

**Zytomische Analyse der Monozytensubpopulationen  
bei Gesunden und Patienten nach akutem Myokardinfarkt (Nicht-ST-Hebungsinfarkt)**

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

vorgelegt von David Christian Kost

aus Siegburg

Gießen 2020

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Christian Troidl

Gutachter: Prof. Dr. Ralph Schermuly

Tag der Disputation: 15.09.2021

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
<b>1.1</b>	<b>Akuter Myokardinfarkt</b> .....	1
1.1.1	Bedeutung und Epidemiologie .....	1
1.1.2	Definition des Myokardinfarkts.....	1
1.1.3	Pathophysiologie.....	3
1.1.4	Nicht-ST-Hebungsinfarkt.....	5
1.1.5	Intervention.....	6
1.1.6	Sterile Inflammation nach Ischämie/Reperfusion.....	7
1.1.6.1	Inflamationsphase.....	8
1.1.6.2	Proliferationsphase und Reparationsphase/Remodeling .....	9
<b>1.2</b>	<b>Monozyten</b> .....	11
1.2.1	Subtypen.....	13
1.2.2	Rolle der Monozyten bei Herzinfarkt.....	15
1.2.2.1	Kardiale Monozyten vor dem Infarkt ( <i>Steady-state</i> ) .....	15
1.2.2.2	Rolle der Monozyten bei Atherosklerose .....	16
1.2.2.3	Rolle der Monozyten im akuten Infarktgeschehen.....	18
1.2.2.4	Rolle der Monozyten bei der Infarktheilung.....	19
<b>2</b>	<b>Ziele und Fragestellung</b> .....	21
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	22
<b>3.1</b>	<b>Laborzubehör</b> .....	22
3.1.1	Geräte .....	22
3.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	24
3.1.3	Lösungen, Puffer und sonstige Reagenzien.....	26
3.1.4	Antikörper und Beads.....	27
3.1.5	EDV-Programme.....	29
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b> .....	30
3.2.1	Ethikerklärung .....	30
3.2.2	Patientenkollektiv .....	30
3.2.3	Probengewinnung und Aufklärung der Probanden .....	31
3.2.4	Kontinuität eines sterilen Arbeitsumfeldes.....	32

3.2.5	<b>Probenbearbeitung und Konservierung</b> .....	32
3.2.5.1	<b>Zellauftrennung per Dichtegradientenzentrifugation</b> .....	32
3.2.5.2	<b>Isolation der PBMC</b> .....	33
3.2.5.3	<b>Bestimmung der Zellzahl</b> .....	33
3.2.5.4	<b>Aufteilung und Kryokonservierung der Proben</b> .....	34
3.2.6	<b>Durchflusszytometrische Methoden</b> .....	35
3.2.6.1	<b>Vitalitätskontrolle der Proben</b> .....	35
3.2.6.2	<b>Lyoplate™ Human Cell Surface Marker Screening Panel</b> .....	36
3.2.6.3	<b>Lyoplate™-Versuche: Vorbereitung</b> .....	36
3.2.6.4	<b>Lyoplate™-Versuche: Durchführung</b> .....	37
3.2.6.5	<b>Validierungsversuche</b> .....	40
3.2.7	<b>Einstellung des Durchflusszytometers, Probenaufnahme, Gating</b> ....	42
3.2.8	<b>Datenanalyse der Durchflusszytometrie</b> .....	44
3.2.9	<b>Statistische Analyse</b> .....	44
3.2.10	<b>Bioinformatische Analyse</b> .....	45
4	<b>Ergebnisse</b> .....	46
4.1	<b>Vitalitätskontrolle der PBMC</b> .....	46
4.2	<b>Erkenntnisse zur detaillierten Separation der Monozytensubtypen</b> .....	46
4.3	<b>Immunphänotypische Korrelation zwischen den Monozytensubtypen</b> ....	47
4.4	<b>Oberflächenexpressionsmerkmale der Monozytensubtypen</b> .....	50
4.4.1	<b>Charakteristika klassischer Monozyten</b> .....	51
4.4.2	<b>Charakteristika intermediärer Monozyten</b> .....	54
4.4.3	<b>Charakteristika nicht-klassischer Monozyten</b> .....	61
4.4.4	<b>Validierung ausgewählter Oberflächenmarker</b> .....	65
4.5	<b>Differenzielle Expression bei Gesunden und NSTEMI-Patienten</b> .....	69
5	<b>Diskussion</b> .....	73
5.1	<b>Limitationen</b> .....	73
5.1.1	<b>Probanden- und Patientenkollektiv</b> .....	73
5.1.2	<b>Limitierende Faktoren der PBMC-Analyse bei Infarktpatienten</b> .....	75
5.1.3	<b>Altersunterschied und Vorerkrankungen</b> .....	76
5.1.4	<b>Vergleich mit NSTEMI-Patienten</b> .....	76
5.1.5	<b>Probengewinnung und -verarbeitung</b> .....	77

5.1.6	<b>Einfrieren und Auftauen</b> .....	78
5.1.7	<b>Monozyten als Forschungsfokus</b> .....	78
5.1.8	<b>Durchflusszytometrie und Konzept der Screening-Methode</b> .....	80
5.2	<b>Separationsmerkmale der Monozytensubtypen</b> .....	81
5.3	<b>Analogiemerkmale der Monozytensubtypen</b> .....	82
5.4	<b>Differenzielle Antigenexpression der Monozytensubtypen</b> .....	84
5.4.1	<b>Oberflächenexpressionsprofil klassischer Monozyten</b> .....	87
5.4.2	<b>Oberflächenexpressionsprofil intermediärer Monozyten</b> .....	89
5.4.3	<b>Oberflächenexpressionsprofil nicht-klassischer Monozyten</b> .....	91
5.5	<b>Vergleich der Expressionsprofile von Monozytensubtypen bei Gesunden und NSTEMI-Patienten</b> .....	92
5.6	<b>Klinische Relevanz und Ausblick</b> .....	94
6	<b>Zusammenfassung</b> .....	96
7	<b>Summary</b> .....	97
8	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	98
9	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	101
10	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	103
11	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	104
12	<b>Publikationsverzeichnis</b> .....	128
13	<b>Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation</b> .....	129
14	<b>Danksagung</b> .....	130
15	<b>Anhang</b> .....	131

# **1 Einleitung**

## **1.1 Akuter Myokardinfarkt**

### **1.1.1 Bedeutung und Epidemiologie**

Der akute Myokardinfarkt ist seit Langem eine der bedeutendsten Todesursachen in Deutschland. Von 1998 bis 2018 war der akute Myokardinfarkt konstant der zweithäufigste hier registrierte Todesgrund nach der chronisch ischämischen Herzkrankheit. Wenngleich die absolute Zahl der an einem Herzinfarkt Verstorbenen in diesen Jahren rückläufig war, sind 2018 immer noch 46.207 Menschen daran gestorben (Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2012; Statistisches Bundesamt 2020).

Darüber hinaus verursachen Herz-Kreislauf-Erkrankungen, also mitunter der Herzinfarkt als Teil der ischämischen Herzkrankheiten, höhere Kosten im Gesundheitssystem als sämtliche andere Krankheitsentitäten. Im Jahre 2015 lagen die Kosten bei 570 €/Einwohner (Statistisches Bundesamt 2017). Die gesellschaftliche und wirtschaftliche Bedeutung ist somit groß.

### **1.1.2 Definition des Myokardinfarkts**

Begrifflich ist dem Myokardinfarkt das Akute Koronarsyndrom (ACS, engl. *acute coronary syndrome*) übergeordnet. Leitsymptom des ACS ist der akute Thoraxschmerz (Hamm und Bassand 2012). Dieser Begriff umfasst zunächst alle spezifischen pathophysiologischen Prozesse, die mit einem manifesten oder bevorstehenden Myokardschaden in Verbindung stehen. Anhand des ST-Streckenverlaufs im Elektrokardiogramm (EKG) beinhaltet dies ST-Strecken-Hebungsinfarkte (STEMI, engl. *ST-elevation myocardial infarction*) und Nicht-ST-Strecken-Hebungsinfarkte (NSTEMI, engl. *non-ST-elevation myocardial infarction*) sowie instabile Angina pectoris (s. Abbildung 1) (Deckers 2013). Letztere umschreibt eine Krankheitsgruppe heterogener Pathophysiologie mit entweder unvollständiger oder transientser bzw. reversibler Myokardischämie, aus der noch kein Infarkt resultiert (Hamm und Braunwald 2000). Die Einteilung in diese Kategorien ist von therapieentscheidender Bedeutung, obwohl der ätiologische Hintergrund gleich ist (Hamm und Bassand 2012).

Zum ersten Mal wurde der akute Myokardinfarkt 1979 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO, engl. *World Health Organization*) offiziell definiert (Joint International Society and Federation of Cardiology/World Health Organization 1979). Seitdem wurden durch wissenschaftlichen Fortschritt neue diagnostische Möglichkeiten im Rahmen von sensitiveren Biomarkern, Bildgebung und differenzierterer Befundung des EKG geschaffen und die Definitionskriterien immer weiter verfeinert. Seit 2018 liegt die vierte und zurzeit neueste Überarbeitung der „Universellen Definition des Myokardinfarkts“ vor (Vafaei und Katus 2013; Thygesen et al. 2018).

Seitdem ist, wie bei Thygesen et al. (2018) beschrieben, ein akuter Myokardinfarkt definiert als eine durch objektive Verfahren nachgewiesene Myokardnekrose, verursacht durch eine klinisch manifeste Myokardischämie. Dies kann gegeben sein durch:

- Einen Anstieg oder Abfall kardialer Biomarker, vor allem des kardialen Troponins (cTn) – wobei mindestens ein Messwert oberhalb der 99. Perzentile gegenüber einer gesunden Referenzpopulation liegen muss – in Verbindung mit mindestens einem der folgenden Kriterien:
  - Ischämiesymptomatik
  - Neu oder zumindest mutmaßlich neu aufgetretene ST-Streckenveränderungen bzw. Linksschenkelblock im EKG
  - Auftreten neuer, pathologischer Q-Zacken im EKG, besonders in den Extremitätenableitungen
  - Neu festgestellte Wandbewegungsstörungen bzw. Nachweis einer frischen Myokardnarbe mittels Echokardiografie, Magnetresonanztomografie oder nuklearmedizinischer Verfahren
  - Mittels Koronarangiografie oder Autopsie identifizierter, intrakoronarer Thrombus

(Thygesen et al. 2018).

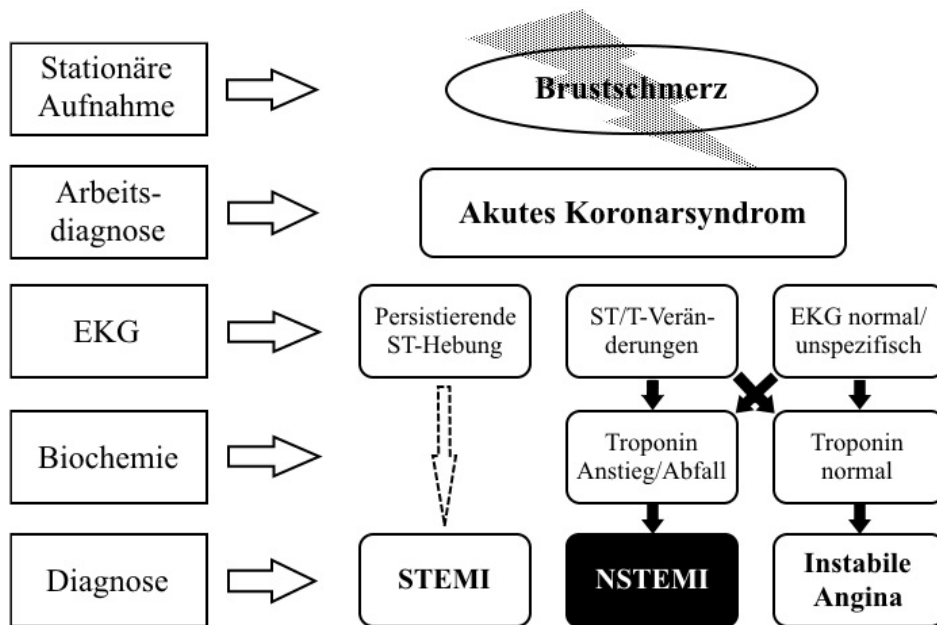


Abbildung 1: Das Spektrum des Akuten Koronarsyndroms (nach Hamm und Bassand 2012)

### 1.1.3 Pathophysiologie

Die Pathophysiologie des Myokardinfarkts basiert stets auf einem für die erforderliche Herzarbeit – somit den Sauerstoffbedarf – zu niedrigen Sauerstoffangebot. Zwei grundsätzlich verschiedene Mechanismen sind hierbei zu unterscheiden:

1. Totale oder partielle Okklusion eines oder mehrerer Koronargefäße infolge Ruptur, Ulzeration, Erosion, Dissektion oder Fissur einer lokalen atherosklerotischen Plaque. Hierbei findet sich häufig ein assoziierter Koronarthrombus mit resultierender Verzögerung oder Unterbrechung des koronaren Flusses oder Embolisation von Plättchenaggregaten in die Gefäßperipherie und eine daraus resultierende Myokardnekrose.

2. Funktionelle Ursachen, die das Gleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf stören, wie endotheliale Dysfunktion, Koronarspasmen, Tachy- oder Bradyarrhythmien, Anämie, respiratorische Insuffizienz, Hypotonie und Hypertonie mit oder ohne linksventrikulärer Hypertrophie (Vafaie und Katus 2013).

Des Weiteren sind Infarkte iatrogen möglich, beispielsweise während einer perkutanen, koronaren Intervention (PCI, engl. *percutaneous coronary intervention*) durch Kathe-



terokklusion des Gefäßlumens, während einer Herzoperation oder durch eine Stentthrombose oder -restenose nach erfolgter PCI (Tehrani und Seto 2013).

Die bei Weitem häufigste Ursache stellt der unter 1. genannte pathophysiologische Vorgang dar (Sami und Willerson 2010). Ihm zugrunde liegt die koronare Herzkrankheit (KHK), am häufigsten verursacht durch koronare Atherosklerose. Hierbei bilden sich atherosklerotische Plaques im Bereich zwischen Tunica intima und Tunica media des arteriellen Gefäßes. Gefördert wird deren Bildung durch kardiovaskuläre Risikofaktoren (Alter, Geschlecht, arterielle Hypertonie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Fettstoffwechselstörungen (erhöhtes Apolipoprotein-B-haltiges *low density lipoprotein* (LDL)-Cholesterin und erhöhte Triglyzeride bei gleichzeitig vermindertem *high density lipoprotein* (HDL)-Cholesterin), Adipositas sowie veränderte Lipoprotein (a)-, Homocystein- und Fibrinogen-Werte und genetische Prädisposition (Davies 2000; Nachtnebel und Warmuth 2013).

Koronargefäße sind deshalb besonders anfällig dafür, da sie aufgrund der nahen anatomischen Lage zum linken Ventrikel als erste Gefäßabgänge der Aorta hohen systolischen Blutdrücken ausgesetzt sind. Außerdem sind sie durch die Herzstruktur und -funktionsweise zu einem geschlängelten Verlauf gezwungen, der den Scherstress des Blutes auf die Gefäßwände erhöht (Zhong et al. 2015). Atherosklerotische Plaques entstehen im Rahmen eines chronischen Entzündungsprozesses der Gefäßwand und bestehen aus einem Lipidkern und einer Bindegewebskapsel. Der Lipidkern enthält vor allem Cholesterolverbindungen und ist umgeben von Schaumzellen, also Gewebsmakrophagen mit großen Mengen intrazytoplasmatischer Cholesteroleinlagerungen (s. Kapitel 1.2.2.2). Im Fortschreiten wächst die Plaque immer weiter und beeinträchtigt die Funktion und Integrität des Endothels.

Über eine Zeitspanne von meist vielen Jahren kann so eine vulnerable Plaque entstehen. Bei einer Erosion oder Ruptur der Plaquekapsel kommt es zur Freilegung des äußerst thrombogenen Lipidkerns und zum Kontakt mit Blutbestandteilen. Aktivierte Thrombozyten lagern sich an die extrazellulären Bestandteile an und es kommt zur Thrombusbildung, die je nach Ausmaß das Arterienlumen kaum, teilweise oder ganz verlegt. Bei einer Erosion wächst der Thrombus auf der Plaqueoberfläche aufgelagert, bei einer Ruptur hingegen bildet sich der Thrombus im Bereich des Lipidkerns und wächst in das Gefäßlumen hinein. Während Blut über den Thrombus fließt, kann es zur Ablösung von

Thrombusbestandteilen kommen, die in kleineren, intramyokardialen Gefäßen zu Mikroembolien führen können (Davies 2000).

#### **1.1.4 Nicht-ST-Hebungsinfarkt**

Wird ein Arterienlumen derart eingengt, dass es zu myokardialer Ischämie kommt, setzt ein Infarktgeschehen ein. In dieser Arbeit geht es hierbei hauptsächlich um die Entität des NSTEMI. Grundlegend dafür ist der akute Brustschmerz ohne anhaltende ST-Streckenhebung im EKG, es treten aber auch symptomarme oder gar -lose Fälle auf. Stattdessen treten persistierende oder transiente ST-Strecken-Senkungen, T-Wellen-Abnormalitäten (Inversion, Abflachung oder Pseudonormalisierung) oder unauffällige bzw. unspezifische Befunde im EKG auf (Hamm und Bassand 2012; Roffi et al. 2016).

Bedeutend ist die Abgrenzung zur instabilen Angina pectoris, da der pathophysiologische Ursprung und die klinische Präsentation sehr ähnlich sind, sie sich in der Bedrohlichkeit für die Myokardzellen jedoch unterscheiden. Die Diagnose NSTEMI kann gestellt werden, wenn die Ischämie so ausgeprägt ist, dass myokardialer Schaden entsteht und spezifische und unspezifische Biomarker für Myokardzellnekrose wie Herzmuskelspezifisches Troponin T (cTnT) oder I (cTnI) und Fraktionen der Kreatinkinase in den Blutstrom abgegeben werden. Bleiben diese Biomarker hingegen auch im Verlauf der folgenden Stunden nach Einsetzen der akuten Brustschmerzen innerhalb des Referenzbereichs, wird von einer instabilen Angina pectoris ausgegangen (Kumar und Cannon 2009; Roffi et al. 2016).

Durch Einführung hoch- bzw. ultrasensitiver Troponinassays (hsTnT bzw. -I) hat sich das Diagnoseschema des NSTEMI jedoch gewandelt. Nach den Leitlinien der *European Society of Cardiology* kann nach einem einmaligen negativen Troponintestergebnis ein NSTEMI bereits ausgeschlossen werden, wenn der Beschwerdebeginn mehr als drei Stunden zurückliegt. Analog dazu kann der einmalige positive Troponinnachweis bei vorliegender typischer klinischer Symptomatik als NSTEMI gewertet werden (Möllmann et al. 2013).

STEMI präsentieren sich beinahe immer mit totaler Koronargefäßokklusion und ausgeprägter Myokardnekrose bzw. von Nekrose bedrohtem Myokard. NSTEMI hingegen haben eine niedrigere Inzidenz für totalen Koronarverschluss, sondern zeigen sich häu-

figer mit hochgradiger Stenosierung (> 70 %) eines oder mehrerer Gefäße, am häufigsten assoziiert mit einem intraluminalen Koronarthrombus. Zudem zeigte sich im Vergleich zu STEMI seltener eine Plaqueruptur und stattdessen häufiger eine Plaqueeosion bzw. kalzifizierte Knötchen (Jia et al. 2013; Ambrose und Singh 2015).

### 1.1.5 Intervention

Im Falle des akuten Myokardinfarktes geht es darum zeitnah eine Reperfusion des Herzmuskels im Versorgungsgebiet des verlegten Koronargefäßes zu erreichen, um ein weiteres Absterben der Myokardzellen zu verhindern. Für die Prognose nach Reperfusion des Stromgebietes ist die Infarktgröße von entscheidender Bedeutung (McKay et al. 1986). Die Infarktgröße ist abhängig von der Größe des Versorgungsgebiets der okkludierten Koronararterie, der Ischämiezeit, also der Zeit zwischen Einsetzen der Ischämie bis zur erfolgreichen Reperfusion, und des myokardialen Energieverbrauchs während dieser Ischämieperiode (Frantz et al. 2008).

Hierfür kommen neben medikamentösen (Akutbehandlung und Lyse) und supportiven Maßnahmen auch chirurgische Verfahren wie die Bypass-Operationen (*coronary artery bypass surgery*, CABG) oder weniger invasive, interventionelle Vorgehensweisen wie die PCI infrage. Bei der perkutanen transluminalen koronaren Angioplastie (PTCA, engl. *percutaneous transluminal coronary angioplasty*) etwa wird die Stenose mittels eines Katheters von der Femoral- oder der Unterarmarterie aus unter Röntgenbildkontrolle dargestellt und durch Ballondilatation aufgedehnt. Nach noch geltender Leitlinie wird der Thrombus soweit möglich aspiriert und abgesaugt, um Embolien zu verhindern. Es gibt jedoch Hinweise, dass dies nicht in allen Fällen ratsam ist (Kolh et al. 2010; Eggebrecht 2016).

Um anschließend abzuwenden, dass das Koronargefäß neuerlich verlegt wird, also restenosiert, werden häufig Stents aus Edelstahl in die aufgedehnten Abschnitte eingebracht. Bei erhöhtem Restenosierisiko, beispielsweise bei ausgedehnteren Stenosen in kleineren Gefäßen, werden medikamentenbeschichtete Stents (DES, engl. *drug-eluting stent*) unbeschichteten Metallstents (BMS, engl. *bare-metal stent*) vorgezogen (Kolh et al. 2010; Nachtnebel und Warmuth 2013). Ein Nachteil der DES-Implantation ist jedoch

das Risiko einer Stentthrombose durch protrahierte Endothelialisierung des Stents (Möllmann et al. 2013).

### 1.1.6 Sterile Inflammation nach Ischämie/Reperfusion

Der genaue pathophysiologische Mechanismus des Ischämie- und Reperfusionsschadens ist äußerst komplex und wird hier nur oberflächlich dargestellt. Während der Ischämiephase muss sich der Stoffwechsel der Myozyten auf anaerobe Energieproduktion umstellen. So fallen Stoffe an, die den zellulären pH-Wert sinken lassen. Zur Kompensation des Protonenanfalls wird der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter aktiviert, was zu einer intrazellulären Natriumanreicherung führt. Da Myokardzellen einen hohen Energieverbrauch haben, reicht der anaerobe Stoffwechsel nicht aus, um genügend Adenosintriphosphat (ATP) bereitzustellen. Somit kann die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase den Anfall intrazellulären Natriums nicht ausgleichen. Der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter schafft zwar Natrium aus der Zelle, erhöht aber gleichzeitig die Calciumkonzentration im Zellinneren. So kommt es zu einem Anstau intrazellulären Calciums, da dieses einen aktiven Abtransport bzw. eine aktive Wiederaufnahme durch die *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase* (SERCA) erfordert. In der Folge kommt es zur Zellschwellung und Aktivierung von Proteasen, was bei anhaltender Situation zum Zelluntergang führt (s. Abbildung 2) (Sanada et al. 2011; Kalogeris et al. 2012).

Nach erfolgreicher Reperfusion des Koronarstromgebiets besteht der Infarktbereich in den meisten Fällen aus äußerst inhomogenem Gewebe, da sich unterschiedliche Bereiche sofort oder verzögert erholen, andere apoptotisch bzw. nekrotisch werden können. Denn die Ischämieempfindlichkeit der Myokardzellen, der beteiligten Gefäße und des Bindegewebes variiert stark (Ertl und Frantz 2005). Fibroblasten, Endothelzellen und im Myokard residierende Mastzellen sind deutlich ischämieresistenter als Kardiomyozyten. Deshalb geht man derzeit davon aus, dass sie das an die Reperfusion anschließende Geschehen triggern (Shinde und Frangogiannis 2014). Zusätzlich können aus dem einströmenden Blut Immunzellen aktiviert, in das betroffene Gebiet rekrutiert werden und Entzündungsprozesse auslösen bzw. aufrechterhalten, Gewebstrümmer beseitigen und Wundheilungsprozesse einleiten. Toxische oder protektive Mediatoren, die systemisch und lokal von bereits vorhandenen und eingewanderten Zellen freigesetzt werden, tragen zur Komplexität der Situation bei. Da diese Inflammation in der Regel in

der Abwesenheit von Mikroorganismen stattfindet, spricht man von steriler Inflammation. So zeichnen sich bereits zwei Phasen ab, die bei der Infarktheilung ablaufen: eine erste Inflammationsphase und eine sich daran anschließende Proliferations- und Reparatursphase mit Ausbildung einer Narbe (Frantz et al. 2008; Kalogeris et al. 2012).

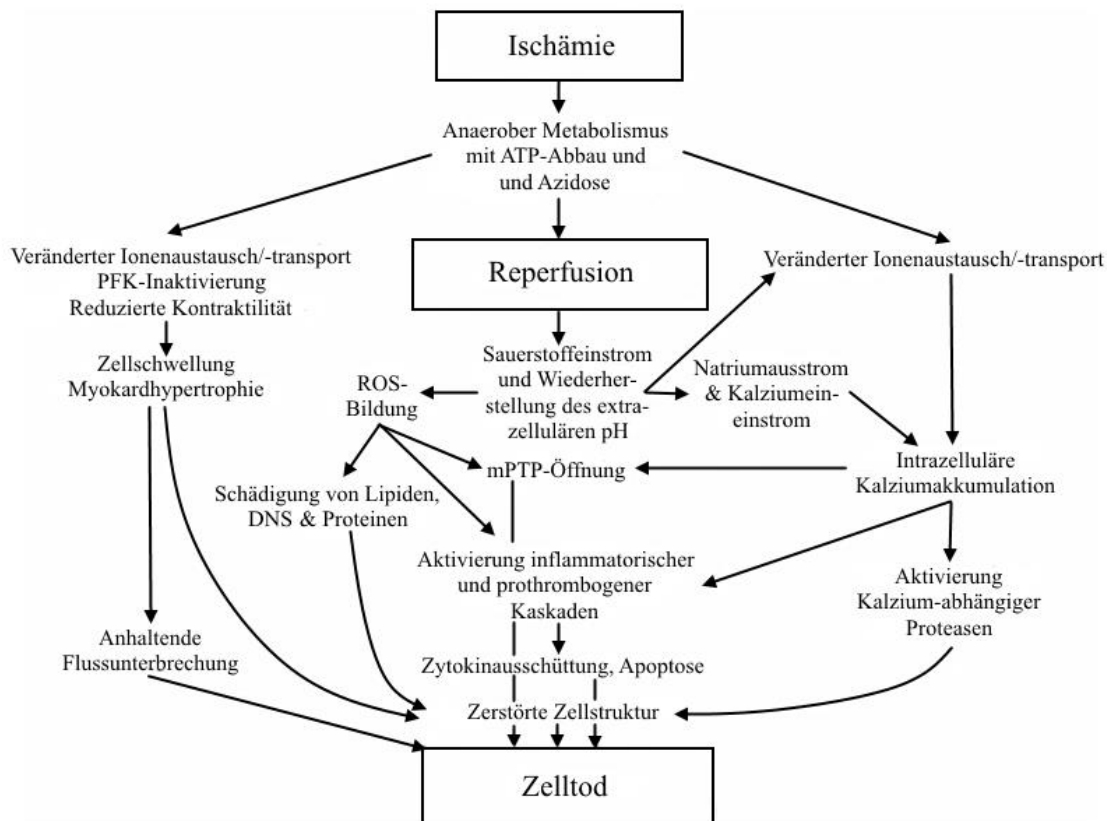


Abbildung 2: Pathologische Vorgänge in der Zelle, die bei Gewebeschaden durch Ischämie und Reperfusion auftreten (Kalogeris et al. 2012). ATP = Adenosintriphosphat; PFK = Phosphofruktokinase; ROS = Reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen-species*); mPTP = Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore; DNS = Desoxyribonukleinsäure

### 1.1.6.1 Inflammationsphase

Die Inflammationsphase ist geprägt von Zellen des angeborenen Immunsystems. Zu ihnen gehören zu Beginn vor allem Granulozyten (Neutrophile, Basophile und Eosinophile), im Verlauf auch Monozyten (einschließlich ihrer Derivate: Makrophagen und dendritische Zellen), Mastzellen und natürliche Killerzellen (NK). Körperfremde Pathogene wie *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP), also z. B. Lipopolysaccharide (LPS) aus Zellmembranen gramnegativer Bakterien, und Alarmsignale aus kör-

pereigenen Zellen sind in der Lage, diesen Teil des Immunsystems zu aktivieren. Somit ist das Aktivierungsmuster bei septischer Inflammation ähnlich zu dem einer sterilen Inflammation. Körper-eigene Moleküle, die eine sterile Immunreaktion hervorrufen können, werden als Gefahrensignale oder *danger/damage-associated molecular patterns* (DAMP) bezeichnet. Potentielle Mediatoren sind hierbei unter anderen reaktive Sauerstoffspezies (ROS, engl. *reactive oxygen species*), Fibronectin – ein Zelladhäsions- und Migrationsregulator – und intrazelluläre Proteine wie beispielsweise freies ATP, Hitzeschockproteine oder mitochondriale Desoxyribonukleinsäure (DNS), die beim Zelluntergang freigesetzt werden. Sie werden von *pattern recognition receptors* (PRR) wie Toll-like Rezeptoren (TLR) der Abwehrzellen erkannt und aktivieren nukleäre Transkriptionsfaktoren wie *nuclear factor* (NF)- $\kappa$ B, was zu einem Anstieg der Zytokin- und Chemokinproduktion führt. In den Immunzellen kommt es zur Ausbildung des Inflammasoms, einem Multiproteinkomplex, der zur Aktivierung der Caspase-1 führt, das wiederum Interleukin (IL)-1 $\beta$  enzymatisch aktiviert (Frantz et al. 2007; Yellon und Hausenloy 2007; Frantz et al. 2008; Mezzaroma et al. 2011; Kalogeris et al. 2012; Christia und Frangogiannis 2013; Aries et al. 2014; Talman und Ruskoaho 2016).

Die ROS-Produktion steigt schlagartig an, sobald frischer Sauerstoff als notwendiges Substrat durch Reperfusion wieder in das Infarktgebiet einströmt. Ein gesundes Herz ist in der Lage ROS zu neutralisieren, ein ischämisch vorgeschädigtes Herz jedoch nicht in dem Maße. Humorale Bestandteile wie das Komplementsystem, Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-18 und Tumornekrosefaktor (TNF) und Chemokine wie IL-8 ergänzen die zelluläre Immunreaktion. Sowohl eine zu hohe als auch eine zu niedrige Expression bzw. Akkumulation eines oder mehrerer dieser Faktoren hat eine negative Auswirkung auf die Prognose und Komplikationsrate in der Postinfarktzeit (Frantz et al. 2007; Yellon und Hausenloy 2007; Frantz et al. 2008; Zuidema 2010; Kalogeris et al. 2012; Talman und Ruskoaho 2016; Christia und Frangogiannis 2013; Mezzaroma et al. 2011).

### **1.1.6.2 Proliferationsphase und Reparationsphase/Remodeling**

Wenn die abgestorbenen Zellen und Gewebstrümmer soweit beseitigt sind, muss das leukozytäre Infiltrat abgebaut und die Narbenbildung eingeleitet werden. Dabei ist es essentiell, dass die Chemokin- und Zytokinsynthese rechtzeitig inhibiert wird. So wird

z. B. IL-10 und *transforming growth factor* (TGF)- $\beta$  in Makrophagen produziert und sezerniert, wenn sie apoptotische Granulozyten phagozytieren. Er wirkt dämpfend auf die Entzündungsreaktion. Durch die sinkende Expression proinflammatorischer Mediatoren wird die kontinuierliche Leukozytenrekrutierung unterbrochen und eine Aufrechterhaltung der Entzündung im heilenden Infarktgebiet verhindert. Stattdessen wandern Fibroblasten in das Infarktgebiet ein, die zu Myofibroblasten proliferieren und Kollagene (vorwiegend Typ I & III) und andere Matrixproteine sezernieren (s. Abbildung 3).

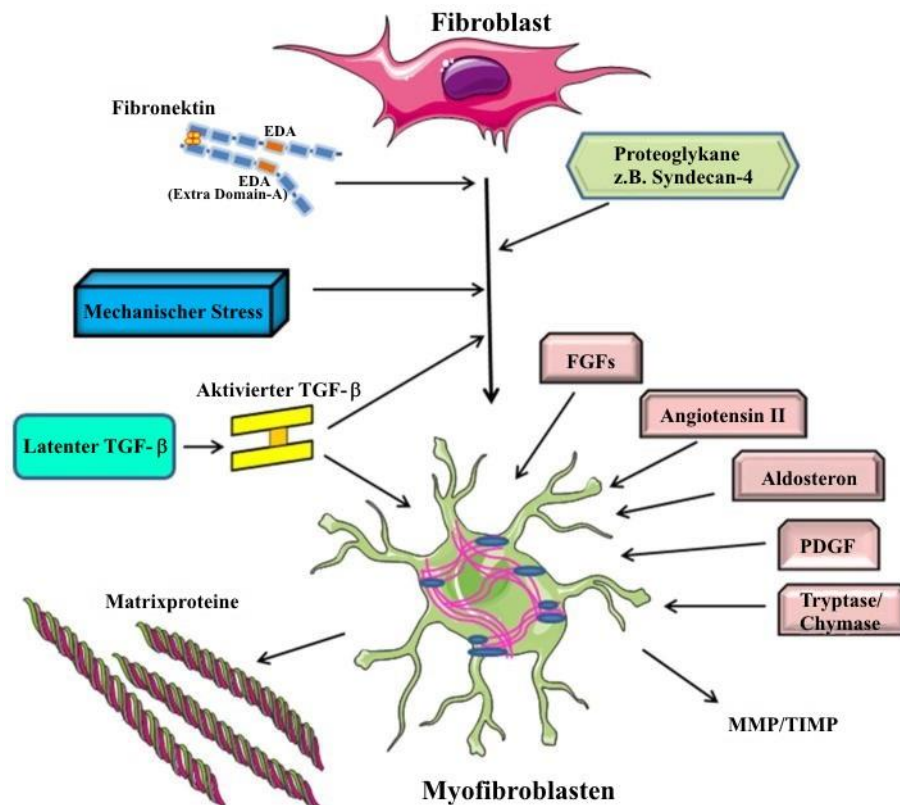


Abbildung 3: Fibroblasten transdifferenzieren zu Myofibroblasten, indem sie kontraktile Proteine exprimieren und große Mengen Matrixproteine sezernieren. Angeregt werden sie dazu durch Wachstumsfaktoren, Bestandteilen des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und die von Mastzellen ausgeschütteten Proteasen Tryptase und Chymase. Weitere spezialisierte Matrixproteine tragen dazu bei (Shinde und Frangogiannis 2014). FGFs = Fibroblasten Wachstumsfaktoren (*fibroblast growth factors*); TGF = *transforming growth factor*; PDGF = *platelet-derived growth factor*; MMP = Matrix-Metalloproteasen; TIMP = Gewebeinhibitoren von Metalloproteasen (*tissue inhibitors of metalloproteases*)

So wird das vorübergehende, fibrinoide Narbengewebe durch stabileres ersetzt. Ein Exzess dieses Vorgangs führt jedoch zu Ausdehnung des Narbengewebes auf infarktfreies Gebiet bis zu kardialer Fibrose – somit zu einer eingeschränkten Herzfunktion – und muss unbedingt verhindert werden. Ein Fehlen dieses Vorgangs wiederum führt zu in-

stabiler Narbenbildung mit möglicher Ruptur. Außerdem benötigt eine adäquate Heilung eine Neovaskularisation des betroffenen Gebiets.

Eine besondere Rolle kommt den Monozyten im Heilungsprozess zu. Sie produzieren Wachstumsfaktoren, die das Fibroblastenwachstum regulieren. Außerdem sezernieren sie Matrix-Metalloproteasen (MMP), die beim extrazellulären Remodeling mitwirken, indem sie Kollagene und andere Matrixproteine spalten (French und Kramer 2007; Frangogiannis 2008; Kalogeris et al. 2012; Frangogiannis 2012; Talman und Ruskoaho 2016). In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Funktionsweise und Involvierung eben jener Monozyten in den Infarkt- und Postinfarktprozess.

## 1.2 Monozyten

Monozyten sind im Blutkreislauf zirkulierende, phagozytenähnliche Zellen, die aus myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark hervorgehen. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Regulierung sowohl der angeborenen als auch der erworbenen Immunantwort im Rahmen von Entzündungsreaktionen. Außerhalb des Knochenmarks proliferieren sie nicht mehr, sondern zirkulieren und patrouillieren mehrere Tage lang in der Blutbahn durch die Gefäße (van Furth und Cohn 1968; Pardali und Waltenberger 2012). In der Milz befindet sich zudem ein Reservoir nicht zirkulierender Monozyten (van der Laan, A. M. et al. 2013; Spahn und Kreisel 2014).

Das Blut eines gesunden, erwachsenen Menschen enthält etwa 450 Monozyten/ $\mu\text{l}$  (Robbins und Swirski 2010). Sie machen 2-10 % der gesamten Leukozyten im Blut bei Mensch und Maus aus und werden durch *colony-stimulating factor* (CSF)-1 im Knochenmark stimuliert und gebildet (s. Abbildung 4, dargestellt am murinen Beispiel). CSF-1 fungiert als hämatopoetischer Wachstumsfaktor und stimuliert die Zellreifung durch Bindung am CSF-1-Rezeptor, auch als *cluster of differentiation* (CD)115 bezeichnet (Nemzek et al. 2001; Auffray et al. 2009).



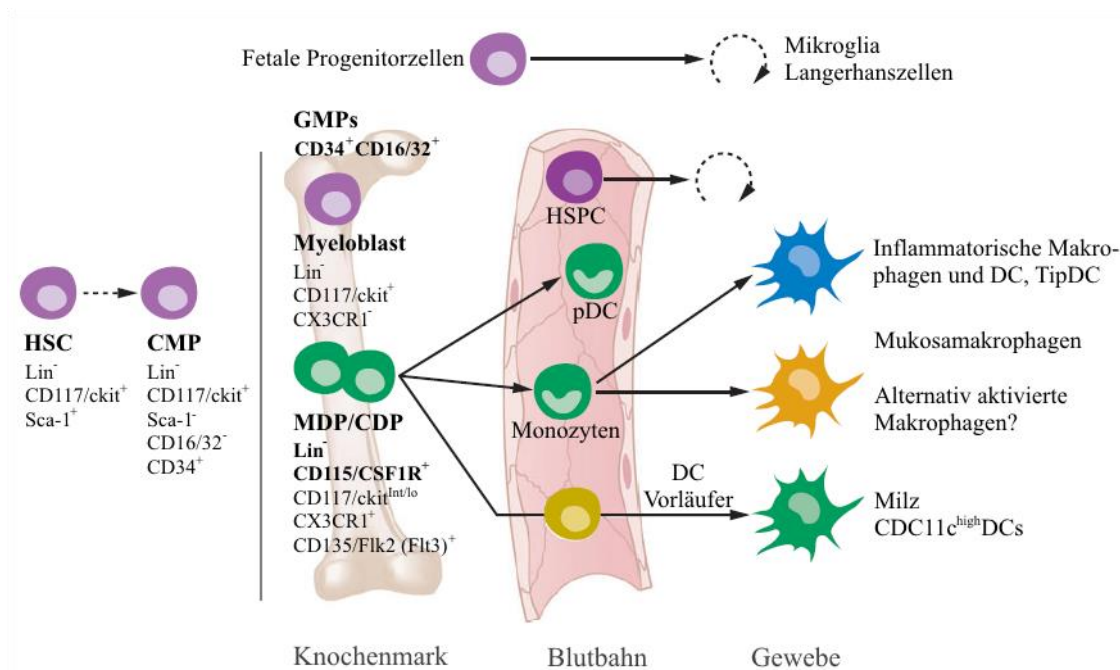


Abbildung 4: Differenzierung von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen aus myelo-poetischen Progenitorzellen am murinen Beispiel (nach Auffray et al. 2009). HSC = Hämatopoetische Stammzelle (*Hematopoietic stem cell*); CMP = Gemeinsame myeloische Progenitorzelle (*Common myeloid progenitors*); GMPs = Granulozyten-Monozyten-Vorläufer (*Granulocyte-monocyte progenitors*); MDP = Monozyten/Makrophagen und dendritische Zellen (DC) Vorläufer (*Monocyte/macrophage and DC precursors*); CDP = Gemeinsamer dendritischer Zellvorläufer (*Common DC progenitors*); HSPC = Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzelle (*Hematopoietic stem and progenitor cell*); pDC = Plasmazytoide dendritische Zellen (DC) (*Plasmacytoid dendritic cells*); TipDC = TNF- $\alpha$ /iNOS-produzierende dendritische Zellen (*TNF- $\alpha$ /iNOS-producing dendritic cells*)

Proinflammatorische und metabolische Stimuli rekrutieren Monozyten aus der Blutbahn und sorgen dafür, dass sie das umliegende Gewebe infiltrieren. Ihre dortige morphologische Varianz ist groß: Sie differenzieren irreversibel entweder zu Makrophagen oder zu dendritischen Zellen. Als Makrophagen sind sie in der Lage per Phagozytose Bakterien oder Zelltrümmer ins Zellinnere aufzunehmen und diese in sauren Phagolysosomen zu degradieren. Außerdem können sie durch ROS-Produktion im oxidativen Burst und durch Sekretion von Proteasen umliegende Matrix oder Zellen angreifen, zerstören und abbauen. In Zellkulturversuchen konnten Monozyten außerdem dazu angeregt werden, zu endothelialen, epithelialen und weiteren Zelltypen zu differenzieren (Pardali und Waltenberger 2012; Frantz und Nahrendorf 2014). So sind sie beispielsweise aktiv in die Angiogenese involviert und stellen eine große Untergruppe der endothelialen Progenitorzellen dar (Shantsila et al. 2008).

Monozyten weisen einige zellmorphologische Besonderheiten wie unregelmäßige Zellform, ovale bzw. nierenförmige Nuclei, zytoplasmatische Vesikel sowie einen hohen Quotienten aus Zytoplasma zu Kernvolumen auf. Dennoch sind sie in Größe und Form sehr heterogen und es ist schwer, sie alleine anhand morphologischer Kriterien von anderen Immunzellen wie aktivierten Lymphozyten und NK abzugrenzen (Auffray et al. 2009). Die Entwicklung neuer Methoden zur Immunphänotypisierung ermöglichte es, spezifischere Charakteristika der Monozyten auszumachen und ihnen Eigenschaften zuzuordnen. So sind sie mit verschiedenen Scavenger-Rezeptoren ausgestattet (z.B. für Lipoproteine (CD36, CD204) und Haptoglobin), um funktionslose bzw. potentiell toxische, biologische Überreste aus der Blutbahn und den Geweben zu beseitigen (Shantsila et al. 2011).

Außerdem bilden alle Monozyten CSF-1-Rezeptoren (CD115) und den Chemokinrezeptor CX<sub>3</sub>CR1 aus und unterscheiden sich von polymorphonukleären Zellen (PMN), NK und T- und B-Lymphozyten unter anderem dadurch, dass sie NK-Protein-46, CD3, CD15 und CD19 nicht exprimieren. Aktivierte Monozyten können hohe Konzentrationen an ROS, Komplementfaktoren, Prostaglandinen, Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL8, IL-6, IL-10 und IL-12, *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und proteolytischen Enzymen produzieren. Des Weiteren können sie, vor allem nach Differenzierung zu dendritischen Zellen, Antigene im Rahmen der Immunabwehr präsentieren, da sie mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, engl. *main histocompatibility complex*)-II-Antigen ausgestattet sind (Auffray et al. 2009; Glezeva et al. 2015).

### 1.2.1 Subtypen

Die technologischen Fortschritte der Zellphänotypisierung ermöglichten die Entdeckung und Charakterisierung von Heterogenität innerhalb der murinen und humanen Monozyten (Passlick et al. 1989). Analog zu Mausmonozyten-Subtypen (Ly6Chigh/low) konnten auch humane Monozyten anhand der Expressionsrate von CD14, einem Korezeptor für bakterielle Lipopolysaccharide, und CD16, einem Fc $\gamma$ -Rezeptor (Fc $\gamma$ -R) -III, zunächst in zwei, später in drei Subtypen unterteilt werden (Wright et al. 1990; Ziegler-Heitbrock et al. 2010; Ancuta et al. 2009). Anfangs variierte die genaue Charakterisierung und Nomenklatur der Untergruppen, weswegen man versuchte, eine einheitliche Einteilung und Identifizierung zu finden: klassische, intermediäre und nicht-klassische

Monozyten (Idzkowska et al. 2015). Diese Einteilung wurde mittlerweile vom *Nomenclature Committee of the International Union of Immunologic Societies* in Brescia, Italien anerkannt und ist somit international etabliert (Wright et al. 1990; Ziegler-Heitbrock et al. 2010; Appleby et al. 2013).

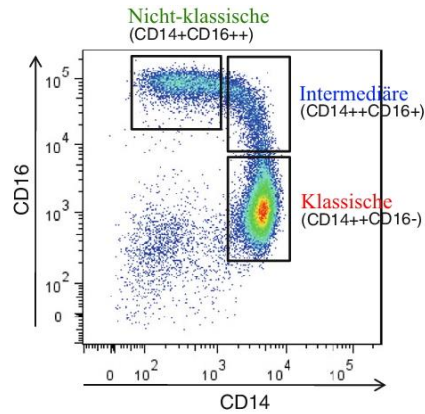


Abbildung 5: Durchflusszytometrische Punktwolkendarstellung zur Gatingstrategie der Monozytensubtypen nach ihrem relativen Expressionsprofil für CD14 und CD16. Klassische Monozyten exprimieren viel CD14 und kein CD16, intermediäre viel CD14 und wenig CD16 und nicht-klassische wenig CD14 und viel CD16 (Wong et al. 2012).

Klassische Monozyten zeigen eine hohe Dichte an CD14 auf ihrer Zelloberfläche ohne signifikante Expression von CD16 ( $CD14^{++}CD16^{-}$ ), intermediäre Monozyten exprimieren viel CD14 und niedrige Mengen CD16 ( $CD14^{++}CD16^{+}$ ) und nicht-klassische Monozyten niedrige Mengen CD14 und hohe Mengen CD16 ( $CD14^{+}CD16^{++}$ ) (s. Abbildung 5). Ein  $^{+}$  bedeutet, dass durchflusszytometrisch eine Fluoreszenzintensität gemessen wurde, die um das zehnfache höher ist als die der Isotypkontrolle. Zwei  $^{++}$  symbolisieren eine 100-fach höhere Intensität und  $^{-}$  zeigt an, dass keine signifikante Erhöhung vorliegt. (Ziegler-Heitbrock et al. 2010; Wong et al. 2012). Bei gesunden Menschen macht die klassische, CD16-negative Population etwa 85 %, die CD16-positive hingegen 15 % (genauer die intermediäre etwa 5 % und die nicht-klassische ca. 10 %) der gesamten Monozytenzahl aus (Wong et al. 2011).

Es konnte derzeit noch nicht abschließend geklärt werden, welche Subtypen in ihren Merkmalen und Eigenschaften näher miteinander in Verbindung stehen. Laut Wong et al. (2012) sieht es auf transkriptioneller Ebene trotz Widersprüchen in der Studienlage so aus, dass intermediäre Monozyten enger mit dem nicht-klassischen Subtyp verwandt sind.

Entsprechend mehreren transkriptionellen Studien exprimieren klassische Monozyten beim Menschen eine besondere Vielzahl an Genen, die an der Migration, beim Aufspüren von Bakterien, bei der Phagozytose und der Immunantwort bei proinflammatorischen Vorgängen beteiligt sind (Wong et al. 2011; Gren et al. 2015). Im Gegensatz dazu zeigen intermediäre Monozyten vor allem aktive Gene auf, die für die Antigenpräsentation und die TNF- $\alpha$ -Produktion verantwortlich sind. Nicht-klassische Monozyten hingegen exprimieren Gene, die zum Patrouillieren und Aufspüren von Nukleinsäuren und Viren notwendig sind (Ziegler-Heitbrock et al. 2010; Cros et al. 2010; Zawada et al. 2011). Man nimmt an, dass die intermediäre Untergruppe eine Übergangsstufe zwischen den klassischen und den nicht-klassischen Monozyten darstellt, da sie die Expression vieler Oberflächenmarker quantitativ zwischen denen der beiden anderen aufweist (Ancuta et al. 2003; Ziegler-Heitbrock 2007; Ancuta et al. 2009; Cros et al. 2010; Ziegler-Heitbrock et al. 2010; Wong et al. 2011; Zawada et al. 2011). Wong et al. (2011) wiesen diese Zusammenhänge zudem auf transkriptioneller Ebene nach. Bei ihnen wird deutlich, dass sich intermediäre und nicht-klassische Monozyten im Transkriptom ähnlicher sind als beide dem klassischen Subtyp. Berg et al. (2012) konnten aufzeigen, dass eine erhöhte Fraktion klassischer Monozyten das Risiko kardiovaskulärer Krankheiten und Ereignisse unabhängig von klassischen Risikofaktoren vorhersagen kann.

## **1.2.2 Rolle der Monozyten bei Herzinfarkt**

Monozyten und Makrophagen spielen in jeder Phase des Herzinfarktes eine bedeutende Rolle. Sie tragen zur Pathologie bei, sind in den Inflammationsprozess nach der Akutphase involviert und unerlässlich für eine optimale Wundheilung (Shen et al. 2013; Viola und Soehnlein 2015; Shinagawa und Frantz 2015). Ihre genau Funktions- und Interaktionsweise ist jedoch noch weitgehend ungeklärt.

### **1.2.2.1 Kardiale Monozyten vor dem Infarkt (*Steady-state*)**

Bereits im gesunden Myokard stellen ruhende Makrophagen nach Kardiomyozyten, Fibroblasten und Endothelzellen die nächstgrößte Zellentität dar (Pinto et al. 2016). Es ist nicht abschließend geklärt, ob sie stetig durch einwandernde Monozyten aus der Blutbahn erneuert werden oder aus eigenständigen, lokalen Progenitorzellen reprodu-

ziert werden. Man vermutet, dass ihnen im gesunden Herzen eine Wächterfunktion und eine Steuerung des Umsatzes der extrazellulären Matrix zukommt. Zwei Funktionen machen sie im Zusammenhang mit kardiovaskulärer Pathophysiologie besonders interessant: 1. Die Fähigkeit Lipoproteine zu phagozytieren und so zu Schaumzellen zu werden (s. Kapitel 1.2.2.2). Diese sind zentraler Bestandteil der Pathogenese atherosklerotischer Plaques. 2. Ihre heftige Reaktion auf Ischämie und somit wichtige Rolle in der Infarktheilung (Frantz und Nahrendorf 2014).

### **1.2.2.2 Rolle der Monozyten bei Atherosklerose**

Wie bereits in Kapitel 1.1.3 erwähnt, ist die Bildung atherosklerotischer Plaques ein entzündlicher Prozess der Gefäßwand. In diesen Prozess sind verschiedene Immunzellen und Mediatoren verwickelt. So auch Monozyten, die Vorläufer von Gewebsmakrophagen und dendritischen Zellen (s. Abbildung 6).

Durch biomechanische Stimuli, wie z.B. arterielle Hypertonie und Scherstress an den Gefäßwänden durch nicht-linearen Blutstrom, und subendotheliale LDL-Ablagerung kommt es zur Aktivierung der Endothelzellen. Diese sorgen chemotaktisch für eine Rekrutierung und Extravasation von Immunzellen – vor allem von Monozyten –, die durch Phagozytose und Ausschüttung pro- und antiinflammatorischer Mediatoren die Entzündungsreaktion regulieren. Chemokine, bioaktive Lipide und immunstimulierende Moleküle unterhalten hierbei die Akkumulation und Aktivierung von Immunzellen. (Kwak et al. 2014; Bäck et al. 2015). Eingewanderte Monozyten differenzieren zu „klassisch“-aktivierten M1-Makrophagen, „alternativ“-aktivierten M2-Makrophagen und dendritischen Zellen. Sie phagozytieren LDL und lagern Cholesterintröpfchen in ihr Zytoplasma ein. Dieser Vorgang hat keine selbstlimitierende Regulation, sodass die Phagozyten irgendwann apoptotisch zugrunde gehen (Moore und Tabas 2011; Bäck et al. 2015). M1-Makrophagen sind vor allem proinflammatorisch, gewebsschädigend und wundheilungsverzögernd, M2-Makrophagen hingegen antiinflammatorisch durch IL-10 und TGF- $\beta$ -Sekretion tätig. Letztere fördern den Abbau apoptotischer Zellen, genannt Efferozytose, dämpfen die Immunreaktion und fördern die Wundheilung und Gewebereparatur (Gordon und Martinez 2010; Moore und Tabas 2011). Es ist noch nicht abschließend geklärt warum die Inflammation chronifiziert und nicht nach einiger Zeit abklingt. Eine These ist, dass aus Monozyten hervorgehende Makrophagen nach Ein-

wanderung in die Läsion Apolipoprotein-B-bindende Proteoglykane sezernieren, die eine LDL-Akkumulation im Inflammationsgebiet verstärken würden (Williams und Tabas 1995). Im Mausmodell konnte die Atherogenese aufgehalten bzw. verlangsamt werden, indem Chemokine oder deren Rezeptoren – wie CC-Motiv-Chemokinligand (CCL)-2/CC-Motiv-Chemokinrezeptor (CCR)-2 oder CCL-5/CCR-5 – auf Monozyten blockiert wurden (Mestas und Ley 2008). Es zeigten sich keine signifikanten, quantitativen Unterschiede der drei Monozytensubtypen bei Individuen mit und ohne atherosklerotischen Plaques (Berg et al. 2012).

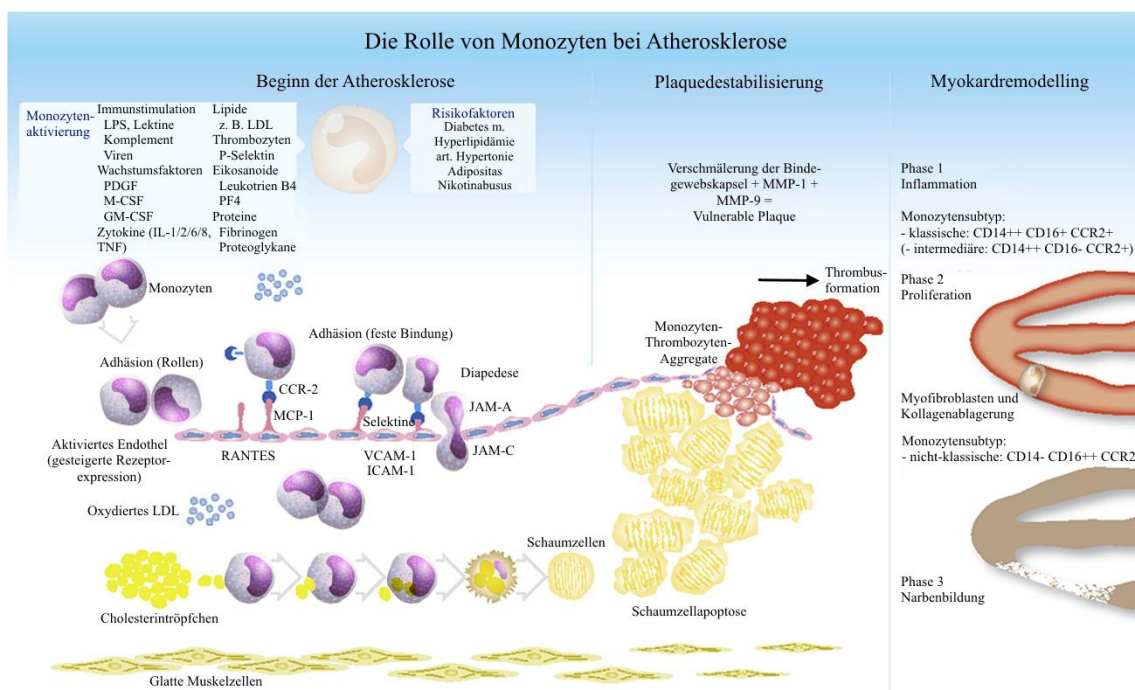


Abbildung 6: Dreifache Rolle der Monozyten in verschiedenen Stadien der Atherosklerose. Linker Abschnitt: Patrouillierende Monozyten in der Blutbahn werden durch unterschiedliche Faktoren aktiviert. Sie migrieren zum aktivierten/beschädigten Endothel, welches MCP (*Monocyte chemoattractant protein*)-1 und Adhäsionsmoleküle (VCAM (= *vascular cell adhesion molecule*)-1, ICAM (= *intercellular adhesion molecule*)-1) auf seiner Oberfläche stark exprimiert. Nach dem „rolling“ und der festen Bindung ans Endothel durchwandern die Monozyten die Endothelschicht (Diapedese). Im subendothelialen Raum differenzieren sie durch M-CSF (*Macrophage colony-stimulating factor*) zu Makrophagen, welche über Scavenger-Rezeptoren – vor allem CD36 – LDL (= *low density lipoprotein*) phagozytieren und zu Schaumzellen werden. Diese werden apoptotisch/nekrotisch und halten somit die Entstehung weiterer lipid-beladener Makrophagen aufrecht. Mittlerer Abschnitt: Vorgänge während eines Akuten Koronarsyndroms mit Plaqueruptur, Verdünnung der fibrösen Kapsel und Bildung von Monozyten-Plättchenaggregaten. Rechter Abschnitt: Kardiale Wundheilung, akut durch die Rekrutierung klassischer Monozyten und später in der Remodeling-Phase mithilfe nicht-klassischer (und evtl. intermediären) Monozyten. Die Extrazellulärmatrix wird durch Myofibroblasteneinlagerung und Angiogenese verändert und die infarzierten Zellen abgebaut. LPS = Lipopolysaccharide; PDGF = *platelet-derived growth factor*; GM-CSF = *granulocyte-*

*macrophage colony-stimulating factor*; TNF = Tumornekrosefaktor; PF = Plättchenfaktor; CCR = CC Chemokinrezeptor; JAM = *junctional adhesion molecule*; MMP = Matrix-Metalloproteinase; RANTES = *regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted* (nach Ghattas et al. 2013).

### 1.2.2.3 Rolle der Monozyten im akuten Infarktgeschehen

Bei einer Inflammation – wie in Kapitel 1.1.6 beschrieben – werden durch Chemotaxis binnen Minuten bis weniger Stunden Monozyten mobilisiert und aus dem Blutstrom ins Infarktgebiet gelenkt, wo sie zu Makrophagen differenzieren. Zu Beginn sind dies vor allem klassische Monozyten mit proinflammatorischer Funktion, die aus dem Milzreservoir und aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks über Zwischenstufen hervorgehen. Über die Aktivierung sympathischer Nervenfasern und humoraler Komponenten wird das Knochenmark zur Bildung neuer Zellen angeregt. Diese werden von dort CCR-2- und aus der Milz Angiotensin-2-vermittelt freigesetzt (Swirski et al. 2009; Dutta et al. 2012; van der Laan, A. M. et al. 2013; Frantz und Nahrendorf 2014). Essentieller Ligand am CCR-2 für die Monozytenrekrutierung und -aktivierung ist das *Monoocyte chemotactic proteine* (MCP)-1 (synonym: CCL-2). Bei Mäusen mit blockiertem MCP-1-Gen zeigte sich eine verlängerte Inflamationszeit gefolgt von abgeschwächter und verzögerter Reparatur (Dewald et al. 2005). Bei der Angiotensin-2-vermittelten Monozytenfreisetzung aus der Milz ist zu bedenken, dass *Angiotensin-converting enzyme* (ACE)-Hemmer und Angiotensinrezeptorblocker somit einen antiinflammatorischen Beitrag zur Infarktheilung leisten könnten (Leuschner et al. 2010; Frantz und Nahrendorf 2014).

Außerdem exprimiert das aktivierte Endothel vermehrt Adhäsionsmoleküle wie Selektine und *vascular cell adhesion molecule* (VCAM)-1 zur gezielten Rekrutierung der Zellen (Lee et al. 2012; Frantz und Nahrendorf 2014). Im Blut und im Infarktgewebe ist die höchste Konzentration klassischer Monozyten nach etwa drei Tagen festzustellen (Nahrendorf et al. 2007; Tsujioka et al. 2009). Die meisten Monozyten proliferieren in dieser frühen Phase zu inflammatorischen M1-Makrophagen und akkumulieren dabei zunächst besonders im Randgebiet des Infarkts; vermutlich, weil hier das Gefäßsystem noch am weitesten intakt ist. Später dringen sie auch in den Kernbereich vor (van der Laan, A. M. et al. 2013). Bei zeitnaher Reperfusion und ausbleibender mikrovaskulärer Obstruktion können sie auch direkt im Infarktkerngebiet auftreten (Ye et al. 2013). Vor



und nach Differenzierung sezernieren sie proinflammatorische Zytokine und MMP. Es wird angenommen, dass die Hauptaufgabe dieser Monozyten die Beseitigung von Gewebstrümmern, nekrotischen Myozyten und apoptotischen Neutrophilen ist, um das Infarktgebiet für die Reparatur vorzubereiten (van der Laan, A. M. et al. 2013).

#### 1.2.2.4 Rolle der Monozyten bei der Infarktheilung

Mit Übergang in die Proliferations- und Reparatursphase nach 4-7 Tagen wandelt sich die Konstellation der Monozytensubtypen und mit ihnen die Funktionsweise der Makrophagen. Die Monozyten- bzw. Makrophagenantwort auf das Infarktgeschehen ist somit biphasisch (s. Abbildung 7). Der Anteil klassischer, CD14-positiver Monozyten fällt von 85 % auf 60 % ab, wogegen nicht-klassische dann 40 % der Monozyten ausmachen (van der Laan, A. M. et al. 2013; Frantz und Nahrendorf 2014). Am fünften postischämischen Tag ist der Gipfel dieser Rekrutierung nicht-klassischer Monozyten (Tsujioka et al. 2009).

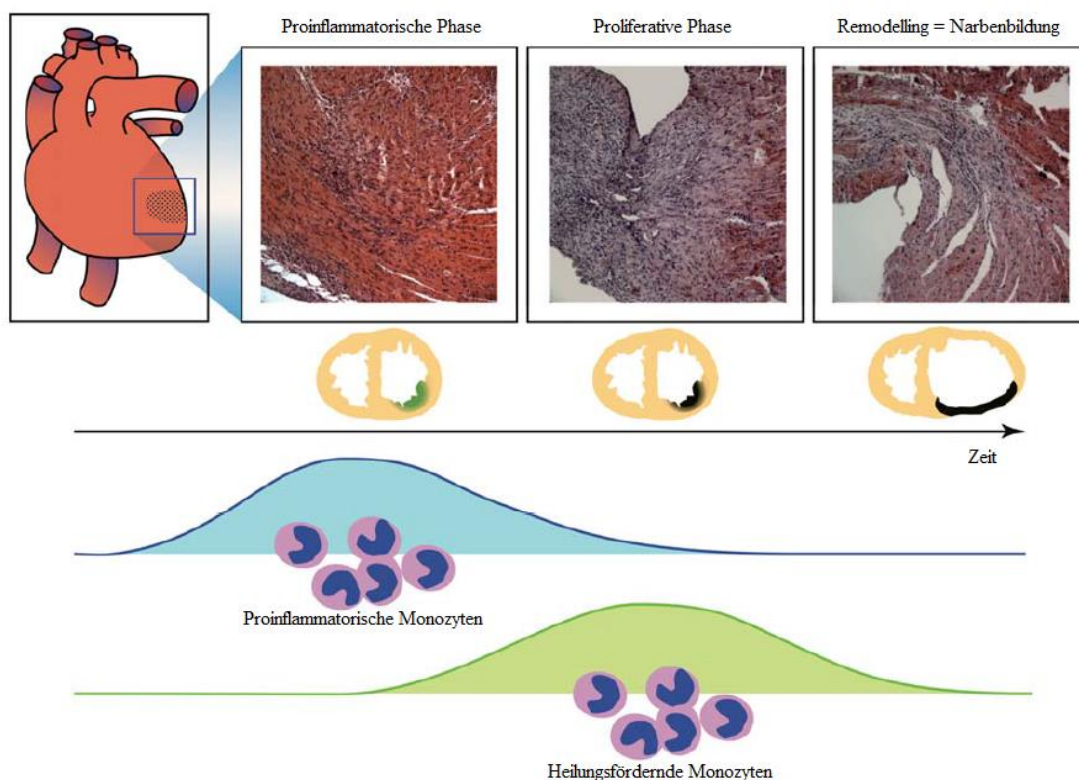


Abbildung 7: Biphasischer Verlauf der Monozyten- und Makrophagenantwort im Verlauf eines akuten Myokardinfarkts (nach Frantz und Nahrendorf 2014)



Jetzt vorherrschende Makrophagen zeigen das Genexpressionsprofil von M2-Makrophagen (Troidl et al. 2009). Dies legt ein Hervorgehen aus nicht-klassischen Monozyten nahe, was jedoch nicht abschließend geklärt ist. Sie regulieren die Gewebsregeneration durch VEGF-Sekretion zur Förderung der Angiogenese und TGF- $\beta$ -Produktion, um Myofibroblasten anzuregen (Nahrendorf et al. 2007). Arslan et al. (2013) berichten über Unterschiede im quantitativen und zeitlichen Auftreten der drei Monozytensubtypen bei STEMI- und NSTEMI-Probanden. Der Spitzenwert klassischer Monozyten war bei STEMI-Patienten höher und trat später auf als bei NSTEMI-Patienten. Gravierendere koronarangiografische Befunde korrelierten positiv mit hohen Maximalwerten an klassischen Monozyten, sodass sie daraus folgerten, dass je größer das nekrotische Areal ist, umso mehr CD16-negative Monozyten rekrutiert werden. Tapp et al. (2013) fanden bei NSTEMI-Probanden außerdem erhöhte Populationen intermediärer Monozyten. Bei Patienten, die allgemein im Verlauf nach einem Infarkt eine Restenose nach Stentimplantation erlitten, haben Liu et al. (2010) gegenüber Patienten mit gleicher Therapie ohne Restenose erhöhte Zahlen CD16-positiver Monozyten festgestellt, was eine Assoziation zwischen intermediären bzw. nicht-klassischen Monozyten und In-Stent-Restenose nahelegen kann.

Auch das nicht-ischämische Myokardgewebe wird im Verlauf reaktiv von Monozyten und Makrophagen infiltriert, allerdings deutlich langsamer als das vom Infarkt betroffene Gewebe. Hier liegt der Höhepunkt am 10. Tag nach Herzinfarkt (Lee et al. 2012). Die genaue Wirkweise dieser Zellen ist noch unklar, eine Assoziation zum kardialen Remodeling jedoch wahrscheinlich (Frantz und Nahrendorf 2014). Wenn die beiden Phasen der Monozyteninvolvierung nicht optimal koordiniert sind (s. Abbildung 7) oder wenn besonders die Inflammationsphase zu lang oder zu kurz ist, sind die Folgen meist schwerwiegend: Es kommt zu kardialer Fibrose bzw. Herzinsuffizienz oder zu instabiler Narbenbildung mit Gefahr eines Ventrikelaneurysmas oder gar einer Ventrikelruptur (Maekawa et al. 2002; Tsujioka et al. 2009; Engstrom et al. 2009).

## 2 Ziele und Fragestellung

Vor knapp 40 Jahren bereits entstand in Großtierversuchen der Verdacht, dass eine frühe Immunzellinfiltration eines Myokardinfarkts zytotoxische Effekte auf gesundes Myokardgewebe habe und den Ischämieschaden ausdehne. Man entwickelte recht simple immunsupprimierende Studien mit dem Ziel, ischämisches Myokard zu schonen. Doch es zeigten sich katastrophale Effekte und man erkannte, wie wichtig es war selektiver vorzugehen und Feinheiten des Postinfarktprozesses aufzudecken (Roberts et al. 1976). Doch warum scheiterten die Ansätze bisher?

Die Komplexität und Spezifität der pathophysiologischen Vorgänge beim ischämischen Herzinfarkt des Menschen ist hoch. Besonders den Einfluss und die Beeinflussbarkeit einzelner beteiligter Immunzellgruppen im Geschehen genauer zu verstehen, ist immer wichtiger geworden. Tiermodelle allein waren bisher nicht ausreichend, eine weiterführende Vorgehensweise aufzuzeigen. Sowohl eine überschießende als auch eine zu geringe Beteiligung z.B. der Monozytensubtypen hat sich als schädlich erwiesen. Man muss versuchen mit klinisch-experimenteller Forschung direkt am Menschen vertiefere Details über die involvierten Mechanismen zu erlangen. Der Ansatz dieser Arbeit ist durch Etablierung eines neuen Verfahrens – des erweiterten Lyoplate™-panels – das Immunphänom humaner Monozytensubpopulationen simultan in derselben Probe nach Subtypen separiert aufzuzeigen und die Hierarchie der sie differenzierenden Marker bei gesunden Probanden darzustellen. Ihre Eigenarten werden beschrieben und die Ergebnisse mit in der Literatur bereits bekannten Merkmalen verglichen.

Anschließend wird diese Methode angewendet, um die detaillierten, immunophänotypischen Charakteristika von Monozytensubtypen bei NSTEMI-Patienten zu untersuchen. Die dabei abweichende Expression einiger Marker wird durch konventionelle Durchflusszytometrie gegen Proben gesunder junger Probanden und älterer Probanden ohne KHK gemessen und validiert.

Dieser Schritt soll ein Beitrag sein, um neue Biomarker oder pharmakologische Ziele aufzeigen zu können, die eine Immunmodulation im Infarktgeschehen nutzen, um das klinische Ergebnis und die Prognose vieler Infarktpatienten zu verbessern.

### 3 Material und Methoden

Im folgenden Abschnitt findet sich eine Auflistung bzw. Ausführung aller bei dieser Arbeit verwendeten Geräte, Lösungen und durchgeführten Methoden zur Probengewinnung, -bearbeitung, -konservierung und -analyse. Lösungen und Puffer, deren Herstellung und genaue Zusammensetzung nicht näher erläutert werden, wurden nach gängigen Laborverfahren zubereitet. In Klammern ist die jeweilige Serien- bzw. Bestellnummer beim Hersteller angegeben.

#### 3.1 Laborzubehör

##### 3.1.1 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung (Katalog-Nr.)</b>	<b>Hersteller</b>
Absaugpumpe	N 035.1.2 AN.18	KNF Neuberger GmbH, Freiburg i.Br.
Autoclav	System VX-95	System GmbH, Wetzberg
Cryo-Einfriergerät	Mr. Frosty™ 1° C Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Deckglässchen	Menzel-Gläser, 10 Deckgläser	Menzel GmbH, Braunschweig
Durchflusszytometer	FACSCanto II Flow Cytometer (V96300611)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Durchflusszytometer	BD FACSVerse Flow Cytometer, Cat.-No: 651155, Z6511550265 (März 2013)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Eismaschine	Scotsman AF10 Flockeneisbereiter (3006 ES1L)	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, IL, USA
Gefrierschrank	GP 2716	Liebherr
Kühlraum	Kühlzelle (472346)	Viessmann Kältetechnik

		AG, Hof/Saale
Mehrkanalpipette	Research Mehrkanal, Okta- pette (3122000.035)	Eppendorf Research AG, Hamburg
Mikroskop	Axiovert 100TV (53205)	Carl Zeiss AG, Oberko- chen
Multipette	Multipette® Plus (4981000.019)	Eppendorf Research AG, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	T734.1	Carl-Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe
Pipette	Research Plus, 10µl (3120000.020)	Eppendorf Research AG, Hamburg
Pipette	Research Plus, 100µl (3120000.046)	Eppendorf Research AG, Hamburg
Pipette	Research Plus, 200µl (3120000.054)	Eppendorf Research AG, Hamburg
Pipette	Research Plus, 1000µl (3120000.062)	Eppendorf Research AG, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetboy acu (155000)	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Sterilisator	T6060 (51015264)	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Vortexer	REAX 2000 / 13162	Heidolph Elektro
Wasserbad	GFL-Wasserbad 1003 (90065)	GFL, Gesellschaft für La- bortechnik mbH, Burgwe- del
Zentrifuge	Centrifuge 5430R (5428ZH208346)	Eppendorf Research AG, Hamburg
Zentrifuge	Centrifuge 5810R (5811ZP061896)	Eppendorf Research AG, Hamburg

Tabelle 1: Geräte

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Produkt</b>	<b>Bezeichnung (Katalog-Nr.)</b>	<b>Hersteller</b>
96-Well-Platten	Falcon 96-Well Microplates, Round Bottom, No Lid (353910)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Cell Preparation Tubes	BD Vacutainer® CPT™ System, 8 ml mit Natriumcitrat (362782)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Cell Strainer	70µm Poren (352350)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
CPT Adapter	Multiple Sample Luer Adapter (367300)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
CPT Einmalhalter	BD Vacutainer® Einmalhalter aus Kunststoff, weiß (364815)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Entsorgungsbehälter für Kanülen	Multi-Safe twin 700 (77.3894.007)	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
FACS-Röhrchen	BD Falcon, 5ml, Polystyrene, Round Bottom Tube (352058)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FACS-Röhrchen	BD Trucount Tubes (340334)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Blutentnahmekanülen	Safety-Multifly-Set (85.1638.235)	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Blutentnahmesystem	S-Monovette mit EDTA (11.605.001)	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Einfrierröhrchen	Cryo.s, PP, 2ml steril (122277)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Einmalpipetten	Pipette mit Spitze, 5ml (606180)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Einmalpipetten	Pipette mit Spitze, 10ml	Greiner Bio-One GmbH,

	(607180)	Frickenhausen
Einmalpipetten	Pipette mit Spitze, 25ml (760180)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Einmalpipetten	Pipette mit Spitze, 50ml (768180)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Membran-Adapter	Membran-Adapter zur Blutentnahme (14.1112)	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Multipetteneinsätze	Combitips Plus, 2,5ml (0030069.447)	Eppendorf Research AG, Hamburg
Multipetteneinsätze	Combitips Plus, 5ml (0030069.455)	Eppendorf Research AG, Hamburg
Parafilm	Parafilm "M"® (701501)	Brand GmbH + CO KG, Wertheim
Pasteurpipetten	Pasteurpipetten (4522)	Carl-Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe
Pipettenspitzen	epT.I.P.S. Reloads (0030073.428)	Eppendorf Research AG, Hamburg
Pipettenspitzen	MultiGuard, 50-1250ml (34000)	Sorenson BioScience Inc., Salt Lake City, UT, USA
Pipettenspitzen	SafeGuard, 1-100µl (811012)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pipettenspitzen	SafeSeal, 10µl (770020)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Plattenabdichter	Polyester Microplate Seal- ing Tape (3095)	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Reaktionsgefäße	Safe-Lock Tubes 1,5 ml (30120.086)	Eppendorf Research AG, Hamburg
Reaktionsgefäße	Safe-Lock Tubes 2,0 ml (30120.094)	Eppendorf Research AG, Hamburg
Zellzähler	LUNA-FL™ Automated Fluorescence Cell Counter (L20001)	Logos Biosystems, Annan- dale, VA, USA
Zellzähler Objektträger	LUNA™ Cell Counting	Logos Biosystems, Annan-

	Slides, 50 Slides (L12001)	dale, VA, USA
Zentrifugenröhrchen	PP-Röhrchen, 15ml (188271)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen	PP-Röhrchen, 50ml (227261)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

### 3.1.3 Lösungen, Puffer und sonstige Reagenzien

Produkt (Katalog-Nr.)	Hersteller
Acridine Orange/Propidium Iodide Stain (F23001)	Logos Biosystems, Annandale, VA, USA
Aqua B. Braun (0082423E)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
BD FACS Clean Solution 51 (340345)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
BD Pharm Lyse (555899)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
BD FACS Rinse Solution 51 (340346)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
BD FACS Sheath Solution (336911)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Cell Staining Buffer (420201)	BioLegend, San Diego, CA, USA
Dextran, from Leuconostoc spp. (31392-50g)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DMSO (D2650)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dulbecco's PBS (10x) (PL-21-L)	c.c.pro GmbH, Oberdorla
Ethanol (K928.4)	Carl-Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe
Histopaque® 1077, 500ml (10771)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Human TruStain FcX™ (Fc Receptor Blocking Solution) (422302)	BioLegend, San Diego, CA, USA
Humanes Serumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
NaCl 0,9 % (3570160)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Penicillin-Streptomycin (Z-13-M)	c.c.pro GmbH, Oberdorla
ROTIPURAN® 2-Propanol (6752.2)	Carl-Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe
Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640 (FM-16-L)	c.c.pro GmbH, Oberdorla
Trypan Blue solution 0,4 % (T8154)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Ultra Pure 0,5M EDTA (15575-020)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
----------------------------------	----------------------------

Tabelle 3: Lösungen, Puffer und sonstige Reagenzien

### 3.1.4 Antikörper und Beads

Antikörper (Katalog-Nr.)	Klon	Hersteller
Alexa Fluor488 Anti-Human CD14 (301811)	M5E2 (Maus IgG <sub>2a</sub> , κ)	BioLegend, San Diego, CA, USA
Alexa Fluor647 Anti-Human CD11b (301319)	ICRF44 (Maus IgG <sub>1</sub> , κ)	BioLegend, San Diego, CA, USA
Alexa Fluor647 Goat Anti-Mouse IgG Secondary Antibody (A-21235)	Polyklonaler Antikörper	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Alexa Fluor647 Goat Anti-Mouse IgM Heavy Chain Secondary Antibody (A-21238)	Polyklonaler Antikörper	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Alexa Fluor647 Goat Anti-Rat IgG Secondary Antibody (A-21247)	Polyklonaler Antikörper	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Alexa Fluor700 Anti-Human CD11b (557918)	ICRF44 (Maus IgG <sub>1</sub> , κ)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Cytometer Setup & Tracking Research Beads (655050)	-	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain Kit (L34957)	-	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Lyoplate™ Human Cell Surface Marker Screening Panel (560747)	Details siehe BD Biosciences 2011	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Pacific Blue Anti-Human CD16 (302032)	3G8 (Maus IgG <sub>1</sub> , κ)	BioLegend, San Diego, CA, USA



PerCP/Cy5.5 Anti-Human CD66b (305108)	G10F5 (Maus IgM, κ)	BioLegend, San Diego, CA, USA
Purified Mouse Anti-Human CD15/SSEA-1 (125602)	MC-480 (Maus IgM, κ)	BioLegend, San Diego, CA, USA
Purified Mouse Anti-Human CD31 (303101)	WM59 (Maus IgG <sub>1</sub> , κ)	BioLegend, San Diego, CA, USA
Purified Mouse Anti-Human CD35 (333402)	E11 (Maus IgG <sub>1</sub> , κ)	BioLegend, San Diego, CA, USA
Purified Mouse Anti-Human CD45RA (304102)	HI100 (Maus IgG <sub>2b</sub> , κ)	BioLegend, San Diego, CA, USA
Purified Mouse Anti-Human CD91 (550495)	A2MR-α2 (Maus IgG <sub>1</sub> , κ)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Purified Mouse Anti-Human CD105 (555690)	266 (Maus IgG <sub>1</sub> , κ)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Purified Mouse Anti-Human CD123 (555642)	9F5 (Maus IgG <sub>1</sub> , κ)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Purified Mouse Anti-Human CD128b/CD182 (555932)	6C6 (Mouse IgG <sub>1</sub> , λ)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Purified Mouse Anti-Human CD163 (333602)	GHI/61 (Maus IgG <sub>1</sub> , κ)	BioLegend, San Diego, CA, USA
Purified Mouse Anti-Human CD181 (555937)	5A12 (Maus IgG <sub>2b</sub> , κ)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Purified Mouse Anti-Human CD195 (555991)	2D7/CCR5 (Maus IgG <sub>2a</sub> , κ)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Purified Rat Anti-Human CD294 (350102)	BM16 (Ratte IgG <sub>2a</sub> , κ)	BioLegend, San Diego, CA, USA
Purified Mouse Anti-Human CD305/LAIR-1 (550810)	DX26 (Maus IgG <sub>1</sub> , κ)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Purified Mouse Anti-Human BLTR-1	202/7B1 (Maus IgG <sub>2a</sub> , κ)	Bio-Rad AbD Serotec Limited, Kidlington, Oxford-

(MCA2108GA)		shire, UK
Purified Mouse Anti-Human CMRF-56 (551534)	CMRF-56 (Maus IgG <sub>1</sub> , κ)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Purified Mouse Anti-Human HLA-DQ (361502)	Tü169 (Maus IgG <sub>2a</sub> , κ)	BioLegend, San Diego, CA, USA
Purified Mouse IgG1 κ Iso-type Control (554121)	MOPC-21	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Purified Mouse IgG2a, κ Isotype Control (555571)	G155-178	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Purified Mouse IgG2b κ Isotype Control (555740)	27-35	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Purified Mouse IgM, κ Iso-type Control (555581)	G155-228	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Purified Rat IgG2a, κ Iso-type Control (555841)	R35-95	BD Biosciences, San Jose, CA, USA

Tabelle 4: Antikörper und Beads

### 3.1.5 EDV-Programme

Produkt	Herausgeber
BD FACSDiva™ software (Version 6.3.1)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
BD FACSuite™ software (Version 1.0.6)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Bioconductor edgeR Software (Version 3.14.0)	Bioconductor Open Source Software ( <a href="http://bioconductor.org/packages/edgeR/">http://bioconductor.org/packages/edgeR/</a> )
FlowJo software (Version 7.6.1)	FlowJo, LLC, Ashland, OR, USA
GraphPad Prism (Version 5)	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
Microsoft Excel™ 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA

Tabelle 5: EDV-Programme

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Ethikerklärung**

Diese Studie wurde genehmigt von der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität Gießen (Ethikkommission des Fachbereichs Medizin, Aktenzeichen des Ethikantrags: 145/11, s. Kapitel 15 Anhang). Die Zustimmung wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki erteilt. Ein schriftliches Einverständnis wurde von jedem Teilnehmer an dieser Studie eingeholt.

### **3.2.2 Patientenkollektiv**

In die Lyoplate™-Versuche dieser Studie wurden sechs männliche Patienten mit klinisch, instrumentell und laborchemisch diagnostiziertem NSTEMI eingeschlossen, die mit medikamentöser Standardtherapie und nach der ersten Blutentnahme mit einer nicht notfallmäßigen PCI therapiert wurden. Sie waren im Mittel 66 Jahre alt (Varianz: 57-84 Jahre) und wurden in der Kerckhoff-Klinik in Bad Nauheim akquiriert.

Als gesunde Kontrollen wurden elf männliche Probanden mit einem mittleren Alter von 27 Jahren (Varianz: 25-32 Jahre) ausgewählt, die an keinem akuten oder chronischen Krankheitszustand litten und sich subjektiv gesund fühlten.

Für beide Kollektive galten prinzipiell dieselben Ausschlusskriterien. Bei überschaubarem Probandenkollektiv wurden ausschließlich männliche Probanden ausgewählt, um zyklusabhängige Einflüsse auf die Ergebnisse zu vermeiden. Außerdem galt es, das Risiko für den Einfluss anderer inflammatorischer Zustände und Pathologien auf das Aktivierungsmuster der Monozyten soweit wie möglich auszuschließen. Dies erfolgte anhand folgend definierter Ausschlusskriterien:

- Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises
- Andere chronisch-entzündliche Erkrankungen
- Bekannte neoplastische Erkrankung
- Autoimmunerkrankungen
- chronische und akute Infektionen

Im Rahmen der Validierungsversuche wurde elf NSTEMI Patienten (mittleres Alter 78 Jahre, Varianz: 47-82 Jahre) und zwölf gesunden, freiwilligen Probanden (mittleres Al-

ter 27 Jahre, Varianz: 23-36 Jahre) nach Überprüfung der gleichen Ausschlusskriterien etwa 25 ml venöses Blut in BD Vacutainer® Cell Preparation Tubes (CPT™) abgenommen. Um aufzuzeigen, ob der Altersunterschied der Kohorten einen Einfluss auf die Ergebnisse haben könnte, wurden zusätzlich neun Probanden ähnlichen Alters wie die Infarktpatienten (mittleres Alter 65 Jahre, Varianz: 54-94 Jahre) ebenfalls nach Prüfung der Ausschlusskriterien in die Versuche eingeschlossen, bei denen sich in der Koronarangiographie kein Nachweis einer KHK ergab.

### **3.2.3 Probengewinnung und Aufklärung der Probanden**

Für die Fragestellung dieser Arbeit war es entscheidend, Vollblut von kardiologischen Patienten zum nächstmöglichen Zeitpunkt des Infarktgeschehens (Baseline) und einen Tag nach Intervention (Tag 1) für den Verlauf zu gewinnen. Um dies zu gewährleisten, war eine enge zeitliche und räumliche Anbindung von Klinik und Labor vonnöten, die durch die direkte Nachbarschaft der Kerckhoff-Klinik und des Franz-Groedel-Instituts gegeben war. Patienten mit einem NSTEMI wurden in die Klinik eingeliefert und nach genügender diagnostischer Absicherung in das Herzkatheterlabor zur nicht notfallmäßigen PCI verlegt. Bei koronarangiografisch untersuchten Patienten zum elektiven Abschluss einer KHK wurden die Blutproben für die Studie ebenfalls vor der Intervention nach gleichem Schema (s. u.) venös entnommen.

Patienten, die sich zur Teilnahme an der Studie bereitklärten, erhielten grundlegende und ausführliche Informationen über Konzept, Sinn und Durchführung dieser Arbeit und wurden über Risiken und Komplikationen von hierfür nötigen Untersuchungen und Eingriffen aufgeklärt. Zudem wurde ihnen das Vorgehen zum Schutz ihrer personenbezogenen Daten und ihr auch nach Einwilligung fortbestehendes Recht, die Teilnahme an der Studie jederzeit unbegründet zu widerrufen, explizit erläutert. Das Besprochene wurde ihnen anschließend in schriftlicher Form mitgegeben und ihr Einverständnis mit- samt Ort, Datum und Unterschrift darunter dokumentiert.

Die erste Blutprobe wurde den Patienten, die mit NSTEMI in die Kerckhoff-Klinik eingeliefert wurden, noch vor dem Herzkatheter während der Diagnostik per Venenpunktion mit einer Safety-Multifly®-Kanüle am Patientenbett in CPT™ entnommen. Die von

der Ethikkommission bewilligten 60 ml Blut wurden zügig in den Laborbereich transportiert, um eine nachträgliche Aktivierung der Immunzellen zu verhindern.

Die zweite Blutprobenentnahme der Patienten, bei denen auch in der Koronarangiografie ein NSTEMI nachgewiesen wurde, erfolgte einen Tag nach der PCI mit erfolgreicher Reperfusion des Myokards wieder als standardmäßige Venenpunktion in CPT™ mit von der Ethikkommission ebenfalls genehmigten 60 ml Blut.

Zur Gewinnung von Kontrollproben wurde jungen, männlichen Probanden, bei denen – wie oben näher erläutert – keine chronischen oder akuten Erkrankungen vorlagen, per Venenpunktion mit Safety-Multifly®-Kanüle 60 ml Vollblut in CPT™ abgenommen. Zuvor wurden sie über Hintergründe der Studie und die Verwendung ihres Blutes aufgeklärt und dann über Vorgang und Risiken einer Venenpunktion informiert. Des Weiteren galten für sie dieselben Rechte wie für alle anderen oben beschriebenen Probanden, was die Verwendung ihrer Daten und die Rücknahme ihrer Einwilligung betraf.

### **3.2.4 Kontinuität eines sterilen Arbeitsumfeldes**

Einige Minuten vor jedem Arbeitsbeginn an der Sicherheitswerkbank wurde der Abzug eingeschaltet und das Arbeitsfenster bis zur vorgegebenen Maximalstellung geöffnet. Es wurden Einmalhandschuhe aus Nitril angelegt und diese mit 80 %-iger Ethanollösung desinfiziert. Anschließend wurde die Sicherheitswerkbank (Arbeitsflächen, Pipetten, Ständer, usw.) mit selbiger Ethanollösung desinfizierend gereinigt. Danach blieb sie bei eingeschaltetem Abzug für 30 min unbenutzt, um das Arbeitsumfeld bei Beginn der Probenverarbeitung so steril wie möglich zu haben. Bei den Arbeitsschritten wurde im sterilen Raum der Sicherheitswerkbank möglichst vorsichtig und mit regelmäßig desinfizierten Handschuhen gearbeitet.

### **3.2.5 Probenbearbeitung und Konservierung**

#### **3.2.5.1 Zellauftrennung per Dichtegradientenzentrifugation**

Für die hier beschriebene Arbeit wurden die Monozyten als Teil der *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) gelagert und weiterhin untersucht. Die Isolation und Kon-

servierung von PBMC erfolgte aus humanem Vollblut. Die blutgefüllten CPT™ wurden im Labor sofort für 20 min in die Zentrifuge bei 22° C und 1650 g gestellt (s. Abbildung 8).

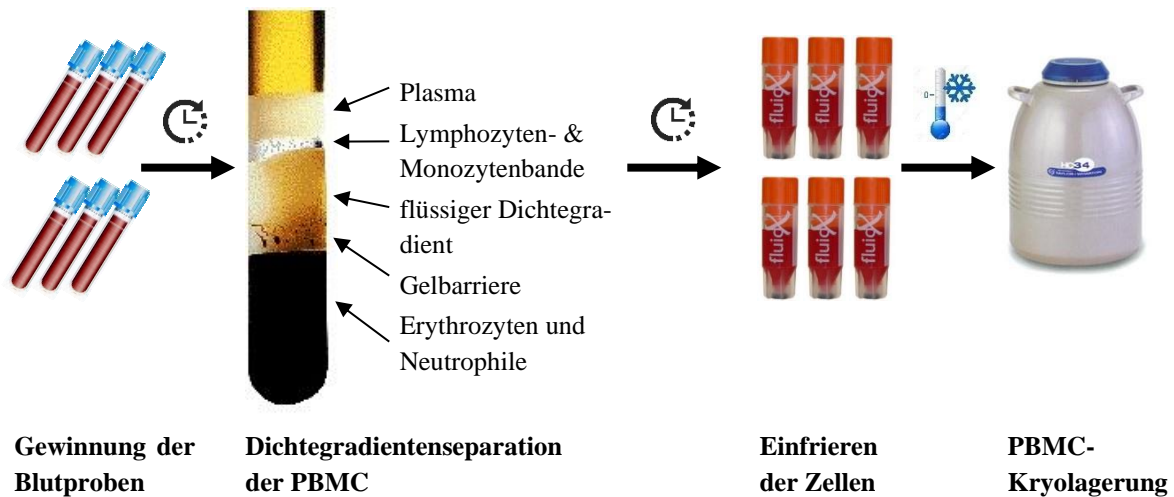


Abbildung 8: Probengewinnung, Verarbeitung und Konservierung

### 3.2.5.2 Isolation der PBMC

Nach der Zentrifugierung wurde das oben befindliche Plasma mit den PBMC und Thrombozyten durch mehrfaches vorsichtiges Invertieren des CPT™ vermischt und das Zell-Plasmagemisch in 50 ml Zentrifugenröhrchen umgefüllt und mit dem doppelten Volumen sterilem *Phosphate buffered saline* (PBS) (1/10 10fach Dulbecco's PBS™ in destilliertem Wasser, Aqua B. Braun™) aufgefüllt. Nach behutsamer Durchmischung wurden die Zellen in der Zentrifuge bei 4° C und 300 g für 10 min vom Plasma und den Thrombozyten getrennt.

Der Plasma-PBS-Thrombozytenüberstand wurde abgesaugt und verworfen, das Zellpellet am Konusboden in 10 ml PBS resuspendiert.

### 3.2.5.3 Bestimmung der Zellzahl

In einem 1,5 ml Safe-Lock-Reaktionsgefäß wurden 90 µl Trypanblau abgefüllt, zu denen 10 µl der Zellsuspension gegeben wurden. Die Zellen wurden gut mit dem Trypanblau vermischt. 10 µl davon wurden auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen und die vitalen Zellen unter dem Mikroskop in den Quadranten ausgezählt. Tote (dunkelblaue und verformte) Zellen wurden nicht mitgezählt.

Formel zur Bestimmung der Zellzahl:

$(\text{Mittelwert der Zellzahl von 3 Großquadranten} / 10) * \text{Volumen [ml]} = \text{Zellzahl} [*10^6]$

Bei den Screening- und Validierungsversuchen wurde der *LUNA-FL™ Automated Fluorescence Cell Counter* für die einheitliche Zellzählung eingesetzt. 18 µl der Zellsuspension wurden in einem 1,5 ml Safe-Lock-Reaktionsgefäß mit 2 µl der Acridinorange/Propidiumiodid Fluoreszenzfarbstofflösung vermischt. Anschließend konnten 10-12 µl der gefärbten Zellsuspension in die Kammer einer *LUNA™ Cell Counting Slide* gegeben werden. Diese wurde in das Zellzählgerät eingeführt, der Fokus des Bildes auf die Zellen eingestellt und die Zellen dann automatisch ausgezählt. Tote Zellen wurden nicht mitgezählt. Um Artefakte auszuschließen, wurde das Bild manuell auf fälschlich mitgezählte Objekte hin überprüft, die gewonnenen Daten dann gespeichert und der Objektträger nach der Zählung verworfen.

#### **3.2.5.4 Aufteilung und Kryokonservierung der Proben**

Als Waschschrift wurden die Zellen anschließend bei 4° C und 300 g für 10 min abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und verworfen. Während der Zentrifugation wurde das Einfriermedium in einem Zentrifugenröhrchen vorbereitet – 100 µl Einfriermedium pro 1.000.000 Zellen. Es wurde zusammengesetzt aus Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI)/Kälberserum/Streptomycin-Medium (5:1:1) und Dimethylsulfoxid (DMSO) im Verhältnis 9:1. Das DMSO wurde erst direkt vor Verwendung unter das Medium gemischt.

Mit einem Milliliter des bereiteten Einfriermediums wurde das Zellpellet gelöst und mit dem restlichen Einfriermedium vermischt.

Zum Einfrieren wurde die Zell/Mediumsuspension in 2 ml Einfriereröhrchen aliquotiert (1 ml, bzw. 0,5 ml pro Tube), beschriftet in einem Mr. Frosty™ -Einfriergerät gelagert und darin in einen -80° C-Gefrierschrank gestellt. So war ein langsames (1° C / min) und zellschonendes Einfrieren über 24 h hinweg auf -80° C garantiert. Sobald -80° C erreicht waren, wurden die Proben in flüssigem Stickstoff bis zum Gebrauch gelagert (s. Abbildung 8).

### 3.2.6 Durchflusszytometrische Methoden

#### 3.2.6.1 Vitalitätskontrolle der Proben

Die Untersuchung des Oberflächenproteoms der Monozyten sollte an vitalen Zellen stattfinden. Zur Kontrolle wie viele kryokonservierte Zellen nach dem Einfrieren, der Lagerung in Flüssigstickstoff und dem Auftauen noch in genügender Zahl vital sind, wurde die Probe eines Testprobanden in ihrem 2 ml Cryo.s™ unter Schwenken binnen 5 min in einem auf 37° C temperierten Wasserbad aufgetaut bis sich das Medium vollständig verflüssigt hatte. Anschließend wurde die Probe in ein steriles BD Falcon™-Tube umgefüllt und mit 2ml PBS verdünnt. Die Zellen wurden bei 4° C und 350 g für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Zählen wurde das Zellpellet in 2 ml PBS resuspendiert. Auf gleiche Weise, wie in 3.2.2 beschrieben, wurde die Zellzahl der Probe bestimmt. Anschließend wurde die Probe zum Waschen mit PBS verdünnt und erneut bei 4° C und 350 g 5 min lang zentrifugiert.

Unterdessen wurde gemäß Vorgaben des Herstellers ein *LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain Kit* für die spätere Färbung vorbereitet.

Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen der Probe so in PBS resuspendiert, dass sich 1.000.000 Zellen in 100 µl befanden. 100 µl wurden als ungefärbte Kontrolle in ein neues BD-Falcon™-Tube gefüllt. Die übrigen Zellen wurden mit 5 µl Alexa Fluor647 anti-human CD11b, 5 µl Alexa Fluor488 anti-human CD14 und 5 µl Pacific Blue anti-human CD16 versetzt, leicht mit dem Vortexer gemischt und 30 min lang bei 4° C inkubiert.

Zum Beenden des Färbevorgangs wurde die Probe mit 1 ml PBS verdünnt und wie gehabt zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 300 µl PBS resuspendiert. 1 µl des *LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain Kit* wurden hinzugefügt und mit vorsichtigem Schnippen mit dem Finger gegen das *fluorescence-activated cell sorting* (FACS)-Röhrchen mit der Zelllösung vermischt. Nach 20-minütiger Inkubation bei 4° C wurde die Probe mit 1 ml PBS verdünnt, wie bisher zentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes in 300 µl PBS resuspendiert. Auch die ungefärbte Kontrollprobe wurde auf gleiches Volumen gebracht und beides im Durchflusszytometer gemessen (s. Abbildung 9).



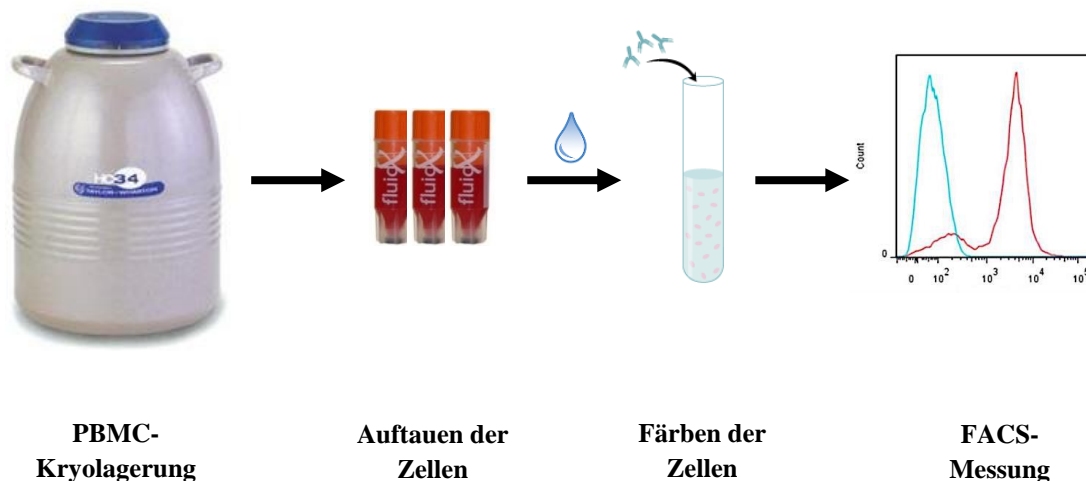


Abbildung 9: Auftauen, Färben und Messen der Proben

### 3.2.6.2 Lyoplate™ Human Cell Surface Marker Screening Panel

Jedes Lyoplate™ Screening Panel der Becton Dickinson GmbH besteht aus drei 96-Well-Platten mit insgesamt 242 aufgereinigten, monoklonalen Immunglobulinen (Ig) gegen wesentliche Oberflächenantigene von Immunzellen und Maus- und Ratten-Isotypkontrollen (Ms IgM, Ms IgG1, Ms IgG2a, Ms IgG 2b, Ms IgG3, Rt IgM, Rt IgG1, Rt IgG2a, Rt IgG2b, Rt IgG3), um die Isotyp-spezifischen Hintergrundsignale bei der Messung zu ermitteln. Jedes Well enthält 2,75 µg des lyophilisierten Antikörpers, was für 6 Tests reicht (ca. 0,4 µg pro Test). Zum Kit gehören außerdem Alexa Fluor 647-konjugierte Ziege anti-Maus IgG und Ziege anti-Ratte IgG Sekundärantikörper, die an den Fc-Teil der Primärantikörper binden und sie so im Durchflusszytometer detektierbar machen (BD Biosciences 2011).

### 3.2.6.3 Lyoplate™-Versuche: Vorbereitung

Das *Lyoplate™ Human Cell Surface Marker Screening Panel* (Becton Dickinson GmbH) diente als Grundlage für die Versuche. Für die spezifische Untersuchung der Monozyten wurde das Herstellerprotokoll so abgewandelt, dass das Oberflächenmarker-expressionsprofil der Monozytensubtypen getrennt voneinander analysiert werden konnte.

Kurz vor Versuchsbeginn wurden die Primärantikörper rekonstituiert. Hierzu wurden die Platten kurz bei 300 g für 10 min zentrifugiert und die Versiegelungsfolien sehr vorsichtig abgezogen. Mithilfe einer Mehrkanalpipette wurden die Antikörperpellets mit 160 µl sterilem PBS pro Well aufgelöst. Für jede Plattenreihe wurden neue Pipettenspitzen verwendet. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten mit Folie und die Ränder gegen Evaporation mit Parafilm "M"® versiegelt und von jetzt an für maximal 14 Tage bei 4° C im Kühlraum gelagert.

Der konzentrierte Sekundärantikörper wurde 1:200 verdünnt. 130 µl des Ziege anti-Maus Antikörpers wurden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen in 26 ml einer Lösung aus *Cell Staining Buffer* + 5 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) verdünnt. Auf gleiche Weise wurden 15 µl des Ziege anti-Ratte Antikörpers mit derselben Lösung in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen verdünnt.

Zur Differenzierung der Monozytensubtypen wurde ein Antikörpermisch aus Anti-CD14- und Anti-CD16-Antikörpern vorbereitet, sodass in jedes zu färbende Well jeweils 3 µl Anti-CD14- und Anti-CD16-Antikörper hinzugefügt werden konnten. Hierzu wurden 900 µl Alexa Fluor488 anti-human CD14 und 900 µl Pacific Blue anti-human CD16 in 28,2 ml *Cell Staining Buffer* + 5 mM EDTA Lösung gegeben (folgend Anti-CD14/16-Mastermix).

Um tote Zellen nach der Messung identifizieren zu können wurde wie in Kapitel 3.2.6.1 beschrieben das *LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain Kit* von Invitrogen eingesetzt. Es wurden drei Röhrchen eines Kits in je 50 µl DMSO gelöst. Diese wurden zusammen in 30 ml PBS gegeben. Die Verdünnung entsprach somit ungefähr 1:200.

#### **3.2.6.4 Lyoplate™-Versuche: Durchführung**

Um ausreichend vitale Zellen für das Lyoplate™-Screening zur Verfügung zu haben, wurden 150-160 x 10<sup>6</sup> eingefrorene PBMC eines jeden Probanden verwendet. Sofort nach Entnahme aus dem Gefrierschrank wurden die Zellen binnen 5 min unter vorsichtigem Schwenken im 37° C warmen Wasserbad aufgetaut (s. Abbildung 9).

Um die Zellen von dem Einfriermedium zu trennen, wurde der Inhalt der Kryotubes zunächst durch einen *Cell Strainer* mit 70 µm Porengröße in ein 50 ml Zentrifugenröhr-

chen überführt. Damit keine Zellen verloren gingen, wurden die 2 ml Cryo.s™ mit je 1 ml *Cell Staining Buffer* – mit 5 mM EDTA versetzt – ausgespült und ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen hinzugefügt. Das EDTA dient in der Mischung dazu, Zell-Zell-Interaktionen zu verhindern und so dem Entstehen von Zelldoubletten vorzubeugen. Das Gemisch wurde bei 4° C und 300 g 10 min lang zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und verworfen.

Zum Zählen wurden die Zellen in 10 ml *Cell Staining Buffer* + 5 mM EDTA resuspendiert. Das Zählverfahren erfolgte mit dem *LUNA™ Automated Cell Counter*. Im Anschluss wurde die Probe erneut bei 4° C und 300 g für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Für die Färbung und Messung mit den Lyoplate™-Antikörpern auf 96-Well-Rundbodenplatten wählten wir eine Anzahl von mindestens 500.000 Zellen pro Well. Die Zellen wurden in einer entsprechenden Menge *Cell Staining Buffer* + 5 mM EDTA resuspendiert, sodass in 100 µl Zell-*Cell Staining Buffer*-Lösung mindestens 500.000 Zellen enthalten waren. Anschließend wurden, dem Plattenbelegungsplan des *Lyoplate™ Human Cell Surface Marker Screening Panel* entsprechend, jeweils 100 µl in die Wells von drei sterilen 96-Well-Roundbottomplatten gegeben. Um ungewollte Antikörperbindungen an freie *fragment crystallizable* (Fc)-Rezeptoren zu verhindern, wurden an dieser Stelle 3 µl *TruStain FcX™ Fc Receptor Blocking Solution* in jedes Well hinzugegeben. Die Inkubation dieses Vorgangs dauerte bei Raumtemperatur 20 min lang.

Als ersten Schritt der Färbungsreaktion wurden die Primärantikörper des Lyoplate™ Kits zu den Zellen gemischt. Hierzu wurden pro Well 20 µl der gelösten Antikörper mit der Mehrkanalpipette von den Antikörperplatten des Kits auf die Probenplatten pipettiert. Durch behutsames Aufziehen und Ablassen in die Pipettenspitze wurde für eine ausreichende Mischung mit der Zellsuspension gesorgt. Für jede Reihe der Platte wurden neue Pipettenspitzen verwendet. Die Platten wurden mit Folie versiegelt und bei 4° C 20 min lang inkubiert.

Nach Entfernen der Versiegelungsfolie konnten die Wells zum Waschen mit 100 µl *Cell Staining Buffer* + 5 mM EDTA aufgefüllt werden. Dann wurden die Platten mit Versiegelungsfolie versehen und bei 4° C und 500 g für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Waschbecken abgeschüttet und überschüssige Flüssigkeit aus den Platten auf Papiertüchern vorsichtig abgetupft. Die Platten mit Versiegelungsfolie zu versehen,

die Zentrifugation bei 4° C und 500 g für 7 min und das Abkippen und Abtupfen des Überstandes werden zusammengefasst im Folgenden nur noch als „Waschschritt“ bezeichnet.

Mit der Mehrkanalpipette und neuen Pipettenspitzen in jeder Plattenreihe wurden 200 µl *Cell Staining Buffer* + 5 mM EDTA in jedes Well gegeben und die Zellen darin resuspendiert. Es folgte ein Waschschritt (s.o.).

Nun wurde der Sekundärantikörper gemäß dem Plattenbelegungsplan des Lyoplate™ Kits zu den Zellen gegeben. Dazu wurde der verdünnte Sekundärantikörper wie vorgesehen in neue, sterile 96-Well-Roundbottomplatten gegeben und mithilfe der Mehrkanalpipette 100 µl je Well daraus auf die Probenplatten übertragen. Sekundärantikörper sind Fluorochrom-gekoppelt, binden an die Fc-Region des Primärantikörpers und markieren diese so zu gleichen Teilen. Die Inkubation fand bei 4° C im dunklen Kühlraum für 20 min statt.

Im Anschluss wurden mit der Mehrkanalpipette 100 µl *Cell Staining Buffer* + 5 mM EDTA in jedes Well gegeben und ein Waschschritt (s.o.) eingelegt. Zusätzlich wurden die Zellen danach in 200 µl *Cell Staining Buffer* + 5 mM EDTA resuspendiert und in einem weiteren Waschschritt (s.o.) von Rückständen der Antikörperlösung gereinigt.

Jetzt konnten die Zellen mit dem Anti-CD14/16-Mastermix (s.o.) inkubiert werden. 100 µl wurden hiervon in jedes Well der Probenplatte pipettiert und die Zellen darin resuspendiert. Die Inkubation dauerte bei 4° C im dunklen Kühlraum 20 min lang.

Anschließend wurden mit der Mehrkanalpipette 100 µl *Cell Staining Buffer* + 5 mM EDTA pro Well hinzugegeben und zwei Waschschriffe durchgeführt – der zweite nach Resuspendierung in 200 µl *Cell Staining Buffer* + 5 mM EDTA. Daraufhin wurden die Zellen in 100 µl des verdünnten *LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain Kit* resuspendiert, die Platten mit Versiegelungsfolie versehen und 20 min lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Zum Schluss wurden 100 µl *Cell Staining Buffer* + 5 mM EDTA mit der Mehrkanalpipette in jedes Well gegeben und ein letzter Waschschritt (s.o.) durchgeführt. Danach wurden die Zellen in 150 µl der *Cell Staining Buffer* + 5 mM EDTA Lösung pro Well mit der Mehrkanalpipette resuspendiert und waren bereit für die Messung im Durch-

flusszytometer, beziehungsweise wurden bei 4° C im dunklen Kühlraum gelagert, bis sie mit dem *BD FACSVerser Flow Cytometer* gemessen werden konnten.

### 3.2.6.5 Validierungsversuche

Im Wesentlichen entspricht das Zellfärbeverfahren der Validierungsversuche demjenigen der Lyoplate™-Versuche. Es wurden lediglich die einzelnen Antikörper zu den jeweiligen zu testenden Antigenen anstelle der Lyoplate™-Antikörper verwendet. Diese lagen nicht lyophilisiert, sondern gelöst vor.

Für die sich an die Hauptversuche anschließenden Validierungsversuche wurden Proben von fünf jungen, gesunden, männlichen Probanden zur Verifizierung der Methode auf CD15, CD31, CD35, CD45RA, CD91, CD105, CD123, CD163, CD182, CD305, *Leukotriene B4 receptor (BLTR)-1*, *human leukocyte antigen (HLA)-DQ* und die zugehörigen Isotypkontrollen getestet. Bei der Gegenüberstellung von Gesunden-, NSTEMI-Proben und Ausschluss-KHK-Proben wurden folgende Marker getestet: CD43, CD305, CDw329, CD45 und *stage-specific embryonic antigen (SSEA)-1*. Außerdem wurden die jeweiligen IgG und IgM Isotypkontrollen der verwendeten Antikörper mitgetestet. Außer beim BLTR-1-Antikörper stimmten alle Isotypen exakt mit denen der Lyoplate überein oder wurden vom Hersteller als passend angegeben (im Falle von CD128b/CD182). Als Sekundärantikörper wurden passende Alexa Fluor647-gekoppelte Anti-Maus-, bzw. Anti-Ratte-Antikörper verwendet.

Die Zellen wurden im 37° C-Wasserbad zügig aufgetaut. Der Inhalt der Kryotubes wurde zunächst durch einen *Cell Strainer* in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen umgefüllt. Um dabei keine Zellen zu verlieren, wurden die Einfrierröhrchen mit je 1 ml *Cell Staining Buffer* + 5 mM EDTA ausgespült und ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen hinzugefügt. Das Gemisch wurde mit weiterer *Cell Staining Buffer* + 5 mM EDTA Lösung aufgefüllt und bei 4° C und 300 g 15 min lang zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und verworfen und die Zellen in 10 ml frischem *Cell Staining Buffer* + 5 mM EDTA resuspendiert.

Dann wurde die Zellzahl der Probe mithilfe des *LUNA™ Automated Cell Counter* bestimmt, das Probenvolumen mit der *Cell Staining Buffer* + 5 mM EDTA Lösung aufgefüllt und bei 300 g und 4° C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen, das Zellpellet nun in einer jeweils definierten Menge *Cell Staining Buf-*

fer + 5 mM EDTA Lösung resuspendiert, sodass sich eine Zellzahl von  $0,5 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$  ergab. Jetzt wurde die Probe mit *TruStain FcX™ Fc Receptor Blocking* versetzt in einem Verhältnis von  $3 \mu\text{l} / 100 \mu\text{l}$  Zellsuspension und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden mit der Multipette jeweils  $100 \mu\text{l}$  der Zellsuspension in die Vertiefungen einer sterilen 96-Well-Roundbottomplatte pipettiert. Der Mix der jeweiligen Primärantikörper wurde mit der Multipette auf die Wells verteilt und gut mit den Zellen vermischt. Dann wurden die Proben für 20 min bei  $4^\circ \text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden  $100 \mu\text{l}$  *Cell Staining Buffer* + 5 mM EDTA mit der Mehrkanalpipette in jedes Well gegeben und alles bei  $4^\circ \text{C}$  und 500 g 7 min lang zentrifugiert.

Zur Schonung der Zellzahl in den Wells wurde der Überstand abgeschüttet, nicht abgesaugt und die Zellpellets in  $200 \mu\text{l}$  *Cell Staining Buffer* + 5 mM EDTA zum Waschen gelöst und erneut bei  $4^\circ \text{C}$  und 500 g 7 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgeschüttet. Im Folgenden dieses Versuchs wird das in diesem Abschnitt erläuterte als „Waschschritt“ bezeichnet.

Nun wurden  $100 \mu\text{l}$  des entsprechenden Sekundärantikörpermix auf die Zellpellets gegeben, mit ihnen vermischt und dann für 20 min bei  $4^\circ \text{C}$  im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschritt (s.o.).

Zur Einteilung der Monozyten in ihre Subtypen wurde nun Anti-CD14/16-Mastermix (s.o.) auf die Zellpellets gegeben und die Zellen gut darin gelöst. Für 20 min erfolgte bei  $4^\circ \text{C}$  im Dunkeln die Inkubation. Im Anschluss wurden  $100 \mu\text{l}$  *Cell Staining Buffer* + 5 mM EDTA mit der Mehrkanalpipette in jedes Well gegeben, alles bei  $4^\circ \text{C}$  und 300 g 7 min lang zentrifugiert und ein Waschschritt (s.o.) durchgeführt.

Um abgestorbene Zellen durchflusszytometrisch auszusortieren, wurden  $100 \mu\text{l}$  *LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain Kit* (1:200 in PBS gelöst) auf die Zellen gegeben und gut mit den Zellen vermischt. Dieses musste bei Raumtemperatur für 20 min in Dunkelheit inkubieren. Hinterher wurden  $100 \mu\text{l}$  *Cell Staining Buffer* + 5 mM EDTA hinzugegeben und das Gemisch bei  $4^\circ \text{C}$  und 300 g 7 min lang zentrifugiert. Nach einem Waschschritt wurden die Zellpellets zur Messung sorgfältig in  $150 \mu\text{l}$  *Cell Staining Buffer* + 5 mM EDTA gelöst und dann sofort gemessen oder bei  $4^\circ \text{C}$  bis zur Messung im *BD FACSVerser Flow Cytometer* gelagert.

### 3.2.7 Einstellung des Durchflusszytometers, Probenaufnahme, Gating

Alle FACS-Experimente wurden erst durchgeführt, nachdem das Gerät die tägliche Qualitätskontrolle mithilfe von *Cytometer Setup & Tracking (CS&T) Research Beads* erfolgreich absolviert hatte. Zunächst wurde sichergestellt, dass die Signalintensität eines jeden Fluorochroms stärker als das 2,5-fache der robusten Standardabweichung und die hellste im jeweiligen Kanal ist. Im Gegensatz zur klassischen Standardabweichung ist die robuste Standardabweichung am Median und nicht am Mittelwert orientiert, was sie genauer für unsere Versuche macht, da die Messwertkurve bei den Versuchen nicht genau normalverteilt ist. Die Geräteeinstellungen wurden kalibriert, indem jedem Zielwert der Fluorochrome eine spezifische CS&T-Beadgruppe zugewiesen wurde. Alle Instrumenteneinstellungen wurden am Anfang für die Untersuchung festgelegt und für alle Messungen übernommen. Wegen der Verwendung multipler Fluorochrome wurde beim Gating der Zellen die *fluorescence minus one (FMO)*-Kontrolle verwendet. FMO-Kontrollen enthalten alle im Versuch verwendeten Fluorochrome außer dasjenige, welches gemessen wird. Somit kann die zu untersuchende Frequenz gut isoliert werden.

Zelldoubletten, also zusammenhängende Zellen, stellen ein größeres Objektvolumen und somit eine größere Objektfläche dar und täuschen eine höhere Rezeptordichte als die der Einzelzellen vor. Um Zelldoubletten von der Messung auszuschließen, wurde ein *forward-scattered light (FSC)*-A versus FSC-H Gating aufgenommen. Einzelzellen stellen sich hier bei korrekter Gerätekalibrierung und unter der Annahme, dass FSC-A und -H gleich sind, näherungsweise auf einer 45° diagonalen Punktewolke dar, die den Nullpunkt schneidet. Doubletten weichen von der Linearität ab und können so aussortiert werden (s. Abbildung 10 a).

Tote Zellen wurden durchflusszytometrisch erfasst durch Verwendung von *LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain Kit* und in einer Auftragung AquaDye-A versus FSC-A ausgegattet (s. Abbildung 10 b).

In den Screeningversuchen konnte die Monozytenpopulation neben allgemeinen Eigenschaften wie Zellgröße und Granularität lediglich anhand der Expression von CD14 und CD16 spezifiziert werden. In den Validierungsexperimenten wurde die Darstellung der Gesamtmonozyten zusätzlich verfeinert durch einen Phycoerythrin (PE)-A Antikörpercocktail gegen Marker, die sie nicht oder in geringerem Maße exprimieren (CD2, CD15,

CD19, CD56, CD335), gegen FSC-A aufgetragen und eine Positivmarkierung HLA-DR PE-Cy7-A versus FSC-A (s. Abbildung 10 c, d) vorgenommen.

Die drei Monozytensubpopulationen – klassische ( $CD14^{++}CD16^{-}$ ), intermediäre ( $CD14^{++}CD16^{+}$ ) und nicht-klassische ( $CD14^{+}CD16^{++}$ ) – wurden anhand ihrer Ausprägung von CD16 Pacific Blue-A versus CD14 Alexa 488-A Antigenen im Gate eingestellt und aufgeteilt (s. Abbildung 10 e, f).

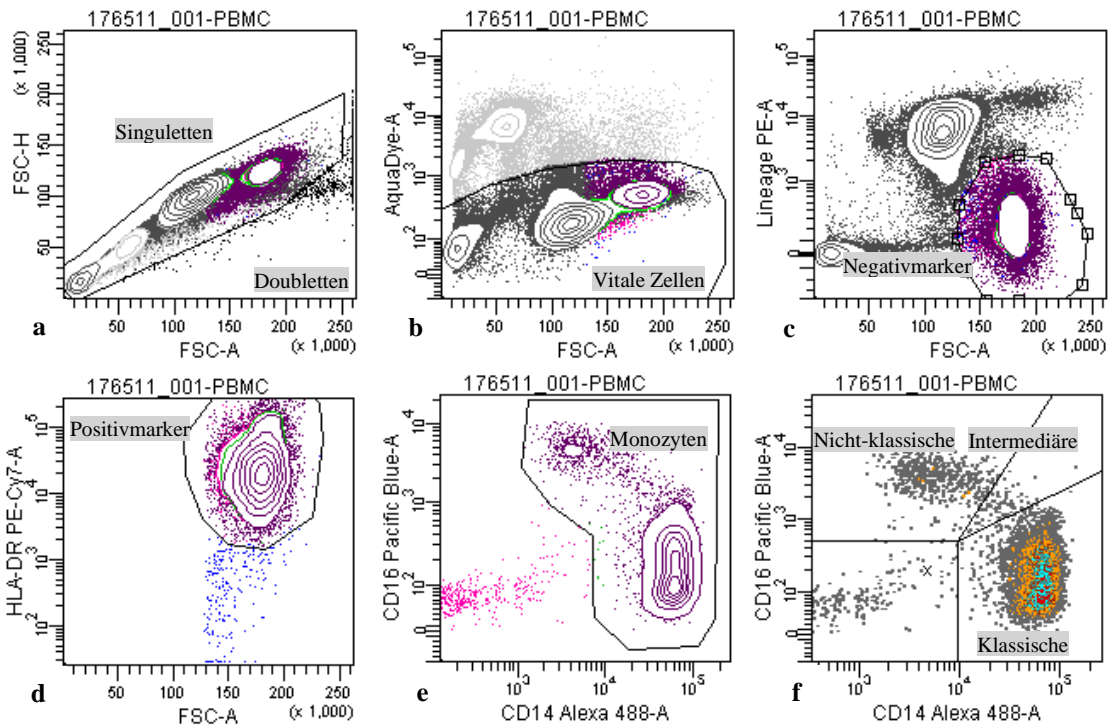


Abbildung 10: Gatingstrategie für die Analyse am Durchflusszytometer

Die Messung und Datengewinnung der Lyoplate™- und Validierungsexperimente wurde an einem *BD FACSVerser Flow Cytometer* mit der *BD FACSuite™* Software vorgenommen. Vorversuche, wie die Vitalitätskontrollen, wurden an einem *FACSCanto II Flow Cytometer* mit der *BD FACSDiva™* Software durchgeführt. Die Flussrate der Probenakquirierung wurde bei den Vorversuchen jeweils auf das unterschiedliche Probenvolumen optimiert angepasst. Bei jeder Einzelmessung wurden 20.000 Monozytensignale aufgezeichnet und analysiert.



### 3.2.8 Datenanalyse der Durchflusszytometrie

Die bei den Lyoplate™-Versuchen gewonnenen Daten wurden zunächst mithilfe der BD FACSDiva Software (Version 6.3.1) analysiert. Bei der traditionellen zweidimensionalen Darstellung der Fluoreszenzen auf logarithmischen Achsen nehmen 10 Fluoreszenzeinheiten im Bereich von 1 – 10 denselben visuellen Raum ein wie 10.000 Fluoreszenzeinheiten im Bereich von 1.000 – 10.000, was sie visuell schwer interpretierbar macht. Um die visuelle Darstellung und Interpretation zu verbessern, wurde eine biexponentielle Transformation vorgenommen. Im Gegensatz zur klassischen logarithmischen Auftragung an den Achsen lassen sich so Ereignisse mit niedriger Fluoreszenz besser mit jenen im stark fluoreszierenden Bereich vergleichen. Die drei Monozytensubtypen wurden sequenziell gated.

Die Medianwerte der Fluoreszenzintensität im Alexa Fluor 647-Detektor wurden für alle Monozytensubtypen auf jedes einzelne Antigen hin aufgezeichnet. Dies ergab die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) der Probe. Als endgültige Markerexpression wurde die Differenz aus der gemessenen MFI der Probe und der MFI der zugehörigen Isotypkontrolle angenommen:

$$\text{MFI} = \text{MFI}_{\text{Probe}} - \text{MFI}_{\text{Isotypkontrolle}}$$

Durchflusszytometrische Daten aus den Validierungsversuchen wurden mit der FlowJo Software analysiert, um *Histogram Overlays* für alle 242 Antikörper und ihre Isotypkontrollen zu generieren.

### 3.2.9 Statistische Analyse

Die spezifischen Fluoreszenzintensitäten eines jeden Probanden wurden gemittelt und als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Ein Mittelwertvergleich wurde zunächst mit der Varianzanalyse gefolgt vom Tukey Post-hoc-Test zur Signifikanzanalyse vorgenommen. Alle statistischen Analysen wurden mithilfe von GraphPad Prism (Version 5) durchgeführt.

### **3.2.10 Bioinformatische Analyse**

Eine bioinformatische Analyse wurde in der Programmiersprache R für statistische Berechnungen und Grafiken unter Anwendung von Bioconductor (edgeR Software) und anderer R-Pakete durchgeführt (Huber et al. 2015; The R Core Team 2016). Zur Bestimmung des Zusammenhangs zwischen einzelnen Variablen verhalf entweder Spearmans Rangkorrelationskoeffizient oder die lineare Regression. Signifikante Abweichungen konnten entweder durch den Mann-Whitney-U-Test oder durch Generalisierte Lineare Modelle der Regressionsanalyse herausgestellt werden. Entweder die Hauptkomponentenanalyse oder die Multidimensionale Skalierung dienten als Algorithmen zur Dimensionsreduktion. Eine hierarchische Clusteranalyse wurde mit Manhattan-Distanz und der Ward-Methode zur Inter-Cluster-Verknüpfung („ward.D2“) durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Vitalitätskontrolle der PBMC

Die vor den Hauptversuchen durchgeführten Testläufe dienten dazu nachzuprüfen, wie viele der kryokonservierten Zellen nach dem Einfrier- und Auftauvorgang noch vital waren. Bei insgesamt fünf getesteten Proben ergab sich eine durchschnittliche Vitalität von 93 % (Varianz: 91,3-94,5 %) der Zellen, die in der Probe enthalten waren.

### 4.2 Erkenntnisse zur detaillierten Separation der Monozytensubtypen

Zunächst wurden ausschließlich die Probanden der gesunden Kontrollen betrachtet. Es war zu klären, welche der vielen mittels neu etablierter Methodik gemessenen Oberflächenmarker eine verlässliche Unterscheidung zwischen den drei Monozytenuntergruppen zulassen. Durch Anwendung einer Hauptkomponentenanalyse (PCA, engl. *principal component analysis*) konnte zunächst die Gesamtzahl der Variablen reduziert, der Anteil der Varianzen aller Variablen im großen Lyoplate™-Datensatz veranschaulicht und die Ergebnisse strukturierter dargestellt werden. Es zeigte sich, dass die ersten beiden Hauptkomponenten (PC1 und PC2) über 70 % der Datenvarianz ausmachten (s. Abbildung 11 und Abbildung 12).

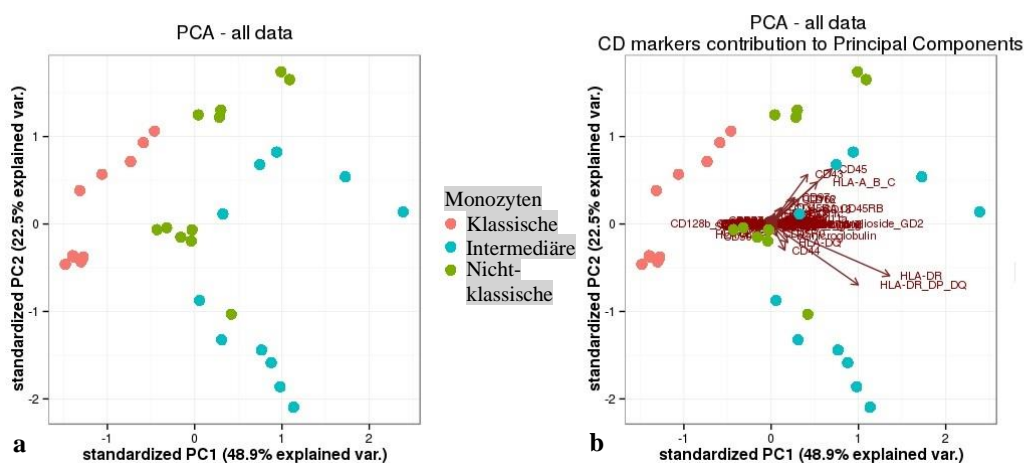


Abbildung 11: Niedrigdimensionale Streudiagramme der aufbereiteten Lyoplate™-Daten mit allen gemessenen Oberflächenmarkern (a) und mit Darstellung der Marker, die am stärksten zur Streuung beitragen (b). Jeder farbige Punkt repräsentiert den jeweiligen Monozytensubtyp eines der elf gesunden Probanden (Hoffmann et al. 2020).

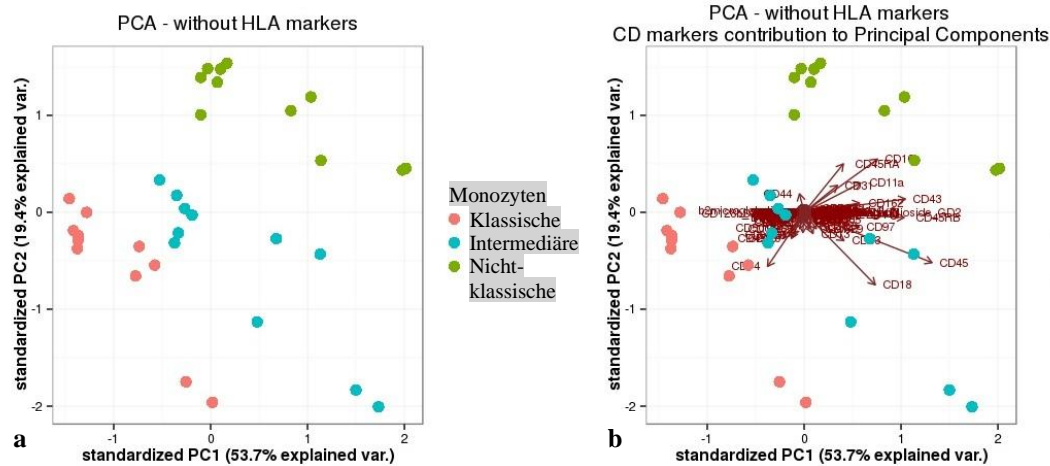


Abbildung 12: Niedrigdimensionale Streudiagramme der aufbereiteten Lyoplate™-Daten ohne HLA-Marker (a) und zusätzlich mit den für die Streuung relevantesten CD-Markern (b). Jeder farbige Punkt repräsentiert den jeweiligen Monozytensubtyp eines der elf gesunden Probanden (Hoffmann et al. 2020).

Wenn man alle Oberflächenmarker berücksichtigt, stellten sich die Monozytensubtypen nicht als klar unterscheidbare Entitäten dar. Stattdessen zeigte sich eine deutliche Überschneidung, vor allem von intermediären und nicht-klassischen Monozyten (s. Abbildung 11 a). Deshalb galt es herauszufinden, welche Marker am stärksten zur Streuung der Probanden und der Streuungsrichtung beitrugen. Dabei wurde deutlich, dass einige HLA den größten Effekt auf die undeutliche Abgrenzung der Untergruppen in der PCA hatten (s. Abbildung 11 b).

Unter Berücksichtigung aller HLA-Marker im Datensatz (HLA-ABC, HLA-A2, HLA-DQ, HLA-DR und HLA-DR/DP/DQ) stellten sich die Proben in einer Gruppierung unabhängig von den Monozytenuntergruppen dar. Nach Ausschluss der HLA-Marker aus der Analyse erwies sich der Algorithmus der PCA als zuverlässige Methode zur Auftrennung und Unterscheidung der drei Subtypen (s. Abbildung 12 a). Wenn man nun die übrigen CD-Marker des Datensatzes in die Darstellung einschloss, demaskierte sich der Effekt einzelner CD-Antigene auf die Streuung entlang der Hauptkomponenten (s. Abbildung 12 b).

### 4.3 Immunphänotypische Korrelation zwischen den Monozytensubtypen

Um herauszufinden, wie hoch die Korrelation zwischen klassischen, intermediären und nicht-klassischen Monozyten der gesunden Probanden bezüglich ihrer Expression an

Oberflächenmarkern ist, wurde Spearmans Rangkorrelationskoeffizient und ein lineares Regressionsmodell gewählt.

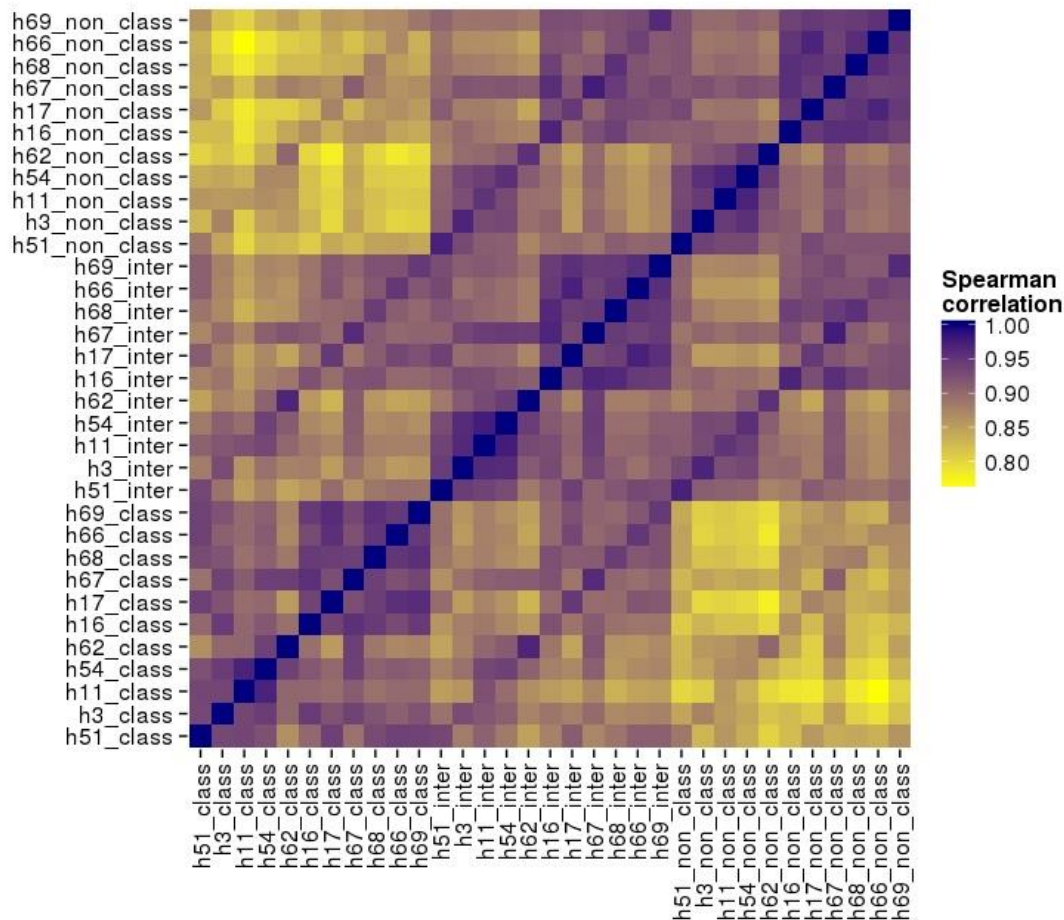


Abbildung 13: Spearmans Rangkorrelationskoeffizient. Dargestellt sind die Expressionsmuster der drei Monozytensubtypen (class = klassische, inter = intermediäre, non\_class = nicht-klassische) bei gesunden Probanden (h für engl. *healthy*) für alle Marker, um zu zeigen, wie ähnlich bzw. verschieden sich die Subtypen bezüglich ihrer Oberflächenmarkerexpression sind. Je dunkler das Feld ist, desto höher korreliert das Expressionsprofil. Helle Felder weisen auf verschiedene Expression hin (Hoffmann et al. 2020).

In Abbildung 13 sind alle Oberflächenmarkerwerte für jeden gesunden Probanden einzeln, akkumuliert und nach Subtypen gruppiert gegeneinander aufgetragen worden. Die so entstandene Heatmap zeigt geringe Korrelationen als gelb und hohe Korrelationen in der Farbe Purpur. Die in Abbildung 14 gezeigten Streudiagramme zeigen die drei möglichen Gegenüberstellungen der Monozytensubtypen. Jeder Punkt der Punktwolken repräsentiert ein Oberflächenantigen; die am meisten herausstechenden in den Vergleichen wurden bezeichnet. Über den Grafiken ist die Funktion der Ausgleichsgeraden

angegeben, die die Punktwolke näherungsweise danach unterteilt, welcher der verglichenen Subtypen die Marker stärker exprimiert.

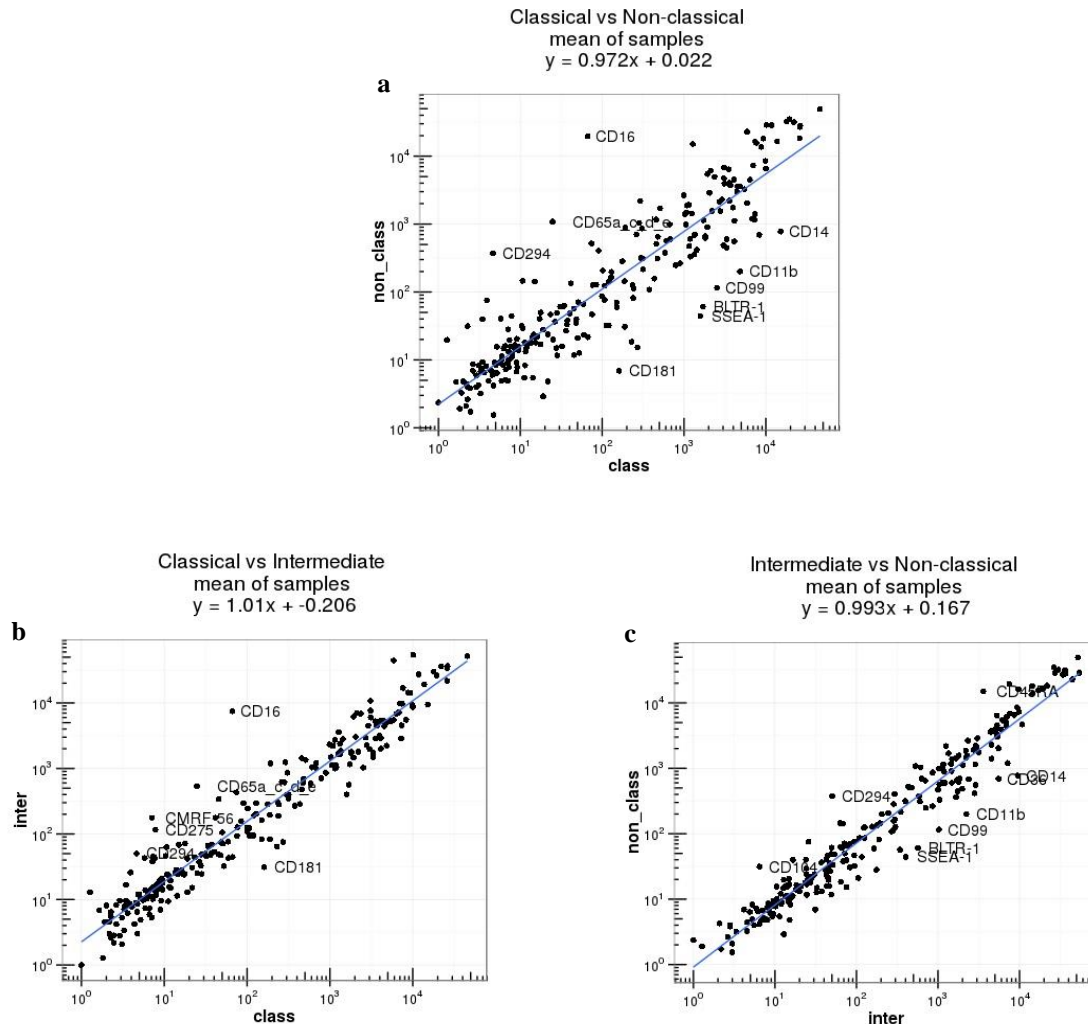


Abbildung 14: Lineare Regression (Streudiagramme) zur Darstellung der Oberflächenmarkerkorrelation zwischen den Monozytensubpopulationen (class = klassische und non\_class = nicht-klassische (a), klassische und inter = intermediäre (b) und intermediäre und nicht-klassische Monozyten (c)). Je näher die einzelnen Punkte, die für je einen Marker stehen, an der Linearen liegen, desto höher ist die Korrelation (Hoffmann et al. 2020).

Zwischen allen dreien gab es darin signifikante Korrelationen. Dennoch war die Markerkorrelation zwischen klassischen und nicht-klassischen Monozyten deutlich geringer als zwischen jeweils beiden und intermediären Monozyten (s. Abbildung 13 und Abbildung 14). Somit zeigen intermediäre Monozyten im Oberflächenmarkerprofil Ähnlichkeiten sowohl zu klassischen, als auch nicht-klassischen Monozyten.



#### 4.4 Oberflächenexpressionsmerkmale der Monozytensubtypen

Zur Betrachtung der differentiellen Expression aller Oberflächenmarker auf klassischen, intermediären und nicht-klassischen Monozyten der gesunden Probanden wurden die Daten mit Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler und Medianwert aus Platzgründen im Anhang zusammengestellt (s. Tabelle 8).

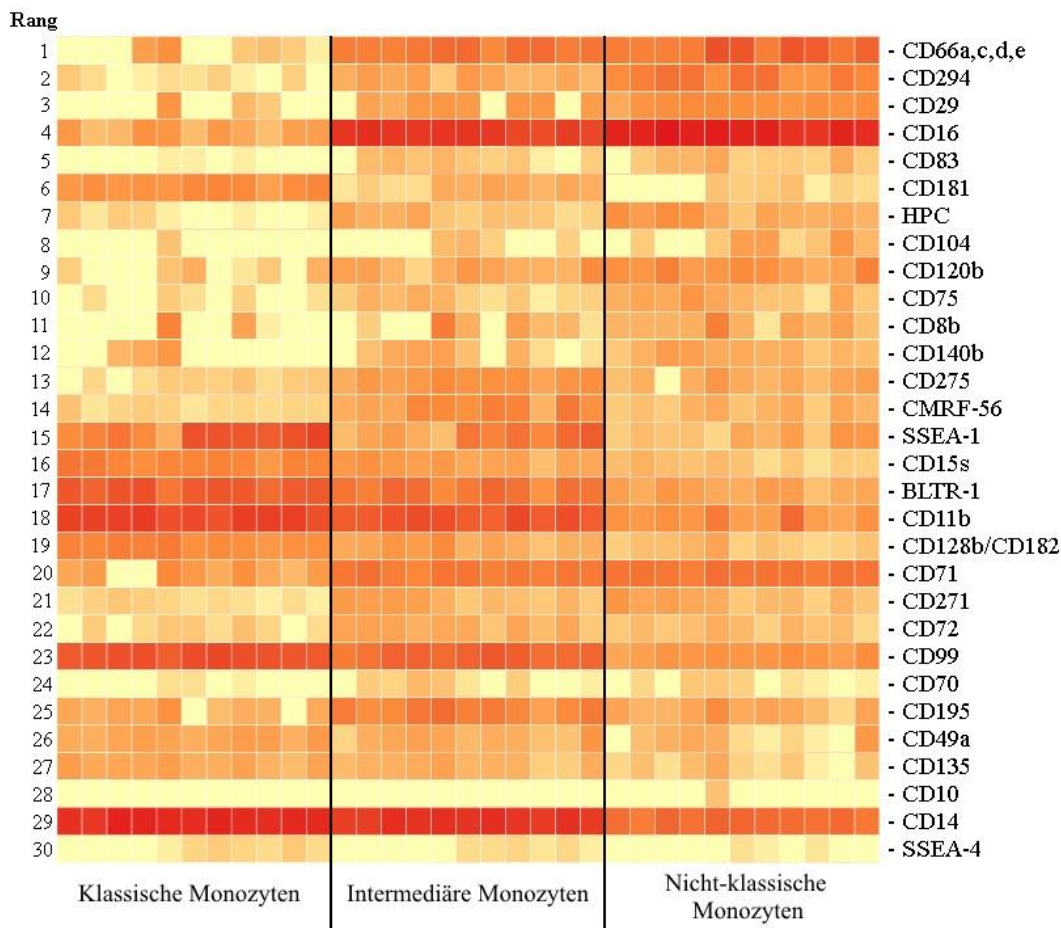


Abbildung 15: Heatmap der 30 relevantesten, differentiell exprimierten Oberflächenmarker auf klassischen, intermediären und nicht-klassischen Monozyten aus der edgeR-Analyse. Je stärker die Rotfärbung, desto stärker wurde der Marker exprimiert, hell bedeutet schwache Expression.

Eine Analyse der Daten zur differentiellen Oberflächenmarkerexpression mithilfe der edgeR Software (s. Tabelle 9 im Anhang) ergab überraschenderweise, dass etablierte Monozytensubtypenmarker wie CD14 und CD16 gar nicht die besten Unterscheidungsmerkmale der Subpopulationen waren. Die Rangfolge der 30 Marker mit den größten Expressionsunterschieden sind zur Übersicht in einer Heatmap nach den Subtypen unterteilt dargestellt (Abbildung 15). CD16 liegt hier an Stelle 4 und CD14 lediglich an Stelle 29 der gemessenen Monozytenoberflächenmarker.

Einige dieser differenziell exprimierten Oberflächenepitope lassen sich anhand ihrer generellen biologischen Funktion in Kategorien einsortieren (Engel et al. 2015):

- Zelladhäsion: CD11b, CD15s/SSEA-1, CD29, CD49a, CD66a,c,d,e, CD99, CD104, CD195
- Chemotaxis: CD181, CD128b/CD182
- Antigenpräsentation: CD83
- Phagozytose: CD16
- Inflammation: CD14, CD120b, CD294, BLTR-1

#### **4.4.1 Charakteristika klassischer Monozyten**

Klassische Monozyten exprimierten die Marker CD11b, CD15s, CD35, CD36, CD38, CD49e, CD89, CD99, CD128b (CD182), CD181, BLTR-1, und SSEA-1 signifikant höher als die anderen Subtypen (s. Tabelle 8). Sie werden folgend detaillierter aufgeführt.

CD11b (s. Abbildung 16), auch genannt Integrin  $\alpha_M$ , ist ein wichtiges Protein zur Zelladhäsion von Monozyten an aktiviertes Endothel und bei der Phagozytose. Es bindet eine Vielzahl an Liganden, so beispielsweise Fibronectin, Kollagen, ICAM-1, Fibrinogen, LPS und Komplementfaktoren (Meerschaert und Furie 1995; Li 1999).

CD15s (s. Abbildung 16), auch bekannt als Sialyl-Lewis X, ist ein Zelladhäsionsmolekül vieler Zellen. Bei Monozyten fungiert es als Gegenrezeptor zu endothelialen Selektinen. Im Differenzierungsprozess der Zellen wird von CD15s eine Sialinsäure durch  $\alpha(2-3)$ -Sialidase-Aktivität abgespalten, sodass CD15 entsteht (s. u. „SSEA-1“) (Lo et al. 1997; Gadhoun und Sackstein 2008).

CD35 (s. Abbildung 16) oder Komplementrezeptor 1 vermittelt die Phagozytose komplementmarkierter Partikel, indem es C3b/C4b-Peptide bindet. Außerdem fördert die Bindung an seine Liganden die Sekretion von IL-1 $\beta$  und Prostaglandinen (Bacle et al. 1990; Liu und Niu 2009).

CD36 (s. Abbildung 16), ein PRR, fungiert als Adhäsionsmolekül und bindet z. B. oxidiertes LDL. Somit ist es in die Atherogenese involviert (Febbraio et al. 2001).



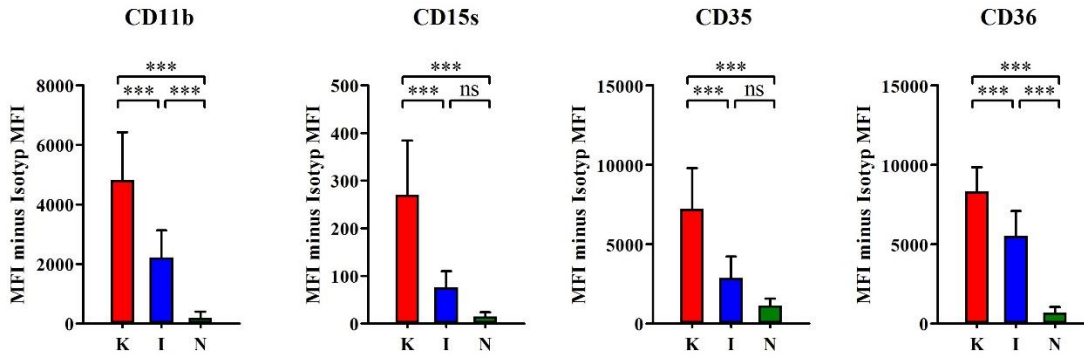


Abbildung 16: Expressionsprofil von CD11b, CD15s, CD35 und CD36. Für den jeweiligen Marker ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der MFI nach Abzug der MFI der Isotypkontrolle für jeden Subtypen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Varianzanalyse, gefolgt vom Tukey Post-hoc-Test bestimmt. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , ns = nicht signifikant

CD38 (s. Abbildung 17), auch Adenosindiphosphat (ADP)-Ribosyl Zyklastase, ist ein Kozeptor von MHC-II-Molekülen in der Aktivierung von T-Zellen. Über die genaue Funktion bei Monozyten ist bisher wenig bekannt, aber er scheint aktivierend auf Monozyten zu wirken und die Zelladhäsion zu fördern (Zilber et al. 2000; Musso et al. 2001).

CD49e (s. Abbildung 17), ein monozytärer Fibronektinzeptor, fungiert als Adhäsionsmolekül an extrazellulärer Matrix. Fibronektin zeigt hohe Konzentrationen in der kardialen Extrazellulärmatrix (Trial et al. 1999).

CD89 (s. Abbildung 17) ist ein IgA-Rezeptor, der beide Unterklassen von IgA mit gleicher Affinität bindet. Eine Bindung kann unterschiedliche Immunreaktionen auslösen: Phagozytose, Sekretion proinflammatorischer Mediatoren oder ROS (van Zandbergen et al. 1999).

CD99 (s. Abbildung 17), ein Zelladhäsionsmolekül auf Leukozyten und Endothel, führt dazu, dass Monozyten besonders an endothelialen Junctionen zur Diapedese binden können (Schenkel et al. 2002; Lou et al. 2007).

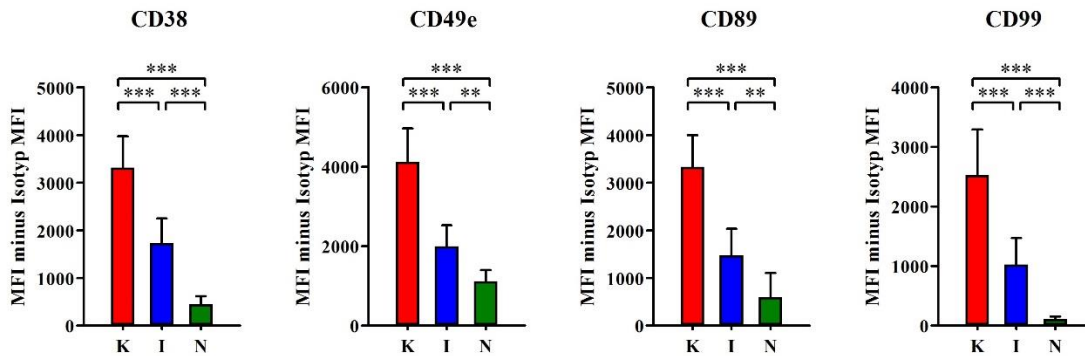


Abbildung 17: Expressionsprofil von CD38, CD49e, CD89 und CD99. Für den jeweiligen Marker ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der MFI nach Abzug der MFI der Isotypkontrolle für jeden Subtypen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Varianzanalyse, gefolgt vom Tukey Post-hoc-Test bestimmt. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , ns = nicht signifikant

CD128b bzw. CD182 (s. Abbildung 18), CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2 oder IL-8-Rezeptor b bindet IL-8 mit hoher Affinität. IL-8 ist ein Zytokin, das von Monozyten selbst sezerniert werden kann. Die folgende intrazelluläre Signaltransduktionskaskade führt zu einer Förderung der Chemotaxis, indem vermehrt Adhäsionsmoleküle exprimiert werden und sich Monozyten an das Endothel anlagern. Außerdem werden proinflammatorische Zytokine und ROS freigesetzt (Gerszten et al. 1999; Pruitt et al. 2014).

CD181 (s. Abbildung 18) ist ähnlich wie CD128b/182 ein IL-8-Rezeptor, auch IL-8-Rezeptor a bzw. CD128a oder CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 1 bezeichnet. Seine Signaltransduktionskaskade verläuft langsamer als die von CD128b/182 und fördert ebenfalls die Chemotaxis (Nasser et al. 2007). Die genaue Funktion bei Monozyten ist derzeit aber noch unklar.

BLTR-1 (s. Abbildung 18) bindet hoch affin Leukotrien B<sub>4</sub>, welches wichtig in der Vermittlung von Chemotaxis und Aktivierung einiger Immunzellen im Rahmen der Inflammation ist. Es wird beispielsweise von atherosklerotischen Plaques sezerniert, führt zu einer festen Adhäsion der Zellen am Endothel und zur Migration ins Gewebe (Caterina et al. 1988; Tager und Luster 2003; Friedrich et al. 2003; van den Borne et al. 2014).

SSEA-1 (s. Abbildung 18) fungiert auf zirkulierenden Monozyten als Ligand für E-Selektin (CD62E) des Endothels, das im Rahmen einer Inflammation durch Zytokinstimulation vermehrt exprimiert wird und Monozyten dort so adhären. Es wird durch

$\alpha$ 1,3-fucosyltransferase IV auf Monozyten gebildet (Munro et al. 1992a; Nakayama et al. 2001).

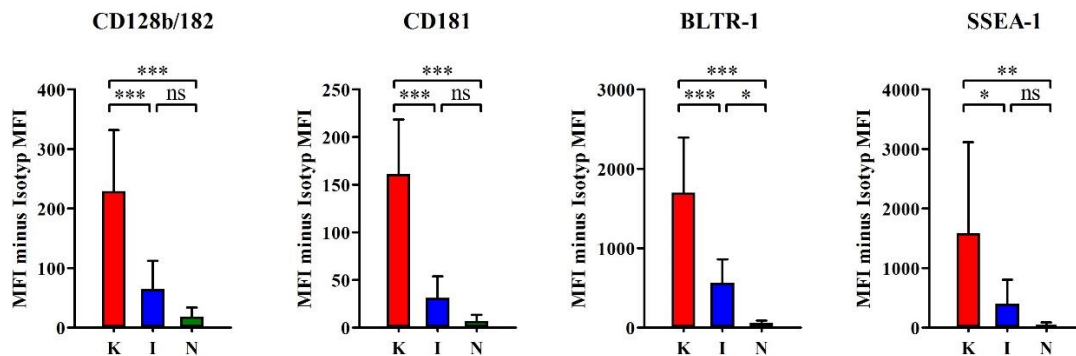


Abbildung 18: Expressionsprofil von CD128b/182, CD181, BLTR-1 und SSEA-1. Für den jeweiligen Marker ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der MFI nach Abzug der MFI der Isotypkontrolle für jeden Subtypen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Varianzanalyse, gefolgt vom Tukey Post-hoc-Test bestimmt. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , ns = nicht signifikant

#### 4.4.2 Charakteristika intermediärer Monozyten

Intermediäre Monozyten hingegen exprimierten die Oberflächenmarker CD23, CD32, CD39, CD40, CD46, CD49d, CD54, CD72, CD74, CD85, CD91, CD105, CD163, CD195, CD227, CD275, CD305, CDw328, *class II-associated I<sub>i</sub>-derived peptides* (CLIP), CMRF-44, CMRF-56, HLA -DQ, HLA-DR und Integrin  $\beta_7$  höher als die anderen Subtypen (s. Tabelle 8). Daher werden diese Marker, die mit hoher Signifikanz exprimiert wurden, folgend näher erläutert.

CD23 (s. Abbildung 19) ist der Fc-Rezeptor Fc $\epsilon$ RII, ein niedrig-affiner IgE-Rezeptor. Seine Liganden sind IgE, CD11b, CD11c und CD21 (Komplementrezeptor 2). Speziell in Zusammenhang mit Monozyten wurde hauptsächlich eine Interaktion mit CD11b und CD11c nachgewiesen. Eine Bindung der Liganden führt zur Aktivierung und Produktion proinflammatorischer Zytokine (Lecoanet-Henchoz et al. 1995; Burger und Dayer 2002; Hibbert et al. 2005).

CD32 (s. Abbildung 19), der niedrig-affine Fc $\gamma$ -Rezeptor 2, bindet IgG und ist somit in die Immunantwort involviert. Bei Monozyten löst die Rezeptorbindung eine Effektorantwort und eine Differenzierung aus. Generell wird er von vielen Zelltypen exprimiert.

Immunsuppressive Mediatoren wie TGF- $\beta_1$  senken die Konzentration an CD32 auf Monozyten (Brooks et al. 1989; Reterink et al. 1996; Tanaka et al. 2009).

CD39 (s. Abbildung 19) steht für die Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase, ein membrangebundenes Enzym, das extrazelluläres, proinflammatorisches ATP, das bei inflammatorischen Zuständen und Zelluntergang frei wird, zu Adenosinmonophosphat (AMP) spaltet. Es wirkt somit antiinflammatorisch. Neben Monozyten kommt es auf vielen weiteren Leukozyten vor (Kaczmarek et al. 1996; Pulte et al. 2007; Antonioli et al. 2013; Takenaka et al. 2016).

CD40 (s. Abbildung 19) gehört zur TNF- $\alpha$ -Rezeptor Superfamilie und wirkt bei Monozyten als Zelladhäsionsmolekül, Apoptoseinhibitor und fördert die inflammatorische Zytokinsynthese (z. B. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-12). Es bindet an CD40L/CD154 (L für Ligand). Monozyten können so auch von aktivierten CD4-positiven T-Helferzellen stimuliert werden (Alderson et al. 1993; Kiener et al. 1995; Suttles et al. 1999).

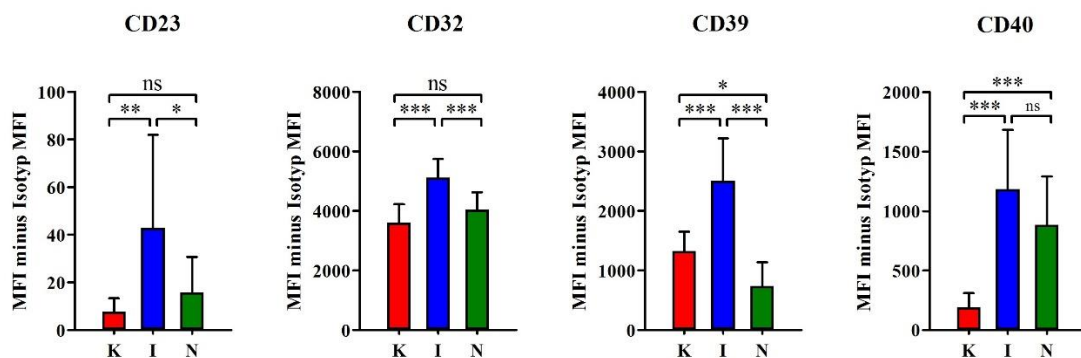


Abbildung 19: Expressionsprofil von CD23, CD32, CD39 und CD40. Für den jeweiligen Marker ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der MFI nach Abzug der MFI der Isotypkontrolle für jeden Subtypen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Varianzanalyse, gefolgt vom Tukey Post-hoc-Test bestimmt. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , ns = nicht signifikant

CD46 (s. Abbildung 20) ist ein Komplement-regulierendes Protein, das auf Monozyten und vielen anderen Leukozyten vorkommt. Es zeigt Faktor-I-Kofaktoraktivität, bindet und inaktiviert dabei die Komplementfaktoren C3b und C4b und beschützt die Zelle so vor homologer Zerstörung durch das Komplementsystem. Aus den Zellmembranen apoptotischer und nekrotischer Zellen wird es schnell entfernt, damit sie zügig komplementvermittelt abgebaut werden können. Es wird von einigen Viren, wie dem Masern-

virus, genutzt, um in die Zelle zu gelangen (Kurita-Taniguchi et al. 2000; Elward et al. 2005; Christmas et al. 2006).

CD49d (s. Abbildung 20), auch Integrin  $\alpha_4$  bezeichnet, ist ein Zelladhäsionsmolekül vieler ruhender Leukozyten und bindet an andere Integrine. Es vermittelt sowohl Zell-Zell-Kontakte, als auch die Anlagerung (Rollen und feste Bindung) der Zellen an Extrazellulärmatrix. TNF- $\alpha$  führt zu einer Induktion von CD49d und Integrin  $\beta_7$  bei der Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen, ansonsten wird es im Rahmen der Zellaktivierung kaum hochreguliert (Puig-Kroger et al. 2000; Hyun et al. 2009).

CD54 (s. Abbildung 20), bzw. ICAM-1, wird auf der Oberfläche von Monozyten und anderen Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert. Es bindet verschiedene Integrine (z. B. CD11a/b/c) und dient so der Zelladhäsion und transendothelialen Migration (Stent et al. 1995; Grisar et al. 2001; Rezaie-Majd et al. 2003).

CD72 (s. Abbildung 20) ist ein Rezeptor für das Semaphorin CD100, das ursprünglich bei der Neurogenese involviert ist. In den letzten Jahren zeigte sich jedoch, dass er auch im Immunsystem vorkommt. So aktivieren T-Zellen beispielsweise CD72-vermittelt B-Zellen und dendritische Zellen. Bei Monozyten wirkt eine Bindung inhibierend auf die inflammatorische Zytokinsynthese und die Zellmigration (Ishida et al. 2003; Chabbert-de Ponnat et al. 2005). Neuere Daten lassen eine Involvierung von CD100 in die Atherogenese und Monozyten-Endotheladhäsion vermuten, über CD72 ist in diesem Zusammenhang bisher wenig bekannt (Luque et al. 2015).

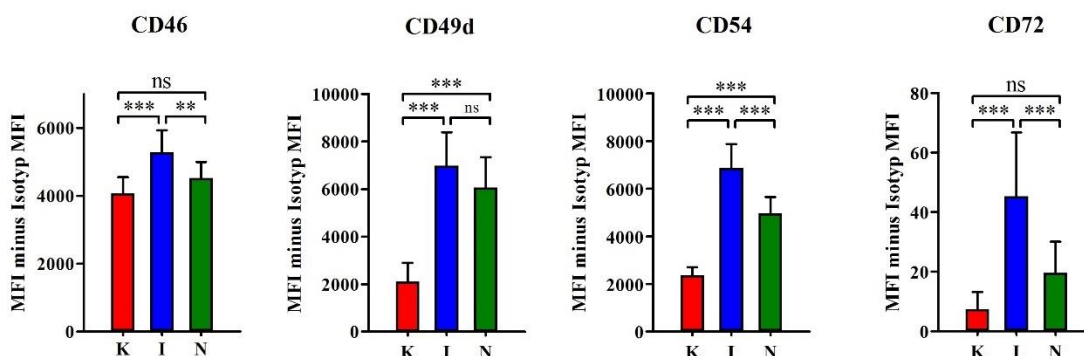


Abbildung 20: Expressionsprofil von CD46, CD49d, CD54 und CD72. Für den jeweiligen Marker ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der MFI nach Abzug der MFI der Isotypkontrolle für jeden Subtypen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Varianzanalyse, gefolgt vom Tukey Post-hoc-Test bestimmt. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , ns = nicht signifikant

CD74 (s. Abbildung 21) ist die Invariante Kette ( $I_i$ ) des HLA-DR-Rezeptors. Sie spielt in der MHC-II-vermittelten Antigenpräsentation und -verarbeitung eine Rolle, da sie die Internalisierung des HLA-DR-Moleküls möglich machen. Bei der Synthese im endoplasmatischen Retikulum wird es mit MHC-II-Molekülen assoziiert und stabilisiert diese. Ohne MHC-Moleküle fungiert sie als Membranrezeptor und bindet den Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor, einem Zytokin zur frühen Monozyten-/Makrophagenaktivierung, das auch bei der Atherogenese eine Rolle spielt (Moldenhauer et al. 1999; Wolk et al. 2003; Leng et al. 2003; Bernhagen et al. 2007; Martin-Ventura et al. 2009; Tillmann et al. 2013).

CD85 (s. Abbildung 21) repräsentiert die Familie der Ig-ähnlichen Transkripte, oft auch als Monozyten/Makrophagen-inhibitorischer Rezeptor bezeichnet. Liganden sind MHC-I-Moleküle. Die genauere Funktion bei Monozyten ist noch weitgehend ungeklärt (Banham et al. 1999; Li et al. 2009).

CD91 (s. Abbildung 21), auch  $\alpha_2$ -Makroglobulinrezeptor oder *LDL-receptor-related proteine 1* genannt, bindet sowohl Lipoproteine, als auch Hitzeschockproteine und den Komplementfaktor C1q und ist somit bei der Phagozytose involviert (Moestrup et al. 1992; Basu et al. 2001; Duus et al. 2010). Es eignet sich als Marker zur Abgrenzung von Monozyten zu anderen Immunzellen wie NK und Granulozyten in der Durchflusszytometrie (Hudig et al. 2014; Ferrer et al. 2014).

CD105 (s. Abbildung 21) oder Endoglin ist ein Membranglykoprotein, das TGF- $\beta_1$  und - $\beta_3$  (s. 1.1.6.2), neueren Erkenntnissen zufolge auch Integrine binden kann. Es ist besonders auf Monozyten während der Differenzierung zu Makrophagen exprimiert, über die genauere Funktion ist jedoch wenig bekannt (Lastres et al. 1992; Lastres et al. 1996; Rossi et al. 2013; Aristorena et al. 2014; Ojeda-Fernandez et al. 2016).

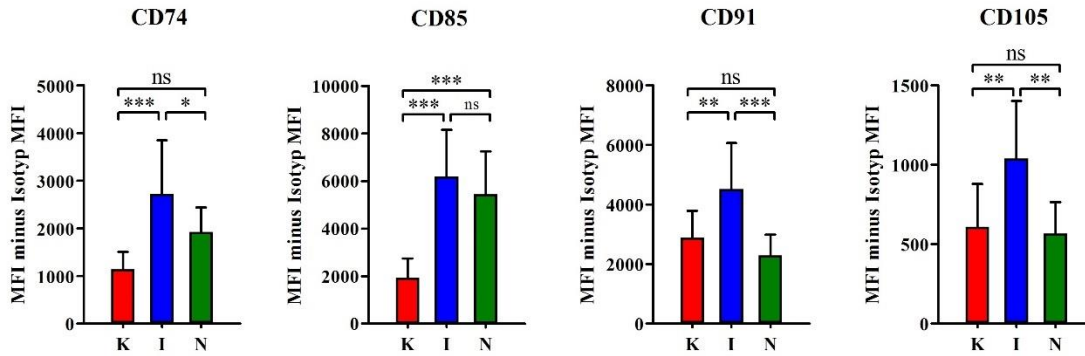


Abbildung 21: Expressionsprofil von CD74, CD85, CD91 und CD105. Für den jeweiligen Marker ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der MFI nach Abzug der MFI der Isotypkontrolle für jeden Subtypen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Varianzanalyse, gefolgt vom Tukey Post-hoc-Test bestimmt. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , ns = nicht signifikant

CD163 (s. Abbildung 22) ist ein Haptoglobin (Hp)-Hämoglobin (Hb)-Scavenger-Rezeptor, der Hp-Hb-Komplexe bindet (Kristiansen et al. 2001). So entfernen Makrophagen der Leber und Milz, aber auch zirkulierende Makrophagen, diese Komplexe und – weniger affin – freies Hb aus der Blutbahn. Dies ist bedeutend zur Restriktion und Aufhebung einer Inflammation, da so Schäden durch freies Hb abgewendet werden und die IL-10-Sekretion aus Makrophagen gefördert wird (Philippidis et al. 2004; Schaer et al. 2007b; Schaer et al. 2007a; Tippett et al. 2011). Monozyten sind die Hauptquelle freien CD163 im Blut und wurden von Aristoteli et al. (2006) als Marker für Koronarsklerose postuliert.

CD195 (s. Abbildung 22) ist der CCR5, sein adäquater Ligand der CCL5. Bei Monozyten vermittelt er eine Adhäsion am und Transmigration durch das Endothel. Die höchste, wenngleich schwache Expression unter den Subtypen zeigen intermediäre Monozyten. Dies ist vor allem in der Pathogenese der Atherosklerose von Bedeutung. (Gerhardt und Ley 2015; Damasceno et al. 2016).

CD227 (s. Abbildung 22), auch Mucin-1 genannt, ist in Zell-Zell-Interaktionen und der Zelladhäsion involviert. Es bindet an eine Vielzahl von Liganden, so CD54 (ICAM-1), Selektine und Sialoadhäsine (Siglec, engl. *sialic acid-binding Ig-like lectin*)-1, das ausschließlich auf von Monozyten abstammenden Zellen exprimiert wird (Hartnell et al. 2001; Wykes et al. 2002).

CD275 (s. Abbildung 22) oder Ligand des induzierbaren Kostimulators (ICOSL für engl. *inducible co-stimulator ligand*) wurde bisher, neben anderen Zellen, auf aktivierten CD14-positiven Monozyten und dendritischen Zellen nachgewiesen und wird durch inflammatorische Stimuli wie IL-4 induziert. Sein Ligand ist der induzierbare Kostimulator ICOS (Bellinghausen et al. 2004; Richter und Burdach 2004; Youngnak-Piboonratanakit et al. 2006).

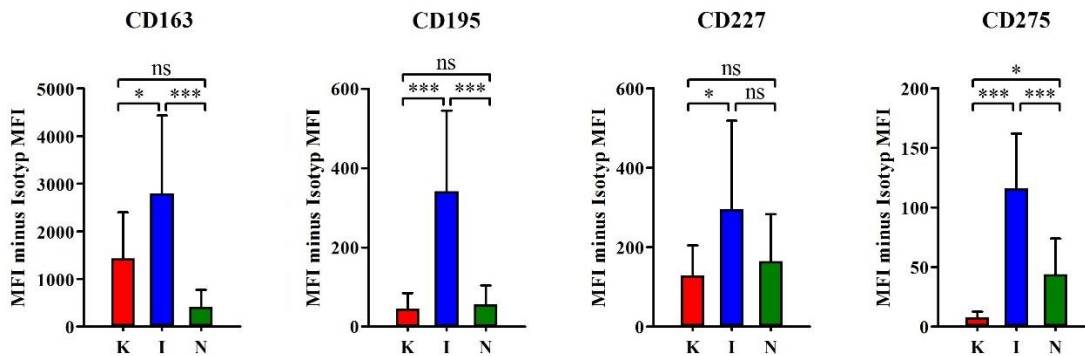


Abbildung 22: Expressionsprofil von CD163, CD195, CD227 und CD275. Für den jeweiligen Marker ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der MFI nach Abzug der MFI der Isotypkontrolle für jeden Subtypen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Varianzanalyse, gefolgt vom Tukey Post-hoc-Test bestimmt. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , ns = nicht signifikant

CD305 (s. Abbildung 23) ist der Leukozyten-assoziierte Ig-ähnliche Rezeptor 1 (LAIR1), der unspezifisch Kollagene bindet und als inhibitorischer Rezeptor fungiert. So hemmt der aktivierte Rezeptor beispielsweise die Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen. Das Komplementprotein C1q enthält eine Kollagen-ähnliche Sequenz und wird ebenfalls von CD305 mit inhibierendem Effekt auf die Monozyten gebunden. Es wird vermutet, dass kollagenreiche Extrazellulärmatrix über CD305 im gesunden Gewebe stetig eine inadäquate Immunreaktion verhindert (Meyaard 2008; Son et al. 2012; Son und Diamond 2014).

CDw328 (s. Abbildung 23) wird auch als Siglec-7 bezeichnet und bindet sialierte Glykane. Es wird vor allem auf NK, einem Subtyp von T-Lymphozyten und Monozyten exprimiert, wo es vorrangig inhibitorisch wirksam ist und Zell-Zell-Kontakte vermitteln kann. Speziell bei Monozyten konnte jedoch ein aktivierender, proinflammatorischer Effekt nachgewiesen werden. Besonders nach Pathogenerkennung kam es zu einer ge-



steigerten Produktion an Zytokinen und Chemokinen wie IL-6, IL-1 $\alpha$ , IL-8 und TNF- $\alpha$  (Nicoll et al. 1999; Varchetta et al. 2012).

CLIP (s. Abbildung 23) sind MHC-II-assoziierte, aus der I<sub>i</sub> gespaltene Peptide. Sie entstehen bei der Synthese und dem Transport der MHC-II-Moleküle an die Zelloberfläche bei der Spaltung von CD74 (I<sub>i</sub>) durch Cathepsin S zu Peptiden, die MHC-Mulde zur Antigenpräsentation blockieren und körpereigene Merkmale repräsentieren. Sie werden zur Antigenpräsentation durch körperfremde Peptide ausgetauscht (Chaturvedi et al. 2000; Stumptner-Cuvelette und Benaroch 2002; Hornell et al. 2003; Röhn et al. 2004; Wolk et al. 2005; Tillmann et al. 2013).

CMRF-44 (s. Abbildung 23) wird vor allem als Marker früher Differenzierung von dendritischen Zellen verwendet (Hock et al. 1994; Monji et al. 2002). Hier ist er auf intermediären Monozyten sehr schwach, aber signifikant gegenüber den anderen Subtypen exprimiert.

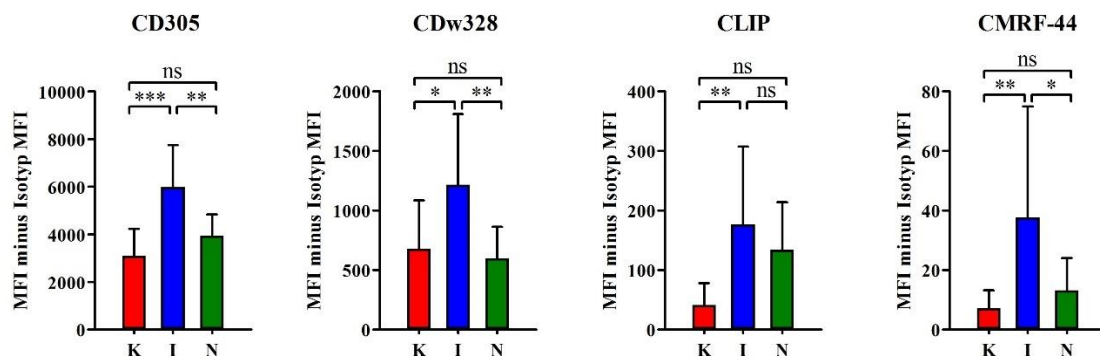


Abbildung 23: Expressionsprofil von CD305, CDw328, CLIP und CMRF-44. Für den jeweiligen Marker ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der MFI nach Abzug der MFI der Isotypkontrolle für jeden Subtypen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Varianzanalyse, gefolgt vom Tukey Post-hoc-Test bestimmt. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , ns = nicht signifikant

CMRF-56 (s. Abbildung 24) ist ebenfalls ein Marker früher Aktivierung und Differenzierung von dendritischen Zellen. Über ihn ist bisher wenig bekannt und geforscht worden. Man ist bisher davon ausgegangen, dass er von Monozyten nicht exprimiert wird (Hock et al. 1999).

HLA-DQ und -DR (s. Abbildung 24) sind die MHC-II-Moleküle, die zur Antigenpräsentation mithilfe co-stimulierender Moleküle an CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im Rahmen der Im-

munreaktion dienen. Sie bestehen aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit und werden von allen Monozyten exprimiert (Brooks und Moore 1988; Bertho et al. 2000; van Lith et al. 2010). Vor allem HLA-DR ist mit höchster Konzentration auf intermediären Monozyten zu finden (Ziegler-Heitbrock 2007).

Integrin  $\beta_7$  (s. Abbildung 24) ist ein Zelladhäsionsmolekül. Als Membranprotein stabilisiert es sich durch nicht-kovalente Anlagerung an entweder eine Integrin  $\alpha_4$  oder  $\alpha_E$  (CD103) Einheit zu einem heterodimeren Komplex. Die Interaktionen sind bisher vor allem bei der Rekrutierung von Leukozyten in die Darmmukosa beschrieben worden (Tiisala et al. 1995; Yang et al. 1996; Schippers et al. 2016).

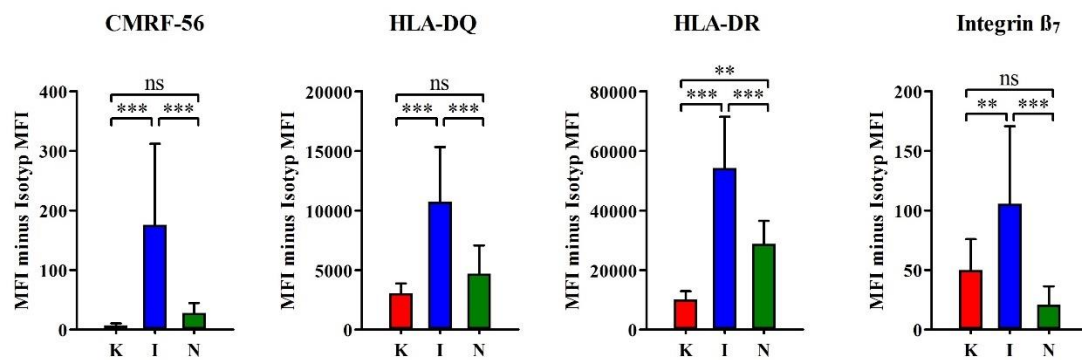


Abbildung 24: Expressionsprofil von CMRF-56, HLA-DQ, HLA-DR und Integrin  $\beta_7$ . Für den jeweiligen Marker ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der MFI nach Abzug der MFI der Isotypkontrolle für jeden Subtypen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Varianzanalyse, gefolgt vom Tukey Post-hoc-Test bestimmt. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , ns = nicht signifikant

#### 4.4.3 Charakteristika nicht-klassischer Monozyten

Nicht-klassische Monozyten zuletzt exprimierten CD29, CD31, CD43, CD45RA, CD66a,c,d,e, CD75, CD88, CD104, CD120b, CD132, CD244 und CD294 höher als die anderen Subtypen (s. Tabelle 8). Diese Marker, die mit hoher Signifikanz exprimiert wurden, werden folgend ausführlicher beschrieben.

CD29 (s. Abbildung 25), die  $\beta_1$ -Kette der Integrine, ist in die Zelladhäsion involviert. Es ist Bestandteil des *very late antigen* (VLA)-4, das von Monozyten exprimiert wird und VCAM-1 (s. 1.2.2.3) auf Endothelzellen bindet. Sie binden jedoch erst dann mit

hoher Affinität, wenn die Monozyten chemotaktisch stimuliert wurden (Hemler 1990; Meerschaert und Furie 1995; Shang et al. 1998).

CD31 (s. Abbildung 25), auch bekannt als *platelet endothelial cell adhesion molecule* (PECAM)-1, exprimieren neben Monozyten viele andere Leukozyten und Endothelzellen. Es bindet hauptsächlich homolog, also andere CD31-Moleküle, aber auch heterolog indem es u.a. CD38 (s. 4.4.1) und Integrin  $\alpha\beta 3$  bindet. Dabei vermittelt es Zell-Zell-Verbindungen von Endothelzellen und Zelladhäsion und Transmigration von Monozyten bei der Diapedese (Muller et al. 1993; Piali et al. 1995; Woodfin et al. 2007). Nach einer CD31-CD31-Bindung von Monozyten am Endothel werden weitere Integrine aktiviert, die für eine Transmigration notwendig sind. Auf Endothelzellen fungiert es zudem als Mechanosensor für mechanische Stimuli, wie beispielsweise Scherstress, und vermittelt in Folge dessen eine Endothelzellaktivierung (s. 1.1.3) (Privratsky et al. 2010).

CD43 oder Leukosialin (s. Abbildung 25) führt zu Adhäsion und Aktivierung von Monozyten, die daraufhin ROS produzieren (Nong et al. 1989). Über die genaue Funktion ist bisher wenig bekannt. Es spielt eine bedeutende Rolle in der T-Zellaktivierung und beim Wiskott-Aldrich-Syndrom, wo es defekt ist (Shelley et al. 1989).

CD45RA (s. Abbildung 25) ist eine Isoform des CD45 bzw. der Protein-Tyrosin-Phosphatase. Bei einer Bindung durch Liganden kommt es zur Signaltransduktion, die die Synthese von Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor (M-CSF, engl. *Macrophage colony-stimulating factor*) auslöst (Webb et al. 1990; Gruber et al. 1994; Hayes et al. 1999).

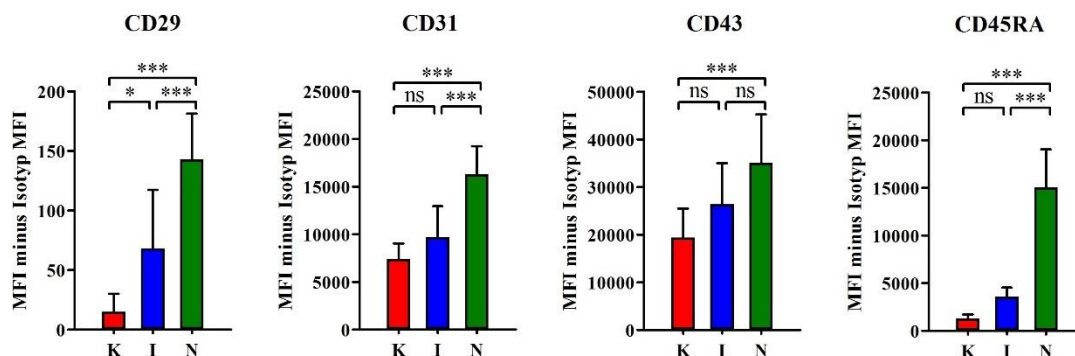


Abbildung 25: Expressionsprofil von CD29, CD31, CD43 und CD45RA. Für den jeweiligen Marker ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der MFI nach Abzug der MFI der Isotypkontrolle für jeden Subtypen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Varianzanalyse,

gefolgt vom Tukey Post-hoc-Test bestimmt. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , ns = nicht signifikant

CD66a,c,d,e (s. Abbildung 26) gehören zur Familie der *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules* (CEACAM) und fungieren als Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle auf vielen Immunzellen mit unterschiedlicher Wirkung. Die Unterform CD66a entspricht CEACAM1, CD66c CEACAM6, CD66d CEACAM3 und CD66e CEACAM5. Liganden sind neben E-Selektinen auch CEACAM in homophiler oder heterophiler Bindung (Yu et al. 2006; Gray-Owen und Blumberg 2006; Khairnar et al. 2015; Engel et al. 2015). Ihre genauere Funktion bei Monozyten liegt noch weitestgehend im Dunkeln. Wie Yu et al. (2006) zeigten, vermittelt CD66a über homophile Zell-Zell-Interaktionen bei Monozyten eine anti-apoptotische Wirkung.

CD75 (s. Abbildung 26) ist ein Kohlenhydrat und Ligand der  $\alpha 2,6$ -Sialyltransferase, sein eigener Ligand ist CD22 (Siglec-2) (Stamenkovic et al. 1991; Munro et al. 1992b). Genauere Funktionen in Bezug auf Monozyten sind derzeit noch nicht beschrieben.

CD88 (s. Abbildung 26) oder Komplementfaktor 5a Rezeptor 1 ist ein G-Proteingekoppelter Rezeptor für den aktivierten Komplementfaktor C5a, einem stark inflammatorischen Peptid. Es wirkt als Anaphylatoxin auf alle immunreaktiven Zellen entzündungsfördernd und bewirkt speziell bei Monozyten eine Chemotaxis, Zytokinfreisetzung und Extravasation. CD88 kommt auch auf Kardiomyozyten vor. Gemeinsam mit seinem Ligand ist er in die Atherogenese involviert (Bock et al. 1997; Furebring et al. 2002; Speidl et al. 2005; Niederbichler et al. 2006; Lee et al. 2008).

CD104 (s. Abbildung 26), auch Integrin  $\beta_4$  bezeichnet, ist ein Lamininrezeptor. Laminine sind große Glykoproteine zur Zelladhäsion, die vor allem in Basallaminae vorkommen. Der Rezeptor ist auf Monozyten an der Zellmigration beteiligt (Lee 1992; Durbeej 2010).

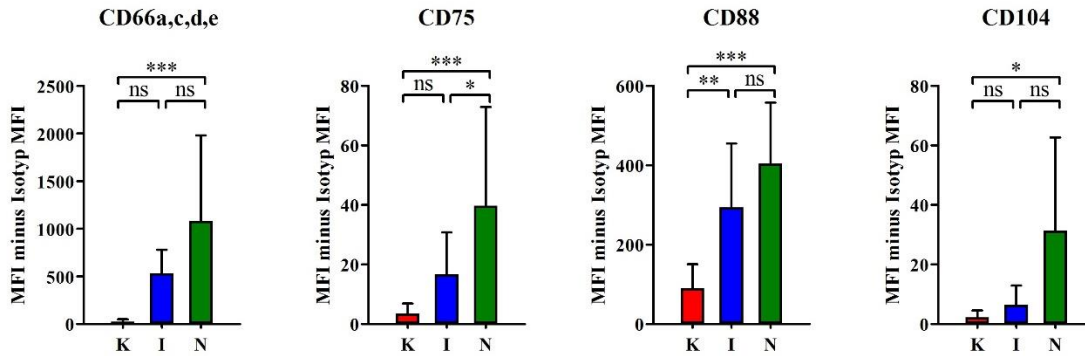


Abbildung 26: Expressionsprofil von CD66a,c,d,e, CD75, CD88 und CD104. Für den jeweiligen Marker ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der MFI nach Abzug der MFI der Isotypkontrolle für jeden Subtypen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Varianzanalyse, gefolgt vom Tukey Post-hoc-Test bestimmt. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , ns = nicht signifikant

CD120b (s. Abbildung 27) ist der TNF-Rezeptor (TNFR)-2, der im Gegensatz zu TNFR1 vor allem auf Immunzellen vorkommt, keine irreversible Bindung an TNF $\alpha$  sondern schnelle Wechsel zwischen Bindung und Dissoziation aufweist und keine Todesdomäne auf zyttoplasmatischer Seite zeigt. Seine Effekte sind dämpfend auf die Entzündung. Werden TNFR1/2 durch MMP von der Zellmembran abgespalten, fungieren sie als endogene TNF $\alpha$ -Inhibitoren. Eine Stimulation von TNFR2 führt zu einer Synthese antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 und inaktiviert freies TNF- $\alpha$  durch die Bindung. Die Efferozytose apoptotischer neutrophiler Granulozyten durch Makrophagen im Entzündungsherd findet ebenfalls TNF $\alpha$ -vermittelt statt (Tartaglia et al. 1991; Santee und Owen-Schaub 1996; Michlewska et al. 2009; Parameswaran und Patial 2010; Gane et al. 2016).

CD132 (s. Abbildung 27), auch allgemeine Gamma-Kette (engl. *common gamma chain*) oder IL-2 Rezeptoruntereinheit  $\gamma$  genannt, ist ein essentieller Bestandteil des IL-2 Rezeptors und eine funktionale Komponente weiterer IL-Rezeptoren (z. B. IL-4-R, IL-7-R), an denen sie die Bindungsaffinität erhöht (Russell et al. 1993; Sugamura et al. 1996). IL-2 hat an Monozyten aktivierende, proinflammatorische Effekte, wohingegen IL-4 antiinflammatorische Effekte vermittelt, indem die IL-1 $\beta$ - und TNF $\alpha$ -Produktion gehemmt wird (Espinoza-Delgado et al. 1995; Bonder et al. 1998).

CD244 (s. Abbildung 27), auch als 2B4 bezeichnet, ist der Rezeptor für das Protein CD48, das auf allen hämatopoetischen Zellen vorkommt (Brown et al. 1998). Es ist

vorrangig in die Lymphozytenaktivierung involviert; über die Funktion bei Monozyten ist bisher wenig bekannt (Mathew et al. 2009). Es gibt Hinweise darauf, dass sie dort immunmodulatorisch wirksam sind, so beispielsweise an dendritischen Zellen deren Vorläufer Monozyten sind (Georgoudaki et al. 2015).

CD294 (s. Abbildung 27) ist der Prostaglandin D<sub>2</sub> Rezeptor 2. Bei der Differenzierung zu Makrophagen nimmt die Dichte an CD294 auf der Zelloberfläche zu. Eine Aktivierung des Rezeptors auf Makrophagen führt zu einem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom und in der Folge zu Zytokinausschüttung und Migration der Makrophagen. Sie scheinen daraufhin auch Überleben und Migration von neutrophilen Granulozyten zu fördern (Jandl et al. 2016).

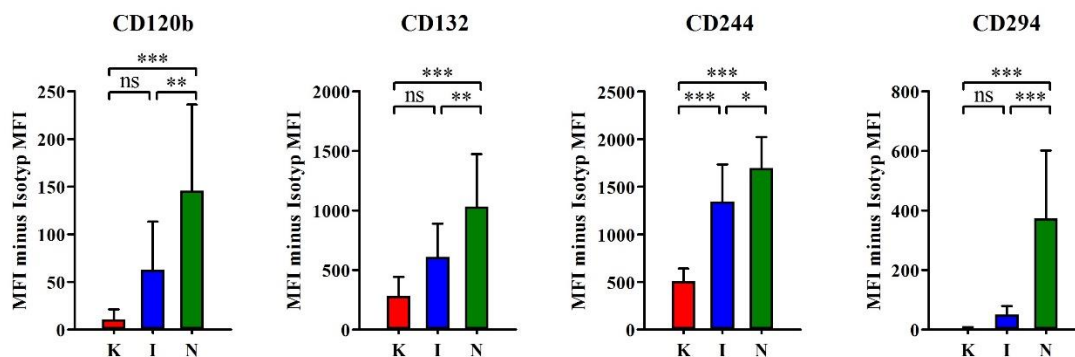


Abbildung 27: Expressionsprofil von CD120b, CD132, CD244 und CD294. Für den jeweiligen Marker ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der MFI nach Abzug der MFI der Isotypkontrolle für jeden Subtypen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Varianzanalyse, gefolgt vom Tukey Post-hoc-Test bestimmt. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , ns = nicht signifikant

#### 4.4.4 Validierung ausgewählter Oberflächenmarker

Die Expression zufällig ausgewählter, in den Kapiteln 4.4.1-4.4.3 genannter Epitope CD15, CD31, CD35, CD45RA, CD91, CD105, CD123, CD163, CD182, CD294, CD305, BLTR-1, und HLA-DQ wurde per Einzelmarkerfärbung an PBMC von 5 freiwilligen, gesunden Probanden in konventioneller Durchflusszytometrie validiert. Hierbei zeigte sich stets ein gleiches relatives Verteilungsmuster wie bei den Lyoplate<sup>TM</sup>-Versuchen (s. Abbildung 28).

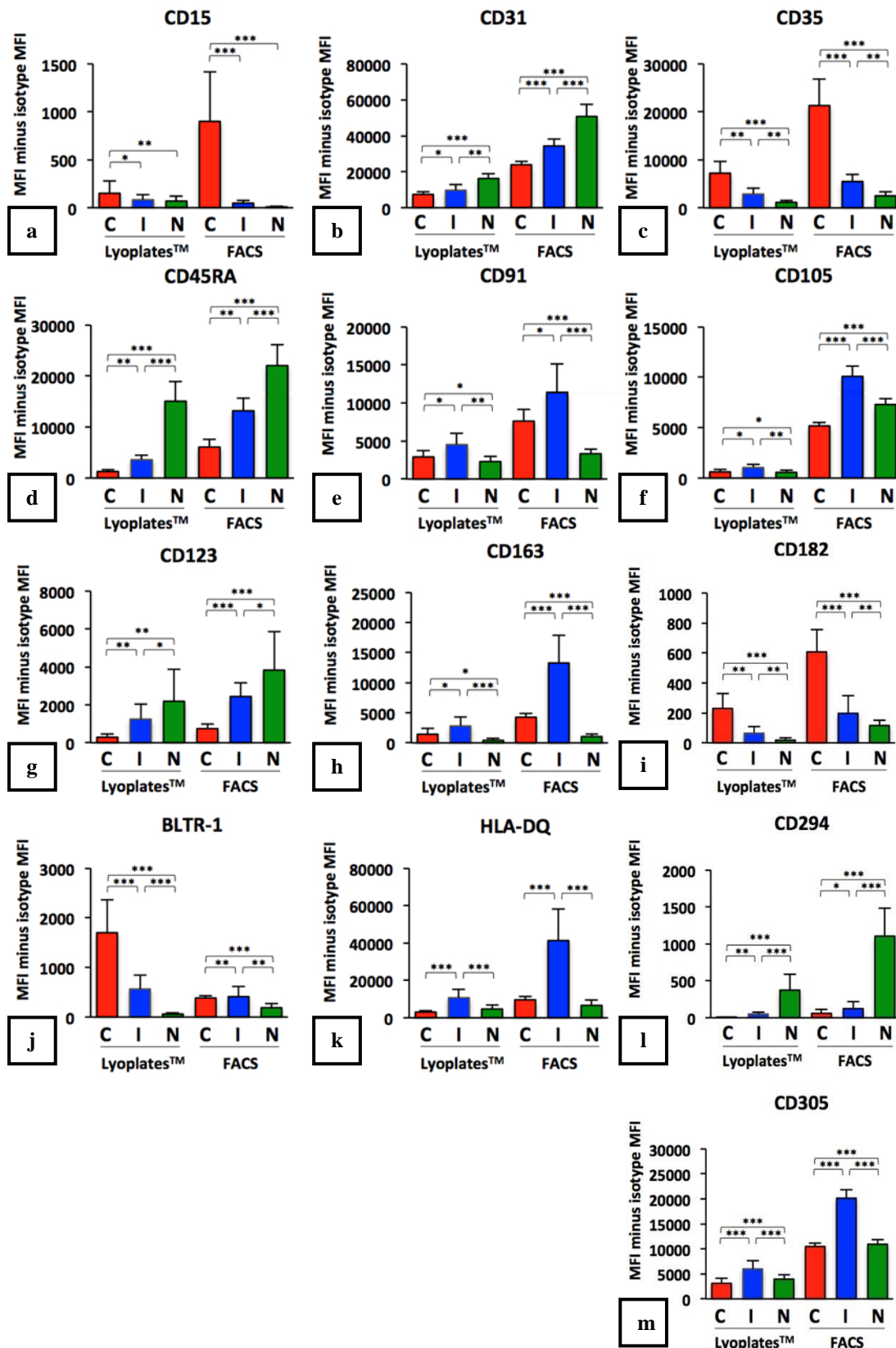


Abbildung 28: Expressionsprofile validierter Marker im Vergleich zu den Ergebnissen der Screeningversuche. Für den jeweiligen Marker ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der MFI nach Abzug der MFI der Isotypkontrolle für jeden Subtypen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Varianzanalyse, gefolgt vom Tukey Post-hoc-Test bestimmt. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,005$ , \*\*\* =  $p < 0,0005$ , ns = nicht signifikant

Das Ausprägungsmuster der Oberflächenantigene bei den Subtypen ist zum Teil sehr verschieden, zwischen den einzelnen Probanden jedoch stets homogen (s. Abbildung 29).

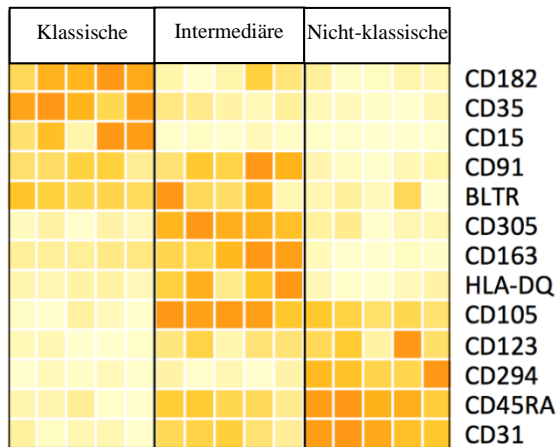


Abbildung 29: *Heatmap* zur Expression ausgewählter Oberflächenantigene bei klassischen, intermediären und nicht-klassischen Monozyten in der Validierung. Zur Validierung wurden fünf junge, gesunde Probanden herangezogen. Je dunkler die Gelbfärbung der Felder ist, desto stärker wurde der jeweilige Marker von dem Subtyp aus der Probe exprimiert.

Zudem wurden CD-Marker ausgewählt, die in der Literatur als für die Subtypen spezifisch vorbeschrieben wurden, und per Einzelmarkerfärbung an PBMC von 5 freiwilligen, gesunden Probanden in konventioneller Durchflusszytometrie getestet. In der Diskussion werden die Ergebnisse an der jeweiligen Stelle näher ausgewertet (s. 5.4.1, 5.4.2, 5.4.3):



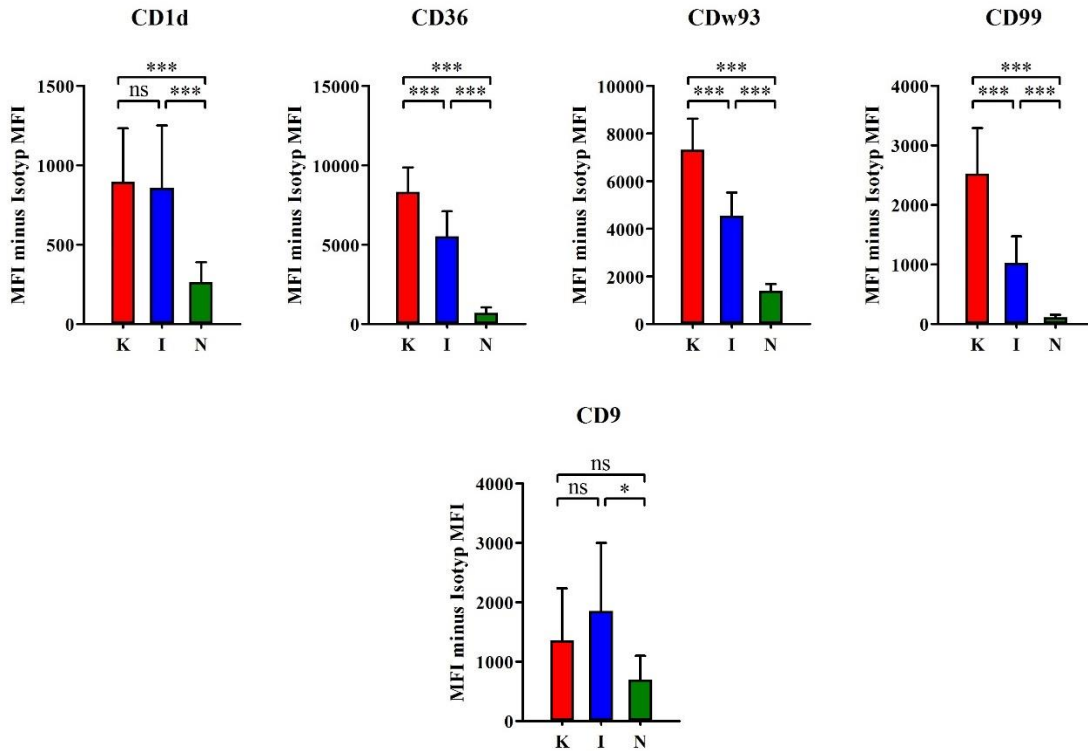


Abbildung 30: Expressionsprofil von CD1d, CD36, CDw93, CD99 und CD9. Für den jeweiligen Marker ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der MFI nach Abzug der MFI der Isotypkontrolle für jeden Subtypen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Varianzanalyse, gefolgt vom Tukey Post-hoc-Test bestimmt. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,005$ , \*\*\* =  $p < 0,0005$ , ns = nicht signifikant

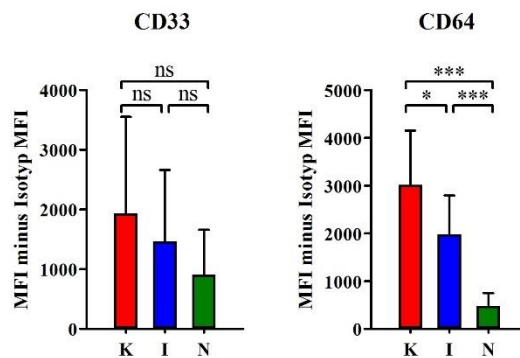


Abbildung 31: Expressionsprofil von CD33 und CD64. Für den jeweiligen Marker ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der MFI - MFI Isotypkontrolle für jeden Subtypen. Signifikanz: Varianzanalyse und Tukey Post-hoc-Test. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,005$ , \*\*\* =  $p < 0,0005$ , ns = nicht signifikant

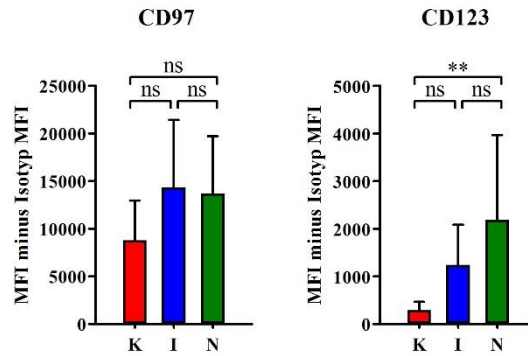


Abbildung 32: Expressionsprofil von CD97 und CD123. Für jeden Marker ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der MFI nach Abzug der MFI der Isotypkontrolle für jeden Subtypen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Varianzanalyse, gefolgt vom Tukey Post-hoc-Test bestimmt. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,005$ , \*\*\* =  $p < 0,0005$ , ns = nicht signifikant

#### 4.5 Differenzielle Expression bei Gesunden und NSTEMI-Patienten

Um zu prüfen, ob Lyoplate™-Screenings in der Lage sind, frühe Auswirkungen des Infarktgeschehens bei NSTEMI-Patienten auf das Oberflächenmarkerexpressionsprofil von Monozytensubtypen zu detektieren, wurden zunächst die Expressionsmuster von elf gesunden Probanden (mittleres Alter: 27 Jahre, Varianz: 25-32 Jahre) mit sechs NSTEMI-Patienten (mittleres Alter: 66 Jahre, Varianz: 57-84 Jahre) verglichen:

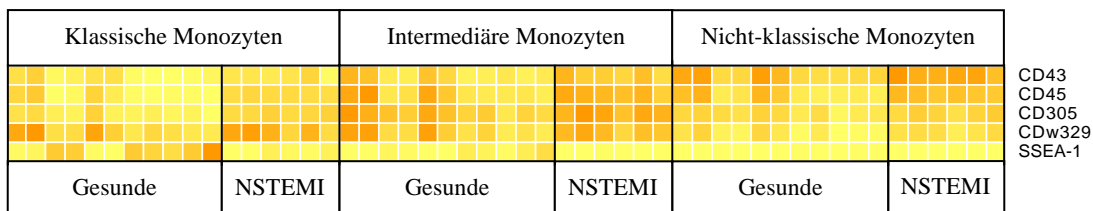
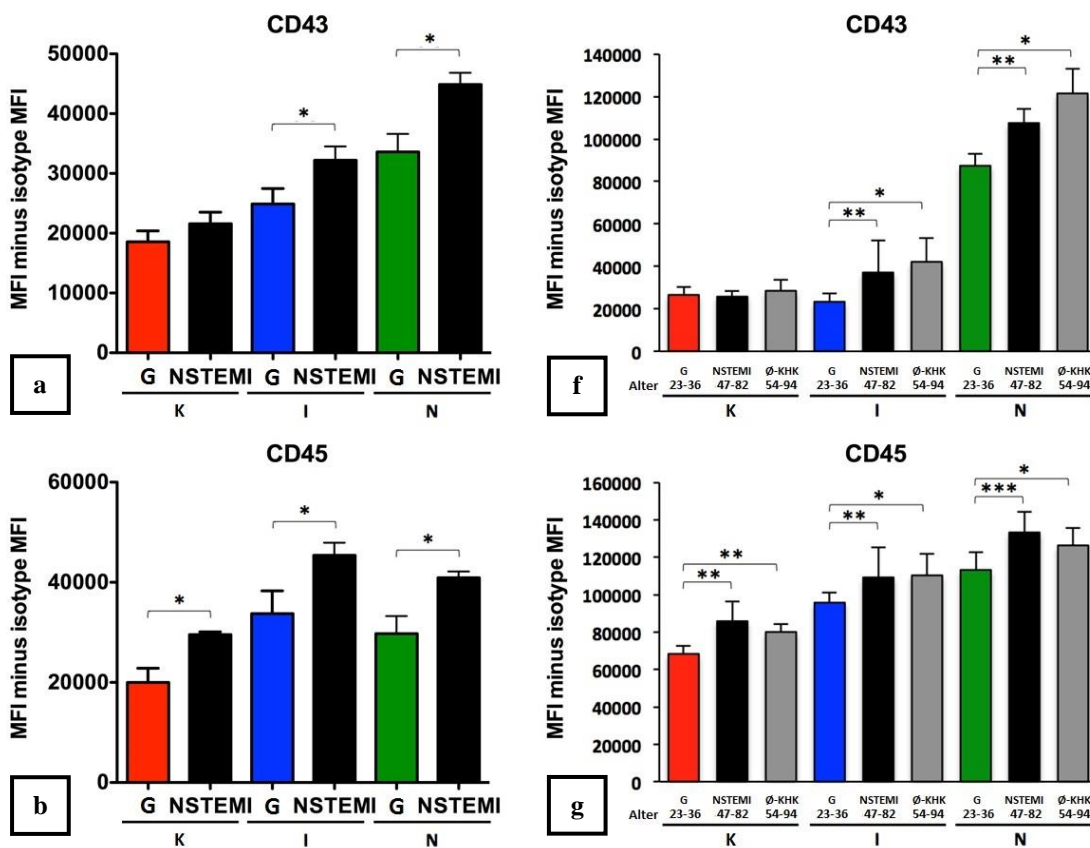


Abbildung 33: Differenzielle Oberflächenmarkerexpression der Monozytensubtypen bei Gesunden und NSTEMI-Patienten. Dargestellt sind Marker, die bei einzelnen Subtypen der Probanden signifikant gegenüber den anderen Subtypen erhöht waren.

Hierbei ergaben sich signifikante Unterschiede bei der Expression von insgesamt 5 Antigenen. Die klassischen Monozyten unterschieden sich bei beiden Kohorten signifikant in der Expression von CD45, CD305, CDw329 und SSEA-1. Intermediäre Monozyten wiesen Signifikanzen bei den Markern CD43, CD45, CD305 und SSEA-1 und nicht-klassische Monozyten bei CD43, CD45 und SSEA-1 auf (s. Abbildung 34 a-e). Eine Validierung dieser Ergebnisse durch konventionelle Durchflusszytometrie mit Antikör-

pern gegen CD43, CD45, CD305, CDw329 und SSEA-1 lieferte bei 12 gesunden Probanden (mittleres Alter 27 Jahre, Varianz: 23-36 Jahre) und 11 NSTEMI Patienten (mittleres Alter 78 Jahre, Varianz: 47-82 Jahre) die gleichen Ergebnisse (s. Abbildung 34 f-k). Hier zeigten sich im Vergleich zu den Resultaten der Screening-Versuche zusätzlich signifikante Unterschiede der Expression von CD305 und CDw329 auf nicht-klassischen Monozyten.

In der Validierung wurde ebenfalls ein Vergleich der Ergebnisse bei Infarktpatienten mit etwa gleichaltrigen, katheterisierten Probanden ohne Nachweis einer KHK durchgeführt. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Differenzen in der Antigenexpression außer bei der Expression von CDw329 und SSEA-1 (s. Abbildung 34 k).



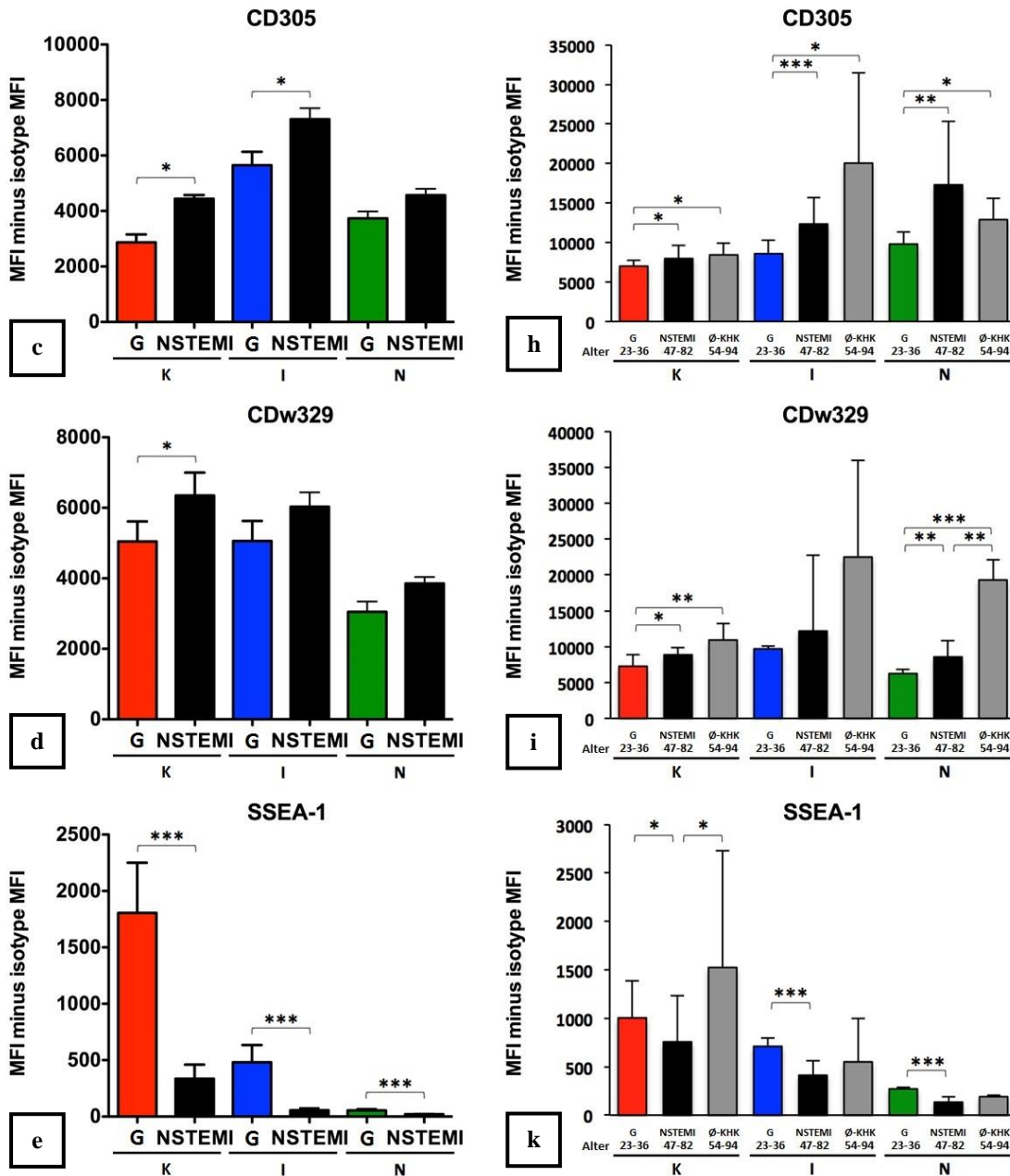


Abbildung 34: Vergleich der Expression von CD43, CD45, CD305, CDw329 und SSEA-1 auf den Monozytensubtypen von jungen Gesunden, NSTEMI-Patienten und ihnen gleichaltrigen Probanden ohne KHK. Die Grafen auf der linken Seite zeigen die Ergebnisse aus den Lyoplate™-Versuchen, die auf der rechten Seite diejenigen der Validierungsversuche. Die statistische Signifikanz wurde mittels Varianzanalyse, gefolgt vom Tukey Post-hoc-Test bestimmt. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,005$ , \*\*\* =  $p < 0,0005$ , ns = nicht signifikant. K = klassische Monozyten, I = Intermediäre Monozyten, N = Nicht-klassische Monozyten, G = Gesunde, Ø-KHK = Patienten ohne interventionellen Nachweis einer KHK

Die Funktionen dieser Marker wurden mit Ausnahme von CDw329 bereits in den Kapiteln 4.4.1 - 4.4.3 beschrieben. CDw329 ist das Siglec-9, ein Sialinsäurerezeptor, der auf allen Leukozyten vorkommt (Zhang et al. 2000). Er dient Monozyten im Phagozyto-

seprozess und regt sie zur Zytokinfreisetzung an (Lock et al. 2004; Lajaunias et al. 2005; Crocker 2005).

## **5 Diskussion**

### **5.1 Limitationen**

#### **5.1.1 Probanden- und Patientenkollektiv**

Zentrales Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer Methode zur Charakterisierung des gesamten Oberflächenmarkerexpressionsprofils aller drei Monozytensubtypen simultan aus derselben Blutprobe. Hierzu wurden junge, gesunde Männer – wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben – als Probanden ausgewählt. Anschließend wurden einige Marker bei NSTEMI-Patienten in Abgrenzung zu gleichaltrigen, herzgesunden Patienten bestimmt, um Einflüsse des akuten Infarktgeschehens auf Monozytensubtypen und ihre Rolle dabei zu untersuchen.

Es wurden nur Männer und keine Frauen ins Untersuchungskollektiv eingeschlossen, um bei der recht begrenzten Probandenanzahl ein möglichst homogenes Kollektiv zu erhalten und unter anderem die möglichen Einflüsse hormoneller, zyklusabhängiger Unterschiede zwischen den Geschlechtern auf das Immunsystem auszuschließen.

Auch bei den Patienten wurden nur Männer eingeschlossen, da es sowohl in der Häufigkeit des Auftretens, der Pathophysiologie, den Risikofaktoren und der Ausprägung der Symptome eines Herzinfarkts Unterschiede zwischen den Geschlechtern gibt (Blomkalns et al. 2005; Maas und Appelman 2010). Somit sind die Ergebnisse dieser Analyse jedoch nicht ohne Weiteres auf Frauen übertragbar.

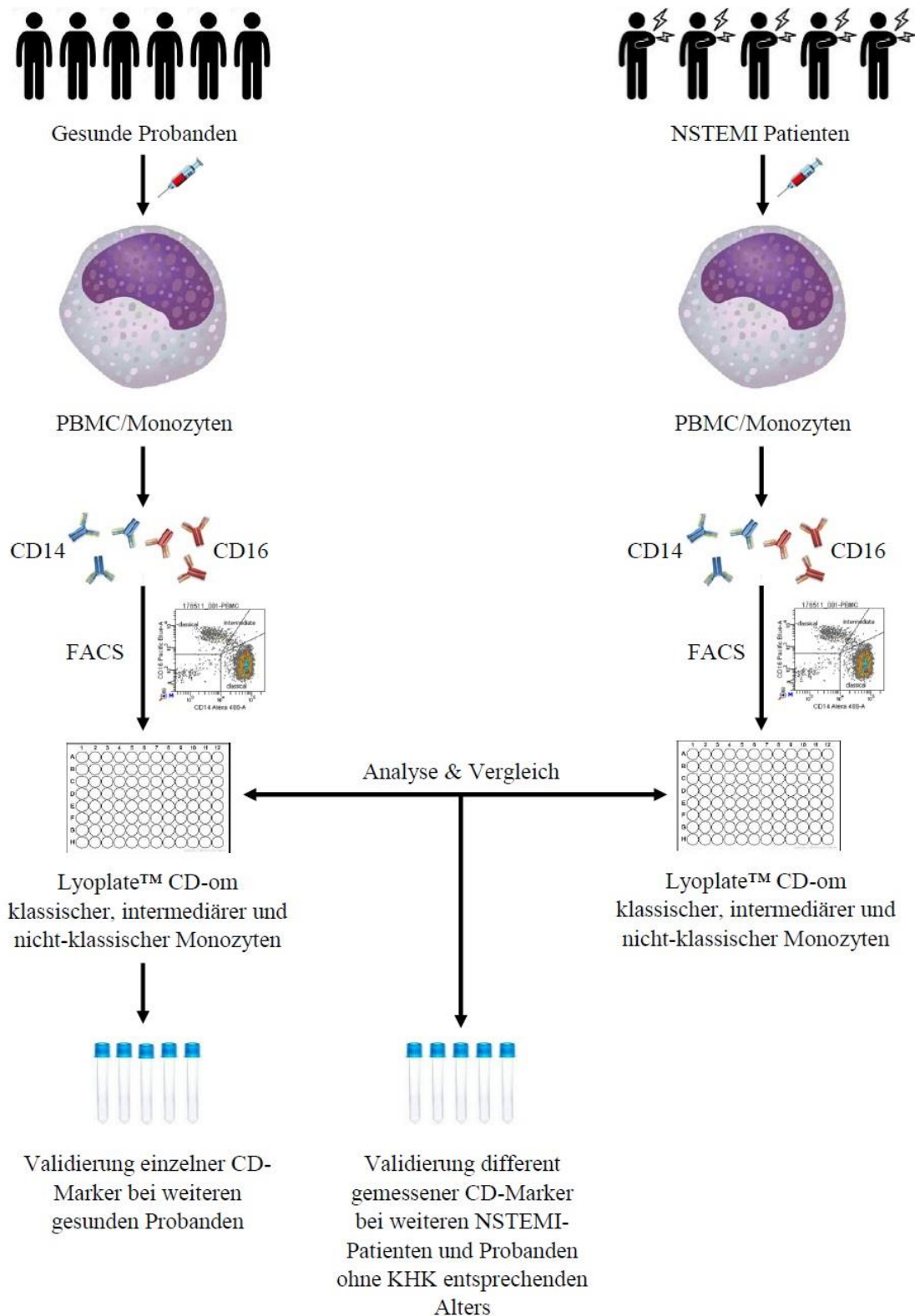


Abbildung 35: Schematische Darstellung des Versuchs- und Auswertungsablaufs. Den Probanden und Patienten wurde Blut abgenommen, PBMC daraus isoliert und diese in einer FACS-Analyse so gefärbt, dass man für die Subtypen der Monozyten jeweils ihre CD-Antigenexpression darstellen konnte. Diese wurde mit statistischen Verfahren ausgewertet und verglichen. Anschließend wurde die Methodik validiert, indem einzelne, bei Subtypen in den Versuchen bzw. in der Literatur verstärkt oder vermindert exprimierte Marker bei weiteren ge-

sunden Probanden getestet wurden. Zudem wurden die Ergebnisse der NSTEMI-Proben bei weiteren NSTEMI-Patienten und ihnen altersentsprechenden Probanden ohne KHK anhand ausgewählter Marker überprüft.

### **5.1.2 Limitierende Faktoren der PBMC-Analyse bei Infarktpatienten**

Der Zeitpunkt des Eintreffens eines Infarktpatienten in der Klinik ist variabel, ebenso sein Zustand. So ist es unterschiedlich, wann bei einem Patienten mit einem frischen Infarkt Symptome auftreten und er dahingehend handelt. Akute Myokardinfarkte unterliegen starken zirkadianen Varianzen und treten gehäuft in den frühen Morgenstunden aus dem Schlaf heraus auf (Peters et al. 2002; Khan und Ahmad 2003). Außerdem gibt es Patienten, die gar keine Symptome verspüren (Dorr 2010). Zwischen dem Auftreten einer kardialen Gefäßokklusion bzw. Minderperfusion, dem Auftreten von Symptomen (engl. *Onset-of-pain*) und dem Absetzen eines Notrufs können verschiedene, zum Teil retrospektiv nicht mehr klar erfassbare Zeitabstände liegen.

Des Weiteren sind Auswirkungen der Akutmedikation auf humorale Faktoren und Zellaktivierungen nicht auszuschließen. Das Standardprozedere beinhaltet z. B. Thrombozytenaggregationshemmer, Heparin, Morphin, Nitrate, Betablocker und gegebenenfalls eine supportive Sauerstoffgabe. Thrombozytenaggregationshemmer wie Acetylsalicylsäure (ASS) wirken auch antiinflammatorisch und können beispielsweise die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen inhibieren (Signori et al. 2009). Dabei wirken sie vermutlich auf das Rezeptorprofil der Monozytenoberfläche. Auch Heparin (Leung et al. 1989; Heinzelmann und Bosshart 2005), Morphine (Singhal et al. 1998) und manche Betablocker (Muthu et al. 2009) interagieren nachgewiesenermaßen mit Monozyten.

All diese Faktoren können den Status und den Fortschritt der Immunreaktion auf das Ereignis hin bei Eintreffen in der Klinik und Abnahme der Blutprobe beeinflussen. So hätte man für eine genauere Abbildung der pathophysiologischen Merkmale ein Tierversuchsmodell zum Herzinfarkt wählen können. Dies wäre jedoch nicht direkt auf die klinische Realität und den Menschen übertragbar. Darüber hinaus wird – wie von unserer Arbeitsgruppe gezeigt – die Immunzell- und insbesondere Monozytensubtypendynamik nach Myokardinfarkt in einem Mausversuchsmodell ebenso von verschiedenen



Faktoren – einschließlich interindividueller Variabilität sowie invasiver bzw. operativer Prozeduren – maßgeblich beeinflusst (Hoffmann et al. 2014).

### **5.1.3 Altersunterschied und Vorerkrankungen**

Die Wahl von jungen, gesunden, männlichen Probanden ermöglichte eine Analyse der Monozytensubtypen in einem Kollektiv, das möglichst unbeeinflusst und homogen in Bezug auf Alter, Geschlecht, Krankheitsgeschichte, variierende Lebensweise und Medikamenteneinnahme war. Besonders das Alter hat einen großen, multifaktoriellen Einfluss auf das Immunsystem und die Monozytensubtypen (Tollerud et al. 1989; Shaw et al. 2013). So wiesen z. B. Seidler et al. (2010) für das Alter höhere Zahlen an nicht-klassischen Monozyten mit teilweise abweichender Rezeptorexpression (erniedrigtes HLA-DR und CX3CR1) nach.

Aus diesem Grund wurde den Infarktpatienten eine mit dem Alter übereinstimmende Studiengruppe von Patienten gegenübergestellt, bei denen eine KHK interventionell ausgeschlossen worden war (s. Kapitel 3.2.2). Somit konnte der Einfluss des Alters trotzdem herausgestellt und berücksichtigt werden.

Obwohl Ausschlusskriterien wie das Vorliegen rheumatischer und allgemein chronisch-entzündlicher Erkrankungen sowie chronische oder akute Infekte bei allen Individuen definiert wurden, ist es möglich, dass diese dennoch subklinisch und unerkannt vorlagen und die Ergebnisse beeinflussten. Auch das Maß der Ausprägung kardialer Risikofaktoren ist bei allen Probanden variabel. Dies ist bei der Interpretation der Versuchsergebnisse zu berücksichtigen (s. Tabelle 7 „Risikofaktoren und medikamentöse Therapie der NSTEMI-Patienten und Patienten ohne KHK“ im Anhang).

### **5.1.4 Vergleich mit NSTEMI-Patienten**

NSTEMI machen den größten Teil der Myokardinfarkte aus (Lloyd-Jones et al. 2009). Im Gegensatz zum STEMI sind die diagnostischen Möglichkeiten beim NSTEMI auf Biomarker beschränkt. Mittels hsTNT/I kann man innerhalb von etwa 1-3 Stunden nach Symptombeginn mit großer Sicherheit bestimmen, ob ein NSTEMI anzunehmen oder auszuschließen ist (Roffi et al. 2016). Verglichen mit der wenig zeitaufwändigen EKG-

Analyse beim STEMI ist dies ein recht großer Zeitraum. Je länger die Kardiomyozyten einer Ischämie ausgesetzt sind, desto größer ist das Risiko für bleibende Myokardschäden. Da der Gefäßverschluss in den meisten Fällen partiell bis subtotal auf dem Boden einer Gefäßerosion vorliegt (s. Kapitel 1.1.4), variiert die Größe und Ausdehnung des Infarktareals von Patient zu Patient stark.

NSTEMI-Patienten sind weitaus heterogener als STEMI-Patienten und das Infarktstadium bei Eintreffen in der Klinik ist variabler, da die Symptomatik oft undeutlicher und weniger ausgeprägt ist. Zudem sind sie in der Regel älter, haben mehr Komorbiditäten (Diabetes mellitus Typ 2, chronische Niereninsuffizienz, etc.) als STEMI-Patienten und ihre Therapie ist von der anderer ACS-Entitäten verschieden (Hamm 2009; Paxinos und Katritsis 2012). Deshalb sind sie bisher weniger erforscht, weswegen sie als Kernkollektiv für die Versuche dieser Arbeit gewählt wurden.

### **5.1.5 Probengewinnung und -verarbeitung**

Die Proben der gesunden Kontrollen wurden direkt im Labor entnommen. Um modulierende Einflüsse auf die PBMC nach der Blutentnahme zu minimieren, ist sowohl die Wahl des Antikoagulans in den Blutentnahmeröhrchen als auch das methodische Vorgehen bei der Weiterverarbeitung entscheidend (Basavaraj et al. 2012).

Frühe Versuche mit S-Monovetten von der Firma Sarstedt hatten den Vorteil, dass sie EDTA als Antikoagulans enthielten, das von allen gängigen Antikoagulantien die geringste Beeinflussung von Immunzellen zeigt (Basavaraj et al. 2012). Nachteilig war jedoch, dass mehrere Bearbeitungsschritte (Umfüllen in Zentrifugenröhrchen, Verdünnen, Auftragen auf Histopaque® 1077, behutsames Absaugen) in der Folge notwendig waren, die potentiell durch längere Bearbeitungsdauer und den Kontakt von Monozyten mit mehreren Fremdoberflächen und Lösungen zu einer Modulation bzw. Aktivierung der Zellen geführt haben. Deshalb wurde letztlich ein vorgefertigtes Entnahmesystem zur Probenentnahme gewählt (BD Vacutainer® Mononuclear CPT™). Sie können mithilfe eines Adapters mit denselben Safety-Multifly-Kanülen zur Blutentnahme verwendet werden, enthalten jedoch bereits eine fixierte Ficollphase, weswegen all die anderen separaten, oben genannten Arbeitsschritte zu Separation der PBMC entfallen. BD Biosciences bot sie nur mit Heparin oder Natrium-Citrat an, nicht aber mit EDTA. Für

die Versuche wurden jene mit Citrat verwendet, auch wenn es neuere Hinweise gibt, dass auch Citrat Monozyten beeinflussen kann (Ashbrook et al. 2015). Der Einfluss bezog sich aber vorwiegend auf Stimulationsversuche und schien somit für die hier durchgeführten Versuche vertretbar zu sein, insbesondere weil viele ebenfalls potentiell modulierende Arbeitsschritte dadurch vermieden werden konnten. Das weitere Vorgehen mit den CPT™ erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers (BD Biosciences 2016).

### **5.1.6 Einfrieren und Auftauen**

Das Einfrieren von PBMC wurde nach derzeit gängigen Methoden durchgeführt. So wurde das Einfrieremedium mit 10 % DMSO versetzt. Diese Konzentration sollte, wie Nazarpour et al. (2012) nachgewiesen haben, nicht weit überschritten werden, da DMSO zytotoxisch wirksam ist. Es verhindert beim Einfriervorgang die Schädigung der Zellen durch das Entstehen spitzer Eiskristalle, welche die Zellmembranen der PBMC beschädigen würden. Des Weiteren wurden die Zellen bei längerer Lagerung nach dem behutsamen Einfriervorgang in Flüssigstickstoff gelagert und zu Beginn der Versuche binnen 10 min. in einem 37° C warmen Wasserbad aufgetaut (Mallone et al. 2011; Ramachandran et al. 2012; Nazarpour et al. 2012).

Wie in Kapitel 4.1 beschrieben, führte diese Vorgehensweise dazu, dass die Proben nach dem Auftauen für die Versuche noch durchschnittlich 93 % vitale Zellen enthielten, was durchaus gut bis durchschnittlich verglichen mit sehr variablen Ergebnissen anderer Forschungsgruppen ist. So geben Cox et al. (2005) eine mediane Vitalität von 86 % (mit großer Varianz von 24,8 % bis 100 %) bei 11 Laboren an. Mallone et al. (2011) erreichten 92 – 94 % vitale Zellen bei sehr ähnlichem Vorgehen wie bei dieser Arbeit.

### **5.1.7 Monozyten als Forschungsfokus**

Monozyten sind – wie in Kapitel 1.2.2.2 erläutert – in allen Bereichen der Ätiologie und Pathogenese des Myokardinfarkts von der Atherosklerose bis hin zur Narbenbildung involviert (Ghattas et al. 2013; Dutta und Nahrendorf 2015). Sie sind Teil der angebore-

nen Immunabwehr und wurden zunächst nur auf ihre Funktionen im Hinblick auf Infektgeschehen und Erregerabwehr untersucht. Seit einiger Zeit weiß man, dass sie eine entscheidende Rolle bei der sterilen Inflammation – wie z. B. beim Myokardinfarkt – spielen (Nahrendorf et al. 2010; Frantz und Nahrendorf 2014; Dutta und Nahrendorf 2014). Wie genau die einzelnen Subtypen Einfluss auf den Prozess nehmen, ist bisher nur unzureichend geklärt. Tsujioka et al. (2009) fanden heraus, dass die einzelnen Subtypen notwendig sind für einen gelungenen Heilungsprozess, aber dass sowohl erhöhte als auch erniedrigte Zellzahlen klassischer Monozyten nachteilig für die Prognose sind (s. auch Kapitel 1.2.2.4). Auch hier sind genaue Mechanismen und die individuellen biologischen Funktionen der Subtypen bisher nicht vollständig verstanden. Es ist jedoch äußerst wahrscheinlich, dass ihnen unterschiedliche Rollen in der Homöostase und der Inflammation zukommen (Ziegler-Heitbrock 2007; Auffray et al. 2007; Nahrendorf et al. 2007; Zhao et al. 2009). Deshalb wurden die CD-Merkmale der Subtypen in dieser Arbeit systematisch analysiert und mit Hinblick auf ihre Funktionalität hin geclustert.

Bei Monozyten handelt es sich um eine hochkomplexe Zellentität des Immunsystems. Wong et al. (2011) haben die Genexpressionsprofile der Monozytensubtypen mithilfe transkriptomischer Mikroarrays herausgestellt und verglichen, Gren et al. (2015) machten daraufhin eine Einzelzellgenexpressionsanalyse mittels Polymerase-Kettenreaktion. Beide Studien wiesen eine Vielzahl von exprimierten Oberflächenproteinen nach. So entstand die Idee, die Oberflächenexpressionsprofile der einzelnen Subtypen darzustellen, zu analysieren und zu prüfen, ob ein kardiales Infarktgeschehen frühzeitige Auswirkungen auf das Antigenmuster der Monozytenoberflächen hat und es moduliert. Dies würde die Chance bieten, dabei eventuell neuartige Biomarker oder pharmakologische Angriffspunkte zu entdecken, um die Diagnostik und Infarktheilung zu verbessern. Deshalb entwickelten wir zunächst eine neuartige Methode, um in einer einzelnen Probe simultan klassische, intermediäre und nicht-klassische Monozyten separat auf ihre Oberflächenmarkerexpression hin zu untersuchen. Anschließend sollte deren Validität überprüft und auf gleiche Weise Veränderungen des Expressionsprofils durch die Akutphase eines NSTEMI ermittelt werden.

### 5.1.8 Durchflusszytometrie und Konzept der Screening-Methode

Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit, in kurzer Zeit große Zellmengen zuverlässig zu analysieren. Je mehr antigengekoppelte Fluorochrome in der Probe im Durchflusszytometer detektiert werden können, desto höher ist die aufgezeichnete Intensität. Durch die Antikörper-Antigenbindung entspricht dies dem Maß der Antigenexpression. Hier sollten in derselben Messung klassische, intermediäre und nicht-klassische Monozyten separat untersucht werden, weshalb das herkömmliche Färbeprotokoll erweitert wurde. Nach der Inkubation mit den Primär- und Sekundärantikörpern wurde ein weiterer Färbeschritt eingebaut, in dem die Zellen mit fluorochromgekoppelten anti-CD14- und anti-CD16-Antikörpern inkubiert wurden. Die entsprechenden Antigene dienen anhand der international etablierten Nomenklatur nach Ziegler-Heitbrock et al. (2010) zur Auftrennung der Monozytensubtypen. Essentiell war zudem, diesen Färbeschritt erst nach der Anwendung der Primär- und Sekundärantikörper durchzuführen, da bei vorheriger Applikation die allgemein für humane Antikörper sensitiven Sekundärantikörper auch diese binden und so zu falsch hohen Fluoreszenzintensitäten in der Probe führen würden.

Bereits vor der Inkubation mit den Primärantikörpern wurde ein Fc-Rezeptorblock (*Human TruStain FcX™ Fc Receptor Blocking Solution*) verwendet. Dieser blockiert freie Fc-Rezeptoren, um zu verhindern, dass diese unspezifisch Primärantikörper binden und so falsch höhere Fluoreszenzintensitäten verursachen. Nachteilig könnte an diesem Schritt sein, dass dafür in Folge das Ergebnis einiger zu testender Fc-Rezeptoren falsch niedrig ausfällt. Der Hersteller BioLegend gibt an, dass die angewendeten Antigenklone für die Fc-Rezeptoren CD16 (Klon: 3G8) und CD64 (Klon: 10.1) kompatibel mit dem Fc-Rezeptorblock seien (BioLegend). Ein Einfluss auf das Ergebnis für Fc-Rezeptoren wie CD23, CD32 (anderer Klon) und CD89 kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Nekrotische Zellen mit defekten Membranen stellen ebenfalls eine relevante Quelle unspezifischer Antikörperbindestellen dar. Diese wurden mithilfe des *LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain Kit* von der Erfassung der Monozytendaten ausgeschlossen. Sie beinhalten einen fluoreszenzaktiven Farbstoff, der mit freien Aminen im Zellinneren und auf der Zelloberfläche reagiert. Bei nekrotischen Zellen mit durchlässigerer Membran binden die Farbpartikel sowohl im Zellinneren als auch an der Zelloberfläche und

führen zu einer intensiven Fluoreszenz im entsprechenden Laserkanal des Durchflusszytometers. Bei vitalen Zellen binden sie nur Amine auf der Zelloberfläche. Hierdurch entsteht in der Regel ein Intensitätsunterschied um mehr als das 50-fache zwischen lebenden und abgestorbenen Zellen, weshalb sie bei der Erfassung gut zu unterscheiden sind.

## 5.2 Separationsmerkmale der Monozytensubtypen

Im Rahmen der linearen Regression (s. Kapitel 4.3, Abbildung 14) konnte die Methode auch auf ihre Validität im Hinblick auf herkömmliche Subtypenmarker überprüft werden. Bei der Analyse ist CD16 deutlich intermediären und vor allem nicht-klassischen Monozyten beim Vergleich mit dem klassischen Subtyp zugeordnet (s. Abbildung 14 a & b). CD14 ist klar dem intermediären und vor allem klassischen Subtyp zugeordnet im Vergleich mit nicht-klassischen Monozyten (s. Abbildung 14 a & c) und stellt sich indifferent dar, also in sehr gleicher Ausprägung im Vergleich klassischer mit intermediären Monozyten (s. Abbildung 14 b). Somit teilt das Lyoplate™-Screening die Subtypen zuverlässig nach etablierten Markern ein: klassische Monozyten  $CD14^{++}CD16^{-}$ , intermediäre Monozyten  $CD14^{++}CD16^{+}$  und nicht-klassische Monozyten  $CD14^{+}CD16^{++}$ . Als weitere Validierung der Methodik wurden zufällig ausgewählte Marker aus den Lyoplate™-Versuchen an PBMC-Proben anderer gesunder, junger Männer als Einzelmarkerfärbung gemessen (s. Abbildung 28). Dies lieferte stets kohärente Resultate.

Die Hauptkomponentenanalyse mit allen im Lyoplate™-Screening analysierten Markern war jedoch zunächst nicht in der Lage, die Monozyten in die klassifizierten Subtypen zu unterteilen (s. Kapitel 4.2, Abbildung 11). Vor allem die HLA-Antigene sorgten für eine unsaubere Auftrennung der Subtypen entlang der Hauptkomponenten (Abbildung 11b). Vor allem HLA-DR wird gerne als Marker verwendet, um CD16-positive Monozyten von CD16-positiven Natürlichen Killerzellen zu separieren und es wurde festgestellt, dass vor allem intermediäre Monozyten hohe Konzentrationen daran exprimieren (Abeles et al. 2012; Appleby et al. 2013). Letzteres ist gut nachzuvollziehen, da die Streuung durch HLA-DR (bezeichneter Pfeil) vorwiegend in den Bereich des intermediären Subtyps verweist (Abbildung 11b). Es liegt also nahe, dass diesem antigenpräsentierende Funktionen zukommen. Dies wiesen auch Wong et al. (2011) auf transkriptioneller Ebene nach.

Die Gesamtheit der HLA-Antigene in den Proben erschwert jedoch die Auftrennung der Subtypen, was dadurch erklärbar ist, dass HLA-A, HLA-B und HLA-C (MHC Klasse I) von allen Leukozyten und somit auch allen Monozyten exprimiert werden (Choo 2007). Da das Expressionsprofil an HLA-Antigenen außerdem, unabhängig vom Zelltyp, von Individuum zu Individuum äußerst verschieden ist (Janeway et al. 2001), eignet es sich nicht dazu, interindividuelle Vergleiche anzustellen, um funktionell zusammenhängende Zellgruppen zu definieren. Durch Ausschluss der HLA-Antigene von der Hauptkomponentenanalyse konnte mit den restlichen 237 Oberflächenmarkern eine klare Abgrenzung der drei Monozytensubtypen voneinander erreicht werden (s. Kapitel 4.2, Abbildung 12). Dies bekräftigt die Anwendung eines erweiterten Lyoplate™- Screenings als valide Methode zur Oberflächenmarkeranalyse von humanen Monozytensubtypen.

### **5.3 Analogiemerkmale der Monozytensubtypen**

Eine derzeit zentrale und noch nicht endgültig geklärte Frage in der Monozytenforschung ist, ob die drei Subtypen jeweils verschiedene Endpunkte in der Differenzierung einzelner Progenitorzellen oder unterschiedliche Differenzierungsstadien derselben Zelle darstellen. Ziegler-Heitbrock et al. (2010) schlugen in ihrer Nomenklatur der drei Subtypen vor, intermediäre Monozyten als Zwischenstadium in der Differenzierung von klassischen hin zu nicht-klassischen Monozyten anzusehen. Passend dazu zeigten Rogacev et al. (2015), dass im Verlauf nach Knochenmarktransplantation mit totaler Immunsuppression zuerst klassische, dann intermediäre und zuletzt nicht-klassische Monozyten im Blut nachweisbar wurden. Abschließende Beweise für diese Hypothese gibt es aber nach wie vor nicht (Ziegler-Heitbrock und Hofer 2013; Ziegler-Heitbrock 2015). Im Gegensatz dazu zeigten Mandl et al. (2014), dass im Knochenmark residierende Monozyten phänotypisch dem intermediären Subtyp am ähnlichsten sind. Sie proklamierten, dass sich diese in der Blutbahn dann entweder zu klassischen oder zu nicht-klassischen Monozyten differenzierten.

Auf der Suche nach Zusammenhängen zwischen den Subtypen wiesen Wong et al. (2011) einen graduellen Wandel in der Expression von Genen nach, die auf den Reifegrad der Zelle hinweisen. In ihrer Mikroarraystudie exprimierten klassische Monozyten Gene, die auf ein antiapoptotisches, proliferatives Stadium hinwiesen. Intermediäre und nicht-klassische Monozyten zeigten beide eine hohe Aktivität an Differenzierungsge-

nen, nicht-klassische jedoch zusätzlich Gene, die ein proapoptisches, antiproliferatives Stadium indizierten. Außerdem konstatierten sie einen graduellen Wandel in der Expression einiger Oberflächenmarker, indem sie die Fraktion der intermediären Monozyten im FACS weiter untergliederten. Weiter verglichen sie die Anzahl unterschiedlich exprimierter Gene zwischen den drei Subtypen, bei denen der Expressionsunterschied mindestens das 1,5-fache betrug. Die Genexpression zwischen intermediären und nicht-klassischen Monozyten zeigte sich am ähnlichsten, da nur 249 Gene um mehr als das 1,5-fache differenziell exprimiert wurden (Abbildung 36). Klassische und intermediäre Monozyten sind mit 942 unterschiedlich exprimierten Genen schon deutlich differenter.

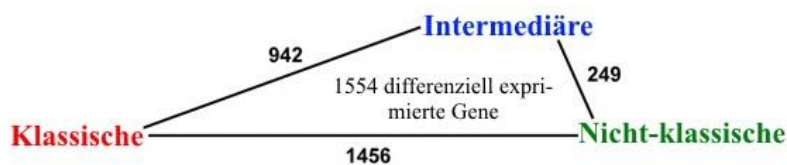


Abbildung 36: Ähnlichkeitsbeziehung der drei Monozytensubtypen auf transkriptioneller Ebene. Vergleich von 1554 differenziell exprimierten Genen, die zwischen den Subtypen mindestens um das 1,5-fache verschieden exprimiert wurden. Die Zahlen an den Kanten geben die Anzahl solcher signifikant verschieden exprimierter Gene an. Die Länge der Linien zwischen 2 Subtypen ist proportional zu dieser Anzahl (angelehnt an Wong et al. 2011).

Im letzten Vergleich weisen klassische und nicht-klassische Monozyten mit 1456 unterschiedlich exprimierten Genen die größten Differenzen auf. Die Längen der Linien in der Grafik repräsentieren zur visuellen Verdeutlichung die Anzahl differenziell exprimierter Gene.

Die vorliegenden Ergebnisse der Lyoplate™-Versuche bestätigen jene aus den Versuchen von Wong et al. (2011). Bei der Auswertung und Veranschaulichung der Daten wurde, wie in Kapitel 4.3 dargestellt, Spearmans Rangkorrelationskoeffizient verwendet, um die Analogien bzw. Differenzen zwischen den drei Monozytensubtypen aufzuzeigen. Abbildung 13 dort zeigt als Heatmap die Rangkorrelation. Es ist dabei deutlich zu erkennen, dass das Oberflächenmarkerprofil von klassischen und nicht-klassischen Monozyten am wenigsten Ähnlichkeiten zeigt, analog zu den transkriptionellen Untersuchungen von Wong et al. (2011). Auf Ebene der Oberflächenmarkerexpression lässt sich nicht abschließend klären, ob der intermediäre Subtyp nun mehr Analogien zum klassischen oder nicht-klassischen Typ aufweist, aber eine Tendenz der höheren Korrelation mit nicht-klassischen Monozyten lässt sich hier ebenfalls statuieren.



Dies ergab auch eine Analyse der Daten mittels linearer Regression (s. Abbildung 14a – c Kapitel 4.3). Ausgewogen zwischen den verglichenen Subtypen exprimierte Marker befinden sich entlang der Ausgleichsgeraden durch die Punktwolke. Je weiter Punkte von dieser Linearen abweichen, desto höher ist der zugehörige Marker auf der Oberfläche des jeweiligen Subtyps (x- oder y-Achse) konzentriert. Beim Vergleich klassische versus nicht-klassische Monozyten ist die Streuung des *Dotplots* sehr breit, was für eine geringe Oberflächenmarkerkorrelation spricht (Abbildung 14a). Im Vergleich klassische versus intermediäre Monozyten (Abbildung 14b) sind die Punkte deutlich linearer verteilt, aber immer noch weiter verstreut als zwischen dem intermediären und nicht-klassischen Subtyp, welche die geradlinigste Korrelation aufzeigen (Abbildung 14c).

Diese Ergebnisse bekräftigen die in Kapitel 1.2.1 genannte Hypothese vorausgegangener Studien, dass intermediäre Monozyten phänotypisch am nächsten mit nicht-klassischen Monozyten verwandt sind und vermutlich eine Art Differenzierungszwischenstufe von klassischen zu nicht-klassischen Monozyten darstellen (Ancuta et al. 2009; Wong et al. 2011; Gren et al. 2015). Somit konnten in voneinander unabhängigen Studien sowohl auf transkriptioneller Ebene (Wong et al. 2011) als auch bei diesen Versuchen zur Immunphänotypisierung Belege in gleicher Auslegung für diese Hypothese gewonnen werden.

#### **5.4 Differenzielle Antigenexpression der Monozytensubtypen**

Mithilfe der edgeR-Software konnte aus den Daten ermittelt werden, welche Oberflächenepitope von den jeweiligen Subtypen markant unterschiedlich exprimiert wurden. In Tabelle 9 im Anhang und auszugsweise in Abbildung 15 (s. Kapitel 4.4) sind diese Erkenntnisse veranschaulicht. Erwartungsgemäß befinden sich CD14 und CD16 unter den 30 Markern mit der größten Signifikanz differenzieller Expression. Auffällig ist jedoch, dass CD16 dabei auf Rang 4 und CD14 sogar nur auf Rang 29 liegt. Die internationale Nomenklatur von Ziegler-Heitbrock et al. (2010) zeigt, dass die Varianz von CD16 zwischen klassischen, intermediären und nicht-klassischen Monozyten größer ist als die von CD14: klassische Monozyten  $CD14^{++}CD16^{-}$ , intermediäre Monozyten  $CD14^{++}CD16^{+}$  und nicht-klassische Monozyten  $CD14^{+}CD16^{++}$ . Dies bestätigt das Rangverhältnis der beiden Oberflächenmarker untereinander. Die anderen, noch deutlich differenzieller exprimierten Marker könnten bei Untersuchungen als Ergänzung zur

verfeinerten Kontrastierung der Subtypen zueinander genutzt werden. Klassische Monozyten werden durch stärkere Expression von 11 dieser 30 differenziellen Epitope definiert, intermediäre nur durch 5 von 30 und nicht-klassische sogar durch 14 von 30.

Im Abgleich mit der umfangreichen Datenbank des *Human Leucocyte Differentiation Antigen Workshop 9* der Organisation *Human Cell Differentiation Molecules* werden die meisten der in dieser Auswertung auffälligen Marker bestätigt. Zu CD66a,c,d,e (CEACAM), CD294 (Prostaglandin-D<sub>2</sub>-Rezeptor), CD71 (Transferrinrezeptor) und CD271 (Rezeptor des Nervenwachstumsfaktors) gab es darin aber bezüglich der Expression auf Monozyten noch keine Erkenntnisse (Diaz-Ramos et al. 2011). In den Daten der Lyoplate™-Versuche werden diese jedoch eindeutig von Monozyten und besonders vom nicht-klassischen Subtyp exprimiert.

CD66a,c,d,e und CD294 befinden sich bei der Analyse (Abbildung 15) auf Rang 1 und 2, sie sind also die Marker mit der größten differenziellen Expression zwischen den Subtypen. Vorrangig werden sie dabei von nicht-klassischen Monozyten ausgebildet. Dies passt zu den Aussagen von Wong et al. (2011), die das Gen von CD66d unter den 50 höchst exprimierten Genen nicht-klassischer Monozyten und CD294 als einen Marker zur eindeutigen Abgrenzung des nicht-klassischen Subtyps von den anderen fanden. Ältere Studien wiesen den Transferrinrezeptor CD71 auf Monozyten vor allem im Ausreifungsprozess zu Makrophagen nach (Andreesen et al. 1984; Andreesen et al. 1990). CD271 ist zum derzeitigen Stand bei Monozyten noch nicht beschrieben worden.

Des Weiteren zeigen die Ergebnisse einige exprimierte Epitope auf, die Diaz-Ramos et al. (2011) auf Monozyten nicht gefunden hatten. Dazu gehören CD83 (Antigenpräsentation bei Lymphozyten und dendritischen Zellen), CD104 (Integrin  $\beta_4$ ), CD8b (T-Zell MHC-I-Rezeptor), CD140b (*platelet-derived growth factor receptor  $\beta$* ) und CD10 (Neprilysin) (Diaz-Ramos et al. 2011). CD83 wird typischerweise in Monozyten präformiert und erst im Rahmen der Ausreifung und Differenzierung zu Makrophagen oder dendritischen Zellen auf der Zelloberfläche exprimiert (Cao et al. 2005). Auch CD140b wird nicht auf Monozyten selbst, sondern erst bei einer späteren Differenzierung zu Makrophagen ausgebildet (Demoulin und Montano-Almendras 2012). Eine zwar dezentale, aber signifikante Expression auf nicht-klassischen Monozyten, wie sie hier festgestellt wurde, könnte die Hypothese stützen, dass diese ein späteres Stadium der Monozytenmaturation darstellen. Bemerkenswert ist zudem die schwache, aber recht ho-

mogen nachgewiesene Expression von CD8b in der Fraktion der nicht-klassischen Monozyten. CD8b ist spezifisch für zytotoxische T-Zellen (Watkins et al. 2009). Iwasaki et al. (2011) konstatierten zum ersten Mal die Entdeckung CD8b-positiver Monozyten. In ihren Analysen, bei denen sie nur CD14 als Monozytenmarker verwendeten und somit nicht nach Subtypen unterschieden, wiesen sie nach, dass CD8b jedoch nicht von Monozyten selbst gebildet wurde, sondern durch Trogozytose auf diese übertragen worden war. Dabei konjugieren Monozyten mit T-Zellen unter bestimmten Bedingungen im Rahmen von Zell-Zell-Kontakten und es werden Fragmente der Zellmembran samt Oberflächenantigenen übertragen, sodass CD8b in die Zellmembran von Monozyten gelangen kann (Iwasaki et al. 2011). Dies könnte ebenfalls für die oben genannte Hypothese zur Monozytenreifung sprechen, da die Expression von klassischen über intermediäre zu nicht-klassischen Monozyten zunimmt.

Da die Datenauswertung mit der edgeR-Software die differenzielle Expression der Marker detektiert und in eine Rangfolge bringt, ist es möglich, dass sich insgesamt gering ausgeprägte Epitope mit großem Expressionsunterschied zwischen den Subtypen signifikant hervortun. So ist beispielsweise bei CD10, welches sich auf Rang 28 platziert (Abbildung 15), nicht auszuschließen, dass hier ein Artefakt vorliegt, weil nur eine Probe im Bereich der nicht-klassischen Monozyten überhaupt positiv war.

Dennoch ist es durchaus denkbar, dass seit der Charakterisierung und Definition der Monozytensubtypen neue Marker auf Monozyten registriert werden, für die diese Zellen zuvor als negativ galten. Denn der intermediäre und der nicht-klassische Subtyp machen nur etwa 5 % bzw. 10 % der gesamten Monozyten aus (Wong et al. 2011). Somit liegt es nahe, dass Antigene, die spezifisch von intermediären oder nicht-klassischen Monozyten exprimiert werden, in Studien ohne Auftrennung nach Subtypen nicht auffallen, da das Expressionsprofil klassischer Monozyten das Ergebnis dominiert. Jockers und Novak (2006) gaben beispielsweise in ihrer Studie explizit an, dass das Adhäsionsmolekül CD104 auf den von ihnen untersuchten Monozyten nicht exprimiert wurde. Sie verwendeten jedoch nur CD14 zur Identifikation und Separation der Monozyten und gliederten diese nicht mit CD16 in Subtypen auf. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen CD104 erstmals auf nicht-klassischen Monozyten als schwach, aber signifikant gegenüber den anderen Subtypen exprimiert.

Bei der Validierung von 13 Markern aus den Screening-Versuchen bestätigten sich die Ergebnisse (s. Kapitel 4.4.4). Somit ist davon auszugehen, dass die Methode eine technisch korrekte Analyse der Monozytensubtypen ermöglicht.

### 5.4.1 Oberflächenexpressionsprofil klassischer Monozyten

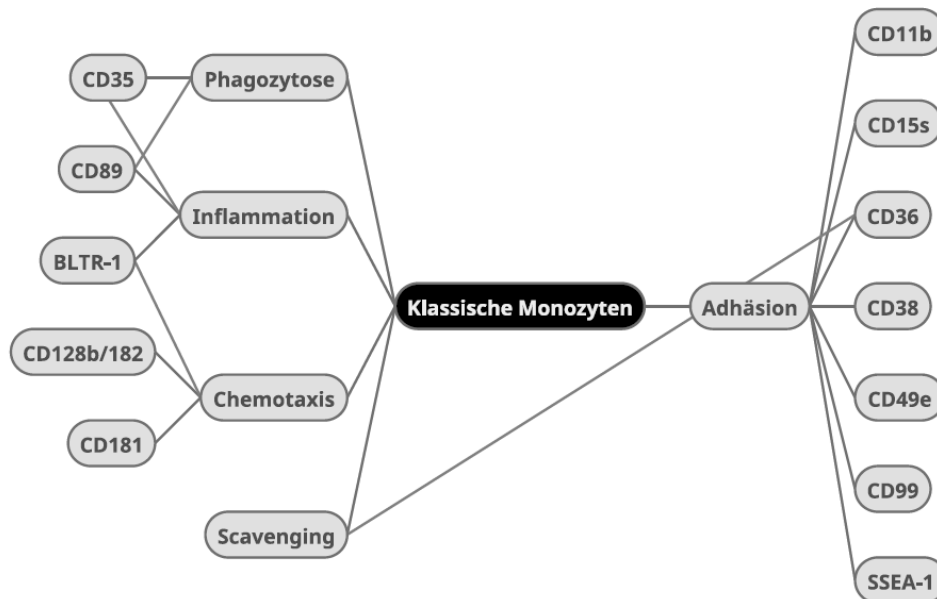


Abbildung 37: Darstellung der Oberflächenmarker klassischer Monozyten nach biologischer Funktionalität.

Die bei den Lyoplate™-Versuchen herausstechenden Oberflächenantigene klassischer Monozyten waren mindestens gegenüber einem der anderen beiden Subtypen signifikant erhöht gemessen worden (s. Kapitel 4.4.1). Anhand ihrer bereits in der Literatur beschriebenen biologischen Funktionen lassen sie sich in Gruppen einteilen (s. Abbildung 37). Einige Antigene erfüllen mehrere nachgewiesene Funktionen, die aber oft miteinander einhergehen. Mehr als die Hälfte der gefundenen Marker dient den Immunzellen zur Adhäsion und Diapedese. Die Übrigen entfallen auf Inflammationsfunktionen wie Chemotaxis, Produktion und Sekretion von Entzündungsmediatoren und Phagozytose.

Passend zu den Ergebnissen von Wong et al. (2011) zeigten die hiesigen Versuche die Expression der Oberflächenmarker CD1d (Antigenpräsentation), CD36 und CD99 als

von klassischen Monozyten dominiert. Gleiches gilt für CDw93 (Phagozytose), den Gren et al. (2015) als für klassische Monozyten charakteristisch statuierten (s. 4.4.4).

Im Fall von CD1d ist in dieser Untersuchung der Unterschied zwischen klassischen und intermediären Monozyten nicht signifikant, aber die Tendenz ebenfalls dieselbe wie in den Resultaten von Wong et al. (2011). Alle anderen Differenzen sind von höchster Signifikanz (s. Abbildung 30). Bei CD9 und CD163 jedoch stimmen die Ergebnisse von Wong et al. (2011) und den Lyoplate™-Versuchen nicht überein, da diese Marker hier bei intermediären Monozyten höher exprimiert wurden, während Wong et al. (2011) sie dem klassischen Subtypen zuordneten (s. Abbildung 22 und Abbildung 30). Dies kann zum einen am möglicherweise unterschiedlichen Gating der beiden Auswertungen liegen und zum anderen daran, dass Wong et al. (2011) eine wesentlich geringere Stichprobengröße bei ihrer Untersuchung hatten:  $n = 5$  im Vergleich zu  $n = 11$  hier.

## 5.4.2 Oberflächenexpressionsprofil intermediärer Monozyten

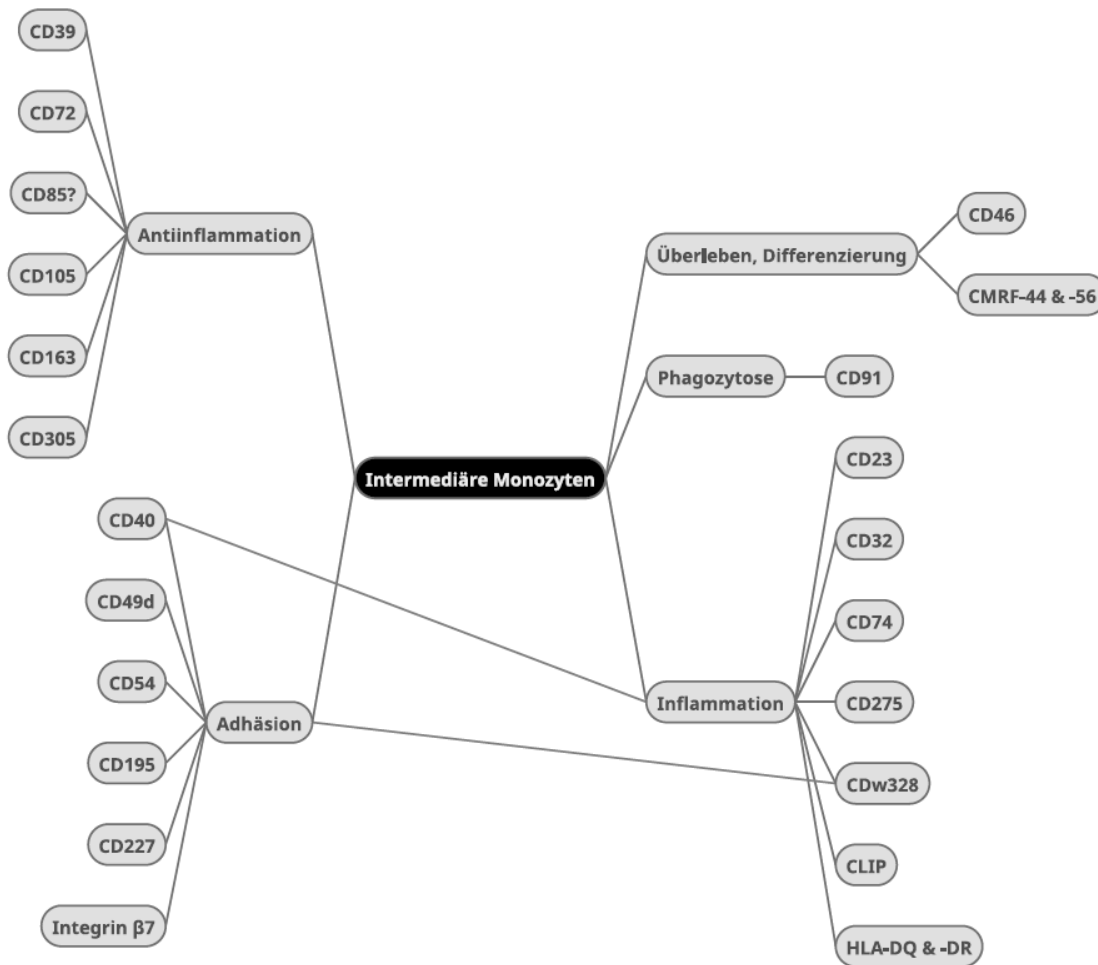


Abbildung 38: Gliederung der Oberflächenmarker intermediärer Monozyten nach biologischer Funktionalität

Wie zuvor schon für klassische Monozyten wurden die Ergebnisse zu Oberflächenantigenen intermediärer Monozyten ihrer Funktionalität nach zur Übersicht gruppiert (s. Abbildung 38). Das Antigenprofil stellt sich hierbei als sehr vielfältig dar. Wie bei allen Monozyten spielen auch beim intermediären Subtyp Adhäsionsmoleküle eine große Rolle. Interessanterweise zeigen sich in annähernd ausgeglichenem Maße Marker, die entzündungsfördernd und entzündungshemmend sind. Besonders CD85, aber auch CMRF-44 und -56 sind in ihrer biologischen Funktion bei Monozyten noch weitestgehend unbekannt, somit ist ihre Einordnung nur spekulativ möglich.

Die Erkenntnisse bestätigen die Beobachtungen von Wong et al. (2011), dass intermediäre Monozyten CD40, CD54 und HLA-DR am höchsten exprimieren (s. Abbildung 19, Abbildung 20 und Abbildung 24). Es war jedoch auch festzustellen, dass es bei der

Ausprägung der HLA-Antigene große interindividuelle Unterschiede gab. Gren et al. (2015) wiesen CD74 als vom intermediären Subtyp am höchsten exprimierten Marker nach, was sich in diesen Resultaten ebenfalls widerspiegelt (s. Abbildung 21). Dies zeugt besonders von hoher Konkordanz der Methodik zur separaten Analyse der Monozytensubpopulationen in einer simultanen Messung.

Die zuvor bereits aufgezeigte Theorie, dass intermediäre Monozyten eine Zwischenstufe und keinen Endpunkt in der Monozytendifferenzierung darstellen, wird von dieser Lyoplate™-Untersuchung unter anderem dadurch bekräftigt, dass bei sämtlichen entweder dem klassischen oder nicht-klassischen Subtyp zugeordneten Antigenen intermediäre Monozyten stets eine intermediäre Expression aufzeigten (s. Kapitel 4.4.1 und 4.4.3). Weitere, bei Wong et al. (2011) bereits als auf intermediärem Niveau exprimiert beschriebene Marker der intermediären Subpopulation wie CD11b, CD33 und CD64, bestätigen sich auch hier (s. Abbildung 16 und Abbildung 31).

### 5.4.3 Oberflächenexpressionsprofil nicht-klassischer Monozyten

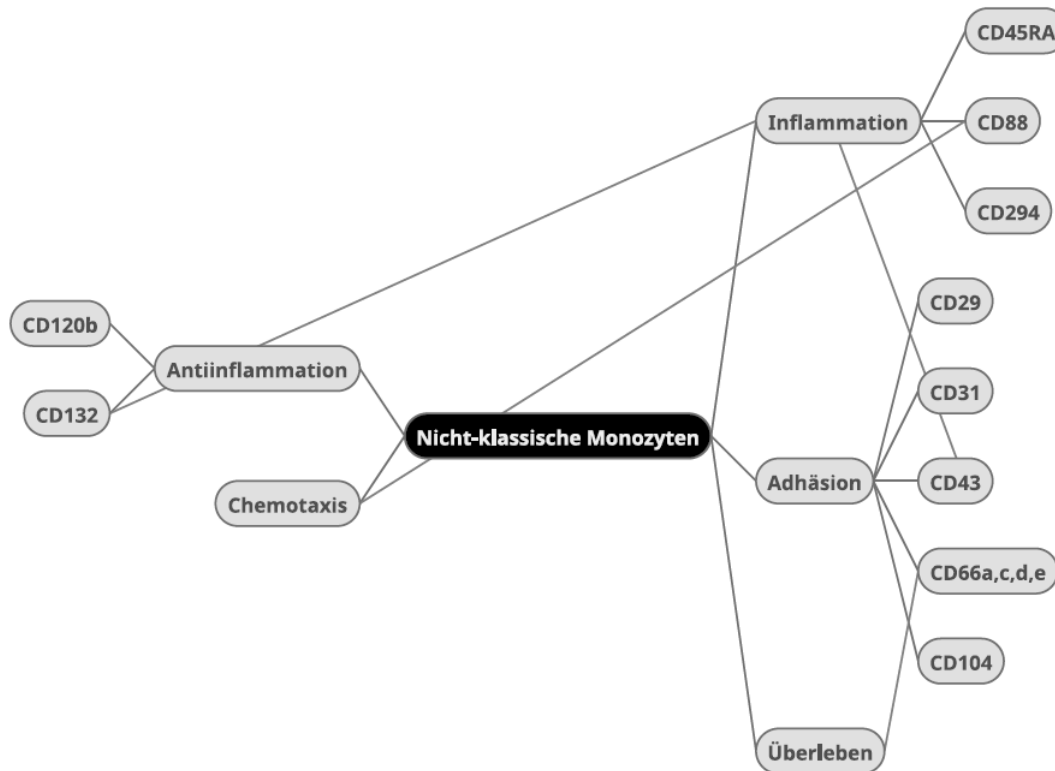


Abbildung 39: Darstellung der Oberflächenantigene nicht-klassischer Monozyten nach biologischer Funktionalität

Auch bei nicht-klassischen Monozyten machen die Zelladhäsionsmoleküle etwa die Hälfte der differenziell exprimierten Antigene aus. Ähnlich wie bei intermediären Monozyten zeigt dieser Subtyp sowohl Marker, die proinflammatorisch wirksam sind, als auch Marker, die antiinflammatorisch wirken (s. Abbildung 39). Insgesamt ist das funktionelle Markerspektrum dieser beiden Subtypen konkordanter als jeweils verglichen mit klassischen Monozyten. Über die ebenfalls differenziell ausgeprägten Antigene CD75 und CD244 ist in Bezug auf Monozyten zum Zeitpunkt der Niederschrift zu wenig Funktionelles bekannt, um sie konkret einer Kategorie zuzuordnen zu können. CD75 ist bisher aus der B-Lymphozytenadhäsion, -reifung und -aktivierung bekannt, da es an CD22 (Siglec-2) bindet, das ausschließlich auf B-Lymphozyten vorkommt (Hennet et al. 1998; Marth und Grewal 2008). Somit läge es nahe, dass CD75 auf Monozyten eine Interaktion mit B-Zellen vermittelt. Zu klären wäre, welchen funktionellen Effekt diese Zell-Zell-Interaktion hat. CD244 ist ein Rezeptor auf NK mit aktivierender Wirkung auf



diese, wenn sie an CD48 binden (Chlewicki et al. 2008). Unklar bleibt, wie sich eine Bindung von CD244 auf Monozyten auswirkt.

Hijdra et al. (2012) stellten in ihrer Studie analog zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie fest, dass nicht-klassische Monozyten unter den drei Subtypen die höchste Konzentration an CD120b zeigten (s. Kapitel 4.4.3, Abbildung 27). Die intrazelluläre Signalkaskade nach einer Bindung von CD120b führt zur Aktivierung des NF- $\kappa$ B. In der Folge kommt es zu Proliferation, Differenzierung, Zytokinproduktion oder sogar Apoptose der Zellen (Hijdra et al. 2012).

Ebenfalls wie hier wurde CD294 bei Wong et al. (2011) bereits als ein durch schwache, aber spezifische Expression auf nicht-klassischen Monozyten auffallender Marker beschrieben. Des Weiteren beschrieben sie CD97 (Adhäsion) und CD123 (Wachstum/Differenzierung) als vom nicht-klassischen Subtyp dominierte Antigene. Während die hiesigen Resultate diese Erkenntnis zu CD123 bestätigen, weichen sie bei CD97 etwas ab, da hier intermediäre Monozyten knapp die höchste Expression zeigen (s. Abbildung 32). Wong et al. (2011) hatten jedoch, wie erwähnt, nur eine Stichprobengröße von  $n = 5$ , die Stichprobengröße hier ist mit 11 mehr als doppelt so groß und liefert so womöglich konsistentere Erkenntnisse. CD97 wird von vielen Leukozyten exprimiert und schützt die Zelle vor Komplement-vermitteltem Schaden (Visser et al. 2002). CD123 ist die  $\alpha$ -Kette des IL-3-Rezeptors und seine Expression wird während der Ausreifung von Monozyten langsam eingestellt (Testa et al. 1996). Auf unreifen dendritischen Zellen bzw. plasmazytoiden dendritischen Zellen wird CD123 wieder ausgebildet (Shi et al. 2008). Dass dieser Marker sich nun vor allem auf nicht-klassischen Monozyten darstellte, könnte entweder für einen früheren Reifezustand oder eine nähere Verwandtschaft dieser Zellen zum dendritischen Zelltypus sprechen.

## **5.5 Vergleich der Expressionsprofile von Monozytensubtypen bei Gesunden und NSTEMI-Patienten**

Zur Klärung der Frage ob mittels Lyoplate<sup>TM</sup>-Screening Antigene aufgedeckt werden können, die spezifisch durch das Erleiden eines NSTEMI auf den Monozytensubpopulationen moduliert werden, sollte zunächst ein größtmöglicher Kontrast geschaffen werden. Hierzu wurden die Screening-Ergebnisse der elf jungen, gesunden, männlichen

Probanden mit denen von sechs NSTEMI-Patienten verglichen. Als hierbei signifikant verschieden exprimierte Marker ergaben sich CD43 (Adhäsion und Aktivierung), CD45 (proinflammatorische Zytokinsynthese), CD305 (Antiinflammation), CDw329 (Phagozytose und Aktivierung) und SSEA-1 (Adhäsion und Migration). Abgesehen von CD305 spielen alle eine Rolle im Inflammationsprozess und würden sich somit gut in das Bild einer erhöhten Expression im Rahmen eines NSTEMI einfügen. SSEA-1 war bei Infarktpatienten jedoch in geringerem Maße ausgebildet als bei Gesunden. Zudem ist auffällig, dass außer bei CD43 und SSEA-1 die Unterschiede der MFI zwischen Gesunden und NSTEMI-Patienten bei allen Subtypen jeweils homogen sind, was eher auf interindividuelle Unterschiede hinweisen würde.

Die Kontrastierung der NSTEMI-Ergebnisse mit denen gesunder, junger Probanden barg das Problem, dass der Effekt des Alters nicht ausgeschlossen werden konnte. Deshalb wurden im Rahmen der Validierung der fünf Antigene Blutproben von neun dem Alter der NSTEMI-Patienten entsprechenden Probanden ohne KHK eingeschlossen. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten, somit ist von einem Effekt des Alters als ursächlich für die Unterschiede auszugehen. Lediglich bei SSEA-1 waren die Werte der klassischen Monozyten von NSTEMI-Patienten signifikant ( $p < 0,05$ ) niedriger als die von gleichaltrigen Probanden (s. Abbildung 34k). Eine erniedrigte Adhäsionstendenz ließe sich jedoch pathophysiologisch nicht in Einklang mit dem Infarktgeschehen bringen.

Somit ist davon auszugehen, dass die Unterschiede, die zwischen den Monozytensubpopulationen festgestellt wurden, z. B. durch Alter oder Medikamenteneinnahme zustande gekommen sind. Tollerud et al. (1989) wiesen nach, dass weder Alter, Ethnie noch Geschlecht einen Einfluss auf die Zellzahl mononukleärer Zellen gesunder Nichtraucher hatten. Die Superoxidanionenproduktion im *respiratory burst* von Monozyten wurde jedoch durch Alter und Geschlecht beeinflusst (Alvarez und Santa Maria 1996). Seidler et al. (2010) konstatierten, dass im Alter die Fraktion nicht-klassischer Monozyten zunimmt, jedoch weniger HLA-DR und Fraktalkin auf ihrer Oberfläche exprimiert wird. Ebenso war die Serumkonzentration an MCP-1 erhöht nachweisbar. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen weitere Erkenntnisse zu Veränderungen der Oberflächenantigene bei Monozytensubtypen im Alter auf, da die Differenzen zwischen jungen, gesunden Probanden und älteren Patienten bei den untersuchten Markern größtenteils homogen sind (s. Abbildung 34f-k).

Krumholz et al. (2000) untersuchten den Effekt von Migränemedikamenten auf die Chemotaxis der Monozyten. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass zwar Metoprolol, Metoclopramid, Dihydroergotamin und Sumatriptan die Chemotaxis nicht beeinflussten, hohe Dosen an Propranolol und ASS jedoch zu einer signifikanten Inhibierung dieser wichtigen Zellfunktion führten. Auch in der Gruppe der älteren Probanden ohne Nachweis einer KHK nahmen zwei regelmäßig, wenngleich in geringen Dosierungen, ASS ein (s. Tabelle 7). Dass dies die Monozytenfunktion beeinflussen kann, ist nicht gänzlich auszuschließen. Jaipersad et al. (2013) untersuchten bei Patienten mit stabiler KHK die Auswirkung eines Statinentzugs auf die Monozytensubpopulationen und einige ihrer Oberflächenantigene. Sie fanden die Zellzahlen aller Subtypen unbeeinflusst, aber eine Reduktion der CD184- und CD284-Expression auf klassischen Monozyten. Ein NSTEMI-Patient und ein Gleichaltriger ohne KHK der Kohorten dieser Arbeit nahmen Statine regelmäßig ein; eine Modulation weiterer, in zuvor genannter Studie nicht getesteter Antigene hierdurch wäre denkbar.

## **5.6 Klinische Relevanz und Ausblick**

Diese Arbeit sollte das Oberflächenmarkerexpressionsprofil der drei definierten Monozytensubtypen bei Gesunden und bei NSTEMI-Patienten aufzeigen und vergleichen. Spätestens seit Tsujioka et al. (2009) ist bekannt, dass den Subpopulationen der Monozyten sowohl zeitlich als auch funktionell unterschiedliche Rollen im Infarktgeschehen zukommen. Da das Krankheitsbild von hoher klinischer und gesellschaftlicher Relevanz ist, hat die Forschung auf dem Gebiet Monozytenmodulation durch den bzw. beim Infarkt besondere Bedeutung, speziell im Hinblick auf die Weiterentwicklung der Diagnose- und Therapiekonzepte.

Klar ist, dass sowohl zu hohe als auch zu niedrige Monozytenzahlen ungünstig für die Prognose nach einem Herzinfarkt sind. Ob und wie sich jedoch die einzelnen Subpopulationen modulieren lassen, um das Ergebnis zu verbessern, ist noch unbekannt. Eine Balance und ein genau orchestrierter Ablauf des Auftretens der einzelnen Subtypen ist von grundlegender Bedeutung, aus der sich neue Therapiestrategien ergeben können. Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lässt sich eine umfangreiche Analyse der Oberflächenmarkerexpression der Monozytensubtypen bei jungen, gesunden, männlichen Probanden aufstellen. Der Vergleich mit NSTEMI-Patienten und gleichaltrigen Pati-

enten ohne nachgewiesene KHK zeigt keine belastbaren Erkenntnisse in der funktionellen Unterscheidung zwischen diesen Kohorten.

Deutlich wird jedoch, dass der Ansatz und die Methode, ein modifiziertes Lyoplate™-Screening für die drei Subtypen anzuwenden, valide Ergebnisse liefert. So lässt sich die Antigenexpression der Subpopulationen klar und simultan darstellen. Überwiegend stimmen die Erkenntnisse mit denen anderer Forschungsgruppen überein. Bei einigen Antigenen kommen die Ergebnisse dieser Arbeit bei einer oft deutlich höheren Stichprobengröße aber zu abweichenden Aussagen. Somit bietet sie eine gute Grundlage, auf der weitergehende Untersuchungen im Bereich der Monozytensubpopulationen bei Herzinfarkt gemacht werden können. Als weiteren Schritt sollte man künftig mit derselben Methode größere Kohorten vergleichen, die in Alter und Medikamenteneinnahme genauer übereinstimmen. So könnten spezifische Epitope bei den Subtypen aufgedeckt werden, mit denen die Immunreaktion der Monozyten in der sterilen Inflammation enger orchestriert werden könnte. Es ist zudem unklar, ob die bisherige Klassifizierung der Monozyten in drei Subtypen im Rahmen des Infarktgeschehens ihre Gültigkeit behält, oder ob sich nicht völlig andere Subtypen auftun könnten. Gren et al. (2015) wiesen bereits innerhalb der Monozytensubpopulationen einzelne Zellcluster als Untergruppen mit spezifischen Antigenexpressionen nach.

Direkte klinische Anwendungen lassen sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit nicht ableiten. Sie bahnen jedoch einen Weg in die systematische Analyse der Subtypen, um vielleicht eines Tages eine verfeinerte Diagnostik bzw. pharmakologische Modulation der Monozyten zur Verbesserung der Infarktheilung zu erzielen.

## 6 Zusammenfassung

Die Heterogenität der Monozytensubtypen spielt im Herzinfarktgeschehen eine große Rolle. Sowohl in der Atherogenese als auch während und nach einem Herzinfarkt sind Monozyten in die Prozesse der sterilen Inflammation involviert. Ihre Funktionen üben die einzelnen Subtypen dabei in unterschiedlicher zeitlicher Abfolge aus. Viele Fragen bezüglich der Pathophysiologie, Koordination und möglichen Modulation in diesem Zusammenhang sind noch immer ungeklärt. Daher ist es notwendig zu untersuchen, welche genaue Funktion ihnen dabei zukommt und wie man unterstützend im Rahmen der Diagnostik und Therapie in diesen Ablauf eingreifen kann.

Diese Arbeit basiert auf der Hypothese, dass man das Oberflächenmarkerexpressionsprofil der drei Monozytensubpopulationen systematisch, routiniert und zuverlässig anhand eines erweiterten Lyoplate™-Screenings erfassen und analysieren kann. Nach der Erfassung bei Gesunden wurde ein gleiches Vorgehen mit Proben von NSTEMI-Patienten durchgeführt und ihr Profil erfasst. Dann wurden die Erkenntnisse statistisch ausgewertet und durchflusszytometrisch mittels Einzelmarkerfärbungen unter Hinzunahme von Proben altersentsprechender Patienten ohne KHK-Nachweis validiert.

Die Ergebnisse dieser Studie bei jungen, gesunden Männern erwiesen sich als kohärent und valide. Aufgrund der größeren Stichprobe waren sie teils detaillierter als in vorausgegangenen Studien. Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit NSTEMI-Patienten zeigte Unterschiede auf, die sich jedoch in der Kontrolle mit gleichaltrigen Probanden ohne KHK nicht widerspiegelten.

Somit ist von einem Einfluss des Altersunterschieds, einer etwaigen Medikation und weiterer, bisher nicht bekannter Faktoren auf die Monozytenpopulationen auszugehen. Um weitergehend an klinisch nutzbare Erkenntnisse und Anwendungen zu gelangen, sollte diese Methode und Vorgehensweise als Protokoll etabliert werden, da es konsistente Ergebnisse liefert. Auf dem Boden dieser Art der Analyse sollten größere Kohorten in Alter und in der Medikamenteneinnahme übereinstimmender Patienten untersucht werden mit dem Ziel, eine Grundlage für neue und klinisch relevante Strategien zu entwickeln, die Heilung, Prognose und Lebensqualität nach einem Herzinfarkt verbessern.

## 7 Summary

Heterogeneity of human blood monocyte subsets has a significant impact on myocardial infarction. As early as in atherogenesis as well as during and after myocardial ischemia monocytes are involved in the process of sterile inflammation. Each subset has specific functions and appears well orchestrated at its own peak on a time scale. Yet many aspects about their role in pathophysiology, their coordinated appearance and modulation remain unresolved. Thus, it is an important field of research to gain further insights to be able to understand the process better and develop novel strategies in diagnostics and therapy.

This work is based on the hypothesis that a modified and enhanced Lyoplate™-Screening-Panel can lead to a systematic, concurrent, repeatable and reliable analysis of the surface antigen profile of monocyte subsets. At first, samples from healthy young age-matched males were gathered and monocyte surface antigen profiles obtained. Then samples from NSTEMI-patients were processed in equivalent manner. Results were statistically analyzed and chosen markers validated through single-marker stain analysis (with FACS) in samples of age-matched males without coronary artery disease (CAD).

Results of this study in healthy young male donors are coherent, detailed and highly valid due to a large sample number. The contrast between these results and the profiles from NSTEMI-patients at first showed significant deviations. But in comparison with age-matched donors without CAD these differences could not be observed.

This led to the assumption that age-difference, possible medications or other yet unknown factors had influence on monocyte subsets. To gain further understanding and clinical use the presented method should be established as a protocol for trials on a larger scale. The method delivers consistent results so that large cohorts of age-matched patients with comparable medication could be analyzed to establish a basis for clinical pathways to improve outcome, prognosis and quality of life after myocardial infarction.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
<b>ACE</b>	<i>Angiotensin-converting enzyme</i>
<b>ACS</b>	Akutes Koronarsyndrom ( <i>Acute coronary syndrome</i> )
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>AMP</b>	Adenosinmonophosphat
<b>ASS</b>	Azetylsalizylsäure
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BMS</b>	<i>Bare-metal stent</i>
<b>BLTR</b>	<i>Leukotriene B4 receptor</i>
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Kalzium-Kation
<b>CABG</b>	<i>Coronary artery bypass surgery</i>
<b>CAD</b>	<i>Coronary artery disease</i>
<b>CCL</b>	CC-Motiv-Chemokinligand
<b>CCR</b>	CC-Motiv Chemokinrezeptor
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>
<b>CEACAM</b>	<i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule</i>
<b>CLIP</b>	<i>Class II-associated I<sub>i</sub>-derived peptides</i>
<b>CPT<sup>TM</sup></b>	<i>Cell Preparation Tubes</i>
<b>CS&amp;T</b>	<i>Cytometer Setup and Tracking</i>
<b>CSF</b>	<i>Colony-stimulating factor</i>
<b>cTn</b>	Kardiales Troponin ( <i>Cardiac troponin</i> )
<b>DAMP</b>	<i>Danger/Damage-associated molecular patterns</i>
<b>DES</b>	<i>Drug-eluting stent</i>
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNS</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
<b>EKG</b>	Elektrokardiogramm
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
<b>Fc</b>	<i>Fragment crystallisable</i>
<b>FMO</b>	<i>Fluorescence minus one</i>
<b>FSC</b>	<i>Forward-scattered light</i>

<b>H<sup>+</sup></b>	Proton
<b>Hb</b>	Hämoglobin
<b>HDL</b>	<i>High density lipoprotein</i>
<b>HLA</b>	Humane Leukozytenantigene ( <i>Human leukocyte antigen</i> )
<b>Hp</b>	Haptoglobin
<b>hsTnT/I</b>	hochsensitiver Troponin-T/I-assay
<b>ICAM</b>	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
<b>ICOS(L)</b>	<i>Inducible co-stimulator (ligand)</i>
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>I<sub>i</sub></b>	Invariante Kette
<b>IL</b>	Interleukin
<b>K<sup>+</sup></b>	Kalium-Kation
<b>KHK</b>	Koronare Herzkrankheit
<b>LAIR</b>	Leukozyten-assoziiertes Ig-ähnliches Rezeptor
<b>LDL</b>	<i>Low density lipoprotein</i>
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>MCP</b>	<i>Monocyte chemotactic proteine</i>
<b>M-CSF</b>	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
<b>MFI</b>	Mediane Fluoreszenzintensität
<b>MHC</b>	<i>Main histocompatibility complex</i>
<b>MMP</b>	Matrix-Metalloproteasen
<b>Na<sup>+</sup></b>	Natrium-Kation
<b>NF-κB</b>	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
<b>NK</b>	Natürliche Killerzellen
<b>NSTEMI</b>	Nicht-ST-Strecken-Hebungsinfarkt ( <i>Non-ST-elevation myocardial infarction</i> )
<b>PAMP</b>	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
<b>PBMC</b>	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PCA</b>	<i>Principal component analysis</i>
<b>PCI</b>	Perkutane koronare Intervention ( <i>Percutaneous coronary intervention</i> )
<b>PE</b>	Phycoerythrin
<b>PECAM</b>	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i>



<b>PMN</b>	Polymorphonukleäre Zellen
<b>PRR</b>	<i>Pattern recognition receptors</i>
<b>PTCA</b>	Perkutane transluminale koronare Angioplastie ( <i>Percutaneous transluminal coronary angioplasty</i> )
<b>ROS</b>	reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
<b>SERCA</b>	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
<b>Siglec</b>	<i>Sialic acid-binding Ig-like lectin</i>
<b>SSEA</b>	<i>Stage-specific embryonic antigen</i>
<b>STEMI</b>	ST-Strecken-Hebungsinfarkt ( <i>ST-elevation myocardial infarction</i> )
<b>TGF</b>	<i>Transforming growth factor</i>
<b>TLR</b>	Toll-like Rezeptoren
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>TNFR</b>	TNF-Rezeptor
<b>VCAM</b>	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
<b>VEGF</b>	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
<b>VLA</b>	<i>Very late antigen</i>
<b>WHO</b>	Weltgesundheitsorganisation ( <i>World Health Organisation</i> )

Tabelle 6: Abkürzungsverzeichnis

## 9            **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Das Spektrum des Akuten Koronarsyndroms .....	3
Abbildung 2: Pathologische Vorgänge in der Zelle, die bei Gewebeschaden durch Ischämie und Reperfusion auftreten .....	8
Abbildung 3: Fibroblasten transdifferenzieren zu Myofibroblasten .....	10
Abbildung 4: Differenzierung von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen aus myelopoetischen Progenitorzellen am murinen Beispiel .....	12
Abbildung 5: Durchflusszytometrische Punktwolkendarstellung zur Gatingstrategie der Monozytensubtypen.....	14
Abbildung 6: Dreifache Rolle der Monozyten in verschiedenen Stadien der Atherosklerose. ....	17
Abbildung 7: Biphasischer Verlauf der Monozyten- und Makrophagenantwort im Verlauf eines akuten Myokardinfarkts .....	19
Abbildung 8: Probengewinnung, Verarbeitung und Konservierung.....	33
Abbildung 9: Auftauen, Färben und Messen der Proben .....	36
Abbildung 10: Gatingstrategie für die Analyse am Durchflusszytometer .....	43
Abbildung 11: Niedrigdimensionale Streudiagramme der aufbereiteten Lyoplate™-Daten mit allen gemessenen Oberflächenmarkern .....	46
Abbildung 12: Niedrigdimensionale Streudiagramme der aufbereiteten Lyoplate™-Daten ohne HLA-Marker .....	47
Abbildung 13: Spearmans Rangkorrelationskoeffizient .....	48
Abbildung 14: Lineare Regression (Streudiagramme) zur Darstellung der Oberflächenmarkerkorrelation zwischen den Monozytensubpopulationen .....	49
Abbildung 15: Heatmap der 30 relevantesten, differenziell exprimierten Oberflächenmarker auf klassischen, intermediären und nicht-klassischen Monozyten aus der edgeR-Analyse .....	50
Abbildung 16: Expressionsprofil von CD11b, CD15s, CD35 und CD36.....	52
Abbildung 17: Expressionsprofil von CD38, CD49e, CD89 und CD99 .....	53
Abbildung 18: Expressionsprofil von CD128b/182, CD181, BLTR-1 und SSEA-1.....	54
Abbildung 19: Expressionsprofil von CD23, CD32, CD39 und CD40 .....	55
Abbildung 20: Expressionsprofil von CD46, CD49d, CD54 und CD72 .....	56
Abbildung 21: Expressionsprofil von CD74, CD85, CD91 und CD105 .....	58
Abbildung 22: Expressionsprofil von CD163, CD195, CD227 und CD275 .....	59
Abbildung 23: Expressionsprofil von CD305, CDw328, CLIP und CMRF-44 .....	60

Abbildung 24: Expressionsprofil von CMRF-56, HLA-DQ, HLA-DR und Integrin $\beta_7$	61
Abbildung 25: Expressionsprofil von CD29, CD31, CD43 und CD45RA.....	62
Abbildung 26: Expressionsprofil von CD66a,c,d,e, CD75, CD88 und CD104.....	64
Abbildung 27: Expressionsprofil von CD120b, CD132, CD244 und CD294 .....	65
Abbildung 28: Expressionsprofile validierter Marker im Vergleich zu den Ergebnissen der Screeningversuche .....	66
Abbildung 29: <i>Heatmap</i> zur Expression ausgewählter Oberflächenantigene.....	67
Abbildung 30: Expressionsprofil von CD1d, CD36, CDw93, CD99 und CD9.....	68
Abbildung 31: Expressionsprofil von CD33 und CD64. ....	68
Abbildung 32: Expressionsprofil von CD97 und CD123 .....	69
Abbildung 33: Differenzielle Oberflächenmarkerexpression der Monozytensubtypen bei Gesunden und NSTEMI-Patienten .....	69
Abbildung 34: Vergleich der Expression von CD43, CD45, CD305, CDw329 und SSEA-1 auf den Monozytensubtypen von jungen Gesunden, NSTEMI-Patienten und ihnen gleichalten Probanden ohne KHK .....	71
Abbildung 35: Schematische Darstellung des Versuchs- und Auswertungsablaufs.....	74
Abbildung 36: Ähnlichkeitsbeziehung der drei Monozytensubtypen auf transkriptioneller Ebene.....	83
Abbildung 37: Darstellung der Oberflächenmarker klassischer Monozyten nach biologischer Funktionalität. ....	87
Abbildung 38: Gliederung der Oberflächenmarker intermediärer Monozyten nach biologischer Funktionalität .....	89
Abbildung 39: Darstellung der Oberflächenantigene nicht-klassischer Monozyten nach biologischer Funktionalität .....	91

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte .....	23
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien .....	26
Tabelle 3: Lösungen, Puffer und sonstige Reagenzien .....	27
Tabelle 4: Antikörper und Beads .....	29
Tabelle 5: EDV-Programme.....	29
Tabelle 6: Abkürzungsverzeichnis .....	100
Tabelle 7: Risikofaktoren und medikamentöse Therapie der NSTEMI-Patienten und Patienten ohne KHK .....	135
Tabelle 8: Differenzielle Expression aller Oberflächenmarker auf den Monozytensubtypen im Vergleich.....	142
Tabelle 9: EdgeR-Analyse der Monozytensubtypen basierend auf den Werten klassischer Monozyten.....	150

## 11 Literaturverzeichnis

- Abeles, Robin Daniel; McPhail, Mark J.; Sowter, David; Antoniadou, Charalambos G.; Vergis, Nikhil; Vijay, Godhev K. Manakkat et al. (2012): CD14, CD16 and HLA-DR reliably identifies human monocytes and their subsets in the context of pathologically reduced HLA-DR expression by CD14(hi) /CD16(neg) monocytes: Expansion of CD14(hi) /CD16(pos) and contraction of CD14(lo) /CD16(pos) monocytes in acute liver failure. In: *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 81 (10), S. 823–834. DOI: 10.1002/cyto.a.22104.
- Alderson, M. R.; Armitage, R. J.; Tough, T. W.; Strockbine, L.; Fanslow, W. C.; Spriggs, M. K. (1993): CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. In: *The Journal of experimental medicine* 178 (2), S. 669–674.
- Alvarez, E.; Santa Maria, C. (1996): Influence of the age and sex on respiratory burst of human monocytes. In: *Mechanisms of ageing and development* 90 (2), S. 157–161.
- Ambrose, John A.; Singh, Manmeet (2015): Pathophysiology of coronary artery disease leading to acute coronary syndromes. In: *F1000prime reports* 7, S. 8. DOI: 10.12703/P7-08.
- Ancuta, Petronela; Liu, Kuang-Yu; Misra, Vikas; Wacleche, Vanessa Sue; Gosselin, Annie; Zhou, Xiaobo; Gabuzda, Dana (2009): Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16+ and CD16- monocyte subsets. In: *BMC genomics* 10, S. 403. DOI: 10.1186/1471-2164-10-403.
- Ancuta, Petronela; Rao, Ravi; Moses, Ashlee; Mehle, Andrew; Shaw, Sunil K.; Luscinskas, F. William; Gabuzda, Dana (2003): Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. In: *The Journal of experimental medicine* 197 (12), S. 1701–1707. DOI: 10.1084/jem.20022156.
- Andreesen, R.; Brugger, W.; Scheibenbogen, C.; Kreutz, M.; Leser, H. G.; Rehm, A.; Lohr, G. W. (1990): Surface phenotype analysis of human monocyte to macrophage maturation. In: *Journal of Leukocyte Biology* 47 (6), S. 490–497.
- Andreesen, R.; Osterholz, J.; Bodemann, H.; Bross, K. J.; Costabel, U.; Löhr, G. W. (1984): Expression of transferrin receptors and intracellular ferritin during terminal differentiation of human monocytes. In: *Blut* 49 (3), S. 195–202. DOI: 10.1007/BF00319822.
- Antonioli, Luca; Pacher, Pal; Vizi, E. Sylvester; Hasko, Gyorgy (2013): CD39 and CD73 in immunity and inflammation. In: *Trends in molecular medicine* 19 (6), S. 355–367. DOI: 10.1016/j.molmed.2013.03.005.
- Appleby, Laura J.; Nausch, Norman; Midzi, Nicholas; Mduluza, Takafira; Allen, Judith E.; Mutapi, Francisca (2013): Sources of heterogeneity in human monocyte subsets. In: *Immunology letters* 152 (1), S. 32–41. DOI: 10.1016/j.imlet.2013.03.004.
- Aries, A.; Whitcomb, J.; Shao, W.; Komati, H.; Saleh, M.; Nemer, M. (2014): Caspase-1 cleavage of transcription factor GATA4 and regulation of cardiac cell fate. In: *Cell death & disease* 5, e1566. DOI: 10.1038/cddis.2014.524.
- Aristorena, Mikel; Blanco, Francisco J.; Las Casas-Engel, Mateo de; Ojeda-Fernandez, Luisa; Gallardo-Vara, Eunat; Corbi, Angel et al. (2014): Expression of endoglin isoforms in the mye-

loid lineage and their role during aging and macrophage polarization. In: *Journal of cell science* 127 (Pt 12), S. 2723–2735. DOI: 10.1242/jcs.143644.

Aristoteli, Lina Panayioti; Moller, Holger Jon; Bailey, Brian; Moestrup, Soren Kragh; Kritharides, Leonard (2006): The monocytic lineage specific soluble CD163 is a plasma marker of coronary atherosclerosis. In: *Atherosclerosis* 184 (2), S. 342–347. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2005.05.004.

Arslan, Uğur; Kocaoğlu, İbrahim; Balci, Mustafa M.; Gülkan, Birsen; Falay, Mesude Y.; Temizhan, Ahmet (2013): Monocyte heterogeneity in myocardial infarction with and without ST elevation and its association with angiographic findings. In: *Coronary Artery Disease* 24 (5), S. 404–411. DOI: 10.1097/MCA.0b013e328361a98c.

Ashbrook, M. J.; McDonough, K. L.; Pituch, J. J.; Christopherson, P. L.; Cornell, T. T.; Selewski, D. T. et al. (2015): Citrate modulates lipopolysaccharide-induced monocyte inflammatory responses. In: *Clinical and experimental immunology* 180 (3), S. 520–530. DOI: 10.1111/cei.12591.

Auffray, Cedric; Fogg, Darin; Garfa, Meriem; Elain, Gaelle; Join-Lambert, Olivier; Kayal, Samer et al. (2007): Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. In: *Science (New York, N.Y.)* 317 (5838), S. 666–670. DOI: 10.1126/science.1142883.

Auffray, Cedric; Sieweke, Michael H.; Geissmann, Frederic (2009): Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. In: *Annu. Rev. Immunol.* 27 (1), S. 669–692. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132557.

Bäck, M.; Weber, C.; Lutgens, E. (2015): Regulation of atherosclerotic plaque inflammation. In: *Journal of internal medicine* 278 (5), S. 462–482. DOI: 10.1111/joim.12367.

Bacle, F.; Haeffner-Cavaillon, N.; Laude, M.; Couturier, C.; Kazatchkine, M. D. (1990): Induction of IL-1 release through stimulation of the C3b/C4b complement receptor type one (CR1, CD35) on human monocytes. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 144 (1), S. 147–152.

Banham, A. H.; Colonna, M.; Cella, M.; Micklem, K. J.; Pulford, K.; Willis, A. C.; Mason, D. Y. (1999): Identification of the CD85 antigen as ILT2, an inhibitory MHC class I receptor of the immunoglobulin superfamily. In: *Journal of Leukocyte Biology* 65 (6), S. 841–845.

Basavaraj, M. G.; Osterud, B.; Hansen, J-B (2012): Influence of different anticoagulants on monocyte procoagulant functions and monocyte-platelet aggregates formation. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 10 (8), S. 1698–1702. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2012.04821.x.

Basu, S.; Binder, R. J.; Ramalingam, T.; Srivastava, P. K. (2001): CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. In: *Immunity* 14 (3), S. 303–313.

BD Biosciences (2011): Human Cell Surface Marker Screening Panel. In: *Technical Data Sheet* (560747 Rev.6). Online verfügbar unter <http://www.bdbiosciences.com/ds/pm/tds/560747.pdf>, zuletzt geprüft am 18.08.2016.

BD Biosciences (2016): BD Vacutainer® CPT™ Mononuclear Cell Preparation Tube - Sodium Citrate. Online verfügbar unter [http://www.bdbiosciences.com/ds/ab/others/PI\\_CPT\\_citrate\\_March\\_2016\\_VDP40104-06-WEB\\_500010322.pdf](http://www.bdbiosciences.com/ds/ab/others/PI_CPT_citrate_March_2016_VDP40104-06-WEB_500010322.pdf), zuletzt geprüft am 22.10.2016.

Bellinghausen, Iris; Klostermann, Bettina; Bottcher, Ingo; Knop, Jurgen; Saloga, Joachim (2004): Importance of the inducible costimulator molecule for the induction of allergic immune responses and its decreased expression on T helper cells after venom immunotherapy. In: *Immunology* 112 (1), S. 80–86. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2004.01845.x.

Berg, Katarina E.; Ljungcrantz, Irena; Andersson, Linda; Bryngelsson, Carl; Hedblad, Bo; Fredrikson, Gunilla N. et al. (2012): Elevated CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> monocytes predict cardiovascular events. In: *Circulation. Cardiovascular genetics* 5 (1), S. 122–131. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.111.960385.

Bernhagen, Jurgen; Krohn, Regina; Lue, Hongqi; Gregory, Julia L.; Zernecke, Alma; Koenen, Rory R. et al. (2007): MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. In: *Nature medicine* 13 (5), S. 587–596. DOI: 10.1038/nm1567.

Bertho, N.; Drenou, B.; Laupeze, B.; Berre, C. L.; Amiot, L.; Grosset, J.-M. et al. (2000): HLA-DR-Mediated Apoptosis Susceptibility Discriminates Differentiation Stages of Dendritic/Monocytic APC. In: *The Journal of Immunology* 164 (5), S. 2379–2385. DOI: 10.4049/jimmunol.164.5.2379.

BioLegend, Inc: Human TruStain FcX™ (Fc Receptor Blocking Solution). Antigen Details. In: *Product Data Sheet* (4). Online verfügbar unter <http://www.biolegend.com/human-trustain-fcx-fc-receptor-blocking-solution-6462.html>, zuletzt geprüft am 19.10.2016.

Blomkalns, Andra L.; Chen, Anita Y.; Hochman, Judith S.; Peterson, Eric D.; Trynosky, Kelly; Diercks, Deborah B. et al. (2005): Gender disparities in the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: large-scale observations from the CRUSADE (Can Rapid Risk Stratification of Unstable Angina Patients Suppress Adverse Outcomes With Early Implementation of the American College of Cardiology/American Heart Association Guidelines) National Quality Improvement Initiative. In: *Journal of the American College of Cardiology* 45 (6), S. 832–837. DOI: 10.1016/j.jacc.2004.11.055.

Bock, D.; Martin, U.; Gartner, S.; Rheinheimer, C.; Raffetseder, U.; Arseniev, L. et al. (1997): The C terminus of the human C5a receptor (CD88) is required for normal ligand-dependent receptor internalization. In: *European journal of immunology* 27 (6), S. 1522–1529. DOI: 10.1002/eji.1830270631.

Bonder, C. S.; Dickensheets, H. L.; Finlay-Jones, J. J.; Donnelly, R. P.; Hart, P. H. (1998): Involvement of the IL-2 receptor gamma-chain (gammac) in the control by IL-4 of human monocyte and macrophage proinflammatory mediator production. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 160 (8), S. 4048–4056.

Brooks, C. F.; Moore, M. (1988): Differential MHC class II expression on human peripheral blood monocytes and dendritic cells. In: *Immunology* 63 (2), S. 303–311.

Brooks, D. G.; Qiu, W. Q.; Luster, A. D.; Ravetch, J. V. (1989): Structure and expression of human IgG FcRII(CD32). Functional heterogeneity is encoded by the alternatively spliced products of multiple genes. In: *The Journal of experimental medicine* 170 (4), S. 1369–1385.

Brown, M. H.; Boles, K.; van der Merwe, P A; Kumar, V.; Mathew, P. A.; Barclay, A. N. (1998): 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. In: *The Journal of experimental medicine* 188 (11), S. 2083–2090.

- Burger, Danielle; Dayer, Jean-Michel (2002): The role of human T-lymphocyte-monocyte contact in inflammation and tissue destruction. In: *Arthritis research* 4 Suppl 3, S169-76. DOI: 10.1186/ar558.
- Cao, Weiping; Lee, Szu Hee; Lu, Jinhua (2005): CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. In: *The Biochemical journal* 385 (Pt 1), S. 85–93. DOI: 10.1042/BJ20040741.
- Caterina, R. de; Mazzone, A.; Giannesi, D.; Sicari, R.; Pelosi, W.; Lazzarini, G. et al. (1988): Leukotriene B4 production in human atherosclerotic plaques. In: *Biomedica biochimica acta* 47 (10-11), S182-5.
- Chabbert-de Ponnat, Isabelle; Marie-Cardine, Anne; Pasterkamp, R. Jeroen; Schiavon, Valerie; Tamagnone, Luca; Thomasset, Nicole et al. (2005): Soluble CD100 functions on human monocytes and immature dendritic cells require plexin C1 and plexin B1, respectively. In: *International Immunology* 17 (4), S. 439–447. DOI: 10.1093/intimm/dxh224.
- Chaturvedi, P.; Hengeveld, R.; Zechel, M. A.; Lee-Chan, E.; Singh, B. (2000): The functional role of class II-associated invariant chain peptide (CLIP) in its ability to variably modulate immune responses. In: *International Immunology* 12 (6), S. 757–765. DOI: 10.1093/intimm/12.6.757.
- Chlewicki, L. K.; Velikovskiy, C. A.; Balakrishnan, V.; Mariuzza, R. A.; Kumar, V. (2008): Molecular Basis of the Dual Functions of 2B4 (CD244). In: *The Journal of Immunology* 180 (12), S. 8159–8167. DOI: 10.4049/jimmunol.180.12.8159.
- Choo, Sung Yoon (2007): The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. In: *Yonsei medical journal* 48 (1), S. 11–23. DOI: 10.3349/ymj.2007.48.1.11.
- Christia, Panagiota; Frangogiannis, Nikolaos G. (2013): Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction. In: *Eur J Clin Invest* 43 (9), S. 986–995. DOI: 10.1111/eci.12118.
- Christmas, Stephen E.; de la Mata Espinosa, Claudia T; Halliday, Deborah; Buxton, Cheryl A.; Cummerston, Joanne A.; Johnson, Peter M. (2006): Levels of expression of complement regulatory proteins CD46, CD55 and CD59 on resting and activated human peripheral blood leukocytes. In: *Immunology* 119 (4), S. 522–528. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2006.02467.x.
- Cox, Josephine H.; Ferrari, Guido; Kalams, Spyros A.; Lopaczynski, Wlodek; Oden, Neal; D'souza, M. Patricia (2005): Results of an ELISPOT proficiency panel conducted in 11 laboratories participating in international human immunodeficiency virus type 1 vaccine trials. In: *AIDS research and human retroviruses* 21 (1), S. 68–81. DOI: 10.1089/aid.2005.21.68.
- Crocker, Paul R. (2005): Siglecs in innate immunity. In: *Current opinion in pharmacology* 5 (4), S. 431–437. DOI: 10.1016/j.coph.2005.03.003.
- Cros, Jerome; Cagnard, Nicolas; Woollard, Kevin; Patey, Natacha; Zhang, Shen-Ying; Senechal, Brigitte et al. (2010): Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. In: *Immunity* 33 (3), S. 375–386. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.08.012.
- Damasceno, Daniela; Andres, Martin Perez; van den Bossche, Wouter Bl; Flores-Montero, Juan; Bruin, Sandra de; Teodosio, Cristina et al. (2016): Expression profile of novel cell surface molecules on different subsets of human peripheral blood antigen-presenting cells. In: *Clinical & translational immunology* 5 (9), e100. DOI: 10.1038/cti.2016.54.



- Davies, Michael J. (2000): The pathophysiology of acute coronary syndromes. In: *Heart* 83 (3), S. 361–366. DOI: 10.1136/heart.83.3.361.
- Deckers, Jaap W. (2013): Classification of myocardial infarction and unstable angina: A re-assessment. In: *International Journal of Cardiology* 167 (6), S. 2387–2390. DOI: 10.1016/j.ijcard.2013.01.008.
- Demoulin, Jean-Baptiste; Montano-Almendras, Carmen P. (2012): Platelet-derived growth factors and their receptors in normal and malignant hematopoiesis. In: *American journal of blood research* 2 (1), S. 44–56.
- Dewald, Oliver; Zymek, Pawel; Winkelmann, Kim; Koerting, Anna; Ren, Guofeng; Abou-Khamis, Tareq et al. (2005): CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. In: *Circulation Research* 96 (8), S. 881–889. DOI: 10.1161/01.RES.0000163017.13772.3a.
- Diaz-Ramos, M. Carmen; Engel, Pablo; Bastos, Ricardo (2011): Towards a comprehensive human cell-surface immunome database. In: *Immunology letters* 134 (2), S. 183–187. DOI: 10.1016/j.imlet.2010.09.016.
- Dorr, Marcus (2010): Silent myocardial infarction: the risk beyond the first admission. In: *Heart (British Cardiac Society)* 96 (18), S. 1434–1435. DOI: 10.1136/hrt.2010.201384.
- Durbeej, Madeleine (2010): Laminins. In: *Cell and tissue research* 339 (1), S. 259–268. DOI: 10.1007/s00441-009-0838-2.
- Dutta, Partha; Courties, Gabriel; Wei, Ying; Leuschner, Florian; Gorbатов, Rostic; Robbins, Clinton S. et al. (2012): Myocardial infarction accelerates atherosclerosis. In: *Nature* 487 (7407), S. 325–329. DOI: 10.1038/nature11260.
- Dutta, Partha; Nahrendorf, Matthias (2014): Regulation and consequences of monocytoysis. In: *Immunological reviews* 262 (1), S. 167–178. DOI: 10.1111/imr.12219.
- Dutta, Partha; Nahrendorf, Matthias (2015): Monocytes in myocardial infarction. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 35 (5), S. 1066–1070. DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.304652.
- Duus, Karen; Hansen, Erik W.; Tacnet, Pascale; Frachet, Philippe; Arlaud, Gerard J.; Thielens, Nicole M.; Houen, Gunnar (2010): Direct interaction between CD91 and C1q. In: *The FEBS journal* 277 (17), S. 3526–3537. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07762.x.
- Eggebrecht, Holger (2016): Thrombusaspiration: Bei akutem Myokardinfarkt ohne Nutzen und gefährlich? Routinemäßige Anwendung nicht sinnvoll. In: *Kardiologie.org*, 28.08.2016. Online verfügbar unter <https://www.kardiologie.org/ischaemische-herzerkrankungen-koronare-herzkrankheit--khk/thrombusaspiration-bei-akutem-myokardinfarkt-ohne-nutzen-und-gef/10613528>, zuletzt geprüft am 07.06.2018.
- Elward, Kristina; Griffiths, Mark; Mizuno, Masashi; Harris, Claire L.; Neal, Jim W.; Morgan, B. Paul; Gasque, Philippe (2005): CD46 plays a key role in tailoring innate immune recognition of apoptotic and necrotic cells. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (43), S. 36342–36354. DOI: 10.1074/jbc.M506579200.
- Engel, Pablo; Boumsell, Laurence; Balderas, Robert; Bensussan, Armand; Gattei, Valter; Horejsi, Vaclav et al. (2015): CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen

- Workshops as a Driving Force in Immunology. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 195 (10), S. 4555–4563. DOI: 10.4049/jimmunol.1502033.
- Engstrom, Gunnar; Melander, Olle; Hedblad, Bo (2009): Leukocyte count and incidence of hospitalizations due to heart failure. In: *Circulation. Heart failure* 2 (3), S. 217–222. DOI: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.827071.
- Ertl, Georg; Frantz, Stefan (2005): Healing after myocardial infarction. In: *Cardiovascular Research* 66 (1), S. 22–32. DOI: 10.1016/j.cardiores.2005.01.011.
- Espinoza-Delgado, I.; Bosco, M. C.; Musso, T.; Gusella, G. L.; Longo, D. L.; Varesio, L. (1995): Interleukin-2 and human monocyte activation. In: *Journal of Leukocyte Biology* 57 (1), S. 13–19.
- Febbraio, M.; Hajjar, D. P.; Silverstein, R. L. (2001): CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. In: *The Journal of clinical investigation* 108 (6), S. 785–791. DOI: 10.1172/JCI14006.
- Ferrer, Dario G.; Jaldin-Fincati, Javier R.; Amigone, Jose L.; Capra, Raul H.; Collino, Cesar J.; Albertini, Ricardo A.; Chiabrando, Gustavo A. (2014): Standardized flow cytometry assay for identification of human monocytic heterogeneity and LRP1 expression in monocyte subpopulations: decreased expression of this receptor in nonclassical monocytes. In: *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 85 (7), S. 601–610. DOI: 10.1002/cyto.a.22455.
- Frangogiannis, N. G. (2012): Regulation of the Inflammatory Response in Cardiac Repair. In: *Circulation Research* 110 (1), S. 159–173. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243162.
- Frangogiannis, Nikolaos G. (2008): The immune system and cardiac repair. In: *Pharmacological research* 58 (2), S. 88–111. DOI: 10.1016/j.phrs.2008.06.007.
- Frantz, S.; Bauersachs, J.; Ertl, G. (2008): Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation. In: *Cardiovascular Research* 81 (3), S. 474–481. DOI: 10.1093/cvr/cvn292.
- Frantz, S.; Nahrendorf, M. (2014): Cardiac macrophages and their role in ischaemic heart disease. In: *Cardiovascular Research* 102 (2), S. 240–248. DOI: 10.1093/cvr/cvu025.
- Frantz, Stefan; Ertl, Georg; Bauersachs, Johann (2007): Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. In: *Nature clinical practice. Cardiovascular medicine* 4 (8), S. 444–454. DOI: 10.1038/ncpcardio0938.
- French, Brent A.; Kramer, Christopher M. (2007): Mechanisms of Post-Infarct Left Ventricular Remodeling. In: *Drug discovery today. Disease mechanisms* 4 (3), S. 185–196. DOI: 10.1016/j.ddmec.2007.12.006.
- Friedrich, Erik B.; Tager, Andrew M.; Liu, Emerson; Pettersson, Annika; Owman, Christer; Munn, Lance et al. (2003): Mechanisms of leukotriene B<sub>4</sub>-triggered monocyte adhesion. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (10), S. 1761–1767. DOI: 10.1161/01.ATV.0000092941.77774.3C.
- Furebring, Mia; Hakansson, Lena Douhan; Venge, Per; Nilsson, Bo; Sjolín, Jan (2002): Expression of the C5a receptor (CD88) on granulocytes and monocytes in patients with severe sepsis. In: *Critical care (London, England)* 6 (4), S. 363–370.

Gadhoun, Samah Zeineb; Sackstein, Robert (2008): CD15 expression in human myeloid cell differentiation is regulated by sialidase activity. In: *Nature chemical biology* 4 (12), S. 751–757. DOI: 10.1038/nchembio.116.

Gane, Jennie M.; Stockley, Robert A.; Sapey, Elizabeth (2016): TNF-alpha Autocrine Feedback Loops in Human Monocytes: The Pro- and Anti-Inflammatory Roles of the TNF-alpha Receptors Support the Concept of Selective TNFR1 Blockade In Vivo. In: *Journal of immunology research* 2016, S. 1079851. DOI: 10.1155/2016/1079851.

Georgoudaki, Anna-Maria; Khodabandeh, Sorosh; Puiac, Speranta; Persson, Catrine M.; Larsson, Maria K.; Lind, Max et al. (2015): CD244 is expressed on dendritic cells and regulates their functions. In: *Immunology and cell biology* 93 (6), S. 581–590. DOI: 10.1038/icb.2014.124.

Gerhardt, Teresa; Ley, Klaus (2015): Monocyte trafficking across the vessel wall. In: *Cardiovascular Research* 107 (3), S. 321–330. DOI: 10.1093/cvr/cvv147.

Gerszten, R. E.; Garcia-Zepeda, E. A.; Lim, Y. C.; Yoshida, M.; Ding, H. A.; Gimbrone, M. A., JR et al. (1999): MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. In: *Nature* 398 (6729), S. 718–723. DOI: 10.1038/19546.

Gesundheitsberichterstattung des Bundes (2012): Sterbefälle, Sterbeziffer, Ränge, Anteile der 10/20/50/100 häufigsten Todesursachen (ab 1998). Internet. Online verfügbar unter [http://www.gbe-bund.de/oowa921-in-stall/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd\\_init?gbe.isgbetol/xs\\_start\\_neu/&p\\_aid=3&p\\_aid=39094665&nummer=516&p\\_sprache=D&p\\_indsp=4065&p\\_aid=87480495](http://www.gbe-bund.de/oowa921-in-stall/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=3&p_aid=39094665&nummer=516&p_sprache=D&p_indsp=4065&p_aid=87480495), zuletzt aktualisiert am 23.04.2014, zuletzt geprüft am 23.04.2014.

Ghattas, Angie; Griffiths, Helen R.; Devitt, Andrew; Lip, Gregory Y. H.; Shantsila, Eduard (2013): Monocytes in coronary artery disease and atherosclerosis: where are we now? In: *Journal of the American College of Cardiology* 62 (17), S. 1541–1551. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.07.043.

Glezeva, Nadezhda; Horgan, Stephen; Baugh, John A. (2015): Monocyte and macrophage subsets along the continuum to heart failure: Misguided heroes or targetable villains? In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 89 (Pt B), S. 136–145. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.10.029.

Gordon, Siamon; Martinez, Fernando O. (2010): Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. In: *Immunity* 32 (5), S. 593–604. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.05.007.

Gray-Owen, Scott D.; Blumberg, Richard S. (2006): CEACAM1: contact-dependent control of immunity. In: *Nature reviews. Immunology* 6 (6), S. 433–446. DOI: 10.1038/nri1864.

Gren, Susanne T.; Rasmussen, Thomas B.; Janciauskiene, Sabina; Hakansson, Katarina; Gerwien, Jens G.; Grip, Olof (2015): A Single-Cell Gene-Expression Profile Reveals Inter-Cellular Heterogeneity within Human Monocyte Subsets. In: *PLoS ONE* 10 (12), e0144351. DOI: 10.1371/journal.pone.0144351.

Grisar, J.; Hahn, P.; Brosch, S.; Peterlik, M.; Smolen, J. S.; Pietschmann, P. (2001): Phenotypic characteristics of human monocytes undergoing transendothelial migration. In: *Arthritis research* 3 (2), S. 127–132. DOI: 10.1186/ar150.

Gruber, M. F.; Williams, C. C.; Gerrard, T. L. (1994): Macrophage-colony-stimulating factor expression by anti-CD45 stimulated human monocytes is transcriptionally up-regulated by IL-1

beta and inhibited by IL-4 and IL-10. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 152 (3), S. 1354–1361.

Hamm, C. W. (2009): Kommentar zu den Leitlinien der European Society of Cardiology (ESC) zur Diagnose und Therapie des akuten Koronarsyndroms ohne ST-Strecken-Hebung (NSTE-ACS). In: *Kardiologe* 3 (2), S. 81–100. DOI: 10.1007/s12181-009-0177-2.

Hamm, C. W.; Bassand, Jean-Pierre (2012): ESC Pocket Guidelines Akutes Koronarsyndrom ohne ST-Hebung (NSTE-ACS).

Hamm, C. W.; Braunwald, E. (2000): A Classification of Unstable Angina Revisited. In: *Circulation* 102 (1), S. 118–122. DOI: 10.1161/01.CIR.102.1.118.

Hartnell, A.; Steel, J.; Turley, H.; Jones, M.; Jackson, D. G.; Crocker, P. (2001): Characterization of human sialoadhesin, a sialic acid binding receptor expressed by resident and inflammatory macrophage populations. In: *Blood* 97 (1), S. 288–296. DOI: 10.1182/blood.V97.1.288.

Hayes, A. L.; Smith, C.; Foxwell, B. M.; Brennan, F. M. (1999): CD45-induced tumor necrosis factor alpha production in monocytes is phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and nuclear factor-kappaB-independent. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (47), S. 33455–33461.

Heinzelmann, M.; Bosshart, H. (2005): Heparin Binds to Lipopolysaccharide (LPS)-Binding Protein, Facilitates the Transfer of LPS to CD14, and Enhances LPS-Induced Activation of Peripheral Blood Monocytes. In: *The Journal of Immunology* 174 (4), S. 2280–2287. DOI: 10.4049/jimmunol.174.4.2280.

Hemler, M. E. (1990): VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. In: *Annual review of immunology* 8, S. 365–400. DOI: 10.1146/annurev.iy.08.040190.002053.

Hennet, T.; Chui, D.; Paulson, J. C.; Marth, J. D. (1998): Immune regulation by the ST6Gal sialyltransferase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (8), S. 4504–4509.

Hibbert, Richard G.; Teriete, Peter; Grundy, Gabrielle J.; Beavil, Rebecca L.; Reljic, Rajko; Holers, V. Michael et al. (2005): The structure of human CD23 and its interactions with IgE and CD21. In: *The Journal of experimental medicine* 202 (6), S. 751–760. DOI: 10.1084/jem.20050811.

Hijdra, Danielle; Vorselaars, Adriane Dm; Grutters, Jan C.; Claessen, Anke Me; Rijkers, Ger T. (2012): Differential expression of TNFR1 (CD120a) and TNFR2 (CD120b) on subpopulations of human monocytes. In: *Journal of inflammation (London, England)* 9 (1), S. 38. DOI: 10.1186/1476-9255-9-38.

Hock, B. D.; Fearnley, D. B.; Boyce, A.; McLellan, A. D.; Sorg, R. V.; Summers, K. L.; Hart, D. N. (1999): Human dendritic cells express a 95 kDa activation/differentiation antigen defined by CMRF-56. In: *Tissue antigens* 53 (4 Pt 1), S. 320–334.

Hock, B. D.; Starling, G. C.; Daniel, P. B.; Hart, D. N. (1994): Characterization of CMRF-44, a novel monoclonal antibody to an activation antigen expressed by the allostimulatory cells within peripheral blood, including dendritic cells. In: *Immunology* 83 (4), S. 573–581.

Hoffmann, Jędrzej; Ospelt, Manuel; Troidl, Christian; Voss, Sandra; Liebetrau, Christoph; Kim, Won-Keun et al. (2014): Sham surgery and inter-individual heterogeneity are major determi-

nants of monocyte subset kinetics in a mouse model of myocardial infarction. In: *PLoS ONE* 9 (6), e98456. DOI: 10.1371/journal.pone.0098456.

Hoffmann, J, Fišer K, Liebetrau C, Staubach N, Kost D, et al. (2020): High-Content Immunophenotyping and Hierarchical Clustering Reveal Sources of Heterogeneity and New Surface Markers of Human Blood Monocyte Subsets. In: *Thromb Haemost.* 120 (1), S. 141-155. DOI: 10.1055/s-0039-1700871

Hornell, T. M. C.; Beresford, G. W.; Bushey, A.; Boss, J. M.; Mellins, E. D. (2003): Regulation of the Class II MHC Pathway in Primary Human Monocytes by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. In: *The Journal of Immunology* 171 (5), S. 2374–2383. DOI: 10.4049/jimmunol.171.5.2374.

Huber, Wolfgang; Carey, Vincent J.; Gentleman, Robert; Anders, Simon; Carlson, Marc; Carvalho, Benilton S. et al. (2015): Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. In: *Nature methods* 12 (2), S. 115–121. DOI: 10.1038/nmeth.3252.

Hudig, Dorothy; Hunter, Kenneth W.; Diamond, W. John; Redelman, Doug (2014): Properties of human blood monocytes. I. CD91 expression and log orthogonal light scatter provide a robust method to identify monocytes that is more accurate than CD14 expression. In: *Cytometry. Part B, Clinical cytometry* 86 (2), S. 111–120. DOI: 10.1002/cyto.b.21131.

Hyun, Young-Min; Lefort, Craig T.; Kim, Minsoo (2009): Leukocyte integrins and their ligand interactions. In: *Immunologic research* 45 (2-3), S. 195–208. DOI: 10.1007/s12026-009-8101-1.

Idzkowska, Ewelina; Eljaszewicz, Andrzej; Miklasz, Paula; Musial, Włodzimierz J.; Tycinska, Agnieszka M.; Moniuszko, Marcin (2015): The role of different monocyte subsets in the pathogenesis of atherosclerosis and acute coronary syndromes. In: *Scand J Immunol*, n/a. DOI: 10.1111/sji.12314.

Ishida, I.; Kumanogoh, A.; Suzuki, K.; Akahani, S.; Noda, K. (2003): Involvement of CD100, a lymphocyte semaphorin, in the activation of the human immune system via CD72. Implications for the regulation of immune and inflammatory responses. In: *International Immunology* 15 (8), S. 1027–1034. DOI: 10.1093/intimm/dxg098.

Iwasaki, Sari; Masuda, Sakiko; Baba, Tomohisa; Tomaru, Utano; Katsumata, Kazuaki; Kasahara, Masanori; Ishizu, Akihiro (2011): Plasma-dependent, antibody- and Fcγ receptor-mediated translocation of CD8 molecules from T cells to monocytes. In: *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 79 (1), S. 46–56. DOI: 10.1002/cyto.a.20984.

Jaipersad, Anthony S.; Shantsila, Eduard; Blann, Andrew; Lip, Gregory Y. H. (2013): The effect of statin therapy withdrawal on monocyte subsets. In: *European Journal of Clinical Investigation* 43 (12), S. 1307–1313. DOI: 10.1111/eci.12183.

Jandl, Katharina; Stacher, Elvira; Balint, Zoltan; Sturm, Eva Maria; Maric, Jovana; Peinhaupt, Miriam et al. (2016): Activated prostaglandin D2 receptors on macrophages enhance neutrophil recruitment into the lung. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 137 (3), S. 833–843. DOI: 10.1016/j.jaci.2015.11.012.

Janeway, C.; Travers, P.; Walport, M.; et al. (Hg.) (2001): Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. The major histocompatibility complex and its functions. Available from: 5. Aufl. New York: Garland Science. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27156/>, zuletzt geprüft am 22.10.2016.

- Jia, Haibo; Abtahian, Farhad; Aguirre, Aaron D.; Lee, Stephen; Chia, Stanley; Lowe, Harry et al. (2013): In vivo diagnosis of plaque erosion and calcified nodule in patients with acute coronary syndrome by intravascular optical coherence tomography. In: *Journal of the American College of Cardiology* 62 (19), S. 1748–1758. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.05.071.
- Jockers, J. J.; Novak, N. (2006): Different expression of adhesion molecules and tetraspanins of monocytes of patients with atopic eczema. In: *Allergy* 61 (12), S. 1419–1422. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2006.01191.x.
- Joint International Society and Federation of Cardiology/World Health Organization (1979): Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease. Report of the Joint International Society and Federation of Cardiology/World Health Organization task force on standardization of clinical nomenclature. In: *Circulation* 59 (3), S. 607–609. DOI: 10.1161/01.CIR.59.3.607.
- Kaczmarek, E.; Koziak, K.; Sevigny, J.; Siegel, J. B.; Anrather, J.; Beaudoin, A. R. et al. (1996): Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (51), S. 33116–33122.
- Kalogeris, Theodore; Baines, Christopher P.; Krenz, Maïke; Korthuis, Ronald J. (2012): Cell biology of ischemia/reperfusion injury. In: *International review of cell and molecular biology* 298, S. 229–317. DOI: 10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7.
- Khairnar, Vishal; Duhan, Vikas; Maney, Sathish Kumar; Honke, Nadine; Shaabani, Namir; Pandyra, Aleksandra A. et al. (2015): CEACAM1 induces B-cell survival and is essential for protective antiviral antibody production. In: *Nature communications* 6, S. 6217. DOI: 10.1038/ncomms7217.
- Khan, M. S.; Ahmad, S. I. (2003): Circadian variation--increased morning incidence of acute myocardial infarction in patients with coronary artery disease. In: *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association* 53 (2), S. 84–87.
- Kiener, P. A.; Moran-Davis, P.; Rankin, B. M.; Wahl, A. F.; Aruffo, A.; Hollenbaugh, D. (1995): Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 155 (10), S. 4917–4925.
- Kolh, Philippe; Wijns, William; Danchin, Nicolas; Di Mario, Carlo; Falk, Volkmar; Folliguet, Thierry et al. (2010): Guidelines on myocardial revascularization. In: *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 38 Suppl, S1-S52. DOI: 10.1016/j.ejcts.2010.08.019.
- Kristiansen, M.; Graversen, J. H.; Jacobsen, C.; Sonne, O.; Hoffman, H. J.; Law, S. K.; Moestrup, S. K. (2001): Identification of the haemoglobin scavenger receptor. In: *Nature* 409 (6817), S. 198–201. DOI: 10.1038/35051594.
- Krumholz, W.; Szalay, G.; Ogal, H.; Menges, T. (2000): Der Einfluss von Migrane-Medikamenten auf die Monozyten-Chemotaxis. In: *Anaesthesiologie und Reanimation* 25 (4), S. 102–104.
- Kumar, Amit; Cannon, Christopher P. (2009): Acute Coronary Syndromes: Diagnosis and Management, Part I. In: *Mayo Clinic Proceedings* 84 (10), S. 917–938. DOI: 10.1016/S0025-6196(11)60509-0.
- Kurita-Taniguchi, M.; Fukui, A.; Hazeki, K.; Hirano, A.; Tsuji, S.; Matsumoto, M. et al. (2000): Functional Modulation of Human Macrophages Through CD46 (Measles Virus Receptor). Pro-

duction of IL-12 p40 and Nitric Oxide in Association with Recruitment of Protein-Tyrosine Phosphatase SHP-1 to CD46. In: *The Journal of Immunology* 165 (9), S. 5143–5152. DOI: 10.4049/jimmunol.165.9.5143.

Kwak, Brenda R.; Back, Magnus; Bochaton-Piallat, Marie-Luce; Caligiuri, Giuseppina; Daemen, Mat J A P; Davies, Peter F. et al. (2014): Biomechanical factors in atherosclerosis: mechanisms and clinical implications. In: *European Heart Journal* 35 (43), 3013–20, 3020a–3020d. DOI: 10.1093/eurheartj/ehu353.

Lajaunias, Frederic; Dayer, Jean-Michel; Chizzolini, Carlo (2005): Constitutive repressor activity of CD33 on human monocytes requires sialic acid recognition and phosphoinositide 3-kinase-mediated intracellular signaling. In: *European journal of immunology* 35 (1), S. 243–251. DOI: 10.1002/eji.200425273.

Lastres, P.; Bellon, T.; Cabanas, C.; Sanchez-Madrid, F.; Acevedo, A.; Gougos, A. et al. (1992): Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. In: *European journal of immunology* 22 (2), S. 393–397. DOI: 10.1002/eji.1830220216.

Lastres, P.; Letamendia, A.; Zhang, H.; Rius, C.; Almendro, N.; Raab, U. et al. (1996): Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. In: *The Journal of cell biology* 133 (5), S. 1109–1121.

Lecoanet-Henchoz, Sybille; Gauchat, Jean-Francois; Aubry, Jean-Pierre; Graber, Pierre; Life, Paul; Paul-Eugene, Nathalie et al. (1995): CD23 Regulates monocyte activation through a novel interaction with the adhesion molecules CD11b-CD18 and CD11c-CD18. In: *Immunity* 3 (1), S. 119–125. DOI: 10.1016/1074-7613(95)90164-7.

Lee, E. C. (1992): The integrin alpha 6 beta 4 is a laminin receptor. In: *The Journal of cell biology* 117 (3), S. 671–678. DOI: 10.1083/jcb.117.3.671.

Lee, Hyun; Whitfeld, Peter L.; Mackay, Charles R. (2008): Receptors for complement C5a. The importance of C5aR and the enigmatic role of C5L2. In: *Immunology and cell biology* 86 (2), S. 153–160. DOI: 10.1038/sj.icb.7100166.

Lee, Won Woo; Marinelli, Brett; van der Laan, Anja M; Sena, Brena F.; Gorbатов, Rostic; Leuschner, Florian et al. (2012): PET/MRI of inflammation in myocardial infarction. In: *Journal of the American College of Cardiology* 59 (2), S. 153–163. DOI: 10.1016/j.jacc.2011.08.066.

Leng, Lin; Metz, Christine N.; Fang, Yan; Xu, Jing; Donnelly, Seamas; Baugh, John et al. (2003): MIF signal transduction initiated by binding to CD74. In: *The Journal of experimental medicine* 197 (11), S. 1467–1476. DOI: 10.1084/jem.20030286.

Leung, L.; Saigo, K.; Grant, D. (1989): Heparin binds to human monocytes and modulates their procoagulant activities and secretory phenotypes. Effects of histidine-rich glycoprotein. In: *Blood* 73 (1), S. 177–184.

Leuschner, F.; Panizzi, P.; Chico-Calero, I.; Lee, W. W.; Ueno, T.; Cortez-Retamozo, V. et al. (2010): Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition Prevents the Release of Monocytes From Their Splenic Reservoir in Mice With Myocardial Infarction. In: *Circulation Research* 107 (11), S. 1364–1373. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.227454.

- Li, D.; Wang, L.; Yu, L.; Freundt, E. C.; Jin, B.; Screaton, G. R.; Xu, X.-N. (2009): Ig-Like Transcript 4 Inhibits Lipid Antigen Presentation through Direct CD1d Interaction. In: *The Journal of Immunology* 182 (2), S. 1033–1040. DOI: 10.4049/jimmunol.182.2.1033.
- Li, Z. (1999): The alphaMbeta2 integrin and its role in neutrophil function. In: *Cell research* 9 (3), S. 171–178. DOI: 10.1038/sj.cr.7290015.
- Liu, Dong; Niu, Zhong-Xiang (2009): The structure, genetic polymorphisms, expression and biological functions of complement receptor type 1 (CR1/CD35). In: *Immunopharmacology and immunotoxicology* 31 (4), S. 524–535. DOI: 10.3109/08923970902845768.
- Liu, Yong; Imanishi, Toshio; Ikejima, Hideyuki; Tsujioka, Hiroto; Ozaki, Yuichi; Kuroi, Akio et al. (2010): Association Between Circulating Monocyte Subsets and In-Stent Restenosis After Coronary Stent Implantation in Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction. In: *Circ J* 74 (12), S. 2585–2591. DOI: 10.1253/circj.CJ-10-0544.
- Lloyd-Jones, Donald; Adams, Robert; Carnethon, Mercedes; Simone, Giovanni de; Ferguson, T. Bruce; Flegal, Katherine et al. (2009): Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. In: *Circulation* 119 (3), S. 480–486. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.191259.
- Lo, S. K.; Golenbock, D. T.; Sass, P. M.; Maskati, A.; Xu, H.; Silverstein, R. L. (1997): Engagement of the Lewis X antigen (CD15) results in monocyte activation. In: *Blood* 89 (1), S. 307–314.
- Lock, Kevin; Zhang, Jiquan; Lu, Jinhua; Lee, Szu Hee; Crocker, Paul R. (2004): Expression of CD33-related siglecs on human mononuclear phagocytes, monocyte-derived dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells. In: *Immunobiology* 209 (1-2), S. 199–207. DOI: 10.1016/j.imbio.2004.04.007.
- Lou, Olivia; Alcaide, Pilar; Luscinskas, Francis W.; Muller, William A. (2007): CD99 is a key mediator of the transendothelial migration of neutrophils. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178 (2), S. 1136–1143.
- Luque, Maria Carolina A.; Gutierrez, Paulo S.; Debbas, Victor; Kalil, Jorge; Stolf, Beatriz S. (2015): CD100 and plexins B2 and B1 mediate monocyte-endothelial cell adhesion and might take part in atherogenesis. In: *Molecular immunology* 67 (2 Pt B), S. 559–567. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.07.028.
- Maas, A. H. E.; Appelman, Y. E. A. (2010): Gender differences in coronary heart disease. In: *Netherlands heart journal : monthly journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation* 18 (12), S. 598–602.
- Maekawa, Yuichiro; Anzai, Toshihisa; Yoshikawa, Tsutomu; Asakura, Yasushi; Takahashi, Toshiyuki; Ishikawa, Shiro et al. (2002): Prognostic significance of peripheral monocytosis after reperfused acute myocardial infarction: a possible role for left ventricular remodeling. In: *Journal of the American College of Cardiology* 39 (2), S. 241–246.
- Mallone, R.; Mannering, S. I.; Brooks-Worrell, B. M.; Durinovic-Bello, I.; Cilio, C. M.; Wong, F. S.; Schloot, N. C. (2011): Isolation and preservation of peripheral blood mononuclear cells for analysis of islet antigen-reactive T cell responses: position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society. In: *Clinical and experimental immunology* 163 (1), S. 33–49. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2010.04272.x.



- Mandl, Manuela; Schmitz, Susanne; Weber, Christian; Hristov, Michael; Signoret, Nathalie (2014): Characterization of the CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monocyte Population in Human Bone Marrow. In: *PLoS ONE* 9 (11), e112140. DOI: 10.1371/journal.pone.0112140.
- Marth, Jamey D.; Grewal, Prabhjit K. (2008): Mammalian glycosylation in immunity. In: *Nature reviews. Immunology* 8 (11), S. 874–887. DOI: 10.1038/nri2417.
- Martin-Ventura, Jose Luis; Madrigal-Matute, Julio; Munoz-Garcia, Begona; Blanco-Colio, Luis Miguel; van Oostrom, Melany; Zalba, Guillermo et al. (2009): Increased CD74 expression in human atherosclerotic plaques: contribution to inflammatory responses in vascular cells. In: *Cardiovascular Research* 83 (3), S. 586–594. DOI: 10.1093/cvr/cvp141.
- Mathew, Stephen O.; Rao, Krithi K.; Kim, Jong R.; Bambard, Nowland D.; Mathew, Porunelloor A. (2009): Functional role of human NK cell receptor 2B4 (CD244) isoforms. In: *European journal of immunology* 39 (6), S. 1632–1641. DOI: 10.1002/eji.200838733.
- McKay, R. G.; Pfeffer, M. A.; Pasternak, R. C.; Markis, J. E.; Come, P. C.; Nakao, S. et al. (1986): Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion. In: *Circulation* 74 (4), S. 693–702.
- Meerschaert, J.; Furie, M. B. (1995): The adhesion molecules used by monocytes for migration across endothelium include CD11a/CD18, CD11b/CD18, and VLA-4 on monocytes and ICAM-1, VCAM-1, and other ligands on endothelium. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 154 (8), S. 4099–4112.
- Mestas, Javier; Ley, Klaus (2008): Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. In: *Trends in cardiovascular medicine* 18 (6), S. 228–232. DOI: 10.1016/j.tcm.2008.11.004.
- Meyaard, Linde (2008): The inhibitory collagen receptor LAIR-1 (CD305). In: *Journal of Leukocyte Biology* 83 (4), S. 799–803. DOI: 10.1189/jlb.0907609.
- Mezzaroma, Eleonora; Toldo, Stefano; Farkas, Daniela; Seropian, Ignacio M.; van Tassell, Benjamin W.; Salloum, Fadi N. et al. (2011): The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (49), S. 19725–19730. DOI: 10.1073/pnas.1108586108.
- Michlewska, Sylwia; Dransfield, Ian; Megson, Ian L.; Rossi, Adriano G. (2009): Macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils is critically regulated by the opposing actions of pro-inflammatory and anti-inflammatory agents: key role for TNF-alpha. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 (3), S. 844–854. DOI: 10.1096/fj.08-121228.
- Moestrup, S. K.; Gliemann, J.; Pallesen, G. (1992): Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. In: *Cell and tissue research* 269 (3), S. 375–382.
- Moldenhauer, G.; Henne, C.; Karhausen, J.; Möller, P. (1999): Surface-expressed invariant chain (CD74) is required for internalization of human leucocyte antigen-DR molecules to early endosomal compartments. In: *Immunology* 96 (3), S. 473–484. DOI: 10.1046/j.1365-2567.1999.00676.x.

- Möllmann, H.; Szardien, S.; Kempfert, J.; Nef, H.; Liebetrau, C.; Walther, T.; Hamm, C. (2013): Myokardrevaskularisation. In: *Herz* 38 (5), S. 513–528. DOI: 10.1007/s00059-013-3917-9.
- Monji, Tatsue; Petersons, JerilynTynes; Saund, Narinder K.; Vuckovic, Slavica; Hart, Derek Nigel John; Auditore-Hargreaves, Karen; Risdon, Grant (2002): Competent dendritic cells derived from CD34+ progenitors express CMRF-44 antigen early in the differentiation pathway. In: *Immunology and cell biology* 80 (3), S. 216–225. DOI: 10.1046/j.1440-1711.2002.01075.x.
- Moore, Kathryn J.; Tabas, Ira (2011): Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. In: *Cell* 145 (3), S. 341–355. DOI: 10.1016/j.cell.2011.04.005.
- Muller, W. A.; Weigl, S. A.; Deng, X.; Phillips, D. M. (1993): PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. In: *The Journal of experimental medicine* 178 (2), S. 449–460.
- Munro, J. M.; Lo, S. K.; Corless, C.; Robertson, M. J.; Lee, N. C.; Barnhill, R. L. et al. (1992a): Expression of sialyl-Lewis X, an E-selectin ligand, in inflammation, immune processes, and lymphoid tissues. In: *The American journal of pathology* 141 (6), S. 1397–1408.
- Munro, S.; Bast, B. J.; Colley, K. J.; Tedder, T. F. (1992b): The B lymphocyte surface antigen CD75 is not an alpha-2,6-sialyltransferase but is a carbohydrate antigen, the production of which requires the enzyme. In: *Cell* 68 (6), S. 1003.
- Musso, T.; Deaglio, S.; Franco, L.; Calosso, L.; Badolato, R.; Garbarino, G. et al. (2001): CD38 expression and functional activities are up-regulated by IFN-gamma on human monocytes and monocytic cell lines. In: *Journal of Leukocyte Biology* 69 (4), S. 605–612.
- Muthu, Kuzhali; He, Li-Ke; Szilagyi, Andrea; Stevenson, Julia; Gamelli, Richard L.; Shankar, Ravi (2009): Propranolol restores the tumor necrosis factor-alpha response of circulating inflammatory monocytes and granulocytes after burn injury and sepsis. In: *Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association* 30 (1), S. 8–18. DOI: 10.1097/BCR.0b013e3181921f22.
- Nachtnebel, A.; Warmuth, M. (2013): Perkutane koronare Intervention bei chronischen Kompletverschluss. In: *Decision Support Dokument* (64).
- Nahrendorf, M.; Pittet, M. J.; Swirski, F. K. (2010): Monocytes: Protagonists of Infarct Inflammation and Repair After Myocardial Infarction. In: *Circulation* 121 (22), S. 2437–2445. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.916346.
- Nahrendorf, M.; Swirski, F. K.; Aikawa, E.; Stangenberg, L.; Wurdinger, T.; Figueiredo, J.-L. et al. (2007): The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. In: *Journal of Experimental Medicine* 204 (12), S. 3037–3047. DOI: 10.1084/jem.20070885.
- Nakayama, F.; Nishihara, S.; Iwasaki, H.; Kudo, T.; Okubo, R.; Kaneko, M. et al. (2001): CD15 expression in mature granulocytes is determined by alpha 1,3-fucosyltransferase IX, but in promyelocytes and monocytes by alpha 1,3-fucosyltransferase IV. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (19), S. 16100–16106. DOI: 10.1074/jbc.M007272200.
- Nasser, Mohd W.; Raghuvanshi, Sandeep K.; Malloy, Kimberly M.; Gangavarapu, Pavani; Shim, Joong-Youn; Rajarathnam, Krishna; Richardson, Ricardo M. (2007): CXCR1 and CXCR2 activation and regulation. Role of aspartate 199 of the second extracellular loop of

- CXCR2 in CXCL8-mediated rapid receptor internalization. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (9), S. 6906–6915. DOI: 10.1074/jbc.M610289200.
- Nazarpour, Robab; Zabihi, Ebrahim; Alijanpour, Ebrahim; Abedian, Zeinab; Mehdizadeh, Hamid; Rahimi, Fatemeh (2012): Optimization of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) Cryopreservation. In: *International journal of molecular and cellular medicine* 1 (2), S. 88–93.
- Nemzek, J. A.; Bolgos, G. L.; Williams, B. A.; Remick, D. G. (2001): Differences in normal values for murine white blood cell counts and other hematological parameters based on sampling site. In: *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 50 (10), S. 523–527. DOI: 10.1007/PL00000229.
- Nicoll, G.; Ni, J.; Liu, D.; Klenerman, P.; Munday, J.; Dubock, S. et al. (1999): Identification and Characterization of a Novel Siglec, Siglec-7, Expressed by Human Natural Killer Cells and Monocytes. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (48), S. 34089–34095. DOI: 10.1074/jbc.274.48.34089.
- Niederbichler, Andreas D.; Hoesel, Laszlo M.; Westfall, Margaret V.; Gao, Hongwei; Ipaktchi, Kyros R.; Sun, Lei et al. (2006): An essential role for complement C5a in the pathogenesis of septic cardiac dysfunction. In: *The Journal of experimental medicine* 203 (1), S. 53–61. DOI: 10.1084/jem.20051207.
- Nong, Y. H.; Remold-O'Donnell, E.; LeBien, T. W.; Remold, H. G. (1989): A monoclonal antibody to sialophorin (CD43) induces homotypic adhesion and activation of human monocytes. In: *The Journal of experimental medicine* 170 (1), S. 259–267.
- Ojeda-Fernandez, Luisa; Recio-Poveda, Lucia; Aristorena, Mikel; Lastres, Pedro; Blanco, Francisco J.; Sanz-Rodriguez, Francisco et al. (2016): Mice Lacking Endoglin in Macrophages Show an Impaired Immune Response. In: *PLoS genetics* 12 (3), e1005935. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005935.
- Parameswaran, Narayanan; Patial, Sonika (2010): Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages. In: *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 20 (2), S. 87–103.
- Pardali, E.; Waltenberger, J. (2012): Monocyte function and trafficking in cardiovascular disease. In: *Thromb Haemost* 108 (5), S. 804–811. DOI: 10.1160/TH12-04-0276.
- Passlick, B.; Flieger, D.; Ziegler-Heitbrock, H. W. (1989): Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. In: *Blood* 74 (7), S. 2527–2534.
- Paxinos, George; Katritsis, Demosthenes G. (2012): Current therapy of non-ST-elevation acute coronary syndromes. In: *Hellenic journal of cardiology : HJC = Hellenike kardiologike epitheorese* 53 (1), S. 63–71.
- Peters, Robert W.; Zoble, Robert G.; Brooks, Marla M. (2002): Onset of acute myocardial infarction during sleep. In: *Clinical cardiology* 25 (5), S. 237–241.
- Philippidis, P.; Mason, J. C.; Evans, B. J.; Nadra, I.; Taylor, K. M.; Haskard, D. O.; Landis, R. C. (2004): Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. In: *Circulation Research* 94 (1), S. 119–126. DOI: 10.1161/01.RES.0000109414.78907.F9.

- Piali, L.; Hammel, P.; Uherek, C.; Bachmann, F.; Gisler, R. H.; Dunon, D.; Imhof, B. A. (1995): CD31/PECAM-1 is a ligand for alpha v beta 3 integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium. In: *The Journal of cell biology* 130 (2), S. 451–460.
- Pinto, Alexander R.; Ilinykh, Alexei; Ivey, Malina J.; Kuwabara, Jill T.; D'Antoni, Michelle L.; Debuque, Ryan et al. (2016): Revisiting Cardiac Cellular Composition. In: *Circulation Research* 118 (3), S. 400–409. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307778.
- Privratsky, Jamie R.; Newman, Debra K.; Newman, Peter J. (2010): PECAM-1: conflicts of interest in inflammation. In: *Life sciences* 87 (3-4), S. 69–82. DOI: 10.1016/j.lfs.2010.06.001.
- Pruitt, Kim D.; Brown, Garth R.; Hiatt, Susan M.; Thibaud-Nissen, Françoise; Astashyn, Alexander; Ermolaeva, Olga et al. (2014): RefSeq: an update on mammalian reference sequences. In: *Nucleic acids research* 42 (Database issue), D756–63. DOI: 10.1093/nar/gkt1114.
- Puig-Kroger, A.; Sanz-Rodriguez, F.; Longo, N.; Sanchez-Mateos, P.; Botella, L.; Teixido, J. et al. (2000): Maturation-Dependent Expression and Function of the CD49d Integrin on Monocyte-Derived Human Dendritic Cells. In: *The Journal of Immunology* 165 (8), S. 4338–4345. DOI: 10.4049/jimmunol.165.8.4338.
- Pulte, E. Dianne; Broekman, M. Johan; Olson, Kim E.; Drosopoulos, Joan H. F.; Kizer, Jorge R.; Islam, Naziba; Marcus, Aaron J. (2007): CD39/NTPDase-1 activity and expression in normal leukocytes. In: *Thrombosis research* 121 (3), S. 309–317. DOI: 10.1016/j.thromres.2007.04.008.
- Ramachandran, Hari; Laux, Jessica; Moldovan, Ioana; Caspell, Richard; Lehmann, Paul V.; Subbramanian, Ramu A. (2012): Optimal thawing of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells for use in high-throughput human immune monitoring studies. In: *Cells* 1 (3), S. 313–324. DOI: 10.3390/cells1030313.
- Reterink, T. J.; Klar-Mohamad, N.; Nibbering, P. H.; van Es, L. A.; Daha, M. R. (1996): CD32 expression and signaling is down-regulated by transforming growth factor-beta 1 on human monocytes. In: *European journal of immunology* 26 (8), S. 1970–1973. DOI: 10.1002/eji.1830260844.
- Rezaie-Majd, Abdolreza; Prager, Gerald W.; Bucek, Robert A.; Scherthaner, Gerit H.; Maca, Thomas; Kress, Hans-Georg et al. (2003): Simvastatin reduces the expression of adhesion molecules in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (3), S. 397–403. DOI: 10.1161/01.ATV.0000059384.34874.F0.
- Richter, G.; Burdach, S. (2004): ICOS: a new costimulatory ligand/receptor pair and its role in T-cell activation. In: *Onkologie* 27 (1), S. 91–95. DOI: 10.1159/000075612.
- Robbins, Clinton S.; Swirski, Filip K. (2010): The multiple roles of monocyte subsets in steady state and inflammation. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 67 (16), S. 2685–2693. DOI: 10.1007/s00018-010-0375-x.
- Roberts, R.; DeMello, V.; Sobel, B. E. (1976): Deleterious effects of methylprednisolone in patients with myocardial infarction. In: *Circulation* 53 (3 Suppl), I204–6.
- Roffi, Marco; Patrono, Carlo; Collet, Jean-Philippe; Mueller, Christian; Valgimigli, Marco; Andreotti, Felicita et al. (2016): 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-

Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). In: *European Heart Journal* 37 (3), S. 267–315. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv320.

Rogacev, Kyrill S.; Zawada, Adam M.; Hundsdorfer, Johanna; Achenbach, Marina; Held, Gerhard; Fliser, Danilo; Heine, Gunnar H. (2015): Immunosuppression and monocyte subsets. In: *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 30 (1), S. 143–153. DOI: 10.1093/ndt/gfu315.

Röhn, Till A.; Boes, Marianne; Wolters, Dirk; Spindeldreher, Sebastian; Müller, Bernd; Langen, Hanno et al. (2004): Upregulation of the CLIP self peptide on mature dendritic cells antagonizes T helper type 1 polarization. In: *Nature immunology* 5 (9), S. 909–918. DOI: 10.1038/ni1108.

Rossi, Elisa; Sanz-Rodriguez, Francisco; Eleno, Nelida; Duwell, Annette; Blanco, Francisco J.; Langa, Carmen et al. (2013): Endothelial endoglin is involved in inflammation: role in leukocyte adhesion and transmigration. In: *Blood* 121 (2), S. 403–415. DOI: 10.1182/blood-2012-06-435347.

Russell, S. M.; Keegan, A. D.; Harada, N.; Nakamura, Y.; Noguchi, M.; Leland, P. et al. (1993): Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. In: *Science (New York, N.Y.)* 262 (5141), S. 1880–1883.

Sami, Shehzad; Willerson, James T. (2010): Contemporary treatment of unstable Angina and Non-ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction (Part 1).

Sanada, Shoji; Komuro, Issei; Kitakaze, Masafumi (2011): Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 301 (5), H1723-41. DOI: 10.1152/ajpheart.00553.2011.

Santee, S. M.; Owen-Schaub, L. B. (1996): Human tumor necrosis factor receptor p75/80 (CD120b) gene structure and promoter characterization. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (35), S. 21151–21159.

Schaer, Christian A.; Vallelian, Florence; Imhof, Alexander; Schoedon, Gabriele; Schaer, Dominik J. (2007a): CD163-expressing monocytes constitute an endotoxin-sensitive Hb clearance compartment within the vascular system. In: *Journal of Leukocyte Biology* 82 (1), S. 106–110. DOI: 10.1189/jlb.0706453.

Schaer, Dominik J.; Alayash, Abdu I.; Buehler, Paul W. (2007b): Gating the radical hemoglobin to macrophages: the anti-inflammatory role of CD163, a scavenger receptor. In: *Antioxidants & Redox Signaling* 9 (7), S. 991–999. DOI: 10.1089/ars.2007.1576.

Schenkel, Alan R.; Mamdouh, Zahra; Chen, Xia; Liebman, Ronald M.; Müller, William A. (2002): CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. In: *Nature immunology* 3 (2), S. 143–150. DOI: 10.1038/ni749.

Schippers, A.; Muschaweck, M.; Clahsen, T.; Tautorat, S.; Grieb, L.; Tenbrock, K. et al. (2016): beta7-Integrin exacerbates experimental DSS-induced colitis in mice by directing inflammatory monocytes into the colon. In: *Mucosal immunology* 9 (2), S. 527–538. DOI: 10.1038/mi.2015.82.

Seidler, Sebastian; Zimmermann, Henning W.; Bartneck, Matthias; Trautwein, Christian; Tacke, Frank (2010): Age-dependent alterations of monocyte subsets and monocyte-related

chemokine pathways in healthy adults. In: *BMC immunology* 11, S. 30. DOI: 10.1186/1471-2172-11-30.

Shang, X. Z.; Lang, B. J.; Issekutz, A. C. (1998): Adhesion molecule mechanisms mediating monocyte migration through synovial fibroblast and endothelium barriers: role for CD11/CD18, very late antigen-4 (CD49d/CD29), very late antigen-5 (CD49e/CD29), and vascular cell adhesion molecule-1 (CD106). In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 160 (1), S. 467–474.

Shantsila, Eduard; Watson, Timothy; Tse, Hung-Fat; Lip, Gregory Y. H. (2008): New insights on endothelial progenitor cell subpopulations and their angiogenic properties. In: *Journal of the American College of Cardiology* 51 (6), S. 669–671. DOI: 10.1016/j.jacc.2007.09.057.

Shantsila, Eduard; Wrigley, Benjamin J.; Tapp, Luke D.; 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. In: *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 9 (5), S. 1056–1066. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2011.04244.x.

Shaw, Albert C.; Goldstein, Daniel R.; Montgomery, Ruth R. (2013): Age-dependent dysregulation of innate immunity. In: *Nature reviews. Immunology* 13 (12), S. 875–887. DOI: 10.1038/nri3547.

Shelley, C. S.; Remold-O'Donnell, E.; Davis, A. E. 3rd; Bruns, G. A.; Rosen, F. S.; Carroll, M. C.; Whitehead, A. S. (1989): Molecular characterization of sialophorin (CD43), the lymphocyte surface sialoglycoprotein defective in Wiskott-Aldrich syndrome. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (8), S. 2819–2823.

Shen, Hua; Kreisel, Daniel; Goldstein, Daniel Robert (2013): Processes of sterile inflammation. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 191 (6), S. 2857–2863. DOI: 10.4049/jimmunol.1301539.

Shi, Jun; Ikeda, Kazuma; Maeda, Yosinobu; Shinagawa, Katsuji; Ohtsuka, Aiji; Yamamura, Hajime; Tanimoto, Mitsune (2008): Identification of CD123+ myeloid dendritic cells as an early-stage immature subset with strong tumoristatic potential. In: *Cancer letters* 270 (1), S. 19–29. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.04.048.

Shinagawa, Hisahito; Frantz, Stefan (2015): Cellular immunity and cardiac remodeling after myocardial infarction: role of neutrophils, monocytes, and macrophages. In: *Current heart failure reports* 12 (3), S. 247–254. DOI: 10.1007/s11897-015-0255-7.

Shinde, Arti V.; Frangogiannis, Nikolaos G. (2014): Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 70, S. 74–82. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.11.015.

Signori, Luis Ulisses; da Silva, Antonio Marcos Vargas; Della Plentz, Rodrigo Mea; Moreno, Heitor, JR; Irigoyen, Maria Claudia; Schaan, Beatriz D'Agord (2009): Reversal of postprandial endothelial dysfunction by cyclooxygenase inhibition in healthy volunteers. In: *Journal of cardiovascular pharmacology* 54 (1), S. 90–93. DOI: 10.1097/FJC.0b013e3181abc26f.

Singhal, P. C.; Sharma, P.; Kapasi, A. A.; Reddy, K.; Franki, N.; Gibbons, N. (1998): Morphine enhances macrophage apoptosis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 160 (4), S. 1886–1893.

Son, Myoungsun; Diamond, Betty (2014): C1q-mediated repression of human monocytes is regulated by leukocyte-associated Ig-like receptor 1 (LAIR-1). In: *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 20, S. 559–568. DOI: 10.2119/molmed.2014.00185.

Son, Myoungsun; Santiago-Schwarz, Frances; Al-Abed, Yousef; Diamond, Betty (2012): C1q limits dendritic cell differentiation and activation by engaging LAIR-1. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (46), E3160-7. DOI: 10.1073/pnas.1212753109.

Spahn, Jessica H.; Kreisel, Daniel (2014): Monocytes in Sterile Inflammation: Recruitment and Functional Consequences. In: *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 62 (3), S. 187–194. DOI: 10.1007/s00005-013-0267-5.

Speidl, Walter S.; Exner, Markus; Amighi, Jasmin; Kastl, Stefan P.; Zorn, Gerlinde; Maurer, Gerald et al. (2005): Complement component C5a predicts future cardiovascular events in patients with advanced atherosclerosis. In: *European Heart Journal* 26 (21), S. 2294–2299. DOI: 10.1093/eurheartj/ehi339.

Stamenkovic, I.; Sgroi, D.; Aruffo, A.; Sy, M. S.; Anderson, T. (1991): The B lymphocyte adhesion molecule CD22 interacts with leukocyte common antigen CD45RO on T cells and alpha 2-6 sialyltransferase, CD75, on B cells. In: *Cell* 66 (6), S. 1133–1144.

Statistisches Bundesamt (2012): Staat & Gesellschaft - Krankheitskosten - Statistisches Bundesamt (Destatis). Hg. v. Statistisches Bundesamt. Internet. Online verfügbar unter <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Krankheitskosten/Tabellen/KrankheitsklassenAlter.html>, zuletzt aktualisiert am 15.06.2012, zuletzt geprüft am 23.04.2014.

Statistisches Bundesamt (2017): Pressemitteilung Nr. 347 vom 29. September 2017. Krankheitskosten 2015 nach Krankheiten. Hg. v. Statistisches Bundesamt. Internet. Online verfügbar unter [https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2017/09/PD17\\_347\\_236.html](https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2017/09/PD17_347_236.html), zuletzt geprüft am 20.10.2020.

Statistisches Bundesamt (2020): Todesursachen in Deutschland. Ausgewählte Todesursachen 2018. Hg. v. Statistisches Bundesamt. Internet. Online verfügbar unter <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaele-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html>, zuletzt geprüft am 20.10.2020.

Stent, G.; Irving, L.; Lewin, S.; Crowe, S. M. (1995): The kinetics of surface expression of CD11/CD18 integrins and CD54 on monocytes and macrophages. In: *Clinical & Experimental Immunology* 100 (2), S. 366–376. DOI: 10.1111/j.1365-2249.1995.tb03678.x.

Stumptner-Cuvelette, Pamela; Benaroch, Philippe (2002): Multiple roles of the invariant chain in MHC class II function. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1542 (1-3), S. 1–13. DOI: 10.1016/S0167-4889(01)00166-5.

Sugamura, K.; Asao, H.; Kondo, M.; Tanaka, N.; Ishii, N.; Ohbo, K. et al. (1996): The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. In: *Annual review of immunology* 14, S. 179–205. DOI: 10.1146/annurev.immunol.14.1.179.

Suttles, J.; Milhorn, D. M.; Miller, R. W.; Poe, J. C.; Wahl, L. M.; Stout, R. D. (1999): CD40 Signaling of Monocyte Inflammatory Cytokine Synthesis through an ERK1/2-dependent Path-

way. A TARGET OF INTERLEUKIN (IL)-4 AND IL-10 ANTI-INFLAMMATORY ACTION. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (9), S. 5835–5842. DOI: 10.1074/jbc.274.9.5835.

Swirski, Filip K.; Nahrendorf, Matthias; Etzrodt, Martin; Wildgruber, Moritz; Cortez-Retamozo, Virna; Panizzi, Peter et al. (2009): Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. In: *Science (New York, N.Y.)* 325 (5940), S. 612–616. DOI: 10.1126/science.1175202.

Tager, Andrew M.; Luster, Andrew D. (2003): BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. In: *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 69 (2-3), S. 123–134.

Takenaka, Maisa C.; Robson, Simon; Quintana, Francisco J. (2016): Regulation of the T Cell Response by CD39. In: *Trends in immunology* 37 (7), S. 427–439. DOI: 10.1016/j.it.2016.04.009.

Talman, Virpi; Ruskoaho, Heikki (2016): Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration. In: *Cell and tissue research*. DOI: 10.1007/s00441-016-2431-9.

Tanaka, Motoyuki; Krutzik, Stephan R.; Sieling, Peter A.; Lee, Delphine J.; Rea, Thomas H.; Modlin, Robert L. (2009): Activation of Fc gamma RI on monocytes triggers differentiation into immature dendritic cells that induce autoreactive T cell responses. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183 (4), S. 2349–2355. DOI: 10.4049/jimmunol.0801683.

Tapp, Luke D.; Shantsila, Eduard; Wrigley, Benjamin J.; Montoro-Garcia, Silvia; Lip, Gregory Y. H. (2013): TLR4 expression on monocyte subsets in myocardial infarction. In: *J Intern Med* 273 (3), S. 294–305. DOI: 10.1111/joim.12011.

Tartaglia, L. A.; Weber, R. F.; Figari, I. S.; Reynolds, C.; Palladino, M. A., JR; Goeddel, D. V. (1991): The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (20), S. 9292–9296.

Tehrani, D. M.; Seto, A. H. (2013): Third universal definition of myocardial infarction: Update, caveats, differential diagnoses. In: *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 80 (12), S. 777–786. DOI: 10.3949/ccjm.80a.12158.

Testa, U.; Fossati, C.; Samoggia, P.; Masciulli, R.; Mariani, G.; Hassan, H. J. et al. (1996): Expression of growth factor receptors in unilineage differentiation culture of purified hematopoietic progenitors. In: *Blood* 88 (9), S. 3391–3406.

The R Core Team (2016): R: A Language and Environment for Statistical Computing (Version 3.3.1). Online verfügbar unter <https://cran.r-project.org/doc/manuals/r-release/fullrefman.pdf>, zuletzt geprüft am 23.08.2016.

Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, White HD; Executive Group on behalf of the Joint European Society of Cardiology (ESC)/American College of Cardiology (ACC)/American Heart Association (AHA)/World Heart Federation (WHF) Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction (2018): Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction. In: *Glob Heart*; 13 (4), S. 305–338. DOI: 10.1016/j.gheart.2018.08.004.

Tiisala, S.; Paavonen, T.; Renkonen, R. (1995): Alpha E beta 7 and alpha 4 beta 7 integrins associated with intraepithelial and mucosal homing, are expressed on macrophages. In: *European journal of immunology* 25 (2), S. 411–417. DOI: 10.1002/eji.1830250216.



- Tillmann, Sabine; Bernhagen, Jurgen; Noels, Heidi (2013): Arrest Functions of the MIF Ligand/Receptor Axes in Atherogenesis. In: *Frontiers in immunology* 4, S. 115. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00115.
- Tippett, Emma; Cheng, Wan-Jung; Westhorpe, Clare; Cameron, Paul U.; Brew, Bruce J.; Lewin, Sharon R. et al. (2011): Differential expression of CD163 on monocyte subsets in healthy and HIV-1 infected individuals. In: *PLoS ONE* 6 (5), e19968. DOI: 10.1371/journal.pone.0019968.
- Tollerud, D. J.; Clark, J. W.; Brown, L. M.; Neuland, C. Y.; Pankiw-Trost, L. K.; Blattner, W. A.; Hoover, R. N. (1989): The influence of age, race, and gender on peripheral blood mononuclear-cell subsets in healthy nonsmokers. In: *Journal of clinical immunology* 9 (3), S. 214–222.
- Trial, J.; Baughn, R. E.; Wygant, J. N.; McIntyre, B. W.; Birdsall, H. H.; Youker, K. A. et al. (1999): Fibronectin fragments modulate monocyte VLA-5 expression and monocyte migration. In: *The Journal of clinical investigation* 104 (4), S. 419–430. DOI: 10.1172/JCI4824.
- Troidl, C.; Möllmann, H.; Nef, H.; Masseli, F.; Voss, S.; Szardien, S. et al. (2009): Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 13 (9B), S. 3485–3496. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00707.x.
- Tsujioka, Hiroto; Imanishi, Toshio; Ikejima, Hideyuki; Kuroi, Akio; Takarada, Shigeho; Tanimoto, Takashi et al. (2009): Impact of Heterogeneity of Human Peripheral Blood Monocyte Subsets on Myocardial Salvage in Patients With Primary Acute Myocardial Infarction. In: *Journal of the American College of Cardiology* 54 (2), S. 130–138. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.04.021.
- Vafaie, M.; Katus, H. A. (2013): Myokardinfarkt. In: *Herz* 38 (8), S. 821–827. DOI: 10.1007/s00059-013-3989-6.
- van den Borne, Pleunie; van der Laan, Sander W.; Bovens, Sandra M.; Koole, Dave; Kowala, Mark C.; Michael, Laura F. et al. (2014): Leukotriene B4 levels in human atherosclerotic plaques and abdominal aortic aneurysms. In: *PLoS ONE* 9 (1), e86522. DOI: 10.1371/journal.pone.0086522.
- van der Laan, A. M.; ter Horst, E. N.; Delewi, R.; Begieneman, M. P. V.; Krijnen, P. A. J.; Hirsch, A. et al. (2013): Monocyte subset accumulation in the human heart following acute myocardial infarction and the role of the spleen as monocyte reservoir. In: *European Heart Journal*. DOI: 10.1093/eurheartj/eh331.
- van Furth, R.; Cohn, Z. A. (1968): The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. In: *The Journal of experimental medicine* 128 (3), S. 415–435.
- van Lith, Marcel; McEwen-Smith, Rosanna M.; Benham, Adam M. (2010): HLA-DP, HLA-DQ, and HLA-DR have different requirements for invariant chain and HLA-DM. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (52), S. 40800–40808. DOI: 10.1074/jbc.M110.148155.
- van Zandbergen, G.; Westerhuis, R.; Mohamad, N. K.; van De Winkel, J G; Daha, M. R.; van Kooten, C. (1999): Crosslinking of the human Fc receptor for IgA (FcalphaRI/CD89) triggers FcR gamma-chain-dependent shedding of soluble CD89. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 163 (11), S. 5806–5812.
- Varchetta, Stefania; Brunetta, Enrico; Roberto, Alessandra; Mikulak, Joanna; Hudspeth, Kelly L.; Mondelli, Mario U.; Mavilio, Domenico (2012): Engagement of Siglec-7 receptor induces a

pro-inflammatory response selectively in monocytes. In: *PLoS ONE* 7 (9), e45821. DOI: 10.1371/journal.pone.0045821.

Viola, Joana; Soehnlein, Oliver (2015): Atherosclerosis - A matter of unresolved inflammation. In: *Seminars in immunology* 27 (3), S. 184–193. DOI: 10.1016/j.smim.2015.03.013.

Visser, Lizette; Vos, Alex F. de; Hamann, Jorg; Melief, Marie-Jose; van Meurs, Marjan; van Lier, Rene A. W. et al. (2002): Expression of the EGF-TM7 receptor CD97 and its ligand CD55 (DAF) in multiple sclerosis. In: *Journal of neuroimmunology* 132 (1-2), S. 156–163.

Watkins, Nicholas A.; Gusnanto, Arief; Bono, Bernard de; De, Subhajyoti; Miranda-Saavedra, Diego; Hardie, Debbie L. et al. (2009): A HaemAtlas: characterizing gene expression in differentiated human blood cells. In: *Blood* 113 (19), e1-9. DOI: 10.1182/blood-2008-06-162958.

Webb, D. S.; Shimizu, Y.; van Seventer, G. A.; Shaw, S.; Gerrard, T. L. (1990): LFA-3, CD44, and CD45: physiologic triggers of human monocyte TNF and IL-1 release. In: *Science (New York, N.Y.)* 249 (4974), S. 1295–1297.

Williams, K. J.; Tabas, I. (1995): The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 15 (5), S. 551–561.

Wolk, K.; Grütz, G.; Witte, K.; Volk, H-D; Sabat, R. (2005): The expression of legumain, an asparaginyl endopeptidase that controls antigen processing, is reduced in endotoxin-tolerant monocytes. In: *Genes and immunity* 6 (5), S. 452–456. DOI: 10.1038/sj.gene.6364224.

Wolk, Kerstin; Kunz, Stefanie; Crompton, Nigel E. A.; Volk, Hans-Dieter; Sabat, Robert (2003): Multiple mechanisms of reduced major histocompatibility complex class II expression in endotoxin tolerance. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (20), S. 18030–18036. DOI: 10.1074/jbc.M207714200.

Wong, Kok Loon; Tai, June Jing-Yi; Wong, Wing-Cheong; Han, Hao; Sem, Xiaohui; Yeap, Wei-Hseun et al. (2011): Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. In: *Blood* 118 (5), e16-31. DOI: 10.1182/blood-2010-12-326355.

Wong, Kok Loon; Yeap, Wei Hseun; Tai, June Jing Yi; Ong, Siew Min; Dang, Truong Minh; Wong, Siew Cheng (2012): The three human monocyte subsets: implications for health and disease. In: *Immunologic research* 53 (1-3), S. 41–57. DOI: 10.1007/s12026-012-8297-3.

Woodfin, Abigail; Voisin, Mathieu-Benoit; Nourshargh, Sussan (2007): PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (12), S. 2514–2523. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.151456.

Wright, S. D.; Ramos, R. A.; Tobias, P. S.; Ulevitch, R. J.; Mathison, J. C. (1990): CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. In: *Science (New York, N.Y.)* 249 (4975), S. 1431–1433.

Wykes, M.; MacDonald, K. P. A.; Tran, M.; Quin, R. J.; Xing, P. X.; Gendler, S. J. et al. (2002): MUC1 epithelial mucin (CD227) is expressed by activated dendritic cells. In: *Journal of Leukocyte Biology* 72 (4), S. 692–701.

Yang, Y.; Harrison, J. E.; Print, C. G.; Lehnert, K.; Sammar, M.; Lazarovits, A.; Krissansen, G. W. (1996): Interaction of monocytoïd cells with the mucosal addressin MAdCAM-1 via the integrins VLA-4 and LPAM-1. In: *Immunology and cell biology* 74 (5), S. 383–393. DOI: 10.1038/icb.1996.67.

- Ye, Yu-Xiang; Basse-Lusebrink, Thomas C.; Arias-Loza, Paula-Anahi; Kocoski, Vladimir; Kampf, Thomas; Gan, Qiang et al. (2013): Monitoring of monocyte recruitment in reperfused myocardial infarction with intramyocardial hemorrhage and microvascular obstruction by combined fluorine 19 and proton cardiac magnetic resonance imaging. In: *Circulation* 128 (17), S. 1878–1888. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.000731.
- Yellon, Derek M.; Hausenloy, Derek J. (2007): Myocardial reperfusion injury. In: *The New England journal of medicine* 357 (11), S. 1121–1135. DOI: 10.1056/NEJMra071667.
- Youngnak-Piboonratanakit, P.; Tsushima, F.; Otsuki, N.; Igarashi, H.; Omura, K.; Azuma, M. (2006): Expression and regulation of human CD275 on endothelial cells in healthy and inflamed mucosal tissues. In: *Scandinavian journal of immunology* 63 (3), S. 191–198. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2006.01726.x.
- Yu, Qigui; Chow, Edith M. C.; Wong, Henry; Gu, Jenny; Mandelboim, Ofer; Gray-Owen, Scott D.; Ostrowski, Mario A. (2006): CEACAM1 (CD66a) promotes human monocyte survival via a phosphatidylinositol 3-kinase- and AKT-dependent pathway. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (51), S. 39179–39193. DOI: 10.1074/jbc.M608864200.
- Zawada, A. M.; Rogacev, K. S.; Rotter, B.; Winter, P.; Marell, R.-R.; Fliser, D.; Heine, G. H. (2011): SuperSAGE evidence for CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes as a third monocyte subset. In: *Blood* 118 (12), e50-e61. DOI: 10.1182/blood-2011-01-326827.
- Zhang, J. Q.; Nicoll, G.; Jones, C.; Crocker, P. R. (2000): Siglec-9, a novel sialic acid binding member of the immunoglobulin superfamily expressed broadly on human blood leukocytes. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (29), S. 22121–22126. DOI: 10.1074/jbc.M002788200.
- Zhao, Changqing; Zhang, Huoming; Wong, Wing-Cheong; Sem, Xiaohui; Han, Hao; Ong, Siew-Min et al. (2009): Identification of novel functional differences in monocyte subsets using proteomic and transcriptomic methods. In: *Journal of proteome research* 8 (8), S. 4028–4038. DOI: 10.1021/pr900364p.
- Zhong, Z. X.; Li, B.; Li, C. R.; Zhang, Q. F.; Liu, Z. D.; Zhang, P. F. et al. (2015): Role of chemokines in promoting instability of coronary atherosclerotic plaques and the underlying molecular mechanism. In: *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]* 48 (2), S. 161–166. DOI: 10.1590/1414-431X20144195.
- Ziegler-Heitbrock, L. (2007): The CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> blood monocytes: their role in infection and inflammation. In: *Journal of Leukocyte Biology* 81 (3), S. 584–592. DOI: 10.1189/jlb.0806510.
- Ziegler-Heitbrock, Loems (2015): Blood Monocytes and Their Subsets: Established Features and Open Questions. In: *Frontiers in immunology* 6, S. 423. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00423.
- Ziegler-Heitbrock, Loems; Ancuta, Petronela; Crowe, Suzanne; Dalod, Marc; Grau, Veronika; Hart, Derek N. et al. (2010): Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. In: *Blood* 116 (16), e74-80. DOI: 10.1182/blood-2010-02-258558.
- Ziegler-Heitbrock, Loems; Hofer, Thomas P. J. (2013): Toward a refined definition of monocyte subsets. In: *Frontiers in immunology* 4, S. 23. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00023.
- Zilber, M. T.; Gregory, S.; Mallone, R.; Deaglio, S.; Malavasi, F.; Charron, D.; Gelin, C. (2000): CD38 expressed on human monocytes: a coaccessory molecule in the superantigen-induced proliferation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (6), S. 2840–2845. DOI: 10.1073/pnas.050583197.

Zuidema, Mozow Y. (2010): Ischemia/reperfusion injury: The role of immune cells. In: *WJC* 2 (10), S. 325. DOI: 10.4330/wjc.v2.i10.325.

## 12 Publikationsverzeichnis

Hoffmann J, Fišer K, Liebetrau C, Staubach N, Kost D, et al. (2020): High-Content Immunophenotyping and Hierarchical Clustering Reveal Sources of Heterogeneity and New Surface Markers of Human Blood Monocyte Subsets. In: *Thromb Haemost.* 120 (1), S. 141-155. DOI: 10.1055/s-0039-1700871

### **13 Ehrenwörtliche 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, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. 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

---

David Christian Kost

## 14 Danksagung

Als erstes danke ich der William G. Kerckhoff-Stiftung und dem Deutschen Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung e. V. für die Ermöglichung dieser Arbeit. Besonders Herr PD Dr. phil. nat. Christian Troidl danke ich für die intensive Betreuung dieser Arbeit über die gesamte Zeit hinweg. Seine Expertise sowohl im labortechnischen Bereich, als auch bei der Ausführung und Aufstellung der Arbeit war mir stets eine große Hilfe. Zudem gilt mein Dank Herr Dr. med. Jędrzej Hoffmann für seine Förderung, Motivation und Inspiration dieser Arbeit.

Ich danke dem Team des Kerckhoff Herzforschungsinstituts für die guten und produktiven Stunden im Labor in geselliger Atmosphäre. Insbesondere ohne die gute Arbeit und beharrliche Hilfe von Nora Staubach und Sigrun Sass wären die Ergebnisse dieser Arbeit nicht zustande gekommen.

Außerdem bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mich auf dem Weg dieser Arbeit in vielerlei Hinsicht unterstützt haben und stets für mich da waren. Ohne sie wäre ich nicht an diesen Punkt gelangt.

Ebenso danke ich meiner Familie und besonders meiner Frau, Jana Kost, die mich auf dem Weg begleitet, mir in ungewissen Zeiten beigestanden und mir Motivation gegeben hat. Gewidmet sei die Arbeit meinen Töchtern Marla und Nele!

Zudem danke ich meinem Freund und Mitdoktoranden, Joost Efken, für die guten Stunden und Gespräche im Labor, auf den Zugfahrten und weit darüber hinaus.

## **15 Anhang**



**Ethik-Kommission bei der  
Landesärztekammer Hessen**

Landesärztekammer Hessen, Im Vogelsgesang 3, 60488 Frankfurt

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

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

*Vorab per Telefax: 06032/9962827*

Ihr Zeichen	(bitte immer angeben) Unser Zeichen	Datum
	III/1/woe/ewa	20.06.2011
	<b>FF 17/2011</b>	

**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. Nef,

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 berufsethischen 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.

Postgirokonto: Frankfurt/Main 80666-602, BLZ 500 100 60 Bankkonto: Deutsche Apotheker- und Ärztekammer Frankfurt/Main 0001161695, BLZ 500 906 07

Die Ethik-Kommission bittet außerdem nach Abschluss des Forschungsvorhabens um einen Bericht mit der Mitteilung der bei der Studie gewonnenen Ergebnisse.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethik-Kommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichen Grüßen  
i. A.



Prof. Dr. med. S. Harder  
Vorsitzender der Ethik-Kommission

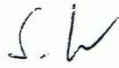
Anlage zum Votum der Studie

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

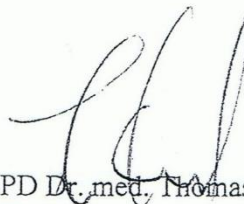
BioACs: Prospektive Evaluierung neuer biochemischer Marker bei akuten Koronarsyndromen in der frühen Phase der Diagnostik und bei sequentieller Testung

**FF 17/2011**

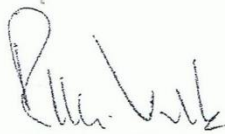
Mitglieder der Ethik-Kommission bei der Landesärztekammer Hessen, die in der Sitzung am **22. März 2011** ein Votum zu der oben bezeichneten Studie abgegeben haben.



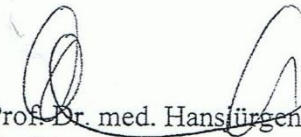
Prof. Dr. med. Sebastian Harder  
Klinischer Pharmakologe



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

Patientengruppe	Experiment	Patientennummer	Nikotinkonsum (Jahre)	Adipositas	Diabetestherapie	Familienanamnese	Betablocker	Statin	ACE-Hemmer AT <sub>1</sub> -Antagonist	Acetylsalicylsäure (ASS)	Clopidogrel	Marcumar	Prasugrel	Ticagrelor	Digitalis	Aldosteron-Antagonist	Schleifendiuretikum	Thiaziddiuretikum	Procoralan	Renininhistor	Alpha <sub>1</sub> -Blocker	Alpha <sub>2</sub> -Agonist	Kalziumkanalblocker	Kalziumkanalöffner	Vasodilatoren	Glukokortikoide	
<b>NSTEMI</b>	<b>Lyoplate™</b>	1	45	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	
		2	0	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		3	57	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		4	0	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		5	Keine Information																								
	6	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>Validierung (FACS)</b>	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		3	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		4	45	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
		5	0	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6		0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7		0	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8		0	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9		0	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	
10		0	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	
11	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<b>Ohne KHK</b>	<b>Validierung (FACS)</b>	1	0	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
		2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		3	0	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4	25	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
5	0	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
6	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
7	Keine Information																										
8	Keine Information																										
9	0	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tabelle 7: Risikofaktoren und medikamentöse Therapie der NSTEMI-Patienten und Patienten ohne KHK

Antigen	Klassische (MFI minus Isotyp MFI)						Intermediäre (MFI minus Isotyp MFI)						Nicht-Klassische (MFI minus Isotyp MFI)					
	Mittelwert	SD	SEM	Median	Obere Grenze	Untere Grenze	Mittelwert	SD	SEM	Median	Obere Grenze	Untere Grenze	Mittelwert	SD	SEM	Median	Obere Grenze	Untere Grenze
CD1a	2.6	2.4	0.7	1	7	1	4.2	4.4	1.3	2	14	1	6.9	9.8	2.9	1	32	1
CD1b	3.8	3.4	1.0	3	11	1	8.6	12.6	3.8	6	44	1	8.1	11.2	3.4	3	38	1
CD1d	896.2	335.3	101.1	746	1518	414	857.7	392.8	118.4	783	1714	291	264.1	124.8	37.6	252	533	94
CD2	587.3	223.9	67.5	513	1163	389	586.2	270.8	81.7	545	1307	313	378.2	191.1	57.6	342	902	211
CD3	177.1	137.5	41.5	120	445	1	286.1	172.2	51.9	208	668	90	284.1	154.3	46.5	236	687	141
CD4	1030.5	233.8	70.5	982	1503	764	1489.3	398.0	120.0	1405	2160	961	1393.5	347.0	104.6	1304	2120	1021
CD4v4	670.0	246.0	74.2	540	1123	387	1022.7	361.8	109.1	906	1608	504	985.5	352.5	106.3	843	1716	534
CD5	84.8	95.0	28.7	38	268	1	156.0	110.8	33.4	123	348	21	128.9	72.8	22.0	118	278	36
CD6	188.0	115.9	34.9	143	487	73	195.4	159.0	47.9	152	622	50	144.7	133.8	40.3	110	523	42
CD7	129.5	90.4	27.3	87	359	39	204.5	169.6	51.1	143	634	45	198.0	186.1	56.1	129	700	50
CD8a	314.8	285.4	86.0	246	1126	98	401.2	406.2	122.5	319	1576	88	311.1	386.1	116.4	198	1455	72
CD8b	30.7	79.4	23.9	1	263	1	49.7	107.7	32.5	9	367	1	61.1	90.2	27.2	32	327	3
CD9	1358.8	876.5	264.3	1114	3383	443	1855.5	1144.1	345.0	1348	3879	686	702.7	397.1	119.7	490	1632	272
CD10	1.0	0.0	0.0	1	1	1	1.0	0.0	0.0	1	1	1	2.4	4.5	1.4	1	16	1
CD11a	17860.3	1791.2	540.1	17674	20641	14875	29936.2	3900.8	1176.1	29202	36239	23565	32159.9	3106.8	936.7	31737	37674	28533
CD11b	4829.2	1597.5	481.7	5439	7240	2366	2230.5	901.7	271.9	1725	3993	1237	200.0	242.5	73.1	114	878	53
CD11c	7633.6	2145.4	646.9	6917	11270	4956	16921.8	4345.2	1310.1	15775	23392	11487	15651.2	3313.0	998.9	15551	21849	12185
CD13	6400.5	4200.1	1266.4	6789	13201	1121	6868.9	4434.3	1337.0	7348	12511	571	4491.8	2955.5	891.1	5406	7973	248
CD14	15198.8	3831.2	1155.1	14756	22352	8482	9501.7	2499.4	753.6	9931	12540	6038	774.0	256.2	77.2	752	1211	355
CD15	150.6	138.4	41.7	119	536	36	82.8	59.8	18.0	113	172	1	69.8	51.0	15.4	94	125	5
CD15s	270.7	113.7	34.3	254	482	96	75.5	34.3	10.3	71	150	19	15.3	8.5	2.6	16	33	4
CD16	66.5	42.7	12.9	69	139	19	7487.2	2760.7	832.4	8114	12188	3256	19595.1	7055.5	2127.3	20796	32652	8578
CD18	26259.7	10232.4	3085.2	22660	46334	17552	36577.9	11620.9	3503.8	33581	58866	25011	28110.0	8350.6	2517.8	24417	43162	19595
CD19	8.1	4.8	1.4	8	16	1	13.8	11.7	3.5	12	45	2	15.5	12.9	3.9	11	51	8
CD20	28.1	26.8	8.1	18	89	4	48.6	69.7	21.0	23	245	1	49.1	75.0	22.6	25	268	3
CD21	9.5	11.9	3.6	3	36	1	14.1	18.0	5.4	5	52	1	15.5	20.2	6.1	4	53	1
CD22	10.7	7.5	2.3	9	25	3	24.1	16.6	5.0	18	55	1	29.5	21.1	6.4	23	70	1
CD23	7.6	5.6	1.7	6	17	1	42.9	39.1	11.8	32	115	1	15.8	14.9	4.5	10	45	1
CD24	9.2	27.1	8.2	1	91	1	9.6	28.6	8.6	1	96	1	7.8	17.7	5.3	1	59	1
CD25	33.6	35.8	10.8	14	102	2	66.6	67.0	20.2	39	190	7	60.8	65.4	19.7	28	177	5
CD26	51.0	40.5	12.2	29	130	17	71.3	67.3	20.3	34	205	11	70.9	77.9	23.5	28	234	10
CD27	59.2	50.5	15.2	45	192	14	76.5	76.8	23.2	54	288	13	65.8	72.9	22.0	41	278	17
CD28	40.2	25.7	7.8	30	107	17	53.4	41.3	12.5	35	163	19	48.5	45.3	13.7	31	173	17
CD29	15.0	36.2	10.9	1	122	1	68.2	49.0	14.8	89	121	1	143.0	38.5	11.6	155	181	45
CD30	23.4	19.4	5.8	30	52	1	44.4	35.6	10.7	58	91	1	46.6	38.9	11.7	73	93	1
CD31	7423.4	1624.3	489.7	7390	9679	5149	9727.8	3228.6	973.5	9091	15756	5439	16275.4	2966.0	894.3	15962	21069	12297
CD32	3596.2	627.1	189.1	3610	4828	2590	5118.8	626.6	188.9	5338	5765	3460	4043.9	587.8	177.2	4129	4814	2662

Antigen	Klassische (MFI minus Isotyp MFI)						Intermediäre (MFI minus Isotyp MFI)						Nicht-Klassische (MFI minus Isotyp MFI)					
	Mittelwert	SD	SEM	Median	Obere Grenze	Untere Grenze	Mittelwert	SD	SEM	Median	Obere Grenze	Untere Grenze	Mittelwert	SD	SEM	Median	Obere Grenze	Untere Grenze
CD33	1933.1	1619.9	488.4	1777	5160	284	1466.6	1195.9	360.6	1227	3782	321	907.7	750.7	226.3	679	2184	179
CD34	37.1	25.2	7.6	27	94	12	51.4	31.6	9.5	37	105	20	33.4	23.9	7.2	27	86	9
CD35	7233.8	2558.9	771.5	7330	11700	3868	2877.9	1342.1	404.7	2423	6138	1674	1151.5	417.6	125.9	1188	2053	657
CD36	8328.5	1528.9	461.0	8251	10936	5263	5527.5	1571.5	473.8	5383	8013	2956	693.5	352.0	106.1	617	1497	269
CD37	306.0	194.3	58.6	264	730	81	860.0	396.1	119.4	700	1575	429	862.8	384.0	115.8	842	1546	421
CD38	3316.5	654.4	197.3	3151	4438	2490	1734.4	515.0	155.3	1924	2440	1013	446.1	171.7	51.8	378	771	231
CD39	1327.6	325.0	102.8	1259	2040	915	2506.8	712.5	225.3	2664.5	3863	1102	740.3	398.4	126.0	677	1761	321
CD40	191.8	119.8	36.1	202	419	26	1187.9	497.6	150.0	1222	2002	358	886.9	405.5	122.3	892	1663	232
CD41a	1811.8	1491.1	449.6	1569	5813	379	1800.6	1126.5	339.6	1572	3814	650	623.1	461.1	139.0	457	1828	223
CD41b	234.5	145.6	43.9	205	561	57	300.5	163.9	49.4	254	536	109	126.8	79.4	23.9	89	304	45
CD42a	474.8	458.7	138.3	401	1665	66	600.1	394.5	119.0	444	1534	191	309.7	297.3	89.6	220	1175	86
CD42b	151.0	165.7	49.9	80	603	27	162.8	117.4	35.4	139	439	53	59.5	28.0	8.4	55	99	22
CD43	19453.9	6076.4	1832.1	18261	30292	12138	26418.1	8596.3	2591.9	20963	41081	17163	35079.1	10173.3	3067.4	28659	49358	24551
CD44	45633.6	9190.2	2770.9	42748	67467	36381	52049.0	8009.1	2414.8	52496	68552	39620	49265.6	7146.2	2154.7	50290	61964	37530
CD45	22008.8	10536.2	3176.8	15216	37418	12241	36207.5	15586.3	4699.5	27159	60214	20809	31732.4	12234.5	3688.9	24919	48567	19324
CD45RA	1280.1	432.3	130.4	1274	2102	706	3590.2	946.2	285.3	3429	5348	2408	15062.5	3986.0	1201.8	13934	22901	10772
CD45RB	11759.6	4425.9	1334.5	10946	21317	6929	27302.5	9565.1	2884.0	24057	47982	17318	28530.3	10725.4	3233.8	25032	50436	16765
CD45R0	6783.3	2318.4	699.0	7587	10903	4034	7145.8	2615.3	788.5	6173	12186	4177	1203.3	363.5	109.6	1192	1801	630
CD46	4072.2	473.6	142.8	4015	5162	3568	5291.3	645.2	194.5	5150	6452	4178	4531.6	470.9	142.0	4514	5180	3808
CD47	3501.4	1559.6	470.2	3339	6189	1419	5260.0	1927.8	581.3	5101	8588	2923	6396.3	2388.7	720.2	6451	10845	3558
CD48	1088.9	364.7	110.0	1168	1630	374	2198.0	546.9	164.9	2334	2867	1042	1877.2	466.2	140.6	2036	2393	903
CD49a	59.7	20.7	6.2	56	93	34	43.0	29.3	8.8	40	110	7	23.3	30.2	9.1	7	98	1
CD49b	112.5	48.7	14.7	128	201	49	95.6	44.7	13.5	102	160	25	32.2	14.1	4.2	27	60	10
CD49c	5.5	4.0	1.2	6	14	1	9.7	8.6	2.6	9	30	1	9.1	10.1	3.0	5	37	1
CD49d	2114.9	779.7	235.1	2060	2976	951	6980.3	1414.5	426.5	7228	8836	5125	6072.3	1268.9	382.6	6398	7748	4022
CD49e	4130.2	838.8	252.9	4331	5490	2508	2001.7	527.2	159.0	2015	2745	1026	1123.2	272.8	82.2	1116	1462	577
CD50	25936.4	3895.1	1174.4	26392	32381	19994	21763.5	3509.3	1058.1	20343	29631	18650	18300.4	3437.8	1036.5	17332	26909	14584
CD51/61	11.5	11.4	3.5	9	40	1	15.5	17.9	5.4	12	61	1	8.3	11.4	3.4	3	38	1
CD53	13710.0	5674.5	1710.9	11689	23223	5493	19147.7	6168.2	1859.8	16452	28972	13230	16577.9	5525.1	1665.9	14024	25389	11553
CD54	2360.2	340.1	102.5	2324	3210	2029	6871.8	1003.2	302.5	7095	8376	5064	4971.0	679.3	204.8	4918	6156	3934
CD55	10039.2	1551.0	467.7	9633	12871	7754	8657.3	1866.8	562.9	8585	11572	6533	6542.6	1891.4	570.3	5748	10576	4379
CD56	14.6	13.0	3.9	10	49	3	24.5	25.5	7.7	11	84	2	23.6	24.9	7.5	7	76	3
CD57	15.2	12.9	3.9	14	47	1	26.7	15.3	4.6	22	51	7	21.2	11.8	3.6	19	39	7
CD58	4516.0	300.8	90.7	4623	4845	3847	4406.6	404.2	121.9	4448	4981	3647	3601.2	321.4	96.9	3567	4152	3080
CD59	1198.8	391.8	118.1	1350	1657	631	1047.4	369.3	111.4	1212	1494	395	331.0	115.6	34.8	351	480	125
CD61	1808.4	1437.1	433.3	1632	5626	391	1706.6	998.2	301.0	1611	3492	654	663.5	475.7	143.4	480	1866	238
CD62E	9.5	13.4	4.0	1	38	1	18.0	24.1	7.3	2	59	1	14.0	18.9	5.7	1	49	1

Antigen	Klassische (MFI minus Isotyp MFI)						Intermediäre (MFI minus Isotyp MFI)						Nicht-Klassische (MFI minus Isotyp MFI)					
	Mittelwert	SD	SEM	Median	Obere Grenze	Untere Grenze	Mittelwert	SD	SEM	Median	Obere Grenze	Untere Grenze	Mittelwert	SD	SEM	Median	Obere Grenze	Untere Grenze
CD62L	107.5	53.8	16.2	111	223	28	93.9	66.8	20.1	75	263	25	76.2	71.2	21.5	49	265	17
CD62P	241.7	160.5	48.4	248	540	40	283.1	179.6	54.1	253	572	60	112.5	90.3	27.2	63	250	20
CD63	5900.4	1955.6	589.6	5940	9075	3786	5508.1	1866.3	562.7	4845	9241	3271	2032.5	616.4	185.9	1919	3054	1092
CD64	3018.2	1135.6	342.4	2596	5554	1624	1982.9	809.0	243.9	1991	3650	890	485.1	267.0	80.5	436	1006	223
CD66a,c,d,e	24.8	47.3	14.3	2	151	1	531.4	248.5	74.9	450	847	203	1085.4	894.2	269.6	479	2604	307
CD66b	7.3	4.6	1.4	6	15	1	10.2	9.9	3.0	7	30	1	7.7	7.3	2.2	6	26	1
CD66f	2.2	1.9	0.6	1	7	1	4.5	5.7	1.7	2	20	1	4.5	6.4	1.9	3	23	1
CD69	27.6	19.4	5.8	22	76	9	32.8	23.5	7.1	34	88	9	14.9	12.8	3.9	8	42	3
CD70	1.6	1.2	0.4	1	4	1	6.8	7.5	2.3	3	24	1	4.7	4.7	1.4	2	13	1
CD71	74.1	64.1	19.3	55	208	1	433.0	130.8	39.4	435	691	237	518.8	104.4	31.5	516	700	336
CD72	7.4	5.7	1.7	6	18	1	45.3	21.5	6.5	49	75	12	19.6	10.5	3.2	19	41	6
CD73	13.9	16.3	4.9	8	58	1	28.4	27.7	8.4	20	104	1	21.5	25.1	7.6	13	91	1
CD74	1145.5	360.2	108.6	1067	1966	742	2721.2	1126.4	339.6	2266	5432	1268	1922.2	518.0	156.2	1840	3090	1060
CD75	3.5	3.4	1.0	1	11	1	16.6	14.2	4.3	9	44	2	39.7	33.2	10.0	36	122	3
CD77	2.3	1.6	0.5	2	6	1	5.5	5.6	1.7	2	17	1	4.0	3.7	1.1	3	12	1
CD79b	3.5	3.4	1.0	2	11	1	9.5	8.8	2.7	7	25	1	9.4	10.1	3.0	6	29	1
CD80	76.4	21.9	6.6	72	127	50	126.6	34.5	10.4	113	190	89	126.0	40.7	12.3	118	221	84
CD81	987.0	449.4	135.5	979	2080	503	2320.6	1076.9	324.7	2230	4789	862	2654.6	1118.8	337.3	2592	5084	951
CD83	1.3	0.5	0.1	1	2	1	12.8	10.0	3.0	13	29	1	19.7	17.2	5.2	11	53	1
CD84	1180.4	360.6	108.7	1068	1731	635	1136.2	363.9	109.7	1170	1694	583	605.2	213.0	64.2	553	1027	284
CD85	1937.6	809.4	244.1	1852	3743	825	6193.5	1962.7	591.8	6291	10019	2724	5443.6	1799.7	542.6	5186	8789	2919
CD86	2049.3	667.4	201.2	1749	3236	1316	3034.0	852.7	257.1	2734	4357	2111	2876.8	563.0	169.7	2818	4040	2249
CD87	3580.5	1058.7	319.2	3204	5172	2074	2879.7	914.6	275.8	2764	4189	1771	2209.4	626.0	188.7	2062	2966	1478
CD88	90.5	60.5	18.2	86	217	26	293.9	161.1	48.6	236	624	92	404.2	153.4	46.3	370	618	154
CD89	3331.5	665.2	200.6	3175	4763	2529	1477.0	555.7	167.5	1347	2763	773	599.0	506.6	152.7	546	1505	134
CD90	5.2	2.7	0.8	5	11	1	4.9	3.8	1.1	5	12	1	6.4	6.7	2.0	3	20	1
CD91	2899.6	888.6	267.9	2694	4743	1714	4514.3	1547.9	466.7	4430	8474	2257	2290.7	702.1	211.7	2246	3794	1182
CDw93	7315.5	1306.9	394.0	6894	9560	5763	4548.8	969.8	292.4	4742	6099	2817	1401.6	273.5	82.5	1307	1883	914
CD94	21.7	6.5	1.9	21	34	12	30.5	10.4	3.1	32	49	12	23.7	9.6	2.9	22	42	9
CD96	1732.2	363.8	109.7	1936	2171	1088	1159.4	283.8	85.6	1281	1422	658	1139.0	289.9	87.4	1299	1437	603
CD97	8783.1	4190.5	1263.5	5625	14094	4496	14353.8	7063.3	2129.7	9275	26403	7872	13722.3	5995.7	1807.8	9569	23807	7495
CD98	3692.5	1021.2	307.9	3612	5256	2269	4507.5	1288.1	388.4	4129	6652	2551	3719.0	871.0	262.6	3604	5112	2545
CD99	2524.8	766.9	231.2	2420	3879	1401	1028.0	442.0	133.3	1000	1908	371	115.6	37.8	11.4	112	173	53
CD99R	100.6	30.3	9.1	92	168	72	125.8	27.0	8.1	128	173	89	85.8	15.7	4.7	84	107	62
CD100	262.9	124.4	37.5	256	428	33	625.6	246.0	74.2	659	988	141	698.5	242.3	73.0	639	1130	252
CD102	3091.8	528.5	159.4	3139	3775	1919	7638.5	771.0	232.5	7789	8775	6111	6812.1	673.5	203.1	6875	7827	5824
CD103	17.7	7.3	2.2	16	35	9	24.5	12.0	3.6	25	45	8	16.9	9.9	3.0	13	33	5

Antigen	Klassische (MFI minus Isotyp MFI)						Intermediäre (MFI minus Isotyp MFI)						Nicht-Klassische (MFI minus Isotyp MFI)					
	Mittelwert	SD	SEM	Median	Obere Grenze	Untere Grenze	Mittelwert	SD	SEM	Median	Obere Grenze	Untere Grenze	Mittelwert	SD	SEM	Median	Obere Grenze	Untere Grenze
CD105	609.7	270.1	81.4	481	1072	284	1038.8	363.5	109.6	877	1566	489	568.3	197.7	59.6	516	987	303
CD106	7.9	3.9	1.2	6	15	4	13.3	7.2	2.2	13	25	2	11.0	7.2	2.2	10	25	1
CD107a	1154.5	333.3	100.5	1057	1780	658	1001.5	235.5	71.0	1100	1295	628	473.5	142.1	42.8	398	712	343
CD107b	790.5	275.4	83.0	711	1310	353	707.2	209.4	63.1	722	1001	396	248.2	83.4	25.2	217	388	148
CD108	67.0	57.6	17.4	29	160	1	44.5	37.0	11.2	30	104	1	21.5	14.1	4.3	18	52	3
CD109	1055.6	365.4	110.2	950	1751	531	1125.5	366.8	110.6	1056	1802	577	981.1	376.8	113.6	814	1734	556
CD112	11.9	5.9	1.8	10	22	4	19.6	14.4	4.3	13	48	4	15.1	12.6	3.8	12	39	1
CD114	189.1	75.9	22.9	184	288	54	83.0	34.3	10.3	84	123	13	30.6	16.4	4.9	30	58	5
CD116	299.9	281.3	84.8	229	819	4	397.5	376.7	113.6	281	1188	7	316.0	287.2	86.6	249	882	5
CD117	5.2	3.3	1.0	4	11	1	10.5	8.9	2.7	7	25	1	15.5	13.9	4.2	9	49	4
CD118	4.1	2.6	0.8	3	9	1	7.7	7.3	2.2	5	21	1	4.9	4.6	1.4	3	13	1
CD119	1251.2	351.6	106.0	1244	1786	653	1660.9	396.2	119.4	1668	2130	951	1421.5	280.9	84.7	1424	1928	963
CD120a	26.5	8.2	2.5	24	43	18	37.3	15.4	4.7	30	63	23	36.5	21.0	6.3	29	70	13
CD121a	7.0	2.7	0.8	7	13	4	11.1	7.0	2.1	10	26	1	9.1	6.9	2.1	7	21	1
CD121b	19.0	11.8	3.6	16	42	5	41.9	31.8	9.6	34	103	6	27.9	20.8	6.3	23	72	4
CD122	11.6	4.0	1.2	10	19	7	19.9	7.6	2.3	19	31	8	13.3	6.0	1.8	12	26	7
CD123	290.7	173.6	52.3	225	570	115	1244.5	842.4	254.0	931	2943	348	2185.9	1781.9	537.3	1427	5541	432
CD124	48.4	25.4	7.7	38	90	18	74.9	35.4	10.7	66	128	23	39.5	22.1	6.7	36	92	13
CD126	121.2	48.5	14.6	112	212	44	191.9	96.8	29.2	180	365	45	141.4	87.8	26.5	129	318	32
CD127	12.0	7.0	2.1	9	28	2	15.0	13.7	4.1	12	50	1	16.7	18.5	5.6	10	68	2
CD128b (CD182)	229.6	102.1	30.8	187	413	106	64.5	47.8	14.4	46	184	16	18.5	15.3	4.6	16	59	6
CD130	377.5	106.1	32.0	344	533	193	270.2	104.4	31.5	242	439	90	108.2	46.3	14.0	105	196	35
CD134	9.4	4.7	1.4	9	18	1	20.7	14.0	4.2	22	44	4	15.6	9.8	3.0	13	33	2
CD135	52.4	19.9	6.0	53	85	20	32.4	16.4	5.0	34	68	9	12.6	13.7	4.1	8	49	1
CD137	11.2	4.6	1.4	11	21	3	9.4	8.0	2.4	6	26	1	5.5	5.9	1.8	3	18	1
CD137 Ligand	7.2	2.9	0.9	7	12	4	15.2	9.2	2.8	17	35	1	10.0	7.7	2.3	9	22	1
CD138	4.7	2.5	0.7	5	10	1	8.5	8.7	2.6	6	29	1	6.5	6.4	1.9	6	18	1
CD140a	21.8	35.2	10.6	1	109	1	15.1	20.0	6.0	2	54	1	4.8	4.9	1.5	2	16	1
CD140b	17.3	33.5	10.1	1	107	1	24.0	26.3	7.9	17	71	1	40.2	23.8	7.2	36	88	12
CD141	456.6	229.6	69.2	378	879	235	1441.0	646.7	195.0	1181	2633	753	1167.0	496.8	149.8	1077	2039	428
CD142	36.2	9.9	3.0	35	54	22	47.8	14.8	4.4	47	72	21	26.8	9.3	2.8	28	46	13
CD144	6.6	4.4	1.3	7	16	1	7.3	6.5	1.9	7	20	1	5.1	4.6	1.4	2	13	1
CD146	4.5	2.1	0.6	5	8	1	8.9	7.1	2.2	8	21	1	6.0	6.5	2.0	5	22	1
CD147	9907.4	3078.3	928.2	9500	13705	5831	9376.2	2780.7	838.4	8721	12855	5306	8498.5	2134.1	643.4	8268	11165	5505
CD150	6.3	3.7	1.1	6	14	1	12.6	8.6	2.6	13	31	1	14.8	8.4	2.5	13	32	4
CD151	480.0	188.7	56.9	511	716	243	697.8	314.8	94.9	853	1066	256	648.4	308.3	93.0	761	1082	184
CD152	14.3	29.2	8.8	1	96	1	11.4	19.4	5.9	1	61	1	5.5	7.1	2.1	1	22	1



Antigen	Klassische (MFI minus Isotyp MFI)						Intermediäre (MFI minus Isotyp MFI)						Nicht-Klassische (MFI minus Isotyp MFI)					
	Mittelwert	SD	SEM	Median	Obere Grenze	Untere Grenze	Mittelwert	SD	SEM	Median	Obere Grenze	Untere Grenze	Mittelwert	SD	SEM	Median	Obere Grenze	Untere Grenze
CD153	45.2	25.7	7.8	43	89	9	49.3	28.6	8.6	47	93	3	11.8	7.1	2.1	10	25	1
CD154	8.6	4.4	1.3	8	18	4	18.4	11.5	3.5	17	41	4	16.5	12.3	3.7	10	37	4
CD158a	4.8	3.2	1.0	4	11	1	12.0	6.7	2.0	11	23	2	9.2	4.4	1.3	10	15	2
CD158b	5.9	4.2	1.3	7	14	1	7.4	6.7	2.0	6	20	1	4.9	4.8	1.4	3	14	1
CD161	11.3	4.3	1.3	11	18	4	23.6	9.2	2.8	23	43	9	18.0	9.5	2.9	20	34	1
CD162	9337.6	2603.4	785.0	9290	13453	5398	14255.2	5059.6	1525.5	11770	22827	9178	18210.7	5449.3	1643.0	14665	25935	13017
CD163	1432.6	965.0	291.0	1386	3614	45	2801.6	1630.1	491.5	2635	6467	405	417.0	356.0	107.3	348	1340	87
CD164	2703.5	459.3	138.5	2803	3553	1894	2965.5	658.2	198.5	2803	4068	2161	2114.5	509.8	153.7	2061	3207	1478
CD165	75.5	42.1	12.7	80	170	27	93.5	50.8	15.3	89	193	32	46.7	24.4	7.4	36	98	18
CD166	433.0	84.4	25.5	416	603	319	287.1	106.4	32.1	233	525	205	156.9	48.5	14.6	137	260	115
CD171	19.0	27.3	8.2	1	89	1	12.8	18.3	5.5	1	53	1	2.9	3.4	1.0	1	11	1
CD172b	2205.0	1114.2	336.0	2206	4198	31	1804.2	873.5	263.4	1782	3403	66	1567.6	746.2	225.0	1552	2750	62
CD177	8.0	4.3	1.3	8	14	2	16.5	8.3	2.5	17	32	5	11.2	6.7	2.0	10	27	4
CD178	5.9	2.6	0.8	5	12	3	13.9	6.3	1.9	13	26	7	11.3	6.5	2.0	10	21	1
CD180	1071.9	580.1	174.9	900	2165	326	2202.7	1021.8	308.1	2131	4090	589	1465.1	626.8	189.0	1439	2438	588
CD181	161.1	57.3	17.3	153	247	71	31.2	22.6	6.8	35	66	3	6.9	6.6	2.0	5	19	1
CD183	8.7	6.1	1.8	9	22	1	19.4	11.7	3.5	20	49	8	14.4	12.8	3.9	11	49	1
CD184	120.3	72.9	22.0	107	266	36	94.2	55.8	16.8	87	181	26	32.3	14.4	4.3	33	52	10
CD193	2.5	1.7	0.5	2	6	1	2.8	2.5	0.7	1	8	1	3.8	3.6	1.1	1	10	1
CD195	45.4	39.6	11.9	42	147	1	341.8	203.4	61.3	318	804	70	56.9	47.5	14.3	53	187	6
CD196	6.5	5.1	1.5	6	18	1	13.5	12.4	3.7	11	40	1	16.0	16.2	4.9	10	59	1
CD197	6.2	4.8	1.5	6	13	1	10.4	7.6	2.3	8	22	1	8.4	6.3	1.9	6	18	1
CD200	28.2	12.3	3.7	25	49	14	24.5	14.5	4.4	22	55	5	11.6	8.0	2.4	10	28	1
CD205	3947.0	1164.7	351.2	3931	6165	1814	3140.8	913.1	275.3	3192	4545	1415	1753.2	497.1	149.9	1677	2613	913
CD206	15.4	4.7	1.4	15	25	9	27.1	13.0	3.9	23	58	11	18.0	11.7	3.5	15	42	6
CD209	32.2	10.1	3.0	29	54	21	46.0	23.0	6.9	49	83	10	15.8	8.3	2.5	15	30	1
CD220	459.5	151.3	45.6	403	685	240	478.0	157.0	47.3	431	754	272	506.9	149.1	45.0	459	731	324
CD221	107.1	38.5	11.6	94	163	45	123.3	43.1	13.0	132	195	43	122.9	39.8	12.0	129	184	45
CD226	314.5	135.8	40.9	350	583	133	349.5	139.6	42.1	326	624	179	215.9	82.9	25.0	198	398	107
CD227	128.6	76.2	23.0	128	266	22	295.6	222.9	67.2	207	732	36	165.5	118.0	35.6	154	370	25
CD229	16.3	8.3	2.5	16	31	3	28.0	19.8	6.0	24	63	5	22.3	16.6	5.0	13	59	7
CD231	1.9	1.3	0.4	1	4	1	4.5	4.3	1.3	3	13	1	3.3	3.4	1.0	2	12	1
CD235a	3.1	2.6	0.8	3	9	1	2.1	2.7	0.8	1	10	1	4.3	4.7	1.4	1	15	1
CD243	2.5	1.6	0.5	2	5	1	2.2	2.3	0.7	1	8	1	1.7	1.6	0.5	1	5	1
CD244	509.3	130.5	39.4	488	720	339	1345.7	388.8	117.2	1319	1991	697	1697.8	324.2	97.8	1752	2259	1091
CD255	2.2	1.9	0.6	1	6	1	3.0	3.7	1.1	1	13	1	2.1	1.9	0.6	1	6	1
CD268	34.5	9.6	2.9	37	50	18	63.5	19.9	6.0	68	93	31	62.9	19.7	6.0	64	92	33

Antigen	Klassische (MFI minus Isotyp MFI)						Intermediäre (MFI minus Isotyp MFI)						Nicht-Klassische (MFI minus Isotyp MFI)					
	Mittelwert	SD	SEM	Median	Obere Grenze	Untere Grenze	Mittelwert	SD	SEM	Median	Obere Grenze	Untere Grenze	Mittelwert	SD	SEM	Median	Obere Grenze	Untere Grenze
CD271	5.8	3.3	1.0	5	13	2	42.9	31.9	9.6	32	90	11	40.5	30.4	9.2	32	111	8
CD273	10.4	6.1	1.8	9	24	3	46.3	24.1	7.3	45	96	17	31.9	14.4	4.3	32	61	14
CD274	17.8	6.2	1.9	19	27	9	71.8	35.8	10.8	69	150	25	49.8	24.1	7.3	49	105	20
CD275	7.8	4.7	1.4	8	16	1	116.1	45.9	13.8	128	193	40	44.1	29.8	9.0	40	110	1
CD278	2.6	2.0	0.6	2	7	1	8.3	5.7	1.7	8	17	1	8.6	10.5	3.2	5	35	1
CD279	4.4	3.8	1.2	3	11	1	4.2	5.2	1.6	2	17	1	7.0	11.0	3.3	2	38	1
CD282	4437.7	1517.1	457.4	3969	6721	2468	5318.6	1653.7	498.6	5293	8082	2900	3017.4	704.2	212.3	3442	3983	2179
CD305	3106.1	1120.3	337.8	2719	5005	1548	5984.9	1758.0	530.1	5872	8672	3244	3942.5	893.1	269.3	4099	5280	2140
CD309	9.0	5.0	1.5	10	14	1	14.5	9.8	3.0	18	34	1	9.2	7.7	2.3	10	25	1
CD314	13.5	6.3	1.9	15	25	5	25.4	19.9	6.0	17	65	5	17.7	16.3	4.9	15	60	1
CD321	2776.9	756.3	228.0	2838	3752	1857	2275.0	608.6	183.5	2198	3015	1263	1551.0	340.2	102.6	1535	2158	813
CDw327	9.0	7.0	2.1	5	22	2	7.0	6.4	1.9	4	17	1	6.7	7.4	2.2	3	20	1
CDw328	679.9	405.2	122.2	587	1350	285	1217.6	591.0	178.2	996	2354	597	600.1	262.8	79.2	550	1090	311
CDw329	5499.5	2062.5	621.9	4495	8471	3316	5309.5	1888.6	569.4	4699	7919	3185	3259.4	1012.0	305.1	3315	4680	1920
CD335	7.9	1.7	0.5	8	10	5	11.7	6.1	1.8	10	23	1	12.1	5.5	1.7	11	22	1
CD336	3.3	2.8	0.8	2	9	1	3.4	2.5	0.8	3	9	1	3.2	4.5	1.4	1	16	1
CD337	2.9	2.6	0.8	1	7	1	2.8	3.8	1.2	1	13	1	4.0	4.1	1.2	3	14	1
CD338	1.8	0.9	0.3	2	3	1	1.3	0.9	0.3	1	4	1	1.9	2.0	0.6	1	6	1
CD340	6.6	4.4	1.3	6	16	2	5.9	4.6	1.4	4	15	1	7.3	6.7	2.0	6	23	1
abTCR	25.1	9.7	2.9	25	44	11	25.2	10.0	3.0	24	40	13	19.8	6.5	1.9	23	26	10
β2-Microglobulin	6978.0	2414.3	727.9	7510	11414	2365	9806.2	3121.8	941.3	9640	15955	4078	7308.5	2341.1	705.9	7168	11596	3143
BLTR-1	1699.9	694.4	209.4	1791	2865	466	565.4	295.7	89.2	552	1017	129	60.9	28.0	8.4	50	119	18
CLIP	41.6	36.4	11.0	17	119	12	176.5	130.7	39.4	178	461	21	133.9	79.8	24.1	128	292	42
CMRF-44	7.2	6.0	1.8	5	21	2	37.7	37.3	11.2	21	117	4	13.2	10.8	3.3	10	34	2
CMRF-56	7.1	3.3	1.0	7	15	3	176.1	136.1	41.0	139	457	30	28.1	16.6	5.0	27	55	10
EGF-R	2.0	1.4	0.4	1	5	1	8.1	9.1	2.8	7	29	1	4.8	5.8	1.8	1	16	1
fMLP-R	1341.7	662.6	199.8	1320	2439	480	1665.3	786.9	237.2	1462	3007	707	360.1	249.0	75.1	265	760	79
gdTCR	4.7	2.9	0.9	4	12	2	6.5	3.8	1.1	6	12	1	4.2	3.5	1.0	3	11	1
HPC	3.9	4.1	1.2	2	12	1	25.7	22.7	6.8	15	74	5	75.6	55.2	16.7	49	173	14
HLA-A,B,C	26106.5	12637.0	3810.2	18620	47874	13147	33863.5	14121.7	4257.9	26444	55300	20690	26906.6	12468.7	3759.5	19319	48758	16180
HLA-A2	4785.6	5661.1	1706.9	2	13297	1	5052.6	5974.3	1801.3	14	14183	1	3595.0	4224.5	1273.7	21	9596	1
HLA-DQ	3083.2	790.7	238.4	3040	4467	2249	10743.4	4603.7	1388.1	8779	18866	6306	4701.5	2376.7	716.6	4106	10537	2335
HLA-DR	10123.7	2792.3	841.9	9254	14125	4068	54210.2	17272.9	5208.0	56833	89071	29133	28830.6	7698.2	2321.1	28457	44297	16088
HLA-DR,DP,DQ	5886.6	2076.4	626.1	5898	9519	2922	44492.8	10739.4	3238.1	41072	65465	30247	22916.8	8018.6	2417.7	20802	45457	16530
Invariant NKT	2.3	1.6	0.5	2	6	1	2.6	2.7	0.8	1	9	1	2.6	2.4	0.7	1	7	1
Disialoganglioside GD2	37.5	18.7	5.6	35	67	11	68.5	73.8	22.3	29	209	1	37.8	44.9	13.5	10	114	1

Antigen	Klassische (MFI minus Isotyp MFI)						Intermediäre (MFI minus Isotyp MFI)						Nicht-Klassische (MFI minus Isotyp MFI)					
	Mittelwert	SD	SEM	Median	Obere Grenze	Untere Grenze	Mittelwert	SD	SEM	Median	Obere Grenze	Untere Grenze	Mittelwert	SD	SEM	Median	Obere Grenze	Untere Grenze
MIC A/B	47.9	44.2	13.3	43	128	1	47.4	54.0	16.3	33	164	1	35.0	40.5	12.2	19	137	1
NKB1	5.0	3.2	1.0	4	13	2	11.9	4.5	1.4	13	18	5	8.4	4.9	1.5	7	16	1
SSEA-1	1587.3	1528.1	460.7	1666	4960	37	402.3	508.8	153.4	210	1675	19	44.2	42.9	12.9	22	127	7
SSEA-4	4.7	3.9	1.2	5	12	1	3.0	2.3	0.7	2	7	1	1.5	1.0	0.3	1	4	1
TRA-1-60	2.9	3.4	1.0	1	11	1	9.6	11.8	3.6	4	38	1	5.9	7.6	2.3	1	23	1
TRA-1-180	3.3	4.5	1.4	1	16	1	7.1	9.8	2.9	3	32	1	6.7	9.7	2.9	3	34	1
Vb23	5.9	4.1	1.2	6	13	1	10.5	8.4	2.5	8	23	1	10.1	7.8	2.4	8	24	1
Vb8	7.1	2.9	0.9	7	11	1	5.3	4.3	1.3	4	14	1	4.9	3.4	1.0	5	9	1
CD49f	239.0	141.5	42.7	219	495	41	189.7	77.3	23.3	194	286	74	81.7	37.4	11.3	85	161	31
CD104	2.3	4.2	1.3	1	15	1	6.5	9.2	2.8	1	27	1	31.4	40.5	12.2	12	118	1
CD120b	10.6	13.8	4.2	3	39	1	63.1	50.2	15.1	42	187	7	145.8	90.2	27.2	121	319	41
CD132	282.8	159.5	48.1	222	663	112	611.6	279.9	84.4	628	954	224	1034.4	439.6	132.5	1176	1517	358
CD201	9.1	4.0	1.2	10	15	1	14.9	7.8	2.3	16	24	1	20.5	12.3	3.7	17	41	4
CD210	101.8	36.3	11.0	104	155	30	245.4	70.4	21.2	253	369	101	206.1	55.5	16.7	210	282	98
CD212	3.6	4.1	1.2	3	15	1	6.2	5.2	1.6	5	15	1	6.5	4.5	1.4	6	16	1
CD267	3.1	2.1	0.6	3	7	1	5.3	4.2	1.3	4	12	1	8.3	7.5	2.3	7	26	1
CD294	4.6	3.8	1.2	4	12	1	50.4	28.8	8.7	49	102	11	373.9	227.7	68.7	335	687	111
CD236	99.6	98.2	29.6	36	246	20	108.9	118.2	35.6	32	305	13	86.3	92.5	27.9	22	222	11
CLA	4120.4	2451.8	739.2	4978	7026	795	2899.0	2283.1	688.4	3178	5854	113	557.2	470.7	141.9	787	1136	19
Integrin b7	50.1	25.8	7.8	48	85	7	105.6	65.0	19.6	86	229	29	21.1	15.3	4.6	17	57	5
SSEA-3	3.4	3.3	1.0	1	9	1	8.0	9.1	2.7	6	32	1	7.5	7.1	2.1	4	19	1

Tabelle 8: Differenzielle Expression aller Oberflächenmarker auf den Monozytensubtypen im Vergleich. MFI = Mediane Fluoreszenzintensität, SD = Standardabweichung, SEM = Standardfehler.

Rang	Antigen	logFC inter- mediate	logFC non-classical	logCPM	LR	P-value	FDR
1	CD66a_c_d_e	1.6989936	1.8862213	13.03957	17.9566236	0.0001261	0.0305200
2	CD294	1.3993198	2.0570037	12.83223	15.8155142	0.0003679	0.0445133
3	CD29	1.4606713	2.0921862	12.73951	14.2401875	0.0008087	0.0652344
4	CD16	1.0320674	1.2629606	13.40736	13.4629644	0.0011928	0.0721622
5	CD83	2.2413317	2.5980639	12.43826	12.3620935	0.0020683	0.1001039
6	CD181	-0.7565393	-1.6861956	12.75662	10.7062365	0.0047334	0.1777717
7	HPC	1.3494412	1.8745037	12.66056	10.5405651	0.0051422	0.1777717
8	CD104	1.1661927	2.3311401	12.34005	10.0489081	0.0065752	0.1988991
9	CD120b	1.2051205	1.5860346	12.79991	9.6627326	0.0079756	0.2144555
10	CD75	1.2529548	1.7332148	12.56788	8.0026812	0.0182911	0.4426446
11	CD8b	0.9235760	1.6425520	12.57536	7.7475136	0.0207802	0.4571634
12	CD140b	0.8193704	1.4969705	12.58732	6.7134051	0.0348500	0.7028080
13	CD275	1.1984690	0.8548642	12.78363	5.8367149	0.0540223	0.9391116
14	CMRF-56	1.1841468	0.6931101	12.78475	5.8254027	0.0543288	0.9391116
15	SSEA-1	-0.4303562	-0.9253153	13.07540	5.2226076	0.0734387	0.9990430
16	CD15s	-0.4389910	-1.0177774	12.92636	5.1814560	0.0749654	0.9990430
17	BLTR-1	-0.3110873	-0.8186160	13.18954	4.6327092	0.0986325	0.9990430
18	CD11b	-0.2101196	-0.7342961	13.34078	4.4834294	0.1062761	0.9990430
19	CD128b/CD182	-0.4799586	-0.9144468	12.90951	4.2706603	0.1182056	0.9990430
20	CD71	0.6542934	0.7841515	13.10840	4.1439368	0.1259376	0.9990430
21	CD271	0.9141301	0.9813612	12.70031	3.9358438	0.1397470	0.9990430
22	CD72	1.0128932	0.7550479	12.67198	3.6726385	0.1594031	0.9990430
23	CD99	-0.2537646	-0.6867990	13.27111	3.6138107	0.1641614	0.9990430
24	CD70	1.3318522	1.1866392	12.26296	3.1044225	0.2117792	0.9990430
25	CD195	0.7125998	0.2379778	12.94105	3.0186056	0.2210640	0.9990430
26	CD49a	-0.2533142	-0.8248882	12.77472	2.8199121	0.2441540	0.9990430
27	CD135	-0.2765683	-0.8399966	12.74670	2.7973397	0.2469252	0.9990430
28	CD10	0.0000000	0.9232806	12.03440	2.7019756	0.2589843	0.9990430
29	CD14	-0.1450473	-0.5116327	13.51074	2.6712947	0.2629879	0.9990430
30	SSEA-4	-0.4608499	-1.3133669	12.22487	2.5840434	0.2747148	0.9990430
31	CD171	-0.3153984	-1.1007059	12.33429	2.3331759	0.3114277	0.9990430
32	CD278	0.9814618	0.8897405	12.37760	2.2661041	0.3220488	0.9990430

<b>Rang</b>	<b>Antigen</b>	<b>logFC inter- mediate</b>	<b>logFC non-classical</b>	<b>logCPM</b>	<b>LR</b>	<b>P-value</b>	<b>FDR</b>
33	CLA	-0.2158593	-0.5028278	13.33720	2.1083566	0.3484786	0.9990430
34	CD114	-0.3206015	-0.6159773	12.94617	2.0467166	0.3593860	0.9990430
35	CD45RA	0.1183176	0.4299164	13.49395	2.0431143	0.3600339	0.9990430
36	CD36	-0.1430753	-0.4579306	13.46206	2.0311473	0.3621946	0.9990430
37	CD137	-0.3732200	-0.8510046	12.47533	1.8744746	0.3917085	0.9990430
38	TRA-1-60	0.9844836	0.5706390	12.30378	1.8192967	0.4026658	0.9990430
39	CD153	-0.0676768	-0.6220949	12.76272	1.7938512	0.4078215	0.9990430
40	EGF-R	1.0126142	0.6543265	12.27526	1.7917361	0.4082531	0.9990430
41	CD23	0.7169549	0.3323345	12.61389	1.7905071	0.4085040	0.9990430
42	CD273	0.6154643	0.5700333	12.74800	1.7851177	0.4096063	0.9990430
43	CD5	0.4674141	0.5351862	12.94552	1.7023426	0.4269146	0.9990430
44	CMRF-44	0.6812390	0.3199416	12.60009	1.5792818	0.4540078	0.9990430
45	CD79b	0.7310204	0.7745430	12.39575	1.5574867	0.4589824	0.9990430
46	CD40	0.3840565	0.4065668	13.24090	1.5096481	0.4700933	0.9990430
47	CD89	-0.2290067	-0.4075426	13.35554	1.4560200	0.4828689	0.9990430
48	Integrin_b7	0.1801389	-0.3651271	12.85386	1.4371248	0.4874525	0.9990430
49	CD117	0.3138733	0.6995687	12.50838	1.4033545	0.4957531	0.9990430
50	CD235a	-0.7789938	0.1188140	12.21062	1.3845631	0.5004330	0.9990430
51	CD123	0.2429899	0.4149517	13.29164	1.3789945	0.5018283	0.9990430
52	CD38	-0.1948373	-0.3955817	13.36420	1.3596803	0.5066980	0.9990430
53	SSEA-3	0.7279812	0.7241840	12.35448	1.3398470	0.5117477	0.9990430
54	CLIP	0.4141715	0.4600914	12.96146	1.3290615	0.5145149	0.9990430
55	CD88	0.2743407	0.4500876	13.10661	1.3186205	0.5172080	0.9990430
56	CD267	0.3977743	0.7726628	12.36607	1.2784538	0.5277002	0.9990430
57	CD338	-0.9382326	-0.3357175	12.10364	1.1943331	0.5503689	0.9990430
58	CD64	-0.1529212	-0.3654595	13.36385	1.1564747	0.5608861	0.9990430
59	TRA-1-180	0.6796571	0.7042099	12.31203	1.1270541	0.5691979	0.9990430
60	CD200	-0.1664830	-0.5353099	12.69419	1.0944235	0.5785607	0.9990430
61	CD231	0.8177388	0.5505633	12.23084	1.0887076	0.5802166	0.9990430
62	CD274	0.4451145	0.4063092	12.83997	1.0829631	0.5818855	0.9990430
63	CD158a	0.5776319	0.5308440	12.50745	1.0810307	0.5824480	0.9990430
64	CD212	0.4340343	0.7183932	12.35857	1.0772923	0.5835378	0.9990430

<b>Rang</b>	<b>Antigen</b>	<b>logFC inter- mediate</b>	<b>logFC non-classical</b>	<b>logCPM</b>	<b>LR</b>	<b>P-value</b>	<b>FDR</b>
65	CD35	-0.2313288	-0.3138419	13.45012	1.0441384	0.5932916	0.9990430
66	CD150	0.2999209	0.5745495	12.55683	1.0074031	0.6042897	0.9990430
67	CD196	0.3619351	0.5885468	12.52421	0.9939705	0.6083620	0.9990430
68	CD163	0.0854791	-0.2442645	13.31599	0.9526020	0.6210765	0.9990430
69	CD49b	-0.1284172	-0.4144709	12.93390	0.9235552	0.6301625	0.9990430
70	CD184	-0.1478164	-0.4156248	12.93001	0.9128829	0.6335341	0.9990430
71	CD45R0	-0.0666969	-0.2929837	13.48533	0.9023189	0.6368893	0.9990430
72	NKB1	0.5568286	0.3318281	12.50988	0.8888496	0.6411930	0.9990430
73	CD209	0.0213321	-0.3950907	12.77142	0.8880962	0.6414346	0.9990430
74	fMLP-R	-0.0295969	-0.3041044	13.30058	0.8801839	0.6439772	0.9990430
75	Disialo-ganglioside	-0.1039531	-0.4454681	12.75462	0.8640794	0.6491836	0.9990430
76	CD22	0.3102068	0.4773558	12.66778	0.8353803	0.6585663	0.9990430
77	Vb8	-0.5233479	-0.4390466	12.40222	0.7915369	0.6731625	0.9990430
78	CD243	-0.4594241	-0.7382720	12.14923	0.7837643	0.6757837	0.9990430
79	CD15	-0.3471430	-0.2880581	12.93571	0.7791528	0.6773437	0.9990430
80	CDw93	-0.1523340	-0.2764879	13.48087	0.7595025	0.6840316	0.9990430
81	CD183	0.4780030	0.2775232	12.59439	0.7591606	0.6841485	0.9990430
82	HLA-DR_DP_DQ	0.2257471	0.2192183	13.65068	0.7505462	0.6871016	0.9990430
83	CD337	-0.3669663	0.3129852	12.21673	0.7446485	0.6891307	0.9990430
84	CD132	0.1092136	0.3046573	13.24050	0.7419594	0.6900579	0.9990430
85	CD77	0.6290919	0.4858709	12.26930	0.7353888	0.6923287	0.9990430
86	CD130	-0.1627699	-0.3310865	13.11837	0.7278863	0.6949307	0.9990430
87	CDw327	-0.3866437	-0.4795456	12.42384	0.6653338	0.7170090	0.9990430
88	CD66f	0.5462392	0.5759336	12.23929	0.6518077	0.7218746	0.9990430
89	CD178	0.4455240	0.3227801	12.55850	0.6395286	0.7263202	0.9990430
90	CD201	0.1696646	0.4256723	12.62088	0.6390448	0.7264959	0.9990430
91	CD51_61	-0.0311136	-0.4434223	12.46655	0.6080199	0.7378535	0.9990430
92	CD49e	-0.2035975	-0.2283180	13.41750	0.6027313	0.7398072	0.9990430
93	CD1d	-0.0903482	-0.2763966	13.25027	0.6006330	0.7405838	0.9990430
94	CD59	-0.1030430	-0.2713181	13.28462	0.5922599	0.7436908	0.9990430
95	CD69	-0.0103194	-0.3443433	12.71596	0.5787878	0.7487172	0.9990430
96	CD37	0.1829828	0.2683937	13.25107	0.5703842	0.7518698	0.9990430

<b>Rang</b>	<b>Antigen</b>	<b>logFC inter- mediate</b>	<b>logFC non-classical</b>	<b>logCPM</b>	<b>LR</b>	<b>P-value</b>	<b>FDR</b>
97	CD19	0.2330064	0.4216703	12.58222	0.5673188	0.7530231	0.9990430
98	CD244	0.1252840	0.2588339	13.33337	0.5670689	0.7531172	0.9990430
99	CD108	-0.2759074	-0.3124319	12.76620	0.5208820	0.7707116	0.9990430
100	CD100	0.1471950	0.2639110	13.22137	0.5200736	0.7710232	0.9990430
101	CD1a	0.3406806	0.5365753	12.25901	0.4974119	0.7798092	0.9990430
102	CD73	0.3635662	0.2742232	12.63406	0.4925438	0.7817096	0.9990430
103	CD107b	-0.0937982	-0.2525284	13.23876	0.4896568	0.7828389	0.9990430
104	CD197	0.3904812	0.3537053	12.46513	0.4689753	0.7909760	0.9990430
105	CD3	0.1711415	0.2657288	13.10136	0.4661958	0.7920760	0.9990430
106	CD166	-0.1779786	-0.2465937	13.15108	0.4597935	0.7946156	0.9990430
107	CD57	0.3121979	0.2938278	12.68975	0.4512269	0.7980265	0.9990430
108	CD49f	-0.1065448	-0.2686074	13.05629	0.4469533	0.7997336	0.9990430
109	CD177	0.3591475	0.2209479	12.58818	0.4284071	0.8071841	0.9990430
110	CD144	-0.1762394	-0.4280954	12.39797	0.4214363	0.8100023	0.9990430
111	CD49d	0.1384888	0.2012026	13.50294	0.4208207	0.8102517	0.9990430
112	CD141	0.1721338	0.2148945	13.30742	0.4168371	0.8118672	0.9990430
113	HLA-DR	0.1605114	0.1639735	13.68284	0.4151924	0.8125351	0.9990430
114	CD134	0.3239743	0.2771851	12.62133	0.4090051	0.8150527	0.9990430
115	CD140a	0.0421661	-0.3557145	12.37481	0.4054251	0.8165129	0.9990430
116	gdTCR	0.1227415	-0.2900373	12.38691	0.3995845	0.8189009	0.9990430
117	CD85	0.1310120	0.1958477	13.48902	0.3903285	0.8226995	0.9990430
118	CD62P	-0.0175532	-0.2256160	13.06893	0.3850896	0.8248574	0.9990430
119	CD25	0.2519110	0.2584223	12.78625	0.3695371	0.8312967	0.9990430
120	CD146	0.2855905	-0.0778153	12.40650	0.3691611	0.8314530	0.9990430
121	CD279	-0.2762535	0.1545311	12.30208	0.3665548	0.8325372	0.9990430
122	Vb23	0.2929197	0.3468025	12.48642	0.3662020	0.8326840	0.9990430
123	CD24	-0.0349480	0.4107410	12.15233	0.3594310	0.8355079	0.9990430
124	CD81	0.0874746	0.1985313	13.39321	0.3584206	0.8359301	0.9990430
125	CD154	0.2852531	0.2835004	12.61910	0.3564537	0.8367526	0.9990430
126	CD31	-0.0365203	0.1306431	13.59677	0.3530891	0.8381614	0.9990430
127	CD39	0.0239743	-0.1593733	13.35008	0.3369527	0.8449512	0.9990430
128	CD210	0.1768979	0.2180346	13.08355	0.3360073	0.8453507	0.9990430

<b>Rang</b>	<b>Antigen</b>	<b>logFC inter- mediate</b>	<b>logFC non-classical</b>	<b>logCPM</b>	<b>LR</b>	<b>P-value</b>	<b>FDR</b>
129	CD41a	-0.0593065	-0.1948162	13.33402	0.3320991	0.8470043	0.9990430
130	CD161	0.2907838	0.1581369	12.67099	0.3201126	0.8520958	0.9990430
131	MIC_A/B	-0.2760249	-0.1813461	12.69474	0.3147209	0.8543960	0.9990430
132	CD309	0.1728368	-0.1376448	12.52610	0.2932871	0.8636018	0.9990430
133	CD63	-0.0853376	-0.1715447	13.49048	0.2925171	0.8639343	0.9990430
134	CD30	0.2273824	0.2419908	12.71397	0.2824304	0.8683024	0.9990430
135	CD61	-0.0672032	-0.1813528	13.33574	0.2820117	0.8684842	0.9990430
136	CD137_Ligand	0.2576429	0.0143606	12.54582	0.2723745	0.8726792	0.9990430
137	CD42b	0.0039626	-0.1888514	12.98850	0.2710606	0.8732527	0.9990430
138	CD107a	-0.0996224	-0.1771733	13.30077	0.2590344	0.8785195	0.9990430
139	CD268	0.1396467	0.2194504	12.89314	0.2464508	0.8840644	0.9990430
140	CD1b	0.2867093	0.3127915	12.33990	0.2407609	0.8865831	0.9990430
141	CD45RB	0.0481818	0.1386729	13.66369	0.2360841	0.8886587	0.9990430
142	CD336	0.0492537	-0.3005035	12.23827	0.2309161	0.8909579	0.9990430
143	CD121b	0.2269406	0.1535128	12.74533	0.2229031	0.8945347	0.9990430
144	CD49c	0.2427449	0.2677753	12.45038	0.2178328	0.8968054	0.9990430
145	CD102	0.0765450	0.1438635	13.52797	0.2135968	0.8987069	0.9990430
146	CD162	-0.0133109	0.1099359	13.62001	0.2128125	0.8990593	0.9990430
147	CD43	-0.0316692	0.0938876	13.68710	0.2117466	0.8995386	0.9990430
148	CD54	0.1055212	0.1388824	13.50241	0.2093679	0.9006091	0.9990430
149	CD96	-0.1525538	-0.0720220	13.36128	0.2090965	0.9007313	0.9990430
150	CD90	-0.2875497	-0.2127741	12.37371	0.2063597	0.9019648	0.9990430
151	CD205	-0.1134668	-0.1325438	13.44917	0.2007839	0.9044828	0.9990430
152	CD41b	0.0000558	-0.1506988	13.09376	0.1930382	0.9079926	0.9990430
153	CD158b	-0.0339879	-0.2740784	12.37237	0.1903092	0.9092323	0.9990430
154	CD118	0.2167844	-0.0556043	12.35944	0.1892430	0.9097172	0.9990430
155	CD47	0.0004066	0.1169210	13.50939	0.1889294	0.9098598	0.9990430
156	CD340	-0.2703576	-0.1145898	12.42893	0.1859572	0.9112130	0.9990430
157	CD33	-0.1165447	-0.1351138	13.32464	0.1844077	0.9119192	0.9990430
158	CD193	-0.0239337	0.2723400	12.22601	0.1827589	0.9126713	0.9990430
159	CD11c	0.0462095	0.1218856	13.61532	0.1716150	0.9177709	0.9990430
160	CD255	0.2164253	-0.1143139	12.16595	0.1676910	0.9195733	0.9990430



<b>Rang</b>	<b>Antigen</b>	<b>logFC inter- mediate</b>	<b>logFC non-classical</b>	<b>logCPM</b>	<b>LR</b>	<b>P-value</b>	<b>FDR</b>
161	CD62L	-0.1336476	-0.1537003	12.96052	0.1583374	0.9238840	0.9990430
162	HLA-DQ	0.1207969	0.0711164	13.52033	0.1544131	0.9256986	0.9990430
163	CD138	0.1726692	-0.0678442	12.40784	0.1530612	0.9263246	0.9990430
164	CD80	0.0795980	0.1585242	13.01353	0.1478139	0.9287581	0.9990430
165	CD11a	-0.0027767	0.0930986	13.68941	0.1472762	0.9290079	0.9990430
166	CD62E	0.2383523	0.2028134	12.38017	0.1465754	0.9293334	0.9990430
167	CD84	-0.0820978	-0.1300063	13.31534	0.1448046	0.9301566	0.9990430
168	CD165	-0.0012234	-0.1417217	12.92663	0.1381486	0.9332573	0.9990430
169	CD321	-0.1094843	-0.0938175	13.41931	0.1338407	0.9352697	0.9990430
170	CD48	0.0659784	0.1220118	13.38683	0.1331952	0.9355716	0.9990430
171	CD9	-0.0098059	-0.1129347	13.33420	0.1310813	0.9365610	0.9990430
172	CD87	-0.1127684	-0.0734456	13.45084	0.1293768	0.9373595	0.9990430
173	CD206	0.1603831	0.0185662	12.70673	0.1272885	0.9383388	0.9990430
174	CD122	0.1781947	0.0623802	12.65486	0.1235188	0.9401090	0.9990430
175	CD50	-0.0989637	-0.0384583	13.67217	0.1218702	0.9408843	0.9990430
176	CD74	0.0828608	0.1115421	13.39790	0.1205568	0.9415024	0.9990430
177	CD124	0.0809943	-0.0669309	12.88101	0.1126368	0.9452381	0.9990430
178	CD106	0.1858899	0.1113006	12.56373	0.1113161	0.9458625	0.9990430
179	CD55	-0.0985266	-0.0593370	13.57189	0.1095655	0.9466908	0.9990430
180	CD127	-0.1178100	0.0595730	12.59498	0.1095612	0.9466928	0.9990430
181	CD314	0.1440897	-0.0041613	12.65761	0.1094764	0.9467330	0.9990430
182	CD227	0.1294657	0.0600023	13.05817	0.1078385	0.9475086	0.9990430
183	CD21	0.0454157	0.1897728	12.45385	0.1036089	0.9495145	0.9990430
184	CD142	0.0238180	-0.1156553	12.82997	0.1029959	0.9498056	0.9990430
185	CD97	-0.0001651	0.0817906	13.60235	0.1013968	0.9505653	0.9990430
186	CD20	0.0113196	0.1360118	12.75194	0.0974581	0.9524391	0.9990430
187	CD13	-0.0806174	-0.0835399	13.49031	0.0915506	0.9552566	0.9990430
188	CD147	-0.0821171	-0.0098872	13.58139	0.0899633	0.9560150	0.9990430
189	CD44	-0.0567228	0.0220002	13.75007	0.0867566	0.9575491	0.9990430
190	CD335	0.0541587	0.1616859	12.57182	0.0867390	0.9575575	0.9990430
191	CD4v4	0.0144687	0.0921967	13.30671	0.0821453	0.9597594	0.9990430
192	CD172b	-0.0937614	-0.0348836	13.36976	0.0813141	0.9601583	0.9990430

<b>Rang</b>	<b>Antigen</b>	<b>logFC inter- mediate</b>	<b>logFC non-classical</b>	<b>logCPM</b>	<b>LR</b>	<b>P-value</b>	<b>FDR</b>
193	CDw329	-0.0790319	-0.0741366	13.50338	0.0810951	0.9602635	0.9990430
194	CD2	-0.0781903	-0.0957569	13.23331	0.0803343	0.9606289	0.9990430
195	CD112	0.1197243	-0.0156252	12.62681	0.0800284	0.9607758	0.9990430
196	CD220	-0.0635461	0.0358074	13.22958	0.0785965	0.9614639	0.9990430
197	CD86	-0.0016326	0.0771115	13.44275	0.0783479	0.9615834	0.9990430
198	CD229	0.1238818	0.1208187	12.70355	0.0771949	0.9621380	0.9990430
199	CD45	-0.0031713	0.0666747	13.69389	0.0770233	0.9622205	0.9990430
200	CD180	0.0713242	0.0848657	13.36608	0.0725100	0.9643944	0.9990430
201	CD6	-0.0866679	-0.0946023	13.06200	0.0703297	0.9654463	0.9990430
202	CD58	-0.0784216	-0.0272374	13.49885	0.0655633	0.9677498	0.9990430
203	CD236	-0.0965640	-0.0920754	12.90579	0.0628249	0.9690758	0.9990430
204	CD7	0.0346030	0.0986120	13.05497	0.0624184	0.9692728	0.9990430
205	CD4	-0.0035524	0.0695352	13.35882	0.0602210	0.9703383	0.9990430
206	CD42a	0.0333848	-0.0531843	13.18771	0.0559707	0.9724026	0.9990430
207	HLA-A2	0.0281925	0.0951525	12.99083	0.0549158	0.9729157	0.9990430
208	CD34	0.0547202	-0.0508355	12.82206	0.0527256	0.9739817	0.9990430
209	CD53	-0.0201942	0.0442768	13.63850	0.0512963	0.9746780	0.9990430
210	CD103	0.0509797	-0.0595691	12.70263	0.0486428	0.9759720	0.9990430
211	CD221	-0.0322976	0.0522558	13.02338	0.0445454	0.9779735	0.9990430
212	CD120a	0.0510507	0.0961564	12.80760	0.0417236	0.9793543	0.9990430
213	CD226	-0.0431328	-0.0767627	13.15447	0.0412788	0.9795721	0.9990430
214	CD151	0.0004137	0.0622294	13.24964	0.0403347	0.9800346	0.9990430
215	CD121a	0.0994459	0.0010275	12.52169	0.0399880	0.9802046	0.9990430
216	CDw328	0.0597759	0.0003763	13.28666	0.0398986	0.9802484	0.9990430
217	CD56	0.0461144	0.1039605	12.63939	0.0384439	0.9809616	0.9990430
218	CD109	-0.0595162	-0.0053452	13.33043	0.0376901	0.9813314	0.9990430
219	CD46	-0.0309351	0.0290525	13.50998	0.0375204	0.9814147	0.9990430
220	HLA-A_B_C	-0.0356973	0.0165717	13.69175	0.0355946	0.9823601	0.9990430
221	CD164	-0.0590014	-0.0350256	13.44216	0.0343699	0.9829619	0.9990430
222	CD305	0.0387542	0.0573475	13.49503	0.0341635	0.9830633	0.9990430
223	abTCR	-0.0684262	-0.0843665	12.74655	0.0337927	0.9832456	0.9990430
224	CD98	-0.0410461	0.0140265	13.48982	0.0335491	0.9833654	0.9990430

Rang	Antigen	logFC inter- mediate	logFC non-classical	logCPM	LR	P-value	FDR
225	CD18	-0.0271938	0.0232258	13.70010	0.0319692	0.9841425	0.9990430
226	CD119	-0.0170839	0.0404147	13.37156	0.0314360	0.9844049	0.9990430
227	CD282	-0.0430828	-0.0502881	13.49410	0.0299577	0.9851328	0.9990430
228	CD152	0.0704149	-0.0502251	12.29690	0.0287095	0.9857478	0.9990430
229	CD32	-0.0141077	0.0314405	13.49936	0.0223254	0.9888994	0.9990430
230	CD105	0.0451846	0.0043726	13.27821	0.0206990	0.9897039	0.9990430
231	CD66b	-0.0488101	-0.0811031	12.45883	0.0174539	0.9913110	0.9990430
232	b2microglobulin	-0.0181632	0.0211744	13.56351	0.0170185	0.9915269	0.9990430
233	CD94	0.0622528	0.0322653	12.76241	0.0169045	0.9915834	0.9990430
234	CD91	0.0001392	-0.0321024	13.46107	0.0133661	0.9933392	0.9990430
235	CD126	0.0393348	0.0211383	13.04821	0.0097899	0.9951170	0.9990430
236	CD27	-0.0050758	0.0333696	12.89313	0.0089810	0.9955196	0.9990430
237	CD116	0.0081653	0.0345292	13.09939	0.0085504	0.9957339	0.9990430
238	CD28	0.0111640	0.0388918	12.85108	0.0077154	0.9961497	0.9990430
239	CD99R	-0.0029350	-0.0309029	13.00921	0.0068182	0.9965967	0.9990430
240	Invariant_NKT	-0.0519936	0.0037164	12.18840	0.0059696	0.9970197	0.9990430
241	CD8a	-0.0242384	-0.0188872	13.14752	0.0045748	0.9977152	0.9990430
242	CD26	-0.0037390	0.0148482	12.86381	0.0019149	0.9990430	0.9990430

Tabelle 9: EdgeR-Analyse der Monozytensubtypen basierend auf den Werten klassischer Monozyten. FC = Fold change, CPM = Counts per million, LR = Long Range, FDR = False discovery rate.