

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

Die Bedeutung von „bone morphogenetic proteins“ und
ihren Interaktionspartnern in den verschiedenen Subtypen
von Monozyten bei der Entstehung der koronaren
Herzerkrankung und des akuten Koronarsyndroms

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Ahmad, Osama

2021

Dekan: Professor Dr. rer. nat. B. Pichler

1. Berichterstatter: PD Dr. med. I. Müller

2. Berichterstatter: Professor Dr. med. M. Hofbeck

Tag der Disputation: 20.10.2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1. Die Koronare Herzkrankheit	1
1.2. Die Atherosklerose	2
1.2.1. Response to Injury Theory	2
1.2.2. Klinische Ausprägung der KHK.....	8
1.3. Monozyten und monozytäre Marker	9
1.3.1. Morphologie und Funktion von Monozyten und Makrophagen	9
1.3.2. CD14	11
1.3.3. CD16.....	11
1.3.4. MIF	11
1.3.4.1. Die Rolle des MIF's in der Atherosklerose	12
1.3.5. Gremlin-1	14
1.3.5.1. Gremlin-1 in der Atherosklerose.....	16
1.3.6. BMP	17
1.3.7. BMP-2	18
1.3.7.1. BMP-2 in der Atherosklerose.....	18
1.3.8. BMP-4	19
1.3.8.1. BMP-4 in der Atherosklerose.....	20
1.3.9. BMP-7	21
1.3.9.1. BMP-7 in der Atherosklerose.....	21
1.4. Fragestellung dieser Arbeit	22
2. Material und Methoden	23
2.1. Materialien	23
2.1.1. Materialien zur Blutentnahme	23
2.1.2. Antikörper.....	23
2.1.3. Chemikalien und Reagenzien	24
2.1.4. Materialien für die Durchflusszytometrie	25
2.1.5. Statistische Datenauswertung	25
2.2. Methoden	25

2.2.1. Blutentnahme und Blutaufbereitung.....	25
2.2.2. Monozyten-Färbung.....	25
2.2.3. Durchflusszytometrie	26
2.2.4. Messprotokoll.....	27
2.2.5. Auswertungen der Messungen	27
2.2.6. Auswahl und Basischarakteristika des Patientenkollektivs.....	29
2.2.7. Statistische Auswertung.....	31
3. Ergebnisse	32
3.1. Patientencharakteristika der Studienkohorte.....	32
3.2. Oberflächenexpression der Antikörper auf den Monozyten-Populationen	35
3.2.1. BMP-2-Expression	35
3.2.2. BMP-4-Expression	37
3.2.3. BMP-7-Expression	39
3.2.4. MIF-Expression	41
3.2.5. Gremlin-Expression	43
4. Diskussion	46
4.1. Betrachtung der Patientencharakteristika	46
4.2. Klinische Bedeutung der BMP-2-Konzentration	47
4.3. Klinische Bedeutung der BMP-4-Konzentration	50
4.4. Klinische Bedeutung der BMP-7-Konzentration	52
4.5. Klinische Bedeutung der MIF-Konzentration	53
4.6. Klinische Bedeutung der Gremlin-Konzentration	54
5. Zusammenfassung	56
6. Literaturverzeichnis	58
7. Erklärung zum Eigenanteil	70
8. Danksagung	71

Abbildungsverzeichnis

1. Adhäsionsmolekül-assoziierte Einwanderung monozytärer Zellen in die Gefäßintima	3
2. Initiierung einer fibrös-fettigen Plaque.	5
3. Reifung der atherosklerotischen Plaque.....	6
4. Thromboembolische Komplikationen	7
5. Von der klinischen Präsentation bis zur Diagnosefindung.	8
6. Zelluläre Mechanismen von MIF in der Atherogenese.	13
7. Differenzierung via BMP2/4-Mechanismus.	19
8. Beispielhafte durchflusszytometrische Messung zur Bestimmung der MIF-Konzentration	28
9. Beispielhafte Auswertung mittels Flowjo	29
10. Gegenüberstellung der mittleren BMP-2-Konzentration auf nicht-klassischen Monozyten	36
11. Gegenüberstellung der mittleren BMP-2-Konzentration auf klassischen Monozyten	36
12. Gegenüberstellung der mittleren BMP-2-Konzentration auf intermediären Monozyten	37
13. Gegenüberstellung der mittleren BMP-4-Konzentration auf nicht-klassischen Monozyten	38
14. Gegenüberstellung der mittleren BMP-4-Konzentration auf klassischen Monozyten	38
15. Gegenüberstellung der mittleren BMP-4-Konzentration auf intermediären Monozyten	39
16. Gegenüberstellung der mittleren BMP-7-Konzentration auf nicht-klassischen Monozyten	40
17. Gegenüberstellung der mittleren BMP-7-Konzentration auf klassischen Monozyten	40
18. Gegenüberstellung der mittleren BMP-7-Konzentration auf intermediären Monozyten	41
19. Gegenüberstellung der mittleren MIF-Konzentration auf nicht-klassischen Monozyten	42
20. Gegenüberstellung der mittleren MIF-Konzentration auf klassischen Monozyten .	42
21. Gegenüberstellung der mittleren MIF-Konzentration auf klassischen Monozyten .	43
22. Gegenüberstellung der mittleren Grem-1-Konzentration auf nicht-klassischen Monozyten	44
23. Gegenüberstellung der mittleren Grem-1-Konzentration auf klassischen Monozyten	44
24. Gegenüberstellung der mittleren Grem-1-Konzentration auf intermediären Monozyten	45

Tabellenverzeichnis

1 Materialien zur Blutentnahme	23
2 Antikörper	23
3 Chemikalien und Reagenzien.....	24
4 Materialien für die Durchflusszytometrie	25
5 Basischarakteristika	30
6 Gegenüberstellung der SAP und des ACS.....	32
7 Baseline Charakteristika	33

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
AT-II	Angiotensin II
BMP	Bone morphogenetic proteins
BMP2	Bone morphogenetic protein 2
BMP4	Bone morphogenetic protein 4
BMP7	Bone morphogenetic protein 7
CCL2	CC-Chemokin-Ligand-2 (CCL2)
CCR2	C-C chemokine receptor type 2
cDNA	Komplementäre DNS
CX3CL1	C-X3-C Motif Chemokine Ligand 1
CX3CR1	C-X3-C Motiv Chemokinrezeptor 1
dpp	Decapentaplegic Genprodukt
Drm	Down-regulated in v-mos transformed cells
ECM	Extrazelluläre Matrix
EKG	Elektrokardiografie
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
IAP	Instabile Angina Pectoris
ICAM-1	Intrazelluläre Adhäsionsmoleküle
KHK	Koronare Herzkrankheit
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes-Protein
LDL	Low Density Lipoproteine
MCP-1	Monozyten-Chemotaxis-Protein 1
MGP	Matrix Gla Protein
MIF	Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor
MSV	Moloney Murine Sarcoma Virus
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NSTEMI	Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt
oxLDL	Oxidiertes LDL
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
rhBMP-2	Rekombinant hergestelltes BMP-2

SAP	Stabile Angina Pectoris
STEMI	ST-Streckenhebungsinfarkt
TF	Tissue factor
TGF-β	Transforming growth factor β
TLR4	Toll-Like-Rezeptor 4
TNF-alpha	Tumor Nekrosefaktor Alpha
VCAM-1	Vaskuläre Adhäsionsmoleküle
VEGFR-2	Vascular endothelial growth factor receptor-2

1. Einleitung

1.1. Die Koronare Herzkrankheit

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist eine chronische Erkrankung des Herzens, die durch Atherosklerose zu einer fortschreitenden Gefäßeinengung der Koronararterien und folglich zu einer Minderperfusion des Herzmuskelgewebes führt [1]. Ursächlich hierfür ist das Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf.

Die Minderversorgung der Herzmuskelzellen kann in zwei Untergruppen aufgeteilt werden: Das akute Koronarsyndrom bestehend aus der instabilen Angina Pectoris (IAP), der Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt (NSTEMI), sowie der ST-Streckenhebungsinfarkt (STEMI). Die stabile Angina Pectoris (SAP) hingegen zählt zu der chronischen Form dieser Erkrankung.

In den Industriestaaten führt die KHK die Rangliste der häufigsten Todesursachen an. Laut dem Statistischen Bundesamt der Bundesrepublik Deutschland belegte die chronisch ischämische Herzkrankheit, zu welcher auch die KHK klassifiziert wird, im Jahre 2015 mit 76.013 Personen abermals den ersten Platz seit Beginn der statistischen Erhebung im Jahre 1998 auf Grundlage der ICD-10 Klassifikation [2]. Hiervon erlagen 38.823 Bundesbürger und 37.190 Bundesbürgerinnen der chronisch ischämischen Herzkrankheit [2]. Dem akuten Myokardinfarkt erlagen 5,3 % (49.210) [2]. Mit Beginn des fünfzigsten Lebensjahres steigt der Anteil der Bürgerinnen und Bürger, die der KHK erliegen rapide an [2]. Die Lebenszeitprävalenz einer KHK für Männer und Frauen im Alter von 40-79 Jahren liegt bei ca. 9,3 % [3].

Im Jahr 2017 stieg die Zahl der Todesfälle im Vergleich zum Vorjahr um 2,3 % an, wobei erneut die Herz-Kreislauf-Erkrankungen den prozentual größten Anteil ausmachten [4].

Jahrzehntelange Forschungen konnten, trotz dieser eindrücklichen Statistik, keine endgültige Aussage zur Entstehung und zum Verlauf der KHK treffen. Die Zielsetzung dieser Doktorarbeit besteht darin, einen weiteren Teilaspekt der

Pathogenese zu decodieren. Hierfür werden monozytäre Antikörperkonzentrationen bestimmt, um aufzudecken, ob und inwiefern diese sich bei dem Formenkreis des akuten Koronarsyndroms und der stabilen Angina Pectoris unterscheiden und inwiefern diesen eine Rolle bei der Entstehung zugeschrieben werden kann.

1.2. Die Atherosklerose

Die Atherosklerose, welche zuvor als Hauptursache der KHK beschrieben wurde, unterliegt einer multikausalen Pathogenese, welche bis dato nicht vollständig entschlüsselt werden konnte.

Bereits 1815 postulierte Joseph Hodgson in seinem Buch „A treatise on the diseases of arteries and veins, containing the pathology and treatment of aneurisms and wounded arteries“, dass die Atherosklerose auf eine Entzündungsreaktion zurückzuführen sei [5].

Jean Lobstein prägte 1833 in seinem „Traité d'anatomie pathologique II“ den Begriff „Artériosclerose“ erstmals [6].

Dieser Begriff wird häufig synonym zur Atherosklerose verwendet, obzwar die Genese der Arteriosklerose per Definition zweitrangig ist.

N. Anitschkow wies 1923 darauf hin, dass eine derart komplexe Erkrankung, entgegen herkömmlicher Meinung, mit zu vernachlässigender Wahrscheinlichkeit auf einen einzigen Faktor als grundlegende Pathogenese beruhen kann [7].

Die von Ross und Gosmet beschriebene „Response to Injury Theory“ ist nach aktuellem Stand das gängigste pathophysiologische Erklärungsmodell der Atherosklerose, welches über die Jahre hinweg mehrmals von R. Ross passend zur jeweiligen Studienlage modifiziert wurde und im Folgenden erläutert wird [8].

1.2.1. Response to Injury Theory

Phase 1: Endotheldysfunktion

Der Ausgangspunkt der Atherosklerose basiert auf der Endotheldysfunktion. Die wohlbekannte Framingham-Studie offenbarte diverse Risikofaktoren für die Entstehung der KHK, welche die Endotheldysfunktion konstituieren. Zu jenen

gehören Nikotinkonsum, Adipositas, Bluthochdruck, Hypercholesterinämie und das Lebensalter.

Die chronische Belastung des Endothels führt im Verlauf der Erkrankung zur Verdickung der Arterienwand und erhöht die Adhäsion der Leukozyten, sowie der Thrombozyten an das Endothel [8].

Dabei werden Low Density Lipoproteine (LDL) in die Gefäßintima eingelagert. Studien belegen, dass freie Radikale zur Lipidperoxidation beitragen [9].

Phase 2: Inflammatorische Phase

In der inflammatorischen Phase induziert oxidiertes LDL die Chemotaxis der Monozyten, wobei Endothelzellen Adhäsionsmoleküle exprimieren. Es folgt die verstärkte Einwanderung von Entzündungszellen in die Gefäßintima [10].

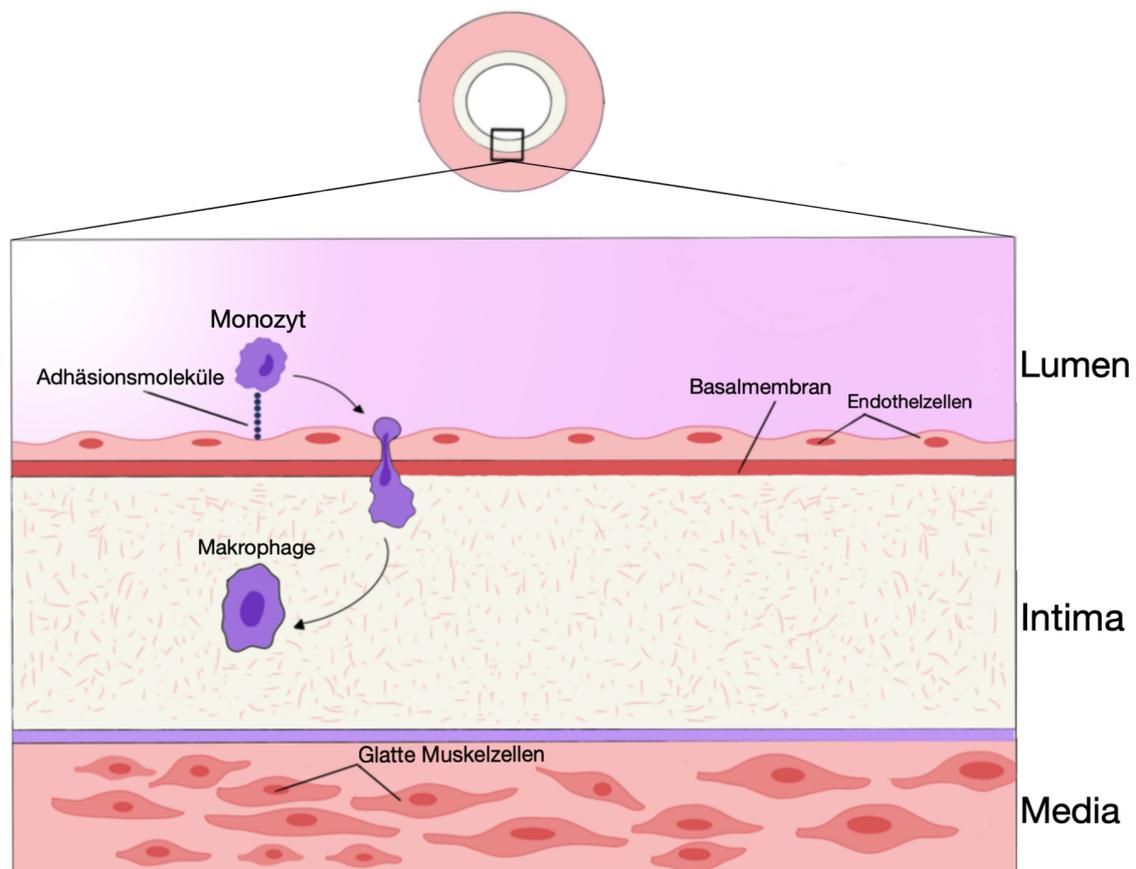


Abbildung 1: Adhäsionsmolekül-assoziierte Einwanderung monozytärer Zellen in die Gefäßintima. Modifiziert nach [10].

Phase 3: Differenzierung von Schaumzellen

Durch den Einfluss von Zytokinen differenzieren sich die eingewanderten Monozyten zu Makrophagen und nehmen anhand der Scavenger Receptor an ihrer Oberfläche oxidiertes LDL auf [10]. Dieser Prozess wird als Phase 3 beschrieben.

Bereits 1987 wurde vermutet, dass oxidiertes LDL für die Entstehung der Schaumzellen verantwortlich sein könnte [11].

Phase 4: Wanderung der glatten Muskelzellen und Bildung einer Plaque

Phase 4 wird durch die Wanderung der glatten Muskelzellen von der Tunica Media in die Intima auf Grundlage von Stimulationsreizen diverser Zytokine eingeleitet. Eine tragende Rolle wird platelet-derived growth factor (PDGF) zuteil. Schaumzellen sezernieren proinflammatorische Mediatoren, welche die glatten Muskelzellen zur erhöhten Produktion extrazellulärer Matrix-Moleküle in der Intima verleiten. Den Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix atherosklerotischer Plaques bilden Kollagen, Elastin und Glykosaminoglykane [10].

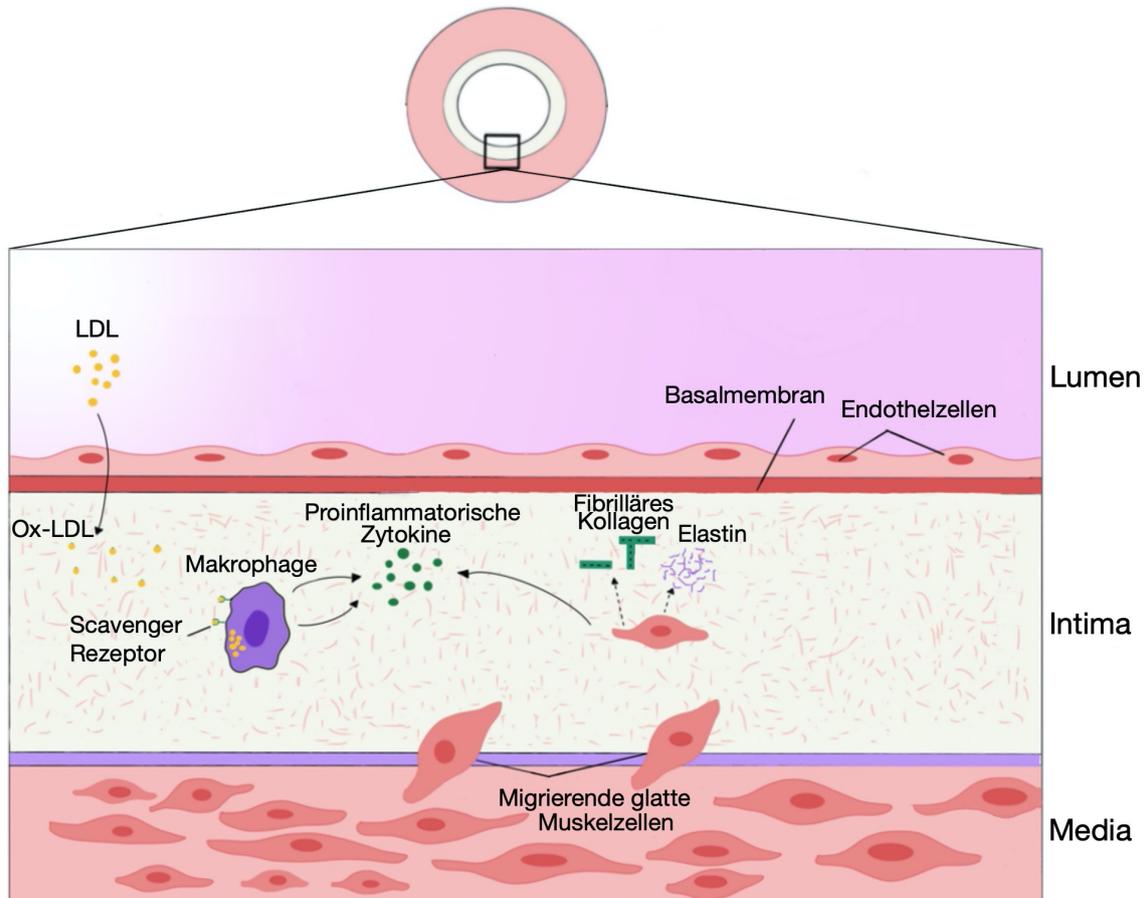


Abbildung 2: Initiierung einer fibrös-fettigen Plaque: Makrophagen nehmen anhand Scavenger Rezeptoren oxidiertes-LDL (Ox-LDL) auf und initiieren die Umwandlung zu Schaumzellen. Glatte Muskelzellen wandern von der Media in die Intima. Schaumzellen sezernieren proinflammatorische Mediatoren, welche die glatten Muskelzellen zur erhöhten Produktion extrazellulärer Matrix-Moleküle verleiten. Modifiziert nach [10].

Aus den Bestandteilen der extrazellulären Matrix (ECM) wird eine fibröse Schutzschicht gebildet, die dem thrombogenen Lipidplaque aufsitzt und diesen vom Blut trennt. Der Plaque besteht aus Debris, Lipiden, sowie Schaumzellen und führt zunehmend zu einem stenosierenden Plaque [10].

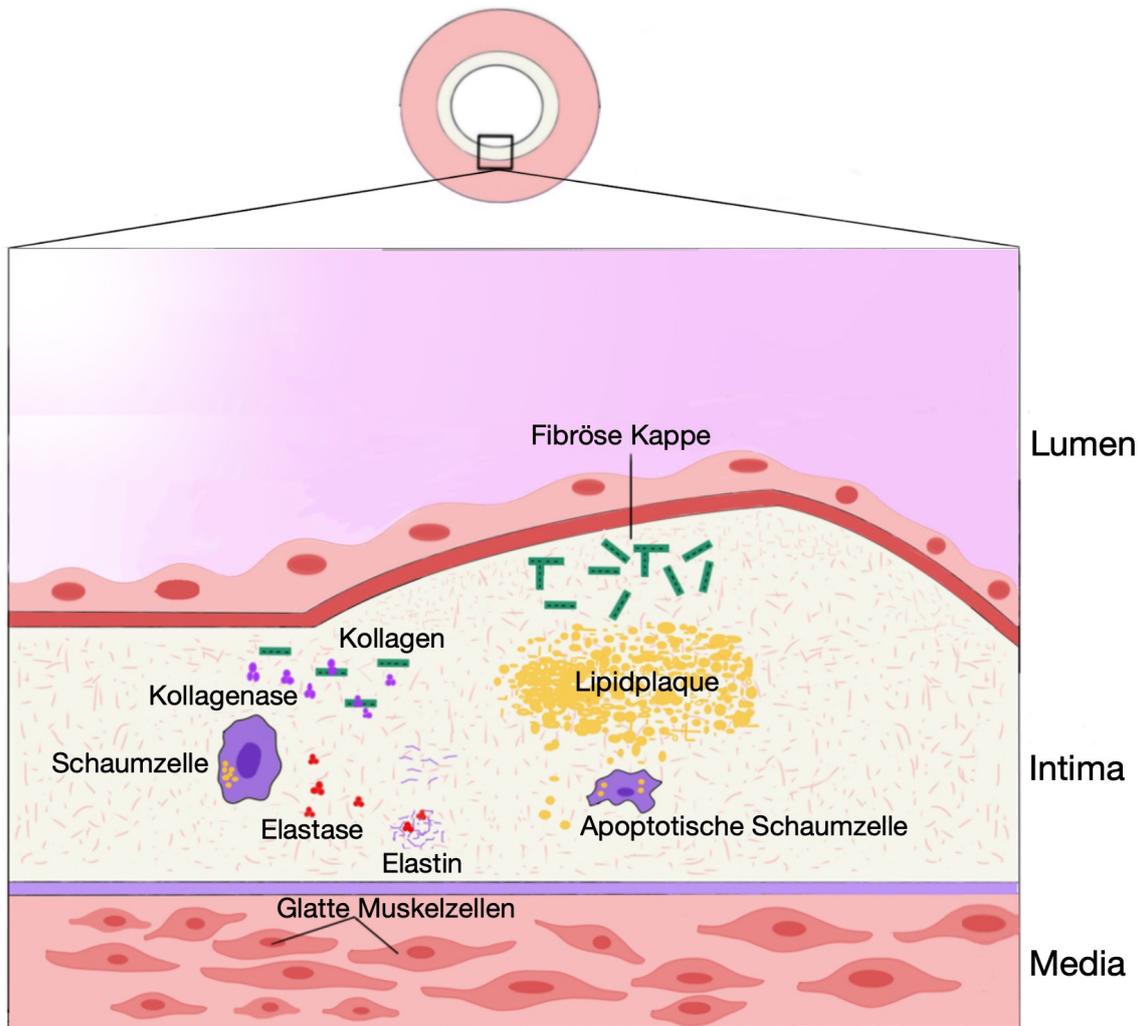


Abbildung 3: Reifung der atherosklerotischen Plaque: Ausbildung einer fibrösen Kappe, welche aus Bestandteilen der extrazellulären Matrix wie dem Kollagen und Elastin besteht und der Lipidplaque aufsitzt. Der Lipidplaque besteht unter anderem aus Makrophagen, Debris, Lipiden und apoptotischen Zellen. Modifiziert nach [10].

Phase 5: Plaqueruptur und Thromboembolien

In der letzten Phase besteht zunehmend die Gefahr der Plaqueruptur. Inflammatorische Zytokine dirigieren die Expression diverser Proteinasen, welche die Fähigkeit zur Degradierung der extrazellulären Matrixmoleküle besitzen und zur ultimativen Destabilisierung der fibrösen Kappe führen [12].

Bereits im Jahre 1982 konnte gezeigt werden, dass komplizierte Läsionen, wie etwa Plaquerupturen, ein höheres Risiko für einen akuten Herzinfarkt oder den plötzlichen Herztod darstellten als unkomplizierte Läsionen [13].

Studien konnten zudem belegen, dass der Schulterbereich der Plaques prädisponierend für Instabilitäten sowie folgender Thromboembolien ist [14].

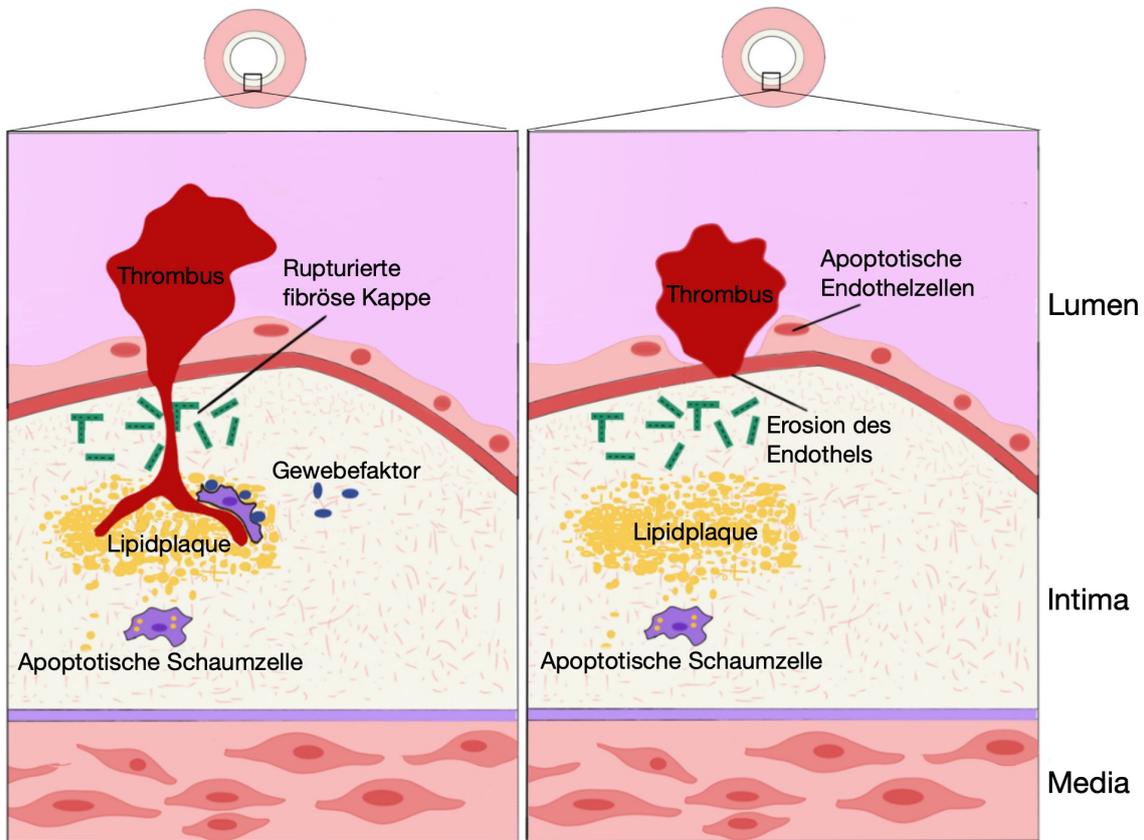


Abbildung 4: Thromboembolische Komplikationen: Das linke Schaubild verdeutlicht die Ruptur der fibrösen Kappe. Hierdurch treten Blutbestandteile mit dem Gewebefaktor in Kontakt und leiten die Thrombosierung ein. Das rechte Schaubild zeigt hingegen die oberflächliche Erosion des Endothels, welche vermutlich durch die Endothel-Apoptose eingeleitet wird. Modifiziert nach [10].

Thromboembolien können auf verschiedene Weisen entstehen: Alte sowie neue Studien belegen, dass die Plaqueruptur, unabhängig der klinischen Präsentation, den Hauptgrund für Koronarthrombosen darstellt [15].

Die zuvor beschriebenen Proteinasen können dazu führen, dass die fibröse Schutzkappe rupturiert. Die Ruptur ermöglicht den Blutbestandteilen, insbesondere den Koagulationsfaktoren, mit dem von den glatten Muskelzellen und Makrophagen exprimierten Gewebefaktor in Kontakt zu treten. Dieser Prozess leitet die Thrombosierung ein [10].

Eine weniger verstandene Form ist die Plaque-Erosion. Typischerweise fehlt das Endothel an der erodierten Stelle, wodurch die Intima mit ihren glatten Muskelzellen und Proteoglykanen in Kontakt mit dem Thrombus tritt.

Das Endothel zeigt Zeichen einer intimalen Verdickung mit intakter Media, während die Media in rupturierten Plaques meist zerstört aufzufinden ist [16].

1.2.2. Klinische Ausprägung der KHK

Diverse Ätiologien und Ausmaße der Thrombusbildung, Gefäßverschlüsse und Ausdehnungen des Infarktareals bergen diverse Kliniken. Hier schließt sich der Kreis sowohl zur initial erläuterten KHK als auch zur Differenzierung zwischen dem akuten Koronarsyndrom und der stabilen Angina Pectoris. Die Differenzierung erfolgt anhand klinischer, elektrokardiographischer (EKG), sowie laborchemischer Parameter [17].

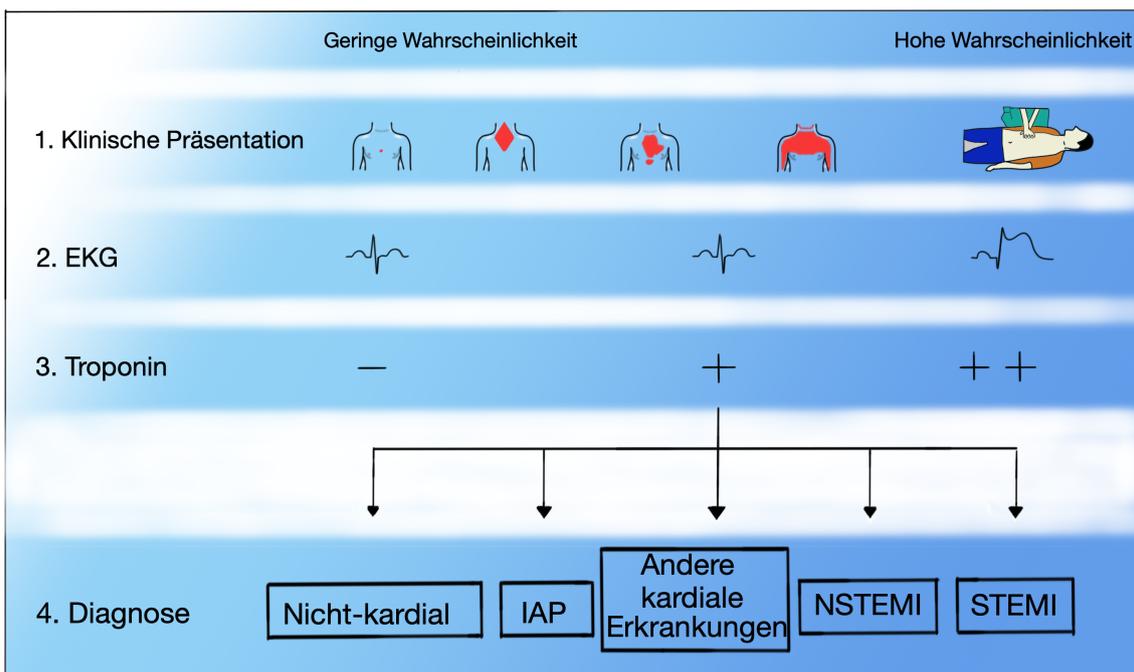


Abbildung 5: Von der klinischen Präsentation bis zur Diagnosefindung. Modifiziert nach [17].

Wie Abbildung 5 verdeutlicht ist eine klinisch geringe Wahrscheinlichkeit, ein Normalbefund des Elektrokardiogramms sowie des Troponins am ehesten als nicht-kardiale Erkrankung zu werten. Je höher die klinische Wahrscheinlichkeit und das Troponin, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit für einen vorliegenden

Herzinfarkt. STEMI und NSTEMI werden, wie der Name vermuten lässt, anhand der vorhandenen ST-Hebung im 12-Kanal-EKG differenziert.

Die instabile Angina Pectoris ist ein breiter Symptomenkomplex. Hierzu zählen mitunter jede de-novo-Angina oder eine Angina Pectoris in Ruhe, wohingegen die stabile Angina Pectoris einen starken Bezug zu Sport, spezifischen Aktivitäten oder emotionalem Stress aufweist [17].

1.3. Monozyten und monozytäre Marker

Wie eingangs erwähnt, spielen Monozyten eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose und folglich bei der Entstehung der koronaren Herzkrankheit. Im Folgenden werden Monozyten, sowie monozytäre Adhäsionsrezeptoren näher charakterisiert.

1.3.1. Morphologie und Funktion von Monozyten und Makrophagen

Blutzellen differenzieren sich klassischerweise aus zwei Zelllinien, der myeloischen sowie der lymphoiden Stammzelle [18].

Monozyten gehören zur Klasse der weißen Blutkörperchen, den Leukozyten. Dabei bilden sie eine Untergruppe der myeloischen Stammzellen und sind Teil des Immunsystems. Bei einer durchschnittlichen Bluttransitzeit von etwa 32 Stunden machen sie circa 5-10 % der Leukozyten aus [19].

Nachdem Monozyten vom Blut in das Gewebe übertreten, differenzieren sie sich zu Makrophagen und dendritischen Zellen [19, 20].

Dieses Verhalten äußern sie insbesondere während einer akuten Entzündungsreaktion zur Abwehr gegen äußere Einflüsse [21, 22].

Monozyten sind sehr heterogen und unterscheiden sich unter anderem durch ihre Größe, ihre Rezeptor-Expression und die Fähigkeit zur Differenzierung zu unterschiedlichen Zellen.

Beim Menschen werden die Monozyten anhand der Expression der Oberflächenmoleküle CD14 und CD16, die mittels Durchflusszytometrie entdeckt wurden in 3 Gruppen unterteilt:

Die klassischen CD14⁺⁺CD16⁻, die nicht-klassischen CD14⁺/CD16⁺⁺ sowie die intermediären CD14⁺⁺/CD16⁺ Monozyten [23, 24].

Die klassischen Monozyten machen 80-90 % der Monozyten aus, exprimieren C-C chemokine receptor type 2 (CCR2) und migrieren als Reaktion auf eine chemotaktische Aktivität von CC-Chemokin-Ligand-2 (CCL2) [25].

Die nicht-klassischen Monozyten zeichnen sich durch höhere Tumor-Nekrose-Faktor, sowie Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) -Klasse 2 Produktion aus [24]. Zudem sind nicht-klassische Monozyten vermehrt in Sepsis-Patienten sowie in Patienten mit akuten oder chronischen Infektionen nachzuweisen [26, 27]. Dies ist auf die erhöhte Tumor-Nekrose- Faktor-Produktion zurückzuführen.

Intermediäre Monozyten exprimieren CD16 sowie C-X3-C Motiv Chemokinrezeptor 1 (CX3CR1) und migrieren in Gewebe, welches C-X3-C Motiv Chemokine Ligand 1 (CX3CL1) exprimiert [25].

Es konnte gezeigt werden, dass intermediäre Monozyten vermehrt IL-10 produzieren und somit eine anti-inflammatorische Rolle einnehmen könnten [28]. Zudem exhibieren sie, im Vergleich zu den nicht-klassischen Monozyten, eine erhöhte phagozytotische Aktivität bei einer verminderten Antigenpräsentation [28].

Die hohe Expression von CD11b und CX3CR1-Rezeptoren lässt vermuten, dass intermediäre Monozyten eine erhebliche Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose spielen, da CD11b einerseits essenziell für die Monozytenadhäsion an das Endothel ist, andererseits LDL vermehrt an intermediäre Monozyten bindet um diese zur CD11b-Expression zu stimulieren [29, 30, 31].

Monozyten wandern zusammenfassend gen Entzündung und differenzieren zu diversen Zellen, wobei sie von diversen Chemokinen stimuliert werden und dabei selbst Chemokine und Zytokine sezernieren sowie zelleigene Rezeptoren exprimieren [32]. Ferner können Monozyten Partikel phagozytieren und im Zellinneren lysieren oder anderen Zellen, wie den T-Lymphozyten, präsentieren [33].

1.3.2. CD14

Das Glykoprotein CD14 ist ein Oberflächen-Protein, welches vor allem von Monozyten und Makrophagen exprimiert wird und via Glycosylphosphatidylinositol-Anker an die Zellmembran gebunden oder frei löslich im Blut vorzufinden ist [34].

Es ist einerseits für die Phagozytose von apoptotischen Zellen von Bedeutung, andererseits fungiert CD14 als Co-Rezeptor und augmentiert die Wirkungen von Toll-Like-Rezeptor 4 (TLR4) und Lipopolysaccharid-bindendes-Protein (LBP) bei der Detektierung von bakteriellen Lipopolysacchariden durch Monozyten und Makrophagen [35-37]. Dies führt, wie bereits beschrieben, zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine.

1.3.3. CD16

CD16 ist ein Typ 3 Fcγ-Rezeptor, welchem eine bedeutende Rolle in der Immunabwehr und in inflammatorischen Prozessen nachgesagt wird.

CD16-Rezeptoren existieren in 2 Isoformen, FcγIIIa (CD16a), sowie FcγIIIb (CD16b) [38].

Während CD16a durch Makrophagen, Mastzellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) exprimiert wird, wird CD16b durch Neutrophile exprimiert [38]. Es ist via GPI-Anker an die Zellmembran der Neutrophilen gebunden und an der Neutrophilen-Degranulation beteiligt [38].

Der CD16-Rezeptor leitet einerseits die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität, kurz ADCC durch NK-Zellen ein, andererseits interagieren CD16-Rezeptoren mit Molekülen der MHC-Klasse 1, um die Apoptose durch NK-Zellen auf Zielzellen einzuleiten [39]. Bei den Zielzellen handelt es sich dabei um Virusinfizierten-Zellen, sowie Krebszellen.

1.3.4. MIF

Der Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor, kurz MIF, initial als von T-Lymphozyten sezerniertes Protein beschrieben, welches die Migration von Makrophagen mehr oder minder willkürlich inhibiert [40-42], wird nach aktuellem Stand als ein komplexeres, pleiotropes Zytokin beschrieben, welchem

mannigfaltige Aufgaben zuteilwerden. Im Laufe der Zeit konnte nachgewiesen werden, dass MIF nicht nur von T-Lymphozyten, sondern mitunter auch von Monozyten, Makrophagen, und Endothelzellen produziert wird [43, 44].

MIF wirkt proinflammatorisch und spielt eine entscheidende Rolle in der toxischen Antwort auf Endotoxämie und etwaigem septischem Schock [45]. Ferner kann MIF die Glukokortikoid-medierte Inhibition der Zytokin-Sekretion durch Lipopolysaccharide aufheben [46].

MIF wird durch Tumor Nekrosefaktor Alpha (TNF-alpha) stimuliert, woraufhin MIF-stimulierte Makrophagen TNF-alpha sezernieren und zur Entzündungsreaktion beitragen [43].

Zudem konnte nachgewiesen werden, dass MIF eine tragende Rolle bei diversen inflammatorischen Krankheiten spielt, beispielsweise bei der juvenilen idiopathischen Arthritis, der rheumatoiden Arthritis und rheumatoiden Vaskulitis, der Psoriasis und der Atherosklerose, welche aus gegebenem Anlass im Folgenden genauer erörtert wird [47-49].

1.3.4.1. Die Rolle des MIF's in der Atherosklerose

Mehrere Studien belegen die Rolle von MIF in der Pathogenese und Progression der Atherosklerose. Im Jahr 2002 konnten Burger-Kentischer et al. nachweisen, dass MIF auf niedrigem Niveau sowohl in den vaskulären Endothelzellen als auch in den glatten Muskelzellen der Arteria Mammaria Interna mit einer normalen Histologie aufzufinden ist. Viel wichtiger ist jedoch die Tatsache, dass MIF während der Progression der Atherosklerose hochreguliert wird [50].

Oxidiertes LDL führte zur Erhöhung der MIF-Sekretion in Makrophagen. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass MIF die Expression des Interzellulären Zelladhäsionsmolekül 1 hochreguliert [51, 52]. Somit kann darauf zurückgeschlossen werden, dass unter anderem oxidiertes LDL für die Migration von Makrophagen in die Gefäßwand und für die Umwandlung von Makrophagen zu Schaumzellen via MIF verantwortlich ist.

Wie eingangs beschrieben wird MIF auch durch TNF-alpha stimuliert. Es folgt ein positives Feedback, wodurch MIF-stimulierte Makrophagen proinflammatorische Zytokine sezernieren.

Apolipoprotein E-defiziente Mäuse, welche mit Anti-MIF-Antikörpern behandelt wurden, zeigten in einer weiteren Studie einen stark reduzierten Makrophagen-Gehalt in den Läsionen und führten zu deutlich niedrigeren Werten von zirkulierenden und lokalen inflammatorischen Mediatoren [53]. Zudem sank die Konzentration der inflammatorischen Zytokine wie IL-6 und Fibrinogen [53].

Das Plaque-Volumen senkte sich hierbei nicht statistisch signifikant [53].

Chen et al. zeigten verminderte vaskuläre Inflammation, zelluläre Proliferation und neointimale Verdickung bei post-angioplastischen Mäusen, welche zuvor mit Anti-MIF-Antikörpern behandelt wurden [54]. Somit wird die Rolle des MIFs in der Arteriosklerose nochmals bestätigt.

Berhagen et al. konnten zeigen, dass die Blockade von MIF zu einer Regression der prä-existierenden atherosklerotischen Plaque in Apoe^{-/-} Mäusen führte. Zudem nahm die Makrophagen und T-Zell Dichte ab, welches schlussendlich zu einer stabileren Plaque führte [55].

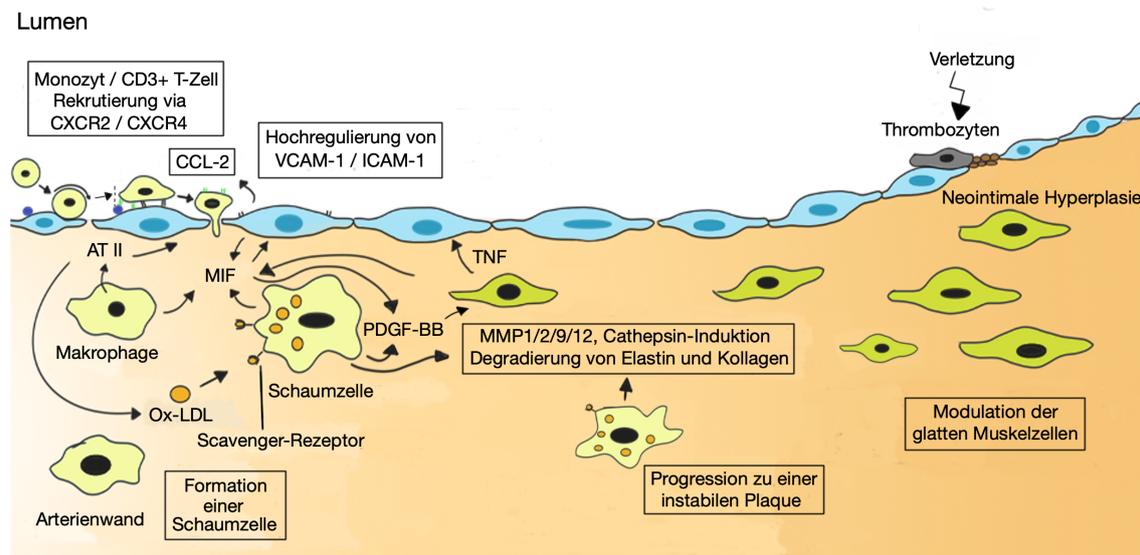


Abbildung 6: Zelluläre Mechanismen von MIF in der Atherogenese: MIF wird durch diverse pro-atherogene Stimuli in den Endothelzellen oder den intimalen Makrophagen stimuliert. MIF kann wiederum endotheliale Zelladhäsionsmoleküle hochregulieren sowie die jeweiligen Integrin-Rezeptoren aktivieren. Folglich werden mononukleäre Zellen rekrutiert, die Transformation von Makrophagen zu Schaumzellen eingeleitet sowie die Migration von glatten Muskelzellen inhibiert. Durch die Fähigkeit zur Elastin- und Kollagendegradierung wird schlussendlich die Progression zur instabilen Plaque dirigiert. (VCAM-1 – vascular cell adhesion molecule, ICAM-1 – intracellular

cell adhesion molecule, CCL-2 – CC-chemokine ligand 2, Ox-LDL – oxidiertes LDL, PDGF-BB – platelet derived growth factor-BB, MMP – matrix metalloproteinase). Modifiziert nach [56].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass MIF eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose zuzuordnen ist. MIF ist entscheidend für die Rekrutierung der Entzündungszellen, die Umwandlung der Makrophagen zu Schaumzellen als auch für die Stabilität und Zusammensetzung der atherosklerotischen Plaque.

Die Rolle des MIF's beim akuten Koronarsyndrom ist Gegenstand aktueller Forschungen. Erste Studien zeigten erhöhte MIF-Konzentration bei ACS-Patienten mit culprit lesions, welche zu Plaque-Rupturen führten [57].

Ob MIF somit als prognostischer Marker für Plaque-Instabilitäten und dem ACS dienen kann konnte bisher nicht abschließend beantwortet werden [58].

1.3.5. Gremlin-1

Gremlin-1 ist ein Protein, welches der DAN/Cerberus-Proteinfamilie zugehörig ist [59]. Diese ist wiederum Teil der Cystinknoten-Protein Superfamilie [60].

Die Superfamilie verbindet, wie der Name bereits vermuten lässt, ihre charakteristische Struktur. Ihr sind unter anderem die TNF- α -, die Transforming growth factor β (TGF- β)-Familie und die Platelet Derived Growth Factor (PDGF) zugehörig [61].

Erste Erwähnung fand Gremlin-1 als Rattenhomologen Drm (down-regulated in v-mos transformed cells), welches von Topol et al. im Jahre 1997 beschrieben wurde. Hierbei fiel auf, dass Zellen, welche durch retrovirale Onkogene wie das Moloney Murine Sarcoma Virus (MSV) behandelt wurden, die drm-Gen-Expression supprimierten. Zudem zeigte sich, dass Zellen mit hoher drm-mRNA Expression die Apoptose einleiteten [62].

Bei den Zellen mit hoher Drm-Gen Expression handelte es sich um Zellen des Gehirns, der Milz, der Nieren und der Hoden wobei eine kaum vorhandene bis geringe Expression im Herzen, der Leber und der Skelettmuskulatur festgestellt wurde [62]. Spezifischer handelte es sich bei den Zellen mit hoher drm-mRNA

Expression um endständig differenzierte, nicht-teilende Zellen, unter anderem Neuronen, Typ 1 Zellen der Lunge und um Becherzellen des Darms [62].

Dies Erkenntnisse ließen schlussfolgern, dass drm eine wichtige Rolle im Zellzyklus-, Zellwachstum und Zelldifferenzierung zuzuschreiben ist.

Die Cystinknoten-Protein Superfamilie und somit Gremlin-1 zeichnen sich durch ihre Eigenschaft bone morphogenetic proteins (BMP) inhibieren zu können aus. BMP-2, BMP-4 und im geringeren Maße BMP-7 sind hierbei die bekanntesten [59, 63].

Dabei ist die Gremlin-1 abhängige Inhibierung der BMP's von hoher Bedeutung für die Embryogenese und Organogenese, vor allem für die Entwicklung der Lunge, der Niere sowie der Glieder [64-67].

Gremlin-1 werden jedoch auch andere Aufgaben zu teil. Darunter fallen unter anderem die Stammzell-, und Zelldifferenzierung, Monozytenmigrationsinhibition, sowie die vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) -abhängige Förderung der Angiogenese [68-70]. Diese Eigenschaften lassen bereits vermuten, dass Gremlin-1 auch in der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt sein könnte, welches im Folgenden erläutert wird.

Des Weiteren wurden Zusammenhänge zwischen einer erhöhten Gremlin-1-Konzentration und Leberzirrhose in Mäusen, diabetischer Retinopathie und tubulointerstitieller Fibrose in der diabetischen Nephropathie gefunden [71-73].

1.3.5.1. Gremlin-1 in der Atherosklerose

Eine Studie von Chang et al. zeigte, dass Gremlin-1 und weitere BMP-Antagonisten von Endothelzellen der Maus-Aorta und humanen Herzkrankgefäßen ausgeschüttet wurden, welche Scherkräften ausgesetzt waren, um eine überschießende Entzündungsreaktion via negativem Feedback-Mechanismus im Zaum zu halten [74]. Dies führt zu dem Rückschluss, dass Gremlin-1 eine bedeutende Rolle in der Entzündungsreaktion und Atherosklerose zuzuschreiben ist.

Diese These wurde von Müller et al. belegt, indem folgende Aspekte dargelegt wurden: Gremlin-1 wird von Monozyten/Makrophagen in atherosklerotischen Plaques stark exprimiert. Zudem inhibiert Gremlin-1 sowohl die Monozyten-Differenzierung als auch die TNF-alpha Sekretion von Makrophagen, welche von MIF stimuliert wurden. Dabei bindet Gremlin-1 mit hoher Affinität an MIF. Prolongierte Administration von rekombinantem Gremlin-1 reduziert den Monozyten/Makrophagen-Gehalt von atherosklerotischen Plaques und vermindert die Läsionsbelastung in ApoE^{-/-}-Mäusen [75].

Gleichzeitig wurde auch die eben erwähnte Interaktion zwischen Gremlin-1 und MIF erstmalig entdeckt, beschrieben und in einer weiteren Studie ausgeführt. Diese Studie zeigte, dass das Grem-1/MIF-Verhältnis sowohl mit dem Schweregrad der koronaren Herzkrankheit als auch mit der Plaque-Stabilität korreliert [76].

In den einzelnen Gruppen zeigten gesunde Probanden den höchsten Grem-1/MIF-Quotienten, gefolgt von Patienten mit einer stabilen Angina Pectoris und dem akuten Koronarsyndrom mit dem niedrigsten Quotienten [76]. Die einzelnen Gruppen des akuten Koronarsyndrom zeigten folgende Quotienten in absteigender Reihenfolge: Instabile Angina Pectoris, NSTEMI, STEMI [76].

Zudem wurde ersichtlich, dass der Grem-1/MIF-Quotient mit angiographischen Zeichen der intrakoronaren Thrombuslast in Relation zu setzen ist. Dabei bestand eine inverse Korrelation von Grem-1/MIF zur Thrombuslast. Patienten mit hohem Quotienten zeigten eine geringere Thrombuslast als Patienten mit niedrigem Quotienten [76].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Gremlin-1 mehr oder minder den Counterpart zu MIF darstellt. Während MIF die Einwanderung der Entzündungszellen in die Intima fördert, hält Gremlin-1 diese unter Kontrolle. Die Plaque-Zusammensetzung wird von Gremlin-1 vermindert. Auch die von MIF induzierte Differenzierung von Makrophagen zu Schaumzellen wird von Grem-1 inhibiert. Die Zusammenschau lässt darauf schließen, dass Grem-1, im Gegensatz zu MIF, dem Progress der Atherosklerose entgegenwirkt und somit einen positiven Einfluss auf die koronare Herzkrankheit ausübt.

1.3.6. BMP

Knochenmorphogenetische Proteine, kurz BMP, vom Englisch abgeleiteten „bone morphogenetic proteins“ sind Mitglieder der TGF- β -Familie, welche, wie bereits zuvor beschrieben, der Cystinknoten-Protein Superfamilie angehören [77]. Ihnen werden wichtige Aufgaben zuteil, vor allem bei der embryonalen Entwicklung diverser Organe wie der Lunge, der Niere und des Herzens [78].

Im Jahre 1965 beschrieb Urist erstmalig die Fähigkeit demineralisierter Knochenmatrix die Bildung von Knochen induzieren zu können, welche zuvor unter der Tierhaut oder in die Muskeln von diversen Tieren injiziert wurden [79]. Nachdem ein dazugehöriges Glykoprotein gefunden wurde, erhielt es den Namen „bone morphogenetic protein“ [80].

Wozney et al. isolierten humane, komplementäre DNS (cDNA) vom gereinigten Rinderknochen und taufte diese BMP-1, BMP-2a und BMP-3. Bis auf BMP-1 wurden diese der TGF-beta Familie zugeordnet [77]. Nachdem die isolierten Proteine in Versuchstieren implantiert wurden, produzierten diese jeweils unabhängig voneinander de novo Knorpelgewebe als auch Knochen [81].

Mehr als 20 verschiedene BMP's mit teils unterschiedlichen Funktionen konnten seither nachgewiesen werden [78].

BMP's lassen sich basierend auf ihrer Aminosäuresequenzen in Subgruppen unterteilen. Eine Subgruppe bildet BMP-2 und BMP-4, während BMP-7 in einer weiteren Subgruppe mit BMP-5, -6 und -8 eingegliedert ist. Die dritte Gruppe

bildet BMP-12, -13, -14 (GDP-5, -6, -7) und zuletzt die vierte Gruppe bestehend aus BMP-9, sowie -10 [82, 83].

1.3.7. BMP-2

Das BMP-2 Gen befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosom 20 (20p12) und zeigt eine 80-prozentige Aminosäuresequenz-Übereinstimmung mit BMP-4, weshalb es zur selben Subgruppe kategorisiert wird [84].

Eine Studie mit BMP-2/-4-Einzel Knockout-Mäusen, sowie Doppel-Knockout-Mäusen belegte schwere Achondroplasien unter BMP-2 Mangel, jedoch geringere Knorpelmissbildungen unter einem BMP-4-Mangel [85].

Des Weiteren ist BMP-2 essenziell für die Frakturheilung, wie eine Studie an BMP-2-defizienten Mäusen belegte, weshalb rekombinant hergestelltes BMP-2 (rhBMP-2) therapeutisch genutzt wird [86]. Studien belegen, dass rhBMP-2, welches zur Heilung von offenen Tibiaschaftfrakturen eingesetzt wurde, zu einer geringeren Anzahl an Knochentransplantation und Zweiteingriffen, sowie zu einer geringeren Rate an Infektionen führte [87].

Auch abseits des Knochen-, und Knorpelgewebes werden BMP-2 wichtige Aufgaben zuteil.

In experimentellen Mäusen führte defizientes BMP-2 unter anderem aufgrund von Herzfehlbildungen zur embryonalen Letalität [88]. Es ist essenziell für die regelhafte Entwicklung der Herzklappen, Septen sowie für das vierkammerige Herz [89].

1.3.7.1. BMP-2 in der Atherosklerose

Bostrom et al. gingen der Frage auf den Grund, ob arterielle Kalzifikation durch einen vergleichbaren Prozess wie die Knochenformation entstehe. Dazu untersuchten sie kalzifizierte Plaques und konnten die Expression von BMP-2 nachweisen [90]. Zudem konnte gezeigt werden, dass bei kalzifizierten Rinder-Gefäßzellen, welche zuvor mit BMP-2 behandelt wurden, die Kalzifizierung dosisabhängig zunahm [91].

BMP-2, welches von Endothelzellen unter anderem aufgrund von Hypoxie, oxidativem Stress oder turbulentem Blutfluss produziert wird, induziert die Differenzierung von glatten Muskelzellen zu einem osteoblastischen Phänotyp [92]. Zudem ist BMP-2 auch an der Migration der glatten Muskelzellen von der Media in die Intima, vermutlich via Aktivierung durch Myosin Va, beteiligt [93].

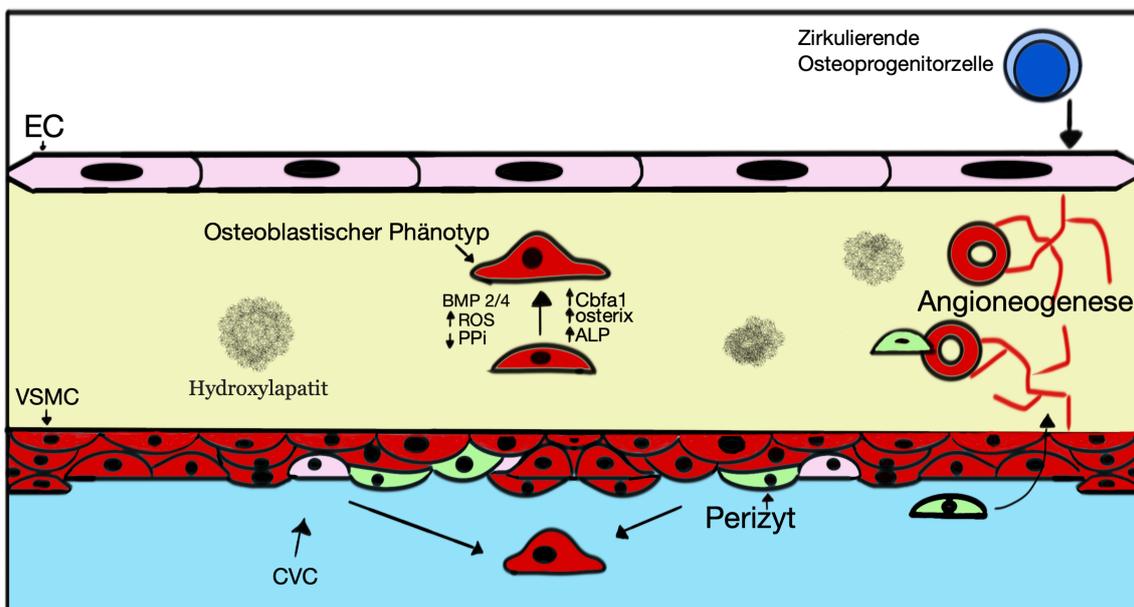


Abbildung 7: Differenzierung via BMP2/4-Mechanismus: Hier wird die Differenzierung von glatten Muskelzellen via BMP2/4 zu einem osteoblastischen Phänotyp verdeutlicht. BMP2 wird durch Endothelzellen unter anderem aufgrund von Hypoxie, oxidativem Stress oder turbulentem Blutfluss produziert. BMP4 hingegen wird von Schaumzellen nach Stimulation durch oxLDL produziert. (CVC=calcifying vascular cells, VSMC= vascular smooth muscle cells, EC=endothelial cells, ROS=reactive oxygen species, PPI=inorganic pyrophosphatase, Cbfa1= Core binding factor α 1, ALP=alkaline phosphatase). Modifiziert nach [92].

1.3.8. BMP-4

Das BMP-4 Gen, welches eine 80% Aminosäuresequenzhomologie zu BMP-2 aufweist, befindet sich auf dem langen Arm des Chromosom 14 (14q22) [84].

Das in der Drosophila vorhandene decapentaplegic Genprodukt (dpp), welches für seine Beteiligung in der Bildung des dorsalen Ektoderms in der frühen Embryonalphase sowie in der Entwicklung des viszeralen Mesoderms bekannt

ist, weist eine strukturelle Ähnlichkeit zu BMP-2/BMP-4 auf und wurde hinsichtlich dieser untersucht [94]. Dabei zeigten experimentelle Studien an Fliegen mit dpp-Mangel, dass humane BMP-4-Transgene die embryonale Entwicklung aufrechterhalten konnten und ein Fehlen des Transgens zum Tode führte [94]. Die Wichtigkeit von BMP-4 für die Gastrulation und Mesoderm-Entwicklung ließ sich auch an BMP-4-defizienten Mäusen nachweisen.

Auch in der Entwicklung des Auges ist BMP-4 unumgänglich. Im Tierversuch führte eine BMP-4 homozygote Null-Mutation zu einer fehlenden Linseninduktion, die durch eine BMP-4 Substitution wieder rückgängig zu machen war [95].

Bei der Onkogenese scheint BMP-4 abhängig vom Tumortyp unterschiedliche Wirkungen zu entfalten.

In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass die BMP4-Konzentration in Patienten mit einem Barrett-Ösophagus erhöht war, weshalb die These aufgestellt wurde, dass BMP-4 in der Transformation vom mehrschichtigen Plattenepithel zum einschichtigen Zylinderepithel beteiligt ist [96, 97].

Bei einem speziellen Phänotyp (A549) pulmonaler Adenokarzinome führte BMP-4 hingegen zur Zellseneszenz, verringertem Zellwachstum und einer geringeren Telomerase Aktivität [98].

1.3.8.1. BMP-4 in der Atherosklerose

BMP-4, besitzt wie BMP-2 die Fähigkeit, die Differenzierung von glatten Muskelzellen zu einem osteoblastischen Phänotyp einzuleiten. Dabei wird es im Gegensatz zu BMP-2 nicht nur durch Endothelzellen, sondern auch durch Schaumzellen produziert [92].

Es konnte eine erhöhte Expression von BMP-4 an Endothelzellen, welche einem erhöhten turbulenten Blutfluss ausgesetzt waren, nachgewiesen werden, wohingegen ein laminarer Blutfluss keine erhöhte Expression nach sich zog [99]. Überdies konnte eine BMP-4-Expression ausschließlich an Endothelzellen der Herzkrankgefäße nachgewiesen werden, welche den atherosklerotischen Plaques mit beinhalteten Schaumzellen auflagen [99].

Weiterhin zeigten Sorescu et al., dass BMP-4 auch an der Monozytenadhäsion an die Endothelzellen beteiligt ist und somit insgesamt zur Progression der Atherosklerose beiträgt [99].

Wie bereits ausgiebig bei der Funktion des Gremlin-1 beschrieben, führt die Inhibierung der BMP's zur Reduzierung der atherosklerotischen Plaque, der Entzündungsreaktion als auch zur Reduzierung der intimalen Kalzifikation. Dies bestätigte sich auch unter Expression vom Matrix Gla Protein (MGP), einem weiteren BMP-Inhibitor [100].

1.3.9. BMP-7

BMP-7 befindet sich auf dem langen Arm des Chromosom 20 (20q13) und weist strukturelle Ähnlichkeiten zu BMP-5, -6 und -8 auf [84]. Dementsprechend sind diese zusammen in einer Gruppe aufzufinden.

Dudley et al. belegten die Rolle des BMP-7 in der Entwicklung der Nieren sowie der Augen [101]. Dabei zeigte sich im Mäuse-Embryo, dass der BMP7-Mangel initial kompensiert wird. Im Laufe der Schwangerschaft konnten Augen-, sowie Nierendefekte nachgewiesen werden. Die meisten Mäuse starben am ersten postnatalen Tag, vermutlich aufgrund eines Nierenversagens. Einzelne, wenige überlebten zwei bis zehn Tage.

Dies zeigt, dass BMP-7-Defekte, im Gegensatz zu Defekten im BMP-2 und -4-Gen, nicht embryonal letal, sondern durch Organdefekte gekennzeichnet sind.

1.3.9.1. BMP-7 in der Atherosklerose

BMP-7 wird im Gegensatz zu BMP-2 und BMP-4 oftmals eine anti-entzündliche Wirkung nachgesagt. In einem Zellkultursystem zeigte sich, dass die M2-Makrophagenzahl nach BMP-7-Inokulation zunahm, wobei gleichzeitig die Zahl der pro-inflammatorischen Zytokine wie IL-6, Tumor Nekrosefaktor Alpha (TNF-alpha) und dem Monozyten-Chemotaxis-Protein 1 (MCP-1) abnahm [102]. Den M2-Makrophagen wird eine anti-inflammatorische Funktion nachgesagt [103].

Die beschriebene Reduktion der MCP-1-Expression führt zur geringeren chemotaktischen Wirkung auf die Monozyten.

Andererseits zeigte eine weitere Studie, dass M2-Makrophagen nach Aufnahme von oxidiertem LDL durch pro-inflammatorische, statt herkömmlich anti-inflammatorischer Attribute hervorstechen [104].

Die bei BMP-2 und BMP-4 aufgeführte Differenzierung von glatten Muskelzellen zu einem osteoblastischen Phänotyp, welche zum Progress der Kalzifikation und Atherosklerose beiträgt, wird durch BMP-7 vermindert [105].

Hingegen stellte eine weitere Studie die These auf, dass die in den atherosklerotischen Plaques vorhandenen Makrophagen nach Stimulation durch BMP7 tissue factor (TF) bilden, welches maßgeblich zur Thrombogenität beiträgt [106].

Die Fülle an Funktionen der BMP's stößt eine Diskussion über die Namensänderung von bone morphogenetic protein zu body morphogenetic protein an, wobei das Akronym unverändert bleiben könnte [107].

1.4. Fragestellung dieser Arbeit

Die monozytären Antikörper MIF, Grem-1, BMP-2, BMP-4 und BMP-7 weisen vielfältige Funktionen in der Embryogenese und Organogenese auf. Auch in der Pathogenese der Atherosklerose zeigen sich diverse Funktionen, zum Teil pro-, zum Teil anti-inflammatorische. Studien zeigen gegensätzliche Resultate, weshalb die letztendliche Aufgabe der Antikörper bisher nicht gänzlich entschlüsselt werden konnte.

In dieser Studie wird die Antikörperkonzentration in den verschiedenen Subtypen der Monozyten 24 Stunden prä-, oder post-Koronarintervention gemessen, um einen möglichen Zusammenhang dieser zu der Entstehung, Progression, Differenzierung und zur klinischen Ausprägung des akuten Koronarsyndrom und der stabilen Angina Pectoris zu beschreiben. Dabei lautet die Hypothese, dass die Konzentration sich bei der SAP im Vergleich zu der ACS unterscheidet.

Weiterhin wird untersucht, ob ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den kardiovaskulären Risikofaktoren, der Prämedikation, sowie der Antikörperkonzentration in den beiden Gruppen aufzufinden ist.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Materialien zur Blutentnahme

Tabelle 1: Materialien zur Blutentnahme und Blutaufbereitung

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Safety-Multifly-Kanüle	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette 9 ml EDTA	
S-Monovette 8,5 ml CPDA	
Universal 32R V3.01 Zentrifuge	Hettich AG, Bäch, Schweiz
Round-Bottom Tube 5 ml Polystyrene	BD Falcon™, Franklin Lakes, USA
eppendorf Reference 100-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
eppendorf Research 100-1000µl	
eppendorf Research 10-100µl	
eppendorf Research 0,5-10µl	
eppendorf 20 µl	
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	
Safe-Lock Tubes 0,5 ml	
Pipettenspitzen Blau 100-1000 µl	ratiolab GmbH, Dreieich, Deutschland
Spitzen 10 µl farblos	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland

2.1.2. Antikörper

Tabelle 2: Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Hersteller
MIF	MIF conjugated to FITC	biorbyt, Cambridge, England

Gremlin	Gremlin 1 antibody (FITC)	biobyte, Cambridge, England
BMP2	BMP2 Polyclonal Antibody, FITC Conjugated	Bioss, USA
BMP4	Anti-BMP4-antibody	abcam, Cambridge, England
BMP7	Milli-Mark Anti-BMP-7-FITC Antibody	Milli-Mark/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
CD14	Human CD14 PE-conjugated Antibody	R&D Systems, Minneapolis, USA
CD16	Human FC gamma RIII (CD16) APC-conjugated Antibody	R&D Systems, Minneapolis, USA

2.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
Paraformaldehyd	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Lysepuffer	BD FACS™ Lysing Solution, Franklin Lakes, USA
Dulbecco's PBS 500 ml	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Sodium Hydroxide (NaOH) 10 mol/l	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure Maßlösung 6 M	

Herstellung verwendeter Reagenzien:

Paraformaldehyd (PFA) 0,5 %: Zur Herstellung von PFA 0,5 % werden zunächst 5 g PFA in 400 ml PBS gelöst und 40 ml NaOH hinzugegeben. Anschließend erfolgt die Erhitzung des Gemisches auf 65°C bis dieses sich unter ständigem Rühren vollständig aufgelöst hat. Nachdem sich das Gemisch abgekühlt hat, wird es mit 1 mol/l Salzsäure auf einen pH von 7,4 titriert und zur Sterilfiltration mittels 0,2µ-Filter gereinigt. Letztendlich wird die Lösung bei 20°C gelagert. Vor

Gebrauch wird die Lösung mit PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt und zur Monozyten-Färbung verwendet.

2.1.4. Materialien für die Durchflusszytometrie

Tabelle 4: Materialien für die Durchflusszytometrie

Materialien	Hersteller
BD FACS Calibur TM Flow Cytometer	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Cell Quest Pro	
FACS Rinse	
FACS Clean	

2.1.5. Statistische Datenauswertung

Zur Statistischen Auswertung wurde die bis dato aktuellste Version der Statistik-Software IBM SPSS Statistics 25 verwendet.

2.2. Methoden

2.2.1. Blutentnahme und Blutaufbereitung

Zunächst erfolgt die Blutentnahme 24 Stunden prä- oder post-Koronarangiographie mithilfe eines Blutentnahme-Sets und den in Tabelle 1 aufgelisteten Materialien. Das entnommene Blut wird in Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin (CPDA)- Monovetten gefüllt und dient der Durchflusszytometrie.

2.2.2. Monozyten-Färbung

Die Monozyten-Färbung erfolgt nach Gewinnung von 150µl CPDA Vollblut und Überführung in nach Antikörpern beschriftete Reaktionsröhrchen. Diese werden zunächst jeweils mit 10 µl CD14 PE und 10 µl CD16 APC-Antikörpern befüllt.

Anschließend erfolgt die Hinzugabe von 10 µl der jeweiligen Antikörper in die jeweiligen Röhrchen mit anschließendem vortexen und 30-minütigem inkubieren im Dunkeln.

Nach Erythrozyten-Lysierung mittels Lysepuffer erfolgt eine erneute 10-minütige Inkubation mit anschließender Abzentrifugation (1400rpm, 9/9 für 5 min) und Abkippung des Überstandes.

Das Zell-Pellet wird mit 300 µl 0,5 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert und im Kühlschrank aufbewahrt oder sofort zur Durchflusszytometrie verwendet.

2.2.3. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Differenzierung, Charakterisierung und quantitative Messung der zu untersuchenden Zellpopulationen. Diese passieren als Einzelzellen einen Laserstrahl im rechten Winkel, um die Lichtstreuung jener als Vorwärtsstreulicht im flachen, und als Seitwärtsstreulicht im rechten Winkel zu detektieren. Das Vorwärtsstreulicht korreliert mit der Größe der Zellen, wohingegen das Seitwärtsstreulicht von der Granularität und Zellkernstruktur dieser abhängig ist [108].

Das weitere Bestreben der spezifischeren Differenzierung bietet der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen, die zellspezifische Strukturen detektieren. Hierbei richten sich fluoreszenzgekoppelte Antikörper gegen bestimmte Oberflächenmoleküle wie die Proteine der CD-Klassifizierung. Das entsprechend ihres Fluoreszenzfarbstoffes emittierte Licht wird detektiert und in elektrische Ströme sowie digitale Signale umgewandelt, die vom Computer verarbeitet werden [108, 109].

Folgende Flurochrome dienen der Detektion: Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und Allophycocyanin (APC). Die Emission eines grün-gelben Lichtes von FITC liegt bei ca. 525 nm im Vergleich zum orangen Licht von PE bei ca. 575 nm unter einer Anregungswellenlänge von 488 nm durch das blaue Licht eines Argon-Lasers [109].

Das Anregungsspektrum von APC liegt hingegen bei 633nm bei einem Emissionsmaximum von 660 nm [110].

Zur Detektion folgender Antikörper wurden FITC-markierte Antikörper verwendet: MIF, Grem-1, BMP2, BMP4 und BMP7. Darüber hinaus dienen PE-markierte Antikörper zur Detektion von CD14-positiven Zellen, sowie APC-markierte Antikörper zur Detektion von CD16-positiven Zellen.

Das hier verwendete BD FACS Calibur TM Flow Cytometer besitzt einen 480 nm Argon-Laser. Zudem besitzt es aufgrund seiner vier Fluoreszenz-Detektoren die Möglichkeit, vier Fluoreszenzfarbstoffe simultan zu messen [110]. Die Zellerfassungsrate beträgt dabei 300 Zellen pro Sekunde [111].

2.2.4. Messprotokoll

Das Messprotokoll beinhaltet eine Isotyp-Kontrolle, eine FMO (Fluorescence-minus-one) -Kontrolle zur genaueren Abschätzung des Signals trotz mehrerer Farben, sowie eine technische Kontrolle. Mithilfe dessen erfolgt die Erschließung und Auswertung der Daten. Die Messanzahl wurde hierbei auf 10.000 Ereignisse beschränkt.

2.2.5. Auswertungen der Messungen

Um die für diese Arbeit relevanten Monozyten isoliert und unter Ausschluss von nicht relevanten Zellen, wie den Erythrozyten und Thrombozyten darzustellen, wurden die Monozyten anhand eines Gates eingegrenzt. Diese Gates können nach Auswertung individuell angepasst werden. Mithilfe der verwendeten Antikörper CD14 und CD16 erfolgt die Klassifizierung der Monozyten in die drei benötigten Gruppen: Die klassischen CD14⁺⁺CD16⁻, nicht-klassischen CD14⁺/CD16⁺⁺ sowie die intermediären CD14⁺⁺/CD16⁺ Monozyten.

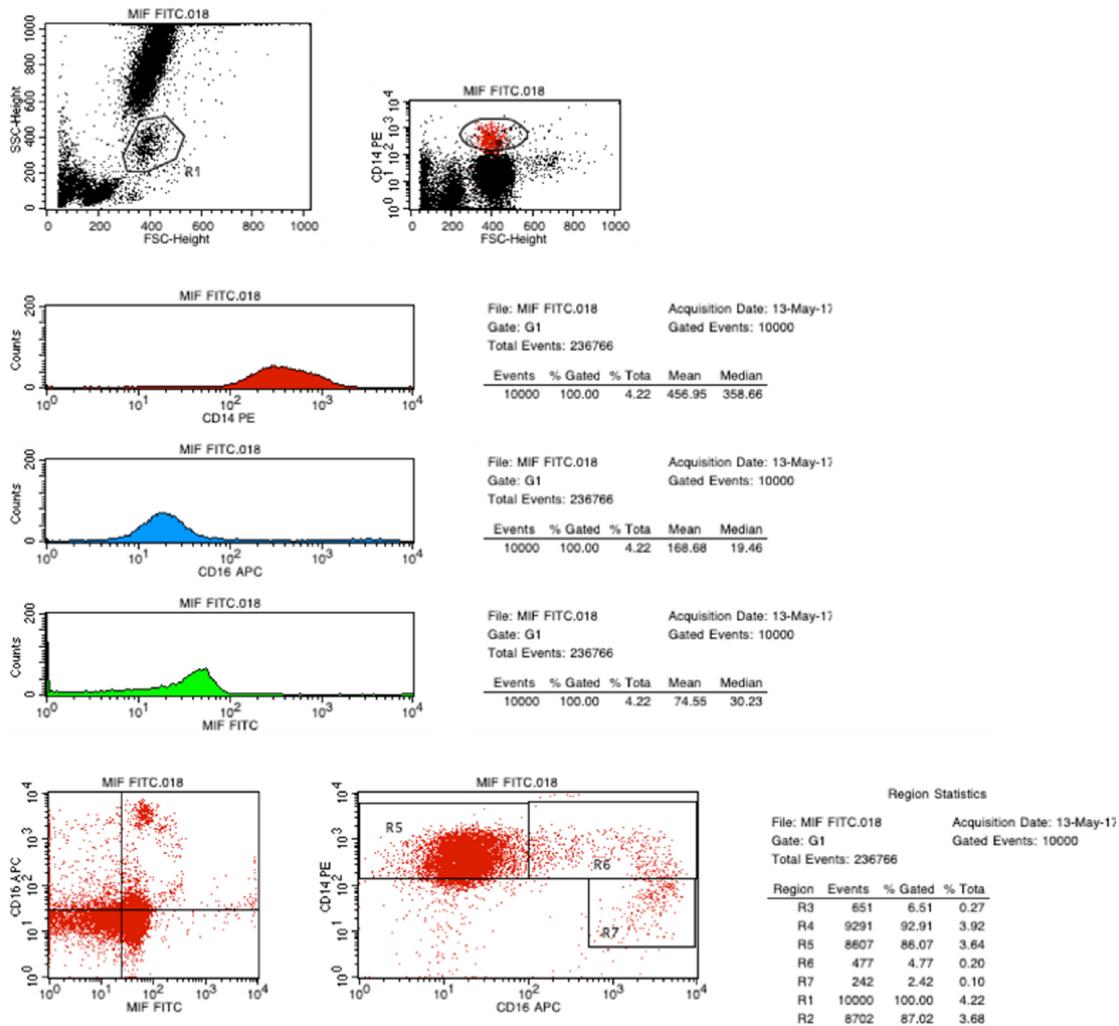


Abbildung 8: Beispielhafte durchflusszytometrische Messung zur Bestimmung der MIF-Konzentration

Fortan werden die Daten in Flowjo Software Version v10 überführt, um diese innerhalb einer MIF Workspace zu bearbeiten. Auch hier besteht die Möglichkeit zur Isolierung relevanter Daten und individueller Anpassung der Daten.

Die Verwendung diverser Fluorochrome führt zur Überlappung mehrerer Fluoreszenzspektren. Um die Fluoreszenzfarbstoffe isoliert betrachten und beurteilen zu können, kann zur Kompensation jeweils ein Fenster um eine wolkenartige Ansammlung von Zellen gelegt werden. Dies führt zur Kompensation der Farbsignale [108].

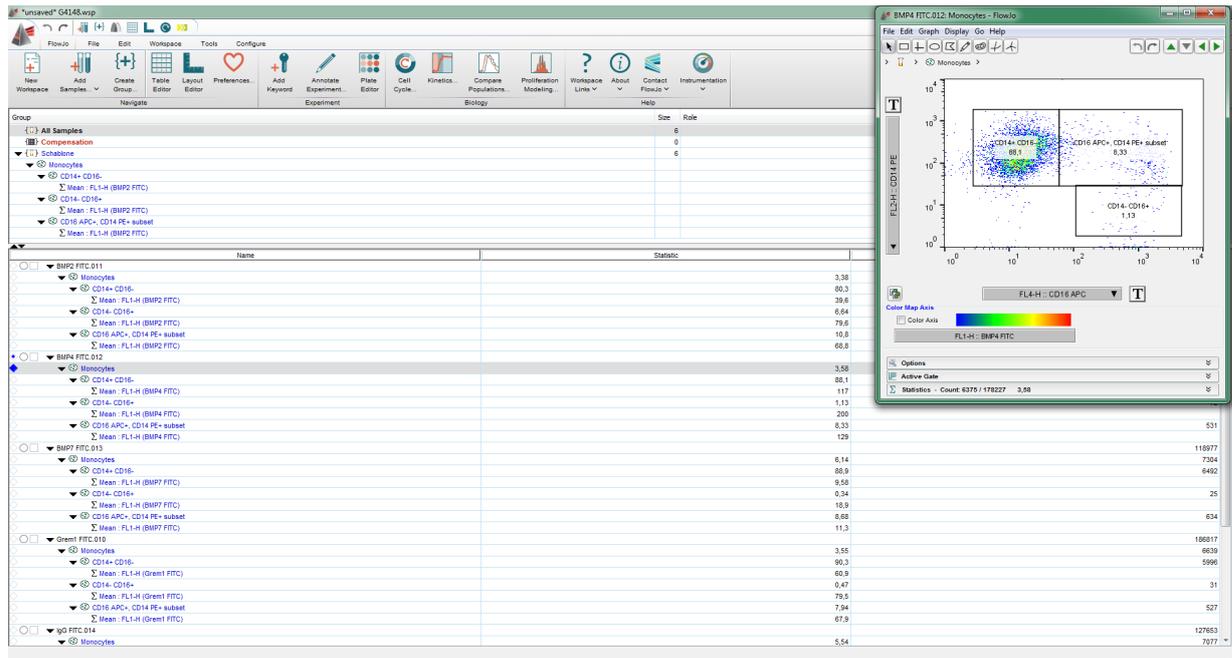


Abbildung 9: Beispielhafte Auswertung mittels FlowJo

Anhand der mean fluorescence intensity (MFI) erfolgte die Quantifizierung der Oberflächenrezeptorexpression.

2.2.6. Auswahl und Basischarakteristika des Patientenkollektivs

Als Prämisse wurden der klinische und/oder der laborchemische Verdacht eines akuten Koronarsyndroms oder einer stabilen Angina Pectoris festgelegt.

Hierbei erfolgte der Einschluss innerhalb eines Zeitintervalls von 24 Stunden prä- bis 24 Stunden post-Koronarintervention. Als Ausschlusskriterium wurden hochgradige Klappenvitien definiert.

Die Basischarakteristika werden aus den Patientenakten beim Einschluss in die Studie entnommen. Diese bilden sich wie folgt:

Tabelle 5: Basischarakteristika

Diagnose/Verdachtsdiagnose	NSTEMI, STEMI, SAP, IAP
Demographische Daten	Alter, Geschlecht
KHK bei Aufnahme unterteilt wie folgt:	Keine, Ein-Gefäß, Zwei-Gefäß, Drei-Gefäß, Bypass
Ejektionsfraktion untergliedert wie folgt:	<ul style="list-style-type: none"> • keine Einschränkung der LV-Funktion: Ejektionsfraktion (EF) \geq 55 % • leichtgradige Einschränkung der LV-Funktion: EF von 45 % - 54 % • mittelgradige Einschränkung der LV-Funktion: EF von 35 % - 44 % • hochgradige Einschränkung der LV-Funktion: EF $<$ 35 %
Aufnahmelabor	CRP, CK, NTproBNP, Troponin, Kreatinin
Aufnahmemedikation	β -blocker, ACE-Hemmer, AT1-Antagonist, Diuretika, ADP-Rezeptorblocker, Marcumar/Xarelto, GPIIb/IIIa-Inhibitor, ASS, Cholesterin-senker, Aldosteronantagonist, Anti-diabetika, CA-Kanalhemmer
Kardiovaskuläre Risikofaktoren	Arterielle Hypertonie, Diabetes Mellitus, Hyperlipidämie, positive Familienanamnese, Nikotin, Niereninsuffizienz

Es liegt ein gültiges Votum von der Ethikkommission für das vorliegende Studienkonzept mit folgender Nummer vor: 270/2011B01.

2.2.7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen und ermittelten Daten wurde mittels SPSS Statistics 25 durchgeführt.

Wie bereits erwähnt erfolgte anhand der mean fluorescence intensity (MFI) die Quantifizierung der Oberflächenrezeptorexpression.

Die erhobenen Daten wurden nach kategorialen und metrischen Merkmalsausprägungen unterteilt.

Zu den kategorialen Merkmalen, die sich aus den nominal-, und ordinalskalierten Merkmale bilden, zählen das Geschlecht, die Ejektionsfraktion, die bestehende KHK, die kardiovaskulären Risikofaktoren sowie die Aufnahmemedikation. Diese Merkmale werden als absolute Häufigkeit und in Prozentwerten illustriert.

Das Alter, das Aufnahmelabor und die ermittelten Werte der Antikörper bilden die metrischen Merkmale und werden mittels Mittelwertes und Standardabweichung dargestellt.

Es werden folgende statistische Tests zur Berechnung verwendet:

Es erfolgt der T-Test für unabhängige Stichproben, der Levene-Test dient zur Prüfung der Varianzhomogenität. Kategoriale Variablen werden mittels Chi-Quadrat-Test analysiert.

Das Hauptaugenmerk dieser Studie liegt bei einem Signifikanzniveau von $<0,05$ auf folgende Hypothesen:

Die Oberflächenmarkerexpressionen unterscheiden sich in den Subtypen der Monozyten signifikant bei der SAP im Vergleich zu dem ACS.

Es liegt ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den kardiovaskulären Risikofaktoren, der Prämedikation, das Aufnahmelabor und den weiteren Basischarakteristika sowie der Antikörperkonzentration und folglich der Oberflächenmarkerexpressionen in den Vergleichsgruppen vor.

3. Ergebnisse

3.1. Patientencharakteristika der Studienkohorte

Diese Studie schloss insgesamt 107 Patienten ein, welche sich in einem Zeitfenster von 24h prä-, oder post-perkutaner Koronarintervention befanden. Dabei unterteilten sich diese wie folgt: Die Diagnose einer stabilen Angina Pectoris wurde für 37 Patienten gestellt. 70 Patienten erhielten eine perkutane Koronarintervention aufgrund eines akuten Koronarsyndroms. Das ACS lässt sich in 30 Patienten mit einer instabilen Angina Pectoris, 36 Patienten mit einem NSTEMI und 4 Patienten mit einem STEMI unterteilen.

Tabelle 6: Gegenüberstellung der SAP und des ACS

	Absolute Häufigkeit	Relative Häufigkeit (%)
Stabile Angina Pectoris	37	34,6
Akutes Koronarsyndrom	70	65,4
Instabile Angina Pectoris	30	28,0
NSTEMI	36	33,6
STEMI	4	3,7

Gegenüberstellung der absoluten und relativen Häufigkeiten (in %) der stabilen Angina Pectoris sowie des akuten Koronarsyndroms. Dieses unterteilt sich wiederum in die instabile Angina Pectoris, den NSTEMI sowie den STEMI.

Folgende Tabelle listet die Baseline Charakteristika der beiden Gruppen im Einzelnen, sowie aller Patienten gebildet aus den Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheit, der Begleitmedikation bei Studieneintritt, der bestehenden koronaren Herzerkrankung, der linksventrikulären Ejektionsfraktion, sowie den Laborparametern auf.

Tabelle 7: Baseline Charakteristika

Parameter	Alle Patienten, N=107	SAP N=37	ACS N=70	p
<i>Risikofaktoren</i>				
Alter, in Jahren	71,30 (11,459)	70,08 (10,576)	71,94 (11,922)	0,427
Geschlecht: m	61 (57 %)	26 (70,3 %)	35 (50 %)	0,044
w	46 (43 %)	11 (29,7 %)	35 (50 %)	0,044
Hypertonie	85 (79,4 %)	28 (75,7 %)	57 (81,4 %)	0,708
Hypercholesterinämie	53 (49,5 %)	17 (45,9 %)	36 (51,4 %)	0,696
Diabetes	34 (31,8 %)	9 (24,3 %)	25 (23,4 %)	0,342
Positive Familienanamnese	27 (25,2 %)	12 (32,4 %)	15 (21,4 %)	0,260
Nikotinabusus	22 (20,6 %)	9 (24,3 %)	13 (18,6 %)	0,413
Vorhofflimmern	23 (21,5 %)	4 (10,8 %)	19 (27,1 %)	0,050
Niereninsuffizienz	10 (9,3 %)	2 (5,4 %)	8 (11,4 %)	0,468
<i>Begleitmedikation bei Studieneintritt</i>				
β-blocker	75 (70,1 %)	27 (73 %)	48 (68,6 %)	0,636
ACE-Hemmer	60 (56,1 %)	20 (54,1 %)	40 (57,1 %)	0,759
AT1-Antagonist	27 (25,2 %)	11 (29,7 %)	16 (22,9 %)	0,436
Diuretika	33 (30,8 %)	11 (29,7 %)	22 (31,4 %)	0,859
ADP Rezeptorblocker	3 (2,7 %)	1 (2,7 %)	2 (2,8 %)	0,400
Marcumar/Xarelto	4 (3,7 %)	1 (2,7 %)	3 (4,3 %)	0,765
GPIIb/IIIa Inhibitor	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	/
ASS	15 (14 %)	5 (13,5 %)	10 (14,3 %)	0,913
Cholesterinsenker	86 (80,4 %)	29 (78,4 %)	57 (81,4 %)	0,931
Aldosteronantagonist	18 (16,8 %)	6 (16,2 %)	12 (17,1 %)	0,903
Antidiabetika	25 (23,3 %)	6 (16,2 %)	19 (27,2 %)	0,448
Ca Kanalhemmer	31 (29 %)	13 (35,1 %)	18 (25,7 %)	0,307
<i>KHK</i>				

LVEF (%)	1,58 (0,952)	1,46 (0,803)	1,64 (1,022)	0,310
KHK	96 (89,7 %)	36 (97,3 %)	60 (85,7 %)	0,075
<i>Laborparameter</i>				
NT-proBNP	118,38 (778,98)	103,11 (627,182)	126,46 (852,511)	0.884
CRP (mg/dl)	1,5057 (5,24)	0.5668 (2,12)	2,00 (6,25)	0.085
CK (U/l)	127,20 (270,88)	45,70 (52,612)	170,90 (326,012)	0.023
Troponin (mg/dl)	4,76 (38,25)	0.00 (0,00)	7,37 (47,534)	0.408
Kreatinin (mg/dl)	0,819 (0,41)	0,635 (0,479)	0,916 (0,333)	0,002

Metrische Merkmale als Mittelwert und Standardabweichung in Klammern. Kategoriale Merkmale als absolute Häufigkeit und in Prozent in Klammern. SAP – Stabile Angina Pectoris, ACS – Akutes Koronarsyndrom, M – Männlich, W – Weiblich, ACE-Hemmer – angiotensin converting enzyme-Hemmer, AT1-Antagonist – Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1-Antagonisten, GPIIb/IIIa Inhibitor – Glykoprotein-2b/3a-Hemmer, ASS – Acetylsalicylsäure, Ca Kanalhemmer – Calciumkanalblocker, LVEF – Linksventrikuläre Ejektionsfraktion, KHK – Koronare Herzkrankheit, NT-proBNP – N-terminales pro brain natriuretic peptide, CRP – C-reaktives Protein, CK – Creatinkinase

Tabelle 7 verdeutlicht, dass insgesamt mehr Männer als Frauen (61 zu 46) mit einem durchschnittlichen Alter von 71 Jahren in dieser Studie eingeschlossen wurden. Während exakt 50 % der Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom den beiden Geschlechtern zuzuordnen sind, sind über 2/3 der Patienten mit einer stabilen Angina Pectoris Männer (70,3 % zu 29,7 %).

Die meisten Risikofaktoren hinsichtlich der Arteriosklerose zeigen keinen signifikanten Unterschied in den beiden gegebenen Gruppen. 24,3 % der Patienten mit einer SAP bejahen den Nikotinabusus im Vergleich zu 18,6 % der Patienten mit einem ACS. Annähernd in Waage halten sich die Werte bei dem Diabetes Mellitus (24,3 % zu 23,4 %), der Hypertonie (75,7 % zu 81,4 %) sowie der Hypercholesterinämie (45,9 % zu 51,4 %). Die positive Familienanamnese zeigt sich gehäuft bei Patienten mit der Diagnose einer stabilen Angina Pectoris mit 32,4 % im Vergleich zu den 21,4 % der Patienten mit einem ACS. Lediglich das Vorhofflimmern zeigt einen signifikanten Unterschied in den beiden Gruppen mit 27,1 % (ACS) zu 10,8 % (SAP).

Die Begleitmedikation bei Studieneintritt zeigt einen ähnlichen Trend in beiden Gruppen mit kleinen Ausreißern in beide Gruppen.

Wie zu erwarten sind die Laborparameter bei Patienten mit einem ACS höher angesiedelt, wie das Troponin mit 7,37 mg/dl zu 0 mg/dl, die CK mit einer signifikanten Differenz von 170,9 U/l zu 45,70 U/l bei einem p von 0,023 sowie das Kreatinin mit 0,92 mg/dl zu 0,64 mg/dl ($p=0,002$).

3.2. Oberflächenexpression der Antikörper auf den Monozyten-Populationen

In den folgenden Grafiken werden die Oberflächenexpressionen von BMP2, BMP4, BMP7, MIF und Gremlin auf den klassischen, nicht klassischen und intermediären Monozyten dargestellt.

Dabei werden die beiden Gruppen bestehend aus der SAP und dem ACS untereinander verglichen, der Mittelwert und der Standardfehler der mittleren Fluoreszenzintensität der Antikörper, sowie die Signifikanz angegeben. Die Signifikanz wurde mittels Levene-Test bei einem Signifikanzniveau von $<0,05$ ermittelt.

3.2.1. BMP-2-Expression

Die Expression von BMP2 auf nicht-klassischen Monozyten beträgt 98,71 (SAP) zu 88,73 (ACS). Bei einem p von 0,044 ist dies als signifikant zu werten.

Klassische Monozyten zeigen eine mittlere Expression von 35,25 (SAP) zu 28,51 (ACS) bei einer Signifikanz von 0,116. Intermediäre Monozyten weisen eine mittlere Expressionshöhe von 92,27 (SAP) zu 81,21 (ACS) auf. Die Signifikanz beträgt 0,113.

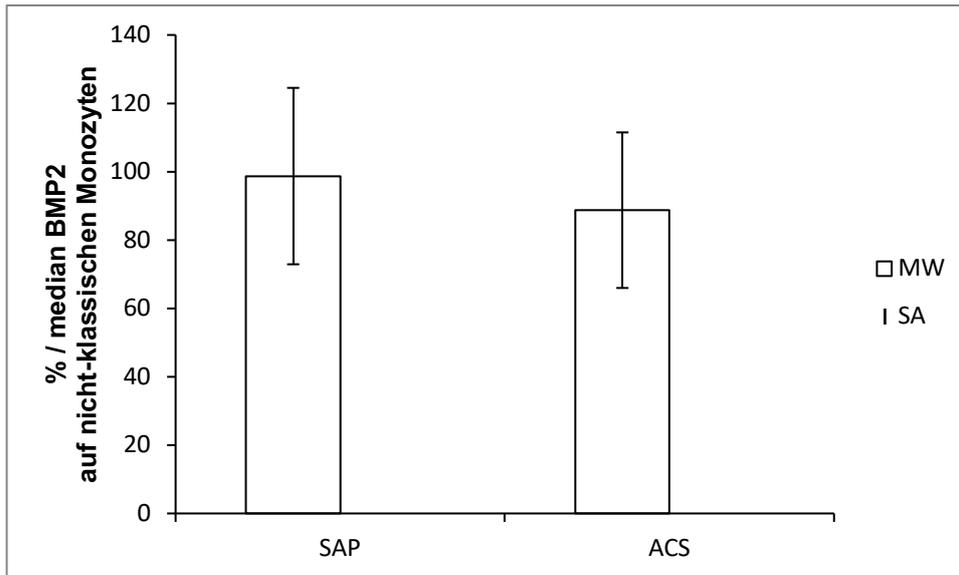


Abbildung 10: Gegenüberstellung der mittleren BMP-2-Konzentration auf nicht-klassischen Monozyten

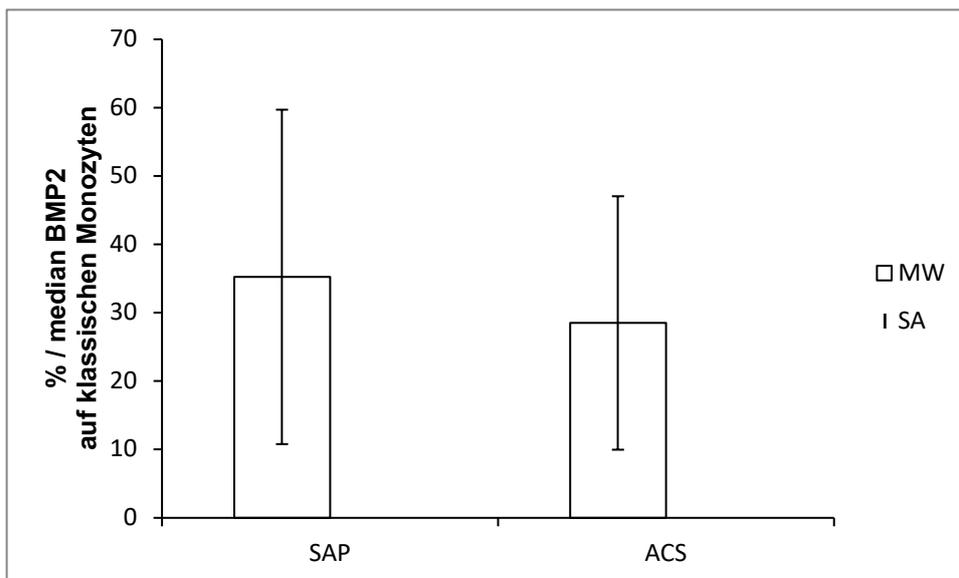


Abbildung 11: Gegenüberstellung der mittleren BMP-2-Konzentration auf klassischen Monozyten

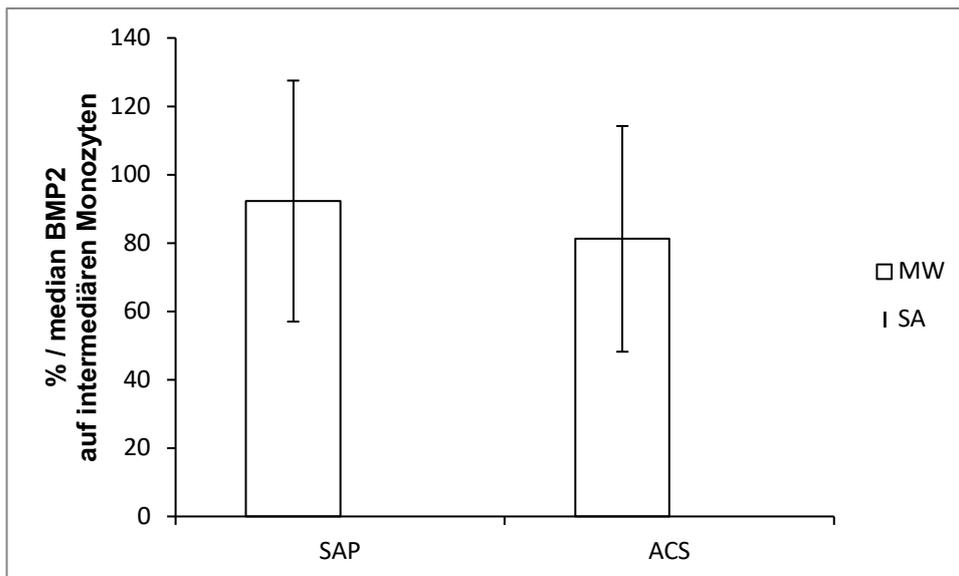


Abbildung 12: Gegenüberstellung der mittleren BMP-2-Konzentration auf intermediären Monozyten

3.2.2. BMP-4-Expression

Unter den drei Monozyten zeigt sich auch hier die höchste Expression auf nicht-klassischen Monozyten. Die mittlere Expressionshöhe von BMP4 beträgt 243,27 (SAP) zu 230,37 (ACS). Es lässt sich kein signifikanter Unterschied finden ($p=0,489$).

Patienten mit einer stabilen Angina Pectoris weisen auf klassischen Monozyten eine mittlere Expression von 123,89 zu 120,14 (ACS) ($p=0,748$) auf. Auf intermediären Monozyten beträgt diese 176,18 (SAP) zu 175,9 (ACS) bei einem p von 0,986.

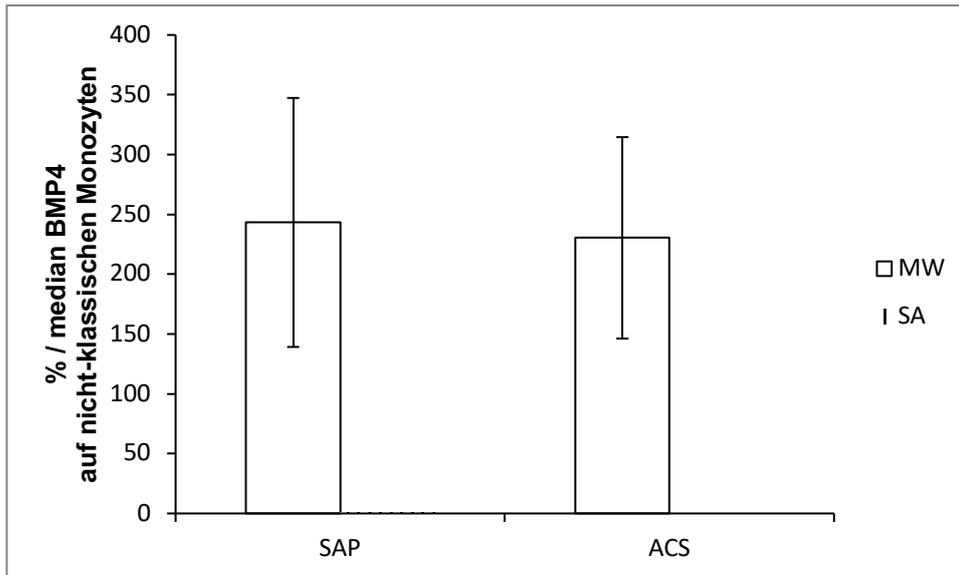


Abbildung 13: Gegenüberstellung der mittleren BMP-4-Konzentration auf nicht-klassischen Monozyten

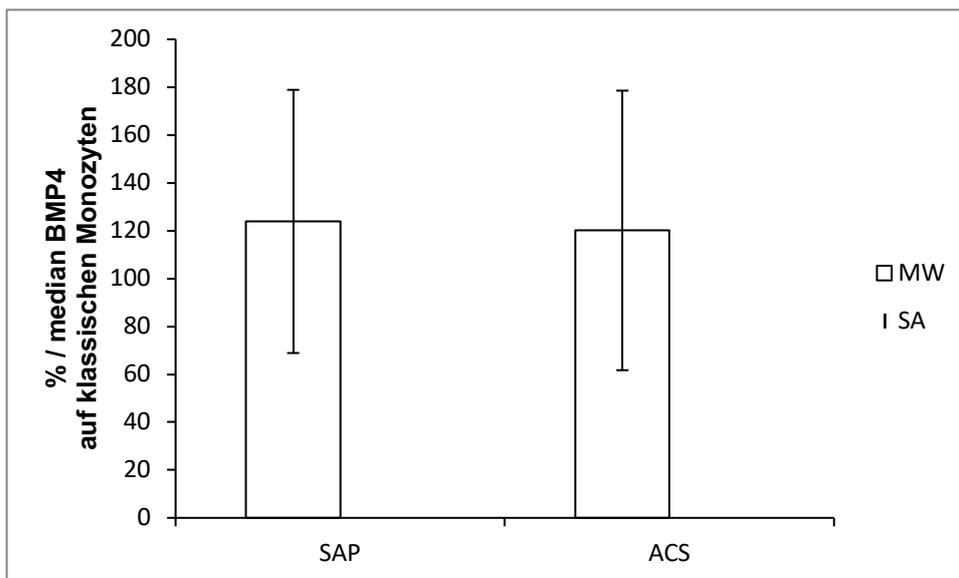


Abbildung 14: Gegenüberstellung der mittleren BMP-4-Konzentration auf klassischen Monozyten

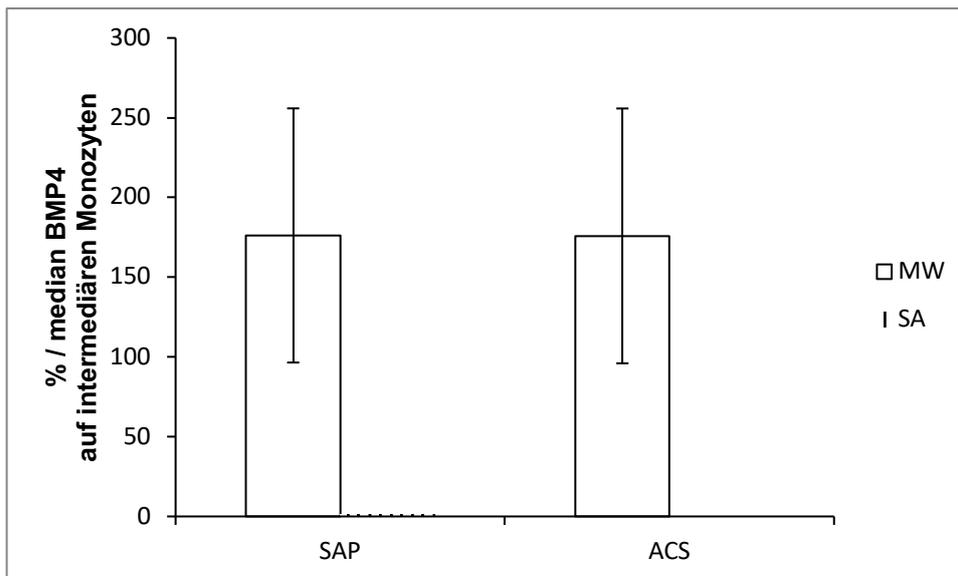


Abbildung 15: Gegenüberstellung der mittleren BMP-4-Konzentration auf intermediären Monozyten

3.2.3. BMP-7-Expression

BMP7 legt eine vergleichsweise niedrige Expression auf den verschiedenen Monozyten-Populationen dar.

Auf nicht-klassischen Monozyten beträgt diese 22,67 (SAP) zu 16,54 (ACS) bei einer Signifikanz von 0,084. Klassische Monozyten zeigen eine mittlere Expression von 3,95 (SAP) zu 6,07 (ACS). Auch dies ist als nicht signifikant zu werten ($p=0,206$).

Die letzte Gruppe gebildet aus den intermediären Monozyten weist eine Antikörper-Expression von 9,65 (SAP) zu 7,69 (ACS) bei einem p von 0,228 auf.

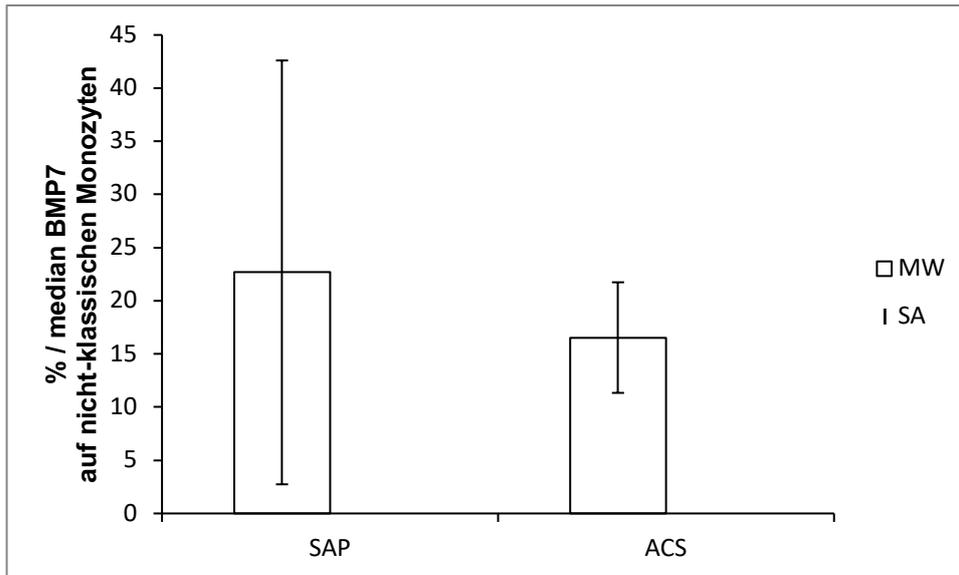


Abbildung 16: Gegenüberstellung der mittleren BMP-7-Konzentration auf nicht-klassischen Monozyten

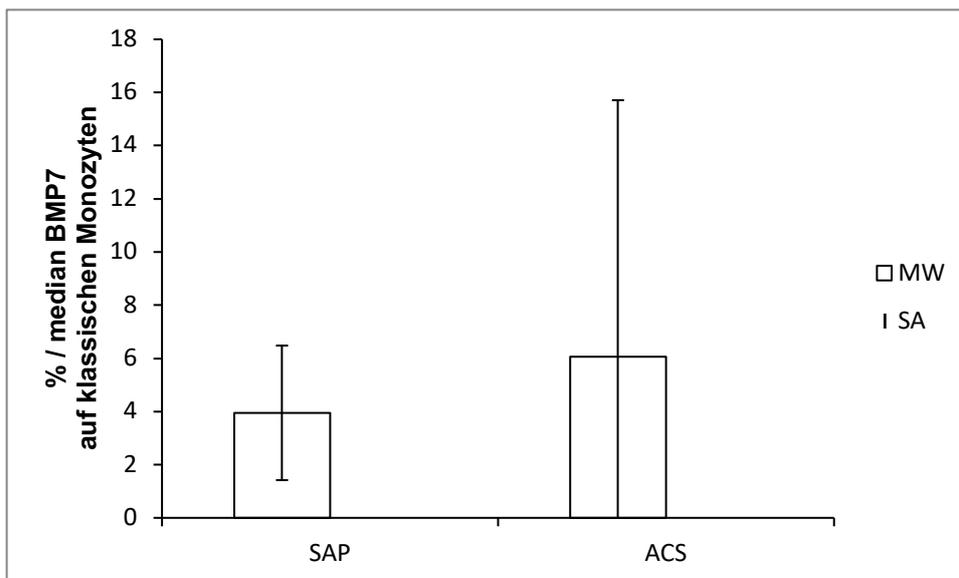


Abbildung 17: Gegenüberstellung der mittleren BMP-7-Konzentration auf klassischen Monozyten

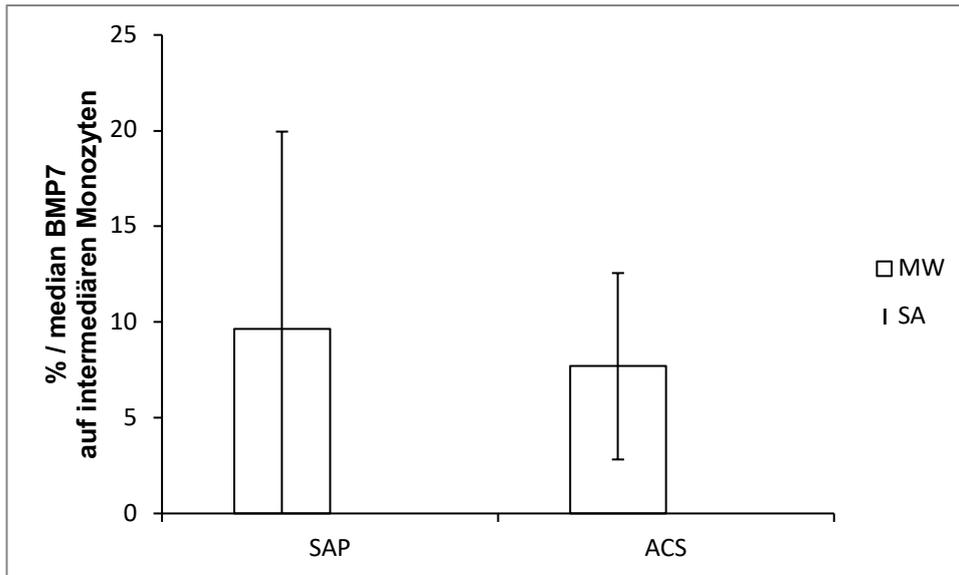


Abbildung 18: Gegenüberstellung der mittleren BMP-7-Konzentration auf intermediären Monozyten

3.2.4. MIF-Expression

Auf nicht-klassischen Monozyten kann bei einer mittleren Oberflächenexpression von 173,95 (SAP) zu 173,46 (ACS) und einem Signifikanzniveau von 0,987 kein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Ähnliche Verhältnisse stellen sich auf den klassischen und intermediären Monozyten dar. Patienten mit einer SAP weisen auf klassischen Monozyten eine mittlere Expression von 121,78 zu 129,57 (ACS) bei einer Signifikanz von 0,786 auf.

Die intermediären Monozyten erbringen die höchste Expression mit 255,14 (SAP) zu 221,6 (ACS) bei einer Signifikanz von 0,470.

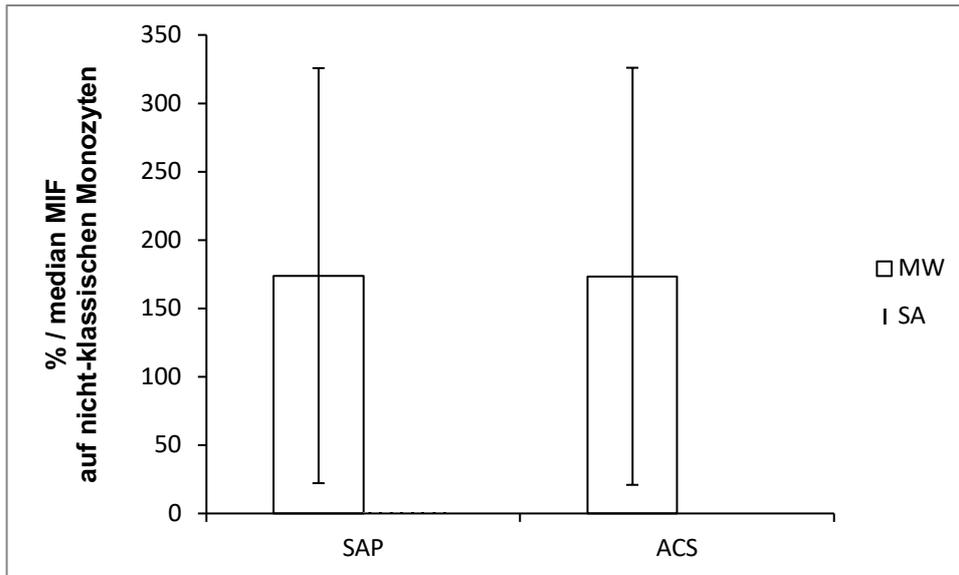


Abbildung 19: Gegenüberstellung der mittleren MIF-Konzentration auf nicht-klassischen Monozyten

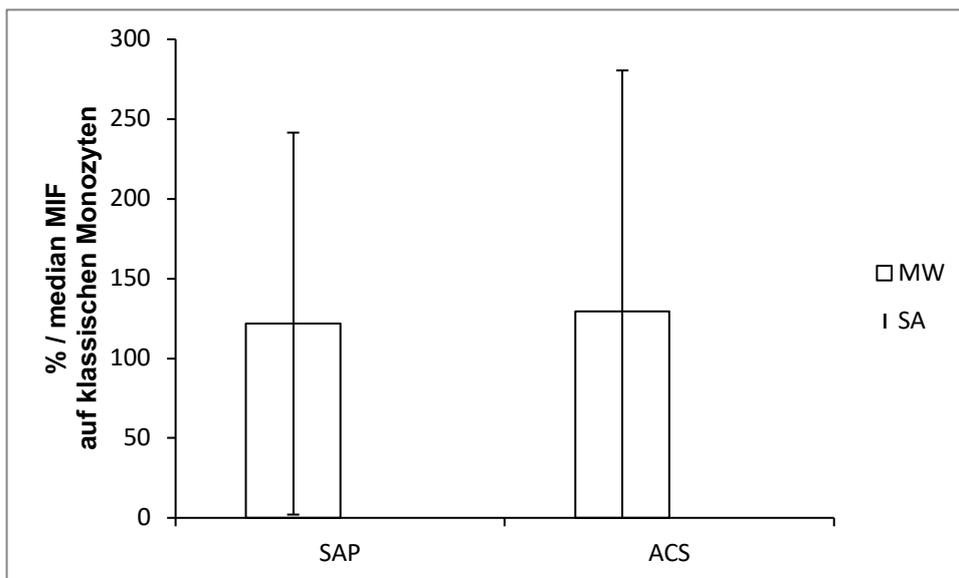


Abbildung 20: Gegenüberstellung der mittleren MIF-Konzentration auf klassischen Monozyten

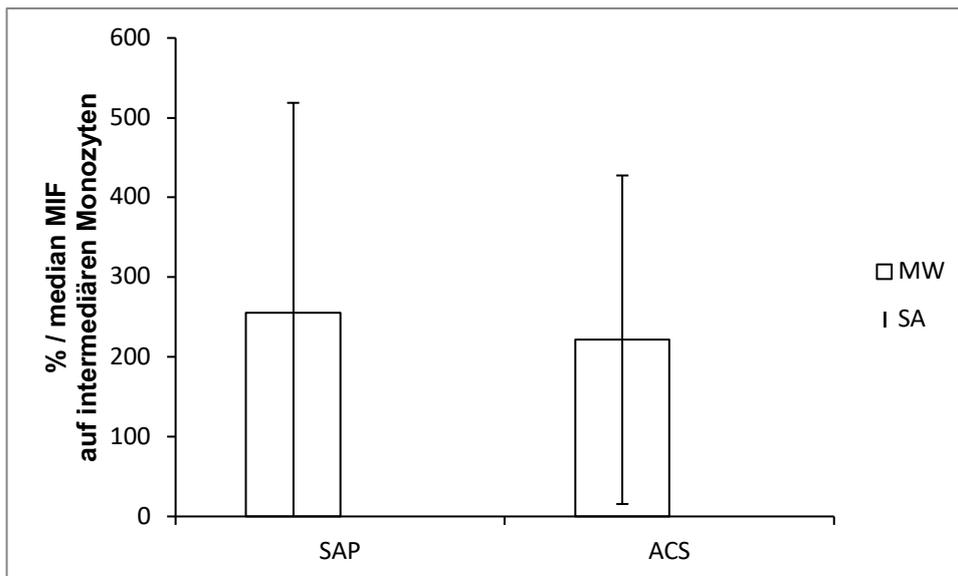


Abbildung 21: Gegenüberstellung der mittleren MIF-Konzentration auf intermediären Monozyten

3.2.5. Gremlin-Expression

Die höchste Expression von Gremlin ist auf nicht-klassischen Monozyten mit einer mittleren Expressionshöhe von 115,22 bei Patienten mit einer SAP zu 123,76 bei Patienten mit einem ACS zu finden. Dieser Unterschied ist als nicht signifikant zu werten ($p=0,328$).

Auf klassischen Monozyten zeigt sich eine mittlere Expression von 55,49 (SAP) zu 49,8 (ACS). Die Signifikanz beträgt 0,326. Die Expression auf intermediäre Monozyten beträgt 98,97 (SAP) zu 95,45 (ACS) bei einer Signifikanz von 0,673.

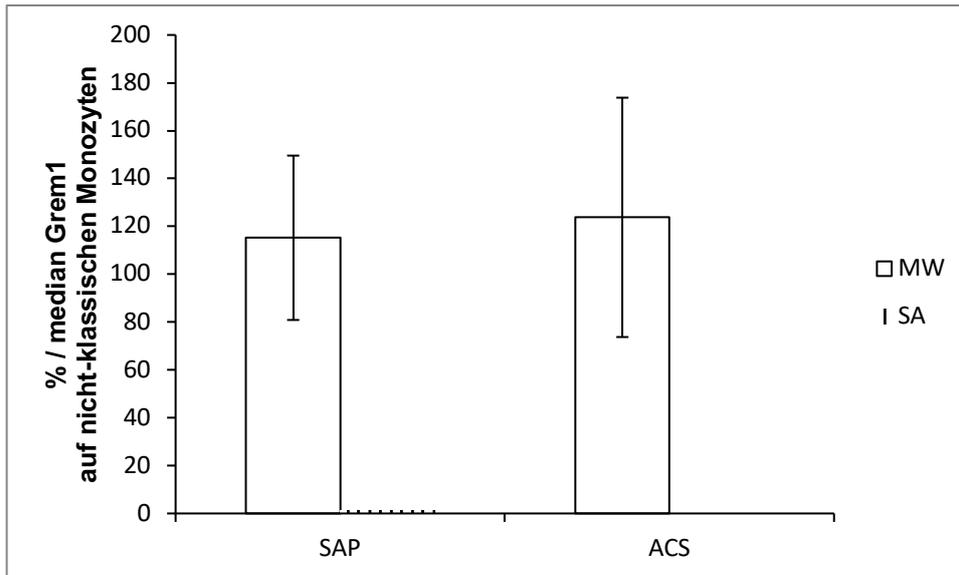


Abbildung 22: Gegenüberstellung der mittleren Grem-1-Konzentration auf nicht-klassischen Monozyten

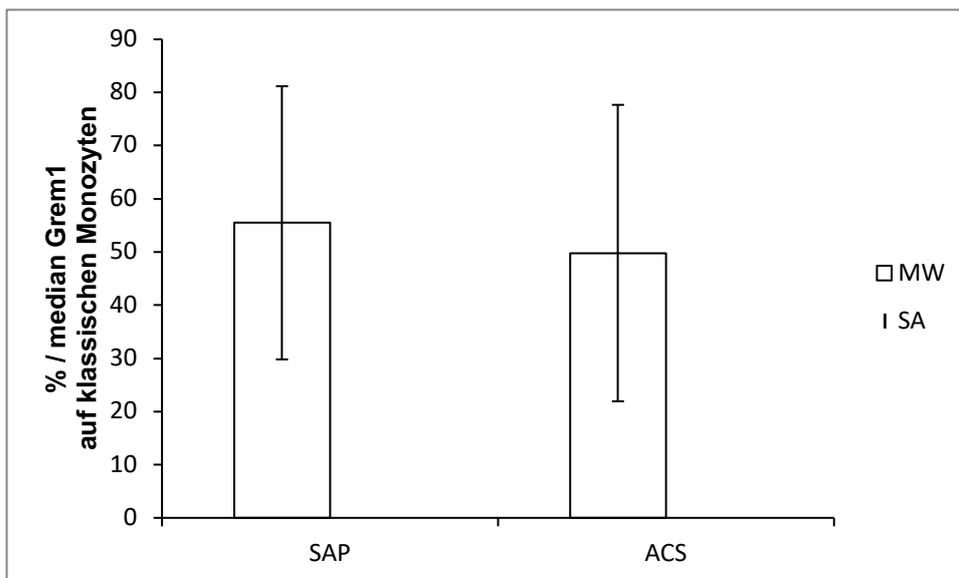


Abbildung 23: Gegenüberstellung der mittleren Grem-1-Konzentration auf klassischen Monozyten

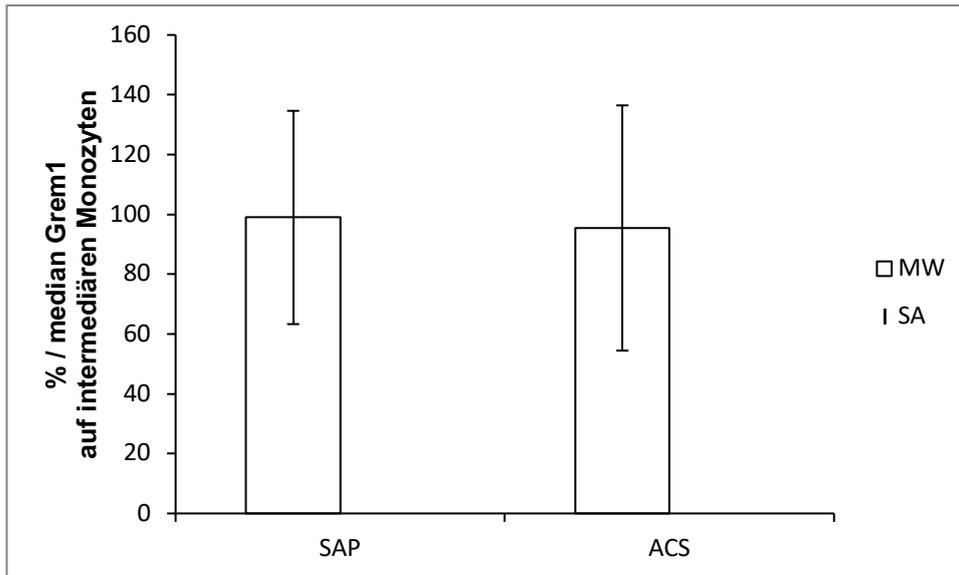


Abbildung 24: Gegenüberstellung der mittleren Grem-1-Konzentration auf intermediären Monozyten

4. Diskussion

4.1. Betrachtung der Patientencharakteristika

Die Patientencharakteristika, bestehend aus den Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheit, der Begleitmedikation bei Studieneintritt, der bestehenden koronaren Herzerkrankung, der linksventrikulären Ejektionsfraktion, sowie den Laborparametern sind in Tabelle 7 aufgelistet und werden innerhalb beider Gruppen verglichen.

Hier zeigt sich erwartungsgemäß, dass beide Gruppen kardiale Risikofaktoren mit sich bringen. Patienten, die unter einem Vorhofflimmern leiden, sind signifikant häufiger zur Gruppe des akuten Koronarsyndroms zuzuordnen. Eine mögliche Erklärung dessen ist, dass der Myokardinfarkt Komplikationen nach sich zieht, die mit dem Vorhofflimmern assoziiert werden. Myokardschäden können auch zu Erkrankungen der Reizbildung sowie Reizweiterleitung führen, welche wiederum Vorhofflimmern verursachen können. Studien zeigen, dass stumme Vorhofflimmern häufiger auf den Myokardinfarkt folgen und zu einem Herzversagen bis hin zum Tod führen können als symptomatische Vorhofflimmern [112, 113]. Auch ein Restrisiko für einen Herzinfarkt bei Vorhofflimmern trotz Antikoagulationstherapie konnte nachgewiesen werden. Dieses Risiko war vor allem bei Patienten mit einer stabilen Angina Pectoris erhöht [114].

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass jegliche Formen des akuten Koronarsyndroms die Langzeit-Mortalitätsrate annähernd verdoppeln [115].

Wie in Tabelle 7 aufgelistet zeigt die positive Familienanamnese keinen signifikanten Unterschied in den untersuchten Gruppen. Auch die Begleitmedikation bei Studieneintritt zeigt in den beiden untersuchten Gruppen des ACS und der SAP keinen signifikanten Unterschied.

Der häufigere Gebrauch von Beta-Blockern bei Patienten mit einer SAP ist durch die Ursache zu erklären, dass diese zur elektiven Durchführung der perkutanen Koronarintervention gebeten werden. Die Diagnose einer koronaren

Herzkrankheit und eine medikamentöse Therapie ist daher bereits initiiert worden.

Der häufigere Gebrauch von Antidiabetika in der Gruppe des ACS, trotz einer ähnlichen Rate eines Diabetes Mellitus in den beiden Gruppen lässt vermuten, dass erstere sich in einem fortgeschrittenen Stadium des Diabetes Mellitus befinden.

Die Laborparameter für eine Myokardschädigung sind bei Patienten mit einem ACS erwartungsgemäß höher.

4.2. Klinische Bedeutung der BMP-2-Konzentration

BMP-2 induziert durch diverse Faktoren wie Hypoxie und turbulenten Blutfluss die Differenzierung von glatten Muskelzellen zu einem osteoblastischen Phänotyp [92].

Zudem trägt es zur Migration der glatten Muskelzellen von der Media in die Intima bei [93]. Somit spielt es in Relation mit weiteren Faktoren eine entscheidende Rolle, insbesondere bei der Entstehung und bei dem Progress der Arteriosklerose.

Abseits der Atherosklerose ist die Wichtigkeit von BMP-2 bei der Frakturheilung bekannt. Darüber hinaus ist es von enormer Bedeutung für die regelhafte Entwicklung der Herzklappen, Septen sowie für das vierkammerige Herz [89].

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die mittlere BMP-2-Konzentration in den untersuchten Subpopulationen bei Patienten, die unter einer SAP leiden höher ist als bei Patienten mit einem ACS. Vor allem zeigt sich ein statistisch relevanter Unterschied in den nicht-klassischen Monozyten.

Die höhere Expression auf nicht-klassischen Monozyten im Vergleich zu klassischen Monozyten konnte bereits bei Mehrgefäßerkrankten mit höhergradigen Stenosen nachgewiesen werden [116].

Ein Ansatz zur Erklärung der höheren Konzentration bei Patienten mit einer SAP ist, dass das ACS durch minder-stenosierte Läsionen ausgelöst wird. Patienten mit einer SAP haben hingegen schwerere Stenosen und einen höheren Grad an Kalzifikationen, welche auch ihre Symptomatik erklären [117]. BMP2 trägt entsprechend dieser Aussage durch verstärkte Gefäßwandkalzifizierung zum Progress der Atherosklerose bei.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass vor allem nicht-klassische Monozyten eine erhebliche Rolle bei inflammatorischen Erkrankungen spielen. Klassische Monozyten hingegen übernehmen eine phagozytäre Funktion [118]. Intermediäre Monozyten nehmen, wie der Name vermuten lässt, eine Zwischenform ein [118]. Somit kann die Inflammation, welche bei der Atherosklerose als gegeben zu betrachten ist, als eine Erklärung für den signifikanten Unterschied in der Gruppe der nicht-klassischen Monozyten gedeutet werden. Auch die Abnahme der mittleren Konzentration von nicht-klassischen Monozyten über die intermediären Monozyten zu den klassischen Monozyten lässt sich hieraus ableiten.

Weitere Studien belegen einen Zusammenhang zwischen plasmatischer BMP2-Konzentration und Kalzifikation bei Patienten mit einem Typ-2 Diabetes [119].

Ein Zusammenhang zwischen plasmatischem BMP2 und In-Stent-Restenosen [120], sowie eine chemotaktische Funktion auf Monozyten und die Induzierung der Adhäsion der Monozyten auf Endothelzellen konnte belegt werden [121].

Der erhöhte Verbrauch von BMP-2 bei Patienten mit einem ACS stellt eine weitere Möglichkeit der geringeren BMP-2-Konzentration dar. Möglich wäre auch eine erhöhte Sezernierung von BMP-2 durch die Monozyten.

Zusammenfassend wird deutlich, dass BMP-2 eine wichtigere Rolle in der SAP als in dem ACS einnimmt, da die mittlere Antikörper-Konzentration bei nicht-klassischen Monozyten signifikant höher ist. Als Ursache hierfür kommt die verstärkte Gefäßwandkalzifizierung durch BMP-2 in Frage, welche sich durch die erwähnten Studien bezüglich In-Stent-Restenosen bestätigen lässt. Es besteht die Möglichkeit, dass BMP-2 als prognostischer Marker für die Entstehung der Atherosklerose und insbesondere für die stabile Angina Pectoris von Nutzen ist.

Um diese These abschließend bewerten zu können, müsste der Effekt von BMP-2 isoliert von anderen Krankheiten und Einflüssen betrachtet werden. Zudem sind eine größere Kohorte und wiederholte Messungen von Nöten.

4.3. Klinische Bedeutung der BMP-4-Konzentration

BMP4 trägt wie auch BMP2 zur Differenzierung von glatten Muskelzellen zu einem osteoblastischen Phänotyp bei. Hierbei wird es sowohl von Endothelzellen als auch von Schaumzellen produziert [92]. Vor allem zeigt sich eine erhöhte BMP4-Expression auf Endothelzellen, welche den atherosklerotischen Plaques aufliegen [99].

Die in dieser Studie gemessene mittlere BMP4-Konzentration verhält sich vergleichbar zu der mittleren BMP2-Konzentration. Dabei zeigt sich eine höhere Konzentration bei Patienten mit einer stabilen Angina Pectoris. Die höchste absolute Konzentration stellte sich auf den nicht-klassischen Monozyten dar. Beckman et al. untersuchten die Kalzifizierung der Koronararterien mittels intravaskulären Ultraschalles. Hierbei wurde deutlich, dass Patienten mit einer SAP einen höheren Grad an Kalzifikationen und somit eine höhergradige Stenose aufweisen als Patienten mit einer instabilen Angina und einem Myokardinfarkt [117]. Dieser Sachverhalt steht im Einklang zu den mittleren BMP2- und BMP4-Konzentrationen unter der Prämisse, dass BMP2 und BMP4 zur Kalzifizierung beitragen.

Park et al. zeigten, dass die BMP4-Konzentration im Serum bei Patienten mit einer Mehrgefäßerkrankung im Vergleich zu Patienten mit einer Eingefäßerkrankung niedriger ist [122].

Diverse Studien belegen, dass die Bedeutung von BMP4 vor allem in den initialen Zügen der Atherosklerose liegt, da BMP4 eine eminente Rolle bei der Monozyten-Adhäsion an das Endothel einnimmt [99]. Hieraus lässt sich eine weitere mögliche Erklärung für die Abnahme der BMP4-Konzentration bei Patienten mit einem ACS erschließen. Ein weiterer Erklärungsansatz der verminderten BMP4-Konzentration könnte das Resultat von BMP4-Ablagerungen in den Endothelzellen oberhalb der Schaumzellen der atherosklerotischen Plaques sein [99].

Buyukterzi et al. wiesen einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen BMP-4 und dem akuten Koronarsyndrom nach. Sie kamen zu der

Schlussfolgerung, dass eine diagnostische Wertigkeit von BMP-4 bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom möglich sei [123].

Andere Studien hingegen milderten die Bedeutung von BMP4 ab, da der BMP-Rezeptor-2 unabhängig von BMP4 die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 hochfahren und die endotheliale Inflammation einleiten konnte [124].

Schlussfolgernd existieren gegensätzliche Meinungen zur Bedeutung von BMP-4 bei der Atherosklerose.

Diese Arbeit belegt keinen statistisch signifikanten Unterschied in den Gruppen der stabilen Angina Pectoris und des akuten Koronarsyndroms. Folgende Limitationen dienen als mögliche Ursache dieses Umstandes: Diese Arbeit weist eine relativ kleine Kohorte, gemessen an der Anzahl der Patienten, die innerhalb eines Jahres ein akutes Koronarsyndrom oder eine stabile Angina Pectoris erleiden, auf. Zudem fehlt in dieser Doktorarbeit die Referenz zu gesunden Patienten.

Es handelt sich hierbei um eine Querschnittsstudie, da die monozytären Antikörperkonzentrationen nur zum Zeitpunkt X gemessen wurden. Aufgrund dessen können keine Aussagen über den Verlauf der Antikörperkonzentrationen getroffen werden.

Etwaige Tagesschwankungen oder Basalspiegel dieser Antikörper können nicht suffizient aufgeführt werden. Die vorliegenden Daten beantworten zudem nicht die Frage, ob eine zusätzliche Veränderung der monozytären Antikörperkonzentrationen durch Begleiterkrankungen vorliegt.

Eine endgültige prognostische Wertung dieser Studie ist nicht möglich, da keine Nachverfolgungszeit eingeplant wurde. Folglich ist keine Aussage darüber zu treffen, ob die unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen einen Einfluss über den Ausgang der Erkrankung hätten.

Demnach lässt sich keine abschließende Bewertung zur klinischen Relevanz des BMP-4 eruieren. Es zeigt sich jedoch kongruent zu der Mehrheit der bereits erwähnten Studien, die besagen, dass BMP-4 eine wichtigere Rolle bei der

stabilen Angina Pectoris im Vergleich zum ACS einnimmt. BMP4 trägt nämlich durch den erhöhten Grad an Kalzifikation bei Patienten mit einer SAP zur Entstehung der Atherosklerose bei.

4.4. Klinische Bedeutung der BMP-7-Konzentration

BMP-7 zeichnet sich durch seine konträre Funktion zu BMP2 und BMP4 aus, indem es durch diverse Mechanismen eine anti-entzündliche Wirkung ausübt. Hierzu zählt unter anderem die Abnahme von pro-inflammatorischen Zytokinen [102]. In dieser Kohorte zeigt BMP-7 eine erhöhte mittlere Konzentration auf klassischen Monozyten bei Patienten mit einem ACS. Überdies verhält es sich analog zu BMP2 und BMP4, wobei die mittlere Konzentration in absoluten Zahlen deutlich geringer ausfällt. Wie bereits erläutert, lässt sich die geringere Konzentration auf die anti-entzündliche Wirkung von BMP-7 zurückführen [125]. Es konnte nachgewiesen werden, dass BMP7 die Fähigkeit zur Umwandlung von Monozyten zu den antiinflammatorischen M2 Makrophagen besitzt sowie die Plaque-Formation inhibieren kann [102] [125]. Die Umwandlung von BMP7-positiven Monozyten zu M2-Makrophagen kann einer der Gründe für die niedrigeren Antikörper-Konzentrationen sein.

Andere Studien verdeutlichen hingegen, dass M2 Makrophagen nach Aufnahme von oxidiertem LDL durch pro-inflammatorische Attribute in Erscheinung treten [105].

Sovershaev et al. bewiesen, dass die BMP7-Konzentration in lipid-reichen atherosklerotischen Plaques höher anfällt, als in Calcium-reichen Plaques. Zudem stellen sie die These auf, dass die in den atherosklerotischen Plaques vorhandenen Makrophagen nach Stimulation durch BMP7 tissue factor (TF) bilden. Schlussendlich trägt es somit zur Thrombogenität und Plaque-Instabilität bei [105] [126]. Darüber hinaus zeigten sie erstmalig, dass BMP-7 bei der Migration und Adhäsion von Monozyten an das Endothel beiträgt [127]. Hierdurch gewinnt BMP-7 noch einmal an Komplexität und zeigt je nach Studienlage vermehrt pro-inflammatorische Charakterzüge auf.

Wie die Fülle an Studien aufweisen, ist bis dato keine abschließende Beurteilung über die Funktion von BMP-7 möglich. Auch diese Arbeit lässt aufgrund der fehlenden statistischen Signifikanz keine endgültige Aussage über die Funktion von BMP-7 in den Gruppen der SAP und des ACS zu.

4.5. Klinische Bedeutung der MIF-Konzentration

MIF spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und vor allem bei der Progression der Atherosklerose [50]. Es trägt zur Rekrutierung der Entzündungszellen, zur Migration von Makrophagen in die Gefäßwand und die Umwandlung derer zu Schaumzellen bei [51, 52]. Weiterhin ist es wichtig für die Stabilität und Zusammensetzung der atherosklerotischen Plaque.

Nicht-klassische sowie intermediäre Monozyten verhalten sich, trotz fehlender Signifikanz, ähnlich zu den bisher erwähnten Antikörpern in den beiden Gruppen. Auf klassischen Monozyten hingegen ist die mittlere MIF-Konzentration bei Patienten mit einem ACS um einen nicht-signifikanten Anteil erhöht. Ein Erklärungsansatz dieses Umstandes ist, dass MIF eine bedeutendere Rolle bei der Entstehung des ACS zuzurechnen ist. Die höhere Konzentration auf klassischen Monozyten könnte dem trivialen Umstand geschuldet sein, dass klassische Monozyten 80-90% der Gesamtpopulation ausmachen. Es konnte gezeigt werden, dass eine höhere Konzentration von klassischen Monozyten mit einem höheren Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse einhergeht [128]. Dies würde dem höheren kardiovaskulären Risiko eines ACS im Vergleich zu einem SAP entsprechen, wie eine Studie in einer chinesischen Kohorte belegte [129].

Studien bei ACS-Patienten mit culprit-lesions, die zu Plaque-Rupturen führten, zeigten, dass diese eine erhöhte MIF-Konzentration aufweisen [57]. Ob MIF somit als prognostischer Marker für Plaque-Instabilitäten und dem ACS dienen kann, konnte bisher nicht abschließend beantwortet werden [58].

Ein statistisch signifikanter Unterschied der MIF-Konzentration in den Untergruppen des ACS konnte bisher nicht belegt werden [130]. Es zeigte sich

jedoch stets eine höhere MIF-Konzentration bei Patienten mit einem ACS im Vergleich zur Kontroll-Gruppe.

Abschließend ist dem MIF auch eine zirkadiane Rhythmik nachzuweisen [131], weshalb nicht endgültig zu beurteilen ist, ob die gemessenen Antikörperkonzentrationen zu einem anderen Zeitpunkt, innerhalb des gegebenen Intervalls von 24h prä-, bis post-Koronarintervention, reproduzierbare Resultate erzeugen würde.

4.6. Klinische Bedeutung der Gremlin-Konzentration

Gremlin-1 stellt das Gegenstück zu MIF dar. Während MIF zu einer Entzündungsreaktion führt, schwächt Gremlin-1 eine überschießende Entzündungsreaktion ab [74]. Zudem zeigten Müller et al., dass Gremlin-1 sowohl die Monozyten-Differenzierung und die TNF-alpha Sekretion inhibiert, als auch den Monozyten/Makrophagen-Gehalt von atherosklerotischen Plaques reduziert [75].

Eine weitere Studie von Müller et al. belegt, dass nicht Gremlin-1 und MIF im Einzelnen, jedoch das Verhältnis von Gremlin-1 zu MIF mit dem Schweregrad der koronaren Herzkrankheit korreliert [76]. Hierbei zeigten gesunde Probanden den höchsten Grem-1/MIF-Quotienten. Im Vergleich der beiden Gruppen hatten Patienten mit einem ACS einen niedrigeren Quotienten als Patienten mit einer SAP [76]. Des Weiteren wurden die einzelnen Gruppen des ACS analysiert. Es zeigten sich Quotienten, die im Folgenden in absteigender Reihenfolge aufgelistet werden: Instabile Angina Pectoris, NSTEMI, STEMI [76]. Weiterhin lies sich eine inverse Korrelation zwischen dem Grem-1/MIF-Quotienten und der Thrombuslast nachweisen. Patienten mit einem hohen Quotienten verzeichneten eine vergleichsweise geringere Thrombuslast im Vergleich zu Patienten mit einem niedrigeren Quotienten [76].

Wie bereits erwähnt ist Gremlin als Counterpart zu MIF anzusehen und stellt daher eine eher protektive Rolle bei der Entstehung und Prognose der KHK dar [132].

Somit würde eine hohe bzw. eine höhere Konzentration von Gremlin-1 im Vergleich zu MIF, ähnlich zur erwähnten Studie von Müller et al, diesen protektiven Faktor bestätigen.

Diese Arbeit weist keinen signifikanten Unterschied in den beiden Gruppen der SAP und des ACS auf. Es zeigt sich lediglich eine leicht höhere, mittlere Gremlin-1-Konzentration auf nicht-klassischen Monozyten in der Gruppe des ACS. Ansonsten zeigen die Monozyten eine minimal stärkere, mittlere Konzentration in der Gruppe der SAP.

Ein limitierender Faktor dieser Arbeit stellt der Zeitpunkt der Blutentnahme dar, da nachgewiesen werden konnte, dass Gremlin-1 in das Blutplasma sezerniert wird [133]. Somit sind die hier gegebenen Daten nicht abschließend zu bewerten und könnten je nach Zeitpunkt variieren.

Alles in allem zeichnet sich Gremlin-1 durch die gegensätzliche Wirkung zu MIF aus. Die erwähnten Studien belegen die protektive Wirkung von Gremlin-1. Diese Arbeit kann jedoch keine abschließende Bewertung über die prognostische Wertigkeit innerhalb der gegebenen Gruppen der SAP und des ACS abgeben.

5. Zusammenfassung

Die koronare Herzkrankheit ist eine chronische Erkrankung des Herzens, welche auf Grundlage von Atherosklerose die Koronarterien im Sinne einer stabilen Angina Pectoris zunehmend einengt. Bei den akuten Formen, zu welchen die IAP, der NSTEMI und der STEMI gehören, sind als pathophysiologischer Mechanismus vordergründig die Thromboembolien zu erwähnen. Ihre Brisanz und Wichtigkeit bestätigt die KHK durch die Tatsache, dass sie als Rangführer der häufigsten Todesursachen in den Industriestaaten gelistet wird.

Monozyten und monozytäre Rezeptoren nehmen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Atherosklerose ein und wurden in dieser Arbeit genauer erörtert. Hierzu wurden die monozytären Antikörperkonzentration von BMP2, BMP4, BMP7, MIF und Gremlin-1 in den beiden Gruppen SAP und ACS mittels Durchflusszytometrie gemessen und vergleichend ausgewertet.

Die Baseline Charakteristika zeigen, dass Patienten, die unter Vorhofflimmern leiden zu einem statistisch signifikant höheren Prozentsatz zu der Gruppe des ACS gehören. Eine Erklärung findet sich in der Pathogenese des Vorhofflimmerns, da es unter anderem durch Komplikationen des Myokardinfarktes entstehen kann.

Wie zu erwarten, sind auch die Parameter des Myokardschadens in der Gruppe des akuten Koronarsyndroms höhergelegen.

Es stellte sich ein statistisch signifikanter Unterschied bei der Expression von BMP2 auf nicht-klassischen Monozyten dar. Hierbei ist die mittlere Antikörperkonzentration in der Gruppe der SAP höher angesiedelt. Dies steht im Einklang mit renommierten Studien, welche besagen, dass Patienten mit einer SAP einen höheren Grad an Kalzifikationen aufweisen sowie unter höhergradigen Stenosen leiden. BMP2 trägt hierbei über eine verstärkte Gefäßwandkalzifizierung zum Progress der Atherosklerose bei. Darüber hinaus sind vor allem nicht-klassische Monozyten bei inflammatorischen Erkrankungen von großer Bedeutung. Auch die Expression folgender Oberflächenmarker ist bei

Patienten mit einer stabilen Angina Pectoris höher angesiedelt: BMP-4 auf klassischen-, nicht-klassischen und intermediären Monozyten, BMP-7 auf nicht-klassischen und intermediären Monozyten, MIF auf intermediären Monozyten sowie Gremlin auf klassischen und intermediären Monozyten. Der Nachweis einer statistischen Signifikanz gelingt jedoch nicht, weshalb kein eindeutiger Rückschluss über diese Marker zu ziehen ist.

Diese Arbeit belegt erneut die Wichtigkeit der Monozyten, der monozytären Proteine sowie Antikörper bei der Entstehung und der möglichen Behandlung der Atherosklerose, sowie der KHK. Es stellte sich heraus, dass vor allem BMP2 das Potential besitzt, als prognostischer Marker für die Entstehung der Atherosklerose und der stabilen Angina Pectoris zu dienen.

Nichtsdestotrotz sind weitere Studien über die genaue Pathogenese dieser Erkrankung notwendig, um neue diagnostische-, und therapeutische Möglichkeiten zu schaffen. Um diese Lücken zu füllen gilt es weitere Studien über folgende Aspekte zu klären: Die Funktion und Interaktion der monozytären Marker, der Basalspiegel sowie der Verlauf dieser über 24h, die Veränderung der Marker durch Ablagerungen, der Einfluss von Nebenerkrankungen auf die Marker sowie die prognostische Bedeutung der Antikörper im Sinne einer Follow-up-Studie.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Robert Koch-Institut (RKI) (Hrsg.) (2015) Kapitel 2.3.1: Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt. In: Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Gemeinsam getragen von RKI und Destatis. Robert Koch-Institut, Berlin
- [2] Statistisches Bundesamt (Hrsg.). (2015) Fachserie 12 Reihe 4 Tabelle 2.2: Sterbefälle 2015 nach ausgewählten Todesursachen, Altersgruppen und Geschlecht. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden
- [3] Gößwald A, Schienkiewitz A, Nowossadeck E, Busch MA. Prävalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz. 2013;56(5):650-5.
- [4] Statistisches Bundesamt, "Zahl der Todesfälle im Jahr 2017 um 2,3 % gestiegen."
<https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/todesfaelle.html>. Stand 26.01.2020, 19:33Uhr
- [5] Hodgson JA. A treatise on the diseases of arteries and veins, containing the pathology and treatment of aneurisms and wounded arteries. London, UK: Thomas Underwood; 1815, pp.8-9
- [6] Sumpio BE. Atherosclerosis: Biological and Surgical Considerations. Haimovici's vascular surgery fifth edition: John Wiley & Sons, 2008; 2003. p. 138..
- [7] Anitschkow N. Zur Ätiologie der Atherosklerose. Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin. 1924;249(1):73-82.
- [8] Ross R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. New England Journal of Medicine. 1999;340(2):115-26
- [9] Steinbrecher, U. P., Parthasarathy, S., Leake, D. S., Witztum, J. L., & Steinberg, D. (1984). Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 81(12), 3883-7.
- [10] P. Libby and P. M. Ridker, "Inflammation and Atherothrombosis From Population Biology and Bench Research to Clinical Practice," Journal of the American College of Cardiology, vol. 48, no. 9s1, pp. A33–A46, 2006.

- [11] Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987;84(9):2995-8.
- [12] Dollery CM, Libby P. Atherosclerosis and proteinase activation. *Cardiovascular Research*. 2006;69(3):625-35
- [13] Levin DC, Fallon JT. Significance of the angiographic morphology of localized coronary stenoses: histopathologic correlations. *Circulation*. 1982;66(2):316-20
- [14] Richardson PD, Davies MJ, Born GVR. Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. *The Lancet*. 1989;334(8669):941-4.
- [15] Falk E, Nakano M, Bentzon JF, Finn AV, Virmani R. Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view. *European Heart Journal*. 2013;34(10):719-28.
- [16] Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the Vulnerable Plaque. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;47(8, Supplement):C13-C8
- [17] Roffi M, Patrono C, Collet J-P, Mueller C, Valgimigli M, Andreotti F, et al. 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). *European Heart Journal*. 2016;37(3):267-315
- [18] Iwasaki H, Akashi K. Myeloid Lineage Commitment from the Hematopoietic Stem Cell. *Immunity*. 2007;26(6):726-40
- [19] van Furth, R., & Cohn, Z. A. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *The Journal of experimental medicine*, 128(3), 415-35.
- [20] Randolph GJ, Inaba K, Robbani DF, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of Phagocytic Monocytes into Lymph Node Dendritic Cells In Vivo. *Immunity*. 1999;11(6):753-61.
- [21] Van Furth R, Diesselhoff-den Dulk MMC, Mattie H. Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction. *The Journal of Experimental Medicine*. 1973;138(6):1314.
- [22] Murray EGD, Webb RA, Swann MBR. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus

Bacterium monocytogenes (n.sp.). *The Journal of Pathology and Bacteriology*. 1926;29(4):407-39.

[23] Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock H. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*. 1989;74(7):2527-34

[24] Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010;116(16):e74

[25] Ancuta P, Liu K-Y, Misra V, Wacleche VS, Gosselin A, Zhou X, et al. Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16+ and CD16- monocyte subsets. *BMC genomics*. 2009;10:403

[26] Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Strobel M, Ziegler-Heitbrock HW. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood*. 1993;82(10):3170.

[27] Nockher WA, Scherberich JE. Expanded CD14+ CD16+ Monocyte Subpopulation in Patients with Acute and Chronic Infections Undergoing Hemodialysis. *Infection and Immunity*. 1998;66(6):2782.

[28] Skrzeczyńska-Moncznik J, Bzowska M, Lośseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J. Peripheral Blood CD14high CD16+ Monocytes are Main Producers of IL-10. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2008;67(2):152-9

[29] Vaddi K, Newton RC. Regulation of monocyte integrin expression by beta-family chemokines. *The Journal of Immunology*. 1994;153(10):4721-32

[30] Kapinsky M, Torzewski M, Büchler C, Duong Chinh Q, Rothe G, Schmitz G. Enzymatically degraded LDL preferentially binds to CD14(high) CD16(+) monocytes and induces foam cell formation mediated only in part by the class B scavenger-receptor CD36. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2001;21(6):1004-10

[31] Han KH, Chen Y, Chang MK, Han YC, Park J-H, Green SR, et al. LDL activates signaling pathways leading to an increase in cytosolic free calcium and stimulation of CD11b expression in monocytes. *Journal of Lipid Research*. 2003;44(7):1332-40

[32] van Furth R. Human monocytes and cytokines. *Research in Immunology*. 1998;149(7):719-20

[33] Gordon S. Pattern Recognition Receptors: Doubling Up for the Innate Immune Response. *Cell*. 2002;111(7):927-30

- [34] Haziot A, Chen S, Ferrero E, Low MG, Silber R, Goyert SM. The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *The Journal of Immunology*. 1988;141(2):547-52
- [35] Devitt A, Moffatt OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL, Gregory CD. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature*. 1998;392:505.
- [36] Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-Dependent Mechanisms of Cell Stimulation by Bacterial Endotoxin. *Annual Review of Immunology*. 1995;13(1):437-57
- [37] Yang R-B, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie MH, Zhang M, et al. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature*. 1998;395:284.
- [38] Unkeless JC, Shen Z, Lin C-W, DeBeus E. Function of human FcγRIIA and FcγRIIIB. *Seminars in Immunology*. 1995;7(1):37-44.
- [39] Mandelboim O, Malik P, Davis DM, Jo CH, Boyson JE, Strominger JL. Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(10):5640-4.
- [40] Lue H, Kleemann R, Calandra T, Roger T, Bernhagen J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes and Infection*. 2002;4(4):449-60
- [41] David JR. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1966;56(1):72-7.
- [42] Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a Reaction in Vitro Associated with Delayed-Type Hypersensitivity. *Science*. 1966;153(3731):80-2
- [43] Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *The Journal of experimental medicine*. 1994;179(6):1895-902
- [44] Nishihira J, Koyama Y, Mizue Y. Identification of macrophage migration inhibitory Factor (MIF) in human vascular endothelial cells and its induction by lipopolysaccharide 1998. 199-205 p.
- [45] Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelter W, et al. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature*. 1993;365:756.

- [46] Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, et al. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature*. 1995;377:68.
- [47] Meazza C, Travaglio P, Pignatti P, Magni-Manzoni S, Ravelli A, Martini A, et al. Macrophage migration inhibitory factor in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2002;46(1):232-7.
- [48] Wakabayashi K, Otsuka K, Sato M, Takahashi R, Odai T, Isozaki T, et al. Elevated serum levels of macrophage migration inhibitory factor and their significant correlation with rheumatoid vasculitis disease activity. *Modern Rheumatology*. 2012;22(1):59-65.
- [49] Shimizu T, Nakamura H, Abe R, Watanabe H, Ohkawara A, Shimizu H, et al. High Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Serum Levels Associated with Extended Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2001;116(6):989-90.
- [50] Burger-Kentischer A, Goebel H, Seiler R, Fraedrich G, Schaefer HE, Dimmeler S, et al. Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Different Stages of Human Atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105(13):1561-6.
- [51] Lin S-G, Yu X-Y, Chen Y-X, Huang Xiao R, Metz C, Bucala R, et al. De Novo Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Atherogenesis in Rabbits. *Circulation Research*. 2000;87(12):1202-8.
- [52] Shyu L-Y, Yeh T-M, Chang H-H, Lin DP-C, Teng Y-H, Chen L-C, et al. Macrophage migration inhibitory factor induces ICAM-1 and thrombomodulin expression in vitro. *Thrombosis Research*. 2012;129(1):43-9.
- [53] Burger-Kentischer A, Göbel H, Kleemann R, Zerneck A, Bucala R, Leng L, et al. Reduction of the aortic inflammatory response in spontaneous atherosclerosis by blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Atherosclerosis*. 2006;184(1):28-38.
- [54] Chen Z, Sakuma M, Zago Alexandre C, Zhang X, Shi C, Leng L, et al. Evidence for a Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Vascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2004;24(4):709-14.
- [55] Bernhagen J, Krohn R, Lue H, Gregory JL, Zerneck A, Koenen RR, et al. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nature Medicine*. 2007;13:587.
- [56] Zerneck A, Bernhagen J, Weber C. Macrophage Migration Inhibitory Factor in Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2008;117(12):1594-602.

- [57] Mueller I, Müller K, Schönleber H, Karathanos A, Schneider M, Jorbenadze R, et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor Is Enhanced in Acute Coronary Syndromes and Is Associated with the Inflammatory Response 2012. e38376 p.
- [58] Herder C, Illig T, Baumert J, Müller M, Klopp N, Khuseyinova N, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) and risk for coronary heart disease: results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984-2002. *Atherosclerosis*. 2008;200(2):380-8.
- [59] Hsu DR, Economides AN, Wang X, Eimon PM, Harland RM. The Xenopus Dorsalizing Factor Gremlin Identifies a Novel Family of Secreted Proteins that Antagonize BMP Activities. *Molecular Cell*. 1998;1(5):673-83.
- [60] Vitt UA, Hsu SY, Hsueh AJW. Evolution and Classification of Cystine Knot-Containing Hormones and Related Extracellular Signaling Molecules. *Molecular Endocrinology*. 2001;15(5):681-94.
- [61] Isaacs NW. Cystine knots. *Current Opinion in Structural Biology*. 1995;5(3):391-5.
- [62] Topol LZ, Marx M, Laugier D, Bogdanova NN, Boubnov NV, Clausen PA, et al. Identification of *drm*, a novel gene whose expression is suppressed in transformed cells and which can inhibit growth of normal but not transformed cells in culture. *Molecular and cellular biology*. 1997;17(8):4801-10.
- [63] Church Rachel H, Krishnakumar A, Urbanek A, Geschwindner S, Meneely J, Bianchi A, et al. Gremlin1 preferentially binds to bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and BMP-4 over BMP-7. *Biochemical Journal*. 2015;466(1):55-68.
- [64] Shi W, Zhao J, Anderson KD, Warburton D. Gremlin negatively modulates BMP-4 induction of embryonic mouse lung branching morphogenesis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2001;280(5):L1030-L9.
- [65] Michos O, Panman L, Vintersten K, Beier K, Zeller R, Zuniga A. Gremlin-mediated BMP antagonism induces the epithelial-mesenchymal feedback signaling controlling metanephric kidney and limb organogenesis. *Development*. 2004;131(14):3401-10
- [66] Michos O, Gonçalves A, Lopez-Rios J, Tiecke E, Naillat F, Beier K, et al. Reduction of BMP4 activity by gremlin 1 enables ureteric bud outgrowth and GDNF/WNT11 feedback signalling during kidney branching morphogenesis. *Development*. 2007;134(13):2397-405.
- [67] Khokha MK, Hsu D, Brunet LJ, Dionne MS, Harland RM. Gremlin is the BMP antagonist required for maintenance of Shh and Fgf signals during limb patterning. *Nature Genetics*. 2003;34:303

[68] Diecke S, Quiroga-Negreira A, Redmer T, Besser D. FGF2 Signaling in Mouse Embryonic Fibroblasts Is Crucial for Self-Renewal of Embryonic Stem Cells. *Cells Tissues Organs*. 2008;188(1-2):52-61.

[69] Chen B, Blair DG, Plisov S, Vasiliev G, Perantoni AO, Chen Q, et al. Cutting Edge: Bone Morphogenetic Protein Antagonists Dm/Gremlin and Dan Interact with Slits and Act as Negative Regulators of Monocyte Chemotaxis. *The Journal of Immunology*. 2004;173(10):5914-7.

[70] Mitola S, Ravelli C, Moroni E, Salvi V, Leali D, Ballmer-Hofer K, et al. Gremlin is a novel agonist of the major proangiogenic receptor VEGFR2. *Blood*. 2010;116(18):3677-80.

[71] Boers W, Aarass S, Linthorst C, Pinzani M, Elferink RO, Bosma P. Transcriptional Profiling Reveals Novel Markers of Liver Fibrogenesis: GREMLIN AND INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-BINDING PROTEINS. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(24):16289-95.

[72] Kane R, Stevenson L, Godson C, Stitt AW, O'Brien C. Gremlin gene expression in bovine retinal pericytes exposed to elevated glucose. *The British journal of ophthalmology*. 2005;89(12):1638-42.

[73] Dolan V, Murphy M, Sadler D, Lappin D, Doran P, Godson C, et al. Expression of Gremlin, a Bone Morphogenetic Protein Antagonist, in Human Diabetic Nephropathy. *American Journal of Kidney Diseases*. 2005;45(6):1034-9.

[74] Chang K, Weiss D, Suo J, Vega JD, Giddens D, Taylor WR, et al. Bone Morphogenic Protein Antagonists Are Coexpressed With Bone Morphogenic Protein 4 in Endothelial Cells Exposed to Unstable Flow In Vitro in Mouse Aortas and in Human Coronary Arteries. *Circulation*. 2007;116(11):1258-66.

[75] Müller I, Schönberger T, Schneider M, Borst O, Ziegler M, Seizer P, et al. Gremlin-1 is an inhibitor of macrophage migration inhibitory factor and attenuates atherosclerotic plaque growth in ApoE^{-/-} Mice. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(44):31635-45.

[76] Müller II, Müller KAL, Karathanos A, Schönleber H, Rath D, Vogel S, et al. Impact of counterbalance between macrophage migration inhibitory factor and its inhibitor Gremlin-1 in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2014;237(2):426-32.

[77] Wozney J, Rosen V, Celeste A, Mitscock L, Whitters M, Kriz R, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*. 1988;242(4885):1528-34.

[78] Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes & Development*. 1996;10(13):1580-94.

- [79] Urist MR. Bone: Formation by Autoinduction. *Science*. 1965;150(3698):893-9.
- [80] Urist MR, Mikulski A, Lietze A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979;76(4):1828-32.
- [81] Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(6):2220-4.
- [82] Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 1998;9(1):49-61.
- [83] Winnier G, Blessing M, Labosky PA, Hogan BL. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes & Development*. 1995;9(17):2105-16.
- [84] Carreira AC, Alves GG, Zambuzzi WF, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone Morphogenetic Proteins: Structure, biological function and therapeutic applications. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2014;561:64-73.
- [85] Shu B, Zhang M, Xie R, Wang M, Jin H, Hou W, et al. BMP2, but not BMP4, is crucial for chondrocyte proliferation and maturation during endochondral bone development. *Journal of Cell Science*. 2011;124(20):3428-40.
- [86] Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, et al. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nature Genetics*. 2006;38:1424.
- [87] Swiontkowski MF, Aro HT, Donell S, Esterhai JL, Goulet J, Jones A, et al. Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in Open Tibial Fractures: A Subgroup Analysis of Data Combined from Two Prospective Randomized Studies. *JBJS*. 2006;88(6):1258-65.
- [88] Zhang H, Bradley A. Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development*. 1996;122(10):2977-86
- [89] Wang RN, Green J, Wang Z, Deng Y, Qiao M, Peabody M, et al. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes & diseases*. 2014;1(1):87-105.
- [90] Boström K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *The Journal of clinical investigation*. 1993;91(4):1800-9.

- [91] Zebboudj AF, Shin V, Boström K. Matrix GLA protein and BMP-2 regulate osteoinduction in calcifying vascular cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2003;90(4):756-65.
- [92] Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular Calcification. *Circulation Research*. 2006;99(10):1044-59.
- [93] Zhang M, Yang M, Liu L-p, Lau WB, Gao H, Xin M-k, et al. BMP-2 overexpression augments vascular smooth muscle cell motility by upregulating myosin Va via Erk signaling. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2014;2014:294150-.
- [94] Padgett RW, Wozney JM, Gelbart WM. Human BMP sequences can confer normal dorsal-ventral patterning in the Drosophila embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90(7):2905-9.
- [95] Furuta Y, Hogan BL. BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo. *Genes & development*. 1998;12(23):3764-75.
- [96] van Baal JWPM, Milana F, Rygiel AM, Sondermeijer CMT, Spek CA, Bergman JJGHM, et al. A comparative analysis by SAGE of gene expression profiles of esophageal adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma. *Cellular oncology : the official journal of the International Society for Cellular Oncology*. 2008;30(1):63-75.
- [97] Milano F, van Baal JWPM, Buttar NS, Rygiel AM, de Kort F, DeMars CJ, et al. Bone Morphogenetic Protein 4 Expressed in Esophagitis Induces a Columnar Phenotype in Esophageal Squamous Cells. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2412-21.
- [98] Buckley S, Shi W, Driscoll B, Ferrario A, Anderson K, Warburton D. BMP4 signaling induces senescence and modulates the oncogenic phenotype of A549 lung adenocarcinoma cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2004;286(1):L81-L6.
- [99] Sorescu GP, Sykes M, Weiss D, Platt MO, Saha A, Hwang J, et al. Bone Morphogenetic Protein 4 Produced in Endothelial Cells by Oscillatory Shear Stress Stimulates an Inflammatory Response. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(33):31128-35.
- [100] Yao Y, Bennett BJ, Wang X, Rosenfeld ME, Giachelli C, Lusis AJ, et al. Inhibition of bone morphogenetic proteins protects against atherosclerosis and vascular calcification. *Circulation research*. 2010;107(4):485-94.
- [101] Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes & Development*. 1995;9(22):2795-807.

- [102] Rocher C, Singla R, Singal PK, Parthasarathy S, Singla DK. Bone morphogenetic protein 7 polarizes THP-1 cells into M2 macrophages. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2012;90(7):947-51.
- [103] Bouhrel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dièvert R, Brozek J, Haulon S, et al. PPAR γ Activation Primes Human Monocytes into Alternative M2 Macrophages with Anti-inflammatory Properties. *Cell Metabolism*. 2007;6(2):137-43.
- [104] van Tits LJH, Stienstra R, van Lent PL, Netea MG, Joosten LAB, Stalenhoef AFH. Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated M2 macrophages: A crucial role for Krüppel-like factor 2. *Atherosclerosis*. 2011;214(2):345-9.
- [105] Davies MR, Lund RJ, Hruska KA. BMP-7 Is an Efficacious Treatment of Vascular Calcification in a Murine Model of Atherosclerosis and Chronic Renal Failure. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2003;14(6):1559-67.
- [106] Sovershaev MA, Egorina EM, Bogdanov VY, Sereckina N, Fallon JT, Valkov AY, et al. Bone morphogenetic protein -7 increases thrombogenicity of lipid-rich atherosclerotic plaques via activation of tissue factor. *Thrombosis Research*. 2010;126(4):306-10.
- [107] Reddi AH. BMPs: From bone morphogenetic proteins to body morphogenetic proteins. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2005;16(3):249-50.
- [108] Sack U, Tarnok A, Rothe G. *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Basel, Switzerland: Karger Publishers; 2007, pp 27-70
- [109] Schneider N, Otte B. *Durchflusszytometrie*. In: Horn F, editor. *Biochemie des Menschen*. 6., überarbeitete Auflage ed: Georg Thieme Verlag; 2015. p. 621.
- [110] Fluorochrome/Laser Reference Poster. In: BD Biosciences. 2015.
- [111] BD FACSCalibur Flow Cytometry System, Technical Specifications. In: BD Biosciences. 2010.
- [112] Stamboul K, Zeller M, Fauchier L, Gudjoncik A, Buffet P, Garnier F, et al. Incidence and prognostic significance of silent atrial fibrillation in acute myocardial infarction. *International Journal of Cardiology*. 2014;174(3):611-7.
- [113] Tateyama S, Higuma T, Endo T, Shibutani S, Hanada K, Yokoyama H, et al. Prognostic impact of atrial fibrillation in patients with acute myocardial infarction. *Journal of Arrhythmia*. 2014;30(6):460-5.

- [114] Violi F, Soliman EZ, Pignatelli P, Pastori D. Atrial Fibrillation and Myocardial Infarction: A Systematic Review and Appraisal of Pathophysiologic Mechanisms. *Journal of the American Heart Association*. 2016;5(5):e003347.
- [115] Poçi D, Hartford M, Karlsson T, Edvardsson N, Caidahl K. Effect of New Versus Known Versus No Atrial Fibrillation on 30-Day and 10-Year Mortality in Patients With Acute Coronary Syndrome. *The American Journal of Cardiology*. 2012;110(2):217-21.
- [116] Ozaki Y, Imanishi T, Taruya A, Aoki H, Masuno T, Shiono Y, et al. Circulating CD14⁺CD16⁺ Monocyte Subsets as Biomarkers of the Severity of Coronary Artery Disease in Patients With Stable Angina Pectoris. *Circulation Journal*. 2012;76(10):2412-8.
- [117] Beckman JA, Ganz J, Creager MA, Ganz P, Kinlay S. Relationship of Clinical Presentation and Calcification of Culprit Coronary Artery Stenoses. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2001;21(10):1618-22.
- [118] Mukherjee R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, Tripathy R, Kumar Das B, Ravindran B. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Scientific Reports*. 2015;5:13886.
- [119] Zhang M, Sara JD, Wang F-I, Liu L-P, Su L-X, Zhe J, et al. Increased plasma BMP-2 levels are associated with atherosclerosis burden and coronary calcification in type 2 diabetic patients. *Cardiovasc Diabetol*. 2015;14:64-.
- [120] Zheng W-p, Yang M, Su L-x, Ning Y, Wen W-w, Xin M-k, et al. Association between plasma BMP-2 and in-stent restenosis in patients with coronary artery disease. *Clinica Chimica Acta*. 2017;471:150-3.
- [121] Pardali E, Makowski L-M, Leffers M, Borgscheiper A, Waltenberger J. BMP-2 induces human mononuclear cell chemotaxis and adhesion and modulates monocyte-to-macrophage differentiation. *J Cell Mol Med*. 2018;22(11):5429-38.
- [122] Park CS, Hong O-K, Kim MK, Chung WB, Choi YS, Baek K-H, et al. Serum Bone Morphogenic Protein-4 Contributes to Discriminating Coronary Artery Disease Severity. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(39):e1530-e.
- [123] Buyukterzi Z, Can U, Alpaydin S, Guzelant A, Karaarslan S, Mustu M, et al. Enhanced serum levels of matrix Gla protein and bone morphogenetic protein in acute coronary syndrome patients. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2018;32(3):e22278.
- [124] Kim CW, Song H, Kumar S, Nam D, Kwon HS, Chang KH, et al. Anti-Inflammatory and Antiatherogenic Role of BMP Receptor II in Endothelial Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2013;33(6):1350-9.

[125] Singla DK, Singla R, Wang J. BMP-7 Treatment Increases M2 Macrophage Differentiation and Reduces Inflammation and Plaque Formation in Apo E^{-/-} Mice. *PLoS One*. 2016;11(1):e0147897-e.

[126] Sovershaev MA, Egorina EM, Sovershaev TA, Svensson B, Hansen JB. Increased expression of TF in BMP-7-treated human mononuclear cells depends on activation of select MAPK signaling pathways. *Thrombosis Research*. 2011;128(6):e154-e9.

[127] Sovershaev TA, Unruh D, Sveinbjörnsson B, Fallon JT, Hansen JB, Bogdanov VY, et al. A novel role of bone morphogenetic protein-7 in the regulation of adhesion and migration of human monocytic cells. *Thrombosis Research*. 2016;147:24-31.

[128] Berg KE, Ljungcrantz I, Andersson L, Bryngelsson C, Hedblad B, Fredrikson GN, et al. Elevated CD14⁺⁺CD16⁺ Monocytes Predict Cardiovascular Events. *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 2012;5(1):122-31.

[129] Yang LX, Guo RW, Qi F, Miao GH, Wang XM, Shi YK, et al. [Association between plasma macrophage migration inhibitory factor concentration and coronary artery lesion severity.]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2008;36(10):912-5.

[130] Yüksel A, Bilgir F, Bilgir O, Calan M, Bozkaya G. Increased circulating macrophage migration inhibitory factor levels are associated with coronary artery disease. *Clinics (Sao Paulo)*. 2015;70(3):169-72.

[131] N.Petrovsky,L.Socha,D.Silva,A.B.Grossman,C.Metz,andR.Bucala,“Macrophage migration inhibitory factor exhibits a pronounced circadian rhythm relevant to its role as a glucocorticoid counter-regulator,” *Immunology and Cell Biology*, vol. 81, p. 137–143, Apr 2003.

[132] I. Müller, T. Schönberger, M. Schneider, O. Borst, M. Ziegler, P. Seizer, C. Leder, K. Müller, M. Lang, F. Appenzeller, O. Lunov, B. Büchele, M. Fahrleitner, M. Olbrich, H. Langer, T. Geisler, F. Lang, M. Chatterjee, J. F. de Boer, U. J. F. Tietge, J. Bernhagen, T. Simmet, and M. Gawaz, “Gremlin-1 is an inhibitor of macrophage migration inhibitory factor and attenuates atherosclerotic plaque growth in ApoE^{-/-} Mice.,” *J Biol Chem*, vol. 288, pp. 31635–31645, Nov 2013.

[133] M.Chatterjee,A.Behrendt,M.Schmid,S.Beck,M.Schneider,A.Mack,I.Müller, T. Geisler, and M. Gawaz, “Platelets as a novel source of Gremlin-1: Implications for thromboinflammation,” *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 2, pp. 311–324, 2016.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Dissertation wurde in der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen unter Betreuung von Herrn Professor Dr. Gawaz durchgeführt. Die Konzeption und Betreuung dieser Studie erfolgten durch Frau PD Dr. Karin Müller.

Die Patienten-Rekrutierung, Erhebung der Basisdaten, sowie die Messungen im Labor erfolgten durch mich nach Einarbeitung durch Frau L. Laptev und weitere Doktoranden der Arbeitsgruppe.

Die statistische Auswertung erfolgte durch Frau PD Dr. Karin Müller.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 25. Januar 2021

8. Danksagung

Zuallererst danke ich Professor Gawaz für die Gelegenheit, diese Dissertationsschrift unter seiner Schirmherrschaft verfassen zu dürfen und für die Zurverfügungstellung aller benötigten Materialien. Ein sehr spezieller Dank gilt auch Frau Dr. Karin Müller, welche mir von Tag eins jederzeit als Betreuerin zur Seite stand.

Für die Zusammenarbeit im Labor möchte ich besonders Frau Lydia Laptev danken, da Sie uns mit den Materialien, Geräten und Arbeitsabläufen vertraut machte. Zudem war Sie bei Fragen und Problemen jederzeit hilfsbereit. Ein weiterer Dank gilt auch Soheil Naeeni für die gute Zusammenarbeit im Labor.

Ein besonderer Dank geht raus an alle Patienten die bei dieser Studie bereitwillig teilgenommen und diese somit ermöglicht haben. Auf diesem Wege wünsche ich allen Patienten nochmals alles Gute und Erholung von den „Vampiren“.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie und meiner Freundin Parwana von ganzem Herzen, da sie mich stets unterstützt haben. Ohne euch wäre mir die Türe des Studiums und der Dissertation stets verschlossen geblieben.