

Aus dem Bereich Innere Medizin III
Klinisch-experimentelle Medizin
Der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
(Prof. Dr. med Ulrich Laufs)

Expression von IL-1 α auf peripheren Monozyten nach akutem Myokardinfarkt

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät
Der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2017

vorgelegt von

Jonas Robert Wilhard Rauterberg

geboren am 31.07.1990

in Heidelberg

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	
Deutsche Fassung	5
English Summary	6
2. Einleitung	7
2.1 Akutes Koronarsyndrom	7
2.2 Bedeutung von Inflammation bei akutem Koronarsyndrom	8
2.3 Monozyten	10
2.3.1. Oberflächenmoleküle auf Monozyten	10
2.3.2 Monozytenaktivierung	11
2.3.3 Rolle der Monozyten bei Akutem Koronarsyndrom	12
2.4 Interleukin-1 α	13
2.4.1 Aufbau	13
2.4.2 Produktion und Freisetzung	14
2.4.3 Funktion und Wirkung	15
2.5 Fragestellung	18
3.1 Material	19
3.1.1 Verwendete Substanzen	19
3.1.2 Angesetzte Lösungen	19
3.1.3 Antikörper für FACS-Analyse	20
3.1.4 Materialien	20
3.1.5 Geräte	21
3.2 Methoden	22
3.2.1 Gewinnung monoklonärer Zellen	22
3.2.1.1 Patientenkollektiv	22
3.2.1.2 Blutentnahme	22
3.2.1.3 Monozytenisolation	22
3.2.2 Durchflusszytometrie	25
3.2.2.1 Messprinzip	25
3.2.2.2 Oberflächenfärbung	26
3.2.2.3 Messung und Analyse	27
3.2.3 Statistische Methoden	27
4. Ergebnisse	29
4.1 Patientencharakteristika der Gesamtgruppe	29
4.2 Patientencharakteristika der Gruppe mit Monozytenisolation	31
4.3 Charakteristika der Kontrollgruppe	33
4.4 Blutbild der Gruppe mit Monozytenisolation	35
4.5 Blutbild der Kontrollgruppe	35
4.6 Durchflusszytometrische Messungen	36

4.6.1 CD14+ Monozyten	37
4.6.2 CD14+CD16+ Monozyten	39
4.6.3 Expression von IL-1 α auf CD14+ Monozyten	41
4.6.4 Expression von IL-1 α auf CD14+CD16+ Monozyten	43
5. Diskussion	45
5.1 Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse	45
5.2 Vergleich mit der aktuellen Studienlage	46
5.2.1 Monozyten nach akutem Myokardinfarkt	46
5.2.2 Rolle von IL-1 α nach akutem Myokardinfarkt	48
5.3 Limitationen der Arbeit	50
5.4 Schlussfolgerung	51
6. Literaturverzeichnis	53

Abkürzungsverzeichnis

ACS	Akutes Koronarsyndrom (A cute C oronary S ndrome)
Ak	A ntikörper
AMI	A kuter M yokard I nfarkt
APC	A llo p hycocyanin
BMI	B ody- M ass- I ndex
CD	C luster of D ifferentiation
CRP	C -reaktives P rotein
CSF	Koloniestimulierender Faktor (C olony- S timulating F actor)
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure (E thylene d iaminetetra a cetic A cid)
FACS	F luorescence- A ctivated C ell S orter
FITC	F luorescein- I sothiocyana t
FSC	F orward S catter
HDL	H igh- d ensity lipoprotein
IL	I nterleukin
IL-1RA	I nterleukin 1 R eceptor A ntagonist
IL-1RAcP	I nterleukin 1 R eceptor A ccessory P rotein
IL-1R1	I nterleukin 1 T yp 1 R ezeptor
IL-1R2	I nterleukin 1 T yp 2 R ezeptor
kD	k ilo D alton
LDL	L ow- d ensity lipoprotein
LPS	L ipopolysaccharid
M-CSF	M acrophage- C olony- S timulating- F actor
mRNA	m essenger Ribonukleinsäure (R ibonucleinacid)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (M ajor H istocompatibility C omplex)
NF-κB	N uclear F actor- k appa B
NSTEMI	Nicht-ST-Hebungsinfarkt (n on- S T-segment e levation m yocardial i nfarction)
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen (P eripheral B lood M ononuclear C ells)
PBS	Phosphatpuffer (P hosphate- B uffered- S aline)
PE	P hycoerythrin

R	Rezeptor
RT	Raumtemperatur (18-25°C)
SSC	Side Scatter
STEMI	ST-Hebungsinfarkt (ST-segment elevation myocardial infarction)
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor

1. Zusammenfassung

Im Rahmen des akuten Myokardinfarktes kommt es zu einer vaskulären und myokardialen Inflammation, die zu tiefgreifenden strukturellen Veränderungen im Herzmuskelgewebe führt, und als wesentlicher prognostischer Faktor angesehen wird. Diese Inflammationsreaktion wird maßgeblich von Monozyten und Zytokinen wie IL-1 α moduliert. Das Ziel der durchgeführten Untersuchung war es, den Zusammenhang von membrangebundener IL-1 α Expression auf zirkulierenden Monozyten und Myokardinfarkten zu untersuchen.

Hierzu wurden bei 58 Patienten, die mit der Diagnose NSTEMI oder STEMI in die Intensivstation der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums des Saarlandes eingeliefert wurden, venöse Blutproben entnommen und Monozyten isoliert. Die frisch isolierten Zellen wurden bezüglich der Expression von membrangebundenen IL-1 α auf klassischen CD14 $^{+}$ sowie auf CD14 $^{+}$ CD16 $^{+}$ Monozyten durchflusszytometrisch untersucht. Die Blutproben 15 gesunder Probanden dienten als Kontrolle.

Nach NSTEMI- und STEMI-Myokardinfarkt zeigte sich verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe eine signifikant höhere Expression von IL-1 α auf klassischen CD14 $^{+}$ und CD14 $^{+}$ CD16 $^{+}$ Monozyten. Bei den CD14 $^{+}$ Monozyten von NSTEMI Patienten exprimierten 53,1% \pm 28,3% und bei den CD14 $^{+}$ Monozyten von STEMI-Patienten 53,3% \pm 32,6% zusätzlich zu CD14 auch IL-1 α auf ihren Oberflächen. Bei der Kontrollgruppe lag dieser Wert bei 14,1% \pm 9,6% ($p < 0,0001$, $p < 0,001$). Bei den CD14 $^{+}$ CD16 $^{+}$ Monozyten ergab sich ein ähnliches Bild: In der Gruppe NSTEMI Patienten exprimierten 46,3% \pm 29,6% der Monozyten zusätzlich IL-1 α und in der STEMI-Gruppe waren es 53,3% \pm 25,2%. Auch hier war der Unterschied zu den Kontrollproben, die eine Expressionsrate von 9,4% \pm 8,7% zeigten, signifikant ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$).

Mit dieser Studie wurde gezeigt, dass IL-1 α nach akutem Myokardinfarkt auf peripheren Monozyten vermehrt exprimiert wird. Diese Daten legen nahe, dass IL-1 α auf peripheren Monozyten als proximaler Teil einer Signalkaskade angesehen werden kann, der die Inflammation nach Herzinfarkt beeinflusst.

English summary

The innate immune response following myocardial infarction triggers an intense inflammatory reaction, that can alter the topography of the ventricular structure and importantly affects the prognosis of survival. This inflammatory response is modulated by monocytes and cytokines such as IL-1 α . In the present study, we sought to evaluate expression levels of IL-1 α on peripheral blood monocytes in patients with ST-segment and non- ST-segment elevation acute myocardial infarction.

Therefore, we obtained peripheral blood samples of 58 NSTEMI and STEMI patients, who were hospitalized in the cardiological intensive care unit of the Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg. The blood samples of 15 healthy persons served as normal controls. The expression of IL-1 α on peripheral blood monocytes was determined by flow cytometry.

Patients with NSTEMI and STEMI showed a significantly higher expression of membrane-bound IL-1 α on classical CD14⁺ and on CD14⁺CD16⁺ monocytes, compared to healthy controls. While CD14⁺ and CD14⁺CD16⁺ monocytes in the NSTEMI group expressed membrane-bound IL-1 α with an average of of 53,1% \pm 28,3% or 46,3% \pm 29,6% and CD14⁺ and CD14⁺CD16⁺ monocytes in the STEMI group demonstrated an average expression rate of 53,3% \pm 32,6% or 53,3% \pm 25,2%, IL-1 α was expressed in only 14,1% \pm 9,6% or 9,4% \pm 8,7% of the healthy controls ($p < 0,0001$, $p < 0,001$).

Our results indicate, that the expression of IL-1 α on peripheral blood monocytes is upregulated after myocardial infarction.

2. Einleitung

2.1. Akutes Koronarsyndrom

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind in Deutschland und allgemein in westlichen Industrieländern die Haupttodesursache. Es ist zu erwarten, dass die Bedeutung dieser Erkrankung bis zum Jahr 2020 auch in Schwellenländern einen ähnlichen Stellenwert haben wird (ESC Guidelines 2011). Diese Entwicklung belegt die große klinische und ökonomische Relevanz kardiovaskulärer Erkrankungen. Hierbei spielt die koronare Herzkrankheit (KHK), insbesondere das akute Koronarsyndrom eine wesentliche Rolle. Im Jahr 2014 betrug die Inzidenz akuter Myokardinfarkte und koronarer Sterbefälle in Deutschland 0,348% (Statistisches Bundesamt 2014).

Unter akutem Koronarsyndrom (ACS) versteht man die Phasen einer KHK, die akut lebensbedrohlich sind. Darunter fallen die instabile Angina Pectoris, der akute Myokardinfarkt (AMI) und der plötzliche Herztod. Die Übergänge zwischen den Syndromen sind fließend. Leitsymptom des akuten Koronarsyndroms ist der akut auftretende Thoraxschmerz, häufig begleitet von vegetativen Symptomen. Basierend auf EKG-Ableitungen lassen sich zwei Patientengruppen unterscheiden: Erstens Patienten mit persistierender (>20min) ST-Streckenhebung, genannt STEMI (ST elevation myocardial infarction). Zweitens Patienten ohne persistierende ST-Strecken Hebung, genannt NSTEMI (non ST elevation myocardial infarction).

Ursache des akuten Koronarsyndroms ist ein Missverhältnis zwischen myokardialer Sauerstoffversorgung und myokardialen Sauerstoffverbrauch. In 80% der Fälle ist der Grund der myokardialen Sauerstoffunterversorgung die Ruptur einer vorbestehenden atherosklerotischen Plaque (Hölschermann 2006). Dies führt zur Bildung eines lokalen Thrombus, mit der Folge einer kritischen Reduktion des Blutflusses in den Koronararterien. Meist geht dem Infarktgeschehen eine langjährige Progression einer Atherosklerose voraus. Diese stellt mit ihrem multifaktoriellen, chronisch inflammatorischen Geschehen das Korrelat einer ganzen Reihe ischämischer Erkrankungen dar. Diverse Risikofaktoren begünstigen die Entwicklung einer Atherosklerose. Die typischen kardiovaskulären Risikofaktoren sind: Rauchen, Vorgeschichte von Bluthochdruck oder Diabetes, Fettverteilungsmuster, Ernährungsmuster, Alkoholkonsum, Dyslipidämie und psychosoziale Faktoren (Yusuf et al.

2004). Diese Risikofaktoren führen primär zu einer Funktionsstörung des Endothels mit Veränderung seiner protektiven Eigenschaften. Eine erhöhte endotheliale Permeabilität erlaubt die Einwanderung von Entzündungszellen. Monozyten differenzieren zu Makrophagen, welche wiederum durch die Aufnahme oxidierten LDLs zu sogenannten Schaumzellen transdifferenzieren. Diese überladenen Makrophagen nekrotisieren, ihr Inhalt entleert sich ins umliegende Gewebe und führt zu einer Entzündung mit nachfolgender Freisetzung von Zytokinen und weiterer Monozyteneinwanderung. Die atherosklerotische Plaque besteht nun aus einem lipidreichen, nekrotischen Kern getrennt vom Gefäßlumen durch eine fibröse Deckplatte von fester Konsistenz. Die lokale Inflammation führt zur Expression von Enzymen, welche die Kollagenfibrillen der extrazellulären Matrix abbauen und damit die Ausdünnung der fibrösen Deckplatte bewirken. Zusätzlich hemmen Entzündungsmediatoren die De-Novo Synthese von interstitiellem Kollagen durch glatte Gefäßmuskeln. Folge ist eine fortschreitende Plaqueinstabilität und schließlich die Plaqueruptur. Bei der Ruptur kommt es zum Kontakt des subendothelialen Gewebes mit im Blut befindlichen stark thrombogenen Substanzen. Durch die sich bildenden Thrombozytenaggregate kommt es zur Verlegung des koronaren Gefäßes.

Die Prognose des akuten Koronarsyndroms hängt neben der Lokalisation des Koronarverschlusses – je proximaler der Verschluss, desto größer das infarzierte Areal - auch von der Koronaranatomie und dem Vorhandensein möglicher Kollateralen ab (Hölschermann 2006). Auch der Zeitraum zwischen Beginn der Symptome und Therapiebeginn ist entscheidend. Im Jahr 2012 verstarben 25% der Infarktpatientinnen und -patienten vor Erreichen des Krankenhauses (Herzinfarktregister Augsburg 2014). Trotz großer Fortschritte in Diagnostik und Therapie ist die Letalität also immer noch hoch. Als Prognose verschlechternder Parameter gilt neben ventrikulären Rhythmusstörungen, ein erhöhtes Risiko für weitere ischämische Episoden.

2.2 Bedeutung von Inflammation bei akutem Koronarsyndrom

Da das menschliche Herz begrenzte regenerative Möglichkeiten hat, stellen Herzinfarkte eine große Herausforderung für die Reparaturmechanismen des Körpers dar und führen letztlich zur Bildung einer Narbe. Die myokardiale Ischämie löst nach maximal 30 Minuten den nekrotischen Zelltod von Kardiomyozyten aus. Diese stoßen durch die Freisetzung von Alarmsignalen eine Entzündungskaskade an. Die Inflammation nach akutem Koronarsyndrom

dient dazu, den infarzierten Bereich von abgestorbenen Zellen und Zellbestandteilen zu befreien, um daraufhin die nötigen Schritte für kardiale Reparaturvorgänge einzuleiten. Allgemein lässt sich die Infarktheilung in die Entzündungsphase, gefolgt von der proliferativen Phase und schließlich der Ausreifungsphase unterteilen.

Die verschiedenen Phasen lassen sich sowohl durch makroskopisch und funktionelle Eigenschaften, als auch durch mikroskopisch und biochemische Veränderungen unterscheiden (Frangogiannis 2014). In der Entzündungsphase setzen Endothelzellen pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine frei, und exprimieren Adhäsionsmoleküle. Neutrophile Granulozyten haften an diesen Adhäsionsmolekülen und lösen 12-24 Stunden nach Infarktbeginn eine massive Infiltration des Infarktareals mit weiteren NG sowie Mononukleären Zellen aus. Dadurch kommt es zum Abbau und zur Phagozytose von nekrotischen Zellen und Zelldebris. Der apoptotische Tod der NG löst die Freisetzung von Signalen aus, die entzündungshemmend wirken. Es folgt die proliferative Phase in der es zu einem Rückgang der Entzündung kommt. Fibroblasten transdifferenzieren sich zu Myofibroblasten und produzieren extrazelluläre Matrix-Proteine (Bujak et al. 2007). In der sich anschließenden Reifungsphase kommt es zur Apoptose von Fibroblasten und der Bildung einer Kollagen gestützten Narbe (Dobaczewski et al. 2006). Im Laufe des Heilungsprozesses kommt es zu tiefgreifenden Veränderungen in der ventrikulären Architektur, dem sogenannten „ventricular remodeling“ (Pfeffer et al. 1990). Post-infarzielle strukturelle Umbildungen in den nekrotischen und nicht infarzierten Bereichen des Ventrikels können in der Folge Kammerdilatation, Hypertrophie des Myokards und Verschlechterung der Herzleistung bedingen (Cohn et al. 2000). Inflammatorische Vorgänge spielen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese des „ventricular remodeling“. Eine verstärkte und verlängerte Entzündungsreaktion ist wahrscheinlich mit der Entwicklung potentiell tödlicher Komplikationen, wie der Ruptur des Myokards verbunden (Bujak et al. 2009). Allerdings zeigen verschiedene Studien, dass die Inflammation im Rahmen des ACS nicht nur ein schädlicher Prozess ist, sondern auch die Heilung von Infarktgewebe unterstützt. So hatten Versuche, die inflammatorische Antwort nach Myokardinfarkt zu unterdrücken, klinisch enttäuschende Ergebnisse (Roberts et al. 2007, Timmers et al. 2012).

2.3 Monozyten

Monozyten stellen 4 bis 8 % der zirkulierenden Leukozyten im peripheren Blut. Sie haben einen Durchmesser von 12 bis 20 µm und sind somit die größten Blutzellen (Silbernagl, 1994). Der große nierenförmige Kern der Monozyten liegt dezentral und nimmt etwa die Hälfte des Zellvolumens ein. Die Halbwertszeit zirkulierender Monozyten beträgt zwischen 8 und 72 Stunden (Whitelaw et al. 1966). Die Zirkulationsdauer hängt u.a. ab von Entzündungsmediatoren, die Chemotaxis und Diapedese an den Entzündungsort vermitteln. Entzündungen stimulieren die Monozytopoese und führen dazu, dass sich Monozyten nach Verlassen der Blutbahn in Makrophagen transformieren.

2.3.1 Oberflächenmoleküle auf Monozyten

Monozyten und Makrophagen erkennen pathogene Erreger anhand von Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche. Dies ermöglicht unter anderem eine Unterscheidung zwischen pathogenen Oberflächenmolekülen und körpereigenen Zellen. Eine wichtige Gruppe dieser Mustererkennungsrezeptoren stellt die Gruppe der Toll-like Rezeptoren (TLR) dar. Diese transmembranen Rezeptoren unterscheiden sich voneinander sowohl in ihrer Lokalisation (intra- oder extrazellulär), als auch in der Art der Liganden, die von ihnen erkannt werden, und gehören zur Gruppe der Interleukin 1 Rezeptor Familie (Medzhitov et al. 1997, Timmers et al. 2012). Insbesondere TLR2 und TLR4 scheinen in der Pathogenese der endothelialen Dysfunktion eine Rolle zu spielen (Mullick et al. 2008). TLR4 ist assoziiert mit dem CD14 Rezeptor und vermittelt die Erkennung von Pathogenen (Takeuchi et al. 1999). Wegen des Fehlens einer zytoplasmatischen Domain wird CD14 als Co-Rezeptor benötigt um intrazelluläre Signalwege zu aktivieren (Lee et al. 1993). Der multifunktionale CD14 Rezeptor ist ein 356 Aminosäuren großes Glykoprotein, das insbesondere auf Monozyten exprimiert wird.

Es lassen sich drei Subpopulationen von Monozyten unterscheiden: Klassische CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten, intermediäre CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten und nicht-klassische, alternative CD14⁺CD16⁺⁺ Monozyten. Das „+“ bezeichnet ein Expressionslevel 10-fach höher, das „++“ ein Expressionslevel 100-fach höher als das einer Isotopenkontrollgruppe (Loems et al. 2010). Die CD16-Rezeptoren (FcγRIII) gehören zu einer Gruppe von Oberflächenmolekülen, die an den Fc-Teil von Immunglobulinen binden. Sie kommen u.a.

bei Monozyten und Makrophagen vor, wo sie die Erkennung und Zerstörung antikörpergebundener pathogener Erreger unterstützen (Janeway 2014). Den Hauptanteil mit ca. 90% aller Monozyten bilden die klassischen Monozyten, die stark CD14 exprimieren. Die alternativen CD14⁺CD16⁺⁺ Monozyten bilden mit ca. 10% die zweite große Gruppe unter den Monozyten. Sie exprimieren sehr viel CD16 und deutlich weniger CD14. Während die Hauptfunktion klassischer Monozyten die Phagozytose ist, spielen intermediäre Monozyten im Rahmen von Entzündungen eine große Rolle (Geissmann et al. 2003). Im Laufe einer Infektion lässt sich im Blut ein Anstieg der intermediären, gefolgt von einem Anstieg der alternativen Monozyten beobachten. Werden intermediäre CD14⁺⁺CD16⁺ und alternative CD14⁺CD16⁺⁺ Monozyten nicht unterschieden, so werden sie zusammen als CD16⁺ Monozyten bezeichnet (Zeigler-Heitbrock et al. 2010). So haben wir diesen Begriff auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

2.3.2 Monozytenaktivierung

Bevor Monozyten in der Pathogenese der Entzündung eine Rolle spielen können, kommt es zu einer phänotypischen Transformation, die zu deren Aktivierung führt. Monozyten exprimieren an ihrer Oberfläche CD14-Rezeptoren für Lipopolysaccharide (LPS), das in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien vorkommt. LPS bindet an zirkulierendes LPS-bindendes Protein, sodass dieser Komplex dann an den CD14-Rezeptor binden kann. CD14 mit diesem gebundenen Ligandenkomplex ermöglicht nun eine Interaktion mit TLR4 (Murphy et al. 2014). Über intrazelluläre Signalkaskaden kommt es zu einer Aktivierung von NFκB. Dadurch wird die Transkription und Translation von Genen stimuliert, deren Proteine eine wichtige Rolle bei weiteren Schritten einer Inflammationsreaktion spielen. So kommt es zur Sekretion pro-entzündlicher Mediatoren wie IL-6 und TNFα, sowie zu erhöhter Expression von Oberflächenrezeptoren (Sato et al. 2006). Doch auch unter sterilen Bedingungen ist CD14 in der Lage, als Mustererkennungsrezeptor zu agieren und apoptotische Zellen als Liganden zu binden, was letztlich zur Phagozytose dieser Zellen führt (Devitt et al 1998).

2.3.3 Rolle der Monozyten bei akutem Koronarsyndrom

Das unspezifische, angeborene Immunsystem spielt bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen, wie dem akutem Koronarsyndrom, eine wichtige Rolle. Im Blut zirkulierende Monozyten sind in der Lage Mediatoren freizusetzen, die an Plaque-Destabilisation, Matrix-Degeneration, Thrombogenese und der Triggerung der Entzündungskaskade bei ACS beteiligt sind.

Die Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel führt zu einer inflammatorischen Zytokinkaskade. Die Stimulation von TLR führt zu einer Steigerung der Entzündungsreaktion in infarzierten Arealen. Zudem lässt sich eine Hochregulation der Expression von TLR1, TLR2 und TLR4 im Endothel und infizierten Arealen beobachten. Zirkulierende TLR4+/CD14+ Monozyten bei Patienten mit ACS sind 2,5 mal häufiger als bei gesunden Probanden (Methe et al. 2005).

Nach ihrer Aktivierung verändern Monozyten ihren Phänotyp und erhöhen durch die Interaktion mit Endothelzellen ihre destruktiven Aktivitäten auf kardiales Gewebe. Geschädigtes Herzgewebe fördert die Rekrutierung von Monozyten über die Induktion von Monozyten Chemoattraktantien wie Monocyte chemoattractant protein (MCP-1) und Makrophage colony stimulating factor (M-CSF). Diese unterstützen nicht nur die Monozyteninfiltration in geschädigtes Gewebe, sondern auch ihre Differenzierung zu Makrophagen. Kardiale Überexpression von MCP-1 induziert zudem Neovaskularisationen, die Expression von Zytokinen und Chemokinen, und die Akkumulation kardialer Myofibroblasten, und beeinflusst so das „ventricular remodeling“ (Morimoto et al. 2006). Dabei wird MCP-1 auch in Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Kardiomyozyten, Makrophagen und in Monozyten selbst produziert (Ikeda et al. 2002).

Monozyten scheinen aktiv in allen Schlüsselphasen des ACS mitzuwirken. Jüngeren Erkenntnissen zufolge scheinen sie nicht nur klassische Elemente des angeborenen Immunsystems, sondern auch wichtige Instrumente regenerativer Kräfte des menschlichen Körpers zu sein (Shantsila et al. 2009). Besonders auch aus diesem Grund sind weitere Studien notwendig, um die genaue Rolle der Monozyten bei ACS weiter aufzuklären.

2.4. Interleukin 1 α

Interleukine gehören zu den Zytokinen. Diese bilden eine große Gruppe regulatorischer niedermolekularer Proteine, die der interzellulären Kommunikation mittels Rezeptoren dienen. Dadurch wird die Steuerung zellulärer Funktionen über auto-, para-, oder endokrine Mechanismen erreicht. Alle neu entdeckten Zytokine werden als Interleukine bezeichnet (Peter et al. 2012). Die Benennung Interleukin ist in gewisser Weise ein Relikt, da nicht nur Leukozyten in der Lage sind Interleukine zu sezernieren, sondern eine Vielzahl verschiedener Zellen (Murphy et al. 2014). IL-1 α wurde ursprünglich beschrieben als das erste endogene Pyrogen, da es Fieber induzierende Effekte in Gang setzt (Dinarello 1999). Entdeckt wurde es 1974 von Dinarello und, da als erstes beschrieben, als Interleukin-1 benannt (Dinarello 2015).

2.4.1 Aufbau

IL-1 α und IL-1 β besitzen ähnliche biologische Eigenschaften und binden an dieselben Rezeptoren (IL-1R1 und IL-1R2), obwohl sie von unterschiedlichen Genen reguliert werden. Beide werden zunächst gebildet als Vorläuferproteinen ohne Leader-Peptid mit jeweils einem Molekulargewicht von 31kDA und später gespalten zu ihren kleineren reifen Endformen mit 17kDa (Auron et al. 1984, Di Paolo et al. 2016). Allerdings bestehen IL-1 α und IL-1 β aus unterschiedlichen Aminosäuresequenzen und die Faktoren, die ihre Reifung kontrollieren, sind sehr unterschiedlich.

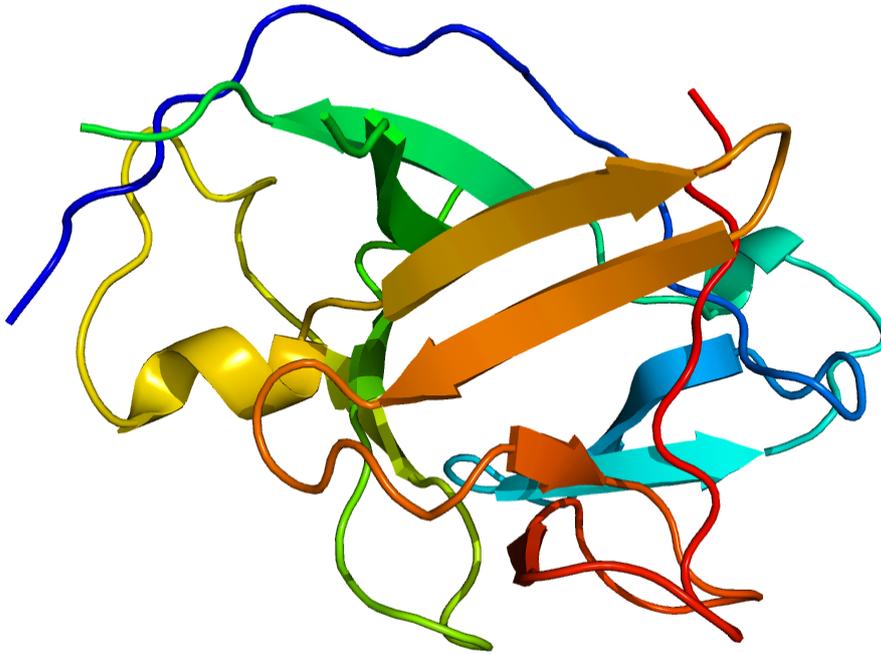


Abbildung 1: Struktur von Interleukin 1 α . Die Sekundärstruktur von IL-1 α besteht hauptsächlich aus antiparallelen β -Faltblatt-Strängen (Pfeile). Den Kern dieser Struktur bildet ein beta-Fass bestehend aus 14 β -Strängen und zusätzlich einer 3_{10} -Helix.

Modifiziert nach Graves, B.J., Hatada, M.H., Hendrickson, W.A., Miller, J.K., Madison, V.S., Satow, Y. Structure of interleukin 1 alpha at 2.7-Å resolution.(1990) *Biochemistry* 29: 2679-2684

2.4.2 Produktion und Freisetzung

Interleukin-1 α wird in verschiedenen Zelltypen wie Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen Granulozyten, aber auch Epithel- und Endothelzellen produziert. Translatiert wird es als pro-IL- α wobei die absolute die Menge an produzierten IL-1 α von Zellart zu Zellart variiert. So wird pro-IL-1 α in erheblichen Mengen im steady state in Endothelzellen des Gastrointestinal Traktes, der Lunge, Leber und Niere gebildet. Pro-IL-1 α befindet sich überwiegend im Zytoplasma. Nach nekrotischem Zelltod, z.B. bei ischämischen Krankheitsbildern, wie Herzinfarkt oder Schlaganfall gelangt pro-IL-1 α in den Extrazellulärbereich (Garlanda et al. 2013). Die IL-1 α Expression erfolgt auf eine Reihe von physiologischen Stimuli wie oxidativer Stress, erhöhte Lipide, hormonelle Stimulation oder Zytokine (Rider 2012, Tynan 2014, Itoh 2007, Kimura 1999). Die Empfindlichkeit des IL-1 α Promoters für so ein weites Spektrum an Stimuli hat wichtige Auswirkungen für die Fähigkeit von IL-1 α sterile und pathogen-induzierte Entzündungen zu lenken (Di Paolo, 2016). Im Gegensatz zu pro-IL-1 α wird pro-IL-1 β von der aspartatischen Protease Caspase-1 gespalten. Diese wird durch eine

große multimere Struktur im Zytosol mononukleärer Zellen, dem Inflammasom-Komplex aktiviert. Dem Inflammasom kommt bei der Spaltung von pro-IL- α keine aktive Rolle zu (Martinon et al. 2009, van de Veerdonk et al. 2011). Die Spaltung von pro-IL-1 α erfolgt durch die Calcium-abhängige Protease Calpain. Calpain ist in der Lage, pro-IL-1 α sowohl intra- wie extrazellulär zu spalten (Kobayashi 1990).

Zusätzlich zur freigesetzten Form von pro-IL-1 α gibt es noch eine membrangebundene Form, die auf aktivierten Monozyten zu finden ist. (Garlanda, 2013) So wird pro-IL-1 α zum Teil nach Myristinylierung in der Zellmembran verankert (Stevenson et al. 1993). Nach Prozessierung durch die Protease Calpain kann auch von der membrangebundene Form von pro-IL-1 α die kleinere 17kDa Form freigesetzt werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei der membrangebundenen Form um ein vollständiges pro-IL-1 α handelt, das voll biologisch aktiv ist (Kurt-Jones et al. 1987). Nach Stimulation hämatopoetischer und nicht-hämatopoetischer Zellen mit pro-inflammatorischen Stimuli, kommt es innerhalb weniger Stunden zum Auftreten von IL-1 α auf der Plasmamembran (Giri 1985). Die Fähigkeit von Pro-IL-1 α als ein Plasmamembran gebundenen Zytokin zu agieren, ist einzigartig in der IL-1 Familie (Dinarello 2011).

2.4.3 Funktion und Wirkung

IL-1 α und IL-1 β binden beide agonistisch an zwei primäre Rezeptoren, den IL-1 Typ 1 Rezeptor (IL-1R1) und den IL-1 Typ 2 Rezeptor (IL-1R2). IL-1R1 ist mit dem Receptor accessory protein (IL-1RAcP) verbunden, das als Ko-Rezeptor dient. Zusammen sind sie verantwortlich für die meisten von IL-1 vermittelten Signale. Dem IL-1R2 fehlt diese intrazelluläre Domäne und somit führt er zu keinem Signal wenn IL-1 an ihn bindet. Folglich fungiert IL-1R2 als ein Decoy Rezeptor, eine Rezeptorattrappe, der seine Liganden zwar bindet aber keine Signale weiterleitet (Colotta et al. 1994). Beide IL-1 Rezeptoren wurden streng konserviert während der Evolution und liegen an der gleichen chromosomalen Stelle (McMahan et al. 1991). Ein weiteres Mitglied der IL-1 Familie ist der kompetitive IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1Ra). IL-1Ra gibt es in drei intrazellulären (icIL-1Ra1, icIL-1Ra2, icIL-1Ra3) und in einer sezernierten Isoform (sIL-1Ra). Wenn IL-1Ra an IL-1R1 bindet wird IL-1RAcP nicht aktiviert. Folglich werden IL-1 vermittelte Signalwege von IL-1Ra kompetitiv gehemmt (Dinarello 2000). Das Verhältnis der Expression von IL Typ I und II Rezeptoren bestimmt maßgeblich die Responsivität von Zellen (Bossu et al. 1995).

Nur die reife Endform von IL-1 β ist ein funktionelles Pyrogen, wohingegen die Vorform als auch die Endform von IL-1 α aktive Liganden sind (Kim 2013). Allerdings besitzt die reife Form von IL-1 α eine höhere biologische Aktivität als seine Vorform (Afonia 2011). IL-1 α weist eine höhere Affinität für IL-1R1 auf, IL-1 β eine höhere für den Decoy Rezeptor IL-1R2. Darüberhinaus kann IL-1R2 einen nicht funktionellen Komplex mit IL-1RAcP bilden. Diese sogenannte Ko-Rezeptor Kompetition ermöglicht eine inhibitorische Wirkung selbst bei sehr hohen IL-1 Konzentrationen (Lang et al. 1998, Malinowsky 1998). Die Wirkung von IL-1 ist also abhängig von der Balance zwischen IL-1 α , IL-1 β , sowie deren Antagonist IL-1Ra.

IL-1 α wird induziert und aktiviert nach Gewebsschädigung und scheint eine entscheidende Rolle in vielen inflammatorischen Vorgängen zu spielen. Die Aktivierung von IL-1R1 triggert multiple Phosphorylierungen, welche zu nukleärer Translokation von Transkriptionsfaktoren führt. So wird der Transkriptionsfaktor Nuclear Factor κ B in den Nukleus transloziert und führt zur Transkription einer großen Zahl inflammatorischer Gene wie Chemokine, proinflammatorischer Zytokine und Adhäsionsmoleküle (Schreck et al. 1991) . Dies wiederum löst nach deren Freisetzung aus den Zellen eine Infiltration inflammatorischer Leukozyten in geschädigtes Gewebe aus.

Zusätzlich zu seiner Fähigkeit an Membranrezeptoren zu binden, kann IL-1 α im Nukleus an DNA binden und ist möglicherweise in der Lage als Transkriptionsfaktor agieren (Berda-Haddad et al 2011).

IL-1 α ist auch an der post-infarziellen Immunantwort im betroffenen Gewebe nach AMI maßgeblich beteiligt. So wurden erhöhte IL-1 α -Level im Myokard nach AMI festgestellt (Timmers et al. 2008). IL-1 α stimuliert die Expression proinflammatorischer Zytokine in kardialen Myofibroblasten, die in der Infarkt-Regeneration und Narbenbildung nach MI eine Schlüsselrolle spielen.

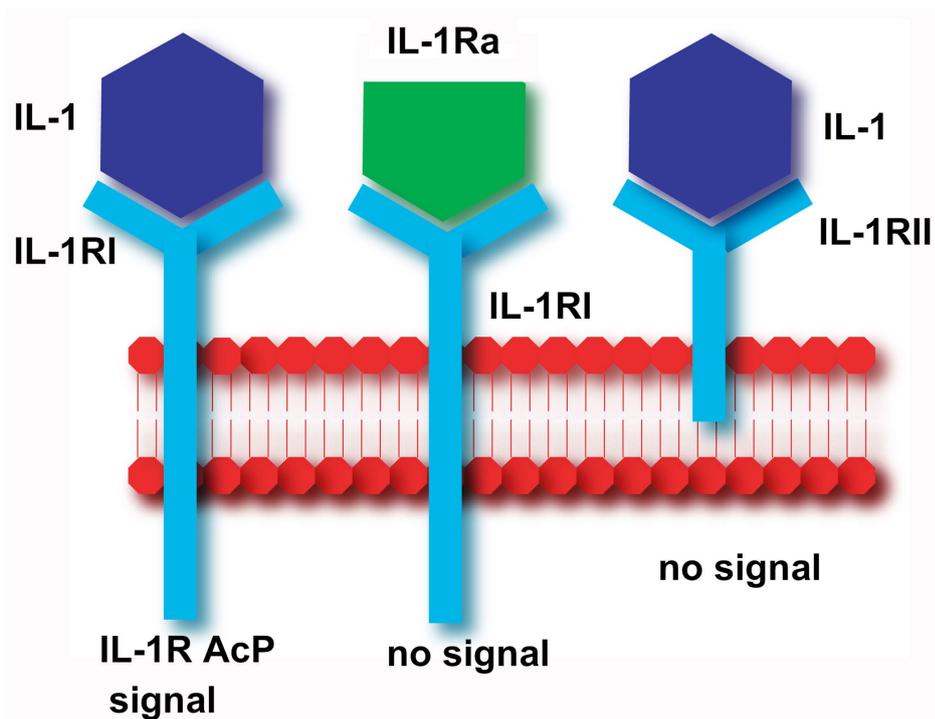


Abbildung 2: Interleukin 1 Rezeptoren. IL-Typ 1 Rezeptor (IL-1R1) verfügt über eine intrazelluläre Domäne, das IL-1 Receptor accessory protein (IL-1R AcP). Dem IL-Typ 2 Rezeptor (IL-1R2) fehlt diese Domäne. So kommt bei Kontakt mit IL-1 zu keinem Signal. Der IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1Ra) vermittelt ebenfalls kein Signal.

Modifiziert nach Bujak M, Frangogiannis N G. The role of Interleukin-1 in the pathogenesis of heart disease. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2009 ; 57(3): 165–176.

1.5 Fragestellung

Monozyten spielen eine zentrale Rolle in der sterilen Entzündungsreaktion nach akutem Myokardinfarkt. Bisher ist die Expression von IL-1 α auf Monozyten nach akutem Myokardinfarkt unbekannt. Ziel dieser Arbeit soll sein, den Zusammenhang zwischen der Stärke der membranösen IL-1 α Expression auf Monozyten und dem Vorliegen eines akuten Koronarsyndroms zu beschreiben.

Hierzu soll in der vorliegenden Arbeit die Expression von IL-1 α auf der Oberfläche im Blut zirkulierender Monozyten gemessen werden. Es wird dabei zwischen der Expression bei Patienten mit persistierender ST-Streckenhebung als Ausdruck einer schweren Myokardschädigung (STEMI), der Expression bei Patienten ohne persistierende ST-Streckenhebung (NSTEMI) und gesunden Probanden unterschieden werden, um zu untersuchen, ob Myokardinfarkte und deren Ausmaß die Quantität der IL-1 α Expression auf peripheren Monozyten beeinflussen.

3.1 Material

3.1.1. Verwendete Substanzen

Produkt	Hersteller
RPMI Medium 1640	Gibco/Life Technologies, Carlsbad US
Pen Strep	Gibco/Life Technologies, Carlsbad US
HEPES Buffer Solution	Gibco/Life Technologies, Carlsbad US
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline	Gibco/Life Technologies, Carlsbad US
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	SIGMA, St. Louis, US
Ammoniumchlorid 4N	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco/Life Technologies, Carlsbad US
Lymphocyte Separation Medium 1077	PromoCell GmbH, Heidelberg, DE
Trypan Blau Lösung	SIGMA, St. Louis, US
Paraformaldehyde	Alfa Aesar, Karlsruhe, DE
Bovine Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories, Colbe, DE
Sodium Azide Research Grade (NaN ₃)	SERVA, Heidelberg, DE
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

3.1.2 Angesetzte Lösungen

Produkt	Zusammensetzung
FACS Puffer	500ml PBS 5% (v/v) FBS 0,5% (w/v) BSA 0,007% (v/v) NaN ₃
Ammoniumchloridlösung	0,155M NH ₄ Cl 0,01M KHCO ₃

	0,1 mM EDTA pH 7,4
EDTA-Lösung	186,1 g EDTA 800 ml H ₂ O _{dest.}
PBS/EDTA-Lösung	500 ml PBS 5 ml EDTA-Lösung

3.1.3 Antikörper für FACS-Analyse

Produkt	Farbstoff	Hersteller
Anti-Human-IL-1 α	FITC	eBio Science, San Diego, US
CD16 Anti-Human	APC	Bio Legend, San Diego, US
CD14 Anti-Human	PE	BD Biosciences, Franklin Lakes, US

3.1.4 Materialien

Produkt	Hersteller
EDTA KE/9 ml Monovette	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Stabpipette 25 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT
Stabpipette 10 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT
Cellstar Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT
Cellstar Röhrchen 15 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT
Easypet	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipettenspitzen 100-1000 μ l	Eppendorf, Hamburg, DE
Neubauer Improved DHC-N01	Nano Entek, Seoul, KR
200 μ l Yellow Graduated Tip	Star Lab, Hamburg, DE
Reagiergefäß 1,5 ml Easy Cap	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Spritze 10 ml	B. BRAUN, Melsungen, DE

Sterican Einmal-Injektions-Kanüle	B. BRAUN, Melsungen, DE
Flow Cytometry Tube 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Seripettor	Brand, Wertheim, DE

3.1.5 Geräte

Produkt	Hersteller
Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg, DE
Fresco 17 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau, DE
Microscope TMS	Nikon, Tokio, JP
Esco Class II BSC Sterilbank	Biomedis, Gießen, DE
Präzisionswaage PCB	Kern, Balingen, DE
Magnetrührer REO	Ikamag, Staufen, DE
FACS Canto II Durchflusszytometer	BD Biosciences, Franklin Lakes, US
Laborautoklav 2540 EL	Biomedis, Gießen, DE
pH-Meter Seven Compact	Mettler Toledo, Columbus, US
Vortex Mixer 7-2020	neoLab, Heidelberg, DE

3.2 Methoden

3.2.1 Gewinnung mononukleärer Zellen

3.2.1.1 Patientenkollektiv

Patienten mit akutem NSTEMI oder STEMI wurden auf der Intensivstation der Klinik für Inneren Medizin III des Universitätsklinikums des Saarlandes rekrutiert.

Die Rekrutierung gesunder Probanden als Vergleichsgruppe erfolgte aus Mitarbeitern des Universitätsklinikums des Saarlandes, die sich beim Betriebsarzt zu regelmäßigen Kontrolluntersuchungen vorgestellt haben. Gesunde Probanden wurden definiert als Personen ohne Vorliegen kardiovaskulärer Erkrankungen sowie fehlender regelmäßiger Einnahme von Medikamenten.

Alle Probanden wurden über die geplanten Untersuchungen aufgeklärt und gaben schriftlich ihre Einwilligung zur Untersuchung des Blutes auf verschiedene Laborparameter und periphere Monozyten. Ein positives Votum der Ethikkommission (155/13) des Saarlandes lag vor Beginn der Untersuchung vor.

3.2.1.2 Blutentnahme

Die Entnahme von 4 x 9 ml peripheren Vollblutes erfolgte morgens jeweils um 7:00 Uhr am Folgetag des Infarktgeschehens über die V. cubitalis, die V. mediana oder über das Rete venosum dorsale manus der Patienten. Die Blutentnahmen wurden vom Verfasser durchgeführt.

3.2.1.3 Monozytenisolation

Die Monozytenisolation erfolgte nach einem etablierten Protokoll. Das frische Vollblut der Patienten aus vier 9 ml EDTA Monovetten wurde aufgeteilt auf zwei 50 ml Röhren. Die geleerten Monovetten wurden anschließend mit je 2x 9 ml PBS/EDTA-Lösung ausgespült und zum Vollblut in die Röhren überführt. Weiterhin wurden jeweils in zwei 50 ml Röhren 15 ml Lymphozyten-Separationsmedium vorgelegt. Nun wurde das Blut-PBS-EDTA Gemisch vorsichtig über das Separationsmedium geschichtet. Dabei wurde besonders

darauf geachtet, dass sich die beiden Phasen nicht vermischen. Anschließend wurden die Proben 30 min bei Raumtemperatur mit 400 g ohne Bremse zentrifugiert. Wegen der unterschiedlichen Dichten der Blutbestandteile ergab sich so eine unterschiedlich starke Migration was eine klar differenzierte Fraktionierung der flüssigen und korpuskulären Bestandteile ergab. Zu unterscheiden waren fünf Phasen: Plasma und PBS in der obersten Schicht, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) in der zweiten Schicht, das Separationsmedium in der dritten Schicht, Granulozyten in der vierten Schicht und Erythrozyten in der untersten, fünften Schicht. Die oberste Schicht wurde nun vorsichtig bis auf einen kleinen Rest mit einer Stabpipette abgenommen und verworfen. Mit einer 10 ml Spritze und einer 20 G Kanüle wurde nun die mononukleäre Zellschicht abgenommen und in ein neues 50 ml Röhrchen überführt. Hierbei wurde darauf geachtet, auch am Rand aggregierten Zellen zu entnehmen.

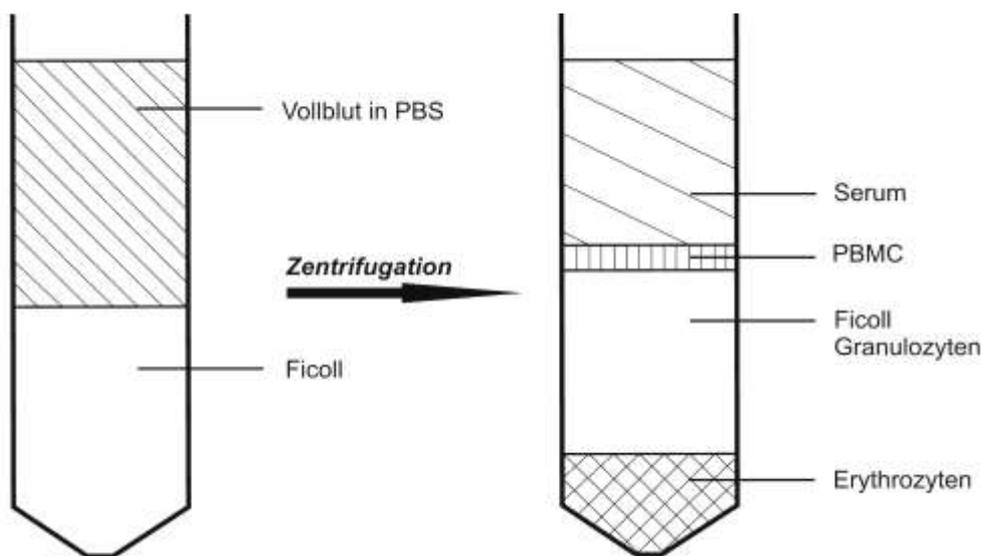


Abbildung 3: Ficoll-Dichtegradient vor und nach Zentrifugation. Das auf der Ficoll-Lösung geschichtete Vollblut wird durch Zentrifugation in Serum, PBMC, Granulozyten und Erythrozyten aufgeteilt. Die Bestandteile mit der höchsten Dichte wandern ganz nach unten im Röhrchen

Nachfolgend wurde das Röhrchen mit PBS/EDTA auf 50 ml aufgefüllt und erneut bei 400 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Hiernach wurde der Überstand bis auf einen kleinen Rest über dem entstandenen Zellpellet abgesaugt. Nachdem die Zellpellets in je 2,5 ml PBS/EDTA resuspendiert wurden, wurden sie in ein 15 ml Röhrchen umgefüllt und mit PBS/EDTA aufgefüllt. Nach einer weiteren Zentrifugation der Proben bei 300 g wurden die Zellen erneut mit PBS/EDTA gewaschen um verbliebene Thrombozyten zu entfernen. Nach einer weiteren

Zentrifugation mit 140 G bei 4°C mit Bremse wurde das entstandene Zellpellet in 2 ml PBS/EDTA resuspendiert und 6 ml Ammoniumchloridlösung hinzugegeben, um eine Lyse restlicher Erythrozyten hervorzurufen. Nach 10 min Inkubation bei 4°C wurden die Proben ein letztes Mal für 15 min bei 4°C und 400 g zentrifugiert. Nun wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 2 ml Medium (RPMI + 10% FBS + 1% Pen/Strep) resuspendiert und mit RPMI Medium auf 10 ml aufgefüllt. 10 µl dieser Zellsuspension wurden mit 90 µl Trypan Blau gemischt und anschließend 10 µl dieses Zell/Trypangemisches in die Zählkammer pipettiert. Trypanblau dient der Vitalitätsbestimmung der Zellen. Der Farbstoff kann die Zytoplasmamembran nur durchdringen, wenn diese wie bei sterbenden oder abgestorbenen Zellen, geschädigt ist. Nekrotische Zellen werden so blau gefärbt, während lebende Zellen durchsichtig erscheinen.

Das Zählgitter der verwendeten Neubauer Improved Zählkammer besteht aus 3 x 3 Großquadranten von je 1 mm Kantenlänge und folglich einer Fläche von jeweils 1 mm². Das zentral gelegene Quadrat ist wiederum in 5 x 5 kleinere Quadranten mit einer Kantenlänge von je 0,2 mm unterteilt und ist somit 0,04 mm² groß. Zur Zählung der Monozyten wurden vier große Eckquadrate ausgezählt und die Summe durch vier geteilt um einen Mittelwert pro Eckquadrat zu erhalten. Dieser Wert wird multipliziert mit den Faktoren 10 x 10 x 10.000. Der erste Faktor 10 ergibt sich aus dem Verdünnungsfaktor des Mediums, der zweite Faktor 10 aus dem Verdünnungsfaktor für die Trypanblauverdünnung und schließlich handelt es sich bei dem Faktor 10.000 um einen spezifischen Kammerfaktor.

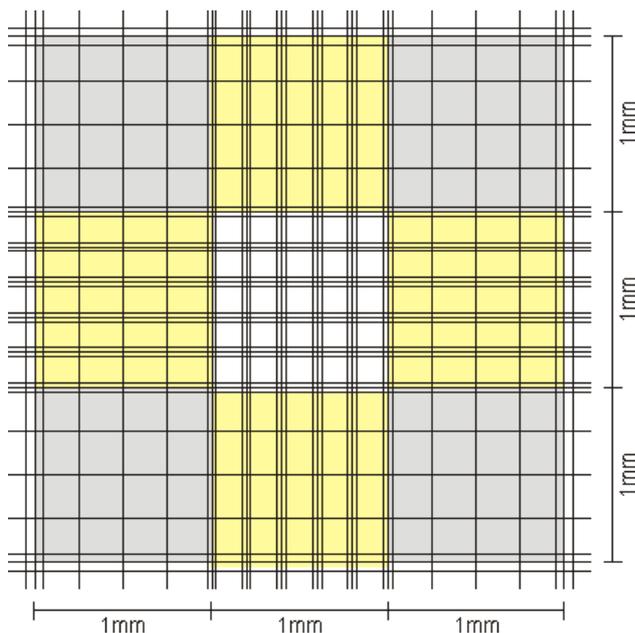


Abbildung 4: Aufbau des Zählfeldes der Neubauer improved Zählkammer.

3.2.2 Durchflusszytometrie

3.2.2.1 Messprinzip

Die Durchflusszytometrie ermöglicht mit Hilfe Fluorochrom-konjugierter Antikörper die Detektion von Zellen mit definierten Oberflächenmolekülen. Durchflusszytometer, die zusätzlich zur Analyse auch noch über die Möglichkeit verfügen die gemessenen Zellen anhand unterschiedlicher Parameter aus der Probe zu sortieren, werden als FACS (fluorescence-activated-cell-sorter) bezeichnet. Heutzutage wird jedoch die Bezeichnung FACS auch für Durchflusszytometer ohne Sortierfunktion verwendet.

Die in den Probenröhrchen befindliche Zellsuspension wird durch Überdruck der Messküvette zugeführt. Durch hydrodynamische Fokussierung entsteht ein feiner laminarer Probenstrom, durch den die Zellen vereinzelt werden und über eine Düse am Messpunkt vorbeigeführt werden. Der Flüssigkeitsstrahl trifft hier auf das monochromatische, gebündelte Licht eines luft- oder wassergekühlten Lasers. Beim Auftreffen des Laserstrahls auf die Zellen und Partikel des laminaren Probenstroms wird das Licht abgelenkt. Dabei ist der Grad der Ablenkung u.a. abhängig von der Größe der betreffenden Zelle und der Struktur von Zellmembran und Zellinneren. Als Vorwärtsstreulicht (forward light scatter, FSC) wird die Beugung des Lichtes in Richtung des einfallenden Strahles bezeichnet und hängt ab von der Größe der gemessenen Zellen. Mit steigender Anzahl und Größe der Zellorganellen wird ein Teil des Lichts vermehrt im rechten Winkel zum Strahlengang abgelenkt. Dieses sogenannte Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) gibt Hinweis auf die Granularität der gemessenen Zellen. Abgesehen von Zellgröße und Granularität lassen sich im Durchflusszytometer weitere Parameter wie etwa Fluoreszenzsignale verschiedener Wellenlänge messen. Um dies zu ermöglichen werden die betreffenden Zellen vor der Messung mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt oder mit an Fluorochrom gekoppelten Antikörpern markiert. Die fluoreszierenden Marker werden nun durch einen Laserstrahl einer bestimmten Wellenlänge angeregt um darauf in einer für das jeweilige Fluorochrom spezifischen Wellenlänge Lichtquanten zu emittieren. Dabei stellt die Fluoreszenzintensität eine relative Größe für die Anzahl der entsandten Signale und folglich die Anzahl der Zellen mit gebundenen Fluorochrom Molekülen dar.

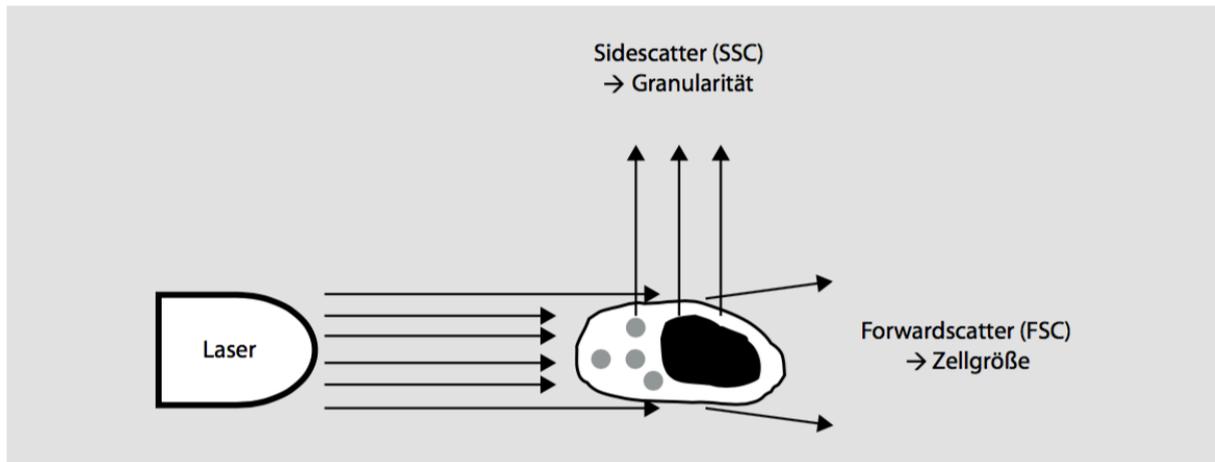


Abbildung 5: Schematischer Ablauf der FACS-Messung: Das vom Laser ausgesendete Licht trifft auf die Zelle und verursacht entweder Vorwärtsstreulicht (FSC) zur Bestimmung der relativen Zellgröße oder Seitwärtsstreulicht (SSC) mit dem sich die relative Zellgranularität bestimmen lässt. (Luttmann W., Bratke K., Küpper M, Myrtek D., *Der Experimentator Immunologie*. Springer, 4. Auflage, 2014)

3.2.2.2 Oberflächenfärbung

Die Färbung der isolierten Monozyten erfolgte nach einem etablierten Protokoll. Sämtliche Schritte wurden auf Eis durchgeführt um den „Status quo“ der Zellen zu erhalten. Zunächst wurden je 1 Million isolierte PBMC in zwei 5 ml großes FACS-Röhrchen überführt. Eine der beiden Proben wurde später als Kontrolle verwendet. In die FACS Röhrchen wird nun 2 ml des FACS Puffers gefüllt, um verbliebenes Medium wegzuwaschen. Bei diesem Puffer handelt es sich um PBS, dem die Proteinzusätze FCS und BSA sowie Natriumazid hinzugefügt wurden. Dabei wirken die Proteinzusätze als stabilisierende Schutzkolloide, die das zellphysiologische Milieu nachahmen sollen. Zudem verringern sie die Adhärenz der Zellen an die Wand der Röhrchen. Das hinzugefügte Natriumazid soll die Endozytose unterdrücken. Anschließend wurden die Proben bei 4°C und 1300 RPM 5 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Darauf wurde der Überstand bis auf das entstandene Zellpellet abgesaugt und verworfen. Für die Färbung und anschließende Messung der Monozyten wurde ein Mastermix aus den benötigten Antikörpern erstellt. Zu 100 µl des FACS Puffers wurden 2 µl CD14 Antikörper, 2 µl IL-1 α Antikörper, sowie 0,5 µl des CD16 Antikörpers hinzugefügt. Von dem Mastermix wurden anschließend 50 µl zu einem der Zellpellets gegeben, während zum zweiten Zellpellet nur 50 µl des FACS Puffers gegeben wurde. Die Proben wurden daraufhin 45 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml des FACS Puffers wurden die Proben erneut bei 4°C und 1300 rpm zentrifugiert, um nicht gebundene Antikörper abzutrennen um damit störenden Hintergrundemissionen zu minimieren. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Proben für die Messung fixiert. Dazu wurde 4%

Paraformaldehyd Lösung 1:1 mit PBS zu einer 2% Lösung verdünnt und davon 300 µl auf die Zellpellets gegeben und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. In einem letzten Waschschrift wurde 2 ml des FACS Puffers zu den beiden Proben hinzu gegeben und nochmals bei 4°C und 1300 RPM 5 min zentrifugiert und daraufhin der so entstandene Überstand abgesaugt. Schließlich wurde in beide Röhrchen nochmal 300 µl des FACS Puffers hinzugegeben und vermischt. Unter Verwendung entsprechender Isotyp-Kontrollen wurde vor Beginn der Experimente die Spezifität der verwendeten Antikörper bestätigt.

3.2.2.3 Messung der Zellen und Analyse

Unmittelbar vor der Messung wurden die Proben per Rotationsschüttler vermischt. Daraufhin wurden die Proben mithilfe des Durchflusszytometers FACS Canto II von BD Biosciences gemessen und mithilfe der FACS-Diva Software (Beckton Dickinson) ausgewertet. Diese Software erlaubt das Erstellen von Quadranten- und Histogrammstatistiken. Dadurch wird eine optimale Differenzierung einzelner Zellpopulationen und die Berechnung der entsprechenden prozentualen Verteilung von Subpopulationen ermöglicht.

Die Auswertung erfolgte als Histogramm oder als „Dot Plot“ (Punktgraph). Beim „Dot Plot“ werden zwei Ergebniswerte gegeneinander aufgetragen. Schnittstellen beider Werte werden durch einen Punkt markiert. Durch Bereichseinschränkungen („Gates“) ist es nun möglich nur Messwerte aus bestimmten Teilbereichen zu erfassen. Mittels eines ausgewählten Gates lassen sich bestimmte Populationen in Abhängigkeit ihrer Fluoreszenzeigenschaften genauer charakterisieren. Für die Auswertung lassen sich die Schaubilder so in verschiedene Regionen unterteilen.

Die emittierten Wellenlängen können sich über einen großen Bereich um ihren Maximalwert erstrecken. Dabei kann es passieren, dass sich die emittierten Wellenlängen zweier Fluorochrome überlappen und so, ohne Kompensation, falsch positive Signale hervorrufen.

Daher kam es im Rahmen der Messung zu Kompensation um falsch positive Signale von richtig positiven Signalen zu trennen.

3.2.3. Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der experimentell erhobenen Daten erfolgte mithilfe des Statistikprogramms RStudio. Für den Vergleich zwischen Monozytenanteilen von Patienten

und Kontrollpersonen wurde der t-Test für unverbundene Stichproben verwendet. Zudem wurden der 1 Way ANOVA Test, sowie der Bonferroni Multiple Comparison Test verwendet um die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen zu untersuchen.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe von Punkt-Streu Diagrammen. Hierfür wurde eine Box als grau hinterlegtes Rechteck gezeichnet, welche jeweils am Mittelwert endet. Eine nach oben und unten vom Mittelwert abgehende horizontale Linie kennzeichnen zusätzlich den Standardfehler.

4. Ergebnisse

4.1 Patientencharakteristika der Gesamtgruppe

Untersucht wurden insgesamt 209 Blutproben von AMI Patienten bei denen Risikofaktoren, sowie relevante Laborparameter bestimmt wurden. Die anthropometrischen Daten der 209 Datensätze sind in Tabelle 1 dargestellt. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 62,8 Jahre, mit einer Altersspanne von 33 bis 90 Jahren. Von den 209 Patienten waren 46 Frauen (22%) und 163 Männer (78%). Das durchschnittliche Alter der Frauen war 65,7, das der Männer 62,1. Es bestand kein signifikanter Altersunterschied zwischen den Geschlechtern ($p=0,077$).

Parameter	Gesamt n = 209	Männer n = 163	Frauen n = 46	p-Wert
Geschlecht	100 %	78 %	22%	-
Alter	62,8	62,1	65,7	0,0766

Tabelle 1: Häufigkeitsverteilung der anthropometrischen Patientendaten

Die Daten verschiedener, für diese Arbeit relevanter, gesundheitsbezogener Charakteristika sind in Tabelle 2 und 3 dargestellt. Von den 209 in die Studie eingeschlossenen Patienten erlitten 118 Patienten einen NSTEMI und 90 Patienten einen STEMI. Durchschnittlich litten etwa 29% der Patienten an einem Diabetes mellitus Typ 2 und etwa 69% der Patienten an einem arteriellen Hypertonus. In 52% der Fälle gaben Patienten an, dass Eltern oder Geschwister in der Vergangenheit von kardiovaskulären Erkrankungen betroffen waren. Ein Viertel der Patienten war adipös und mehr als 77% der Patienten berichtete in der Vergangenheit geraucht zu haben oder aktuell zu rauchen.

Parameter	Gesamt	NSTEMI	STEMI
	209 (100%)	118 (100%)	90 (100%)
Diabetes	60 (28,7%)	39 (33%)	21 (23%)
Hypertonus	144 (68,9%)	80 (67,8%)	64 (71,1%)
Positive Familienanamnese	108 (51,7%)	57 (48,3%)	51 (56,7%)

Adipositas	52 (24,9%)	31 (26,3%)	21 (23,3%)
Raucher	77 (36,8%)	38 (32,2%)	39 (43,3%)
Ex-Raucher	85 (40,7%)	52 (44,1%)	33 (36,7%)

Tabelle 2: Häufigkeitsverteilung der Risikofaktoren der Patienten

Durchschnittlich kamen die untersuchten Patienten auf 34,5 pack years Zigarettenkonsum, wobei eine Standardabweichung von 27,8 eine große Streuung der Werte zeigt. Der durchschnittliche BMI lag bei 28,9, mit einer geringen Standardabweichung von 5,7. Der Mittelwert der Ejektionsfraktionen aller Patienten zeigte mit 54% einen nur leicht eingeschränkten Wert. Der maximale Troponinwert, als wichtigster Laborparameter nach Herzmuskelschaden, stieg erwartungsgemäß bei der Gesamtgruppe der Patienten mit 3060,7 ng/ml auf einen sehr hohen Mittelwert, wobei eine Standardabweichung von 6129,1 die große Streuung unterstreicht. Hierbei ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Troponin-Werten der NSTEMI im Vergleich zur STEMI Gruppe ($p=0,0003$).

Auch der mittlere maximale CK-Wert in der Gesamtpopulation war mit 1326,7 U/l deutlich erhöht, und war in der STEMI Gruppe signifikant höher ($p=0,0008$). Der Cholesterin-, sowie der LDL-Cholesterin Wert lagen durchschnittlich bei 188,1 mg/dl und 119,7 mg/dl.

Parameter	Mittelwert	Standardabweichung	NSTEMI Mittelwert (Standardabweichung)	STEMI Mittelwert (Standardabweichung)	p-Wert
Packyears	34,5	27,1	33,3 (30,4)	35,9 (22,1)	0,526
BMI (kg/m²)	28,9	5,7	28,9 (5,9)	28,8 (5,5)	0,38
Herzfrequenz (/min)	78,1	13,2	77,6 (13,3)	78,1 (13,2)	0,789
EF (%)	54	11	55,2 (11,4)	53,1 (10,1)	0,211
Troponin T max. (ng/ml)	3060,7	6129,1	1652,6 (4617,9)	4855,7 (7218,4)	0,0003
CK max (U/l)	1326,7	1590,6	988,4 (1291,9)	1761,7 (1809,1)	0,0008
HbA1c (mmol/l)	6,14	1,25	6,2 (1,2)	6,08 (1,4)	0,513
Kreatinin (µmol/l)	0,99	0,41	0,98 (0,3)	1,01 (0,5)	0,586
CRP (mg/dl)	74,7	90,1	85,3 (104,1)	66,6 (65,4)	0,168
Cholesterin (mg/dl)	188,1	46	188,7 (49,8)	187,5 (40,7)	0,859
LDL-C (mg/dl)	119,7	43,3	120,5 (46,4)	118,8 (39,2)	0,779
HDL-C (mg/dl)	47,6	15,5	47,4 (15,6)	47,2 (15,4)	0,866

Tabelle 3: Patientencharakteristika

4.2 Patientencharakteristika der Gruppe mit Monozytenisolation

Im Zeitraum von Juli 2014 bis November 2015 wurden bei 58 konsekutiven Patienten zusätzlich periphere mononukleäre Zellen isoliert und untersucht.

Die anthropometrischen Daten dieser Patienten sind in Tabelle 4 dargestellt. Das Durchschnittsalter betrug hier 63 Jahre, mit einer Altersspanne von 38 bis 88 Jahren. Von den 58 Patienten waren 14 Frauen (24%) und 44 Männer (76%). Das durchschnittliche Alter der Frauen war 65,7, das der Männer 62,1. Es bestand kein signifikanter Altersunterschied zwischen den Geschlechtern ($p=0,22$).

Parameter	Gesamt n = 58	Männer n = 44	Frauen n = 14	p-Wert
Geschlecht	100 %	76%	24%	-
Alter	63	62,1	65,7	0,22

Tabelle 4: Häufigkeitsverteilung der anthropometrischen Patientendaten bei Isolation der PBMC

Die Daten verschiedener gesundheitsbezogener Charakteristika sind in Tabelle 5 und 6 dargestellt. Von den 58 Patienten, bei denen eine PBMC Isolation erfolgt ist, erlitten 31 Patienten einen NSTEMI und 27 Patienten einen STEMI. Durchschnittlich litten etwa 35% der Patienten an einem Diabetes mellitus Typ 2 und etwa 48% der Patienten an einem arteriellen Hypertonus. In 27% der Fälle gaben Patienten an, dass Eltern oder Geschwister in der Vergangenheit von kardiovaskulären Erkrankungen betroffen waren. Etwa ein Viertel der Patienten war adipös. Mehr als 77% der Patienten gaben an, in der Vergangenheit entweder geraucht zu haben oder aktuell zu rauchen.

Parameter	Gesamt	NSTEMI	STEMI
	58 (100%)	31 (100%)	27 (100%)
Diabetes	20 (34,5%)	11 (35,5%)	9 (33,3%)
Hypertonus	48 (82,8%)	28 (90,3%)	20 (74,1%)
Positive Familienanamnese	27 (46,6%)	13 (41,9%)	14 (51,9%)
Adipositas	15 (25,9%)	10 (32,3%)	5 (18,5%)
Raucher	24 (41,4%)	7 (22,6%)	17 (63%)
Ex-Raucher	21 (36,2%)	17 (54,8%)	4 (14,8%)

Tabelle 5: Häufigkeitsverteilung der Risikofaktoren der Patienten bei erfolgter Isolation der PBMC

Durchschnittlich lag der Zigarettenkonsum der untersuchten Patienten bei 36,2 pack years, wobei eine Standardabweichung von 23,1 die große Streuung der Werte zeigt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der NSTEMI und der STEMI Gruppe (p=0,366). Der Mittelwert des BMI der Patienten lag bei 28,2 kg/ m² mit einer Standardabweichung von 5,7. Die Ejektionsfraktion der Patienten mit Monozytenisolation zeigte mit durchschnittlich 55% einen Wert im Normbereich. Der maximale Troponinwert, als wichtigster Laborparameter nach Herzmuskelschaden, stieg erwartungsgemäß auch bei Gruppe mit Monozytenisolation mit 2471,7 ng/ml auf einen sehr hohen Mittelwert, wobei eine Standardabweichung von 2961,5 die große Streuung unterstreicht. Die Troponinwerte der STEMI Gruppe waren auch hier signifikant höher als die der NSTEMI Gruppe (p=0,002). Der durchschnittliche maximale CK-Wert war mit 1172,8 U/l wieder deutlich erhöht, wies jedoch eine hohe Streuung auf. Auch in der Gruppe zeigte sich ein signifikant höherer CK-Wert in der STEMI Gruppe im Vergleich zur NSTEMI Gruppe (p=0,013). Der Cholesterin- sowie der LDL-Cholesterin-Wert lagen bei 183,2 mg/dl und 113,2 mg/dl.

Parameter	Mittelwert	Standardabweichung	NSTEMI Mittelwert (Standardabweichung)	STEMI Mittelwert (Standardabweichung)	p-Wert
Packyears	36,2	23,1	39,4 (26,7)	33 (17,3)	0,366
BMI (kg/m²)	28,2	5,7	29,11 (6,3)	27,2 (4,5)	0,192
Herzfrequenz (/min)	77,9	13,9	78,4 (14,7)	77,3 (13,1)	0,762
EF (%)	54,5	10,1	55,1 (10,6)	53,8 (9,1)	0,695
Troponin T max. (ng/ml)	2471,7	2961,5	1300,6 (1496,3)	3816,3 (3544,3)	0,002
CK max (U/l)	1172,8	1094	838 (927,7)	1557,2 (1123,5)	0,013
HbA1c (mmol/l)	6,32	1,53	6,1 (0,64)	6,52 (2,1)	0,418
Kreatinin (µmol/l)	0,95	0,37	0,95 (0,27)	0,96 (0,46)	0,936
CRP (mg/dl)	67,7	101,6	62,4 (116,9)	73,75 (77,5)	0,666
Cholesterin (mg/dl)	183,2	38,8	175 (34,4)	191,6 (41,3)	0,143
LDL-C (mg/dl)	113,1	36,1	101,7 (30,3)	124,9 (37,9)	0,025
HDL-C (mg/dl)	47	18,2	50,4 (20,6)	43,5 (14,5)	0,191

Tabelle 6: Patientencharakteristika der Gruppe mit Isolation der PBMC

4.3 Charakteristika der Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe dienten 15 Mitarbeiter des Universitätsklinikum des Saarlandes, die sich beim Betriebsarzt zur Kontrolluntersuchung vorgestellt hatten. Voraussetzung war das Fehlen kardiovaskulärer Vorerkrankungen und einer Dauermedikation.

Die anthropometrischen Daten dieser Patienten sind in Tabelle 7 dargestellt. Das Durchschnittsalter betrug hier 57,9 Jahre, mit einer Altersspanne von 43 bis 73 Jahren. Von den 15 Kontrollpersonen waren 11 Frauen (73%) und 4 Männer (27%). Das durchschnittliche Alter der Frauen war 58 das der Männer 56 Jahre. Es bestand kein signifikanter Altersunterscheid zwischen den Geschlechtern ($p=0,812$).

Parameter	Gesamt n = 15	Männer n = 4	Frauen n = 11	p-Wert
Geschlecht	100%	26,7%	73,3%	-
Alter	57,9	56,3	58,4	0,812

Tabelle 7: Häufigkeitsverteilung der anthropometrischen Daten der Kontrollgruppe

Die Charakteristika der Probanden sind in Tabelle 8 und 9 dargestellt. Keiner der Probanden litt an einem Diabetes mellitus Typ 2 oder gab an, dass Eltern oder Geschwister in der Vergangenheit von kardiovaskulären Erkrankungen betroffen waren. Eine Person litt unter einem leichten arteriellen Hypertonus. Eine Kontrollperson war adipös. Insgesamt gaben 10 Personen an zu rauchen.

Parameter	Gesamt
	15 (100%)
Diabetes	0 (0%)
Hypertonus	1 (6,7%)
Positive Familienanamnese	0 (0%)
Adipositas	1 (6,7%)
Raucher	10 (66,7%)
Ex-Raucher	0 (0%)

Tabelle 8: Häufigkeitsverteilung relevanter Risikofaktoren der Kontrollgruppe

Die Kontrollpersonen gaben durchschnittlich einen Zigarettenkonsum von 13,3 pack years an. Allerdings zeigt eine Standardabweichung von 8,7 eine recht hohe Streuung. Der Mittelwert des BMI der Kontrollpersonen lag mit 25,3 kg/m² und einer Standardabweichung von 2,9 knapp über dem Normalgewicht. Troponin- und CK-Wert lagen im Normbereich. Der durchschnittliche Cholesterin- sowie LDL-Cholesterin-Wert lagen bei 197,3 mg/dl und 112,5 mg/dl.

Parameter	Mittelwert	Standardabweichung
Packyears	13,3	8,7
BMI (kg/m²)	25,3	2,9
Herzfrequenz (/min)	79,4	10
Troponin T max. (ng/ml)	4,3	2
CK max (U/l)	123,3	52,4
HbA1c (mmol/l)	5,3	0,27
Kreatinin (µmol/l)	0,79	0,79
CRP (mg/dl)	2,1	1,9
Cholesterin (mg/dl)	197,3	36,9
LDL (mg/dl)	112,5	35,2
HDL (mg/dl)	67,8	16,4

Tabelle 9: Charakteristika der Kontrollgruppe

4.4 Blutbild der Gruppe mit Monozytenisolation

Die Daten des Blutbildes der Gruppe mit Monozytenisolation sind in Tabelle 10 dargestellt. Die durchschnittliche Anzahl an Leukozyten bei den Patienten betrug $10,3 \times 10^3/\mu\text{L}$ bei einer Standardabweichung von 3,03. Der Mittelwert der Thrombozyten lag bei 232,44 /nl bei einer Standardabweichung von 55,76. Sowohl der MCV-, als auch der MCH-Wert lagen mit 87,1 fL und 30,3 pg im Normbereich. Der durchschnittliche Hämoglobin-Wert lag bei 13,3 g/dL.

Parameter	Mittelwert	Standardabweichung	NSTEMI Mittelwert (Standard- abweichung)	STEMI Mittelwert (Standard- abweichung)
Leukozyten ($10^3/\mu\text{L}$)	10,03	3,03	9,31 (3,1)	10,86 (2,7)
Thrombozyten (/nL)	232,45	55,76	229,42 (56,6)	235,93 (54,5)
Hämoglobin (g/dL)	13,25	1,96	12,91 (1,8)	13,64 (2,1)
MCV (fL)	87,09	4,41	88,1 (4,2)	85,93 (4,3)
MCH (pg)	30,34	1,66	30,58 (1,5)	30,07 (1,7)

Tabelle 10: Blutbild der Gruppe mit Monozytenisolation

4.5 Blutbild Kontrollgruppe

Die Daten des Blutbildes der Kontrollgruppe sind in Tabelle 11 dargestellt. Durchschnittlich ließen sich $7,26 \times 10^3/\mu\text{L}$ Leukozyten, bei einer geringen Standardabweichung von 1,67, bei den Kontrollpersonen messen. Die durchschnittliche Anzahl an Thrombozyten betrug 261,9 /nL bei einer Standardabweichung von 46,3. Sowohl der MVC-, als auch der MCH-Wert der Kontrollgruppe lagen mit 88,8 fL und 29,4 pg im Durchschnitt im Normbereich. Der Mittelwert der Hämoglobin-Konzentration lag bei 14,1 d/dL.

Parameter	Mittelwert	Standardabweichung
Leukozyten ($10^3/\mu\text{L}$)	7,26	1,67
Thrombozyten (/nL)	261,93	46,27
Hämoglobin (g/dL)	14,09	1,43
MCV (fL)	88,8	5,16
MCH (pg)	29,38	2,88

Tabelle 11: Blutbild der Kontrollgruppe

4.6. Darstellung der durchflusszytometrischen Messungen

Die Bestimmung der Expression verschiedener Oberflächenantigene auf Monozyten erfolgte mittels durchflusszytometrischer Messungen. Hierbei wurde das Blut von Patienten mit nicht ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI) und ST-Hebungsinfarkt (STEMI), sowie von gesunden Probanden untersucht. Um die unterschiedlichen Resultate der Messungen zwischen gesunden Blutspendern und NSTEMI bzw. STEMI Patienten zu veranschaulichen wurden graphische Darstellungen in Form von Punkt-Streu Diagrammen eingesetzt. Dabei ist für jede Messreihe jeweils ein Punkt-Streu Diagramm zur graphischen Darstellung unterschiedlicher Verteilungen der Oberflächenantigenexpression aufgeführt.

4.6.1 CD14+ Monozyten

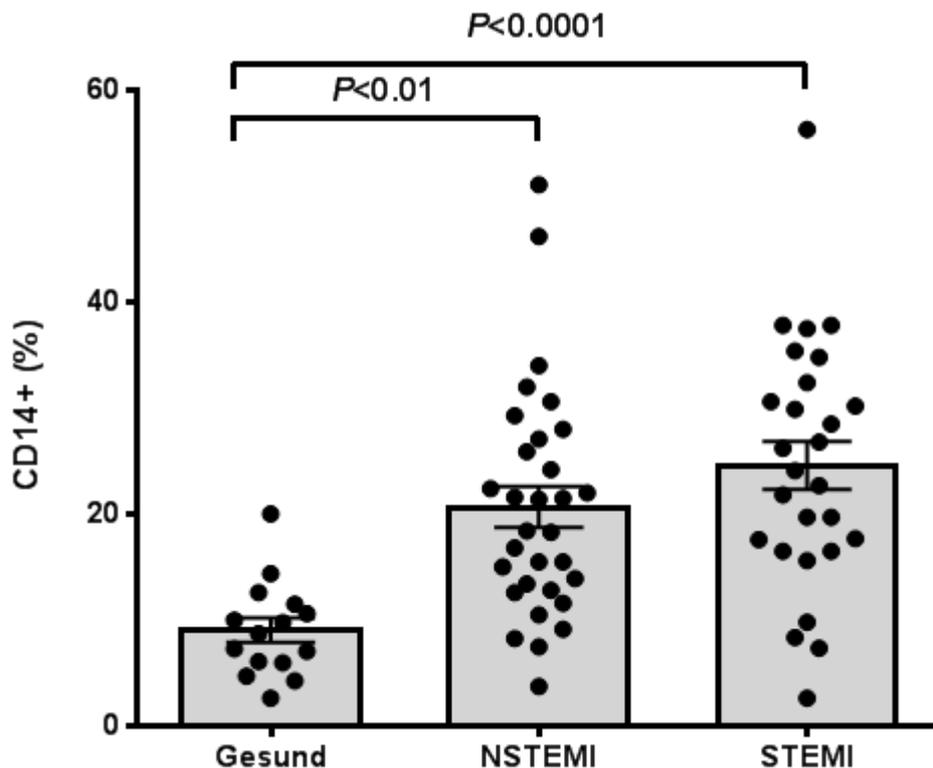


Abbildung 6: Gruppenvergleich der relativen Anzahl an CD14+ Monozyten an der Gesamtzahl peripherer mononukleärer Zellen. Der grau unterlegte Bereich endet jeweils am Mittelwert. Die davon abgehenden Striche stellen den Standardfehler dar. Der Unterschied ist mit $p < 0,01$ bzw. $p < 0,0001$ signifikant zwischen Kontrollgruppe und NSTEMI und STEMI Patienten.

Die isolierten Monozytenproben unserer Patientenkollektive NSTEMI und STEMI wurden in einem ersten Ansatz durchflusszytometrisch auf die relative Anzahl an peripheren mononukleären Zellen untersucht, die sich mit Antikörpern gegen das CD14-Antigen anfärben ließen. Die relativen Zahlen der CD14-positiven Monozyten in den genannten zwei Populationen wurde mit denen der gesunden Kontrollgruppe verglichen.

	Gesund	NSTEMI	STEMI
Anzahl	15	31	27
Mittelwert	9 %	20,7 %	24,6%
Standardabweichung	4,5 %	10,8 %	11,7%
Median	8,7%	18,4%	24,1%

Tabelle 12: Gruppenvergleich der relativen Anteile an CD14+ Monozyten an der Gesamtzahl peripherer mononukleärer Zellen

Die relativen Anteile der CD14-positiven Monozyten von gesunden Probanden waren im Vergleich mit denen der NSTEMI und STEMI Patienten deutlich niedriger. Mittels des Bonferroni Multiple Comparison Tests wurden diese Zusammenhänge untersucht. Im Vergleich der gesunden Kontrollgruppe mit der NSTEMI Gruppe ergab sich mit einem p-Wert von $<0,01$ ein signifikanter Unterschied. Noch deutlicher zeigte sich der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der STEMI Gruppe mit einem p-Wert $<0,0001$.

4.6.2 CD14+CD16+ Monozyten

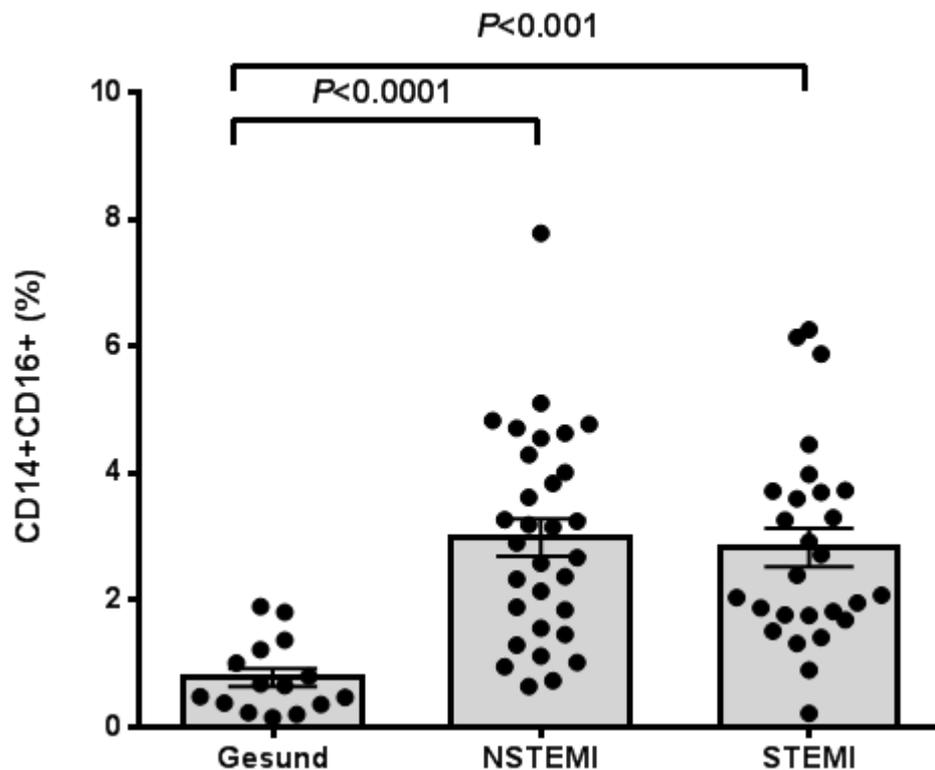


Abbildung 7: Gruppenvergleich der relativen Anzahl an CD14+CD16+ Monozyten an der Gesamtzahl peripherer mononukleärer Zellen. Der grau unterlegte Bereich endet jeweils am Mittelwert. Die davon abgehenden Striche stellen den Standardfehler dar. Der Unterschied ist mit $p < 0,0001$ bzw. $p < 0,001$ signifikant zwischen Kontrollgruppe und NSTEMI und STEMI Patienten.

Im nächsten Ansatz wurden die isolierten Monozyten der Patientenkollektive durchflusszytometrisch auf die relative Anzahl an Monozyten untersucht, die sich mit Antikörpern gegen das CD14-Antigen und das CD16-Antigen anfärben ließen.

	Gesund	NSTEMI	STEMI
Anzahl	15	31	27
Mittelwert	0,8 %	3 %	2,8 %
Standardabweichung	0,6 %	1,6 %	1,6 %
Median	0,7 %	2,9 %	2,4 %

Tabelle 13: Gruppenvergleich der relativen Anteile an CD14+CD16+ Monozyten an der Gesamtzahl peripherer mononukleärer Zellen

Die relativen Anteile der CD14-positiven Monozyten von gesunden Probanden waren im Vergleich mit denen der NSTEMI und STEMI Patienten deutlich niedriger. Mittels des Bonferroni Multiple Comparison Tests wurden diese Zusammenhänge untersucht. Im Vergleich der gesunden Kontrollgruppe mit der NSTEMI Gruppe ergab sich mit einem p-Wert von $<0,0001$ ein signifikanter Unterschied. Der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der STEMI Gruppe war auch hier mit einem p-Wert $<0,001$ signifikant.

4.6.3. Expression von IL-1 α auf CD14+ Monozyten

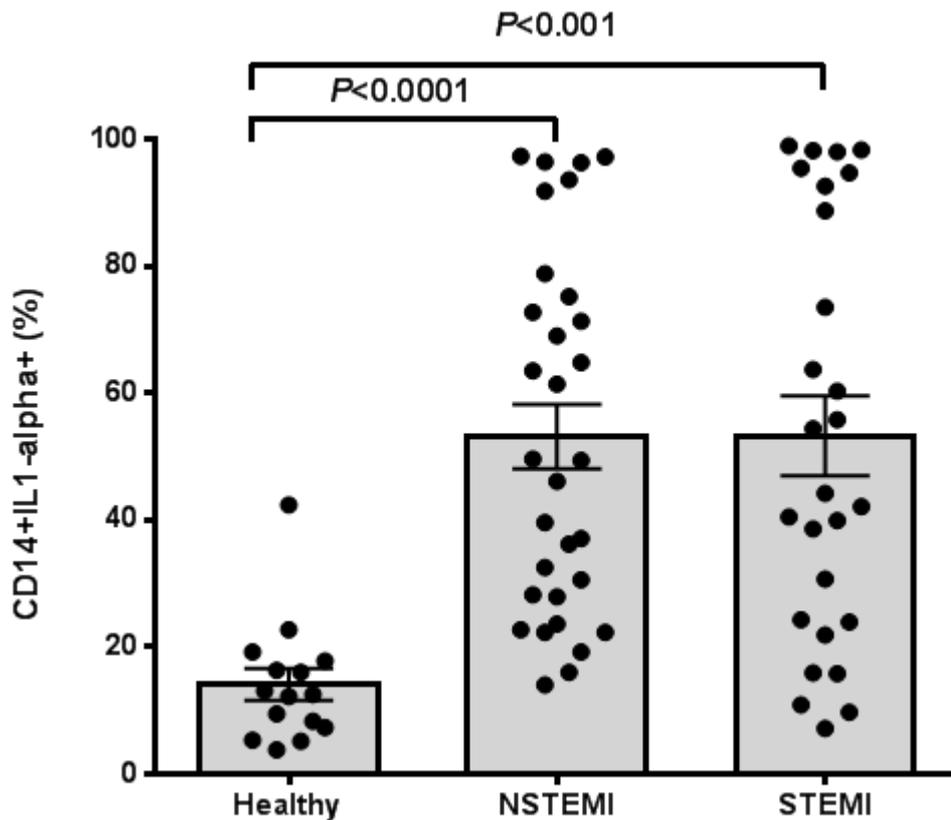


Abbildung 8: Vergleich des Anteils CD14+IL-1 α Monozyten an der Zahl CD14+ Monozyten. Der grau unterlegte Bereich endet jeweils am Mittelwert. Die davon abgehenden Striche stellen den Standardfehler dar. Der Unterschied ist mit $p < 0,0001$ bzw. $p < 0,001$ signifikant zwischen Kontrollgruppe und NSTEMI und STEMI Patienten.

Im nächsten Ansatz wurden die isolierten Monozyten der Patientenkollektive durchflusszytometrisch auf die relative Anzahl an Monozyten untersucht, die sich mit Antikörpern gegen das CD14-Antigen und das IL-1 α Antigen anfärben ließen.

	Gesund	NSTEMI	STEMI
Anzahl	15	31	27
Mittelwert	14,1 %	53,1 %	53,3 %
Standardabweichung	9,6 %	28,3 %	32,6 %
Median	12,5 %	49,4 %	44,2 %

Tabelle 14: Gruppenvergleich der relativen Anteile an CD14+IL-1 α Monozyten an der Gesamtzahl CD14+ Monozyten

Die relativen Anteile der CD14⁺ Monozyten, die auch IL-1 α exprimierten von gesunden Probanden waren im Vergleich mit denen der NSTEMI und STEMI Patienten deutlich niedriger. Mittels des Bonferroni Multiple Comparison Tests wurden diese Zusammenhänge untersucht. Im Vergleich der gesunden Kontrollgruppe mit der NSTEMI Gruppe ergab sich mit einem p-Wert von <0,0001 ein signifikanter Unterschied. Der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der STEMI Gruppe war auch hier mit einem p-Wert <0,001 signifikant.

4.6.4. Expression von IL-1 α auf CD14+CD16+ Monozyten

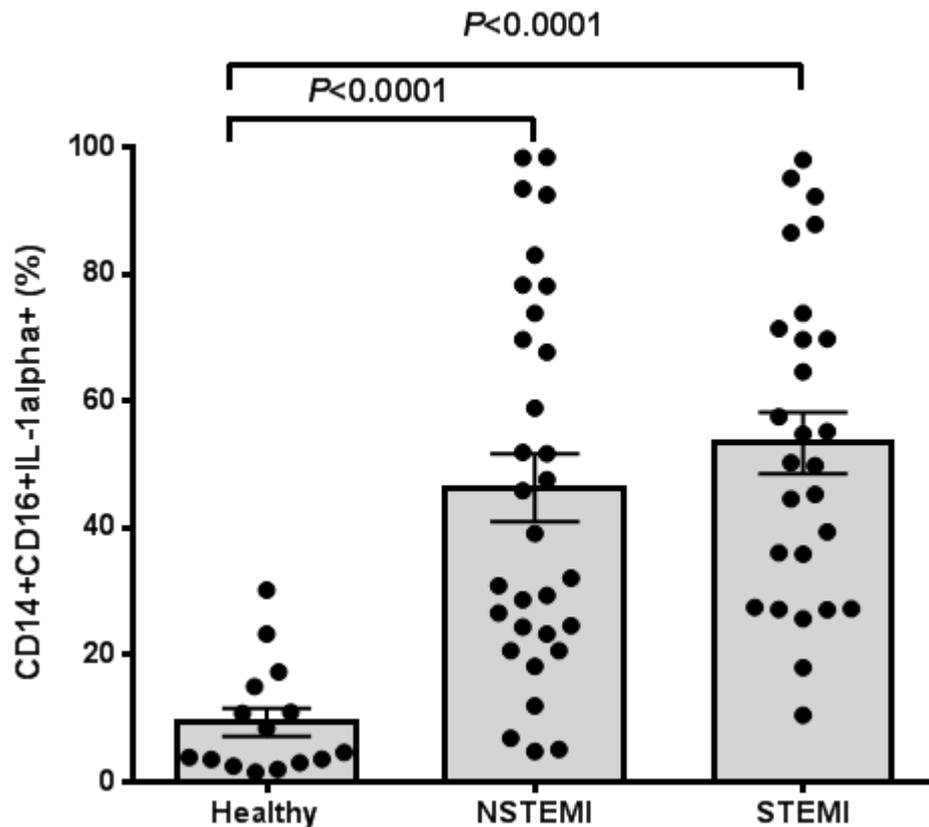


Abbildung 9: Vergleich des Anteils CD14+CD16+IL-1 α Monozyten an der Zahl CD14+CD16+ Monozyten. Der grau unterlegte Bereich endet jeweils am Mittelwert. Die davon abgehenden Striche stellen den Standardfehler dar. Der Unterschied ist mit $p < 0,0001$ bzw. $p < 0,0001$ signifikant zwischen Kontrollgruppe und NSTEMI und STEMI Patienten.

Im letzten Ansatz wurden die isolierten Monozyten der Patientenkollektive durchflusszytometrisch auf die Anzahl an Monozyten untersucht, die sich mit Antikörpern gegen das CD14-Antigen, das CD16-Antigen, sowie das IL-1 α -Antigen anfärben ließen. Diese Zahl wurde in Relation gesetzt zu der Anzahl der CD14+CD16+ Monozyten.

	Gesund	NSTEMI	STEMI
Anzahl	15	31	27
Mittelwert	9,4 %	46,3 %	53,4 %
Standardabweichung	8,7 %	29,6 %	25,2 %
Median	4,6 %	39,1 %	50,3 %

Tabelle 15: Gruppenvergleich der relativen Anteile an CD14+CD16+IL-1 α Monozyten an der Gesamtzahl CD14+CD16+ Monozyten.

Die relativen Anteile der CD14+CD16+ Monozyten, die auch IL-1 α exprimierten von gesunden Probanden waren im Vergleich mit denen der NSTEMI und STEMI Patienten deutlich niedriger. Mittels des Bonferroni Multiple Comparison Tests wurden diese Zusammenhänge untersucht. Im Vergleich der gesunden Kontrollgruppe mit der NSTEMI Gruppe ergab sich mit einem p-Wert von $<0,0001$ ein signifikanter Unterschied. Der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der STEMI Gruppe war auch hier mit einem p-Wert $<0,0001$ signifikant.

5. Diskussion

5.1 Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde der Zusammenhang zwischen membrangebundener IL-1 α Expression auf zirkulierenden Monozyten und Myokardinfarkten, sowie das Ausmaß dieser Expression untersucht. Es sollte die Hypothese überprüft werden, dass Herzinfarktpatienten im Vergleich zu gesunden Personen eine stärkere Expression von IL-1 α auf zirkulierenden Monozyten aufweisen. Zudem wurde untersucht, ob sich die Unterscheidung in STEMI und NSTEMI Herzinfarktpatienten auch in einem unterschiedlichen Expressionsausmaß von IL-1 α auf zirkulierenden Monozyten widerspiegelt.

So wurden 209 Patienten, die entweder einen NSTEMI oder STEMI Myokardinfarkt erlitten hatten, im Rahmen ihres Aufenthaltes in der Intensivstation der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums des Saarlandes, jeweils am Morgen nach Aufnahme venöse Blutproben entnommen und verschiedene Laborparameter bestimmt. Aus dieser Gesamtgruppe wurden bei 58 Patienten zudem Monozyten frisch aus den Blutproben isoliert und durchflusszytometrisch untersucht. Da es sich um eine repräsentative Stichprobe des größeren Patientenkollektivs handelte kann von einer Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das Gesamtkollektiv ausgegangen werden. Zudem wurden als Kontrollgruppe 15 gesunde Probanden rekrutiert bei denen neben der Bestimmung von Laborparametern ebenfalls Monozyten isoliert und durchflusszytometrisch untersucht wurden.

Bei den durchflusszytometrischen Messungen der Blutproben von NSTEMI und STEMI Patienten war der Anteil der CD14⁺ Monozyten an der Gesamtzahl der peripheren Blutmonozyten (PBMC) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht. Durchschnittlich waren bei der Kontrollgruppe 9% der PBMCs CD14⁺ Monozyten. Dieser Anteil war bei der NSTEMI und STEMI Gruppe durchschnittlich mit 20,7% und 24,6% mehr als doppelt so hoch.

Auch bei der Untersuchung der Proben auf den Anteil CD14⁺CD16⁺ Monozyten zeigte sich ein erheblicher Unterschied zwischen Kontrollgruppe und den NSTEMI bzw. STEMI Gruppen. Insgesamt ließen sich deutlich weniger PBMCs gleichzeitig mit CD14⁺ und CD16⁺

Antikörpern anfärben. In der Kontrollgruppe gelang dies durchschnittlich bei 0,8% der Proben, bei NSTEMI und STEMI Gruppe im Mittel bei 3% und 2,8% der Proben.

Bei diesen Vorbefunden interessierte uns nun besonders, wie hoch der Anteil von CD14+ Monozyten wäre, die gleichzeitig auch IL-1 α auf der Oberfläche tragen. Bei dem Vergleich von CD14+IL-1 α Monozyten mit nur CD14+ Monozyten fiel auf, dass sich Kontrollgruppe und NSTEMI und STEMI Gruppen signifikant unterscheiden. Mit einem durchschnittlichen Anteil von 14,1 % exprimierten deutlich weniger CD14+ Monozyten gesunder Probanden zusätzlich IL-1 α als bei der NSTEMI (53,1%) und der STEMI (53,3%) Gruppe. Ein ähnlich deutlicher Unterschied zeigte sich auch bei den Anteilen CD14+CD16+ Monozyten, die zusätzlich auch IL-1 α auf ihrer Oberfläche exprimierten. Hier fanden sich durchschnittlich 9,4% in der Kontrollgruppe und 46,3% bzw. 53,4% in NSTEMI und STEMI Gruppe. Die Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und NSTEMI bzw. STEMI waren auch hier signifikant. Sowohl für die CD14+ Monozyten, als auch für die CD14+CD16+ Monozyten konnte demnach eine deutliche Häufigkeitszunahme von IL-1 α auf der Membran nach Myokardinfarkt festgestellt werden.

5.2 Vergleich mit der aktuellen Studienlage

5.2.1 Monozyten nach akutem Myokardinfarkt

Schon frühere Studien konnten eine deutliche Erhöhung von peripheren Blutmonozytenzahlen nach akutem Myokardinfarkt nachweisen. So konnten Neil et al in einem klinischen Setting, eine Erhöhung der peripheren Monozytenzahlen um das 2-fache des Ausgangswertes 48 Stunden nach Herzinfarkt ereignis aufzeigen. Wobei in dieser Arbeit die Monozytenkonzentration der Infarkt Patienten unmittelbar nach Erreichen des Krankenhauses als Ausgangswert verwendet wurde. Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Promotionsarbeit wurde ein deutliches Überwiegen der CD14+CD16- Monozyten 48 Stunden nach MI festgestellt (Ruparelia et al. 2015). Ein Höhepunkt der Konzentration an CD14+CD16- Monozyten ließ sich 3 Tage nach Infarkt beobachten, während die Konzentration an CD14+CD16+ am Tag 5 nach Infarkt am Höchsten war (Tjujioka 2009).

In dieser Arbeit wurde nun erstmals gezeigt, dass es nach akutem Myokardinfarkt zu einer Erhöhung der Expression von IL-1 α auf klassischen CD14+CD16- und auf CD14+CD16+ Monozyten kommt.

Die postinfarzielle Heilung ist ein komplexer und dynamischer Prozess, der aus der Ersetzung nekrotischen Myokards durch Narbengewebe besteht und entscheidend durch Monozyten vermittelt wird. Während Monozyten also einerseits für Heilungsprozesse nach AMI mitverantwortlich sind, konnten immer mehr Studien zeigen, dass eine unkontrollierte, verstärkte und anhaltende Monozytose dem Heilungsverlauf negativ beeinflusst und somit die Prognose der betroffenen Patienten verschlechtert (Han et al. 2014). Hierbei korreliert das Ausmaß der peripheren Monozytenkonzentration mit dem der irreversiblen Schädigung des Myokards (Ruparelia et al. 2015). Mittlerweile kann eine Differenzierung zwischen den Aufgaben der klassischen CD14+CD16- und der CD16+ Monozyten getroffen werden. Eine exzessive Akkumulation von CD14+CD16- Monozyten nach AMI verstärkt höchstwahrscheinlich die myokardiale Inflammation und führt zu einer Expansion des Infarktes, sowie verstärktem „ventricular remodeling“. Also strukturelle Umbildungen in der Ventrikelarchitektur, die zu einer Verschlechterung der Herzleistung führen. So waren Patienten mit einer erhöhten Anzahl von klassischen Monozyten zum Zeitpunkt des Infarktes anfälliger für Herzversagen (Tsujioka et al. 2009) und zeigten ein funktionell schlechtes Outcome im Vergleich mit Patienten mit niedrigeren Monozytenzahlen (Van der Laan et al. 2012). Die Relevanz der CD16+ Monozyten in der Infarktregeneration ist weniger gut verstanden. So ließ sich bisher kein relevanter Zusammenhang zwischen der Blutkonzentration dieser Monozyten nach AMI und Parametern des funktionellen Outcomes feststellen. Der später auftretende Höhepunkt der Blutkonzentration dieser Monozyten, im Vergleich mit klassischen Monozyten, sowie deren Anreicherung im Granulationsgewebe legen eine Rolle in der Angiogenese und Narbenformation nahe. (Van der Laan et al. 2014) Interessant ist zudem, dass der Anteil der CD14+CD16+ an der Gesamtzahl der Monozyten in der post-infarziellen Heilungsphase im Kern des Infarktes mit 40% deutlich höher ist, als ihr Anteil an der Gesamtmonozytenzahl mit 10-15% (Tsujioka et al. 2009). Dies deutet darauf hin, dass CD14+CD16+ Monozyten gezielt zum Ort des Infarktes rekrutiert werden könnten. Zudem könnte dies den bisher fehlenden Zusammenhang zwischen der Höhe des CD14+CD16+ Monozytenspiegels im Blut mit Parametern des funktionellen Outcomes in Patienten erklären.

Ein Großteil der nach Herzinfarkt rekrutierten Monozyten entstammt der Milz. Dieses extramedulläre Monozytenreservoir gilt als Notfallreserve und wird im Falle schwerwiegender Krankheitsgeschehen innerhalb von 24 Stunden freigesetzt. Die Freisetzung wird unter anderem durch den Angiotensin II – Angiotensin I Rezeptor Signalweg moduliert

(Swirsky et al. 2009). Zusätzlich konnten neue Studien belegen, dass die Milz nach AMI Monozyten nicht nur speichert und freisetzt, sondern auch deren extramedulläre Proliferation unterstützt (Leuscher et al. 2012, Dutta et al. 2012). Die bei den NSTEMI und STEMI Patienten verzeichnete Zunahme der CD14+CD16+ Monozytenzellzahl, kann zum Teil durch die Mobilisation aus dem Monozytenreservoir der Milz, sowie dem marginalen Pool erklärt werden, der Zellen umfasst, die am Endothel von Kapillaren adhären. Dort sind CD16+ Monozyten mengenmäßig dreifach stärker vertreten, als im zentralen Pool (Steppich et al. 2000).

Die schon in der Literatur beschriebene Differenzierung klassischer Monozyten hin zu CD16+ Monozyten (Zawada et al. 2012) könnte auch die Ergebnisse dieser Studie erklären. So ließ sich in der vorliegenden Studie bei Infarktpatienten eine durchschnittliche Erhöhung des Anteils klassischer Monozyten an der Gesamtzahl an PBMCs um den Faktor 2,5 feststellen. Demgegenüber steht eine durchschnittliche Erhöhung der CD16+ Monozyten an der Gesamtzahl der PBMCs mit dem Faktor 3,7. Es stellt sich unweigerlich die Frage ob diese Erhöhung Resultat einer verstärkten Differenzierung klassischer hin zu CD16+ Monozyten ist, oder ob die Mobilisierung CD16+ Monozyten aus dem marginalen Pool hierfür verantwortlich ist.

Es ist zu diesem Zeitpunkt noch unklar, inwieweit die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Veränderungen der Monozyten Subsets im peripheren Blut die tatsächliche Präsenz dieser Zellen im Infarktgewebe widerspiegeln. Dennoch könnte dieser Paradigmenwechsel von einer monophasischen zu einer biphasischen Monozytenantwort neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen. Ein weiterer Schritt zum besseren Verständnis dieser Monozytenantwort nach AMI ist die Identifizierung der Oberflächenantigene, die diese vermitteln.

5.2.2 Rolle von IL-1 α nach akutem Myokardinfarkt

Studien, die einen Zusammenhang zwischen der Expression von IL-1 α und akutem Myokardinfarkt belegen sind rar. Zwar konnten frühere Arbeiten eine erhöhte IL-1 α Expression im Myokard nach akutem Myokardinfarkt nachweisen (Timmers et al. 2008). Ob jedoch eine Verbindung zwischen Ausmaß der Expression von IL-1 α auf peripheren Blutmonozyten und Myokardinfarkt besteht, wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht untersucht. In dieser Arbeit konnte nun erstmals belegt werden, dass das Zytokin IL-1 α

sowohl auf den klassischen, als auch auf den CD16+ Monozyten nach AMI vermehrt exprimiert wird. Bei diesem membrangebundenen IL-1 α handelt es sich um eine Pro-Form, die jedoch voll biologisch aktiv ist.

Immer mehr Studien belegen die zentrale Rolle von IL-1 α in der Pathogenese der Inflammation. Dieses Zytokin konnte kürzlich als einer der wichtigsten Mediatoren bei steriler Entzündung nach Hypoxie bedingter Nekrose nachgewiesen werden. Während hypoxischer Zustände kommt es zu einer vermehrten intrazellulären Bildung von IL-1 α und schließlich zu einer Freisetzung aus nekrotischen Zellen (Rider et al. 2012). So auch beim Myokardinfarkt. Tierexperimentelle Studien konnte IL-1 α unlängst als wichtiges Danger-Signal der Initiation der Inflammationsreaktion im infarzierten Herzen identifizieren. Hierbei kommt es zu einer stark vermehrten Bildung von IL-1 α im infarzierten Myokardium (Timmers et al. 2008).

Dies setzt das sogenannte inflammatorische Schleifenmodell in Gang. Die Entzündungsreaktion wird durch gestresste oder geschädigte Zellen angestoßen, die via IL-1 α abhängiger Rekrutierung von weiteren Chemokinen inflammatorische hämatopoetische Zellen zum Ort der Schädigung locken. Diese Zellen antworten wiederum auf das inflammatorische Milieu mit der Produktion von IL-1 α und IL-1 β , die den Vorgang weiter verstärken. So kommt es zu einer, sich selbst aufrecht erhaltenden Entzündungsreaktion, die erst endet, wenn die IL-1R1 Signalkette entweder erschöpft ist, oder unterdrückt wird (Di Paolo 2016).

IL-1 α vermittelt seine Wirkung über Bindung freier, sowie membrangebundener Formen an den IL-1 Rezeptor (Garlanda et al. 2013). Dabei ist die Plasmamembran assoziierte Form von IL-1 α voll biologisch aktiv. So kommt es nach Stimulation der Zellen mit pro-inflammatorischen Signalen innerhalb von Stunden zum Erscheinen von IL-1 α auf der äußeren Plasmamembran hämatopoetischer und nicht hämatopoetischer Zellen wie Fibroblasten und Endothelzellen (Giri et al. 1985).

Im Infarkt-geschädigten Myokard erfolgt die Freisetzung von IL-1 α aus Kardiomyozyten, die neben der Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion zu einer Aktivierung von Fibroblasten führt (Lugrin et al. 2015). Kardiale Fibroblasten sind die am häufigsten vorkommenden Zellen im menschlichen Herzen (Brown et al. 2005). Nach Stimulation mit IL-1 α verändern sie ihren Phänotyp und transdifferenzieren zu Myofibroblasten, die eine Schlüsselrolle in der

Reparatur und Narbenbildung nach abgelaufenen AMI spielen (Sun 2000). Zudem steigern Myofibroblasten nach Stimulation mit IL-1 α ihre Zytokin Expression.

Weitere Hinweise auf die Funktion von IL-1 α können die Expressionslevel seines Rezeptorantagonisten IL-1Ra geben. So konnte eine deutliche Erhöhung der peripheren IL-1Ra-Konzentration im Blut von Patienten mit AMI festgestellt werden (Patti et al. 2004). Die Konzentrationen von IL-1Ra, das auch in aktivierten Monozyten synthetisiert wird, korrelieren mit dem Ausmaß der Inflammation nach AMI (Dinarello 1996). Interessanterweise sind erhöhte IL-1Ra Level auch assoziiert mit einer schlechteren Prognose nach AMI (Patti et al. 2004). Dies unterstützt die Vermutung, dass IL-1 α positive Effekte auf die Infarktregeneration haben könnte. Allerdings konnte in tierexperimentellen Studien bei IL-1 α -defizienten Mäusen eine verminderte Entzündungsreaktion festgestellt werden (Lugrin et al. 2015). Eine verstärkte Inflammation erschwert die Heilung nach AMI und deutet die Gegensätzlichkeit der von IL-1 α unterstützten Prozesse an.

5.3 Limitationen der Arbeit

Zu beachten ist, dass es eine große Zahl heterogener Einflüsse gibt, die Monozyten aktivieren und somit auch die Produktion und Expression von Zytokinen beeinflussen können. Zudem können Komorbiditäten, die bei Patienten mit kardiovaskulärem Risikoprofil oft vorhanden sind, das Immunsystem beeinflussen. Bei der klinisch gesunden Kontrollgruppe ist jedoch zumindest nicht von einem Einfluss schwerwiegender Krankheiten auf das Immunsystem auszugehen. Dadurch ist sichergestellt, dass die Änderungen der Monozytenkonzentrationen, sowie deren Expressionsmuster nur Folge kardiovaskulärer Erkrankungen sind.

Um in späteren Studien den Einfluss des tatsächlichen akuten Ereignisses auf die Expressionsmuster der Monozyten im Rahmen eines NSTEMI und STEMI zu untersuchen wäre die Wahl einer Kontrollgruppe mit vorbestehenden kardiovaskulären Erkrankungen sinnvoll.

Auch kann die Berührung von Fremdmaterialien zu einer Kontaktaktivierung von Monozyten führen. Zwar wurde besonders darauf geachtet adhärente Zellen von der Oberfläche von Untersuchungsmaterialien zurückzugewinnen, dennoch kann ein gewisser Verlust von Monozyten für die Analysen nicht ausgeschlossen werden. Um eine Verunreinigung der Proben mit Erregern, die zu einer Aktivierung der Monozyten führen können, zu vermeiden, wurde unter einer Sterilbank gearbeitet. Zudem könnte es im Verlauf der

Dichtegradientenzentrifugation von peripheren mononukleären Blutzellen zu einer Herunterregulierung der Expression von Oberflächenmolekülen kommen, wie es im Falle des L-Selectins schon beispielhaft beobachtet worden ist (Stibenz 1994). Um Lagerungsartefakte zu vermeiden wurden die gewonnenen Vollblutproben bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von 60 Minuten verarbeitet.

Da bei allen Patienten die Vollblutentnahme jeweils am folgenden Morgen der intensivmedizinischen Aufnahme nach AMI durchgeführt wurden, könnte es zeitabhängig zu Veränderungen der Monozytenzahlen und Expressionsmuster seit dem akuten Ereignis gekommen sein. Bei einer erweiterten, späteren Analyse auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse sollte demnach eine Analyse der Monozytenexpressionsmuster zu einem früheren Zeitpunkt – direkt nach der Aufnahme im Krankenhaus – durchgeführt werden, um genauere Aussagen über die Veränderungen der Monozytenexpressionsmuster nach Infarkt treffen zu können.

Selbst die Uhrzeit kann einen möglichen Einfluss auf die Höhe der Freisetzung von Monozyten haben. So folgt die Monozyten Freisetzung aus dem Knochenmark einer zirkadianen Rhythmik (Nguyen et al. 2013). Allgemein scheint es zu sehr hohe Monozyten/Makrophagen Spiegeln während der ersten 5 Tage nach AMI in der Infarktzone zu kommen. Eine klinische Studie konnte zeigen, dass die Infarktgröße ihr Maximum um 1:00 Uhr nachts am Tag nach STEMI hatte (Reiter et al. 2012). Um diese Beeinflussung durch die Tageszeit zu vermindern erfolgte die Blutabnahme stets zur gleichen Uhrzeit.

5.4 Schlussfolgerung

Die aus dieser Studie gewonnen Daten und der bisherige Kenntnisstand zu IL-1 α , sowie zu Monozyten, legen nahe, dass es sich bei IL-1 α auf Monozyten um den proximalen Anteil einer entscheidenden Signalkaskade handelt. Da IL-1 α sowohl auf den früh nach AMI auftretenden klassischen Monozyten, wie auch den später nach AMI auftretenden CD16+ Monozyten vorkommt, kann nicht von einer per se schädigenden Wirkung nach AMI ausgegangen werden. Vielmehr scheint membrangebundenes IL-1 α das Bindeglied zwischen Monozyten und betroffenem Gewebe im Herzen darzustellen. Das Zytokin kann als molekularer Nexus der Entscheidungsfindung angesehen werden, der die Schwere der Verletzungen nach Herzinfarkt misst und entweder die Inflammation im Körper aktiviert und

verstärkt oder die reparative Fibrose anstößt (Di Paolo 2016). Der Anteil IL-1 α exprimierender peripherer Monozyten in der Kontrollgruppe war signifikant niedriger als in den AMI Gruppen. Da sich dieser Anteil zwischen NSTEMI und STEMI Gruppe jedoch nicht maßgeblich unterschied, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei IL-1 α um einen empfindlichen Parameter handelt, der schon bei leichteren Herzinfarkten vermehrt exprimiert wird.

Es bleibt zu klären, ob die Wirkung von Monozyten-assoziiertem IL-1 α nach AMI nach Abspaltung von der Membran erfolgt, oder membrangebunden. Verschiedene Proteasen sind in der Lage IL-1 α aus der Membran zu lösen und die Pro-Form in die biologisch aktivere reife Form umzuwandeln (Di Paolo et al. 2016). Zudem ist bis heute unklar welche Faktoren die Translokation von Pro-IL-1 α vom Zytosol zur Außenseite der Plasmamembran bedingen, sodass IL-1 α als membrangebundenes Zytokin agieren kann.

Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass das Zytokin IL-1 α nach akutem Myokardinfarkt sowohl auf klassischen CD14+, als auch auf CD14+CD16+ Monozyten vermehrt exprimiert wird. Diese beiden Monozyten Subsets spielen sowohl bei der Entstehung myokardialer Schäden, als auch bei deren Regeneration und Heilung eine herausragende Rolle. Da membrangebundenes IL-1 α auf Monozyten ein zentraler Drehpunkt der Monozytenantwort zu sein scheint, bietet das Ergebnis dieser Studie wichtige Erkenntnisse über post-infarzieller Abläufe. Ein besseres Verständnis über Signalwege und Abläufe im Rahmen von akuten Myokardinfarkten könnte in Zukunft ein spezielles Targeting durch Medikamente ermöglichen und so zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße und einer verbesserten Regeneration führen.

6. Literaturverzeichnis

- Afonina, I.S. et al. Granzyme B-dependent proteolysis acts as a switch to enhance the proinflammatory activity of IL-1. *Mol. Cell* 44, 2011; 265–278.
- Auron, P.E., Webb, A.C., Rosenwasser, L.J., Mucci, S.F., Rich, A., Wolff, S.M., Dinarello, C.A. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984; 81(24): 7907-7911.
- Bossu, P., Visconti, U., Ruggiero, P., Macchia, G., Muda, M., Bertini, R., Bizzarri, C., Colagrande, A., Sabbatini, V., Maurizi, G., et al. Transfected type II interleukin-1 receptor impairs responsiveness of human keratinocytes to interleukin-1. *Am. J. Pathol.*, 1995; 147(6): 1852-1861.
- Brown RD, Ambler SK, Mitchell MD, Long CS. The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45: 657–687.
- Bujak M, Ren G, Kweon HJ, Dobaczewski M, Reddy A, Taffet G, Wang XF, Frangogiannis NG. Essential Role of Smad3 in Infarct Healing and in the Pathogenesis of Cardiac Remodeling. *Circulation* 2007;116:2127–2138.
- Bujak M, Frangogiannis N G. The role of Interleukin-1 in the pathogenesis of heart disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2009 ; 57(3): 165–176.
- Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:569–582.
- Colotta F, Dower SK, Sims JE, Mantovani A. The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1. *Immunol Today* 1994; 15:562–566.
- Devitt A, D Odette, Moffatt, Raykundalia C, J. D Capra, David L. Simmons D. Gregory. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392 1998, 505-509
- Dinarello C. Biological basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996; 87:2095–147.
- Dinarello CA. Cytokines as endogenous pyrogens. *J Infect Dis* 1999;179:S294–S304
- Dinarello CA. The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. *N Engl J Med* 2000; 343:732–734.
- Dinarello, C.A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 117, 2011; 3720–3732.
- Dinarello CA . The history of fever, leukocytic pyrogen and interleukin-1. *Temperature* 2:1 2015; 8-16.

Dobaczewski M, Bujak M, Zymek P, Ren G, Entman ML, Frangogiannis NG. Extracellular matrix remodeling in canine and mouse myocardial infarcts. *Cell Tissue Res* 2006;324:475–488.

Dutta P, Courties G, Wei Y, Leuschner F, Gorbato R, Robbins CS, Iwamoto Y, Thompson B, Carlson AL, Heidt T, Majmudar MD, Lasitschka F, Etzrodt M, Waterman P, Waring MT, Chicoine AT, van der Laan AM, Niessen HW, Piek JJ, Rubin BB, Butany J, Stone JR, Katus HA, Murphy SA, Morrow DA, Sabatine MS, Vinegoni C, Moskowitz MA, Pittet MJ, Libby P, Lin CP, Swirski FK, Weissleder R, Nahrendorf M. Myocardial infarction accelerates atherosclerosis. *Nature* 2012; 487:325 – 329.

Eduard Shantsila, Gregory Y.H. Lip. Monocytes in Acute Coronary Syndromes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29:1433-1438.

ESC Pocket Guidelines, Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, 2011, Düsseldorf.

Frangogiannis NG. The immune system and the remodeling infarcted heart: cell biological insights and therapeutic opportunities. *J Cardiovasc Pharmacol März* 2014; 63(3): 185-195.

Garlanda, C., Dinarello, C.A. & Mantovani, A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* 39 2013; 1003-1018.

Geissmann F, Jung S, Littman DR: Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003; 19:71–82.

Giri, J.G., Lomedico, P.T. & Mizel, S.B. Studies on the synthesis and secretion of interleukin 1. I. A 33,000 molecular weight precursor for interleukin 1. *J. Immunol.* 1985; 134, 343–349.

Han Y, Jing J, Tu S, Tian F, Xue H, Chen W, Chen J, Reiber JH, Chen Y. ST elevation acute myocardial infarction accelerates non-culprit coronary lesion atherosclerosis. *Int J Cardiovasc Imaging.* 2014; 30:253–261.

Hölschermann H, Tillmanns H, Bode C. Pathogenetische Mechanismen des akuten Koronarsyndroms. *Hämostaseologie* 2006; 26:99-103.

Ikeda U, Matsui K, Murakami Y, Shimada K. Monocyte chemoattractant protein-1 and coronary artery disease. *Clin Cardiol.* 2002; 25:143–147.

Itoh, Y. et al. 17 β -estradiol induces IL-1 gene expression in rheumatoid fibroblast-like synovial cells through estrogen receptor (ER) and augmentation of transcriptional activity of Sp1 by dissociating histone deacetylase 2 from ER. *J. Immunol.* 178, 2007; 3059–3066.

Kim, B. et al. The interleukin-1 α precursor is biologically active and is likely a key alarmin in the IL-1 family of cytokines. *Front. Immunol.* 4, 2013; 391

Kimura, H. et al. Molecular analysis of constitutive IL-1 gene expression in human melanoma cells: autocrine stimulation through NF- κ B activation by endogenous IL-1. *Cytokine* 10, 1998; 872–879.

Kobayashi, Y. et al. Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1990; 5548–5552.

KORA Herzinfarktregister Augsburg (2014) Daten zu Herzinfarkten in der Region Augsburg. www.gbe-bund.de (Stand: 30.04.2015).

Kurt-Jones, E.A., Fiers, W. & Pober, J.S. Membrane interleukin 1 induction on human endothelial cells and dermal fibroblasts. *J. Immunol.* 139, 1987; 2317–2324.

Lang, D., Knop, J., Wesche, H., Raffetseder, U., Kurrle, R., Boraschi, D., Martin, M.U. The type II IL-1 receptor interacts with the IL-1 receptor accessory protein: a novel mechanism of regulation of IL-1 responsiveness. *J. Immunol.*, 161(12) 1998; 6871-6877.

Lee JD, Kravchenko V, Kirkland TN, et al. Glycosyl-phosphatidylinositol- anchored or integral membrane forms of CD14 mediate identical cellular responses to endotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:9930–4.

Leuschner F, Rauch PJ, Ueno T, Gorbатов R, Marinelli B, Lee WW, Dutta P, Wei Y, Robbins C, Iwamoto Y, Sena B, Chudnovskiy A, Panizzi P, Keliher E, Higgins JM, Libby P, Moskowitz MA, Pittet MJ, Swirski FK, Weissleder R, Nahrendorf M. Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis. *J Exp Med* 2012; 209:123–137.

Loems Ziegler-Heitbrock, Petronela Ancuta, Suzanne Crowe, Marc Dalod, Veronika Grau, Derek N. Hart, Pieter J. M. Leenen, Yong-Jun Liu, Gordon MacPherson, Gwendalyn J. Randolph, Juergen Scherberich, Juergen Schmitz, Ken Shortman, Silvano Sozzani, Herbert Strobl, Marek Zembala, Jonathan M. Austyn and Manfred B. Lutz. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010; 02-258558

Lugrin J, Parapanov R, Rosenblatt-Velin N, Rignault-Clerc S, Feihl F, Waeber, Pascal Schneider B, Pacher P, and Liadudet L. Cutting edge: IL-1 α ist a Crucial Danger Signal Triggering Acute Myocardial Inflammation during Myocardial Infarction. *The Journal of Immunology*, 2015; 194: 499-503.

Malinowsky, D., Lundkvist, J., Laye, S., Bartfai, T. Interleukin-1 receptor accessory protein interacts with the type II interleukin-1 receptor. *FEBS Lett.*, 1998; 429(3): 299-302.

Masseli F, Der Makrophage im Myokardinfarkt – transkriptombasierter Ansatz. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin. 2012, Gießen.

McMahan, C.J., Slack, J.L., Mosley, B., Cosman, D., Lupton, S.D., Brunton, L.L., Grubin, C.E., Wignall, J.M., Jenkins, N.A., Brannan, C.I., et al. A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *EMBO J.*, 1991; 10(10): 2821-2832.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the drosophila toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394–7.

Methe H, Kim JO, Kofler S, Weis M, Nabauer M, Koglin J. Expansion of circulating Toll-like receptor 4-positive monocytes in patients with acute coronary syndrome. *Circulation.* 2005; 111:2654–2661.

Morimoto H, Takahashi M, Izawa A, Ise H, Hongo M, Kolattukudy PE, Ikeda U. Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Circ Res.* 2006; 99:891– 899.

Morimoto H, Takahashi M, Izawa A, Ise H, Hongo M, Kolattukudy PE, Ikeda U. Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Circ Res*. 2006; 99:891– 899

Mullick AE, Soldau K, Kiosses WB, Bell TA, 3rd, Tobias PS, Curtiss LK. Increased endothelial expression of Toll-like receptor 2 at sites of disturbed blood flow exacerbates early atherogenic events. *J Exp Med*. 2008; 205(2):373-383.

Murphy K. M., Travers P., Walport M. *Janeway Immunologie*. Springer Spektrum. 7. Auflage, 2014.

Nelson C Di Paolo & Dmitry M Shayakhmetov Interleukin 1 α and the inflammatory process. *NATURE IMMUNOLOGY VOLUME 17 NUMBER 8 AUGUST 2016*

Nguyen KD, Fentress SJ, Qiu Y, Yun K, Cox JS, Chawla A. Circadian gene *Bmal1* regulates diurnal oscillations of Ly6C(hi) inflammatory monocytes. *Science*. 2013; 341:1483–1488.

Patti G, D'Ambrosio A, Mega S, Giorgi G, Maria Zardi E, Maria Zardi D, Dicuonzo G, Dobrina A, Di Sciascio G. Early Interleukin-1 Receptor Antagonist Elevation in Patients with Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 43(1):35-38.

Peter H, Richter WJ, Müller-Ladner U. *Klinische Immunologie*. Elsevier, 3. Auflage, 2012.

Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990;81:1161–1172.

Reiter R, Swingen C, Moore L, Henry TD, Traverse JH. Circadian dependence of infarct size and left ventricular function after ST elevation myocardial infarction. *Circ Res*. 2012; 110:105–110.

Rider P, Kaplanov I, Romzova M, Bernardis L, Braiman A, Voronov E, Ron N. Apte. The transcription of the alarmin cytokine interleukin-1 alpha is controlled by hypoxia inducible factors 1 and 2 alpha in hypoxic cells ;*Frontiers in Immunology* 2012.

Roberts R, DeMello V, Sobel BE. Deleterious effects of methylprednisolone in patients with myocardial infarction. *Circulation* 1976;53:1204-1206.

Ruparelia N, Godec J, Lee R, T.J, Chai, Dall'Armellina E, McAndrew E, Digby J E, J. Forfar C, D. B, Prendergast, Rajesh K. Kharbanda, Adrian P. Banning, Neubauer S, Lygate C A, Keith M. Channon, Nicholas W. Hainin, Robin P. Choudhury. Acute myocardial infarction activates distinct inflammation and proliferation pathways in circulating monocytes, prior to recruitment, and identified through conserved transcriptional responses in mice and humans. *European Heart Journal* 2015; 36, 1923-1934.

Statistisches Bundesamt (2014) Todesursachenstatistik ab 1998, Sterbefälle, Sterbeziffern (je 100.000 Einwohner, altersstandardisiert). www.gbe-bund.de (Stand: 7.4.2016).

Salim Yusuf, Steven Hawken, Stephanie Ôunpuu, Tony Dans, Alvaro Avezum, Fernando Lanus, Matthew McQueen, Andrzej Budaj, Prem Pais, John Varigos, Liu Lisheng, on behalf of the INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors

associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004; 364 .

Satoh M, Shimoda Y, Akatsu T, Ishikawa Y, Minami Y, Nakamura M. Elevated circulating levels of heat shock protein 70 are related to systemic inflammatory reaction through monocyte Toll signal in patients with heart failure after acute myocardial infarction. *Eur J Heart Fail.* 2006; 8: 810 – 815.

Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *Embo J* 1991;10:2247–2258.

Shantsila E, Y.H.G. Lip. Monocytes in Acute Coronary Syndromes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29:1433-1438.

Stevenson, F.T., Bursten, S.L., Fanton, C., Locksley, R.M., Lovett, D.H. The 31-kDa precursor of interleukin 1 alpha is myristoylated on specific lysines within the 16-kDa N-terminal propiece. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993; 90(15): 7245-7249.

Steppich B, Dayyani F, Gruber R, Lorenz R, Mack Matthias, Ziegler-Heitbrock HWL. Selective mobilisation of CD14⁺CD16⁺ monocytes by exercise. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279:C578-86.

Stibenz D, Bühner C. Down-regulation of L-selectin surface expression by various leukocyte isolation procedures. *Scand. J. Immunol.* 1994; 39:59-63.

Sun Y, Weber KT. Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc Res* 2000; 46: 250–256.

Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo JL, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P, Aikawa E, Mempel TR, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science.* 2009; 325:612–616.

Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacteria cell wall components. *Immunity* 1999;11:443–51.

Timmers L, Sluijter JP, van Keulen JK, Hofer IE, Nederhoff MG, Goumans MJ, Doevendans PA, van Echteld CJ, Joles JA, Quax PH, Piek JJ, Pasterkamp G, de Kleijn DP. Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction. *Circ Res* 2008; 102: 257–264.

Timmers L, Sluijter JP, van Keulen JK, Hofer IE, Nederhoff MG, Goumans MJ, Doevendans PA, van Echteld CJ, Joles JA, Quax PH, Piek JJ, Pasterkamp G, de Kleijn DP. Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and
Timmers L, Pasterkamp G, de Hoog V, Arslan F, Appelman Y, de Kleijn D. The innate immune response in reperfused myocardium. *Cardiovascular Research* 2012; 94, 276-283.

Tsujioka H, Imanishi T, Ikejima H, Kuroi A, Takarada S, Tanimoto T, Kitabata H, Okochi K, Arita Y, Ishibashi K, Komukai K, Kataiwa H, Nakamura N, Hirata K, Tanaka A, Akasaka T.

Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54:130–138.

Tynan, G.A. et al. Endogenous oils derived from human adipocytes are potent adjuvants that promote IL-1 -dependent inflammation. *Diabetes* 63, 2014; 2037–2050.

Van der Laan AM, Hirsch A, Robbers LF, Nijveldt R, Lommerse I, Delewi R, van der Vleuten PA, Biemond BJ, Zwaginga JJ, van der Giessen WJ, Zijlstra F, van Rossum AC, Voermans C, van der Schoot CE, Piek JJ. A proinflammatory monocyte response is associated with myocardial injury and impaired functional outcome in patients with ST-segment elevation myocardial infarction monocytes and myocardial infarction. *Am Heart J* 2012; 163:57–65.

WHITE LAW D M, Bell M. The Intravascular Lifespan of Monocytes. *Blood* 1966 28: 455-464

Zawada AM, et al: Monocyte heterogeneity in human cardiovascular disease. *Immunobiology* 2012; 217:1273–1284. 10.1016/j.imbio.2012.07.001.