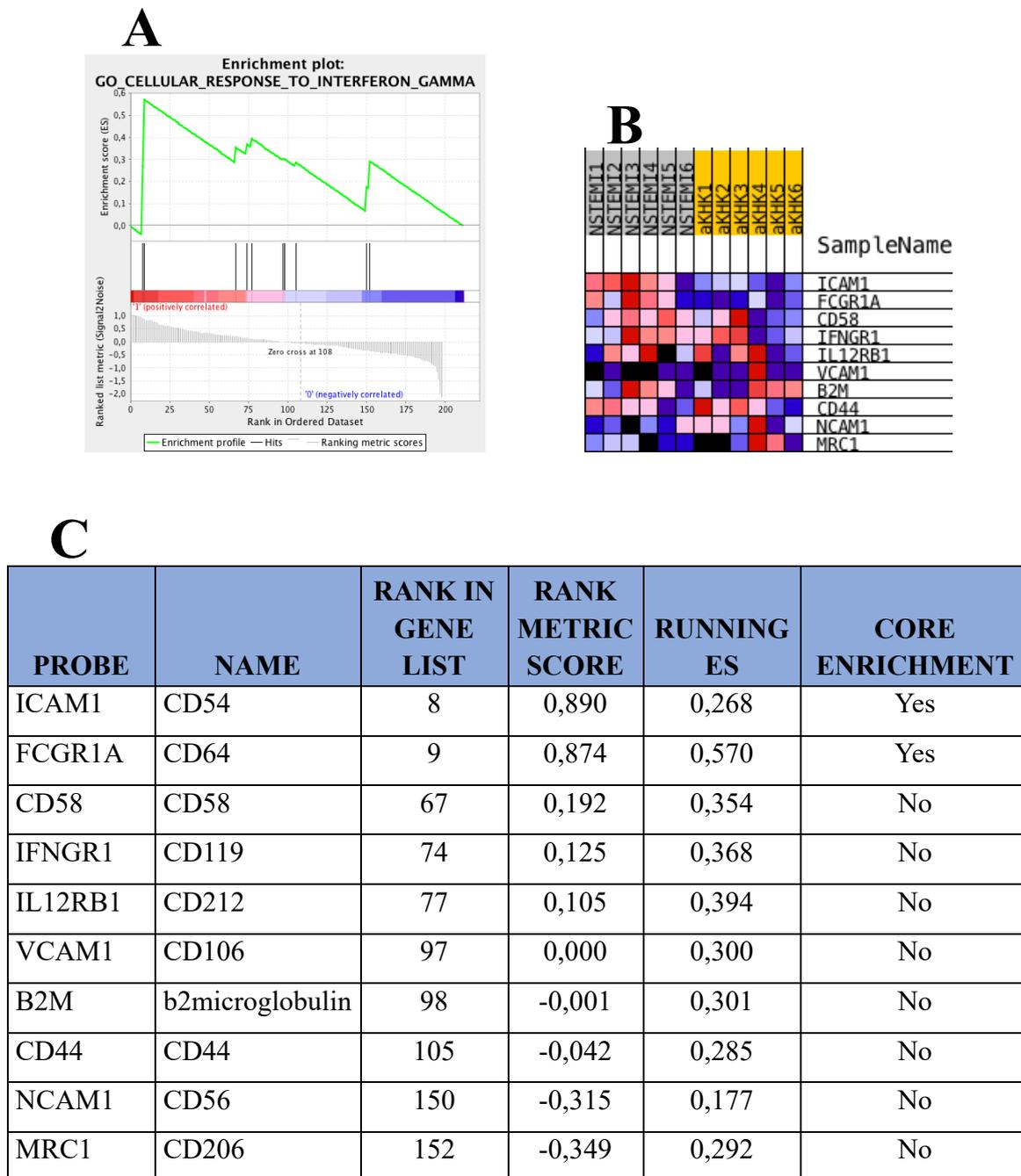
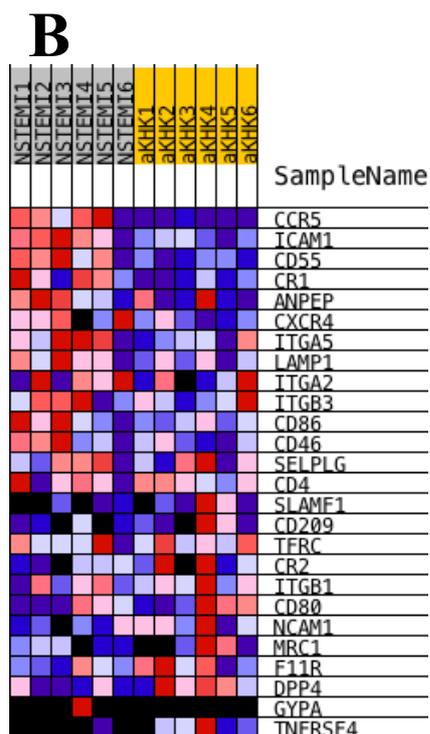
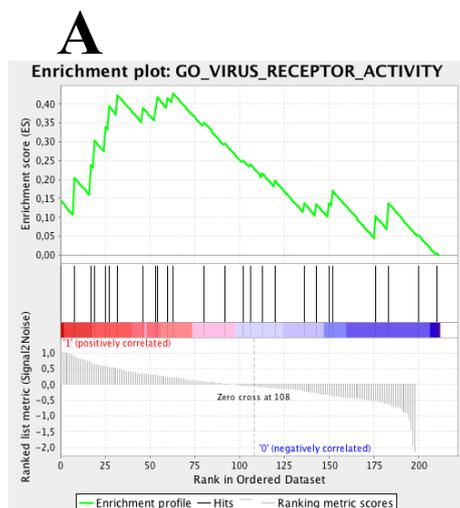


Abbildung 62: Darstellung des Gensets GO_CELLULAR_RESPONSE_TO_INTERFERON_GAMMA für die **nicht-klassische** Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten



C

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
CCR5	CD195	0	1,32392E+16	0,145	Yes
ICAM1	CD54	8	0,890	0,204	Yes
CD55	CD55	17	0,706	0,238	Yes
CR1	CD35	19	0,637	0,302	Yes
ANPEP	CD13	25	0,580	0,339	Yes
CXCR4	CD184	27	0,548	0,393	Yes
ITGA5	CD49e	32	0,471	0,423	Yes
LAMP1	CD107a	46	0,328	0,389	Yes
ITGA2	CD49b	53	0,288	0,388	Yes
ITGB3	CD61	54	0,269	0,417	Yes
CD86	CD86	60	0,226	0,415	Yes
CD46	CD46	63	0,217	0,428	Yes
SELPLG	CD162	80	0,086	0,352	No
CD4	CD4	92	0,025	0,295	No

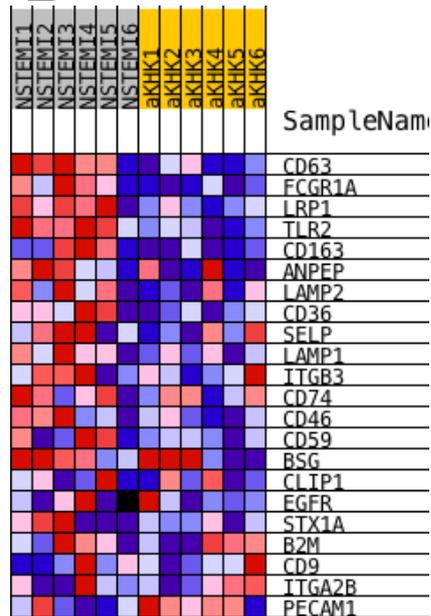
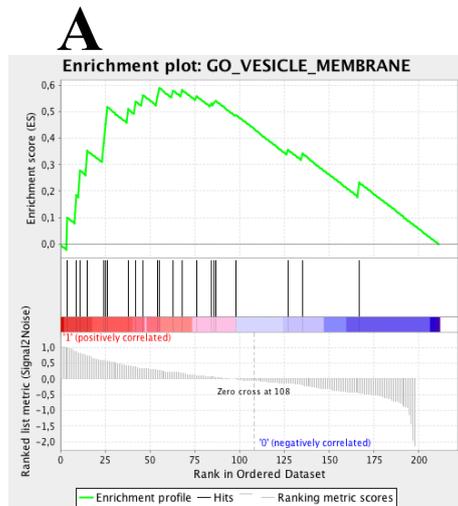
Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
SLAMF1	CD150	102	-0,038	0,251	No
CD209	CD209	106	-0,044	0,239	No
TFRC	CD71	113	-0,075	0,215	No
CR2	CD21	120	-0,117	0,196	No
ITGB1	CD29	136	-0,207	0,138	No
CD80	CD80	143	-0,266	0,135	No
NCAM1	CD56	150	-0,315	0,137	No
MRC1	CD206	152	-0,349	0,170	No
F11R	CD321	176	-0,518	0,102	No
DPP4	CD26	183	-0,618	0,138	No
GYPA	CD235a	200	NaN	0,053	No
TNFRSF4	CD134	210	NaN	0,005	No

Abbildung 63: Darstellung des Gensets *GO_VIRUS_RECEPTOR_ACTIVITY* für die **nicht-klassische** Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

B



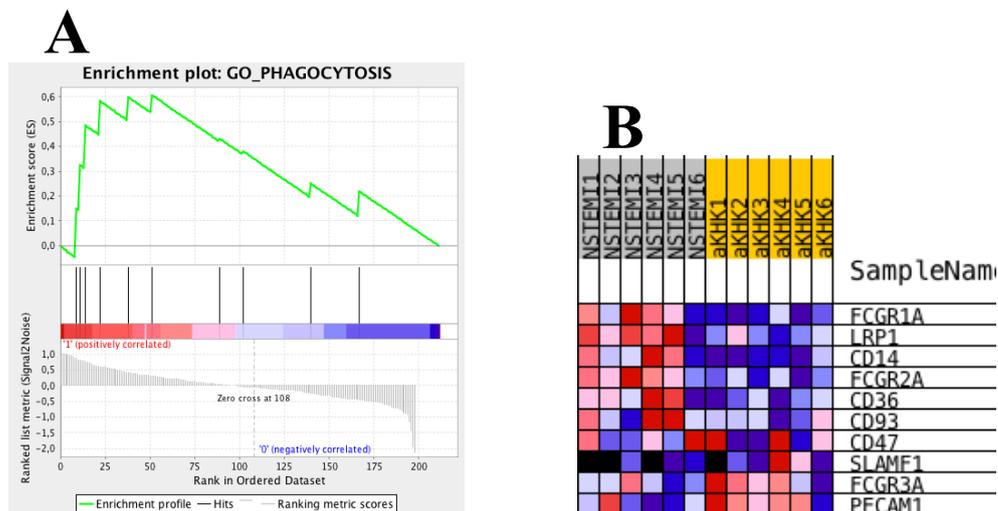
C

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
CD63	CD63	4	0,997	0,100	Yes
FCGR1A	CD64	9	0,874	0,184	Yes
LRP1	CD91	11	0,812	0,277	Yes
TLR2	CD282	15	0,748	0,352	Yes
CD163	CD163	24	0,582	0,380	Yes
ANPEP	CD13	25	0,580	0,450	Yes
LAMP2	CD107b	26	0,552	0,517	Yes
CD36	CD36	38	0,407	0,509	Yes
SELP	CD62P	42	0,377	0,538	Yes
LAMP1	CD107a	46	0,328	0,562	Yes
ITGB3	CD61	54	0,269	0,558	Yes
CD74	CD74	55	0,266	0,590	Yes
CD46	CD46	63	0,217	0,580	No
CD59	CD59	68	0,189	0,581	No
BSG	CD147	76	0,108	0,558	No
CLIP1	CLIP	84	0,078	0,530	No
EGFR	EGF Receptor	86	0,070	0,533	No

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
STX1A	HPC	87	0,053	0,540	No
B2M	b2microglobulin	98	-0,001	0,487	No
CD9	CD9	127	-0,128	0,356	No
ITGA2B	CD41a	135	-0,188	0,341	No
PECAM1	CD31	167	-0,440	0,232	No

Abbildung 64: Darstellung des Gensets GO_VESICLE_MEMBRANE für die **nicht-klassische** Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset



PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
FCGR1A	CD64	9	0,874	0,149	Yes
LRP1	CD91	11	0,812	0,324	Yes
CD14	CD14	14	0,765	0,483	Yes
FCGR2A	CD32	22	0,600	0,581	Yes
CD36	CD36	38	0,407	0,597	Yes
CD93	CDw93	51	0,308	0,606	Yes

Oberflächenmarker-Analyse zirkulierender Monozyten bei NSTEMI-Patienten

PROBE	NAME	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
CD47	CD47	89	0,035	0,431	No
SLAMF1	CD150	102	-0,038	0,379	No
FCGR3A	CD16	140	-0,238	0,249	No
PECAM1	CD31	167	-0,440	0,218	No

Abbildung 65: Darstellung des Gensets GO_PHAGOCYTOSIS für die **nicht-klassische** Subpopulation: (A) Enrichment Diagramm mit der Verteilung der Oberflächenmarker innerhalb der Rangliste; (B) Heatmap der beteiligten Oberflächenmarker für dieses Genset und ihrer Verteilung für die NSTEMI- und die Kontrollkohorte; (C) statistische Angaben für dieses Genset



Einwilligungserklärung

AGG*

Patient/Proband (Name, Vorname):
Geburtsdatum: / /

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass

- das Kerckhoff Herzforschungsinstitut mit der Justus-Liebig-Universität Gießen GmbH wie in der Information beschreiben, personenbezogene Daten von mir erhebt und speichert, weitere Angaben über meine Gesundheit aus meinen Krankenunterlagen entnimmt,
- die Daten gemeinsam mit meinen Biomaterialien pseudonymisiert dem Kerckhoff Herzforschungsinstitut mit der Justus-Liebig-Universität Gießen GmbH für medizinische Forschungsvorhaben zur Verfügung gestellt werden,
- meine Biomaterialien und Daten unbefristet (mindestens jedoch für 20 Jahre) für medizinische Forschungsvorhaben verwendet werden,
- Ich bin darüber aufgeklärt worden, dass ich meine Einwilligung gegenüber dem Kerckhoff Herzforschungsinstitut mit der Justus-Liebig-Universität Gießen GmbH ohne Angabe von Gründen mit Wirkung für die Zukunft jederzeit widerrufen kann. Beim Widerruf werden auf mein Verlangen die verbliebenen Biomaterialien und die erhobenen Daten vernichtet bzw. gelöscht oder anonymisiert. Daten aus bereits durchgeführten Analysen bzw. Forschungsvorhaben können nicht mehr gelöscht werden.
- Ich habe die Informationsschrift gelesen und hatte ausreichend Gelegenheit, Fragen zu stellen.

Einwilligungserklärung Seite 1 von 3

Einwilligungserklärung, Version 41
Erstellt von C. Lohrstaedt, T. Thiele, D. Kerckhoff, K. Müller, J. Ull

Seite 1 von 3



Ich bin mit den folgenden Untersuchungen / Entnahmen im Rahmen von BioReg einverstanden:

1a. Blutentnahmen / Blutuntersuchungen	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
1b. Genetische Analysen	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
1c. Urnuntersuchungen	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
1d. Überlassung von Gewebe (Restmaterial)	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein

Ich bin damit einverstanden, dass ich evtl. zu einem späteren Zeitpunkt erneut telefonisch oder postalisch kontaktiert werde (falls nicht gewünscht, bitte „Nein“ ankreuzen):

2a. zum Zweck der Gewinnung weiterer Informationen / Biomaterialien	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
2b. zum Zweck der Einwilligung in den Abgleich mit anderen medizinischen Registern / Datenbanken	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
2c. zum Zweck der Rückmeldung für mich gesundheitsrelevanter Ergebnisse	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
2d. Informationen über meine erneuten Krankenhausaufenthalte, klinische Symptome und meinen Tod kann gegebenenfalls auch erfolgen über folgenden Arzt: Name und Anschrift des Arztes:	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein

3a. Ich bin damit einverstanden, dass meine Biomaterialien doppelt pseudonymisiert an Universitäten, Forschungsinstitute und forschende Unternehmen, ggf. auch im Ausland mit möglicherweise niedrigerem Datenschutzniveau (z.B. westliche Industriestaaten, Europäische Union o.ä.) zu Zwecken medizinischer Forschung weitergegeben werden dürfen.	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
--	-----------------------------	-------------------------------

Einwilligungserklärung Seite 2 von 3

Einwilligungserklärung, Version 41
Erstellt von C. Lohrstaedt, T. Thiele, D. Kerckhoff, K. Müller, J. Ull

Seite 2 von 3

Abbildung 66: Einwilligungserklärung für Probanden 1/2

Publikationsverzeichnis

Posterpräsentation im Rahmen der 83. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie in Mannheim (19.- 22.04.2017) in der Session „Genetik und Marker“

Publikation

Hoffmann J, Fiser K, Liebetrau C, Staubach N, Kost D, Voss S, zur Heiden A, Dörr O, Lipps C, Nef HM, Möllmann H, Hamm CW, Keller T, Troidl C. High-Content Immunophenotyping and Hierarchical Clustering Reveal Sources of Heterogeneity and New Surface Markers of Human Blood Monocyte Subsets. *Thromb Haemost.* 2020 Jan;120(1):141-155 PMID: 31887780

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Danken möchte ich Herrn PD Dr. phil.nat. Troidl für die Überlassung des Themas und der Gelegenheit, unter seiner Verantwortung die Arbeit zu erstellen. Damit verbunden ist der Dank für die Unterstützung und Beratung während der Erstellung dieser Arbeit.

Den Mitarbeitern des Franz-Groedel Instituts der Kerckhoff-Klinik und insbesondere Frau Staubach danke ich für die Unterstützung und Beratung bei der Arbeit im Labor und der Datenerhebung.

Außerdem bedanke ich mich bei den Patientinnen und Patienten, die ihre Daten für diese Studie zur Verfügung gestellt haben.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an die Deutsche Herzstiftung e.V., die mein Potential erkannt hat und mich finanziell geförderte.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, und Arved Bielmeier, die mich mit viel Geduld gefördert und unterstützt haben.