

Die Rolle des C-Typ-Lektin-Rezeptors 4e in der Atherogenese

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Hanna Dorlies Dregger
aus Köln
2023

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Sebastian Zimmer
2. Gutachterin: PD Dr. Nadejda Monsefi

Tag der Mündlichen Prüfung: 09.05.2023

Aus der Klinik und Poliklinik II Innere Medizin (Kardiologie, Angiologie und Pneumologie)
Direktor: Prof. Dr. med. Georg Nickenig

Für meine Familie.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	11
1.1 Atherosklerose	11
1.1.1 Epidemiologie und Ökonomie	11
1.1.2 Atherogenese	13
1.1.3 Risikofaktoren	24
1.2 CLEC4E-Rezeptor	27
1.3 Fragestellung der Arbeit.....	31
2. Material und Methoden	32
2.1 Buffy Coats	32
2.1.1 Isolation der Makrophagen aus Buffy Coats	32
2.1.2 Inkubationszeitbestimmung	34
2.1.3 Cholesterinkristallaufnahme durch Makrophagen.....	35
2.2 Patientenproben	36
2.2.1 Patientenkollektiv	36
2.2.2 Gewinnung der Patientenproben	37
2.2.3 Isolation mononukleärer Zellen.....	38
2.2.4 Herstellung der Cholesterinkristalle	38
2.2.5 Behandlung der Patientenproben mit Cholesterinkristallen	39
2.2.6 Antikörper-Färbung.....	40
2.3 Durchflusszytometrie und Gating.....	41
2.4 Statistische Auswertung.....	45
3. Ergebnisse	46
3.1 Buffy Coats	46
3.1.1 Inkubationszeitbestimmung	46

3.1.2	Cholesterinaufnahme durch CLEC4E positive Zellen	47
3.2	Patientenproben	48
3.2.1	CLEC4E-Expression auf Monozyten nach CC-Inkubation	48
3.2.2	Cholesterinaufnahme durch CLEC4E positive Zellen	49
3.2.3	CLEC4E-Expression und Phagozytose im akuten Myokardinfarkt	50
3.2.4	Korrelation der Monozyteneigenschaften mit dem Risikoprofil	52
4.	Diskussion	60
4.1	Cholesterin steigert die CLEC4E-Expression auf Monozyten	60
4.2	Erhöhte Cholesterinaufnahme durch CLEC4E positive Zellen.....	60
4.3	Erhöhte CLEC4E-Expression und Phagozytose im akuten Myokardinfarkt.....	62
4.4	Korrelation der Monozyteneigenschaften mit dem Risikoprofil	64
4.5	Fazit und Ausblick.....	69
5.	Zusammenfassung	70
6.	Abbildungsverzeichnis	71
7.	Tabellenverzeichnis	72
8.	Literaturverzeichnis	73
9.	Danksagung	86

Abkürzungsverzeichnis

Abca1	ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1
ACAT	Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase
AK	Antikörper
AKS	Aortenklappenstenose
Bcl10	B-cell lymphoma/leukemia 10
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BSA	Bovines Serumalbumin
Card9	Caspase recruitment domain-containing protein 9
CC	Cholesterol crystal
Cdc42	Cell division control protein 42
CLEC4E	C-type lectin receptor 4e
CLR	C-type lectin receptor
CPT	Cell Preparation Tube
CRAC	Cholesterol recognition/interaction amino acid consensus
CRD	Carbohydrate recognition domain
CRP	C-reaktives Protein
CVD	Cardiovascular disease
DAMPs	Danger associated molecular patterns
DM	Diabetes mellitus
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum

FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
FcR γ	Fc Rezeptor γ -Kette
FSC-H	Forward scatter height
FSC-W	Forward scatter width
GI	Gastrointestinal
GroMM	Glycerol Monomycolate
HbA1c	Hämoglobin A1c
HDL	High-density-Lipoprotein
HPETE	Hydroperoxyeicosatetraenoic acid
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
IDL	Intermediate density Lipoprotein
IL	Interleukin
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low-density-Lipoprotein
MACS	Magnetic Cell Separation
MALT1	Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1
MCL	Makrophage C-type lectin
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor

MHC	Major histocompatibility complex
Mincle	Makrophage inducible C-type lectin
NF- κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NLRP3	NLR family pyrin domain containing 3
NO	Stickstoffmonoxid
NSTEMI	non-ST elevation myocardial infarction
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate-buffered saline
PCAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PCI	perkutane koronare Intervention
PDGF	Platelet-derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd, Paraformaldehyd
PRR	Pattern-recognition-receptor
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
Rac-1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
ROS	Reactive Oxygen Species
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SAP-130	Spliceosome-associated protein 130
SSC-A	Side Scatter Area
STEMI	ST elevation myocardial infarction
Syk	Spleen tyrosine kinase
TDB	Trehalose-6,6-Dibehenate
TDM	Trehalose-6,6'-Dimykolat

TGF- β	Transforming growth factor beta
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
UPR	Unfolded protein response
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLA-4	Very late antigen-4
VLDL	Very low density lipoprotein

1. Einleitung

1.1 Atherosklerose

1.1.1 Epidemiologie und Ökonomie

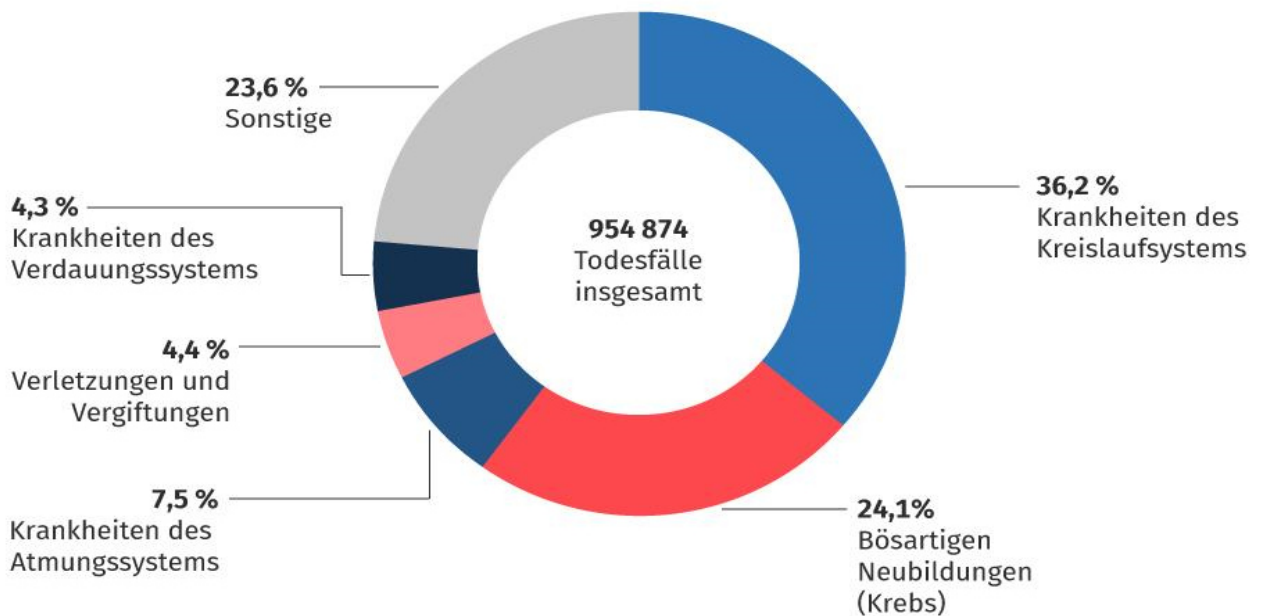
Kardiovaskuläre Erkrankungen sind und bleiben weiterhin die weltweit häufigste Todesursache mit 31,5 % der globalen Todesfälle. Die größte Fraktion bilden hierbei die ischämischen Herzerkrankungen (16,6 % aller Tode) (World Health Organization, 09.06.2020; Benjamin et al., 2017). Kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD), inklusive ischämischer Herzerkrankungen, gehören zu den teuersten chronischen Erkrankungen und sind daher auch von großem wirtschaftlichem Interesse (Trogon et al., 2007). Eine Studie der American Heart Association aus dem Jahre 2010 gab den Anteil der Kosten für CVD an allen nationalen Gesundheitsausgaben in Amerika mit 17 % an. Mit einer jährlichen Wachstumsrate von 6 % prognostizierte diese prospektive Studie eine Verdreifachung der direkten medizinischen Kosten verursacht durch CVD bis zum Jahre 2030 (Heidenreich et al., 2011).

Auch in Deutschland bleiben CVD mit 36,2 % aller Sterbefälle im Jahr 2018 die führende Todesursache (Abb. 1). Das statistische Bundesamt ordnet außerdem bei einer differenzierten Auflistung aller Sterbefälle nach ICD-10-Klassifikation aus dem Jahr 2015 den Hauptanteil dieser Fälle den ischämischen Herzkrankheiten (13,9 % aller Sterbefälle) zu. 5,3 % aller Tode sind auf akute Myokardinfarkte zurückzuführen (Statistisches Bundesamt (Destatis), 21.08.2019). Auch der wirtschaftliche Aspekt dieser Erkrankungen in Deutschland ist nicht zu vernachlässigen. Mit 46,4 Milliarden Euro verzeichnete die Gruppe der CVD die meisten Ausgaben (13,7 % der gesamten Krankheitskosten) im Jahr 2015 (Statistisches Bundesamt (Destatis), 18.03.2019).

Die Hauptursache der CVD stellt die Atherosklerose dar (Frostegård, 2013). Die Atherosklerose ist laut WHO definiert als „eine variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus einer herdförmigen Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“ (Böcker et al., 2006). Die Atherosklerose ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der großen und mittleren Arterien mit komplexer Ätiologie (Frostegård, 2013) .

Todesursachen nach Krankheitsarten 2018

in %



© Statistisches Bundesamt (Destatis), 2020

Abb. 1: Todesursachen in Deutschland 2018 (Statistisches Bundesamt (Destatis), 21.08.2019)

Es konnten zahlreiche Risikofaktoren erforscht und beschrieben werden, häufig genetisch oder auf Umwelteinflüssen basierend (Kapitel 1.1.3.) (Lusis, 2000). Die Pathogenese der Erkrankung umfasst viele sensible Systeme des Körpers, wie den Fettstoffwechsel und die Immunantwort (Weber und Noels, 2011) (Kapitel 1.1.2). Durch Fettablagerungen in die Intima kommt es im Verlauf zur Bildung von atheromatösen Plaques. Bei einer Ruptur dieser Plaques kann es durch Thrombosierung zu einem akuten ischämischen Infarkt kommen (Lusis, 2000; Weber und Noels, 2011; Rafieian-Kopaei et al., 2014). Die Plaqueruptur wird als wichtigster direkter Grund der CVD angesehen (Frostedgård, 2013).

1.1.2 Atherogenese

Die Entstehung der Atherosklerose beginnt bereits im frühen Lebensalter und verläuft lange klinisch stumm. Diese präklinische Phase kann sich über viele Jahre erstrecken bis die Erkrankung, meist im mittleren Alter, symptomatisch wird (Abb. 2) (Deanfield et al., 2007).

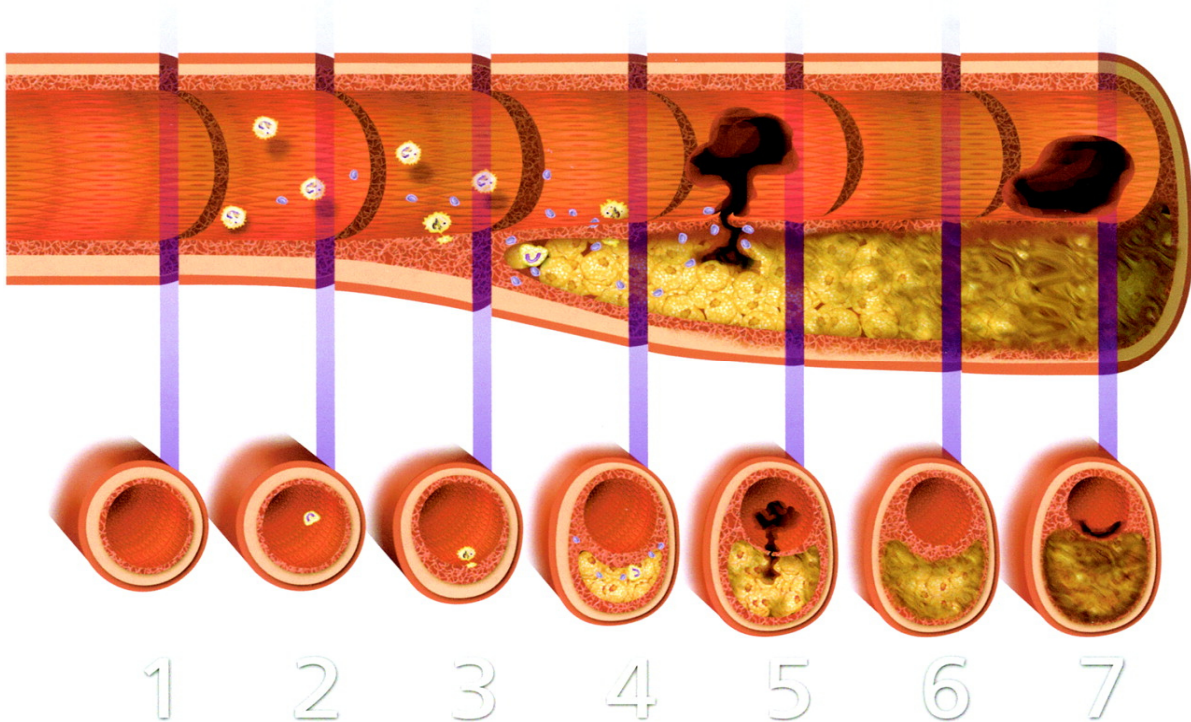


Abb. 2: Initiierung, Progression und Komplikation einer humanen koronar-atherosklerotischen Plaque (Libby, 2001): Oben, Längsschnitt der Arterie als "Zeitachse" der menschlichen Atherogenese. Unten, Arterienquerschnitte in verschiedenen Stadien der Atheromentwicklung. (1) Normale Arterie (2) Läsionsbeginn durch Lipidakkumulation (3) Schaumzellbildung und Proliferation glatter Muskelzellen (4) Fibrinöse Plaque (5) Plaqueruptur und Thrombosierung (6) Fortgeschrittene komplizierte Plaque (7) Mögliche oberflächliche Erosion mit wandständiger Thrombose.

„Response-to-injury“-Hypothese

Seit über 150 Jahren werden die Pathomechanismen der Atherosklerose erforscht. Bereits 1856 wurde von R. Virchow die „Lipid-Hypothese“ postuliert, welche den Lipiden und deren Bindung an die Gefäßwand eine zentrale Rolle zuspricht. Auf dieser These und vielen weiteren Studien aufbauend verfassten Ross und Glomset 1976 die sogenannte „Response-to-injury“-Hypothese (Fraunberger et al., 2005). Diese stützt sich vor allem auf

zwei experimentelle Beobachtungen: Zum einen konnte im Tiermodell durch Entfernung des Intimaendothels mittels Ballonkatheter die Proliferation glatter Muskelzellen und die Entstehung von Läsionen ähnlich einer atheromatösen Plaque induziert werden; zum anderen konnte PDGF, freigesetzt aus Thrombozyten, als Wachstumsreiz für glatte Muskelzellen nachgewiesen werden (Munro und Cotran, 1988; Ross und Glomset, 1976a). Die Hypothese besagt, dass durch Verletzung und Abtragung des arteriellen Endothels, z.B. durch Hyperlipidämie oder Hypertonie bedingte Scherkräfte, die Adhäsion und Einwanderung von Thrombozyten ausgelöst wird. Die darauffolgende Freisetzung von PDGF führt zu einer Migration und Proliferation glatter Muskelzellen in die Intima. Durch rezidivierende Schädigung des Endothels sollen so die atheromatösen Plaques entstehen (Munro und Cotran, 1988; Fraunberger et al., 2005). Allerdings wurde die Hypothese im Laufe der Jahre weiter modifiziert. So zeigte sich, dass nicht nur Abtragung, sondern bereits kleinste Veränderungen das Endothel beeinflussen und die Entstehung der Atherosklerose in Gang setzen können (Munro und Cotran, 1988). Auch die Funktion der Thrombozyten als primäre wachstumsstimulierende Zellen wurde revidiert, da auch andere Zellen, vor allem Monozyten und Makrophagen, einen wesentlichen Einfluss auf die Proliferation glatter Muskelzellen und Lipidablagerungen haben (Munro und Cotran, 1988; Böcker et al., 2006).

Endotheliale Dysfunktion

Das Endothel, die innerste Wandschicht der Blutgefäße, hat als selektiv permeable Membran eine wichtige Rolle zur Trennung von Blut und Gewebe inne. Im gesunden Zustand reguliert es den Gefäßtonus und übt Einfluss auf die Blutgerinnung, inflammatorische Prozesse und Zellproliferation aus (Deanfield et al., 2007; Lusis, 2000). Bei Schädigung des Endothels kann dieses seine Aufgaben nicht mehr hinreichend erfüllen, es entsteht eine endotheliale Dysfunktion. Diese wird als initiierendes Ereignis der Atherogenese angesehen (Davignon und Ganz, 2004; Böcker et al., 2006). Es kommt zur Abnahme der endothelial gesteuerten Prozesse, unter anderem zur Abnahme der Vasomotion. Frühe Arbeiten von Furchgott und Zawadzki (1980) und Ludmer et al. (1986) zeigten, dass der vasodilatierende Mediator NO bei endothelialer Dysfunktion der atherosklerotisch geschädigten Gefäße zu einer Vasokonstriktion führt. Diese Studien

postulieren die verringerte Aktivität von NO als eines der frühesten Anzeichen für Atherosklerose (Davignon und Ganz, 2004; Deanfield et al., 2007).

Anhaltende und wiederholte Exposition gegenüber kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypertonie und Hyperlipidämie führt auf Dauer zu einer Erschöpfung des protektiven endothelialen Systems und einer Dysfunktion des Endothels mit erhöhter Permeabilität (Deanfield et al., 2007; Munro und Cotran, 1988). Diese erhöhte Durchlässigkeit des Endothels begünstigt einen Einstrom von Lipoproteinen in die Intima, vor allem der im Blut befindlichen Low-density-Lipoproteine (LDL) (Böcker et al., 2006). Erhöhte LDL-Blutspiegel fördern diesen Prozess. Die Akkumulation weiterer Apolipoprotein-B enthaltender Lipoproteine wie Lipoprotein (a) und Remnants befeuern den Prozess der Atherogenese zusätzlich (Lusis, 2000). Das in der Gefäßwand eingelagerte LDL kann dort modifiziert werden. Eine der elementarsten Modifikation ist die Oxidation der Lipide durch metabolische Abbauprodukte, z.B. Radikale, der Gefäßwand. Darüber hinaus spielen Enzyme wie Myeloperoxidasen und Lipoxygenasen eine Rolle und dienen als Quelle für Sauerstoffradikale. Insbesondere 12/15-Lipoxygenasen aus den Endothelzellen oxidieren polyenoischen Fettsäuren mit Sauerstoff zu hydroperoxyeicosatetraenoische Fettsäuren (HPETE) unter Bildung von minimal oxidiertem LDL (mo-LDL). Antagonistisch hierzu fungieren High-density-Lipoproteine (HDL). HDL kann überschüssiges Cholesterin aus dem Gewebe aufnehmen und ins Blut zurückführen. Außerdem wirkt HDL antioxidativ durch seine Lipoxygenase hemmende Untereinheit (Paroxonase) (Böcker et al., 2006; Lusis, 2000).

Inflammatorische Phase

Die Einlagerung von mo-LDL in die Gefäßintima setzt nun weitere Mechanismen in Gang. Die Endothelzellen reagieren mit der Produktion verschiedener Chemokine, die sich vor allem auf die Einwanderung und Differenzierung der im Blut befindlichen Monozyten auswirken. Der Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) ist ein Wachstumsfaktor der die Proliferation und Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen stimuliert (Lusis, 2000). M-CSF kann auch bei in vitro Versuchen zur Kultivierung von Makrophagen verwendet werden (Kapitel 2.1.1) (Brugger et al., 1991). Die Adhäsion und Migration dieser Monozyten in das Gewebe wird durch Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) gefördert (Böcker et al., 2006). In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass bei fehlen

dieses Chemokins oder des zugehörigen Rezeptors CCR-2 weniger atherosklerotische Läsionen entstehen (Boring et al., 1998; Gu et al., 1998). Darüber hinaus induziert oxLDL die Expression weiterer Adhäsionsmoleküle, welche die Anheftung von Lymphozyten und Monozyten an das Endothel bewirken (Böcker et al., 2006). Das hierdurch ermöglichte „Rollen“ der Leukozyten auf der endothelialen Oberfläche wird durch Selektine (ICAM-1, P-Selektin, E-Selektin, PCAM-1 und VCAM-1) und leukozytäre Liganden (β 2-Integrin, VLA-4 und PCAM-1) vermittelt (Lusis, 2000; Böcker et al., 2006). Neben dieser lokal inflammatorischen Reaktion kommt es auch zur systemischen Entzündung mit erhöhten Plasmaspiegeln des C-reaktiven Proteins (CRP) (Böcker et al., 2006).

Schaumzellbildung

Die in die Intima eingewanderten und differenzierten Makrophagen nehmen nun das ebenso dort eingelagerte LDL auf (Lusis, 2000). Dies ist jedoch kein Zufall, da das oxidierte LDL sowohl die endothelialen Adhäsionsmoleküle hochreguliert, als auch aktivierend auf die Makrophagen wirkt (Rafieian-Kopaei et al., 2014; Lusis, 2000). Allerdings kann LDL in der nativen oder minimal oxidierten Form nicht suffizient von den Makrophagen aufgenommen werden (Lusis, 2000). Daher muss LDL vorher „hoch oxidiert“ werden (Böcker et al., 2006). Hieran sind vor allem reaktive Sauerstoffspezies (ROS) aus Zellen des Endothels und Makrophagen beteiligt. Weiterhin sind Enzyme, hier zu nennen Myeloperoxidase, Sphingomyelinase und sekretorische Phospholipase, an der Oxidation beteiligt (Böcker et al., 2006). Oxidiertes LDL (Ox-LDL) wird nun von den Makrophagen über sogenannte Scavenger-Rezeptoren aufgenommen (Lusis, 2000). Diese Rezeptoren werden durch die oxidierten Lipide und Zytokine wie M-CSF zusätzlich hochreguliert, dies geschieht vor allem bei der Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen (Rafieian-Kopaei et al., 2014). Eine überschüssige LDL Aufnahme führt zu Speicherung des enthaltenen Cholesterins in Form von Cholesterinestern. Diese sind in den Makrophagen als kleine Tröpfchen gelagert und prägen den mikroskopischen Begriff der Schaumzellen (Brown und Goldstein, 1983). Demgegenüber sezernieren Makrophagen aktiv Apolipoprotein B um das Cholesterin mittels HDL abzutransportieren und der Bildung von Schaumzellen entgegen zu steuern (Böcker et al., 2006). Einige Schaumzellen können die Gefäßwand verlassen und die Lipide abtransportieren;

übersteigt jedoch die Zufuhr die Abfuhr kumulieren die lipidreichen Zellen in der Arterienwand (Rafieian-Kopaei et al., 2014). Diese Anreicherung der gelben Schaumzellen ist als erstes makroskopisches Zeichen der Atherogenese, den sogenannten „fatty streaks“, sichtbar (Böcker et al., 2006; Rafieian-Kopaei et al., 2014). In der sich entwickelnden Intimaläsion gehen nun zahlreiche Schaumzellen zugrunde und verbleiben als lipidreicher Kern der Plaque (Lusis, 2000; Rafieian-Kopaei et al., 2014).

Fibröse Plaque

Diese Veränderungen in der Intima bewirken durch die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) und Interleukin-(IL-1) einen vermehrten Einstrom von Leukozyten (Munro und Cotran, 1988; Fraunberger et al., 2005). Die Interaktion dieser Zellen wiederum fördert die Inflammation im Lipidplaque. So induziert die Interaktion von T-Lymphozyten und Makrophagen die Produktion von proinflammatorischem INF- γ (Böcker et al., 2006). Aktivierte T-Lymphozyten synthetisieren und sezernieren gemeinsam mit den Makrophagen eine Vielzahl von Mitogenen und Wachstumsfaktoren wie dem basischen Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF), welche die Einwanderung und Proliferation von glatten Muskelzellen stimulieren (Fraunberger et al., 2005; Böcker et al., 2006). Auch Angiotensin II (erhöht bei Hypertonie) und Homocystein vermögen wohl dieses Wachstum zu stimulieren (Böcker et al., 2006). Die glatten Muskelzellen produzieren in der Intima nun das Bindegewebe der extrazellulären Matrix (Munro und Cotran, 1988). So entsteht, zusammen mit den beteiligten Entzündungszellen, eine fibröse Kappe (Munro und Cotran, 1988; Lusis, 2000). Der nekrotische Lipidkern und die ihn stabilisierende fibröse Kappe bilden zusammen das entstehende Fibroatherom. Diese frühen Fibroatherome entstehen bei Menschen bereits in der zweiten Lebensdekade (Insull, 2009).

Komplizierten Plaque

Fortgeschrittene Plaques kommen vor allem bei Personen um das 55. Lebensjahr vor. In diesem Stadium der Atherogenese entwickelt sich ein dünnwandiges Fibroatherom und droht zu rupturieren (Insull, 2009). Doch wie kommt es zu dieser Komplikation? Die Ruptur- und Thrombosegefahr einer Plaque ist vor allem abhängig von ihrer Stabilität (Fraunberger et al., 2005; Insull, 2009). Eine zunehmende Instabilität des Fibroatheroms

wird durch von Makrophagen ausgeschüttete Proteinasen (Kollagenase, Gelatinase und Stromolysin) erreicht (Böcker et al., 2006). Außerdem produzieren T-Zellen IFN- γ , ein Zytokin welches die Produktion der extrazellulären Matrix durch glatte Muskelzellen inhibiert (Böcker et al., 2006). Die Vulnerabilität steigt hierbei vor allem an der Plaque-„Schulter“, welche reich an Makrophagen und T-Lymphozyten ist (Ross, 1995; Böcker et al., 2006). Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass inflammatorisch wirksame Faktoren das Thrombosierungsrisiko erhöhen (Fraunberger et al., 2005; Böcker et al., 2006). Zusätzliche Instabilität bringen kleine Gefäße, sogenannte vasa vasorum, die von der Media her einwachsen um die Zellen der sich vergrößernden Läsionen mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen (Insull, 2009; Ross, 1995). Diese Neovaskularisation, vermittelt durch angiogenetische Faktoren (VEGF, bFGF), bietet außerdem eine Eintrittspforte für weitere Entzündungszellen (Fraunberger et al., 2005). Es wird angenommen, dass auch systemische Infektionen, die mit einer messbaren CRP Erhöhung einhergehen, die Plaquestabilisierung fördern (Böcker et al., 2006). In Folge dessen kommt es zu einer Ausdünnung und Formänderung der Plaque-„Schultern“ und rheologische Kräfte können eine Ruptur oder Ulzeration der Läsion bedingen (Ross, 1995). Die Thrombusbildung wird nun vor allem durch die Gegenwart von Gewebethromboplastin („tissue-factor“) im Kern der Läsion initiiert. Tissue-Factor kommt in Kontakt mit Gerinnungsfaktoren und aktiviert so die Gerinnungskaskade (Fraunberger et al., 2005). Diese vulnerablen Plaques haben ein hohes Rupturrisiko und können unter Umständen mehrmals klinisch stumm rupturieren und eine wachsende Schicht aus Bindegewebe hinterlassen. Kommt es jedoch zur Verlegung der Arterie durch den entstehende Thrombus kann es zu ischämischen Ereignissen mit weitreichenden Folgen kommen (Ross, 1995; Lusus, 2000).

Ein weiteres Merkmal dieser komplizierten Plaques scheinen Kalzifizierungsprozesse, ähnlich der Knochenbildung, zu sein (Lusus, 2000). Diese Kalziumaggregate nehmen an Größe zu und ihre Freilegung schafft Prädilektionsstellen für Thrombenbildung. Die bloße Dimension einiger Plaques kann ausreichen, um das betroffene Gefäß zu verlegen und die Stenose bedingte Unterversorgung eine letale Ischämie bedingen (Insull, 2009).

1.1.2.1 Cholesterin als Kern der Atherosklerose

Cholesterin ist ein essentielles Lipid des Menschen, da es wesentlich zum Funktionieren von Zellen und Organismen beiträgt (Grebe und Latz, 2013; Tabas, 2002). Als ubiquitärer Bestandteil aller Zellmembranen, sowie als Baustein für die Synthese von Gallensäuren, Vitamin D und den Steroidhormonen (u.a. Corticosteroide und Geschlechtshormone) hat es eine Vielzahl wichtiger Aufgaben inne (Grebe und Latz, 2013; Rafieian-Kopaei et al., 2014). Cholesterin wird vom Körper entweder aus der Nahrung oder durch endogene Biosynthese bereitgestellt (Grebe und Latz, 2013). Die eigene Synthese findet hierbei hauptsächlich in der Leber statt (Rafieian-Kopaei et al., 2014).

Alle Wirbeltiere synthetisieren und benötigen Cholesterin. Auch der Mensch stellt den Großteil seines Cholesterins selber her. Ein Teil wird über die Nahrung aufgenommen, wobei Eigelb und tierische Fette das meiste Cholesterin enthalten. Im GI-Trakt wird es über die Darmmukosa absorbiert und als Chylomikronen in das Blut aufgenommen. Die nach der Spaltung von Triglyceriden durch Lipasen verbleibenden Chylomikronen-Remnants transportieren das Cholesterin anschließend zur Leber (Rafieian-Kopaei et al., 2014). Da freies Cholesterin schlecht wasserlöslich ist dienen Lipoproteine dem Transport in der Blutbahn (Grebe und Latz, 2013). Lipoproteine sind wasserlösliche Makromoleküle mit mizellenähnlichem Aufbau. Sie stellen Verbindungen aus Lipiden und charakteristischen Proteinen, den Apolipoproteinen, dar. Lipoproteine werden nach ihrer Dichte in sechs Hauptgruppen eingeteilt: Chylomikronen, Chylomikronen-Remnants, VLDL, IDL, LDL und HDL. Die Fraktionen definieren sich darüber hinaus über ihre unterschiedliche metabolische Funktionen (Mahley et al., 1984). 70 % des Cholesterins liegt somit im Plasma in Form von Estern vor (Rafieian-Kopaei et al., 2014). Der Transport aus der Leber zu extrahepatischen Geweben beginnt mit der Bildung von VLDL (very low density lipoproteins) die durch die kontinuierliche Abgabe von Triglyceriden über IDL (intermediate density lipoproteins) zu LDL (low density lipoproteins) verändert werden (Rafieian-Kopaei et al., 2014). Exogenes Cholesterin wird von den Zellen so vor allem rezeptorvermittelt über LDL aufgenommen (Rafieian-Kopaei et al., 2014). Überschüssiges Cholesterin wird vor allem von HDL abtransportiert (Rafieian-Kopaei et al., 2014). Die Cholesterinaufnahme zu den HDL erfolgt entweder über passive Diffusion entlang eines

Cholesteringradienten oder per Transporter in der Plasmamembran (Rafieian-Kopaei et al., 2014).

Wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben kann zu viel Cholesterin jedoch die Bildung von Atherosklerose fördern. Makrophagen können massenweise an Cholesterin aufnehmen: zum einen durch Phagozytose der Cholesterin enthaltenden Zellen oder Membranfragmenten, zum anderen rezeptorvermittelt (Brown und Goldstein, 1983). Die Aufnahme von LDL gelingt vor allem über LDL- und VLDL-Rezeptoren (Böcker et al., 2006). Neben diesen Rezeptoren für normale Plasmalipoproteine exprimieren Makrophagen zahlreiche Rezeptoren für chemisch modifizierte Lipoproteine (z.B. oxidiert oder acetyliert), die eine schnellere Aufnahme fördern (Brown und Goldstein, 1983). All diese Scavenger-Rezeptoren (von engl. scavenger= Aasfresser, Abfallverwerter) werden zur Gruppe der Pattern-recognition-Rezeptoren gezählt und ihre Aktivität unterliegt keinem negativen Feedback (Fraunberger et al., 2005; Hansson et al., 2006). So können die Makrophagen reichlich Cholesterin akkumulieren und sich zu Schaumzellen formieren (Brown und Goldstein, 1983; Rafieian-Kopaei et al., 2014). Einmal aufgenommen wird das Cholesterin bzw. die Cholesterinester in zwei Kompartimenten verarbeitet. Zuerst gelangt es in die Lysosomen wo es durch saure Lipasen hydrolysiert und in Cholesterin und freie Fettsäuren gespalten wird (Brown und Goldstein, 1983; Böcker et al., 2006). Das freie Cholesterin im Zytoplasma hat nun zwei mögliche Destinationen. Über das ACAT-System (Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase) kann Cholesterin wieder verestert werden und führt unter Ablagerung von Cholesterinestertröpfchen zur Bildung von Schaumzellen (Grebe und Latz, 2013). Alternativ, wenn eine cholesterinbindende Substanz wie HDL in der extrazellulären Flüssigkeit enthalten ist, wird das freie Cholesterin ausgeschleust und zur Leber transportiert (reverser Cholesterintransport) (Brown und Goldstein, 1983; Böcker et al., 2006). Ist dies nicht der Fall wiederholt sich der Zyklus aus Hydrolyse, durch das zelluläre Enzym Cholesterinester-Hydrolase, und Veresterung (Brown und Goldstein, 1983; Grebe und Latz, 2013).

Cholesterinkristalle

Cholesterinkristalle (Cholesterol crystals = CCs) finden sich in atherosklerotischen Läsionen und helfen vor allem bei fortgeschrittenen Läsionen eine histopathologische Einteilung zu treffen. Da sich kristallines Cholesterin jedoch bei den histologischen

Färbemethoden in den organischen Lösungsmitteln zersetzt, gelingt der Nachweis im Präparat nur indirekt durch Bildung von Spalten, welche CCs enthalten haben. Durch diese histopathologische Methode entstand der Trugschluss, dass die CCs erst im späten Stadium der Atherosklerose eine Rolle spielen (Samstad et al., 2014; Duewell et al., 2010). In Tierversuchen konnte jedoch gezeigt werden, dass kleine CCs bereits sehr früh in den Läsionen nachweisbar sind (Duewell et al., 2010). So geht man heutzutage davon aus, dass Cholesterinkristalle in allen Stadien der Atherogenese zu finden sind (Grebe und Latz, 2013). Es wird davon ausgegangen, dass die Kristalle aus freiem Cholesterin entstehen, welches mit Hilfe der Cholesterylesterhydrolase (saure Lipase) aus Cholesterinestern gespalten wird (Duewell et al., 2010; Tangirala et al., 1994). Normalerweise wird überschüssiges Cholesterin, wie bereits beschrieben, mithilfe des Enzyms ACAT im Zytosol als Cholesterinester gespeichert. Bei der Erforschung neuer Therapieoptionen wurden daher auch ACAT-Inhibitoren getestet, in der Hoffnung so die Bildung von Schaumzellen und Atherosklerose zu minimieren. Paradoxiere Weise zeigten sich jedoch keine Reduktion, sondern vielmehr eine Zunahme der Größe der koronaren Atherome. Dieses Ergebnis stützt die Hypothese, dass es durch Inhibierung der ACAT zu einer vermehrten Bildung und Speicherung des Cholesterins als Kristalle kommt (Duewell et al., 2010; Grebe und Latz, 2013). Studien von Accad et al. (2000) an Mäusen mit einem ACAT-Defizit zeigten eine vermehrte Bildung von atherosklerotischen Läsionen unter Akkumulation von zahlreichen CCs. Eine ähnliche Studie von Kellner-Weibel et al. (1999) kam zu dem gleichen Ergebnis. In Anwesenheit von ACAT-Inhibitoren in Mausmakrophagen bilden sich aus freiem Cholesterin CCs.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass CCs über Aktivierung verschiedener intrazellulärer Kaskaden, wie dem NLRP3 Inflammasom, Entzündungen induzieren können. Die inflammatorische Komponente ist ein entscheidender Teil der Atherogenese (Duewell et al., 2010). Auch das Ereignis der Plaqueruptur kann in Zusammenhang mit der Anwesenheit von CCs gebracht werden. So zeigten Abela und Kollegen, dass CCs durch physische Störung der fibrinösen Kappe eine Plaqueruptur induzieren und akut ischämische koronare und zerebrale Ereignisse auslösen können (Abela und Aziz, 2005; 2006; 2009). Die genaue Art und Weise, wie die CCs gebildet werden, ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt. Es gibt Hinweise darauf, dass oxidiertes LDL über rezeptorvermittelte Endozytose durch CD36 aufgenommen, sowie vermittelt durch diesen

Pattern-recognition-Rezeptor intrazellulär zu CCs umgewandelt wird und proinflammatorisch wirksam ist (Sheedy et al., 2013; Samstad et al., 2014). Der Rezeptor für die Phagozytose von CCs konnte bis jetzt jedoch nicht gefunden werden. Daher sind die Suche und das Verständnis von Cholesterin erkennenden Rezeptoren, wie dem CLEC4E-Rezeptor, weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung.

1.1.2.2 Die Schlüsselrolle der Monozyten und Makrophagen

Makrophagen sind sehr vielfältige und wandelbare Zellen, welche in allen Stadien der Atherosklerose vertreten sind. Sie entstehen aus im Blut zirkulierenden und in das Endothel der Gefäßwand eingewanderten Monozyten (Liberale et al., 2017; Ross, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass im Blut von Patienten mit Hyperlipidämie und Atherosklerose eine erhöhte Anzahl an zirkulierenden Monozyten zu finden ist. In Tiermodellen korrelierte diese Anzahl außerdem mit der Größe und Phase der atherosklerotischen Plaque (Schaftenaar et al., 2016). Die Monozyten entstammen dem Knochenmark und entwickeln sich aus Monoblasten. Die Entwicklung dieser Progenitorzellen scheint durch ihren zellulären Cholesteringehalt beeinflusst zu werden (Moore und Tabas, 2011). So zeigten Studien, dass Mäuse, deren Cholesterinabfluss aus den Progenitorzellen eingeschränkt war, eine erhöhte Zahl zirkulierender Monozyten und vermehrte Atherosklerose aufwiesen (Yvan-Charvet et al., 2010). Anhand ihrer Oberflächenmoleküle können die Monozyten in Subklassen eingeteilt werden. Zur Einteilung der humanen Monozyten spielen vor allem das Lipopolysaccharid Rezeptor Antigen (CD14) und der Fcγ-Rezeptor III (CD16) eine wichtige Rolle. Den Hauptteil im Blut stellen die „klassischen“ CD14⁺⁺/CD16⁻ Monozyten mit bis zu 90 %, gefolgt von einer Zwischenfraktion der CD14⁺⁺/CD16⁺ Monozyten (2-10 %) und den „nicht-klassischen“ CD14⁺/CD16⁺⁺ (2-8 %) Monozyten, dar. Während die klassischen Monozyten vor allem phagozytierenden Eigenschaften besitzen, wirken die Monozyten der Zwischenfraktion proinflammatorisch. Die nicht-klassischen Monozyten sind hiergegen eher als Wächterzellen, welche im Blut patrouillieren, anzusehen (Liberale et al., 2017).

Durch die Akkumulation von subendothelialen Lipiden werden Monozyten aus dem Blut rekrutiert. Chemokinetisch gesteuert adhären die Monozyten am Endothel und wandern schließlich in die Gefäßwand ein (Moore und Tabas, 2011). Durch den Einfluss von M-CSF differenzieren die Zellen dort zu Makrophagen (Hansson, 2009). Darüber

hinaus fördert modifiziertes LDL die Einwanderung weiterer Monozyten und verstärkt die Expression von M-CSF (Ross, 1999). Makrophagen erhöhen daraufhin die Expression von Pattern-recognition-Rezeptoren, inklusive Scavenger- und Toll-like-Rezeptoren. Eine übermäßige Aufnahme von modifizierten LDL über Scavenger-Rezeptoren lässt die Makrophagen schließlich zu Schaumzellen gedeihen (Hansson, 2009). Außerdem können die Lipide als sogenannte „pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs) oder „danger associated molecular patterns“ (DAMPs) fungieren und die Makrophagen über Toll-like-Rezeptoren aktivieren. Die hierdurch ausgelöste Signalkaskade vermittelt die Freisetzung pro- (z.B. IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, TNF- α , MCP-1) und antiinflammatorischer (z.B. IL-10, TGF- β) Zytokine und fördert die Einwanderung von Immunzellen in die Läsion (Schaffenaar et al., 2016; Tabas und Lichtman, 2017). Das Vorkommen MHC-Klasse-II-präsentierender Makrophagen lässt eine fortwährende Immunaktivierung über T-Zellstimulation vermuten (Hansson, 2009).

Die Makrophagen reagieren sehr sensibel auf ihr sich veränderndes Umfeld und können hierfür zwischen verschiedenen Phänotypen wechseln (Liberale et al., 2017). Man unterscheidet vor allem pro- (M1) und antiinflammatorisch (M2) wirksame Makrophagen (Tabas, 2010). In welche Richtung sich die Makrophagen entwickeln unterliegt einem komplexen epigenetischen Prozess (Liberale et al., 2017). Die Differenzierung zum M1 Phänotyp wird vor allem über Toll-like-Rezeptoren sowie Interferon gesteuerte Pfade und vermehrte Ausschüttung von Zytokinen der IL-1 Familie (inklusive IL-1 und IL-16) vermittelt. Trigger Faktoren hierfür sind oxidierte Lipide und Lipoproteine, CC aktiviertes NLRP3 Inflammasom und Scherbelastungen der Gefäßwand. Die proinflammatorischen M1 Makrophagen fördern die Progression der Atherosklerose, vergrößern die Läsion auf zellulärer Ebene und verursachen morphologische Plaqueränderungen, die eine Ruptur induzieren und gar eine akute Thrombose auslösen können. Der alternative Pfad der M2 Aktivierung fördert hingegen die Gewebereparatur und mindert die lokale Entzündung (Liberale et al., 2017).

Generell werden beide Makrophagentypen verstärkt in rupturierten und vermindert in stabilen Plaques exprimiert. Des Weiteren konnten regionale Unterschiede in der Verteilung der Phänotypen gezeigt werden. So kommen M2-Makrophagen vor allem in der Adventitia vor, während der M1-Typ in der Ruptur gefährdeten Region dominiert. Die Dominanz des M1-Phänotyps wird in Zusammenhang mit der Stabilität und Rupturgefahr

einer Plaque gebracht und rückt so den Parameter der Makrophagenverteilung innerhalb dieser Plaque als Biomarker für akute kardiovaskuläre Ereignisse in den Fokus (Liberale et al., 2017; Tabas und Lichtman, 2017).

Inflammatorische Makrophagen tragen hierzu vor allem durch zwei Mechanismen bei: Plaque Nekrose und Verdünnung der fibrösen Kappe (Tabas und Lichtman, 2017). Letztendlich entsteht der nekrotische Kern der Läsion durch Apoptose der lokalen Makrophagen und eine mangelnde Beseitigung dieser Zellen (Moore und Tabas, 2011). Verstärkend kommt hinzu, dass die intraläsionalen Makrophagen reich an Zell-, Lipid-, und kristallinem Debris sind (Schaftenaar et al., 2016).

So tragen Monozyten und vor allem die von ihnen abstammenden Makrophagen wesentlich zum Beseitigen abgelagerter Lipide und sich entwickelnder Plaques bei, bei zunehmendem Versagen der protektiven Mechanismen jedoch zur fortschreitenden Nekrose, Plaquestabilisierung und Entzündungssteigerung (Brown und Goldstein, 1983). Makrophagen sind hoch komplexe und sensitive Zellen die „ihre sich ständig ändernden Umgebung fortwährend analysieren und mithilfe ihrer epigenetischen Programme schnell auf Umwelteinflüsse reagieren können“ (Liberale et al., 2017).

1.1.3 Risikofaktoren

Im Laufe der Jahre konnten zahlreiche Risikofaktoren für die Atherosklerose identifiziert und erforscht werden. Hierunter fallen Faktoren, welche eine vermehrte Inzidenz und Progression der Erkrankung zahlenmäßig belegen. Die Risikofaktoren werden zumeist in solche mit genetischer Prädisposition und beeinflussbare Faktoren durch Umwelteinflüsse eingeteilt (Böcker et al., 2006). Tab. 1 gibt einen Überblick über diese Faktoren. Dabei ist zu beachten, dass auch Ursachen mit genetischer Komponente beeinflussbar sein können. Die Atherosklerose ist eine multifaktorielle Erkrankung, bei der sich die einzelnen Risikofaktoren potenzieren können (Lusis, 2000).

Tab. 1: Risikofaktoren für Atherosklerose und koronare Herzerkrankungen (Lusis, 2000)

Genetische Prädisposition	Umweltfaktoren
Erhöhte LDL/VLDL-Spiegel	Fetteiche Ernährung
Reduzierte HDL-Spiegel	Nikotinabusus
Erhöhte Lipoprotein-A-Spiegel	Niedrige Antioxidantienspiegel
Homozyteinämie	Bewegungsmangel
Arterielle Hypertonie	Infektionen (Chlamydien, Zytomegalievirus)
Familiäre Häufung	
Diabetes mellitus und Adipositas	
Erhöhte Spiegel an Gerinnungsfaktoren	
Depressionen und Verhaltensstörung	
Geschlecht	
Systemische Entzündungserkrankungen	
Metabolisches Syndrom	

Im Folgenden werden einige der relevantesten und in den Versuchen dieser Arbeit berücksichtigte Risikofaktoren näher beleuchtet.

- **Arterielle Hypertonie:** Hypertonie im großen Kreislauf verursacht Endothelschäden, welche die Bildung von Atherosklerose induzieren und fördern können (Böcker et al., 2006). Determinanten der arteriellen Hypertonie sind Lebensalter, Adipositas und Salzzufuhr. Es wird geschätzt, dass im Durchschnitt je 20 mmHg Erhöhung des normalen systolischen und 10 mmHg Erhöhung des diastolischen Blutdrucks bei einem Druck zwischen 115/75 und 185/115 mmHg mit einer Verdopplung des kardiovaskulären Risikos einhergeht. Dieser Effekt scheint jedoch in Teilen reversibel zu sein (Herrington et al., 2016). So kann in Studien durch eine antihypertensive Therapie das Risiko eines Herzinfarktes um 20-25 % gesenkt werden, das einer Herzinsuffizienz sogar um mehr als 50 % (O'Donnell und Elosua, 2008).

- **Diabetes mellitus:** Die beim Diabetes mellitus (DM) erhöhten Blutzuckerspiegel und dadurch glykosylierte Proteine können das Endothel schädigen sowie Phagozytose und reaktive Fibrose triggern (Böcker et al., 2006). Außerdem wirkt die Erkrankung über eine Dyslipidämie, Hypertonie, Gefäßentzündungen und Thromboseneigung atherogen (Herrington et al., 2016). Ein Zusammenhang dieser Risikofaktoren wird durch das metabolische Syndrom beschrieben (O'Donnell und Elosua, 2008). Vor allem beim genetisch verursachten DM Typ II scheint ein verstärkter Zusammenhang zu ischämischen Herzerkrankungen zu bestehen. Hier verursacht eine Steigerung von 1 % des HbA1c im Blut eine Erhöhung des Risikos einer ischämischen Herzerkrankung um die Hälfte (Herrington et al., 2016).
- **Nikotinabusus:** Regelmäßiger Nikotinabusus hat Auswirkungen auf alle Stadien der Atherosklerose (Ambrose und Barua, 2004). Verschiedene Mechanismen werden als ursächlich diskutiert. So beeinflusst Rauchen Entzündungen, die Thrombozytenfunktion, Veränderungen der Hämodynamik und vor allem oxidativen Stress der Gefäßwand als auslösende Faktoren (Böcker et al., 2006; Ambrose und Barua, 2004). Schon regelmäßiges Passivrauchen steigert das Risiko für koronare Herzkrankheiten um 30 %, aktives Rauchen sogar um 80 % (Ambrose und Barua, 2004).
- **LDL:** Epidemiologische Studien zeigten als erstes einen Zusammenhang zwischen dem Gesamtcholesterin im Serum und dem kardiovaskulären Risiko und definierten das Plasmacholesterin daher als prädiktiven Marker. Diesen Erkenntnissen folgend rückte die Transportform, das LDL-Cholesterin, in den Fokus. Auch hier zeigte sich ein direkter Zusammenhang und darüber hinaus ein prognostischer Effekt bei jungen Menschen für das Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen (O'Donnell und Elosua, 2008). Die Höhe des LDL-Cholesterins wird von Faktoren wie Alter, Geschlecht, Genetik und Hormonen, sowie dem Lebensstil inklusive Ernährung beeinflusst. Gesamtcholesterinspiegel > 240 mg/dl gehen mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko einher, wobei das zeitliche Auftreten stark individuell schwankt (Fraunberger et al., 2005). Die Wirksamkeit LDL-Cholesterin senkender medikamentöser Therapien ist inzwischen hinreichend belegt (O'Donnell und Elosua, 2008). Im Gegensatz hierzu hat HDL-Cholesterin einen

protektiven Effekt, in dem es Cholesterin aus dem Gewebe zurück zur Leber transportiert (Böcker et al., 2006).

- **Entzündungen:** Entzündung sowohl lokal als auch systemisch ist ein wichtiger Mitspieler der Atherogenese. Die Anhäufung von Leukozyten spielt in allen Stadien der Erkrankung eine dominante Rolle. Lokale Inflammation wird vor allem durch die Lipid aufnehmenden Makrophagen befeuert (Lu und Daugherty, 2015). Auch systemisch führt die wiederholte und chronische Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie CRP zu einer Komplementaktivierung, welche die lokale Entzündung weiter unterhält (Fraunberger et al., 2005). Einige Studien beschrieben darüber hinaus eine Korrelation zwischen dem Auftreten infektiöser Mikroorganismen und der Inzidenz der Atherosklerose (Ross, 1999). Insgesamt kann die Entzündungsaktivität über eine Förderung der Atherogenese zu ischämischen Infarkten führen. Entzündungsmarker können daher zur Überwachung und Antiphlogistika therapieunterstützend hinzugezogen werden (Hansson, 2009).

1.2 CLEC4E-Rezeptor

CLEC4E (C-type lectin receptor 4e) oder auch Mincle (makrophage inducible C-type lectin) genannt, ist ein transmembranöser Rezeptor und gehört zur Gruppe der CLR (C-type lectin receptors) (Richardson und Williams, 2014). Diese wiederum gehören, wie auch Toll-like-Rezeptoren, zu den Pattern-recognition-Rezeptoren (PRRs). Diese Art der Rezeptoren definieren sich darüber, bestimmte „Patterns“ also Muster ihrer Liganden zu erkennen (Lu et al., 2018). So erkennt CLEC4E unter anderem sogenannte DAMPs (damage-associated molecular patterns) und PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). Hierbei spielt die extrazelluläre „carbohydrate recognition domain“ (CRD) des Rezeptors eine Rolle. Außerdem definieren Sequenzanalysen CLEC4E als Typ-2-Transmembranprotein. Dieser Typ besteht aus N-terminalem zytoplasmatischem Schwanz, transmembranöser Region und extrazellulärer C-terminaler Proteindomäne, hier wie der Name bereits sagt ein C-Typ Lektin (Abb. 3). Der CLEC4E-Rezeptor wird auf Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen und dendritischen Zellen exprimiert, sowie bei Menschen auf Chromosom 12 kodiert (Richardson und Williams, 2014).

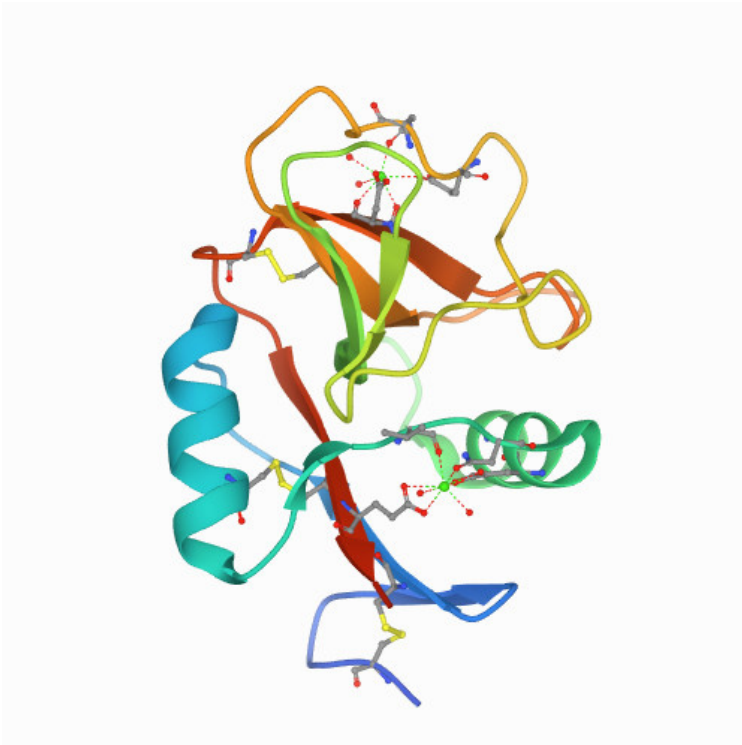


Abb. 3: Humanes CLEC4E (Furukawa et al., 2013): Farbgradient von blau nach rot entsprechend N- zu C-terminalem Ende

Wenn aktiviert koppelt CLEC4E sich mit der Fc Rezeptor γ -Kette (FcR γ), wobei die Signaltransduktion über die Phosphorylierung des „immunoreceptor tyrosine-based activation motif“ (ITAM) vermittelt wird. Dies löst wiederum eine intrazelluläre Signalkaskade aus, welche die Expression proinflammatorischer Zytokine fördert. Hierzu aktiviert das ITAM die Tyrosinkinase Syk und das nachgeschaltete Card9–Bcl10–MALT1 Signalosom. CARD9 ist ein wichtiges Adaptermolekül und vermittelt, z.B. über Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, die Expression immunologischer Gene und die Produktion von Zyto- und Chemokinen (Richardson und Williams, 2014; Lu et al., 2018). Neben der Wirkung von CLEC4E ist vor allem die Aktivierung des Rezeptors von Interesse und so konnten im Laufe der Jahre mehr und mehr Liganden identifiziert werden. Der erste Ligand wurde von Wells et al. (2008) als *Candida albicans* identifiziert. CLEC4E bindet die Hefe und steigert die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine, wobei die genaue bindende Struktur bis heute nicht identifiziert werden konnte (Wells et al., 2008; Richardson und Williams, 2014). Ein wissenschaftlicher Durchbruch gelang durch die Identifizierung des CLEC4E Liganden TDM (Trehalose-6,6'-Dimykolat). TDM, früher

auch als Cord-Faktor bezeichnet, ist ein Glykolipid der mykobakteriellen Zellwand und die meistuntersuchtete immunstimulatorische Komponente des *Mycobacterium tuberculosis*. Somit fördert CLEC4E, über proinflammatorische Zytokine, die Entstehung von Granulomen, einem charakteristischen pathologischen Korrelat der Tuberkulose. Darüber hinaus bindet auch das synthetische Analogon TDB (Trehalose-6,6-Dibehenate) an den Rezeptor und fungiert als starker Ligand (Ishikawa et al., 2009; Lu et al., 2018; Richardson und Williams, 2014). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde nach weiteren Liganden gesucht. So kann auch Glycerol Monomycolate (GroMM), ein weiteres von Mykobakterien produziertes Glycolipid, CLEC4E binden. Dies gelang jedoch nur bei humanem, nicht bei murinem CLEC4E (Hattori et al., 2014). Auch Arten von Pilzen wie *Malassezia* und *Fonsecaea*, beide beteiligt an der Entstehung von diversen Hautkrankheiten mit inflammatorischer Komponente, konnten als Liganden ermittelt werden (Richardson und Williams, 2014). Neben diesen exogenen können auch endogene Strukturen CLEC4E binden. So können etwa tote Zellen den Rezeptor aktivieren. Als Ligand konnte SAP-130 (spliceosome-associated protein 130) aus den toten Zellen isoliert werden (Lu et al., 2018). Schließlich brachte die Entdeckung eines weiteren TDM-Rezeptors neue Erkenntnisse über die Funktionsweise von CLEC4E. MCL (makrophage C-type lectin; Clec4d) ist ein homologer Rezeptor und wird auf myeloischen Zellen exprimiert. MCL reguliert die Transkription und Expression von CLEC4E. Zusammen formen die beiden Rezeptoren an der Zelloberfläche ein Heterodimer und können durch ihren synergistischen Beitrag das Ligandenspektrum erweitern. So bindet beispielsweise CLEC4E den Kohlenhydrat- und MCL den Lipidanteil des TDM. Dies lässt spekulieren, dass weitere bisher unbekannte CLR-Heterodimere das Ligandenspektrum weiter vergrößern können (Lu et al., 2018; Richardson und Williams, 2014).

Clément et al. (2016) stellen in ihrer Arbeit erstmals den Vergleich zwischen tuberkulösen Granulomen und fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen her. Beide besitzen einen nekrotischen Kern, bestehend aus dem Zellschrott untergehender Zellen und Cholesterin in Form von Kristallen, umgeben von einer fibrösen Kapsel bzw. Kappe. Diese Ähnlichkeiten führten zu der Vermutung, dass CLEC4E auch an der Entstehung von atherosklerotischen Plaques beteiligt sein könnte. Und tatsächlich konnte gezeigt werden, dass CLEC4E auf den Schaumzellen atherosklerotischer Läsionen, nahe dem

nekrotischen Kern, exprimiert wird. Darüber hinaus entwickeln Mäuse, denen ein CLEC4E^{-/-} Knochenmark transplantiert wurde, weniger atherosklerotische Läsionen und akkumulierten weniger neutrale Lipide innerhalb der Läsion. Zudem scheint eine erhöhte CLEC4E-Expression den Cholesterinabtransport aus den Zellen zu verhindern, indem das Vorkommen von Abca1 innerhalb der Membran gesenkt wird. Das Membranprotein Abca1 transportiert Cholesterin aus dem Zytosol an die Zelloberfläche. Die CLEC4E⁺ Läsionen weisen außerdem eine erhöhte Zahl an Immunzellen wie Makrophagen und T-Zellen auf. Stimulation des Rezeptors erhöht die Expression proinflammatorischer Zytokine und Mediatoren. Auch die Proliferation von Makrophagen scheint CLEC4E vermittelt zu sein, es wird davon ausgegangen das hierbei die Proteine der „unfolded protein response“ (UPR) eine Rolle spielen. Die UPR ist eine Reaktion der Zellen auf Stress welcher durch fehlerhafte Proteinfaltung im endoplasmatischen Retikulum (ER) entsteht. Dieser ER-Stress ist ein bekannter Auslöser für Zelltod und spielt auch beim Untergang von Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen eine Rolle. Etwa zeitgleich zu diesen Erkenntnissen von Clément et al. (2016) über die entscheidende Rolle von CLEC4E bei der Entstehung und Förderung atherosklerotischer Läsionen fanden Kiyotake et al. (2015) einen bisher unbekanntem endogenen Liganden: Cholesterinkristalle (CCs). Humanes CLEC4E bindet direkt an beschichtetes Cholesterin und ist in der Lage mit CCs zu interagieren. Hervorzuheben ist hierbei die Tatsache, dass nur humanes, nicht aber CLEC4E anderer Spezies wie Mäuse und Ratten, CCs bindet. Auch andere Steroidhormone waren nicht fähig den Rezeptor zu binden. Wie viele andere Proteine erkennt CLEC4E Cholesterin über ein „cholesterol recognition/interaction amino acid consensus“ (CRAC) Motiv. Diese spezielle Aminosäuresequenz konnte jedoch nur beim humanen und nicht beim murinen Rezeptor gefunden werden. In Versuchen mit dendritischen Zellen, kultiviert aus Monozyten von gesundem Spenderblut, wurden die Folgen der CLEC4E Aktivierung untersucht. So hatte diese, ausgelöst durch die Gabe von CCs, eine gesteigerte Produktion von proinflammatorischen Molekülen wie Interleukin-1 β zur Folge.

Veltman et al. (2021) beschäftigten sich in einer aktuellen Studie mit dem Einfluss des CLEC4E-Rezeptors im akuten ischämischen Myokardinfarkt. Die Autoren konnten zeigen, dass eine myokardiale Ischämie und Reperfusion in Tiermodellen zu einer verstärkten Expression des Rezeptors im kardialen Gewebe führt. Darüber hinaus war ein Mangel

des Rezeptors in transgenen Mäusen mit einer geringeren Infarktgröße und besseren myokardialen Genesung assoziiert. Als Grund hierfür sehen die Autoren unter anderem eine reduzierte Migration von Neutrophilen in das betroffene Gewebe an. Außerdem konnte eine erhöhte Expression des Rezeptors im Blut von Patienten mit Myokardinfarkt im Vergleich zu Patienten mit chronischer KHK mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Diese Studien legen also eine bedeutende Rolle des CLEC4E-Rezeptors in der Atherogenese nahe, deren gesamte Dimension es zu erforschen gilt.

1.3 Fragestellung der Arbeit

Diese Dissertationsarbeit baut auf den gewonnenen Erkenntnissen über den CLEC4E-Rezeptor auf und beschäftigt sich vor allem mit seiner Rolle in der Atherogenese und den kardiologischen Auswirkungen beim Menschen. Wie zuvor beschrieben ist der Rezeptor in atherosklerotischen Läsionen zu finden und ist in der Lage Cholesterinkristalle (CCs) zu binden. In einem klinisch experimentellen Versuchsaufbau wird die Frage behandelt, inwieweit Monozyten und aus ihnen kultivierte Makrophagen den Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren und ob eine verstärkte Expression eine erhöhte CC-Aufnahme bedingt. Die hierzu benötigten Monozyten wurden aus den Buffy Coats von humanen Spendern gewonnen. Darüber hinaus ist vor allem die klinische Korrelation der Rezeptorexpression von Interesse. In der vorliegenden Arbeit soll die folgende Hypothese überprüft werden: der CLEC4E-Rezeptor führt über die Phagozytose von CCs durch Monozyten und Makrophagen zu einer verstärkten Schaumzellbildung, hierüber zu einer erhöhten Inzidenz an KHK und letztlich zu einem häufigeren Auftreten von Herzinfarkten. Um diese Hypothese zu verifizieren wurde das Blut von Patienten die sich einer Herzkatheteruntersuchung unterzogen gewonnen. Die aus dem Blut isolierten Monozyten wurden mittels Durchflusszytometrie auf ihre CLEC4E-Expression untersucht und durch Inkubation mit CCs auf eine verstärkte Cholesterinaufnahme und CLEC4E-Induktion getestet. Die Ergebnisse dieser in vitro Versuche wurden anschließend mit den Patientendaten bezüglich kardiovaskulärer Risikofaktoren und akuter sowie chronischer kardiologischer und internistischer Erkrankungen verglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Buffy Coats

2.1.1 Isolation der Makrophagen aus Buffy Coats

Die Buffy Coats wurden uns vom Blutspendedienst der Uniklinik Bonn (Institut für experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin) zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden anonymisiert am selben Tag verarbeitet.

Der Buffy Coat wurde in 15 ml-Aliquots auf 50 ml Tubes (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) verteilt und diese anschließend auf je 35 ml mit 1 x PBS-Lösung (Gibco by life technologies by Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) aufgefüllt. Es wurde 15 ml Biocoll Separating Solution (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) in ein frisches Tube (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) vorgelegt und mit 35 ml der verdünnten Buffy Coat Proben beschichtet. Zur Phasentrennung der Zellmischung wurde der Biocoll für 20 Minuten mit 600 g bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). Die sich dann in der Interphase befindlichen Zellen wurden abpipettiert und mit 1 x PBS-Lösung (Gibco by life technologies by Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) auf insgesamt 50 ml aufgefüllt. Zum Waschen wurden die Zellen für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 375 g zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) und der Überstand anschließend verworfen. Um die Aliquots der einzelnen Buffy Coats wieder zusammenzuführen wurden die Zellpellets in je 10 ml 1 x PBS-Lösung (Gibco by life technologies by Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) gelöst und gemeinsam in ein Tube (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) überführt. Zum erneuten Waschen wurden die Zellen bei gleichen Einstellungen zentrifugiert und in 10 ml 1 x PBS-Lösung aufgenommen. Die Zellsuspension wurden mit einem Falcon CellStrainer, 40 µm micron pores (Falcon by Corning, Corning, NY, USA) gefiltert, weitere 10 ml 1 x PBS-Lösung zugegeben und bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Die Zellen in der Suspension wurden mikroskopisch mittels Neubauer-Zählkammer (Brand GmbH, Wertheim, Deutschland) ausgezählt, sodass auf 10^8 Zellen 800 µl MACS-Puffer (0,5 % BSA, 2 mM EDTA) gegeben werden konnte. Es wurden je 800 µl in ein neues 15 ml Tube (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) überführt und pro Probe 200 µl

CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) mit 4 °C zugefügt. Die Proben wurden für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert und währenddessen alle paar Minuten geschwenkt. Die Zellen wurden dann mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen und bei Raumtemperatur für 10 Minuten mit 300 g zentrifugiert. Unter einer biologischen Sicherheitswerkbank (MSC-Advantage™, Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) wurde ein QuadroMACS Separator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) inklusive gekühlten LS Columns (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) installiert und pro Column je ein 15 ml Tube (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) als Auffangbehältnis platziert. Es sind einmalig je 3 ml MACS-Puffer zum Befeuchten durch die Columns durchgelaufen. Die Zellpellets wurden in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen und auf die Columns gegeben. Sobald die markierten Zellen einmal durchgelaufen sind wurden drei Mal je 3 ml MACS-Puffer darauf gegeben, die Columns waren zu keinem Zeitpunkt trocken. Anschließend wurden die Columns in frischen 15 ml Tubes (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) platziert und zum Entfernen der markierten Zellen 5 ml MACS-Puffer zugegeben und sofort mithilfe des Kolbens hinuntergedrückt. Die so erhaltenen Zellsuspensionen wurden gepoolt und mit einer Neubauer-Zählkammer (Brand GmbH, Wertheim, Deutschland) mikroskopisch ausgezählt. Die bei Raumtemperatur und 300 g für 10 Minuten zentrifugierten Zellen wurden dann entsprechend einer Konzentration von 8×10^6 /ml in Medium aufgenommen. Das verwendete DMEM/F-12 Medium (Gibco by life technologies by Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) enthielt 10 % FBS (Gibco by life technologies by Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1 % Penicillin/Streptomycin (Merck Millipore, Burlington, MA, USA), sowie rekombinanten Human M-CSF (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) in einer Konzentration von 10 ng/ml. Es wurden je 2,5 ml des Mediums in eine Zellkulturschale mit 22,1 cm² (TPP, Trasadingen, Schweiz) vorgelegt und 500 µl der Zellsuspension hinzugefügt. Die Zellen wurden bei 37 °C in einem CO₂-Zellinkubator (Sanyo, Moriguchi, Japan) inkubiert und das Medium an Tag 0+4, sowie 0+6 steril unter einer Sicherheitswerkbank (MSC-Advantage™, Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) gewechselt.

Die ausgereiften Makrophagen wurden an Tag 0+7 geerntet. Dazu wurde unter einer sterilen Sicherheitswerkbank (MSC-Advantage™, Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) das Medium von den Zellkulturschalen abpipettiert und die Zellkulturschalen je

zweimal mit 1 ml 1 x PBS-Lösung (Gibco by life technologies by Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) gewaschen. Zum Ablösen wurden 3 ml Cell Dissociation Solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) zugegeben und für 5 Minuten bei 37 °C in einem CO₂-Zellinkubator (Sanyo, Moriguchi, Japan) inkubiert. Die Zellen wurden mithilfe eines Zellschabers (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gelöst und die Reaktion durch Zugabe von 3ml Medium gestoppt. Die Proben wurden in 15 ml Tubes (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) überführt und bei Raumtemperatur für 8 Minuten mit 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und den Zellen zum Waschen 5 ml 1 x PBS-Lösung zugefügt, sowie erneut bei gleicher Einstellung für 8 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 100 µl abgenommen und die fertigen Makrophagen für die folgenden Versuche weiterverwendet.

2.1.2 Inkubationszeitbestimmung

Um die Zellen ausreichend lange mit Cholesterinkristallen zu sättigen, wurde zunächst eine Testreihe zur Inkubationszeitbestimmung durchgeführt. Die Makrophagen wurden wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben isoliert und ausgereift. An Tag 0+7 wurde das Medium der Zellkulturschalen (n=20) abgenommen und die Zellen mit 1 ml 1 x PBS-Lösung (Gibco by life technologies by Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit CCs inkubiert, indem je 1 ml Zellmedium versetzt mit 3×10^7 CC/µl auf die Zellen gegeben wurde. Die Zellen wurden für 0, 20, 40, 80 oder 160 Minuten in einem CO₂-Zellinkubator (Sanyo, Moriguchi, Japan) bei 37 °C mit den CCs inkubiert, wobei je n=4. Die Zellen mit der definierten Inkubationszeit von 0 Minuten wurden direkt geerntet ohne Inkubation mit CCs. Nach der jeweils definierten Inkubationszeit wurden die Zellen wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben geerntet. Die einzelnen Proben wurden mit 1 µl Zombie Viability Dye (BioLegend, San Diego, CA, USA) pro 100 µl Zellsuspension bei Raumtemperatur für 20 Minuten ohne Lichteinfluss gefärbt. Zum Abstoppen und Waschen wurden pro Probe 3 ml 1 x PBS-Lösung (Gibco by life technologies by Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) zugegeben und bei 10 °C für 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Die Zellen wurden mit 12,5 µl gekühltem 4 % PFA (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) für 5 Minuten fixiert. Danach wie im Schritt zuvor beschrieben mit 3 ml 1 x PBS-Lösung (Gibco by life technologies by Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) gewaschen und zentrifugiert. Die Zellen wurden mit 3 µl

Human TruStain FcX™ Blocking Buffer (BioLegend, San Diego, CA, USA) für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zunächst eine Färbung mit einem unkonjugierten CLEC4E-AK durchgeführt und dieser mit einem sekundären Antikörper für die Durchflusszytometrie markiert. Dafür wurden 1,5 µl Anti-CLEC4E antibody (Abcam, Cambridge, UK) für 15 Minuten in lichtgeschützter Umgebung auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden wie schon zuvor gewaschen und zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden 1,5 µl Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (Abcam, Cambridge, UK) für 15 Minuten ebenfalls lichtgeschützt zu den Proben gegeben und nach Ablauf der Inkubationszeit gewaschen und zentrifugiert wie beschrieben. Die gefärbten Makrophagen wurden vor der Einmessung mittels Durchflusszytometrie durch einen Falcon CellStainer, 70 µm micron pores (Falcon by Corning, Corning, NY, USA) gefiltert und in FACS-Tubes (Falcon by Corning, Corning, NY, USA) überführt. Die Zellen wurden mit dem BD FACS Canto II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) eingemessen.

2.1.3 Cholesterinkristallaufnahme durch Makrophagen

Um die Cholesterinaufnahme und die Korrelation zur CLEC4E-Expression auf den Makrophagen zu untersuchen wurden die Makrophagen zunächst wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben aus Buffy Coats isoliert und auf Zellplatten kultiviert. An Tag 0+7 wurden die Zellen auf 4 verschiedene Ansätze (n=3-5) aufgeteilt und mit unterschiedlichen Konzentrationen an CCs inkubiert. Das vorhandene Medium wurde von den Zellkulturschalen abgenommen und die unterschiedlichen Ansätze mit je 0; $1,5 \times 10^7$; 3×10^7 oder 6×10^7 CC/µl in 1 ml Medium versetzt. Die Zellen wurden für die optimale Inkubationszeit von 80 Minuten (Abb. 6) in einem CO₂-Zellinkubator (Sanyo, Moriguchi, Japan) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion abgestoppt und die Makrophagen wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben geerntet und in 100 µl 1 x PBS-Lösung (Gibco by life technologies by Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) aufgenommen. Pro Probe wurden 1 µl Zombie Viability Dye (BioLegend, San Diego, CA, USA) für 20 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Danach wurde zum Waschen 3 ml 1 x PBS-Lösung (Gibco by life technologies by Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) zugefügt und für 10 Minuten bei 10 °C mit 300 g zentrifugiert. Die Zellen wurden für 5 Minuten mit 12,5 µl 4 % PFA (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) auf 100 µl Probe fixiert, erneut gewaschen und mit 3 µl Human TruStain FcX™ Blocking Buffer (BioLegend, San Diego, CA, USA) für 10 Minuten geblockt. Zur Färbung des CLEC4E-

Rezeptors wurden 1,5 µl Anti-CLEC4E antibody (Abcam, Cambridge, UK) für 15 Minuten dunkel inkubiert, die Zellen wieder gewaschen und zentrifugiert, sowie mit 1,5 µl Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (Abcam, Cambridge, UK) ebenfalls für 15 Minuten lichtgeschützt behandelt. Zuletzt wurden die Zellen gewaschen, durch einen Falcon CellStainer, 70 µm micron pores (Falcon by Corning, Corning, NY, USA) gefiltert und in FACS-Tubes (Falcon by Corning, Corning, NY, USA) überführt. Alle Proben wurden mit dem BD FACS Canto II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) eingemessen. Pro Probe wurden zwischen 30.000-50.000 Events eingemessen.

2.2 Patientenproben

2.2.1 Patientenkollektiv

Tab. 2: Baseline Charakteristika

Charakteristika	n=60
Alter — Jahre	69,7 ±11,2
Männlich	35 (58,3)
Koronare Herzkrankheit	44 (73,7)
1 Gefäß KHK	6 (10)
2 Gefäß KHK	8 (13,3)
3 Gefäß KHK	29 (48,3)
Perkutane Koronarintervention	21 (35)
Herzinfarkt	24 (40)
STEMI	2 (3,3)
NSTEMI	22 (36,7)
Aortenklappenstenose	15 (25)
Linksventrikuläre Ejektionsfraktion <55 %	24 (40)
Arterielle Hypertonie	44 (73,7)
Diabetes mellitus Typ II	13 (21,7)
Nikotin-Abusus	24 (40)
Positives Troponin*	19 (31,7)
Erhöhtes LDL**	21 (35)
Erhöhtes CRP***	30 (50)
Leukozyten ≥10 ⁴ /µl	16 (26,7)

Die Werte werden dargestellt als MW ±SD oder n (%)

MW= Mittelwert; SD= Standardabweichung

* >53 ng/L

** ≥ 100mg/dl

*** ≥3mg/l

In die Studie wurden insgesamt 60 Patienten eingeschlossen, welche sich elektiv oder notfallmäßig zur Herzkatheteruntersuchung am Uniklinikum Bonn einfanden (Tab. 2). Der Altersdurchschnitt lag bei 69,7 Jahren mit einem Männeranteil von 58,3 %. Bei 73,7 % der Patienten bestand eine koronare Herzkrankheit, wobei die Mehrheit dieses Kollektivs mit 65,9 % (n=29) an einer 3-Gefäßerkrankung litt. 40 % der Patienten wiesen einen akuten Herzinfarkt auf, bei 36,7 % (n=22) konnte eine NSTEMI und bei 3,3 % (n=2) ein STEMI diagnostiziert werden. Mit 31,7 % lag die Rate an notfallmäßigen Herzkathetern (Troponin positiv) leicht unter der Rate an tatsächlichen Herzinfarkten. In 35 % der Fälle erhielten die Patienten eine perkutane Koronarintervention (PCI). Das kardiovaskuläre Risikoprofil gestaltet sich wie folgt: 73,7 % der Patienten präsentierten sich mit bekannter arterieller Hypertonie, 21,7 % mit Diabetes mellitus Typ II (hiervon 46,2 % Insulinpflichtig), 40 % mit bestehendem oder anamnestischen Nikotinabusus und 35 % mit Hyperlipidämie (erhöhtes LDL). Kardial vorerkrankt waren 25 % mit Aortenklappenstenose (exklusive Zustand nach Aortenklappenersatz) und 40 % mit eingeschränkter linksventrikulärer Ejektionsfraktion (< 55 %). Hinsichtlich der Entzündungsparameter wiesen 50 % ein erhöhtes CRP, sowie 25,7 % erhöhte Leukozyten im Blut vor Beginn des Eingriffs auf.

2.2.2 Gewinnung der Patientenproben

Alle Blutproben wurden bei Herzkatheteruntersuchungen in der Medizinischen Klinik und Poliklinik II, Abteilung für Kardiologie der Universitätsklinik Bonn in dem Zeitraum vom 08.06.-04.10.2018 gesammelt. Alle Patienten haben freiwillig gespendet und wurden vorher auf der Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983) von einem der zuständigen Ärzte aufgeklärt. Die Proben wurden anonymisiert und randomisiert verwertet. Die Durchführung der Studie wurde durch die Ethikkommission der Universitätsklinik Bonn genehmigt. Bei den Blutproben handelt es sich um arterielles Blut, welches während der Untersuchung über eine radiale oder femorale Schleuse vor der Intervention entnommen wurde. Das Blut wurde in einer 20ml Spritze von dem intervenierenden Arzt entnommen und je 8ml mittels einer Kanüle in BD Vacutainer® CPT™ Blutentnahmeröhrchen (BD, Franklin Lakes, USA) überführt (Abb. 4). Die Zellen wurden mit der im CPT-Röhrchen enthaltenen Flüssigkeit durch sofortiges fünfmaliges Invertieren gemischt. Bis zur weiteren Verarbeitung durften die CPT-Röhrchen maximal 24 Stunden aufrecht bei Raumtemperatur gelagert werden.

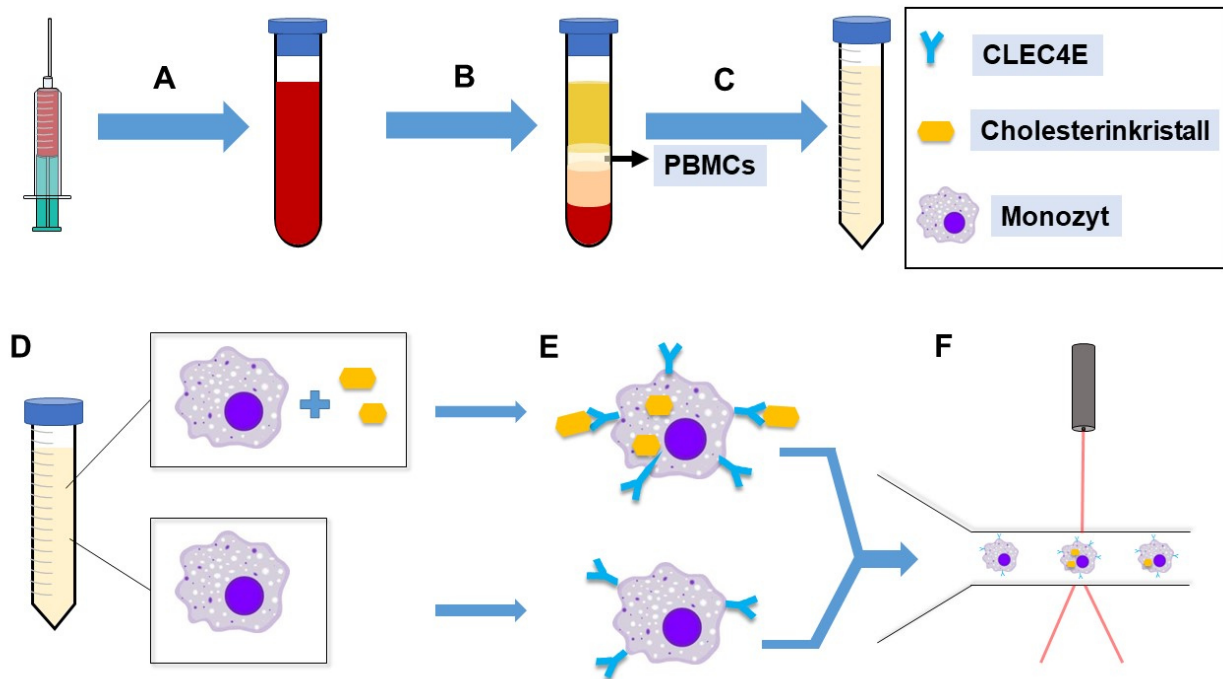


Abb. 4: Versuchsaufbau: (A-C) Aus den Patientenproben werden mittels Gradiententrennung in CPT-Röhrchen die PBMCs gewonnen. (D) Die enthaltenen Monozyten werden mit CCs inkubiert und (E) können diese über den CLEC4E-Rezeptor binden. (F) Durchflusszytometrische Analyse der CLEC4E-Expression und CC-Aufnahme.

2.2.3 Isolation mononukleärer Zellen

Zur Isolation der mononukleären Zellen (PBMCs) aus dem Blut der Patienten wurde, wie zuvor beschrieben, das Vacutainer® Cell Preparation Tube (CPT™) von Becton Dickinson (BD) verwendet. Dieses System enthält 1 ml Na³-Citrat 0,1 M zur Antikoagulation kombiniert mit 2 ml FICOLL™. Ficoll™-Paque ist die klassische Methode zur Gradiententrennung von Blutkomponenten. Sie basiert auf einer hochmolekularen Schicht aus Saccharose und Epichlorhydrin. Durch Zentrifugation entsteht ein Gradient der das periphere Blut in Plasma, mononukleäre Zellen, sowie ein Pellet aus Erythrozyten und Granulozyten trennt (Corkum et al., 2015; Baum, 2019). Die Schicht der mononukleären Zellen kann so einfach abgenommen werden und steht für geplante Versuche zur Verfügung (Abb. 4).

2.2.4 Herstellung der Cholesterinkristalle

Die für die Versuche verwendeten Cholesterinkristalle wurden wie im Folgenden beschrieben hergestellt. Zuerst wurden 40 mg der Kristalle (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,

USA) mit 20 ml 1-Propanol (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) in einem 50 ml Tube (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) gelöst um eine 2 mg/ml Cholesterinlösung herzustellen. Anschließend wurden 30 ml destilliertes Wasser (Invitrogen by life technologies by Thermofisher Scientific, Grand Island, NY, USA) hinzugefügt. Die Lösung wurde stets bei Raumtemperatur angefertigt und für mindestens 10 Minuten zur Stabilisierung der Kristalle ruhen gelassen. Zum Ausfällen wurde die Lösung danach für 10 Minuten bei 3800 g zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). Der Überstand wurde nach der Zentrifugation bis auf 5 ml mit einer Pipette abgenommen und je 1 ml der verbliebenen Cholesterinlösung auf 1,5 ml Eppendorf-Tubes (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) verteilt. Zum Trocknen der Kristalle wurden die Proben mit offenem Deckel über Nacht bei 30 °C in einem Vakuumkonzentrator (Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. Die getrockneten Kristalle wurden in 1 ml 0,1 % FBS (Gibco by life technologies by Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) in PBS (Gibco by life technologies by Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) aufgenommen, gevortext (VELP Scientifica, Usmate (MB), Italy) und 10 Minuten in einem Ultraschallbad (Sonorex, Banderlin, Berlin, Deutschland) resuspendiert. Anschließend wurde die genaue Konzentration der Cholesterinkristalle mithilfe eines BD FACS Calibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) bestimmt. Hierzu wurden 5 µl der Lösung 1:100 in 495 µl 0,1 % FBS in PBS verdünnt. Zum Zählen wurden 50 µl CountBright™ absolute counting beads (Invitrogen by Thermofisher Scientific, Eugene, OR, USA) gevortext (VELP Scientifica, Usmate (MB), Italy) und der Messprobe zugefügt. Die Partikelzahl wurde durchflusszytometrisch unter Verwendung der BD CellQuest™ Pro Software bestimmt. Da die Konzentration der einzelnen Chargen abweicht, musste für die Versuchsdurchführung das Volumen der verwendeten Cholesterinkristalllösung bei für den Versuch definierter Menge angepasst werden.

2.2.5 Behandlung der Patientenproben mit Cholesterinkristallen

Die CPT-Röhrchen wurden vor der Zentrifugation einmal invertiert und bei 1650 g für 20 Minuten bei 20 °C in einer Ausschwingrotorzentrifuge (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. Die hierdurch ausgefallenen PBMCs wurden durch einmaliges Invertieren mit dem überstehenden Plasma gemischt. Die Zellsuspension

wurde vollständig in ein Tube (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) überführt und anschließend auf insgesamt 15 ml mit 1 x PBS-Lösung (Gibco by life technologies by Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) aufgefüllt. Die Zellen in der erhaltenen Lösung wurden mikroskopisch mittels Neubauer-Zählkammer (Brand GmbH, Wertheim, Deutschland) ausgezählt und je 1×10^6 Zellen für die Antikörperfärbung verwendet. Die entsprechende Menge Zellsuspension wurde jeweils in ein FACS-Tube (Falcon by Corning, Corning, NY, USA) pipettiert. Pro Patientenprobe wurden je vier Proben, davon zwei Behandelte und zwei Unbehandelte, sowie eine ungefärbte Kontrollprobe hergestellt. Die Zellen wurden anschließend bei 300 g 10 Minuten bei 20 °C in einer Ausschwingrotorzentrifuge (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. Der verbleibende Überstand wurde verworfen und die Zellen in 100 µl 1 x PBS (Gibco by life technologies by Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) aufgenommen. Die Hälfte der Proben wurde anschließend mit CCs behandelt. Die CCs wurden gevortext (VELP Scientifica, Usmate (MB), Italy) und je 120×10^6 CC-Partikel zu den Zellen gegeben. Die behandelten sowie die unbehandelten Proben wurden bei 37 °C 30 Minuten in einem CO₂-Zellinkubator (Sanyo, Moriguchi, Japan) inkubiert (Bakke et al., 2017; Pilely et al., 2019). Darauf folgend wurde durch Zugabe von 3 ml PBS (Gibco by life technologies by Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) die Inkubationszeit gestoppt und die Zellen gewaschen. Die Proben wurden bei 300 g und 10 °C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurde das Zellpellet in 100 µl 1 x PBS (Gibco by life technologies by Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) resuspendiert und die Proben zum Färben in eine 96-Well Platte (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) überführt.

2.2.6 Antikörper-Färbung

Zur Zellfixierung wurden 12,5 µl gekühltes 4 % PFA (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) zu 100 µl Zellsuspension hinzugegeben und für 5 Minuten inkubiert. Darauf wurden die Proben mit 3 µl Human TruStain FcX™ Blocking Buffer (BioLegend, San Diego, CA, USA) versetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt gelagert. Zur Färbung der Zellen wurde ein Mastermix der Antikörper angesetzt der pro Probe folgende Antikörper enthielt:

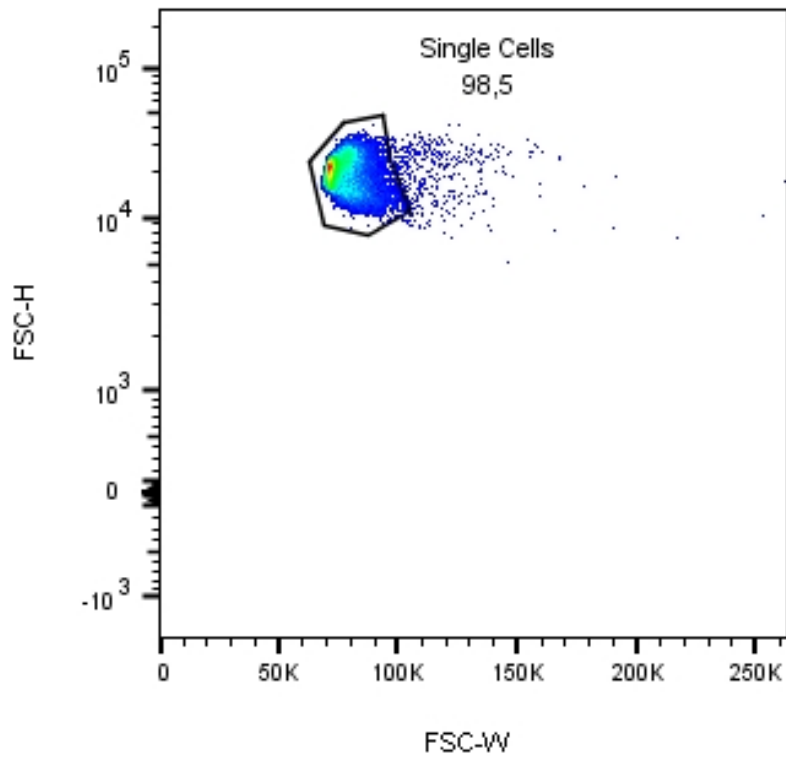
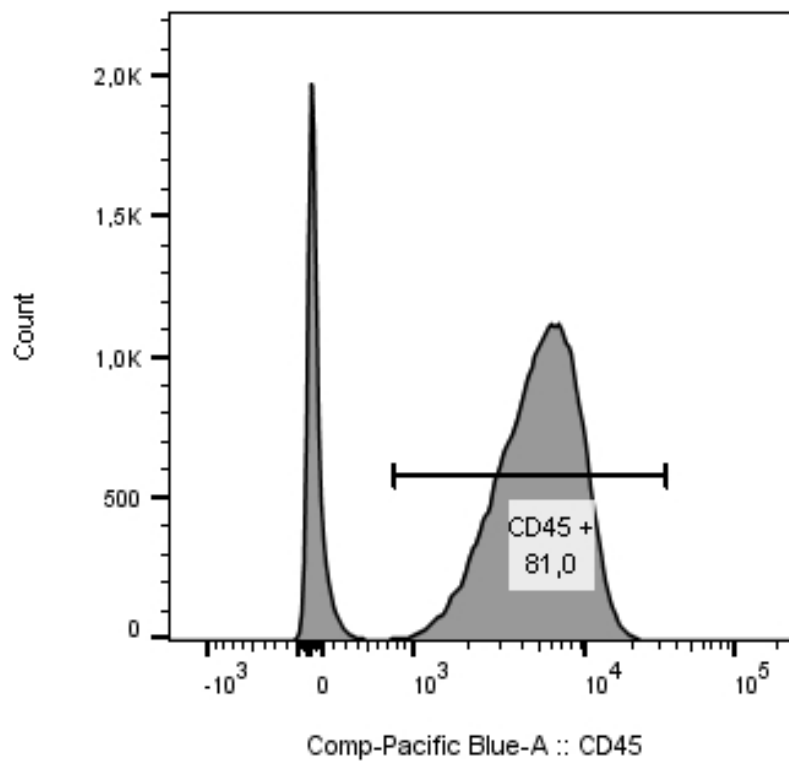
- 0,75 µl **CLEC4E-Antikörper** (Abcam, Cambridge, UK) konjugiert mit PE / R-Phycoerythrin Conjugation Kit (Abcam, Cambridge, UK)
- 1 µl **anti-human CD14 Antibody**, PerCP/Cyanine5.5 (BioLegend, San Diego, CA, USA)
- 1 µl **CD11b Monoclonal Antibody** (ICRF44), APC (eBioscience, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- 1 µl **anti-human CD45 Antibody**, Brilliant Violet 421™ (BioLegend, San Diego, CA, USA)

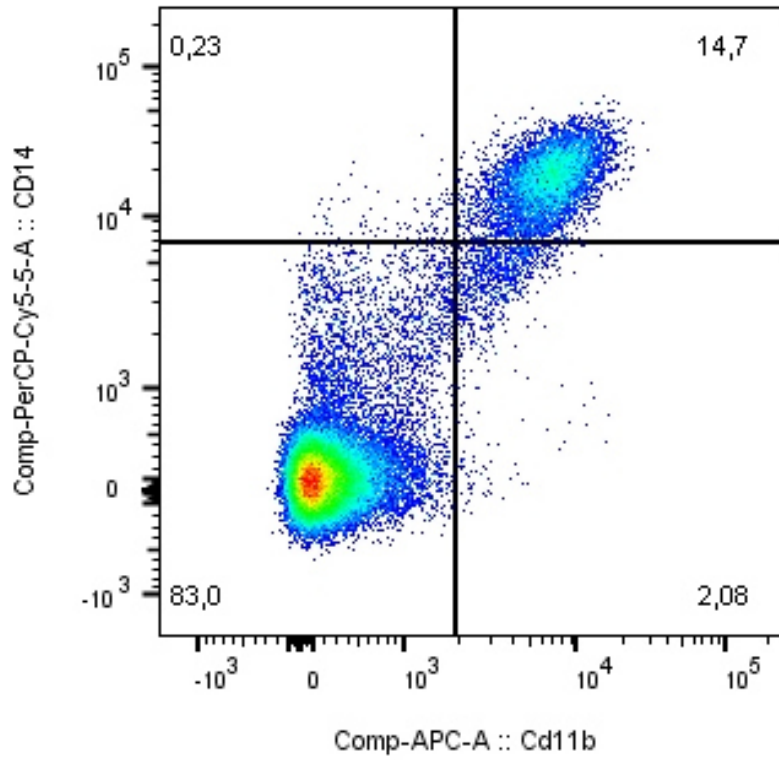
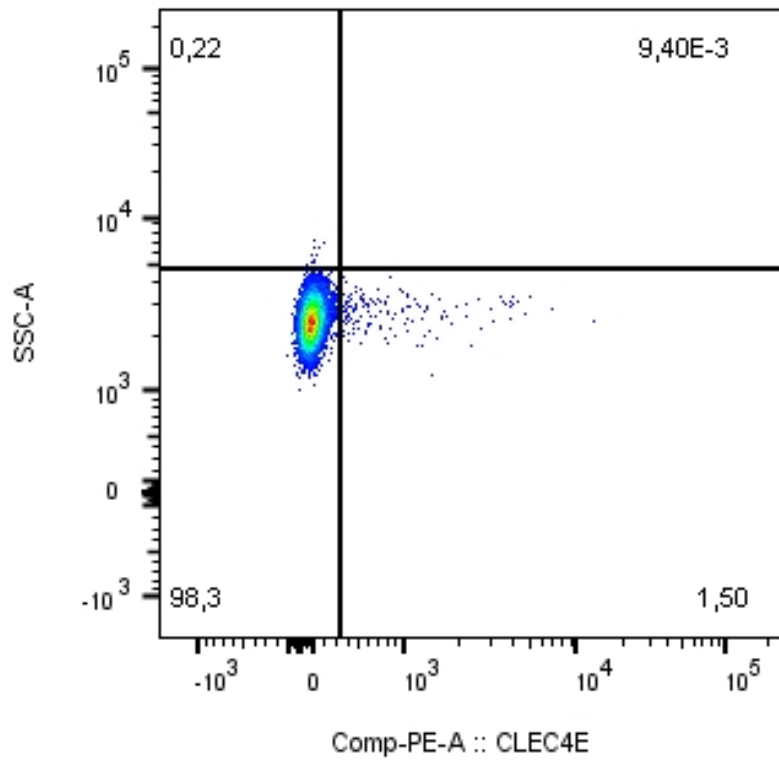
Je 3,75 µl Antikörper-Mix wurden pro Probe beigefügt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen mit 100 µl 1 x PBS (Gibco by life technologies by ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) gewaschen und für 10 Minuten bei 300 g und 10 °C in einer Plattenzentrifuge (Heraeus, Labofuge 400R, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 150 µl resuspendiert. Die Suspension wurde in FACS-Tubes (Falcon by Corning, Corning, NY, USA) überführt und zeitnah eingemessen. Pro Probe wurden je 100.000 Events eingemessen.

2.3 Durchflusszytometrie und Gating

Alle Proben wurden mit dem BD FACS Canto II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) eingemessen. Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit der FlowJo_V10 Software. Das Gating konzentrierte sich vor allem auf die Unterscheidung der Monozyten von allen eingemessenen PBMCs. Als erstes wurde ein gröberes Gate zur Trennung der PBMCs von Zelldetritus gesetzt. Zur Diskriminierung von Dubletten gegenüber Single-Cells wurden die PBMCs anhand ihrer Höhe und Breite im Forward Scatter (FSC-H gegen FSC-W) aufgetragen. Da zwei Zellen im Gegensatz zu einer Einzelzelle eine längere Zeit brauchen, um den Laser zu passieren, vergrößert sich ihre Breite im Forward Scatter (Cossarizza et al., 2019). Dies erlaubt ein Gating der Single-Cells (Abb. 5, A) als Population von ähnlicher Breite und Höhe. Um die Population der PBMCs noch genauer zu definieren wurde als Marker für Lymphozyten und Monozyten ein humaner CD45-Antikörper verwendet, der im Kanal für Pacific Blue als Histogramm gegen die Zellzahl aufgetragen wurde. Die CD45 positiven Zellen wurden gated (Abb. 5, B). Zur

Unterscheidung der Monozyten gegenüber den Lymphozyten wurden Antikörper gegen humanes CD14 und CD11b genutzt und in den entsprechenden Kanälen für APC und Cy5.5 gegeneinander aufgetragen. Zum Gating der doppelt positiven Zellen wurde ein Quadrant-Gate verwendet, diese Population stellt die Monozyten dar (Abb. 5, C). Bei der anschließenden Auftragung von Side Scatter (SSC-A) gegen CLEC4E-Expression im PE-Kanal der Population konnte sowohl die CC-Aufnahme als auch der Anteil der CLEC4E positiven Zellen untersucht werden. Zur Beurteilung der CC-Aufnahme wurden die Proben ohne CC-Zugabe herangezogen (Abb. 5, D). Als Aufnahme von CCs wurde eine Verschiebung der Monozyten im Side Scatter gewertet, da die Zellen durch deren Phagozytose an Granularität zunehmen (Samstad et al., 2014). Da der Side Scatter unter anderem ein Maß für die Granularität der Zelle ist, eignet er sich als Parameter. Die Monozyten wurden mithilfe eines Quadrant-Gates analysiert. Die horizontale Linie definiert die CC-Aufnahme und wurde anhand der CC freien Proben gesetzt, sodass in diesen Proben möglichst wenig Events oberhalb dieser Grenze liegen. Die Events oberhalb der Linie wurden anschließend in den mit CC behandelten Proben als CC positive Monozyten gewertet (Abb. 5, E). Die vertikale Linie setzt die Grenze zwischen CLEC4E negativen und positiven Zellen und wurde für jeden Patienten individuell gesetzt. Die Zellen rechts der Linie wurden als CLEC4E exprimierende Makrophagen gewertet. Die Events konnten so in vier Quadranten eingeteilt werden.

A**B**

C**D**

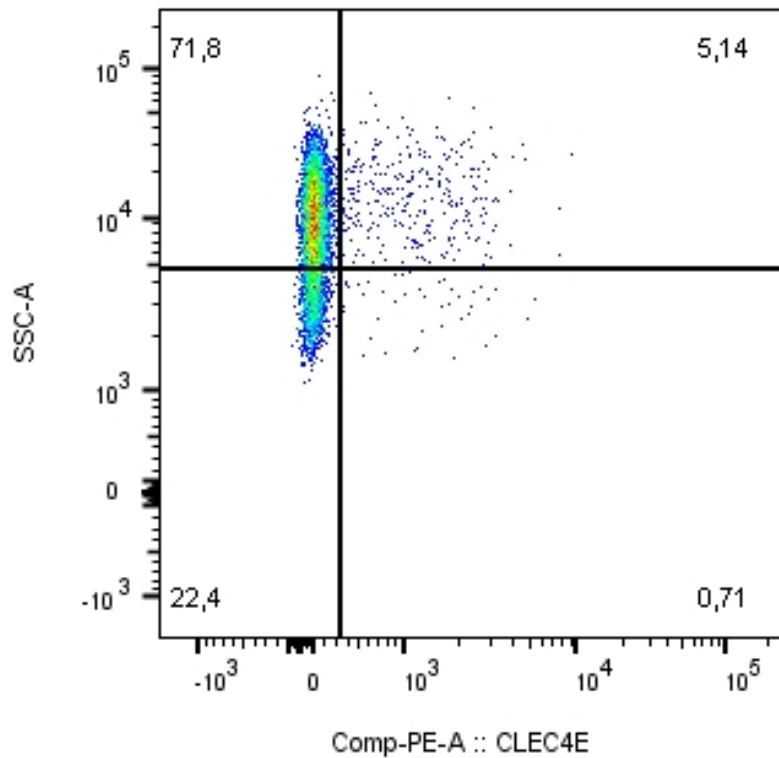
E

Abb. 5: Gatingstrategie der durchflusszytometrischen Daten: (A) Dubletten-Ausschluss durch Gating der Single Cells. (B) Histogramm der CD45+ Zellen zum Gating der Leukozyten. (C) CD14 gegen CD11b: Doppelt positive Zellen stellen die Population der Monozyten dar. (D) und (F) CLEC4E gegen Side Scatter (SSC-A). Darstellung der CLEC4E-Positivität und CC-Aufnahme ((D) ohne CCs, (E) mit CC-Inkubation).

2.4 Statistische Auswertung

Die Analyse der Daten erfolgte mittels GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA USA) und Microsoft Excel von Microsoft® Office 2013 (Microsoft, Redmond, USA). Zum Vergleich zweier Gruppen mit metrisch verteilten Daten wurden ungepaarte t-Tests durchgeführt. Die Ergebnisse wurden nach Berechnung der einseitigen, exakten Signifikanz in absoluten Zahlen und in Prozent angegeben. Die Gültigkeit der Nullhypothesen wurden zum Signifikanzniveau $\alpha = 5\%$ überprüft (*). Alle Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben, sofern nicht anders bezeichnet.

3. Ergebnisse

3.1 Buffy Coats

3.1.1 Inkubationszeitbestimmung

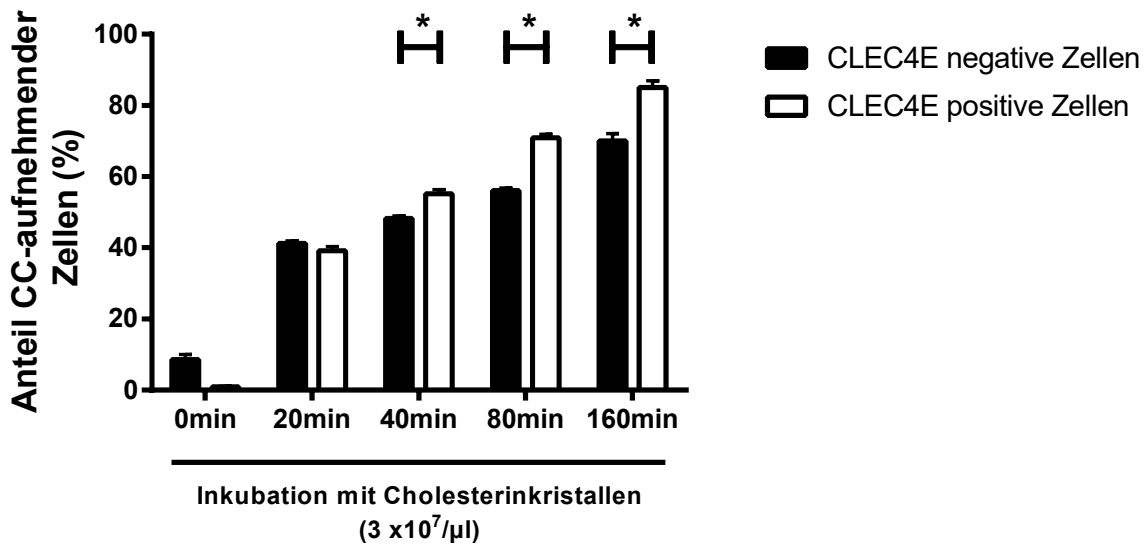


Abb. 6: Inkubationszeitbestimmung : Aus Buffy Coats isolierte und zu Makrophagen differenzierte Zellen wurden mit Cholesterinkristallen ($3 \times 10^7/\mu\text{l}$) inkubiert. Dargestellt ist eine Testreihe mit einer Inkubationszeit von 0 – 160 Minuten. Die Daten werden als Mittelwerte \pm SEM dargestellt ($n=4$), * $p<0,05$

Die aus Buffy Coats isolierten Makrophagen zeigen bei Verlängerung der Inkubationszeit mit CCs einen erhöhten Anteil an CC aufnehmenden Zellen. Bei einer Inkubationszeit zwischen 40-160 Minuten zeigen die CLEC4E positiven Makrophagen einen signifikant größeren Anteil dieser CC aufnehmenden Zellen im Vergleich zu den CLEC4E negativen Makrophagen. Die in Abb. 6 dargestellten Ergebnisse zur Bestimmung der Inkubationszeit stellen die Grundlage der in Kapitel 2.1.3 verwendeten Inkubationszeit dar.

3.1.2 Cholesterinaufnahme durch CLEC4E positive Zellen

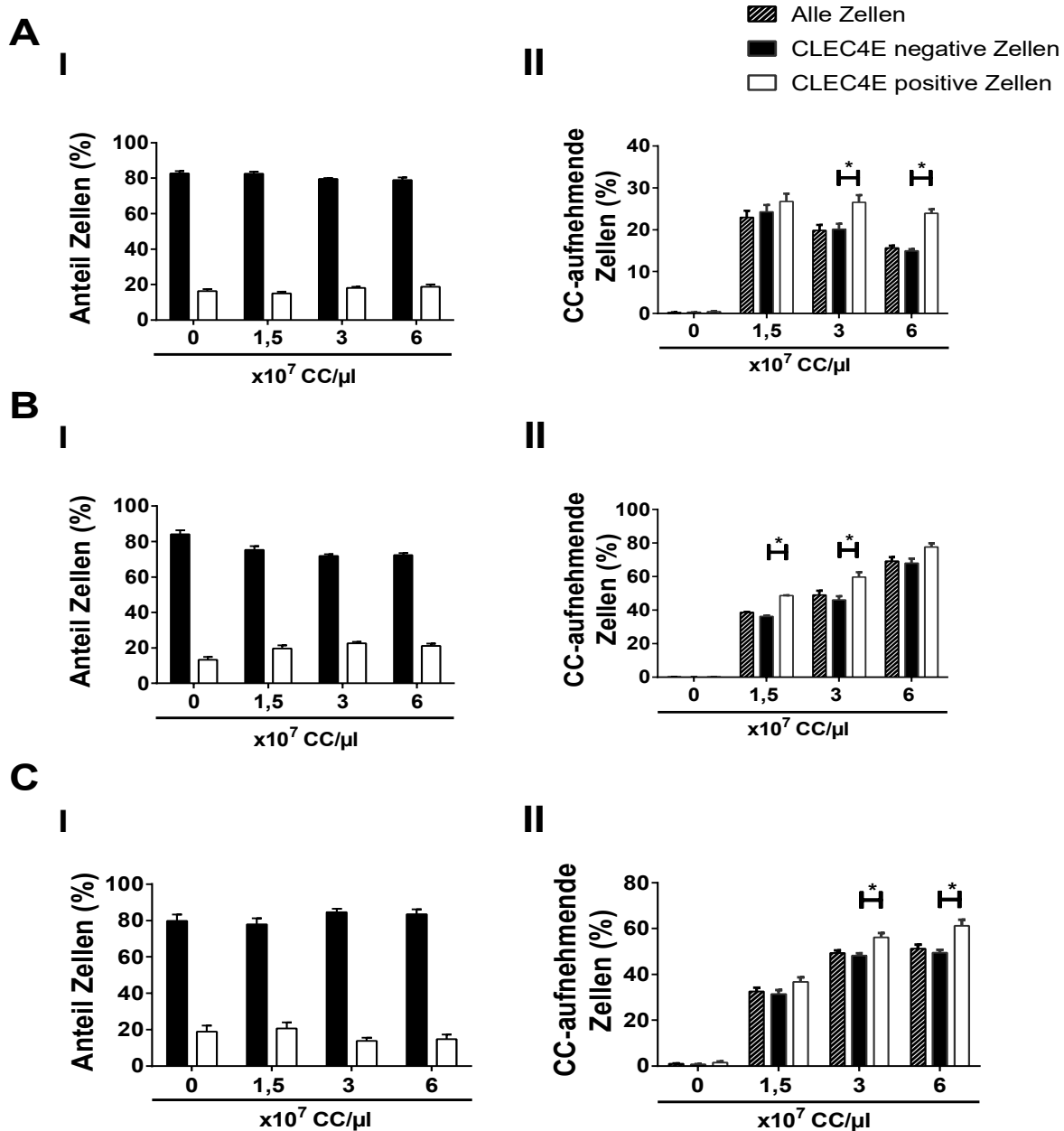


Abb. 7: FACS-Analyse der aus Buffy Coats kultivierten Makrophagen: Aus Buffy Coats wurden CD14⁺ Zellen isoliert und zu Makrophagen differenziert. Inkubation der Makrophagen mit verschiedenen CC-Konzentrationen. Für die anschließende Analyse der CC-Aufnahme erfolgte die Färbung der Zellen mit einem Vitalitäts- und einem Anti-CLEC4E Antikörper. Es werden die Daten der Durchflusszytometrie dargestellt. Der Versuch wurde mit Buffy Coats drei verschiedener Probanden durchgeführt (A, B, C). (I) Anteil der CLEC4E negativen und positiven Zellen an allen vitalen Makrophagen nach Stimulation mit verschiedenen CC-Konzentrationen (II) Anteil der CC aufnehmenden Zellen gesamt, sowie bei CLEC4E negativen und positiven Makrophagen. Dargestellt bei verschiedenen CC-Konzentrationen. Die Daten werden als Mittelwerte \pm SEM dargestellt (n=3-5). * $p < 0,05$

Die aus den Buffy Coats differenzierten Makrophagen zeigten durchschnittlich einen Anteil CLEC4E positiver Zellen von 17,6 % (Abb. 7: I A-C). In vitro nahmen diese CLEC4E positiven Zellen durchschnittlich mehr Cholesterinkristalle auf als die CLEC4E negativen. Insbesondere nach Zugabe der CCs in einer Konzentration von $3 \times 10^7/\mu\text{l}$ ergab sich in allen Versuchsreihen eine signifikant erhöhte Aufnahme durch die CLEC4E positiven Makrophagen (Abb. 7: II A-C).

3.2 Patientenproben

3.2.1 CLEC4E-Expression auf Monozyten nach CC-Inkubation

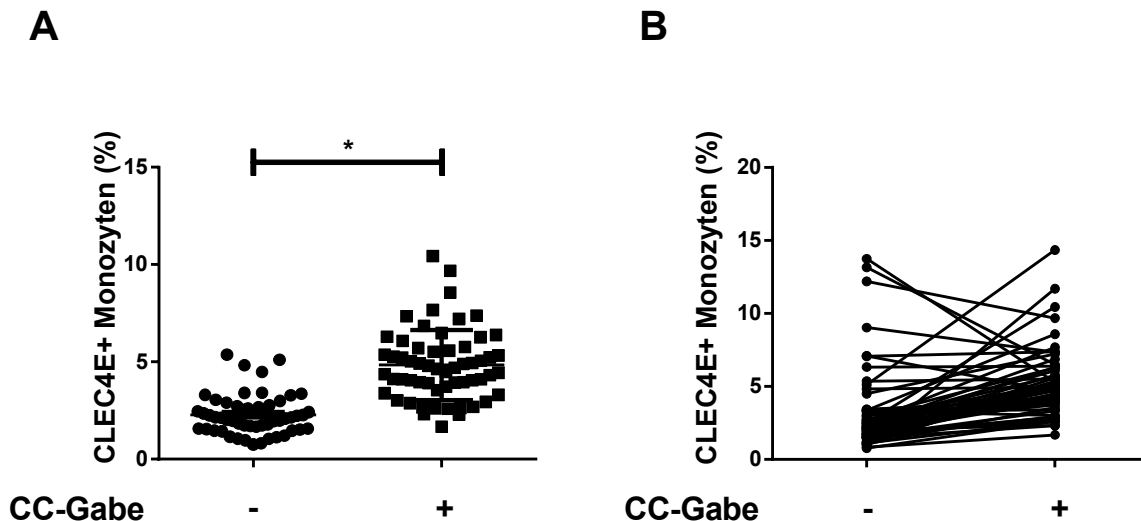


Abb. 8: CCs stimulieren die CLEC4E-Expression auf Monozyten: Aus Spenderblut gewonnene PBMCs wurden isoliert und anschließend mit 12×10^7 CC-Partikeln pro 1×10^6 Zellen für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Färbung der Monozyten mit Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmerkmale für Monozyten (CD45, CD14, CD11b) und CLEC4E erfolgte die Analyse mittels Durchflusszytometrie. (A) Anteil an CLEC4E positiven Monozyten in der Durchflusszytometrie ohne und mit Gabe von CCs. (B) Anteil an CLEC4E positiven Monozyten pro Patienten ohne und mit CC-Gabe. Daten gezeigt als Mittelwerte (\pm SEM) ($n=53-59$ pro Gruppe; * $p<0,05$).

Die Monozyten aus dem Blut der Spender zeigen einen signifikant erhöhten Anteil an CLEC4E positiven Zellen nach der Zugabe von Cholesterinkristallen (Abb. 8, A).

3.2.2 Cholesterinaufnahme durch CLEC4E positive Zellen

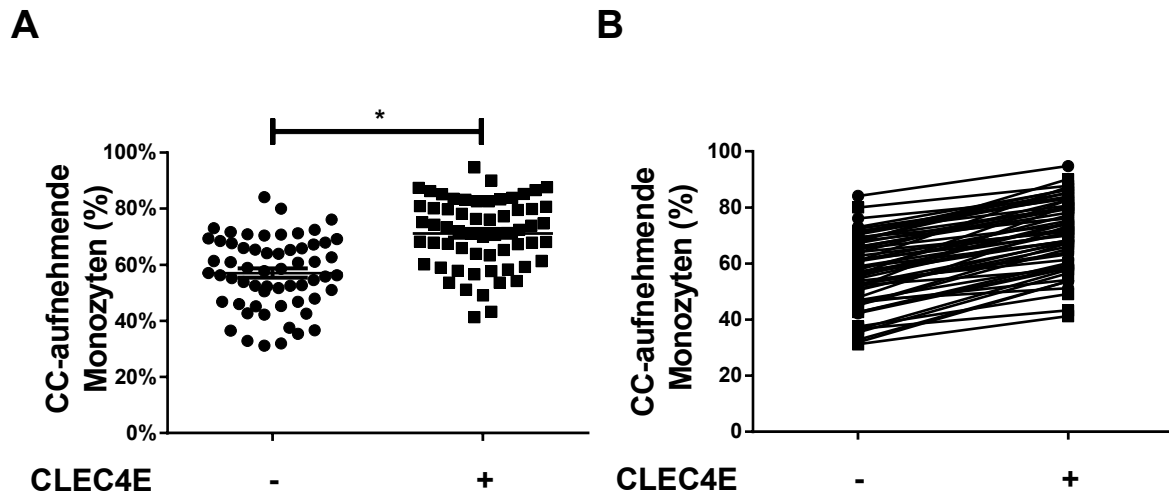


Abb. 9: CLEC4E positive Monozyten nehmen mehr CCs auf: Aus Spenderblut gewonnene PBMCs wurden für 30 Minuten mit 12×10^7 CC-Partikeln pro 1×10^6 Zellen bei 37°C inkubiert. Nach Färbung der Monozyten mit Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmerkmale für Monozyten (CD45, CD14, CD11b) und CLEC4E erfolgte die Analyse mittels Durchflusszytometrie. (A) Anteil CC aufnehmender Monozyten bei CLEC4E Negativität/Positivität in der Durchflusszytometrie. (B) Darstellung der Ergebnisse pro Patienten. Daten gezeigt als Mittelwerte (\pm SEM) ($n=60$ pro Gruppe; $*p<0,05$).

In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass CLEC4E exprimierende Monozyten nach Zugabe von Cholesterinkristallen einen signifikant höheren Anteil an CCs aufnehmen als Monozyten ohne CLEC4E-Expression (Abb. 9, A). Dieses Ergebnis lässt sich auch bei Betrachtung der einzelnen Werte pro Patienten verifizieren (Abb. 9, B).

3.2.3 CLEC4E-Expression und Phagozytose im akuten Myokardinfarkt

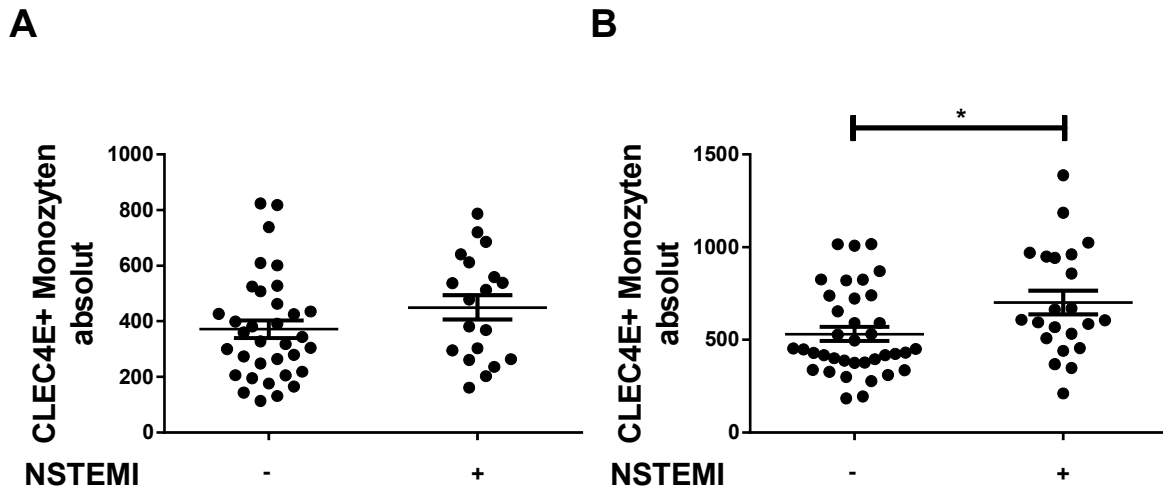


Abb. 10: Erhöhte Anzahl CLEC4E positiver Monozyten bei NSTEMI-Patienten: Aus Spenderblut gewonnene PBMCs wurden für 30 Minuten mit 12×10^7 CC-Partikeln pro 1×10^6 Zellen bei 37°C inkubiert. Nach Färbung der Monozyten mit Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmerkmale für Monozyten (CD45, CD14, CD11b) und CLEC4E erfolgte die Analyse mittels Durchflusszytometrie. Hier dargestellt ist die Anzahl der CLEC4E positiven Monozyten ohne (A) und mit (B) CC-Stimulation bei Patienten ohne und mit NSTEMI. Daten gezeigt als Mittelwerte (\pm SEM) ($n=19-37$ pro Gruppe; $* p < 0,05$).

Bei der Betrachtung aller Patienten mit einem NSTEMI weisen diese eine erhöhte Zahl an CLEC4E positiven Zellen in ihrem Blut auf (Abb. 10, A). Nach der Zugabe von Cholesterinkristallen kommt es zusätzlich zu einer signifikant verstärkten Expression von CLEC4E durch die stimulierten Monozyten (Abb. 10, B).

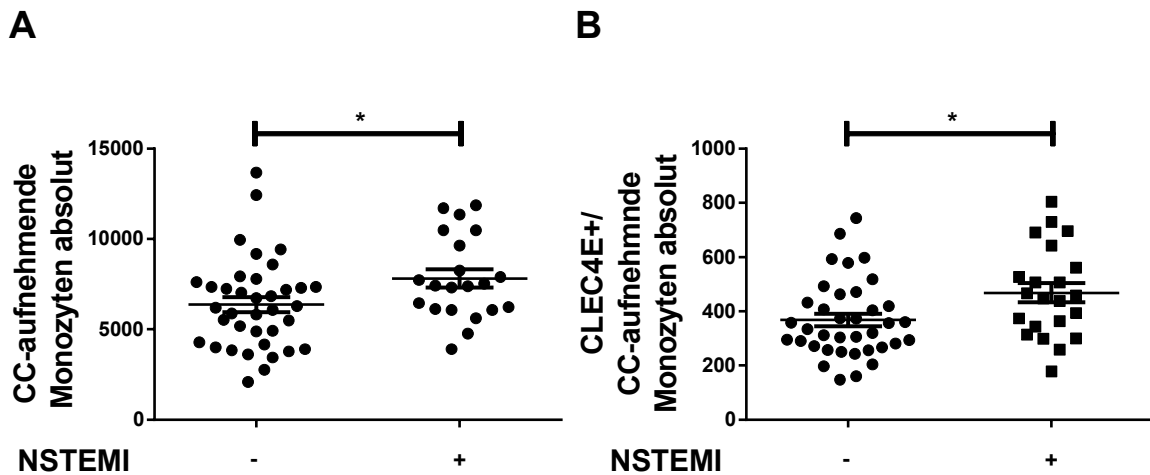


Abb. 11: Zunahme der CC aufnehmenden Monozyten bei NSTEMI-Patienten: Aus Spenderblut gewonnene PBMCs wurden für 30 Minuten mit 12×10^7 CC-Partikeln pro 1×10^6 Zellen bei 37°C inkubiert. Nach Färbung der Monozyten mit Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmerkmale für Monozyten (CD45, CD14, CD11b) und CLEC4E erfolgte die Analyse mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt ist die Anzahl der CC aufnehmenden Monozyten (A), sowie der CLEC4E positiven und CC aufnehmenden Monozyten (B) bei Patienten ohne und mit NSTEMI. Daten gezeigt als Mittelwerte (\pm SEM) ($n=21-37$ pro Gruppe; * $p<0,05$).

Die Patienten mit einem NSTEMI zeigen eine signifikant höhere Anzahl CC aufnehmender Monozyten aus ihrem Blut (Abb. 11, A). Darüber hinaus zeigte sich bei weiterer Differenzierung der Monozyten eine signifikant höhere Fraktion an zeitgleich CLEC4E positiven und CC aufnehmenden Monozyten bei Patienten mit NSTEMI-Konstellation im Vergleich zu den Patienten ohne NSTEMI-Ereignis (Abb. 11, B).

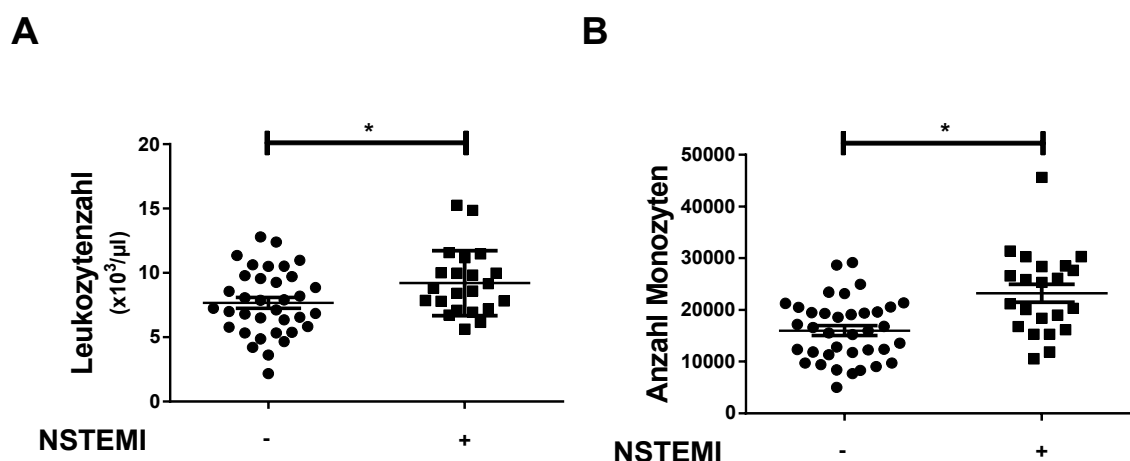


Abb. 12: Absolute Anzahl der Leukozyten und Monozyten bei NSTEMI-Patienten: Die Leukozytenzahl wurde aus den routinemäßig erhobenen Laborwerten bestimmt. (A) Absolute Anzahl der Leukozyten mit und ohne NSTEMI. (B) Absolute Anzahl der in der Durchflusszytometrie gemessenen Monozyten von 100.000 Events bei Patienten mit und ohne NSTEMI. Daten gezeigt als Mittelwerte (\pm SEM) (n=21-37 pro Gruppe; * $p < 0,05$).

Die Patienten mit einem NSTEMI weisen eine signifikant höhere Leukozytenzahl in ihrem Blut auf als Patienten ohne ein solches Infarktgeschehen (Abb. 12, A). Darüber hinaus werden bei den NSTEMI-Patienten signifikant mehr Monozyten in der Durchflusszytometrie gemessen (Abb. 12, B).

3.2.4 Korrelation der Monozyteneigenschaften mit dem Risikoprofil

Tab. 3: Korrelation der Monozyteneigenschaften mit kardiovaskulären Risikofaktoren und Erkrankungen

Koronare Herzkrankheit	ohne (n = 16)	mit (n= 44)	p-Wert
CC-Aufnahme [% an Monozyten]	61,1 \pm 2,3	56,6 \pm 2,1	0,2256
CLEC4E pos. Zellen nativ [% an Monozyten]	1,9 \pm 0,1	2,4 \pm 0,2	0,1122
CLEC4E pos. Zellen nach CC-Gabe [% an Monozyten]	5,0 \pm 0,6	4,9 \pm 0,3	0,8381
CC-Aufnahme [% an CLEC4E negativen Zellen]	60,3 \pm 2,2	55,9 \pm 2,1	0,2393

CC-Aufnahme [% an CLEC4E positiven Zellen]	75,6 ± 2,6	69,7 ± 1,9	0,0988
---	------------	------------	--------

Perkutane Koronarintervention	ohne (n = 39)	mit (n = 21)	p-Wert
CC-Aufnahme [% an Monozyten]	59,7 ± 1,9	54,1 ± 2,9	0,1022
CLEC4E pos. Zellen nativ [% an Monozyten]	2,3 ± 0,2	2,8 ± 0,4	0,1763
CLEC4E pos. Zellen nach CC-Gabe [% an Monozyten]	4,5 ± 0,3	5,5 ± 0,4	0,0302*
CC-Aufnahme [% an CLEC4E negativen Zellen]	59 ± 1,9	53,5 ± 2,9	0,104
CC-Aufnahme [% an CLEC4E positiven Zellen]	73,8 ± 1,7	66,5 ± 3,0	0,0249*

Leukozyten	<10 ⁴ /μl (n = 44)	≥10 ⁴ /μl (n = 16)	p-Wert
CC-Aufnahme [% an Monozyten]	59,7 ± 2,0	52,4 ± 2,2	0,0454*
CLEC4E pos. Zellen nativ [% an Monozyten]	2,3 ± 0,2	2,3 ± 0,2	0,9906
CLEC4E pos. Zellen nach CC-Gabe [% an Monozyten]	5,3 ± 0,3	4,1 ± 0,3	0,0324*
CC-Aufnahme [% an CLEC4E negativen Zellen]	59 ± 2	51,8 ± 2,2	0,0483*
CC-Aufnahme [% an CLEC4E positiven Zellen]	72,8 ± 2,1	67,1 ± 2,1	0,1097

NSTEMI	ohne (n = 38)	mit (n = 22)	p-Wert
CC-Aufnahme [% an Monozyten]	58 ± 2,2	57,4 ± 2,5	0,8797
CLEC4E pos. Zellen nativ [% an Monozyten]	2,4 ± 0,2	2,2 ± 0,2	0,5115
CLEC4E pos. Zellen nach CC-Gabe [% an Monozyten]	4,7 ± 0,3	5 ± 0,4	0,5948
CC-Aufnahme [% an CLEC4E negativen Zellen]	57,2 ± 2,1	56,8 ± 2,5	0,9164
CC-Aufnahme [% an CLEC4E positiven Zellen]	72,3 ± 2	69,5 ± 2,5	0,3959

STEMI	ohne (n = 58)	mit (n = 2)	p-Wert
CC-Aufnahme [% an Monozyten]	58,1 ± 1,7	49,5 ± 3,5	0,3519
CLEC4E pos. Zellen nativ [% an Monozyten]	2,3 ± 0,1	2,1 ± 1	0,805
CLEC4E pos. Zellen nach CC-Gabe [% an Monozyten]	5 ± 0,3	4,5 ± 0,5	0,7433
CC-Aufnahme [% an CLEC4E negativen Zellen]	57,4 ± 1,7	48,5 ± 3,2	0,3325
CC-Aufnahme [% an CLEC4E positiven Zellen]	71,2 ± 1,6	73,1 ± 7,8	0,8265

Aortenklappenstenose	ohne (n = 43)	mit (n = 15)	p-Wert
CC-Aufnahme [% an Monozyten]	56,6 ± 2	61 ± 3,3	0,2588

CLEC4E pos. Zellen nativ [% an Monozyten]	2,2 ± 0,2	2,5 ± 0,3	0,4312
CLEC4E pos. Zellen nach CC-Gabe [% an Monozyten]	5,3 ± 0,3	3,9 ± 0,2	0,0195*
CC-Aufnahme [% an CLEC4E negativen Zellen]	55,9 ± 2	60,4 ± 3,2	0,2466
CC-Aufnahme [% an CLEC4E positiven Zellen]	70 ± 2	75 ± 2,6	0,187

Linksventrikuläre Ejektionsfraktion	<55 % (n = 24)	≥55 % (n = 36)	p-Wert
CC-Aufnahme [% an Monozyten]	57,5 ± 2,5	58 ± 2,2	0,8959
CLEC4E pos. Zellen nativ [% an Monozyten]	2,2 ± 0,2	2,4 ± 0,2	0,5307
CLEC4E pos. Zellen nach CC-Gabe [% an Monozyten]	4,6 ± 0,3	5,4 ± 0,4	0,2026
CC-Aufnahme [% an CLEC4E negativen Zellen]	56,8 ± 2,5	56,5 ± 2,1	0,9157
CC-Aufnahme [% an CLEC4E positiven Zellen]	72,4 ± 2,3	70,5 ± 2,2	0,5641

Arterielle Hypertonie	ohne (n = 16)	mit (n = 44)	p-Wert
CC-Aufnahme [% an Monozyten]	53,8 ± 3,4	59,2 ± 1,8	0,1404
CLEC4E pos. Zellen nativ [% an Monozyten]	2,9 ± 0,4	2,2 ± 0,1	0,0297*
CLEC4E pos. Zellen nach CC-Gabe [% an Monozyten]	4,6 ± 0,2	5 ± 0,3	0,5026

CC-Aufnahme [% an CLEC4E negativen Zellen]	53,1 ± 3,5	58,5 ± 1,8	0,1464
CC-Aufnahme [% an CLEC4E positiven Zellen]	66,4 ± 3,5	73 ± 1,7	0,0621

Diabetes mellitus Typ II	ohne (n = 47)	mit (n = 13)	p-Wert
CC-Aufnahme [% an Monozyten]	57,1 ± 1,9	60,1 ± 3,2	0,4632
CLEC4E pos. Zellen nativ [% an Monozyten]	2,3 ± 0,2	2,1 ± 0,3	0,5524
CLEC4E pos. Zellen nach CC-Gabe [% an Monozyten]	4,9 ± 0,3	5,2 ± 0,8	0,5768
CC-Aufnahme [% an CLEC4E negativen Zellen]	56,5 ± 1,9	59,3 ± 3,2	0,4902
CC-Aufnahme [% an CLEC4E positiven Zellen]	70,1 ± 1,9	75,2 ± 2,6	0,1868

Nikotin-Abusus	ohne (n = 36)	mit (n = 24)	p-Wert
CC-Aufnahme [% an Monozyten]	56,4 ± 2,1	59,8 ± 2,6	0,3083
CLEC4E pos. Zellen nativ [% an Monozyten]	2,2 ± 0,2	2,6 ± 0,3	0,1851
CLEC4E pos. Zellen nach CC-Gabe [% an Monozyten]	4,6 ± 0,3	5,2 ± 0,4	0,2283
CC-Aufnahme [% an CLEC4E negativen Zellen]	55,7 ± 2,1	59,2 ± 2,6	0,2986
CC-Aufnahme [% an CLEC4E positiven Zellen]	71,1 ± 2	71,5 ± 2,6	0,9013

Positives Troponin (>53 ng/L)	ohne (n = 25)	mit (n = 22)	p-Wert
CC-Aufnahme [% an Monozyten]	59,7 ± 2,5	57,3 ± 2,6	0,5089
CLEC4E pos. Zellen nativ [% an Monozyten]	2,5 ± 0,2	2,2 ± 0,2	0,3072
CLEC4E pos. Zellen nach CC-Gabe [% an Monozyten]	4,6 ± 0,3	4,9 ± 0,5	0,5599
CC-Aufnahme [% an CLEC4E negativen Zellen]	59,1 ± 2,5	56,6 ± 2,6	0,5003
CC-Aufnahme [% an CLEC4E positiven Zellen]	73,5 ± 2,3	70,8 ± 2,6	0,4332

LDL	<100mg/ dl (n = 27)	≥100mg/ dl (n = 33)	p-Wert
CC-Aufnahme [% an Monozyten]	59 ± 2,6	56,6 ± 2,7	0,5245
CLEC4E pos. Zellen nativ [% an Monozyten]	2,3 ± 0,2	2,3 ± 0,3	0,9913
CLEC4E pos. Zellen nach CC-Gabe [% an Monozyten]	5,4 ± 0,5	4,5 ± 0,4	0,1815
CC-Aufnahme [% an CLEC4E negativen Zellen]	58,2 ± 2,6	55,9 ± 2,7	0,5416
CC-Aufnahme [% an CLEC4E positiven Zellen]	73 ± 2,2	70,2 ± 2,9	0,4352

CRP	<3mg/l (n = 20)	≥3mg/l (n = 40)	p-Wert
CC-Aufnahme [% an Monozyten]	58,7 ± 3,1	58,8 ± 2,1	0,9648

CLEC4E pos. Zellen nativ [% an Monozyten]	2,4 ± 0,24	2,3 ± 0,2	0,7298
CLEC4E pos. Zellen nach CC-Gabe [% an Monozyten]	5,4 ± 0,5	4,7 ± 0,3	0,2201
CC-Aufnahme [% an CLEC4E negativen Zellen]	57,9 ± 3,1	58,1 ± 2,1	0,9570
CC-Aufnahme [% an CLEC4E positiven Zellen]	70,8 ± 3,3	72,7 ± 1,8	0,5933

Die Werte werden dargestellt als MW ±SD;

* $p < 0,05$

MW= Mittelwert; SD= Standardabweichung

Tab. 3 stellt eine Übersicht der erhobenen Patientendaten sowie den gemessenen Monozyteneigenschaften in der Durchflusszytometrie dar. Bei allen Patienten wurde sowohl die Krankengeschichte bezüglich kardialer Vorerkrankungen (Koronare Herzkrankheit, Aortenklappenstenose, linksventrikuläre Ejektionsfraktion) und kardiovaskulärer Risikofaktoren (Arterielle Hypertonie, Diabetes Mellitus Typ II, Nikotinabusus), als auch aktuelle Laborwerte (CRP, Leukozyten, Troponin, LDL) und akute Erkrankungen (STEMI, NSTEMI) inklusive Intervention (PCI) ermittelt. Diese Patientencharakteristika wurden mit der Cholesterinkristallaufnahme, dem Anteil CLEC4E positiver Zellen vor und nach der CC-Gabe, sowie der CC-Aufnahme der CLEC4E positiven und negativen Zellen aus dem Blut der Patienten korreliert. Hierbei zeigte sich ein signifikant erniedrigter Anteil CLEC4E positiver Zellen nach CC-Gabe bei Patienten mit Aortenklappenstenose. Außerdem zeigten Patienten mit bekanntem Hypertonus einen signifikant erniedrigten Anteil CLEC4E positiver Zellen. Patienten mit einer erhöhten Leukozytenzahl im Blut hatten einen signifikant geringeren Anteil CC aufnehmender Zellen im Blut, sowie einen niedrigeren Anteil CLEC4E positiver Zellen nach CC-Gabe und CC aufnehmender Zellen bei CLEC4E-Negativität. Bei Patienten, welche eine perkutane Koronarintervention während ihres Herzkatheters erhielten zeigte sich ein erhöhter Anteil CLEC4E positiver Zellen nach CC-Gabe.

3.2.4.1 Monozytenanzahl bei Patienten mit Aortenklappenstenose

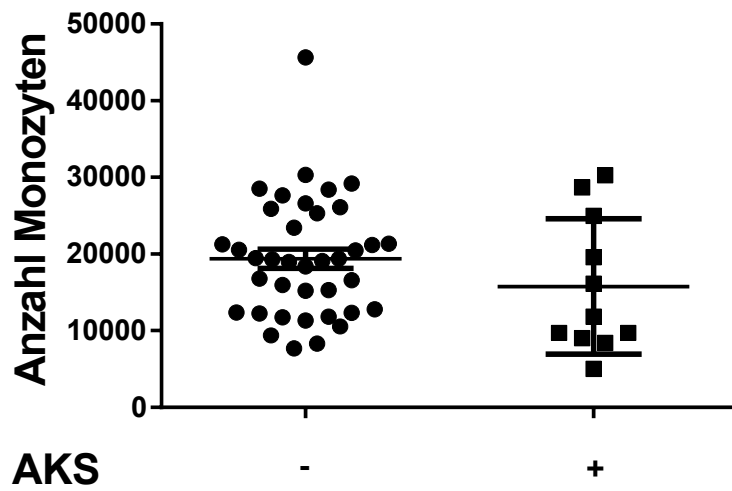


Abb. 13: Absolute Anzahl der in der Durchflusszytometrie gemessenen Monozyten von 100.000 Events bei Patienten mit und ohne Aortenklappenstenose (AKS). Daten gezeigt als Mittelwerte (\pm SEM) ($n=11-39$; * $p<0,05$).

Patienten mit und ohne Aortenklappenstenose zeigen keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der Monozyten aus ihrem Blut (Abb. 13)

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit haben wir uns mit der Rolle des CLEC4E-Rezeptors in der Atherogenese und des Myokardinfarkts beschäftigt. Die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind: (1) Eine Stimulation von humanen Monozyten mit Cholesterinkristallen führt zu einer verstärkten Expression von CLEC4E. (2) Eine verstärkte Expression von CLEC4E durch Monozyten ist mit einer verstärkten Phagozytose von Cholesterinkristallen assoziiert. (3) Monozyten von Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt phagozytieren mehr Cholesterinkristalle, als Monozyten von Patienten ohne akuten Myokardinfarkt.

4.1 Cholesterin steigert die CLEC4E-Expression auf Monozyten

Das der humane CLEC4E-Rezeptor in der Lage ist, Cholesterin in Form von Kristallen zu binden wurde erstmals von Kiyotake et al. (2015) beschrieben. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse zeigen, dass es nach Stimulation von humanen Monozyten mit CCs zu einer signifikant verstärkten Expression von CLEC4E auf der Oberfläche dieser Zellen kommt (Abb. 8). Diese Daten sind im Einklang mit vorangegangenen Publikationen, in denen gezeigt werden konnte, dass eine Stimulation von, aus Mausknorpelmark stammenden, dendritischen Zellen und Makrophagen mit den Mincle-Agonisten TDM/TDB zu einer verstärkten Expression von CLEC4E führt (Miyake et al., 2013; Schoenen et al., 2010). Versuche unserer Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass eine Stimulation von Monozyten mit CCs zu einer verstärkten mRNA-Expression für CLEC4E führt (Deutsche Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und Kreislaufforschung, 2018). Die Versuche dieser Arbeit zeigen darüber hinaus, dass der Rezeptor vermehrt auf den Monozytenoberflächen exprimiert wird. Da Cholesterin eine treibende Kraft der Atherosklerose darstellt (Kapitel 1.1.2.1) bestärken unserer Ergebnisse somit die These, dass der CLEC4E-Rezeptor eine proatherogene Wirkung beim Menschen hat.

4.2 Erhöhte Cholesterinaufnahme durch CLEC4E positive Zellen

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Expression von CLEC4E auf zirkulierenden humanen Monozyten und Makrophagen mit einer signifikant höheren Phagozytose von Cholesterinkristallen assoziiert ist (Abb. 7 und Abb. 9). Clément et al. (2016) zeigten bereits in Tierversuchen, dass Makrophagen aus CLEC4E Knock-out Mäusen weniger

neutrale Lipide akkumulieren als Wildtypmäuse. Sie beschrieben außerdem einen CLEC4E abhängig reduzierten Cholesterin Efflux der Makrophagen. Dies lässt sich laut der oben genannten Studie auf eine verminderte Expression von Abca1 in der Zellwand zurückführen. Wie genau die gesteigerte Aufnahme der Lipide durch die CLEC4E positiven Makrophagen zu erklären ist lassen die Autoren jedoch offen. Der CLEC4E-Rezeptor ist vor allem durch seine Rolle als Pattern-recognition-Rezeptor im Rahmen der angeborenen Immunantwort gegen Pilze und Bakterien bekannt. Zahlreiche Studien erforschten die durch seine Aktivierung ausgelöste intrazelluläre Signalkaskade und die NF- κ B abhängige Genexpression. In ihrer Arbeit beschreiben Richardson und Williams (2014), sowie Mócsai et al. (2010) diese Signalkaskade: CLEC4E ist mit dem Adapterprotein FcR γ verbunden und kommuniziert über dessen ITAM-Motiv. Die Phosphorylierung dieser „immunoreceptor tyrosine-based activation motifs“ rekrutiert die Tyrosinkinase Syk, welche wiederum den Card9–Bcl10–MALT1-Komplex aktiviert. Dieser Proteinkomplex signalisiert die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und somit die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und IL-23. Über die Rolle von CLEC4E als Phagozytoserezeptor lässt sich jedoch bisher nur wenig sagen. Andere Rezeptoren aus der Klasse der C-Typ-Lektin-Rezeptoren, zu denen auch CLEC4E zählt, sind bereits bekannte Phagozytoserezeptoren. So ist Dectin-1 (auch CLEC7A) in der Lage β -Glucane zu binden und das bindende Pathogen zu phagozytieren. Über Phosphorylierung eines zytoplasmatischen ITAM-Motivs kommt es Syk abhängig zur Auslösung nachgeschalteter Ereignisse wie Phagozytose, Differenzierung, Migration und Stimulation der betroffenen Zelle. Über die Aktivierung der Rho-GTPasen Cdc42 und Rac-1 wird eine Umlagerung des Zytoskeletts initiiert. Durch Aktinpolymerisation und Ausbildung von Pseudopodien um die Partikel trägt der Rezeptor zur Phagozytose von Pathogenen durch Makrophagen bei. Auch eine NF- κ B induzierte Expression proinflammatorischer Gene ist Folge der Dectin-1-Rezeptoraktivierung. Diese Genexpression ist entsprechend der Signalkaskade von CLEC4E Syk und Card9–Bcl10–MALT1 abhängig (McGreal et al., 2005; Herre et al., 2004; Tohyama und Yamamura, 2009; Kerrigan und Brown, 2010). Die Tyrosinkinase Syk hat eine Schlüsselrolle bei der angeborenen und erworbenen Immunantwort sowie der Immunrezeptor vermittelten Phagozytose. Durch ihre Aktivierung mittels intrazellulärer ITAM-Motive der Fc-Rezeptoren steuert die Kinase die Stimulation weiterer Enzyme, welche wiederum

sekundäre Botenstoffe und Zellregulatoren generieren. Somit nimmt Syk eine zentrale Rolle innerhalb der Zellen ein und steuert eine Vielzahl von Wegen, welche die Transkription fördern, die Ordnung des Zytoskeletts beeinflussen oder die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren bedingen können. Durch Regulation der Aktindynamik, Stimulation von Rho-GTPasen und Bildung reaktiver Sauerstoffspezies steuert Syk die Bildung eines Phagosoms und den Abbau des Pathogens (Aderem und Underhill, 1999; Crowley et al., 1997; Shi et al., 2006; Tohyama und Yamamura, 2006; Greenberg, 1999). Da die Aktivierung von CLEC4E ebenfalls Syk abhängige Signalwege induziert, könnte die Kinase auch die Aufnahme der CCs durch die Monozyten und Makrophagen steuern. So legen unsere Versuche nahe, dass CLEC4E nicht nur wie bereits bekannt CCs binden kann, sondern darüber hinaus zu deren Phagozytose beiträgt.

4.3 Erhöhte CLEC4E-Expression und Phagozytose im akuten Myokardinfarkt

Neben diesen Ergebnissen interessierte uns vor allem der Zusammenhang eines akuten Myokardinfarktes mit der Expression des CLEC4E-Rezeptors durch zirkulierende Monozyten und die damit verbundene Phagozytose von Cholesterinkristallen. Veltman et al. (2021) konnten in einer aktuellen Studie nachweisen, dass in Tiermodellen eine myokardiale Ischämie zu einer verstärkten Expression von CLEC4E im Myokardgewebe führt. Wir konnten in unseren Versuchen zeigen, dass Patienten, welche einen akuten Nicht-ST-Hebungsinfarkt erleiden, eine erhöhte Zahl an CLEC4E positiven Monozyten in ihrem Blut aufweisen (Abb. 10). Darüber hinaus nehmen vor allem die CLEC4E positiven Monozyten von NSTEMI-Patienten signifikant mehr CCs auf als die CLEC4E positiven Monozyten von Patienten ohne NSTEMI (Abb. 11). Ein erhöhter prozentualer Anteil von CLEC4E positiven und CC aufnehmenden Zellen in Bezug auf die untersuchten Monozyten konnte bei den NSTEMI-Patienten jedoch nicht festgestellt werden (Tab. 3). Dies wirft die Frage auf, welche Faktoren an der verstärkten Expression des CLEC4E-Rezeptors bei vorliegendem akutem Myokardinfarkt beteiligt sind. Ein Myokardinfarkt entsteht mit überwiegender Häufigkeit auf Basis einer atherosklerotischen Plaqueruptur mit nachfolgender Thrombosierung einer Koronararterie. Dem Infarkt geht ein langjähriger komplexer Prozess voraus, welcher eine Vielzahl verschiedener Zellen, Botenstoffe und inflammatorischer Entwicklungen beinhaltet. Viele Studien haben vor allem die Rolle der Inflammation bei der Initiierung und Aufrechterhaltung dieses atherosklerotischen Prozesses bestätigt (Núñez et al., 2006). So ist vor allem eine erhöhte Anzahl an

Leukozyten im Blut ein entscheidender Risikofaktor für koronare Herzerkrankungen und außerdem ein Prognosefaktor für ischämische Infarkte und erhöhte kardiovaskuläre Mortalität (Lee et al., 2001; Grimm et al., 1985). Bei Infarktpatienten ist eine erhöhte Leukozytenzahl außerdem mit Herzinsuffizienz, reduzierter Myokardperfusion und einer erhöhten Kurzzeitmortalität korreliert (Palmerini et al., 2013; Furman et al., 2004; Sabatine et al., 2002). Übereinstimmend mit diesen Studien wiesen die von uns rekrutierten NSTEMI-Patienten eine signifikant erhöhte Leukozytenzahl im Blut auf (Abb. 12). Yamamoto et al. (2016) beschreiben, dass von allen den Leukozyten zugehörigen Zellreihen die Zahl der Monozyten der nützlichste Marker für die Evaluation der Atherosklerose ist. So ist die Anzahl der Monozyten höher in Patienten, welche ein kardiovaskuläres Ereignis erlitten haben. Darüber hinaus scheint eine hohe Monozytenzahl ein prädiktiver Faktor für solche Ereignisse bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit zu sein (Yamamoto et al., 2016). Auch die in dieser Arbeit untersuchten Patienten mit akutem NSTEMI weisen in der Durchflusszytometrie eine signifikant erhöhte Zahl an Monozyten gegenüber Patienten ohne ein solches Ereignis auf (Abb. 12). Diese Beobachtungen geben einen Hinweis auf die Frage, warum die NSTEMI-Patienten zwar eine erhöhte Anzahl jedoch keinen erhöhten Anteil an CLEC4E-positiven und cholesterinaufnehmenden Monozyten zeigen. Aufgrund des akuten ischämischen Myokardinfarkts zeigen die Patienten eine erhöhte Zahl zirkulierender Leukozyten und Monozyten und auch die Zahl an CLEC4E positiven und CC aufnehmenden Zellen ist hierdurch erhöht. Durch die Erhöhung des Anteils (CLEC4E⁺ bzw. CC aufnehmende Zellen) und der Ausgangsmenge (Monozyten) im Blut der Patienten bleibt der prozentuale Anteil somit weitestgehend unverändert. Die absolut erhöhte Zahl dieser Zellen im Blut könnte somit einen fördernden Einfluss auf die Entstehung eines Myokardinfarktes haben. Ableitend aus dieser Schlussfolgerung müssten diese Forschungsergebnisse auch bei Patienten mit ST-Hebungsinfarkt (STEMI) zu sehen sein. Aufgrund der geringen Anzahl von Patienten mit einem STEMI in unserer Studie können wir hierzu jedoch keine valide Aussage treffen. Veltman et al. (2021) untersuchten in Ihrer Studie die Expression von CLEC4E aus dem Blut von Patienten mittels quantitativer reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). Hierbei zeigten sowohl Patienten mit N-STEMI, als auch mit STEMI, eine erhöhte Expression des Rezeptors im Vergleich zu Patienten mit chronischer KHK in den im Blut zirkulierenden Zellen. Dies deckt sich mit unseren

Erkenntnissen und legt die Tatsache nahe, dass der CLEC4E-Rezeptor bei der Entstehung von akuten Myokardinfarkten eine bisher noch wenig verstandene Rolle spielt.

4.4 Korrelation der Monozyteneigenschaften mit dem Risikoprofil

Ein weiterer Parameter, welchen unsere Arbeit untersucht, ist die Zahl der Leukozyten im Blut der Patienten unmittelbar vor deren Herzkatheteruntersuchung. Eine erhöhte Zahl an Leukozyten im Blut (Leukozytose) geht oftmals mit Infektionen oder inflammatorischen Prozessen einher (Neil Abramson und Becky Melton, 2000). Die von uns untersuchten Monozyten bilden mit ca. 2-8 % aller Leukozyten eine Teilfraktion (Lyrad K. Riley und Jemma Rupert, 2015). Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Monozyten der Patienten mit geringer Leukozytenzahl im Blut ($<10^4/\mu\text{l}$) signifikant mehr CCs aufnehmen und nach CC-Stimulation mehr CLEC4E an ihrer Oberfläche exprimieren als Patienten mit Leukozytose ($>10^4/\mu\text{l}$). Die Zahl der CLEC4E positiven Monozyten ist nativ in beiden Patientengruppen gleich. Es ist bekannt, dass Monozyten eine sehr heterogene Gruppe von Zellen darstellen, welche je nach Situation aus dem Blut in das Gewebe einwandern können und multiple Aufgaben übernehmen. So können sie bei einer Infektion, durch Chemokine und Adhäsionsmoleküle gesteuert, in entzündetes Gewebe oder Lymphknoten einwandern und sind somit Teil der Immunantwort des Körpers (Shi und Pamer, 2011). In einer gesunden Homöostase des Körpers entwickeln sich die Monozyten wiederum zu anderen gewebeständigen Zellen und passen sich an die lokalen Gegebenheiten an (Guilliams et al., 2018). Diese Heterogenität der Monozyten wird durch „die Expression von Rezeptoren und spezifischer Moleküle an ihrer Oberfläche“ (Shi und Pamer, 2011) vermittelt. Je nach Ursache der reaktiven Leukozytose, z.B. durch Infektionen, kann man also davon ausgehen, dass bei diesen Patienten eine andere Monozyten Population überwiegt. Basierend auf unseren Forschungsergebnissen scheinen die Monozyten der Patienten mit erhöhter Leukozytenzahl prozentual weniger CCs aufnehmen zu können und nach Stimulation mit CCs kann nur eine geringere CLEC4E-Expression auf ihrer Oberfläche induziert werden. Diese und die bereits zuvor genannten Ergebnisse bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt (Kapitel 4.3) bestärken die These, dass vor allem die Ursache der Leukozytose ausschlaggebend für die Rezeptorexpression und somit Funktion der Monozyten ist.

Ein erhöhter CRP-Wert der Patienten wirkte sich ebenfalls nicht signifikant auf die untersuchten Parameter der CC-Aufnahme und CLEC4E-Expression aus. Hierzu lässt sich anmerken, dass der Grund einer CRP-Erhöhung im Blut der Patienten, wie auch der Leukozytose, vielfältig sein kann und ein Anstieg nach einer akuten Myokardischämie erst verzögert im Blut nachweisbar ist (Liebetrau et al., 2015; Kayser et al., 2020).

Auch in der Pathogenese von chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der Atherosklerose spielen Monozyten eine wichtige Rolle (Shi und Pamer, 2011).

Eine wichtige Folgeerscheinung der Atherosklerose ist die koronare Herzkrankheit (KHK). Die von uns untersuchten Patienten mit in der Herzkatheteruntersuchung diagnostizierter KHK zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Untersuchung ihrer Monozyten im Vergleich zu Patienten ohne KHK in Bezug auf CC-Aufnahme und CLEC4E-Expression. So scheint die Rolle von CLEC4E vor allem bei akuten Ereignissen wie dem Myokardinfarkt und weniger bei chronischen Prozessen wie der KHK entscheidend zu sein. Laut unserer Hypothese müsste der CLEC4E-Rezeptor bereits in frühen Stadien der Atherogenese eine Rolle spielen indem er CCs aufnimmt und so, wie andere Pattern-recognition-Rezeptoren, zur Entstehung der atherosklerotischen Plaque beitragen (Hansson, 2009). Diese Theorie stützen auch die Ergebnisse von Clément et al. (2016), welche zeigen, dass der Rezeptor in atherosklerotischen Läsionen von Schaumzellen exprimiert wird. Wie kommt es daher, dass unsere Ergebnisse diese These nicht bestärken? In unseren Versuchen haben wir nur die im Blut zirkulierenden Monozyten, nicht aber die in den Plaques befindlichen Makrophagen untersucht. Die Relevanz letzterer demonstrieren auch unsere Versuche mit zu Makrophagen ausgereiften Spendermonozyten. Die Monozyten aus dem Blut der Patienten exprimierten im Durchschnitt auf 3 % der Zellen den CLEC4E-Rezeptor, während im Schnitt 17,6 % der mittels M-CSF zu Makrophagen differenzierten Monozyten der Blutspender den Rezeptor auf ihrer Oberfläche hatten. Diese Daten legen nahe, dass die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen mit einer Erhöhung der CLEC4E-Expression einhergeht. Anhand unserer Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die Monozyten im Blut den Rezeptor bereits exprimieren und in der Lage sind, hierdurch Cholesterinkristalle zu erkennen. Jedoch scheinen vor allem die Makrophagen, welche aktiv am Prozess der Atherosklerose beteiligt sind, den Rezeptor zu nutzen um Cholesterin aufzunehmen und

die Atherogenese voran zu treiben. So wäre es in Zukunft sinnvoll neben den Monozyten im Blut, zusätzlich auch die in den koronaren Plaques befindlichen Makrophagen zu untersuchen. Dies bedarf allerdings anderer Methodik. Eine Untersuchung histologischer Präparate beispielsweise hätte jedoch den Nachteil, dass die Zellen hier nicht mehr in einem vitalen Zustand untersucht werden. Der von uns gewählte Versuchsaufbau bedarf Zellen, welche in der Lages sind Phagozytose zu betreiben. So wäre es sinnvoll die Makrophagen im Rahmen eines ex vivo Experimentes zu untersuchen. Ein solcher Versuchsaufbau wird von Erbel et al. (2014) beschrieben, bei dem frische humane Plaques von Patienten entnommen werden, welche sich einer Endarterektomie oder Koronararterienbypass-Operation unterziehen.

Unsere Versuche weisen darauf hin, dass das Ereignis des akuten Myokardinfarkts im Vergleich zur chronischen KHK zu einer Erhöhung der CLEC4E-Expression und CC-Aufnahme führt. Auch Veltman et al. (2021) zeigen in Ihrer Studie, dass im akuten Myokardinfarkt die CLEC4E-Expression im Vergleich zu Patienten mit chronischen KHK signifikant gesteigert ist. Ein akutes Koronarsyndrom ereignet sich in den meisten Fällen auf Basis einer Plaqueruptur und der daraufhin stattfindenden Thrombusbildung (Hansson und Libby, 2006). Dieses Ereignis scheint die Expression von CLEC4E auf den zirkulierenden Monozyten zu triggern.

Auch bei Betrachtung der Risikofaktoren Diabetes Mellitus Typ II, Nikotinabusus und erhöhte LDL-Werte, welche zu der Entstehung einer Atherosklerose beitragen können, zeigen sich keine signifikanten Ergebnisse. Einzig beim Risikofaktor der arteriellen Hypertonie nehmen die Monozyten tendenziell mehr CCs auf. Es zeigen sich jedoch signifikant weniger CLEC4E positive Zellen im Blut. Es ist bekannt das erhöhter intraluminaler Druck in den Gefäßen die Ausschüttung von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen fördert und so die Adhäsion von Monozyten an die Gefäßwand begünstigt (Riou et al., 2007). Es wäre also eine denkbare Hypothese, dass ein Teil der Monozyten, hier vor allem die CLEC4E positiven, bedingt durch einen arteriellen Hypertonus in die Gefäßwand migrieren und nicht mehr im Blut der Patienten nachzuweisen sind. Diese These bedarf jedoch einer differenzierteren Untersuchung von Patienten mit arterieller Hypertonie. So wurden in unserer Studie alle Patienten mit präexistentem Hypertonus eingeschlossen, unabhängig von Medikation und aktuellen

Blutdruckwerten. Eine weitere Limitation unsere Studie besteht darin, dass die von uns untersuchten Patienten häufig mehrere Risikofaktoren und Erkrankungen simultan aufweisen, da diese kausal oder kollektiv vergesellschaftet sind. Es wäre daher sinnvoll, in zukünftigen Studien ein differenzierteres Patientenkollektiv zu untersuchen, bei dem möglichst viele Risikofaktoren isoliert vorliegen.

Außerdem interessierte uns der Einfluss des CLEC4E-Rezeptors bei der Entstehung einer Aortenklappenstenose (AKS). Die Pathogenese der AKS ähnelt der einer arteriellen Atherosklerose; entscheidende Rollen spielen hierbei lokale Inflammation und Lipidakkumulation. Schon früh kommt es bei der AKS zu einer Infiltration von inflammatorischen Zellen, inklusive Makrophagen und Schaumzellen (Helske et al., 2007). Schwartzberg et al. (2013) beschreiben in Ihrer Arbeit, dass vor allem Patienten mit hochgradiger AKS eine niedrigere Zahl an Monozyten in ihrem Blut aufweisen. Die Autoren erklären sich diesen Zusammenhang aufgrund einer kontinuierlichen Migration der Monozyten in die fortschreitend degenerative Aortenklappe, wo sich diese zu Makrophagen wandeln und aktiv zu einer Kalzifizierung der Klappe beitragen. Dies führe auf lange Sicht zu einer Ausschöpfung der peripheren Monozyten im Blut. Eine Limitation ihrer Studie sehen die Autoren in der automatischen Zählung der Monozyten mittels Coulter-Zähler, welche keine ausreichende Genauigkeit bietet und fordern in zukünftigen Studien eine exaktere Analyse mittels Durchflusszytometrie. Eine nachfolgende Studie von Shimoni et al. (2016) kommt zu einem gegenteiligen Ergebnis. So beobachtet diese Forschungsgruppe eine erhöhte Anzahl CD14⁺ Monozyten in der Durchflusszytometrie bei Patienten mit AKS. Dies sei auf die inflammatorische Genese der Erkrankung zurückzuführen, bei der Monozyten in jeder Stufe der Pathogenese eine entscheidende Rolle spielen. Hewing et al. (2017) gehen in Ihrer Arbeit noch einen Schritt weiter und untersuchen die Rolle der verschiedenen Monozyten Subpopulationen bei Patienten mit AKS. So lassen sich Monozyten anhand von Oberflächenmolekülen in drei verschiedene Populationen einteilen. Hierzu zählen die CD14⁺⁺/CD16⁻ (*classical*), die CD14⁺⁺/CD16⁺ (*intermediate*) und die CD14⁺/CD16⁺⁺ (*non-classical*) Monozyten (Liberale et al., 2017). Einzig die Population der CD14⁺⁺/CD16⁺ (*intermediate*) Monozyten war in der Studie von Hewing et al. (2017) bei Patienten mit AKS signifikant erhöht. Die Autoren erklären, dass vor allem diese Subpopulation der Monozyten proinflammatorisch wirkt. Im Gegensatz zu

den Ergebnissen von Shimoni et al. (2016) ist in dieser Studie die Gesamtzahl der Monozyten bei Patienten mit AKS nicht erhöht.

In unserer Arbeit wurde ebenfalls die Population der Monozyten in der Durchflusszytometrie untersucht. Monozyten wurden hierbei als CD14⁺/CD11b⁺ Zellen gated (Gordon und Taylor, 2005; Gahmberg et al., 1998). Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Monozyten aus dem Blut von Patienten mit und ohne bekannte AKS in der Anamnese (Abb. 13). Dieses Ergebnis deckt sich am ehesten mit der Studie von Hewing et al. (2017), wobei in unserer Arbeit nicht vorrangig Patienten mit AKS untersucht wurden. Der Anteil an Patienten mit AKS betrug in unserer Studie 25 % (Tab. 2). Der Anteil CLEC4E positiver Zellen an dieser Monozyten Population war bei Patienten mit AKS nativ nicht signifikant unterschiedlich und nach Inkubation mit CCs signifikant erniedrigt im Vergleich zu Patienten ohne AKS. Geht man nun davon aus, dass Patienten mit AKS eine veränderte Zusammensetzung ihrer Monozyten Subpopulationen haben und vor allem die Zwischenfraktion der CD14⁺⁺/CD16⁺ Monozyten erhöht ist, könnte dies auch einen Einfluss auf die Expression von CLEC4E haben (Hewing et al., 2017). Über die Expression von CLEC4E auf den verschiedenen Monozyten Populationen ist bisher noch nicht viel bekannt. Vijayan et al. (2012) untersuchten in ihrer Studie über die Expression von CLEC4E auf humanen Monozyten und Neutrophilen sowie der Phagozytose von *Candida albicans* auch die CLEC4E-Expression auf CD14⁺/CD16⁻ und CD14⁺/CD16⁺ Monozyten. Letzteres konnte für beide Monozyten Populationen nachgewiesen werden. Allerdings ist zu bemerken, dass in der genannten Studie mit einer kleinen Probandenzahl (n=4) gearbeitet wurde und die Monozyten nicht anhand der drei bekannten Subpopulationen CD14⁺⁺/CD16⁻ (*classical*), CD14⁺⁺/CD16⁺ (*intermediate*) und CD14⁺/CD16⁺⁺ (*non-classical*) unterschieden wurden. So lässt sich bisher keine valide Aussage über die Expression von CLEC4E auf *intermediate* Monozyten treffen. Es sollte daher in zukünftigen Studien ergründet werden, wie CLEC4E auf den verschiedenen Monozyten Populationen exprimiert wird und inwiefern dies die Expression bei Patienten mit AKS beeinflusst.

4.5 Fazit und Ausblick

Nach unserem Kenntnisstand ist der CLEC4E-Rezeptor also ein Pattern-recognition-Rezeptor, welcher in der Lage ist, neben Bestandteilen fremder Organismen auch Cholesterinkristalle zu binden. Aufgrund der entscheidenden Bedeutung von Cholesterin, so wie der den Rezeptor exprimierenden Zellen, den Monozyten und Makrophagen, in der Atherogenese, rückt auch der CLEC4E-Rezeptor immer mehr in den Fokus der Atheroskleroseforschung. Unsere Studie konnte zeigen, dass der CLEC4E-Rezeptor auf zirkulierenden humanen Monozyten vorkommt und in der Lage ist die Cholesterinaufnahme zu steigern. Darüber hinaus haben Patienten die einen akuten NSTEMI erleiden eine erhöhte Zahl an CLEC4E exprimierenden und cholesterinaufnehmenden Monozyten im Blut. Es bleibt jedoch zu klären inwieweit der Rezeptor ursächlich zur Entstehung dieser Erkrankung beiträgt. Hierzu ist es von Nöten den Rezeptor noch besser zu verstehen und offene Fragen zu beantworten. Wie genau der Rezeptor Phagosomen bildet, welche Trigger zu einer gesteigerten Expression im akuten Myokardinfarkt führen und wie sich die Expression auf den verschiedenen Monozyten Subpopulationen verhält. Auf diesen Fragen aufbauend ist es nötig herauszufinden, ob der Rezeptor ein potentielles Ziel für eine antiatherosklerotische Therapie darstellen könnte. CVD stellen nach wie vor die Haupttodesursache in Deutschland und der Welt dar. Es ist daher von großer Bedeutung die zugrundeliegenden Mechanismen der Atherogenese zu entschlüsseln und durch neue Medikamente und Therapien präventiv tätig zu werden, sowie die Lebenserwartung der Betroffenen zu steigern. Rezeptoren wie der CLEC4E-Rezeptor können hierfür Angriffspunkte darstellen.

5. Zusammenfassung

CVD und deren Hauptursache Atherosklerose stellen auch heute noch die weltweit häufigste Todesursache dar. Deren Entstehung ist ein intensiv erforschter Prozess und im Laufe der Zeit konnten zahlreiche Risikofaktoren der Atherogenese identifiziert werden. Dennoch sind viele Faktoren noch nicht ausreichend bekannt und deren Verständnis ausschlaggebend für die Entwicklung neuer Therapie- und Präventionsstrategien. Einer dieser Faktoren ist der CLEC4E-Rezeptor, ein transmembranöser Rezeptor, welcher in der Lage ist Cholesterinkristalle (CCs) zu binden. In dieser Arbeit haben wir versucht ein besseres Verständnis für die Funktion und Rolle des CLEC4E-Rezeptors in der Atherogenese zu gewinnen. Hierzu wurden Makrophagen aus Spenderblut kultiviert und deren Eigenschaften zur Expression des Rezeptors und Bindung von CCs untersucht. Darüber hinaus wurden Monozyten aus dem Blut von Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren gewonnen und neben den genannten Faktoren auf ihre klinische Risikokorrelation untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Makrophagen, als auch die Monozyten aus dem Blut der Patienten, mehr CCs aufnehmen, wenn sie den CLEC4E-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren. Zusätzlich stimulieren CCs die CLEC4E-Expression auf den Zellen. Ferner scheinen Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt bereits auf ihren nativen Monozyten vermehrt CLEC4E zu exprimieren und können überdies mehr CCs aufnehmen. Unsere Daten weisen darauf hin, dass der CLEC4E-Rezeptor vor allem im akuten Krankheitsgeschehen eine Rolle spielt.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Todesursachen in Deutschland	12
Abb. 2: Initiierung, Progression und Komplikation einer humanen koronar- atherosklerotischen Plaque	13
Abb. 3: Humanes CLEC4E	28
Abb. 4: Versuchsaufbau	38
Abb. 5: Gatingstrategie der durchflusszytometrischen Daten	43 - 45
Abb. 6: Inkubationszeitbestimmung	46
Abb. 7: FACS-Analyse der aus Buffy Coats kultivierten Makrophagen	47
Abb. 8: CCs stimulieren die CLEC4E-Expression auf Monozyten	48
Abb. 9: CLEC4E positive Monozyten nehmen mehr CCs auf	49
Abb. 10: Erhöhte Anzahl CLEC4E positiver Monozyten bei NSTEMI-Patienten	50
Abb. 11: Zunahme der CC aufnehmenden Monozyten bei NSTEMI-Patienten	51
Abb. 12: Absolute Anzahl der Leukozyten und Monozyten bei NSTEMI-Patienten	52
Abb. 13: Absolute Anzahl der Monozyten bei Patienten mit AKS	59

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Risikofaktoren für Atherosklerose und koronare Herzerkrankungen	25
Tab. 2: Baseline Charakteristika	36
Tab. 3: Korrelation der Monozyteneigenschaften mit kardiovaskulären Risikofaktoren und Erkrankungen	52

8. Literaturverzeichnis

Abela GS, Aziz K. Cholesterol crystals cause mechanical damage to biological membranes: a proposed mechanism of plaque rupture and erosion leading to arterial thrombosis. *J Clin Cardiol.* 2005. 28: 413–420

Abela GS, Aziz K. Cholesterol crystals rupture biological membranes and human plaques during acute cardiovascular events--a novel insight into plaque rupture by scanning electron microscopy. *Scanning.* 2006. 28: 1–10

Abela GS, Aziz K, Vedre A, Pathak DR, Talbott JD, Dejong J. Effect of cholesterol crystals on plaques and intima in arteries of patients with acute coronary and cerebrovascular syndromes. *Am J Cardiol.* 2009. 103: 959–968

Accad M, Smith SJ, Newland DL, Sanan DA, King LE, Linton MF, Fazio S, Farese RV. Massive xanthomatosis and altered composition of atherosclerotic lesions in hyperlipidemic mice lacking acyl CoA:cholesterol acyltransferase 1. *J Clin Invest.* 2000. 105: 711–719

Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol.* 1999. 17: 593–623

Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol.* 2004. 43: 1731–1737

Bakke SS, Aune MH, Niyonzima N, Pilely K, Ryan L, Skjelland M, Garred P, Aukrust P, Halvorsen B, Latz E, Damås JK, Mollnes TE, Espevik T. Cyclodextrin Reduces Cholesterol Crystal-Induced Inflammation by Modulating Complement Activation. *J Immunol.* 2017. 199: 2910–2920

Baum H. Gradiententrennung. In: Gressner AM, Arndt T, Hrsg. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2019: 1016

Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, Ferranti SD de, Floyd J, Fornage M, Gillespie C, Isasi CR, Jiménez MC, Jordan LC, Judd SE, Lackland D,

Lichtman JH, Lisabeth L, Liu S, Longenecker CT, Mackey RH, Matsushita K, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Palaniappan L, Pandey DK, Thiagarajan RR, Reeves MJ, Ritchey M, Rodriguez CJ, Roth GA, Rosamond WD, Sasson C, Towfighi A, Tsao CW, Turner MB, Virani SS, Voeks JH, Willey JZ, Wilkins JT, Wu JH, Alger HM, Wong SS, Muntner P. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2017. 135: e146-e603

Pathologie. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Aguzzi A, Reg. München: Elsevier Urban & Fischer. 2004. 3 Auflage: 1164-1183

Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*. 1998. 394: 894–897

Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem*. 1983. 52: 223–261

Brugger W, Kreutz M, Andreesen R. Macrophage colony-stimulating factor is required for human monocyte survival and acts as a cofactor for their terminal differentiation to macrophages in vitro. *J Leukoc Biol*. 1991. 49: 483–488

Clément M, Basatemur G, Masters L, Baker L, Bruneval P, Iwawaki T, Kneilling M, Yamasaki S, Goodall J, Mallat Z. Necrotic Cell Sensor Clec4e Promotes a Proatherogenic Macrophage Phenotype Through Activation of the Unfolded Protein Response. *Circulation*. 2016. 134: 1039–1051

Corkum CP, Ings DP, Burgess C, Karwowska S, Kroll W, Michalak TI. Immune cell subsets and their gene expression profiles from human PBMC isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPT™) and standard density gradient. *BMC Immunol*. 2015. 16: 48

Cossarizza A, Chang H-D, Radbruch A, Acs A, Adam D, Adam-Klages S, Agace WW, Aghaeepour N, Akdis M, Allez M, Almeida LN, Alvisi G, Anderson G, Andrä I, Annunziato F, Anselmo A, Bacher P, Baldari CT, Bari S, Barnaba V, Barros-Martins J, Battistini L, Bauer W, Baumgart S, Baumgarth N, Baumjohann D, Baying B, Bebawy M, Becher B, Beisker W, Benes V, Beyaert R, Blanco A, Boardman DA, Bogdan C, Borger JG,

Borsellino G, Boulais PE, Bradford JA, Brenner D, Brinkman RR, Brooks AES, Busch DH, Büscher M, Bushnell TP, Calzetti F, Cameron G, Cammarata I, Cao X, Cardell SL, Casola S, Cassatella MA, Cavani A, Celada A, Chatenoud L, Chattopadhyay PK, Chow S, Christakou E, Čičin-Šain L, Clerici M, Colombo FS, Cook L, Cooke A, Cooper AM, Corbett AJ, Cosma A, Cosmi L, Coulie PG, Cumano A, Cvetkovic L, van Dang D, Dang-Heine C, Davey MS, Davies D, Biasi S de, Del Zotto G, Dela Cruz GV, Delacher M, Della Bella S, Dellabona P, Deniz G, Dessing M, Di Santo JP, Diefenbach A, Dieli F, Dolf A, Dörner T, Dress RJ, Dudziak D, Dustin M, Dutertre C-A, Ebner F, Eckle SBG, Edinger M, Eede P, Ehrhardt GRA, Eich M, Engel P, Engelhardt B, Erdei A, Esser C, Everts B, Evrard M, Falk CS, Fehniger TA, Felipe-Benavent M, Ferry H, Feuerer M, Filby A, Filkor K, Fillatreau S, Follo M, Förster I, Foster J, Foulds GA, Frehse B, Frenette PS, Frischbutter S, Fritzsche W, Galbraith DW, Gangaev A, Garbi N, Gaudilliere B, Gazzinelli RT, Geginat J, Gerner W, Gherardin NA, Ghoreschi K, Gibellini L, Ginhoux F, Goda K, Godfrey DI, Goettlinger C, González-Navajas JM, Goodyear CS, Gori A, Grogan JL, Grummitt D, Grützkau A, Haftmann C, Hahn J, Hammad H, Hämmerling G, Hansmann L, Hansson G, Harpur CM, Hartmann S, Hauser A, Hauser AE, Haviland DL, Hedley D, Hernández DC, Herrera G, Herrmann M, Hess C, Höfer T, Hoffmann P, Hogquist K, Holland T, Höllt T, Holmdahl R, Hombrink P, Houston JP, Hoyer BF, Huang B, Huang F-P, Huber JE, Huehn J, Hundemer M, Hunter CA, Hwang WYK, Iannone A, Ingelfinger F, Ivison SM, Jäck H-M, Jani PK, Jávega B, Jonjic S, Kaiser T, Kalina T, Kamradt T, Kaufmann SHE, Keller B, Ketelaars SLC, Khalilnezhad A, Khan S, Kisielow J, Klenerman P, Knopf J, Koay H-F, Kobow K, Kolls JK, Kong WT, Kopf M, Korn T, Kriegsmann K, Kristyanto H, Kroneis T, Krueger A, Kühne J, Kukat C, Kunkel D, Kunze-Schumacher H, Kurosaki T, Kurts C, Kvistborg P, Kwok I, Landry J, Lantz O, Lanuti P, LaRosa F, Lehuen A, LeibundGut-Landmann S, Leipold MD, Leung LYT, Levings MK, Lino AC, Liotta F, Litwin V, Liu Y, Ljunggren H-G, Lohoff M, Lombardi G, Lopez L, López-Botet M, Lovett-Racke AE, Lubberts E, Luche H, Ludewig B, Lugli E, Lunemann S, Maecker HT, Maggi L, Maguire O, Mair F, Mair KH, Mantovani A, Manz RA, Marshall AJ, Martínez-Romero A, Martrus G, Marventano I, Maslinski W, Matarese G, Mattioli AV, Maueröder C, Mazzoni A, McCluskey J, McGrath M, McGuire HM, McInnes IB, Mei HE, Melchers F, Melzer S, Mielenz D, Miller SD, Mills KHG, Minderman H, Mjösberg J, Moore J, Moran B, Moretta L, Mosmann TR, Müller S, Multhoff G, Muñoz LE, Münz C, Nakayama T, Nasi M, Neumann K, Ng LG, Niedobitek A,

Nourshargh S, Núñez G, O'Connor J-E, Ochel A, Oja A, Ordonez D, Orfao A, Orlowski-Oliver E, Ouyang W, Oxenius A, Palankar R, Panse I, Pattanapanyasat K, Paulsen M, Pavlinic D, Penter L, Peterson P, Peth C, Petriz J, Piancone F, Pickl WF, Piconese S, Pinti M, Pockley AG, Podolska MJ, Poon Z, Pracht K, Prinz I, Pucillo CEM, Quataert SA, Quatrini L, Quinn KM, Radbruch H, Radstake TRDJ, Rahmig S, Rahn H-P, Rajwa B, Ravichandran G, Raz Y, Rebhahn JA, Recktenwald D, Reimer D, Reis e Sousa C, Remmerswaal EBM, Richter L, Rico LG, Riddell A, Rieger AM, Robinson JP, Romagnani C, Rubartelli A, Ruland J, Saalmüller A, Saeys Y, Saito T, Sakaguchi S, Sala-de-Oyanguren F, Samstag Y, Sanderson S, Sandrock I, Santoni A, Sanz RB, Saresella M, Sautes-Fridman C, Sawitzki B, Schadt L, Scheffold A, Scherer HU, Schiemann M, Schildberg FA, Schimisky E, Schlitzer A, Schlosser J, Schmid S, Schmitt S, Schober K, Schraivogel D, Schuh W, Schüler T, Schulte R, Schulz AR, Schulz SR, Scottá C, Scott-Algara D, Sester DP, Shankey TV, Silva-Santos B, Simon AK, Sitnik KM, Sozzani S, Speiser DE, Spidlen J, Stahlberg A, Stall AM, Stanley N, Stark R, Stehle C, Steinmetz T, Stockinger H, Takahama Y, Takeda K, Tan L, Tárnok A, Tiegs G, Toldi G, Tornack J, Traggiai E, Trebak M, Tree TIM, Trotter J, Trowsdale J, Tsoumakidou M, Ulrich H, Urbanczyk S, van de Veen W, van den Broek M, van der Pol E, van Gassen S, van Isterdael G, van Lier RAW, Veldhoen M, Vento-Asturias S, Vieira P, Voehringer D, Volk H-D, Borstel A von, Volkmann K von, Waisman A, Walker RV, Wallace PK, Wang SA, Wang XM, Ward MD, Ward-Hartstonge KA, Warnatz K, Warnes G, Warth S, Waskow C, Watson JV, Watzl C, Wegener L, Weisenburger T, Wiedemann A, Wienands J, Wilharm A, Wilkinson RJ, Willimsky G, Wing JB, Winkelmann R, Winkler TH, Wirz OF, Wong A, Wurst P, Yang JHM, Yang J, Yazdanbakhsh M, Yu L, Yue A, Zhang H, Zhao Y, Ziegler SM, Zielinski C, Zimmermann J, Zychlinsky A. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur J Immunol.* 2019. 49: 1457–1973

Crowley MT, Costello PS, Fitzer-Attas CJ, Turner M, Meng F, Lowell C, Tybulewicz VL, DeFranco AL. A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fcγ receptors on macrophages. *J Exp Med.* 1997. 186: 1027–1039

Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2004. 109: III27-32

Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007. 115: 1285–1295

Deutsche Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und Kreislaufforschung. 84. Jahrestagung der Deutsche Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und Kreislaufforschung vom 4. bis 7. April 2018 in Mannheim. *Clin Res Cardiol*. 2018. 107: 1

Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nuñez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 2010. 464: 1357–1361

Erbel C, Okuyucu D, Akhavanpoor M, Zhao L, Wangler S, Hakimi M, Doesch A, Dengler TJ, Katus HA, Gleissner CA. A human ex vivo atherosclerotic plaque model to study lesion biology. *J Vis Exp*. 2014

Fraunberger P, Wang Y, Blessing FJ, Seidel D, Walli AK. Atherogenese: Wechselspiel zwischen Cholesterin, Inflammation und Koagulation. *Herz*. 2005. 30: 723–732

Frostegård J. Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. *BMC Med*. 2013. 11: 117

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980. 288: 373–376

Furman MI, Gore JM, Anderson FA, Budaj A, Goodman SG, Avezum A, López-Sendón J, Klein W, Mukherjee D, Eagle KA, Dabbous OH, Goldberg RJ. Elevated leukocyte count and adverse hospital events in patients with acute coronary syndromes: findings from the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE). *Am Heart J*. 2004. 147: 42–48

Furukawa A, Kamishikiyo J, Mori D, Toyonaga K, Okabe Y, Toji A, Kanda R, Miyake Y, Ose T, Yamasaki S, Maenaka K. human Mincle, ligand free form. 2013

Gahmberg CG, Valmu L, Fagerholm S, Kotovuori P, Ihanus E, Tian L, Pessa-Morikawa T. Leukocyte integrins and inflammation. *Cell Mol Life Sci*. 1998. 54: 549–555

- Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005. 5: 953–964
- Grebe A, Latz E. Cholesterol crystals and inflammation. *Curr Rheumatol Rep*. 2013. 15: 313
- Greenberg S. Modular components of phagocytosis. *J Leukoc Biol*. 1999. 66: 712–717
- Grimm RH, Neaton JD, Ludwig W. Prognostic importance of the white blood cell count for coronary, cancer, and all-cause mortality. *JAMA*. 1985. 254: 1932–1937
- Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. Absence of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Reduces Atherosclerosis in Low Density Lipoprotein Receptor–Deficient Mice. *Mol Cell*. 1998. 2: 275–281
- Guilliams M, Mildner A, Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity*. 2018. 49: 595–613
- Hansson GK. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *J Thromb Haemost*. 2009. 7 Suppl 1: 328–331
- Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2006. 6: 508–519
- Hansson GK, Robertson A-KL, Söderberg-Nauclér C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*. 2006. 1: 297–329
- Hattori Y, Morita D, Fujiwara N, Mori D, Nakamura T, Harashima H, Yamasaki S, Sugita M. Glycerol monomycolate is a novel ligand for the human, but not mouse macrophage inducible C-type lectin, Mincle. *J Biol Chem*. 2014. 289: 15405–15412
- Heidenreich PA, Trogon JG, Khavjou OA, Butler J, Dracup K, Ezekowitz MD, Finkelstein EA, Hong Y, Johnston SC, Khera A, Lloyd-Jones DM, Nelson SA, Nichol G, Orenstein D, Wilson PWF, Woo YJ. Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2011. 123: 933–944

Helske S, Kupari M, Lindstedt KA, Kovanen PT. Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process. *Curr Opin Lipido*. 2007. 18: 483–491

Herre J, Marshall ASJ, Caron E, Edwards AD, Williams DL, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Reis e Sousa C, Gordon S, Brown GD. Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood*. 2004. 104: 4038–4045

Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ Re*. 2016. 118: 535–546

Hewing B, Au SC-D, Ludwig A, Ellerbroek R, van Dijck P, Hartmann L, Grubitzsch H, Giannini C, Laule M, Stangl V, Baumann G, Stangl K. Severe Aortic Valve Stenosis in Adults is Associated with Increased Levels of Circulating Intermediate Monocytes. *J Cardiovasc Transl Res*. 2017. 10: 27–34

Insull W. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *Am J Med*. 2009. 122: S3-S14

Ishikawa E, Ishikawa T, Morita YS, Toyonaga K, Yamada H, Takeuchi O, Kinoshita T, Akira S, Yoshikai Y, Yamasaki S. Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *J Exp Med*. 2009. 206: 2879–2888

Kayser S, Brunner P, Althaus K, Dorst J, Sheriff A. Selective Apheresis of C-Reactive Protein for Treatment of Indications with Elevated CRP Concentrations. *J Clin Med*. 2020. 9

Kellner-Weibel G, Yancey PG, Jerome WG, Walser T, Mason RP, Phillips MC, Rothblat GH. Crystallization of free cholesterol in model macrophage foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999. 19: 1891–1898

Kerrigan AM, Brown GD. Syk-coupled C-type lectin receptors that mediate cellular activation via single tyrosine based activation motifs. *Immunol Rev*. 2010. 234: 335–352

Kiyotake R, Oh-Hora M, Ishikawa E, Miyamoto T, Ishibashi T, Yamasaki S. Human Mincle Binds to Cholesterol Crystals and Triggers Innate Immune Responses. *J Biol Chem*. 2015. 290: 25322–25332

Lee CD, Folsom AR, Nieto FJ, Chambless LE, Shahar E, Wolfe DA. White blood cell count and incidence of coronary heart disease and ischemic stroke and mortality from cardiovascular disease in African-American and White men and women: atherosclerosis risk in communities study. *Am J Epidemiol*. 2001. 154: 758–764

Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 2001. 104: 365–372

Liberale L, Dallegri F, Montecucco F, Carbone F. Pathophysiological relevance of macrophage subsets in atherogenesis. *Thromb Haemost*. 2017. 117: 7–18

Liebetrau C, Hoffmann J, Dörr O, Gaede L, Blumenstein J, Biermann H, Pyttel L, Thiele P, Troidl C, Berkowitsch A, Rolf A, Voss S, Hamm CW, Nef H, Möllmann H. Release kinetics of inflammatory biomarkers in a clinical model of acute myocardial infarction. *Circ Re*. 2015. 116: 867–875

Lu H, Daugherty A. Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015. 35: 485–491

Lu X, Nagata M, Yamasaki S. Mincle: 20 years of a versatile sensor of insults. *Int Immunol*. 2018. 30: 233–239

Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1986. 315: 1046–1051

Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000. 407: 233–241

Lyrad K, Riley, Jedda Rupert. Evaluation of Patients with Leukocytosis. *AFP*. 2015. 92: 1004–1011

Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res*. 1984. 25: 1277–1294

McGreal EP, Miller JL, Gordon S. Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Current opinion in immunology*. 2005. 17: 18–24

Miyake Y, Toyonaga K, Mori D, Kakuta S, Hoshino Y, Oyamada A, Yamada H, Ono K-I, Suyama M, Iwakura Y, Yoshikai Y, Yamasaki S. C-type lectin MCL is an FcR γ -coupled receptor that mediates the adjuvanticity of mycobacterial cord factor. *Immunity*. 2013. 38: 1050–1062

Mócsai A, Ruland J, Tybulewicz VLJ. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol*. 2010. 10: 387–402

Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*. 2011. 145: 341–355

Munro JM, Cotran RS. The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1988. 58: 249–261

Neil Abramson, Becky Melton. Leukocytosis: Basics of Clinical Assessment. *AFP*. 2000. 62: 2053–2060

Núñez J, Núñez E, Sanchis J, Bodí V, Llàcer A. Prognostic value of leukocytosis in acute coronary syndromes: the cinderella of the inflammatory markers. *Current medicinal chemistry*. 2006. 13: 2113–2118

O'Donnell CJ, Elosua R. Cardiovascular Risk Factors. Insights From Framingham Heart Study. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*. 2008. 61: 299–310

Palmerini T, Génereux P, Mehran R, Dangas G, Caixeta A, Della Riva D, Mariani A, Xu K, Stone GW. Association among leukocyte count, mortality, and bleeding in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes (from the Acute Catheterization and Urgent Intervention Triage Strategy ACUITY trial). *Am J Cardiol*. 2013. 111: 1237–1245

Pilely K, Bakke SS, Palarasah Y, Skjoedt M-O, Bartels ED, Espevik T, Garred P. Alpha-cyclodextrin inhibits cholesterol crystal-induced complement-mediated inflammation: A

potential new compound for treatment of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2019. 283: 35–42

Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Douidi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *International journal of preventive medicine*. 2014. 5: 927–946

Richardson MB, Williams SJ. MCL and Mincle: C-Type Lectin Receptors That Sense Damaged Self and Pathogen-Associated Molecular Patterns. *Frontiers in immunology*. 2014. 5: 288

Riou S, Mees B, Esposito B, Merval R, Vilar J, Stengel D, Ninio E, van Haperen R, Crom R de, Tedgui A, Lehoux S. High pressure promotes monocyte adhesion to the vascular wall. *Circ Re*. 2007. 100: 1226–1233

Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annual review of physiology*. 1995. 57: 791–804

Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999. 340: 115–126

Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med*. 1976a. 295: 369–377

Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *N Engl J Med*. 1976b. 295: 420–425

Sabatine MS, Morrow DA, Cannon CP, Murphy SA, Demopoulos LA, DiBattiste PM, McCabe CH, Braunwald E, Gibson CM. Relationship between baseline white blood cell count and degree of coronary artery disease and mortality in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*. 2002. 40: 1761–1768

Samstad EO, Niyonzima N, Nymo S, Aune MH, Ryan L, Bakke SS, Lappegård KT, Brekke O-L, Lambris JD, Damås JK, Latz E, Mollnes TE, Espevik T. Cholesterol crystals induce complement-dependent inflammasome activation and cytokine release. *J Immunol*. 2014. 192: 2837–2845

Schaftenaar F, Frodermann V, Kuiper J, Lutgens E. Atherosclerosis: the interplay between lipids and immune cells. *Curr Opin Lipido*. 2016. 27: 209–215

Schoenen H, Bodendorfer B, Hitchens K, Manzanero S, Werninghaus K, Nimmerjahn F, Agger EM, Stenger S, Andersen P, Ruland J, Brown GD, Wells C, Lang R. Cutting edge: Mincle is essential for recognition and adjuvanticity of the mycobacterial cord factor and its synthetic analog trehalose-dibehenate. *J Immunol*. 2010. 184: 2756–2760

Schwartzberg S, Meledin V, Zilberman L, Goland S, George J, Shimoni S. Low circulating monocyte count is associated with severe aortic valve stenosis. *Isr Med Assoc J*. 2013. 15: 500–504

Sheedy FJ, Grebe A, Rayner KJ, Kalantari P, Ramkhelawon B, Carpenter SB, Becker CE, Ediriweera HN, Mullick AE, Golenbock DT, Stuart LM, Latz E, Fitzgerald KA, Moore KJ. CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nat Immunol*. 2013. 14: 812–820

Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011. 11: 762–774

Shi Y, Tohyama Y, Kadono T, He J, Miah SMS, Hazama R, Tanaka C, Tohyama K, Yamamura H. Protein-tyrosine kinase Syk is required for pathogen engulfment in complement-mediated phagocytosis. *Blood*. 2006. 107: 4554–4562

Shimoni S, Meledin V, Bar I, Fabricant J, Gandelman G, George J. Circulating CD14(+) monocytes in patients with aortic stenosis. *J Geriatr Cardiol*. 2016. 13: 81–87

Statistisches Bundesamt (Destatis). Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachen die höchsten Kosten. Verfügbar unter https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2017/09/PD17_347_236.html (Zugriffsdatum: 10.06.2020)

Statistisches Bundesamt (Destatis). Todesursachen in Deutschland. Verfügbar unter [https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-](https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html)

[Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html](https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html) (Zugriffsdatum: 09.06.2020)

Tabas I. Cholesterol in health and disease. *J Clin Invest*. 2002. 110: 583–590

Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2010. 10: 36–46

Tabas I, Lichtman AH. Monocyte-Macrophages and T Cells in Atherosclerosis. *Immunity*. 2017. 47: 621–634

Tangirala RK, Jerome WG, Jones NL, Small DM, Johnson WJ, Glick JM, Mahlberg FH, Rothblat GH. Formation of cholesterol monohydrate crystals in macrophage-derived foam cells. *J Lipid Res*. 1994. 35: 93–104

Tohyama Y, Yamamura H. Complement-mediated phagocytosis--the role of Syk. *IUBMB life*. 2006. 58: 304–308

Tohyama Y, Yamamura H. Protein tyrosine kinase, syk: a key player in phagocytic cells. *J Biochem*. 2009. 145: 267–273

Trogdon JG, Finkelstein EA, Nwaise IA, Tangka FK, Orenstein D. The economic burden of chronic cardiovascular disease for major insurers. *Health Promot Pract*. 2007. 8: 234–242

Veltman D, Wu M, Pokreisz P, Claus P, Gillijns H, Caluwé E, Vanhaverbeke M, Gsell W, Himmelreich U, Sinnaeve PR, Janssens SP. Clec4e-Receptor Signaling in Myocardial Repair After Ischemia-Reperfusion Injury. *JACC Basic Transl Sci*. 2021. 6: 631–646

Vijayan D, Radford KJ, Beckhouse AG, Ashman RB, Wells CA. Mincle polarizes human monocyte and neutrophil responses to *Candida albicans*. *Immunol Cell Biol*. 2012. 90: 889–895

Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*. 2011. 17: 1410–1422

Wells CA, Salvage-Jones JA, Li X, Hitchens K, Butcher S, Murray RZ, Beckhouse AG, Lo Y-L-S, Manzanero S, Cobbold C, Schroder K, Ma B, Orr S, Stewart L, Lebus D, Sobieszczuk P, Hume DA, Stow J, Blanchard H, Ashman RB. The macrophage-inducible C-type lectin, mincle, is an essential component of the innate immune response to *Candida albicans*. *J Immunol*. 2008. 180: 7404–7413

World Health Organization. Disease burden and mortality estimates. Verfügbar unter https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html (Zugriffsdatum: 09.06.2020)

Yamamoto E, Sugiyama S, Hirata Y, Tokitsu T, Tabata N, Fujisue K, Sugamura K, Sakamoto K, Tsujita K, Matsumura T, Kaikita K, Hokimoto S. Prognostic significance of circulating leukocyte subtype counts in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2016. 255: 210–216

Yvan-Charvet L, Pagler T, Gautier EL, Avagyan S, Siry RL, Han S, Welch CL, Wang N, Randolph GJ, Snoeck HW, Tall AR. ATP-binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation. *Science*. 2010. 328: 1689–1693

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt Philipp Pfeifer für die hervorragende Betreuung und die enorme Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit. Darüber hinaus danke ich meinen Doktorvätern Nikos Werner für die Überlassung des Themas und die großartige Begleitung meiner Forschung und Sebastian Zimmer für die Übernahme meiner Betreuung und die ausgezeichnete Unterstützung auf meinem Weg. Für die finanzielle Unterstützung möchte ich dem SciMed-Promotionsstipendium des BONFOR-Forschungsförderprogramms meinen Dank ausdrücken. Auch bedanke ich mich bei allen wissenschaftlichen Mitarbeitern der medizinischen Klinik und Poliklinik II, vor allem Theresa Schmitz, Anna Flender, Sandra Adler, Paula Levermann, Katharina Groll und Cristina Göbbel, für ihre tatkräftige Mithilfe und ihre guten Ratschläge. Für ihre Herzlichkeit und die Mitbenutzung ihres FACS-Gerätes danke ich dem Team der Medizinischen Klinik und Poliklinik I. Diesbezüglich möchte ich mich vor allem bei Benjamin Krämer, Eva Steffen und der Flow Cytometry Core Facility für ihr unverzichtbares Wissen bedanken. Dem Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin danke ich für die Bereitstellung und Überlassung ihrer Buffy Coats. Mein Dank gilt allen Patienten, die mir so großzügig geholfen haben und sich für meine Forschung zur Verfügung gestellt haben und den Mitarbeitern und Ärzten des Herzkatheterlabores für ihre gewissenhafte Assistenz. Außerdem danke ich meinen Mitdoktoranden für ihre Anregungen, Gespräche und den gelegentlichen Blutspenden. Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, meinen Schwestern und meinen Freunden, die mich stets ermutigt haben, mir mit ihrer Geduld beiseite standen und auf deren Rat ich mich immer verlassen konnte.