

Aus der

Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin III

(Schwerpunkt: Kardiologie und Angiologie)

**Zusammenhang zwischen kardiovaskulären Erkrankungen,
kardiovaskulären Risikofaktoren und schweren SARS-CoV-
2-Infektionen: Eine Studie über systemische
Hyperinflammation und anhaltende Immunantwort**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Kocaman-Graf, Hüseyin geb. Kocaman
2025**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. K. Müller
2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Riessen

Tag der Disputation: 21.05.2025

Meinen Eltern, meinen Geschwistern, meiner Ehefrau und Tochter

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis.....	9
1 Einleitung.....	14
1.1 SARS-CoV-2 und COVID-19	14
1.2 Klassifikation der Monozyten, ihre weiter differenzierten Formen und ihre Funktion	16
1.2.1 Monozyten	16
1.2.2 Dendritische Zellen.....	17
1.2.3 Makrophagen	17
1.3 Zytokine	18
1.3.1 Makrophagenmigrations-Inhibitionsfaktor	19
1.3.2 Chemokine.....	20
1.4 Zytokin-Rezeptoren	23
1.4.1 Chemokinrezeptoren.....	23
1.5 Adhäsionsmoleküle	26
1.5.1 CD11a	26
1.5.2 CD11b	27
1.6 Thrombozyten/Leukozyten-Aggregate	27
1.7 Kardiovaskuläre Erkrankungen und kardiovaskuläre Risikofaktoren.....	28
1.7.1 Arterielle Hypertonie.....	28
1.7.2 Diabetes mellitus	29
1.7.3 Dyslipidämie	30
1.7.4 Nikotinkonsum	31
1.7.5 Adipositas	31
1.7.6 Kardiovaskuläre Erkrankungen.....	32
1.8 Zielsetzung der Arbeit	32
1.8.1 Kontext und wissenschaftliche Bedeutung	32
1.8.2 Wissenschaftliche Fragestellung	33
1.8.3 Ansatz zur Umsetzung der spezifischen Ziele.....	34
2 Materialien und Methoden	35
2.1 Studiendesign, Studienpopulationen und Einschlusskriterien.....	35
2.2 Klinische Nachbeobachtung	37
2.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	37

2.4	Dimensionsreduktion durch Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP)	39
2.4.1	UMAP-Analyse zur Deutung der Daten aus der Durchflusszytometrie	40
2.5	Durchflusszytometrische Färbung und Bearbeitung der gewonnenen Daten	41
2.6	Bestimmung der Plasmaspiegel von Zytokinen und Chemokinen (LEGENDPlex)	44
2.7	Statistische Auswertung	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Klinische Merkmale von Patienten mit schwerer SARS-Cov-2-Infektion	45
3.2	Darstellung der Veränderung der Leukozytenzahl nach SARS-CoV-2	51
3.3	Veränderungen der Thrombozytenzahl nach Infektion mit SARS-CoV-2	52
3.3	Veränderungen der Thrombozyten/Leukozyten-Aggregate nach Infektion mit SARS-CoV-2	53
3.4	Charakterisierung von Veränderungen des Immunphänotyps zirkulierender peripherer Monozyten nach SARS-CoV-2-Infektion mittels Durchflusszytometrie	54
3.5	Untersuchung der Expression von Markern für Adhäsion, Migration und T-Zell-Aktivierung auf Monozyten-Subtypen	56
3.5.1	Veränderung der CD11b-Expression während der akuten SARS-CoV-2-Infektion auf Monozyten-Subtypen	56
3.5.2	Veränderung der CD11a-Expression während der akuten SARS-CoV-2-Infektion auf Monozyten-Subtypen	58
3.5.3	Die CCR2-Expression während der akuten Phase der SARS-CoV-2-Infektion und in der Rekonvaleszenzphase	60
3.5.4	Die ACKR3-Expression während der akuten Phase der SARS-CoV-2-Infektion und in der Rekonvaleszenzphase	62
3.6	Untersuchung der intrazellulären Expression von CXCL 12 und MIF	64
3.6.1	Die Expression von CXCL12 während der akuten SARS-CoV-2-Infektion und in der Rekonvaleszenzphase	64
3.6.2	MIF-Expression in der Rekonvaleszenzphase	65
3.6.3	Thrombozyten/Leukozyten-Aggregate und nicht-klassische Monozyten während der Rekonvaleszenzphase	67
3.6.4	MIF in klassischen und intermediären Monozyten während der Rekonvaleszenzphase	68
3.7	Hierarchisches Clustering von Monozyten-Subtypen identifiziert spezifische Phänotypen in der akuten Phase der SARS-CoV-2-Infektion und nach dreimonatiger Rekonvaleszenz	70
3.7.1	Expression von CXCL12 und CXCL14 während der akuten SARS-CoV-2-Infektion	71
3.7.2	Die Aktivierungs- und Migrationseigenschaften von Monozyten in der akuten Phase der SARS-CoV-2-Infektion und in der Rekonvaleszenzphase	72
3.7.3	Expression von CD14 und CD16 auf der Oberfläche von Monozyten während der akuten Phase und in der Rekonvaleszenzphase	73
3.8	MIF-Plasmaspiegel in der akuten Phase der SARS-CoV-2-Infektion	75
4	Diskussion	79

4.1 Kernaussagen der Studie	79
4.2 Persistierende Immunaktivierung nach schwerer SARS-CoV-2-Infektion bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen und/oder kardiovaskulären Risikofaktoren.....	80
4.3 Persistierende Immunaktivierung und erhöhte Expression von MIF.....	81
4.4 Veränderungen des Zytokinprofils als Hinweis auf die anhaltende Immunantwort	82
4.5 Vergleich mit bereits vorhandenen Forschungsergebnissen und andere mögliche Erklärungen für unsere Resultate	83
4.6. Klinische Relevanz und mögliche Konsequenzen für die weitere Forschung	83
4.7. Limitation unserer Studie	84
5 Zusammenfassung.....	85
6 Literaturverzeichnis	87
7 Erklärung zum Eigenanteil	98

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Studienablauf und Teilnehmer	36
Abbildung 2. Leukozytenzahl/ml mit IQR während der akuten Infektion, während der Rekonvaleszenz und in der gesunden Kontrollgruppe	52
Abbildung 3. Thrombozytenzahl/ml mit IQR bei akuter Infektion, dreimonatiger Rekonvaleszenz und gesunder Kontrollgruppe	53
Abbildung 4. PLA/ml mit IQR in der akuten Phase und nach dreimonatiger Rekonvaleszenz, verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe	54
Abbildung 5A, 5B und 5C. Vergleich der Immunphänotypen von zirkulierenden peripheren Monozyten in der Studienpopulation	55
Abbildung 6A, 6B und 6C. CD11b-Expression auf Monozyten-Subtypen	57
Abbildung 7A, 7B und 7C. CD11a-Expression auf Monozyten-Subtypen	59
Abbildung 8A, 8B und 8C. CCR2-Expression auf Monozyten-Subtypen	61
Abbildung 9A, 9B und 9C. ACKR3-Expression auf Monozyten-Subtypen	63
Abbildung 10A, 10B und 10C. CXCL12-Expression in Monozyten-Subtypen	65
Abbildung 11A, 11B und 11C. MIF-Expression in Monozyten-Subtypen	66
Abbildung 12A, 12B, 12C und 12D. Anzahl (Median) der Leukozyten, Monozyten, Thrombozyten und Thrombozyten/Leukozyten-Aggregate mit IQR im Vergleich zwischen Akut- und Rekonvaleszenzphase für jeden einzelnen Patienten	67
Abbildung 13A, 13B, 13C, 13D, 13E und 13F. Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker für Aktivierung und Migration auf Monozyten-Subtypen im Vergleich zwischen akuter und Rekonvaleszenzphase einer SARS-CoV-2-Infektion	69
Abbildung 14A, 14B, 14C, 14D und 14E. Immunphänotypisierung und hochdimensionale Analyse von Monozytendaten aus der Durchflusszytometrie	72
Abbildung 15A, 15B, 15C, 15D und 15E. Immunphänotypisierung und hochdimensionale Analyse von Monozytendaten aus der Durchflusszytometrie	74
Abbildung 16. Untersuchung von Zytokin-Konzentrationen im Plasma	77
Abbildung 17. Untersuchung von Zytokin-Konzentrationen im Plasma	78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Liste der Geräte und Verbrauchsmaterialien	37
Tabelle 2. Baseline-Charakteristika der Studienpopulation	45
Tabelle 3. Unerwünschte Ereignisse während des FU	48
Tabelle 4. Längsschnittdaten der Studienpopulation	48

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
ACE	Angiotensin converting enzyme
ACE2-Rezeptor	Angiotensin-converting-enzyme-2-receptor
ACKRs	Atypical chemokine receptors
ADA	American Diabetes Association
AHT	Arterielle Hypertonie
ALT	Alanin-Amino-Transferase
ARB	Angiotensin-2-Rezeptorblocker
ARDS	Akutes respiratorisches Distress-Syndrom
ASS	Acetylsalicylsäure
AST	Aspartat-Aminotransferase
BMI	Body-Mass-Index
CAM	Cell adhesion molecules
cCKRs	Conventional chemokine receptors
CCR2	Chemokine receptor type 2
CD	Cluster of differentiation protein
CI	Confidence interval
CK	Creatinkinase
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
COVID-19	Coronavirus disease 2019
CPDA-Monovetten	Citrat-, Phosphat-, Dextrose- und Adeninmonovetten
CR3	Complement receptor 3
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
CVD	Cardiovascular disease
CVRF	Cardiovascular risk factors
DM	Diabetes mellitus

dL	Deziliter
ECLS/ECMO	Extracorporal life-support/ extracorporal membrane oxygenation
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
EKG	Elektrokardiographie
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EP	Endpoint
ESC	European Society of Cardiology
FCS	Fetal calf serum
FMO	Fluorescence-Minus-One
FSC	Forward scatter
FU	Follow-up
g	Gramm
GCP	Good clinical practice
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GPCR	G-protein-coupled receptor
Hb	Hämoglobin
HbA1c (%)	Glykiertes Hämoglobin A1c
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid
HI	Horovitz-Index
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
hs Tnl	Hochsensitives Troponin I
ICAM	Intracellular cell adhesion molecules
ICU	Intensiv care unit
IL-12	Interleukin-12
IL-6	Interleukin-6
INR	International normalized ratio
IQR	Interquartil range

ITGAM	Integrin alpha M
Kardio-MRT	Kardiale Magnetresonanztomographie
kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzkrankheit
L	Liter
LADA	Latent Autoimmune Diabetes in Adult
LAE	Lungenarterienembolie
LDH	Laktatdehydrogenase
LFA-1	Lymphocyte function associated antigen-1
LPS	Lipopolysachharid
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
m ²	Quadratmeter
Mac-1	Macrophage-1 antigen
MEK/ERK	Mitogen-activated protein kinase/Extracellular signal regulated kinase
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MHC	Major histocompatibility complex
MIF	Makrophagenmmakropigrations-Inhibitionsfaktor
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
MPS	Mononukleäres phagozytäres System
MRA	Mineralokortikoidrezeptor-Antagonist
MW	Mittelwert
ng	Nanogramm
NIR	Near infrared

nm	Nanometer
NSTEMI	Nicht-ST-Strecken-Elevations-Myokardinfarkt
NT-pro-BNP	N-Terminal pro B-type natriuretic peptide
PAP Sys	Systolischer Pulmonalarteriendruck
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate buffered saline
PCT	Procalcitonin
PLA	Platelet/leukocyte aggregates
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand 1
PTT	Partial thromboplastin time
RBC Lysis Buffer	Red blood cell lysis buffer
PCR	Polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SARS-CoV	Severe acute respiratory syndrome coronavirus
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
SD	Standard deviation
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SEM	Standard error of the mean
SSC	Side scatter
TAPSE	Tricuspid annular plane systolic excursion
TNF	Tumornekrosefaktor
TBVT	Tiefe Beinvenenthrombose
U	Unit
UMAP	Uniform manifold approximation and projection
VEGF	Vascular endothelial growth factor

VHF	Vorhofflimmern
VT	Ventrikuläre Tachykardie
WBC	White blood cells
WHO-CPS	WHO Clinical Progress Scale

1 Einleitung

1.1 SARS-CoV-2 und COVID-19

Beim Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) handelt es sich um ein Betacoronavirus, das für die Coronavirus-Krankheit-2019 (COVID-19) verantwortlich ist. Erstmals wurde dieses Virus Ende 2019 in Wuhan, China, identifiziert (Zhu et al., 2020). Trotz strengen Eindämmungsmaßnahmen vor Ort kam es zu einer weltweiten Verbreitung des Virus (Dandekar and Barbastathis, 2020). Innerhalb einer kurzen Zeit meldeten auch andere Staaten ihre ersten COVID-19-Fälle, sodass die Weltgesundheitsorganisation (WHO) aufgrund der raschen Ausdehnung am 30.01.2020 einen internationalen Gesundheitsnotstand und am 11.03.2020 schon eine Pandemie ausrief (Díaz Crego et al., 2020). Bis zum heutigen Tag sind über 700 Millionen bestätigte Krankheitsfälle und 7 Millionen Todesfälle dokumentiert (Chung et al., 2024). Durch die hohe Transmissibilität des Virus und der damit einhergehenden hohen Krankheits- und Todesfälle, waren die Gesundheitssysteme weltweit ausstrapaziert (van Ginneken et al., 2022, Shah et al.). Es zeigte sich chronologisch bereits in frühen Stadien der Pandemie, dass bestimmte Patientengruppen einen ungünstigeren Krankheitsverlauf entwickeln als andere (Zdanyte and Rath, 2021).

SARS-CoV-2 zählt zur derselben Virusfamilie wie das SARS-CoV (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus), das den SARS-CoV-Ausbruch 2002 verursacht hat (Chan et al., 2020). SARS-CoV-2 unterscheidet sich sowohl von SARS-CoV als auch von den anderen bekannten Betacoronaviren durch seine Gensequenz, seine leichte Übertragbarkeit, seine Fähigkeit zur asymptomatischen Verbreitung und seine spezifische Struktur des Spike-Proteins (Amin et al., 2020). Die Übertragung des Virus erfolgt durch Aerosole und Tröpfcheninfektionen (Oh et al., 2021). Klinisch präsentiert sich die COVID-19 vielfältig. Hierzu gehören Fieber, Husten, Kurzatmigkeit, Müdigkeit, Körperschmerzen, Verlust des Geschmacks- oder Geruchssinns (da Rosa Mesquita et al., 2021). In schweren Verläufen der Erkrankung kann es zu Lungenentzündung, akutem Lungenversagen (ARDS), Multiorganversagen und sogar zum Tod kommen (Hoehl and Ciesek, 2020).

Die Pathophysiologie der SARS-CoV-2-Infektion und der COVID-19-Erkrankung ist komplex. SARS-CoV-2 infiziert primär Atemwegszellen, insbesondere Zellen, die die

oberen Atemwege und Alveolen auskleiden (Sungnak et al., 2020). Dazu bindet es sein Spike-Protein an den Angiotensin-Converting-Enzyme-2-Rezeptor (ACE2-Rezeptor) auf der Zelloberfläche der o.g. Zellen (Conceicao et al., 2020). Nach dem Eindringen in die Zelle setzt das Virus seine Ribonukleinsäure (RNA) frei und nutzt die zelluläre Maschinerie des Wirtes, um sich zu replizieren. Um das Virus zu bekämpfen, wird nach der Infektion das körpereigene Immunsystem aktiviert. Immunzellen, wie z. B. T-Zellen und B-Zellen, erkennen die Bestandteile des Virus und leiten eine Immunantwort ein (Hu et al., 2021a). Bei manchen Menschen verläuft die Infektion weniger symptomatisch und das Virus wird dennoch erfolgreich eliminiert. In diesen Fällen dauert die Virusausscheidung länger, aber die Immunantwort ist eher mild (Gesierich, 2020). Bei anderen kann es zu einer überschießenden Immunreaktion mit Entzündung und Schädigung des gesunden Gewebes kommen. In schweren Fällen von COVID-19 kann eine überschießende Immunreaktion zu einer lebensbedrohlichen Komplikation führen, die als Zytokinsturm bezeichnet wird. Dabei setzt der Körper eine große Anzahl von Zytokinen in den Blutkreislauf frei, was zu einer weit verbreiteten Entzündung und Gewebeschädigung führt. Diese Gewebeschädigung kann verschiedene Organe betreffen und z.B. zu Gerinnungsstörungen und damit thrombotische Komplikationen führen (Hu et al., 2021b). Die genauen Mechanismen, die diesen Gerinnungsanomalien zugrunde liegen, werden noch erforscht, könnten aber mit Entzündungen und endothelialer Dysfunktion zusammenhängen (Bernard et al., 2020).

Monozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort, da sie wichtige Produzenten von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen sind (Karwaciak et al., 2021). Neben diesen wichtigen Funktionen können Monozyten Viruspartikel phagozytieren und durch Antigenpräsentation zur Aktivierung von T-Zellen beitragen. Es wird angenommen, dass gerade diese Fähigkeiten der Monozyten bei einer Hyperaktivierung zu einem Zytokinsturm beitragen. Studien konnten bereits zeigen, dass eine schwere SARS-CoV-2 Infektion zu einer Dysregulation der Monozytendifferenzierung mit konsekutiver vermehrter Bildung inflammatorischer Subtypen führt (Zhou et al., 2020). Im Folgenden werden diese Zellpopulation, die Zytokine sowie Zytokinrezeptoren vorgestellt.

1.2 Klassifikation der Monozyten, ihre weiter differenzierten Formen und ihre Funktion

Als größte Leukozyten spielen Monozyten eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem. Ursprünglich als zirkulierende periphere Monozyten im Knochenmark gebildet und ausgeschwemmt, gelangen sie durch Migration in die verschiedenen Organe und differenzieren dort unter dem Einfluss von Chemotaxis, Zytokinen und Antigenen zu Makrophagen und dendritischen Zellen (Coillard and Segura, 2019, Espinoza and Emmady, 2022, Guilliams et al., 2018). In diesen Formen können sie dort bis zu mehreren Monaten verbleiben. Außerdem haben sie die Fähigkeit, das adaptive Immunsystem zu beeinflussen. Es gibt drei Untergruppen von Monozyten, die anhand ihrer phänotypischen Oberflächenmerkmale (Rezeptoren) mittels Durchflusszytometrie unterschieden werden können:

- der klassische Monozyt (CD14⁺CD16⁻)
- der nicht-klassische Monozyt (CD14^{dim}CD16⁺)
- der intermediäre Monozyt (CD14⁺CD16⁺)

1.2.1 Monozyten

Der klassische Monozyt zeichnet sich durch eine starke Expression des Zelloberflächenrezeptors CD14 aus (CD14⁺CD16⁻). Der nicht-klassische Monozyt weist eine geringe Expression von CD14 und eine zusätzliche Koexpression des CD16-Rezeptors auf (CD14^{dim}CD16⁺). Der intermediäre Monozyt weist eine hohe Expression von CD14 und eine niedrige Expression von CD16 auf (CD14⁺CD16⁺). Die verschiedenen Monozyten-Subtypen können eigenständig, d.h. ohne weitere Differenzierung, spezifische Aufgaben erfüllen und damit Immunreaktionen direkt regulieren (Ginhoux et al., 2021). Die klassischen Monozyten sind zur Phagozytose fähig und haben unter anderem die Fähigkeit, proinflammatorische Faktoren zu sezernieren. Die nicht-klassischen Monozyten - ebenfalls zur Phagozytose befähigt - produzieren nach Stimulation durch mikrobielle Produkte große Mengen proinflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF) und Interleukin 12 (IL-12). Darüber hinaus wurde sowohl für klassische als auch für nicht-klassische Monozyten ein patrouillierendes Verhalten beschrieben, d. h. sie bewegen sich

langsam entlang des Endothels, um dieses nach Krankheitserregern abzusuchen (Buscher et al., 2017). Intermediäre Monozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Antigenpräsentation und der Stimulation von T-Lymphozyten. Dabei werden mikrobielle Fragmente nach der Phagozytose in MHC (Major histocompatibility complex) eingebaut, anschließend an die Zelloberfläche transportiert und den T-Lymphozyten als Antigen präsentiert. Dadurch wird die spezifische Immunantwort ausgelöst (Kapellos et al., 2019).

1.2.2 Dendritische Zellen

Die Hauptaufgabe der dendritischen Zellen besteht darin, Antigene zu verarbeiten und sie den T-Zellen zu präsentieren. Sie interagieren auch mit B-Zellen. Sie haben somit vor allem die Funktion eines Vermittlers zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Dendritische Zellen finden sich vor allem in Geweben, insbesondere in Organen, die mit der Außenwelt in Kontakt stehen, wie Haut, Lunge und Darm (Poltorak and Schraml, 2015).

1.2.3 Makrophagen

Lange Zeit wurde angenommen, dass Makrophagen ausschließlich aus zirkulierenden Monozyten entstehen. Funktionelle und morphologische Untersuchungen haben diese Hypothese widerlegt. Studien haben gezeigt, dass der größte Anteil reifer Gewebemakrophagen während der Embryonalentwicklung aus dem Dottersack stammt. Diese Makrophagen werden bereits vor der Geburt ausgeschwemmt und besitzen die Fähigkeit zur Selbstregeneration, so dass sie unabhängig von den Monozyten überleben können (Davies et al., 2013, Eelman et al., 2014). Darüber hinaus hat jedes Organ seine eigene einzigartige Zusammensetzung aus embryonalen und reifen Makrophagen. Die Tatsache, dass eine Reihe von gewebeeigenen Makrophagen auch bei Patienten mit Monozytopenie weitgehend unbeeinflusst bleiben, ist ein weiterer Beleg für diese Annahme (Hashimoto et al., 2013). Monozyten und ihre Vorstufen haben sich als ein äußerst plastisches und dynamisches zelluläres Netzwerk erwiesen, das in der Lage ist, das gewebespezifische mononukleär-phagozytäre System (MPS) bei Bedarf umzurüsten. Sie agieren unter anderem als

kurzlebige Effektorzellen im Gewebe und tragen so zu verschiedenen Prozessen wie der Angiogenese und Arteriogenese bei. Es konnte gezeigt werden, dass embryonale Makrophagen am Gewebeumbau beteiligt sind, während adulte Makrophagen primär an der Wirtsabwehr beteiligt sind. Ferner konnten Kollegen bereits beschreiben, dass die Koexistenz von embryonalen und adulten Makrophagen in vielen verschiedenen Organen möglich ist (Davies et al., 2013, Divangahi et al., 2015, Galli et al., 2011, Guilliams et al., 2014, Sheng et al., 2015, Stefater et al., 2011, Varol et al., 2015). Neben der unspezifischen Abwehr, wie z.B. Phagozytose, sind sie in der Lage, durch Rekrutierung von Lymphozyten spezifische Abwehrmechanismen einzuleiten. So fungieren sie unter anderem als antigenpräsentierende Zellen für T-Lymphozyten. Die Rolle der Makrophagen bei kardiovaskulären Erkrankungen (CVD) ist noch Gegenstand aktueller Forschung und erfährt im Zusammenhang mit COVID-19 besondere Aufmerksamkeit.

1.3 Zytokine

Die zelluläre Signalübertragung ist die Fähigkeit der Zelle, Signale zu empfangen, zu verarbeiten und weiterzuleiten. Die Art der Signale kann vielfältig sein, z.B. physikalischer (Druck, Temperatur, Licht und Spannung) oder chemischer Natur (Proteine und Gase). Rezeptoren nehmen die Signale auf und leiten sie an die entsprechenden Ziele weiter, damit sie dort verarbeitet werden können. Bei der chemischen Zellsignalübertragung kann der Abstand zwischen den beiden kommunizierenden Zellen/Zellverbänden groß oder klein sein, so dass sich daraus verschiedene Wirkungsweisen ableiten lassen: juxtakrin, autokrin, parakrin, intrakrin oder endokrin. Eine besondere Rolle in der zellulären Kommunikation spielen die Zytokine, die von verschiedenen Zellen produziert werden. Der Begriff Zytokin ist ein Sammelbegriff. Je nachdem, welche Zellpopulation diese Signalproteine bildet und welche Aufgabe diese Zytokine erfüllen, werden sie unterschiedlich benannt, z.B.: Monokine (von Monozyten gebildete Zytokine), Chemokine (Zytokine mit chemotaktischer Wirkung), Lymphokine (von Lymphozyten gebildete Zytokine) und Interleukine (von Leukozyten gebildete Zytokine, die auf andere Leukozyten wirken) (Corwin, 2000a, Corwin, 2000b). Sie können die Zellmembranen nicht durchdringen, daher haben sie ihre Zielrezeptoren auf der Zelloberfläche oder liegen extrazellulär gelöst vor (Fernandez-Botran, 1991, Gillis, 1991, Spektrum, 2023). Zytokine werden

von einer Vielzahl von Zellen produziert und wirken pleiotrop. Dieser Effekt kann durch das Vorhandensein mehrerer Rezeptoren für ein Zytokin erklärt werden, so dass je nachdem, auf welcher Zellpopulation diese Rezeptoren vorhanden sind, auch unterschiedliche Signalwege aktiviert werden können. Die redundante Wirkung kann durch ihre Ansteuerung auf denselben spezifischen Rezeptor erklärt werden (Ozaki and Leonard, 2002). Darüber hinaus wurden synergistische und antagonistische Effekte von Zytokinen beschrieben (Bartee and McFadden, 2013, Larrick and Wright, 1992, Opal and DePalo, 2000, Standiford, 2000). Zytokine steuern das Gleichgewicht zwischen zellulärer und humoraler Immunantwort und wirken regulierend auf Reifung, Wachstum und Reaktionsfähigkeit bestimmter Zellen. Insbesondere bei Entzündungsreaktionen des Immunsystems infektiösen oder nicht-infektiösen Ursprungs erfüllen sie wichtige Funktionen (Corwin, 2000b).

1.3.1 Makrophagenmigrations-Inhibitionsfaktor

Obwohl der Name das Gegenteil impliziert, leistet Makrophagenmigrations-Inhibitionsfaktor (MIF) einen großen Beitrag in der Aktivierung des Immunsystems und Regulierung der Immunreaktion. Historisch gesehen erhielt MIF den Namen, weil man durch In-vivo-Versuche festgestellt hat, dass genau diese Substanz eine Inhibierung der Bewegung der Makrophagen induziert (Bloom and Bennett, 1966, Rich and Lewis, 1932). Damals wusste man sehr wenig über die Morphologie und die Physiologie dieser Substanz. Dekaden später, 1989, gelang die Klonierung des menschlichen MIF. Dieses Ereignis erleichterte die Spezifikation der biologischen Eigenschaften von MIF (Weiser et al., 1991).

MIF, ein pleiotropes Protein, ist ein Zytokin und wird konstitutiv sezerniert. Neben den T-Zellen, von denen man als erstes annahm, dass sie die hauptsächlichen Produzenten sind, wurden in den letzten Jahrzehnten viele andere Zellen anderer Funktionen beschrieben. So sind z.B. Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, Hirnzellen und Nierenzellen nur ein kleiner Ausschnitt aus einer langen Liste der MIF-produzierenden Zellen (Bernhagen et al., 1993, Calandra et al., 1998, He et al., 2006, Pellowe et al., 2019). Vor allem ist MIF in Geweben vorzufinden, die in enger Nachbarschaft mit der Außenwelt stehen, so z.B. in der Lunge oder Magendarmtrakt. Nach anfänglichen Untersuchungen des MIF als Mediator bei Immunreaktionen, die

durch bakterielle Infektionen hervorgerufen wurden (Calandra et al., 1998, Roger et al., 2001), wissen wir heute, dass MIF bei vielen anderen Immunreaktionen - auch anderer Genese - eine wichtige Rolle spielt (Bezdek et al., 2018, Bozza et al., 2004, Chen et al., 2016, Marin et al., 2017). Dieses proinflammatorische Zytokin ist an der Regulation der Immunantwort beteiligt und hat verschiedene Funktionen, wie die Aktivierung von Immunzellen, die Induktion der Freisetzung anderer proinflammatorischer Zytokine und die Verstärkung der Rekrutierung von Immunzellen an Entzündungsherden. MIF spielt auch eine Rolle bei der Regulation der Stressantwort und ist mit Zellproliferation und Apoptose assoziiert. In enger Beziehung zu Monozyten, fördert MIF bei der Entzündungsreaktion ihre Rekrutierung ins entzündete Gewebe. Ferner wirkt dieses Zytokin als Chemoattraktor. Einmal in das entzündete Gewebe eingedrungen, kann MIF die Monozyten dazu anregen, sich in aktivierte Makrophagen weiterzuentwickeln, die ihrerseits zur Immunantwort beitragen, indem sie Krankheitserreger aufnehmen und beseitigen und zusätzliche Entzündungsmediatoren produzieren (Yaddanapudi and Mitchell, 2017, Roger et al., 2016). Die Beziehung zwischen MIF und Monozyten ist ein Schlüsselaspekt der Immunantwort und der Entzündung, da sie dazu beiträgt, die Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten zu regulieren, die für die körpereigene Abwehr von Infektionen und Gewebeschäden benötigt werden. Deswegen lässt sich daraus schließen, dass MIF-gerichtete Therapieansätze in Zukunft neue Behandlungsmöglichkeiten bei vielerlei Krankheiten bieten könnten.

1.3.2 Chemokine

Chemokine erfüllen als Untergruppe der Zytokine vielfältige Aufgaben. Neben der Aktivierung sowie der Differenzierung von Immunzellen oder der Organ- und Angiogenese (Lira and Furtado, 2012) ist eine der Hauptaufgaben die Zellmigration (Chemotaxis) von Immunzellen aus der Blutbahn in das Gewebe und umgekehrt. Mit Hilfe von Chemokinen kann die Zellmigration entlang eines Konzentrationsgradienten erfolgen, d. h. vom Ort niedriger zu dem Ort hoher Chemokinkonzentration (Farnsworth et al., 2019, Hughes and Nibbs, 2018, Johnston and Butcher, 2002). Chemokine werden nach ihrer Aminosäurezusammensetzung, d. h. nach der Position

der aufeinanderfolgenden konservierten Cysteinreste, in vier Gruppen eingeteilt (Miller and Mayo, 2017):

- CC-Gruppe
- CXC-Gruppe
- CX3C-Gruppe
- XC-Gruppe

Die Gruppen CC und CXC bilden die größten Fraktionen. Die Namen der Chemokine leiten sich von ihren Gruppen ab, so wird z.B. das Chemokin 19 der CC-Gruppe als „CCL19“ bezeichnet. Das „L“ steht dabei für Ligand (Zlotnik and Yoshie, 2000). Neben dieser Einteilung können Chemokine auch nach ihrer Funktion eingeteilt werden. Diese Art der Gruppierung kann auch innerhalb der gleichen strukturbasierten Unterteilung nachvollziehbar sein. So ist beispielsweise eine Einteilung in inflammatorische, homöostatische, Angiogenese-fördernde und angiostatische Chemokine möglich. Inflammatorische Chemokine werden gebildet, wenn entzündetes Gewebe andere Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF) freisetzt. Infolgedessen fördern inflammatorische Chemokine die Rekrutierung von Leukozyten. Die Gruppe der homöostatischen Chemokine wird konstitutiv exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Einwanderung von Lymphozyten in lymphatische Organe und deren Entwicklung (Moser and Willimann, 2004, Raman et al., 2011). Bisher wurden 50 Chemokine und 20 Chemokinrezeptoren beschrieben (Allen et al., 2007). Diese Vielfalt ermöglicht ein hohes Maß an Spezifität. Die Chemokinrezeptoren auf der Zelloberfläche bestimmen, in welches Gewebe diese Zellen einwandern. So wandern Zellen, die den Oberflächenrezeptor CCR7 exprimieren, dessen Liganden die Chemokine CCL19 und CCL21 sind, bevorzugt in Lymphknoten ein (Höpken et al., 2004).

1.3.2.1 CXCL12

Bei CXCL12, auch bekannt als Stromal Cell-Derived Factor 1 (SDF-1), handelt es sich um ein kleines Protein aus der Familie der Chemokine, das bei einer Reihe von biologischen Prozessen eine entscheidende Rolle spielt. Es fungiert als Chemoattraktor und lockt spezifische Immunzellen an Entzündungsherde und Orte der Gewebereparatur. CXCL12 ist auch an Zellmigrationsprozessen beteiligt,

insbesondere an der Rekrutierung hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark. CXCL12 wirkt durch Bindung an spezielle zelluläre Rezeptoren wie CXCR4 und CXCR7. Neben seiner Rolle im Immunsystem steht CXCL12 auch im Zusammenhang mit dem Fortschreiten von Krebserkrankungen und der Bildung von Metastasen (Vicari and Caux, 2002, Shi et al., 2020). Die Funktion von CXCL12 gegenüber Monozyten besteht darin, diese Zellen anzuziehen und zu kontrollieren. CXCL12 wirkt als Chemoattraktor für Monozyten. Bei Entzündungen oder Verletzungen wird CXCL12 von verschiedenen Zellen wie Stromazellen oder Endothelzellen produziert und freigesetzt. Monozyten folgen der Konzentration dieses Chemoattraktors und wandern in das betroffene Gewebe, sobald CXCL12 in die Umgebung abgegeben wird (Schiraldi et al., 2012). Dort spielen sie eine wichtige Rolle bei der Immunantwort, der Gewebereparatur und der Bekämpfung von Infektionen. CXCL12 ist auch für die Homöostase der Monozyten im Knochenmark von Bedeutung. Es reguliert die Produktion, Reifung und Freisetzung von Monozyten aus dem Knochenmark ins periphere Blut, wo sie in verschiedenen Geweben Funktionen ausüben (Zlotnik and Yoshie, 2000). In Studien wurde unter anderem gezeigt, dass CXCL12 eine wichtige Rolle bei der Reaktion auf einen Herzinfarkt spielt und an den Reparaturmechanismen des Herzmuskels beteiligt ist. Um den geschädigten Bereich des Herzmuskels zu reparieren, wird CXCL12 nach einem Herzinfarkt vermehrt freigesetzt. Es lockt verschiedene Zelltypen, darunter Stammzellen (Ghadge et al., 2011) und Monozyten, in das geschädigte Gewebe. Dort fördert es die Regeneration und Reparatur (Chen and Frangogiannis, 2021). CXCL12 ist auch an der Angiogenese beteiligt (Zhang et al., 2017). Es lockt Endothelzellen und andere angiogene Zellen an. Obwohl CXCL12 eine positive Rolle bei der Herzmuskelregeneration nach Herzinfarkt zu spielen scheint, sind die Mechanismen und Interaktionen komplex und nicht vollständig verstanden, sodass auch kontroverse Ergebnisse diesbezüglich gibt. Große genomweite Assoziationsstudien zeigten, dass Polymorphismen in der Nähe des CXCL12-Gens mit Myokardinfarkten assoziiert sind (Samani et al., 2007, Schunkert et al., 2011). Diese Allele korrelierten mit erhöhten CXCL12-Plasmaspiegeln, was wiederum als ein Hinweis auf eine schädliche Funktion des Chemokins bei Atherosklerose gedeutet werden kann. Ziel der Forschung auf diesem Gebiet ist ein besseres Verständnis von CXCL12 und seiner Rolle bei der Regeneration des Herzmuskels und damit die Entwicklung möglicher therapeutischer Ansätze für eine effektivere Behandlung des Herzinfarkts. Zusammengefasst dient CXCL12 als

"Leitsignal" für Monozyten, um sie zu entzündetem oder verletztem Gewebe zu führen und ihre Immunantwort und Gewebereparaturfunktionen auszuführen. Durch die Beeinflussung der Wanderung und der Funktion von Monozyten spielt CXCL12 eine wichtige Rolle bei der Immunantwort und den Entzündungsreaktionen des Körpers.

1.4 Zytokin-Rezeptoren

Zytokinrezeptoren sind in den letzten Jahren in den Fokus der Forschung gerückt, da neue Erkenntnisse in der Immunologie und die daraus resultierenden Möglichkeiten der Immunmodulation durch sogenannte „Biologicals“ neue Therapieoptionen eröffnen (Propper and Balkwill, 2022). Zytokinrezeptoren sind Glykoproteine, die sowohl membranständig als auch gelöst vorliegen können. Nach Bindung des Liganden (Zytokin) wird intrazellulär eine Signalkaskade in Gang gesetzt, deren Produkte zahlreiche und wichtige biologische Funktionen regulieren. Die Einteilung dieser Rezeptoren basiert auf ihrer extrazellulären dreidimensionalen Ligandenbindungsstelle und den gemeinsamen intrazellulären Signalmechanismen, die sich aus der Bindung ergeben (Druszczyńska et al., 2022, Gaffen, 2009). Daraus lassen sich die folgenden Klassen ableiten:

- Typ-I-Zytokin-Rezeptoren
- Typ-II-Zytokin-Rezeptoren
- Chemokin-Rezeptoren
- TNF-Rezeptor-Superfamilie
- TGF-beta-Rezeptoren
- Immunglobulin (Ig)-Superfamilie
- IL-17-Rezeptor-Superfamilie

1.4.1 Chemokinrezeptoren

Chemokinrezeptoren sind Rezeptoren, die mit Chemokinen interagieren. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung von Lymphozyten und Stromazellen zum Krankheitsherd und sorgen dafür, dass eine angemessene Reaktion auf die Bedrohung ausgelöst wird. Bisher sind 20 Chemokinrezeptoren beschrieben worden.

Man unterscheidet zwei Gruppen: konventionelle (cCKRs) und atypische Chemokinrezeptoren (ACKRs) (Hughes and Nibbs, 2018). Die cCKRs sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs). Wie der Name schon sagt, lösen diese Proteine über G-Proteine eine zelluläre Signalkaskade aus. Die ACKRs hingegen wirken über den Beta-Arrestin-Signalweg. Traditionell wird die erste Gruppe eher mit Entzündungen in Verbindung gebracht, während der zweiten Gruppe eher regulatorische Funktionen zugeschrieben werden (Kraus et al., 2021). Besonders gut untersucht sind die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Sie bestehen aus sieben transmembranen Proteinen. Die Benennung dieser Rezeptoren orientiert sich an der entsprechenden Struktur der Liganden, siehe oben (Bachelerie et al., 2014). Besondere Popularität erlangten Chemokinrezeptoren durch die Erforschung des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV), nachdem beobachtet wurde, dass HIV den CCR5-Rezeptor der T-Zellen als Andockstelle nutzt (Chen, 2019).

1.4.1.1 CCR2

Chemokine receptor type (CCR2) ist ein Protein, das als Chemokinrezeptor im menschlichen Körper wirkt. CCR2 ist insbesondere bei der Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten von Bedeutung. Bestimmte Chemokine, die an CCR2 auf der Oberfläche der Monozyten binden, werden freigesetzt, wenn Gewebe entzündet oder geschädigt wird (Ghadge et al., 2011). Durch diese Bindung wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die dazu führt, dass die Monozyten aus der Blutbahn in das entzündete Gewebe einwandern, um dort ihre Immunfunktionen wie Phagozytose und Produktion von Entzündungsmediatoren auszuüben. CCR2 und die damit verbundenen Signalwege wurden eingehend im Zusammenhang mit entzündlichen Erkrankungen wie Atherosklerose, Arthritis und Multipler Sklerose untersucht, bei denen Monozyten eine entscheidende Rolle für das Fortschreiten der Erkrankung spielen (Zhang et al., 2022, Raghu et al., 2017, Mahad and Ransohoff, 2003). Obwohl CCR2 in erster Linie für seine Rolle bei der Rekrutierung von Monozyten bekannt ist, kommt es auch auf anderen Zelltypen im Körper vor. Dazu gehören dendritische Zellen, T-Zellen, Mastzellen und sogar Astrozyten im Gehirn. Die Wirkung von CCR2 auf diese Zellen kann je nach der Situation und dem Kontext unterschiedlich sein. Wie CCR2 mit den verschiedenen Zelltypen interagiert und

welche entzündlichen Reaktionen daraus resultieren, ist ein wichtiges Forschungsgebiet.

1.4.1.2 ACKR3

Atypical chemokine receptor 3 (ACKR3) ist ein atypischer Chemokinrezeptor, der bei der Bindung an Chemokine keine „typischen“ zellulären Signalreaktionen, d.h. ohne Beteiligung von G-Proteinen, auslöst (Rajagopal et al., 2010). Stattdessen wirkt er als Scavenger-Rezeptor, der Chemokine wie CXCL11 und CXCL12 internalisiert und eliminiert. Dadurch werden chemotaktische Signale reguliert und eine übermäßige Rekrutierung von Immunzellen und Entzündungen verhindert (Naumann et al., 2010). Auf diese Weise kontrolliert ACKR3 Chemokin-Gradienten und die Bewegung anderer Chemokin-Rezeptor exprimierender Zellen. Was seine Beziehung zu Monozyten betrifft, so wird ACKR3 von diesen Immunzellen exprimiert. Wenn Monozyten in Gegenwart von ACKR3 auf CXCL12 treffen, kann die ACKR3-vermittelte Internalisierung des Chemokins die Bewegung und den Aufenthaltsort der Monozyten in bestimmten Geweben beeinflussen. Dies hat Auswirkungen auf die Bewegung und Positionierung der Monozyten und ihre Beteiligung an Immunreaktionen und Gewebereparaturprozessen (Nibbs and Graham, 2013). ACKR3 kommt auf verschiedenen Zelltypen im Körper vor, darunter Endothelzellen, Neuronen, Gliazellen, Herzgewebe und Krebszellen. Die Expression von ACKR3 ist nicht konstitutiv. Die Expression von ACKR3 wird reguliert und kann in verschiedenen Zellen und Geweben unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Die Expression wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst, wie z.B. inflammatorische Signale oder spezifische Entwicklungsstadien (García-Cuesta et al., 2019). Die Wechselwirkung zwischen ACKR3 und anderen Chemokinrezeptoren, auch auf Monozyten, ist komplex und trägt zur dynamischen Natur der Immunantwort bei. Das Verständnis der Rolle von ACKR3 könnte Auswirkungen auf therapeutische Interventionen bei entzündlichen und immunologischen Erkrankungen haben.

1.5 Adhäsionsmoleküle

Die Fähigkeit einer Zelle, sich mit anderen Zellen, aber auch mit der extrazellulären Matrix zu verbinden, wird als Zelladhäsion bezeichnet. Diese Aufgabe wird von Zelladhäsionsmolekülen (CAMs) übernommen. Neben ihrer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der mechanischen Eigenschaften der Zelle spielen sie auch Schlüsselrollen bei der zellulären Signalübertragung, Migration, Wachstum und Differenzierung (Ren et al., 2011). CAMs sind Transmembranproteine mit drei konservierten Domänen. Während die intrazelluläre Domäne mit dem Zytoskelett in Verbindung steht, kann die extrazelluläre Domäne mit den gleichen CAMs anderer Zellen (homophil) oder mit unterschiedlichen CAMs anderer Zellen (heterophil) in Verbindung treten. Aufgrund ihrer unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften werden sie in vier Gruppen unterteilt (Harjunpää et al., 2019):

- Selektine (Kalziumabhängig)
- Integrine (Kalziumunabhängig)
- Cadherine (Kalziumabhängig)
- CAMs der Ig-Superfamilie (Kalziumunabhängig)

Darüber hinaus können die vier oben genannten Gruppen in zwei weitere Gruppen unterteilt werden, nämlich in kalziumabhängige und kalziumunabhängige CAMs.

1.5.1 CD11a

Cluster of Differentiation 11a (CD11a) ist ein Zelloberflächenprotein, das zur Integrin-Familie gehört und an der Zelladhäsion und Signalkommunikation beteiligt ist. In Kombination mit Integrin Beta 2 (CD18) bildet es das funktionelle Integrin Lymphocyte Function-Associated Antigen-1 (LFA-1) (Ghislin et al., 2012). LFA-1 ist vor allem auf Leukozyten wie T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen vorhanden und spielt eine zentrale Rolle bei Zellinteraktionen, insbesondere in der Immunantwort. LFA-1 bindet an seine Liganden, darunter Intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und Intrazelluläres Adhäsionsmolekül-2 (ICAM-2) auf der Oberfläche von Endothelzellen und antigenpräsentierenden Zellen. LFA-1 ermöglicht Leukozyten, sich fest an Endothelzellen zu heften und in entzündetes Gewebe einzutreten, wo sie ihre immunologischen Aufgaben, wie Antigenerkennung, Zytokinproduktion und

Aktivierung anderer Immunzellen, ausführen können (Gérard et al., 2021). Monozyten tragen ebenfalls LFA-1 auf ihrer Oberfläche, was ihre Wechselwirkung mit ICAMs auf Endothelzellen erleichtert. Dies ist entscheidend für ihre Bewegung aus der Blutbahn in das Gewebe bei Entzündungen.

1.5.2 CD11b

Cluster of Differentiation 11b (CD11b), auch bekannt als Integrin alpha M (ITGAM), ist ein Zelloberflächenprotein, das zur Familie der Integrine gehört und zusammen mit Integrin beta 2 (CD18) ein Heterodimer bildet, aus dem das funktionale Integrin Makrophagen-1 Antigen (Mac-1) bzw. der Komplementrezeptor 3 (CR3) entsteht. CD11b ist hauptsächlich auf myeloischen Zellen wie Monozyten, Neutrophilen und Makrophagen lokalisiert (Petty and Todd, 1993, Khan et al., 2018). CD11b spielt eine entscheidende Rolle, um Zelladhäsion, Migration und Phagozytose während der Immunantwort zu vermitteln. CD11b wird auf der Oberfläche von Monozyten stark exprimiert. Es ermöglicht den Monozyten die Anheftung an die Endothelzellen und erleichtert ihre Wanderung aus der Blutbahn in entzündetes Gewebe als Reaktion auf Entzündungssignale (Weber et al., 1995). Im Gewebe angekommen, hilft CD11b den Monozyten, mit Krankheitserregern und Zelltrümmern zu interagieren, fördert ihre phagozytische Aktivität und trägt zum Abklingen der Entzündung bei (Arnaout, 1990, Springer, 1990, Ehrchiou et al., 2007).

1.6 Thrombozyten/Leukozyten-Aggregate

Neben ihrer herausragenden Rolle in der Hämostase spielen Thrombozyten eine wichtige Rolle in der Regulation der Entzündungsreaktion sowie der angeborenen und adaptiven Immunantwort (Ali et al., 2015). Als Voraussetzung für die direkte Interaktion mit verschiedenen Leukozyten sind sie unverzichtbar. Die Aktivierung von Thrombozyten, z.B. durch Trauma oder Entzündung selbst, führt zur Expression von Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Die Bildung dieser Rezeptoren ermöglicht nun die direkte Kommunikation mit dem Gefäßendothel, den Thrombozyten und Leukozyten als wichtiger Bestandteil der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr (Lam et al., 2015). Die Mediatoren, die diese Bindungen ermöglichen, können gelöst sein oder

als CAMs wie P-Selectin und P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 (PSGL-1) auf der Zelloberfläche vorliegen. Erhöhte Konzentrationen von PLA sowohl im Blutkreislauf als auch am Ort der Entzündung sind ein Marker für thromboinflammatorische Prozesse, die auf kardiovaskuläre Erkrankungen, akutes Lungen- und Nierenversagen sowie zerebrovaskuläre Erkrankungen hinweisen können (Finsterbusch et al., 2018).

1.7 Kardiovaskuläre Erkrankungen und kardiovaskuläre Risikofaktoren

Die obigen Abschnitte sollten ein grundlegendes Verständnis der Physiologie der Monozyten, der Zytokine und der damit verbundenen Prozesse vermitteln. Ein weiterer Schwerpunkt unserer Arbeit war neben dem Immunsystem und der Hyperinflammation die Frage, ob sich eine Entzündungsreaktion bei Menschen mit kardiovaskulären Erkrankungen (CVD) und/oder kardiovaskulären Risikofaktoren (CVRF) anders manifestiert. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass der klinische Verlauf von COVID-19 stark von bestimmten prädisponierenden Faktoren oder Pathologien abhängt, insbesondere von CVRF und CVD (Harrison et al., 2021). Das Vorliegen dieser Risikofaktoren bzw. klinischen Entitäten war mit einem schlechteren Outcome der Patienten assoziiert. In Anlehnung an die wichtigste epidemiologische Studie in den USA - die Framingham Heart Study - haben wir die kardiovaskulären Risikofaktoren (CVRF) für unsere Arbeit wie folgt definiert (Mahmood et al., 2014):

- Arterielle Hypertonie (AHT)
- Diabetes mellitus (DM)
- Dyslipidämie
- Nikotinkonsum
- Adipositas

1.7.1 Arterielle Hypertonie

Die AHT ist eine Volkskrankheit und betrifft in Deutschland bis zu 30 % der Bevölkerung, wobei die Prävalenz mit zunehmendem Alter auf bis zu 60 % bei den über 65-Jährigen ansteigt. (Neuhauser et al., 2017).

Man unterscheidet die primäre (essentielle) und die sekundäre arterielle Hypertonie, wobei die primäre Hypertonie mit ca. 90-95% häufiger auftritt (Chiong et al., 2008). Die arterielle Hypertonie ist häufig mit anderen kardiovaskulären Risikofaktoren wie DM und Dyslipidämie assoziiert, was das kardiovaskuläre Gesamtrisiko zusätzlich erhöht (Magnussen et al., 2023). AHT führt zu einer erhöhten mechanischen Belastung der Gefäßwände mit konsekutiven Mikroverletzungen und Entzündungsreaktionen (Zheng et al., 2022). Dies führt zu Plaquebildung, endothelialer Dysfunktion und Gefäßverengung, was wiederum CVD wie Herzinfarkt, Schlaganfall und periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) begünstigt (Andersson et al., 2021). In Analogie zu den europäischen Leitlinien zur arteriellen Hypertonie galt in unserer Studie die Diagnose einer arteriellen Hypertonie als gesichert, wenn der Blutdruck bei mindestens zwei verschiedenen Messungen an zwei verschiedenen Tagen $\geq 140/90$ mmHg betrug oder in einer 24-Stunden-Langzeitblutdruckmessung der 24-Stunden-Mittelwert $\geq 130/80$ mmHg oder der Tagesmittelwert $\geq 135/85$ mmHg betrug (McEvoy et al., 2024). In die Studie wurden vor allem Patienten mit vorbeschriebener und behandelter arterieller Hypertonie eingeschlossen. Die Langzeit-Blutdruckmessung musste bei unseren stationären Patienten zur Diagnosestellung nicht eingesetzt.

1.7.2 Diabetes mellitus

DM ist eine Stoffwechselerkrankung mit einer Prävalenz von 10,2 % in der erwachsenen Bevölkerung (Scheufele R, 2025). Die WHO und die American Diabetes Association (ADA) unterscheiden 4 Hauptgruppen dieser Erkrankung, wobei DM Typ 2 die häufigste Form ist. Bei DM Typ 1 liegt ein absoluter Insulinmangel vor, der durch eine autoimmune Schädigung der β -Zellen der Bauchspeicheldrüse verursacht wird (ADA, 2022, Committee, 2022, Association and Committee, 2022, 2022a). Latent Autoimmune Diabetes in Adult (LADA), bei dem die Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen später (meist im Erwachsenenalter) einsetzt, ist nicht als ein eigener Subtyp definiert. Beim Typ-2-Diabetes liegt dagegen eine Insulinresistenz der peripheren Zellen vor. Ursachen sind neben genetischen Faktoren vor allem der Lebensstil. DM Typ 3 umfasst weitere selteneren Formen wie den Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY) oder den pankreopriven Diabetes mellitus. Typ 4 wird als Schwangerschaftsdiabetes bezeichnet (Harreiter and Roden, 2023).

Chronisch erhöhte Serumglukosespiegel führen zu einer übermäßigen Glykierung von Strukturproteinen der Endothelzellen, was zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führt, die wiederum für oxidativen Stress und damit für Entzündungen verantwortlich sind, die zu endothelialer Dysfunktion und Arteriosklerose führen (An et al., 2023, Oguntibeju, 2019, Giacco and Brownlee, 2010). DM erhöht daher wie AHT das kardiovaskuläre Gesamtrisiko und ist mit CVD assoziiert. Bei unseren Patienten haben wir vor allem das HbA1c als Screeningmethode der Wahl eingesetzt. Dabei wurde ein HbA1c-Wert von $\geq 6,5$ % als Einschlusskriterium definiert. Aufgrund der schlechteren Durchführbarkeit des OGTT bei schwerem COVID-19 wurde dieser nicht als Screeningmethode eingesetzt.

1.7.3 Dyslipidämie

Dyslipidämie ist eine Stoffwechselerkrankung, die mit einem gestörten Gleichgewicht der Lipide einhergeht. Die Prävalenz in der erwachsenen Bevölkerung beträgt 65,7% bei Frauen und 64,5% bei Männern (Scheidt-Nave et al., 2013). Je nach Ursache unterscheidet man primäre und sekundäre Dyslipidämien. Die primäre Form ist nicht nur erblich bedingt, sondern es spielen auch andere Faktoren wie Ernährung oder Übergewicht eine Rolle. Die sekundäre Form ist nicht genetisch bedingt, hier sind vor allem andere Erkrankungen wie DM Typ 2, Adipositas oder Lebererkrankungen von Bedeutung (Yanai and Yoshida, 2021, Berberich and Hegele, 2022). Neben dieser Unterteilung gibt es verschiedene Ansätze, die Erkrankung zu klassifizieren. Dies kann nach dem betroffenen Lipid (z.B. erhöhtes Cholesterin, erhöhte Triglyceride oder erhöhte Triglyceride und erhöhtes Cholesterin) oder nach dem betroffenen Lipoprotein (z.B. niedriges High Density Lipoprotein (HDL), hohes Low Density Lipoprotein (LDL) oder Lipoprotein (a) (Lp(a)) erfolgen (Berberich and Hegele, 2022). Dyslipidämie ist mit einem erhöhten kardiovaskulären Gesamtrisiko assoziiert, da sie unter anderem die Arteriosklerose fördert, deren Pathophysiologie wiederum gut untersucht ist (Ross, 1993). Sie ist häufig mit anderen kardiovaskulären Risikofaktoren wie AHT oder Adipositas assoziiert. (Arvanitis and Lowenstein, 2023, Ballard-Hernandez and Sall, 2023). In Übereinstimmung mit der europäischen Leitlinie zur Dyslipidämie haben wir für unsere Studienpopulation eine Dyslipidämie nach folgenden Kriterien definiert (Mach et al., 2020): Gesamtcholesterin ≥ 200 mg/dl, LDL-Cholesterin je nach

kardiovaskulärem Risiko ≥ 55 mg/dl bzw. 160 mg/dl, HDL-Cholesterin < 40 mg/dl und Lp(a) > 50 mg/dl.

1.7.4 Nikotinkonsum

Ein weiterer wichtiger kardiovaskulärer Risikofaktor ist das Rauchen. Der Anteil der Raucher an der erwachsenen Bevölkerung liegt in Deutschland bei ca. 30 % (Kastaun et al., 2017). Neben der kanzerogenen Wirkung fördert der Tabakkonsum die Arteriosklerose und erhöht damit das kardiovaskuläre Gesamtrisiko (Ding et al., 2019, Scherübl, 2021, Caliri et al., 2021) . Die Wirkung von Nikotin auf die Gefäße ist vielfältig. Neben der Vasokonstriktion fördert Nikotin die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und unterstützt damit die Arteriosklerose (Ishida et al., 2024). In unserer Studie wurden Informationen über den Raucherstatus anamnestisch und fremdanamnestisch erhoben, wobei Personen, die zum Zeitpunkt der Krankenhausaufnahme noch Tabak konsumierten, als Raucher erfasst wurden. Nicht berücksichtigt wurde in dieser Studie die kumulierte Zeit und ob die Patienten in der Vergangenheit rauchten.

1.7.5 Adipositas

Adipositas ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, die durch einen erhöhten Körperfettanteil infolge eines chronischen Energieüberschusses mit gestörter Homöostase des Hunger-Sättigungs-Zentrums und hormoneller Dysregulation gekennzeichnet ist (Kullmann et al., 2020, Rebelos et al., 2021). In den letzten Jahrzehnten hat die Prävalenz in der Gesellschaft zugenommen (Schienkiewitz et al., 2022). Es gibt viele Ursachen für die Entwicklung dieser Krankheit, die in zwei große Kategorien eingeteilt werden können: exogene und endogene. Zu den wichtigsten exogenen Faktoren zählen Bewegungsmangel und Ernährungsgewohnheiten. Daneben gelten sozioökonomische und psychische Faktoren als begünstigend (Masood and Moorthy, 2023). Zu den endogenen Faktoren zählen die Genetik und hormonelle Störungen (Lin and Li, 2021). Außerdem spielt das Mikrobiom eine wichtige Rolle, da bestimmte Bakterienstämme die Energieaufnahme aus der Nahrung fördern (Bäckhed et al., 2004). Adipositas ist mit anderen CVRF wie AHT, Dyslipidämie

und Diabetes mellitus assoziiert und trägt ebenfalls zu einem erhöhten Risiko für CVD bei (Yusuf et al., 2004, Piché et al., 2020). Als diagnostische Hilfsmittel stehen der Body-Mass-Index (BMI), der Taillenumfang und das Taillen-Hüft-Verhältnis zur Verfügung. Bei unseren Patienten haben wir zur Diagnose der Adipositas den BMI nach WHO verwendet, wobei wir einen Wert von $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ als Adipositas definiert haben.

1.7.6 Kardiovaskuläre Erkrankungen

CVD sind Erkrankungen des Herzens und der Gefäße. Sie sind die häufigste Todesursache in Deutschland (Ensminger S, 2024, Kim et al., 2023). Zu dieser Krankheitsgruppe gehören :

- Koronare Herzkrankheit (KHK)
- Zerebrovaskuläre Erkrankungen
- Periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK)
- Rheumatische Herzerkrankungen
- Kongenitale Herzerkrankungen
- Tiefe Beinvenenthrombose (TBVT) und Lungenarterienembolie (LAE)

1.8 Zielsetzung der Arbeit

1.8.1 Kontext und wissenschaftliche Bedeutung

COVID-19 ist nicht nur eine akute Atemwegserkrankung, sondern wurde auch mit einer schweren systemischen Entzündungsreaktion und einem Zytokinsturm in Verbindung gebracht, die zu thrombotischen Komplikationen, Mikrozirkulationsstörungen und Organversagen führen können. Darüber hinaus kann eine Infektion mit SARS-CoV-2 langfristige Auswirkungen auf das Immunsystem haben, deren Mechanismen noch nicht vollständig verstanden sind. Speziell bei infizierten Patienten mit CVRF und/oder CVD wurde eine erhöhte Morbidität und Mortalität beobachtet, wobei die genauen immunologischen Mechanismen dieser Vulnerabilität noch besser verstanden werden müssen. Studien zeigen, dass COVID-19 über die akute Infektionsphase hinaus zu einer Aktivierung des Immunsystems

führt. Dies kann mit klinischen Symptomen einer Long-COVID, veränderter Immunregulation und einem potenziell erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Spätfolgen einhergehen. Als zentrale Effektorzellen des Immunsystems stehen die Monozyten im Mittelpunkt des Interesses, da diesen Zellen sowohl in der akuten Phase als auch in der Rekonvaleszenz eine Schlüsselrolle zugeschrieben wird. Dabei ist die Rolle des MIF noch unzureichend erforscht.

1.8.2 Wissenschaftliche Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, das inflammatorische Profil von Patienten mit schwerer SARS-CoV-2-Infektion unter Berücksichtigung CVRF und/oder CVD zu analysieren. Insbesondere soll die Dynamik der Immunantwort im zeitlichen Verlauf untersucht werden. Ein besonderer Fokus liegt hierbei auf der Charakterisierung von Monozyten-Subtypen, der Expression von MIF und weiteren Zytokinen sowie deren funktionellen Eigenschaften während der akuten SARS-CoV-2-Infektion und drei Monate nach der Rekonvaleszenz. Darüber hinaus sollen die zugrundeliegenden Mechanismen der SARS-CoV-2-induzierten Entzündungsreaktion besser verstanden werden. Durch den Vergleich mit gesunden Probanden sollen charakteristische Veränderungen identifiziert werden, die als potentielle Biomarker für den Krankheitsverlauf dienen können und möglicherweise prognostische Relevanz haben.

In diesem Zusammenhang möchten wir insbesondere auf die folgenden Fragen eingehen:

- Welche Veränderungen der Monozyten-Subtypen können während der akuten Phase der SARS-CoV-2-Infektion und in der Rekonvaleszenzphase beobachtet werden?
- Gibt es eine langfristige Verschiebung der Monozyten-Subtypen?
- Gibt es Hinweise auf eine chronische Aktivierung, die durch die Expression ihrer Zytokine (z.B. MIF) detektiert werden könnte?
- Kann MIF als Biomarker für eine persistierende Immunaktivierung und sogar für Spätfolgen von COVID-19 dienen?
- Welche anderen Zytokine sind während der akuten SARS-CoV-2-Infektion und in der Rekonvaleszenzphase erhöht?

- Was sind die Unterschiede zu gesunden Kontrollpersonen? Und vor allem: Sind die Veränderungen typisch für COVID-19 oder treten sie auch bei anderen postinfektiösen Zuständen auf?

1.8.3 Ansatz zur Umsetzung der spezifischen Ziele

Zu Beantwortung der Forschungsfragen, werden folgende methodische Ansätze verfolgt:

- Analyse der Monozyten-Subtypen
- Analyse der MIF-Expression und anderer Zytokine
- Apparative Diagnostik wie Echokardiographie und Röntgen-Thorax zur Erfassung der kardiopulmonalen Pathologien
- Routinelabor mit zusätzlicher Bestimmung der kardialen Biomarker
- Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen zur Überprüfung der Spezifität für COVID-19

2 Materialien und Methoden

2.1 Studiendesign, Studienpopulationen und Einschlusskriterien

In die vorliegende Studie wurden in der Abteilung für Kardiologie und Angiologie des Universitätsklinikums Tübingen zwischen Februar 2020 und September 2020 konsekutiv 23 Patienten mit vorbestehender CVD und/oder CVRF und einer akuten schweren SARS-CoV-2-Infektion eingeschlossen. Der Studieneinschluss erfolgte innerhalb von 12 Stunden nach Aufnahme in die Klinik. Einschlusskriterien waren eine positive PCR für SARS-CoV-2, ein Mindestalter von 18 Jahren und mindestens eine bestätigte CVD und/oder CVRF. Die CVD wurden definiert als Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems (s.o.), die durch modifizierbare (z.B. arterielle Hypertonie, Adipositas) und nicht modifizierbare (z.B. Alter, Genetik) Risikofaktoren begünstigt werden. Bei den CVRF haben wir uns im Wesentlichen auf die Modifizierbaren beschränkt. Die Identifikation der genannten Erkrankungen und ihrer Risikofaktoren erfolgte durch Anamnese, körperlicher Untersuchung und Labordiagnostik. Der Schweregrad von COVID-19 wurde anhand der WHO Clinical Progress Scale (WHO-CPS) definiert. Die respiratorische Insuffizienz musste durch COVID-19 erklärt werden, andere Infektionen mikrobiellen Ursprungs galten als Ausschlusskriterium. Zu zwei Zeitpunkten, d.h. zum Zeitpunkt der akuten Infektion und nach einer Rekonvaleszenz von drei Monaten - alle 23 Patienten wurden erneut in unsere Abteilung eingeladen - wurden die Patienten klinisch, apparativ (Echokardiographie und Elektrokardiographie) und laborchemisch untersucht. Im Labor wurden neben Routineparametern, die Expression monozytärer Oberflächenmarker und das Chemokinprofil bestimmt. N-terminales natriuretisches Peptid Typ B (NT-pro-BNP, >300 ng/L), hochsensitives Troponin I (hs TnI, >37 ng/L), Interleukin 6 (IL-6 <15 ng/L) und C-reaktives Protein (CRP, >0,5 mg/dL) wurden zur Beurteilung von Inflammation und Myokardbeteiligung verwendet. 40 gesunde Personen, die nicht mit SARS-CoV-2 infiziert waren, wurden als Kontrollgruppe eingeschlossen. Die gesunde Kontrollgruppe hatte ein Durchschnittsalter von 41 Jahren (IQR 28 - 53), wobei 41% der Personen männlichen Geschlechts waren. Ein Mindestalter von 18 Jahren und eine negative PCR für SARS-CoV-2 waren die Grundvoraussetzungen für die Aufnahme dieser 40 Personen in die Studie. Die gesunden Kontrollpersonen litten an keiner chronischen Erkrankung, hatten keine CVRF und nahmen keine tägliche Medikation ein. Von jedem Patienten wurde eine schriftliche Einverständniserklärung

eingeholt. Die Studie wurde von der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen und am Universitätsklinikum Tübingen (Aktenzeichen: 240/2018B02) genehmigt und entspricht der Deklaration von Helsinki und den Richtlinien der Guten Klinischen Praxis zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten über die Anwendung der Guten Klinischen Praxis bei der Durchführung von klinischen Prüfungen mit Humanarzneimitteln.

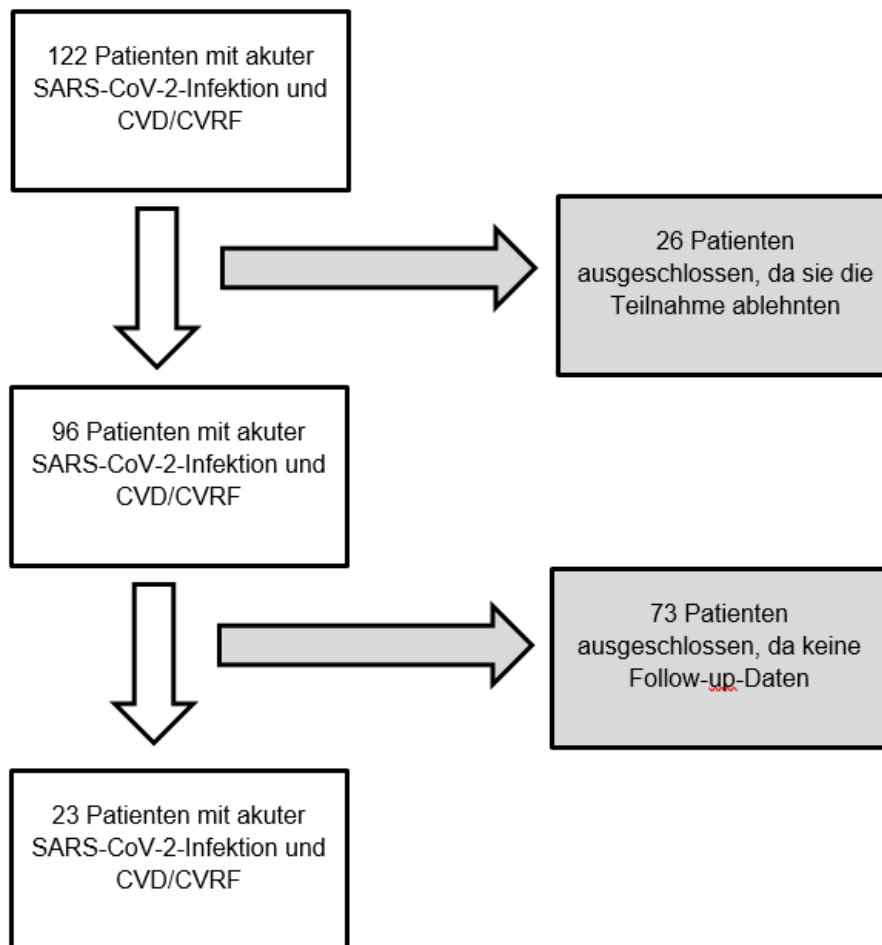


Abbildung 1. Studienablauf und Teilnehmer. Ursprünglich wurden insgesamt 122 Patienten mit CVD und/oder CVRF zur Teilnahme an dieser Studie rekrutiert. Davon lehnten 26 Patienten die Teilnahme ab. Im weiteren Verlauf der Studie gingen weitere 73 Patienten im Rahmen des Follow-up-Protokolls verloren. Die Studie wurde schließlich mit einer verbleibenden Kohorte von 23 Patienten fortgesetzt. Die Daten wurden zu zwei Zeitpunkten erhoben, nämlich während der akuten Phase der Infektion und erneut nach drei Monaten der Rekonvaleszenz.

2.2 Klinische Nachbeobachtung

Der klinische Endpunkt (EP) war definiert als eine anhaltende Veränderung der Immun- und Entzündungsreaktion, die sich sowohl klinisch als auch laborchemisch und -diagnostisch nach einer dreimonatigen Erholungsphase manifestierte. Die Patienten wurden nach Einschluss in die Studie drei Monate lang bis zum Erreichen des primären EP beobachtet.

2.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1. Liste der Geräte und Verbrauchsmaterialien.

CPDA-Monovetten, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
HEPES-Tyrode-Puffer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
96-Well-Platte, Falcon, Corning Inc., New York, USA
RBC-Lysepuffer, BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
PBS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
EDTA, VWR International GmbH, Pennsylvania, USA
FCS, BD Biosciences, New Jersey, USA
Natriumazid, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Humanes IgG, 0,01 mg/ml; Sigma Aldrich Co. St. Luis, Missouri, USA
Fluorochrom-konjugierten Antikörper CX3CR1 PE/Dazzle (Klon 2A9-1), BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Fluorochrom-konjugierten Antikörper CCR2 BV605 (Klon K036C2), BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Fluorochrom-konjugierten Antikörper CCR7 BV785 (Klon G043H7), BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
HLA-DR PerCP-Vio77 (Klon REA805), Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD3 BV510 (Klon OKT3), BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA

CD15 BV510 (Klon W603), BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
CD19 BV510 (Klon HLB19), BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
CD20 BV510 (Klon 2H7), BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
CD56 BV510 (Klon HCD56), BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
CD14 FITC (Klon M5E2), BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
CD16 BV711 (Klon 3G8), BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
CD62L PE-Cy7 (Klon DREG-56), BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
CD11b BV605 (Klon ICRF44), BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
CD11a BV650 (Klon HI1 11), BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Fluorochrom-konjugierte Antikörper CD41 PaBI (Klon HIP8), BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Fluorochrom-konjugierte Antikörper CD42b PerCP-Cy5.5 (Klon HIP1), BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Fluorochrom-konjugierte Antikörper CD62P PE-Cy7 (Klon AK4), BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Fluorochrom-konjugierte Antikörper CD61 FITC (Klon VI-PL2, BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Fluorochrom-konjugierte Antikörper CD31 BV711 (Klon WM59), BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Zombie NIR, BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
FoxP3-Färbepufferset, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Perm-Puffer, eBioscience
Fluorochrom-konjugierten Antikörper anti-CXCL12 PE (Klon 79019), R&D Systems, McKinley Place, Minneapolis, USA
Fluorochrom-konjugierten Antikörper anti-CXCL14 AF647 (Klon MM0213-12B24) R&D Systems, McKinley Place, Minneapolis, USA
Fluorochrom-konjugierten Antikörper anti-MIF AF594 (Klon 932606), R&D Systems, McKinley Place, Minneapolis, USA

LSR Fortessa, BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
DIVA-Software, BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
FlowJo-Software V.10.6.2, BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
OMIQ, Omiq inc., Santa Clara, CA, USA
LEGENDPlex Inflammation Panel 1, BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
LEGENDPlex Proinflammatory Chemokine Panel, BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
LEGENDPlex Datenanalyse-Software, BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
FACS Lyric, BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
SPSS Statistics Software Version 26, IBM, SPSS, Inc.
GraphPad Prism Version 8.4.0, GraphPad Software

2.4 Dimensionsreduktion durch Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP)

UMAP wurde als Alternative zu anderen Dimensionsreduktionsmethoden wie t-SNE (t-distributed Stochastic Neighbor Embedding) und PCA (Principal Component Analysis) entwickelt. Ziel dieser Methoden ist es, hochdimensionale, komplexe Daten auf eine niedrigerdimensionale Darstellung zu reduzieren, wobei die zugrunde liegende Struktur und die Beziehungen zwischen den Datenpunkten erhalten bleiben. Dadurch soll ein besseres Verständnis komplexer Daten durch deren Visualisierung ermöglicht werden (Becht et al., 2018). Dabei werden die Daten als topologische Mannigfaltigkeiten modelliert und es wird versucht, die lokalen und globalen Strukturen zu erhalten. Eine Mannigfaltigkeit ist ein mathematisches Objekt, das auf lokaler Ebene einem euklidischen Raum ähnelt, aber auf globaler Ebene eine komplexere Struktur aufweisen kann. Mannigfaltigkeiten sind von großer Bedeutung, da mit ihrer Hilfe komplexe geometrische Strukturen und deren Eigenschaften analysiert und beschrieben werden können. Der UMAP-Algorithmus konstruiert zunächst einen gewichteten k-Nächsten-Nachbarn-Graphen aus den Abständen der Datenpunkte im ursprünglichen hochdimensionalen Raum. Anschließend werden die

niedrigdimensionalen Einbettungen optimiert, um die Abweichung zwischen den ursprünglichen Abständen und den Abständen im niedrigdimensionalen Raum unter Beibehaltung der Datentopologie zu minimieren (Diaz-Papkovich et al., 2021).

2.4.1 UMAP-Analyse zur Deutung der Daten aus der Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie ermöglicht die Anwendung von UMAP eine effiziente Analyse und Visualisierung der Diversität von Monozytenpopulationen sowie der Expression von Oberflächenrezeptoren. In einem ersten Schritt werden durchflusszytometrische Daten für Monozyten gesammelt und bereinigt, um sie vergleichbar zu machen. Der nächste Schritt ist die Auswahl relevanter Merkmale, wie z.B. Fluoreszenzkanäle, die repräsentativ für die Rezeptorexpression sind. Mit Hilfe von UMAP findet eine Dimensionsreduktion der Daten statt, bei der die hochdimensionale Information in eine niedrigdimensionale Darstellung überführt wird, in der die Beziehungen zwischen den Zellen erhalten bleiben. Die UMAP-Einbettung ermöglicht eine anschauliche Visualisierung der Daten. Unterschiedliche Zellpopulationen erscheinen als separate Cluster oder Gruppen. Spezifische Untergruppen von Monozyten mit ähnlichen Rezeptorprofilen können mittels Clusteranalyse identifiziert werden. In diesen Untergruppen wird die Expression der Rezeptoren analysiert. Auf diese Weise können Unterschiede erkannt und interpretiert werden. Die Ergebnisse der UMAP-Analyse und der Rezeptoranalyse sind wichtig für ein besseres Verständnis heterogener Monozytenpopulationen und ihrer Rezeptorexpression und können wichtige Einblicke in ihre Funktionen und Aktivitäten liefern. Das Verständnis dieser heterogenen Monozytenpopulationen und ihrer spezifischen Rezeptorexpression kann wichtige Einblicke in die Funktionsweise dieser Zellen liefern. Dies kann helfen, bestimmte Zelltypen innerhalb der Monozytenpopulation zu identifizieren, die eine besondere Rolle bei der Immunantwort oder anderen biologischen Prozessen spielen. Dies wiederum kann zu einem besseren Verständnis von Immunreaktionen und Krankheitsmechanismen beitragen. Die Ergebnisse der UMAP-Analyse und der Rezeptoranalyse in der Durchflusszytometrie sind daher von großer Bedeutung für die Erforschung und das Verständnis der Biologie von Monozyten und ihrer Rolle im Immunsystem.

2.5 Durchflusszytometrische Färbung und Bearbeitung der gewonnenen Daten

46 Blutproben von Patienten mit CVD und/oder CVRF und SARS-CoV-2-Infektion sowie 40 Blutproben von gesunden Spendern wurden in CPDA-Monovetten zur Phänotypisierung der Thrombozyten und Monozyten für die durchflusszytometrische Analyse gesammelt. Die Thrombozyten wurden zunächst in Vollblut, das im Verhältnis 1:10 in HEPES-Tyrode-Puffer (pH 7,4) verdünnt war, in einer Mikrotiterplatte (Falcon) analysiert. Für die Monozytenfärbung wurde Vollblut in 10-fach verdünntem RBC-Lysepuffer (BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA), der zuvor 1:10 in Millipore Wasser verdünnt wurde, lysiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS), die 1 % FCS, 2 mM EDTA und 1 % Natriumazid enthält, wurde die Zellzahl auf 3×10^6 Zellen je Vertiefung (Well) eingestellt. Humanes IgG (0,01 mg/ml; Sigma Aldrich Co. St. Luis, Missouri, USA) wurde verwendet, um unspezifische Bindungen zu vermeiden, indem der Fc-Teil der Rezeptoren auf den Zellen während der 20-minütigen Inkubation bei 4 °C blockiert wurde. Die extrazelluläre Färbung der Monozyten erfolgte mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern CX3CR1 PE/Dazzle (Klon 2A9-1), CCR2 BV605 (Klon K036C2) und CCR7 BV785 (Klon G043H7) von BioLegend (San Diego, Kalifornien, USA) für 1 h bei 37 °C, gefolgt von einer Färbung mit HLA-DR PerCP-Vio77 (Klon REA805; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland), CD3 BV510 (Klon OKT3), CD15 BV510 (Klon W603), CD19 BV510 (Klon HLB19), CD20 BV510 (Klon 2H7), CD56 BV510 (Klon HCD56), CD14 FITC (Klon M5E2), CD16 BV711 (Klon 3G8), CD62L PE-Cy7 (Klon DREG-56), CD11b BV605 (Klon ICRF44) und CD11a BV650 (Klon HI111) von BioLegend (San Diego, Kalifornien, USA) für 20 Minuten bei 4 °C. Auf die gleiche Weise wurden die Thrombozyten mit den folgenden Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gefärbt: CD41 PaB1 (Klon HIP8), CD42b PerCP-Cy5.5 (Klon HIP1), CD62P PE-Cy7 (Klon AK4), CD61 FITC (Klon VI-PL2) CD31 BV711 (Klon WM59) der Firma BioLegend (San Diego, Kalifornien, USA). Zombie NIR (BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA) wurde für die Lebend-Tot-Differenzierung verwendet und zusammen mit der extrazellulären Antikörperfärbung durchgeführt. Die Zellen wurden über Nacht mit dem FoxP3-Färbepuffersatz (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) nach Herstellerangaben fixiert. Die Permeabilisierung der Monozyten und Thrombozyten erfolgte mit 1 x Perm-Puffer (eBioscience) und anschließender intrazellulärer Färbung für 1 h bei RT mit folgenden Fluorochrom-konjugierten

Antikörpern: anti-CXCL12 PE (Klon 79019), anti-CXCL14 AF647 (Klon MM0213-12B24) und anti-MIF AF594 (Klon 932606) von R&D Systems (McKinley Place, Minneapolis, USA). Nach jeder Färbung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, die 1% FCS, 2 mM EDTA und 1% Natriumazid enthielt. Anti-CD3, -CD15, -CD19, -CD20 und CD56 wurden als Dump-Kanäle verwendet, um T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen und Granulozyten zu entfernen. Die Messungen wurden mit dem LSR Fortessa (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) und der DIVA-Software (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) durchgeführt, gefolgt von der Datenanalyse mit der FlowJo-Software V.10.6.2 (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Die Monozyten wurden dem Gating wie folgt zugeführt: Zeit / Singlets / Leukozyten / lebende Zellen / liniennegative Zellen /CD14CD16. Klassische Monozyten wurden als CD14⁺CD16⁻, intermediäre als CD14⁺CD16⁺ und nicht-klassische als CD14^{dim}CD16⁺ charakterisiert. Die Thrombozyten und PLA wurden nach Größe und Granularität charakterisiert und wie folgt dem Gating zugeführt: Zeit / Singlets / Thrombozyten / lebend/tot FSC-niedrig oder FSC-hoch. Insbesondere wurden die Thrombozyten wie folgt gated: FSC-niedrig/CD41⁺CD42b⁺. Die PLA wurden wie folgt gated: FSC-hoch/CD42b⁺CD61⁺. Die Expression von Oberflächenmarkern auf lebenden Thrombozyten wurde anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) und der Häufigkeit der Zellen, die die Marker tragen, quantifiziert. Zur Bestätigung der markerpositiven Thrombozyten wurde die Fluoreszenz-Minus-One-Kontrolle (FMO) verwendet. Die im Folgenden beschriebene Datenanalyse wurde ohne vorgegebene Einschränkungen oder Kontrollen mit der Datenanalysesoftware OMIQ (Omiq Inc., Santa Clara, CA, USA) durchgeführt. Zunächst wurden die Daten manuell gated, um Aggregate, tote Zellen und Trümmer zu entfernen, und dann wurden die Daten so unterteilt, dass sie 1,0x10⁶ CD14⁺/CD16⁺/CD14⁺CD16⁺-Zellen/Gruppe umfassten. Anschließend wurde eine FlowAI (Monaco et al., 2016) durchgeführt, um die Daten auf abweichende Regionen zu überprüfen. Die FlowAI-Einstellungen waren wie folgt: alle Daten, Methoden und Standardeinstellungen wurden verwendet, alle Fluoreszenzkanäle und Zeiteinstellungen wurden ausgewählt. Anschließend wurde eine Dimensionsreduktionsanalyse mit Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) durchgeführt, um die verschiedenen Zellsubpopulationen sichtbar zu machen (Becht et al., 2018). Die UMAP-Einstellungen für Thrombozyten waren wie folgt: alle Daten wurden verwendet, alle Fluoreszenzparameter wurden verwendet, außer

Lebend/Tot, Neighbours (Nachbarn) = 15, Minimum Distance (Mindestabstand) = 0,4, Components (Komponenten) = 2, Metric (Metrik) = euklidisch, Learning Rate (Lernrate) = 1, Epochs (Epochen) = 200, Random Seed (Zufallsauswahl) = 2588, Embedding Initialization (Einbettungsinitialisierung) = spektral. Für Thrombozyten/Leukozyten-Aggregate wurden folgende UMAP-Einstellungen verwendet: alle Daten und alle Fluoreszenzparameter wurden verwendet, außer Lebend/Tot, Neighbours = 45, Minimum Distance = 0,4, Components = 2, Metric = euklidisch, Learning Rate = 1, Epochs = 200, Random Seed = 519, Embedding Initialization = spektral. Für Monozyten wurden die folgenden UMAP-Einstellungen verwendet: alle Daten und alle Fluoreszenzparameter wurden verwendet, Neighbours = 15, Minimum Distance = 0,4, Components = 2, Metric = euklidisch, Learning rate = 1, Epochs = 200, Random Seed = 8263, Embedding Initialization = spektral. Nach der UMAP-Analyse wurde PhenoGraph (Levine et al., 2015) ausgeführt, um die Daten zu gruppieren. Die PhenoGraph-Einstellungen für Thrombozyten und Thrombozyten/Leukozyten-Aggregate waren wie folgt: alle Daten verwendet, Clustering-Merkmale CXCL14, CD41, CD31, CD61, CXCL12, CD62P, MIF, CD42b, umap_1, umap_2, Distance metric (Distanz-Metrik) = euklidisch, Consensus Metaclustering (Konsensus-Metaclustering) mit k-means-Algorithmus = 20, Louvain Seed (Louvain-Anfangswert) = 2737. Die PhenoGraph-Einstellungen für Monozyten waren wie folgt: alle Dateien verwendet, Clustering-Merkmale CXCL14, CXCR7, CD11b, CXCR4, CD16, CCR7, CD14, CXCL12, CD62L, MIF, HLA-DR, (Monozyten Panel 2: CD106, CD40, CCR2, CD11a, CD16, CD80, CD14, CD54, CD49a, CX3CR1, HLA-DR,) umap_1, umap_2, Distance Metric = euklidisch, Consensus Metaclustering mit k-means-Algorithmus = 20, Louvain-Seed = 9898. Eine Heatmap wurde erstellt, um die Ähnlichkeiten zwischen den mit dem PhenoGraph-Algorithmus identifizierten Populationen hierarchisch darzustellen. Dabei wurden alle verfügbaren Oberflächenmarker verwendet und die euklidische Distanzmetrik angewandt.

2.6 Bestimmung der Plasmaspiegel von Zytokinen und Chemokinen (LEGENDPlex)

Die Konzentrationen verschiedener Zytokine und Chemokine in 46 gefrorenen Plasmaproben wurden mit dem LEGENDPlex Inflammation Panel 1 und dem LEGENDPlex Proinflammatory Chemokine Panel (BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA) bestimmt. Die Assays wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Messung wurde das FACS Lyric (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) und für die Datenanalyse die LEGENDPlex Data Analysis Software (BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA) verwendet.

2.7 Statistische Auswertung

Es wurde eine statistische Analyse der klinischen und laborchemischen Ausgangsmerkmale der Teilnehmer in Bezug auf die gemessenen Monozyten-/Thrombozyten-Phänotypen und die Markerexpression durchgeführt. Nicht-normalverteilte kontinuierliche Daten wurden als Median mit Interquartilbereich (IQR) und normalverteilte kontinuierliche Daten als Mittelwert mit Standardabweichung (SD) dargestellt. Zwei-Gruppen-Vergleiche für nicht-normalverteilte kontinuierliche Variablen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, während normalverteilte kontinuierliche Variablen mit dem Student's T-Test verglichen wurden. Gepaarte nicht-normalverteilte kontinuierliche Variablen wurden mit dem Wilcoxon-Test verglichen. Drei-Gruppen-Vergleiche für nicht-normalverteilte kontinuierliche Variablen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, während normalverteilte kontinuierliche Variablen mit der einfaktoriellen ANOVA verglichen wurden. Kategoriale Variablen wurden als Gesamtzahl und Anteil der Teilnehmenden dargestellt und mit dem Chi-Quadrat-Test verglichen. Die Vergleiche wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn der zweiseitige p-Wert $< 0,05$ war. Alle statistischen Analysen wurden mit IBM SPSS Statistics Software Version 26 (SPSS, Inc.) und GraphPad Prism Version 8.4.0 (GraphPad Software) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Merkmale von Patienten mit schwerer SARS-Cov-2-Infektion

Die charakteristischen Ausgangs- und Verlaufsp Parameter sowie die demographischen Daten der Studienpopulation sind in den Tabellen 2, 3 und 4 detailliert dargestellt.

Tabelle 2. Baseline-Charakteristika der Studienpopulation.

Parameter	Alle Patienten (n) = 23
Allgemeine Merkmale	
Alter	69 (55-79)
Männlich	12 (52.2)
Frauen	11 (47,8)
BMI (kg/m ²)	27 (25.7-31.5)
Mildes ARDS	15 (65.2)
Moderates ARDS	2 (8.7)
Schweres ARDS	4 (17.4)
Horovitz-Index > 300 mmHg	12 (52.2)
Horovitz-Index 201 - 300 mmHg	6 (26.1)
Horovitz-Index 101 - 200 mmHg	4 (17.4)
Horovitz-Index ≤ 100 mmHg	1 (4.3)
High-Flow-O ₂ -Therapie	4 (17.4)
Mechanische Beatmung	5 (21.7)
Vasopressorenpflichtigkeit	4 (17.4)
Lymphozytenzahl am Tiefpunkt (1000/μl)	0.7 (0.6-1)
Bakterielle Co-Infektion	10 (43.5)
Dialysepflichtigkeit	1 (4.3)

Akute Leberschädigung	2 (8.7)
CVRF	
Arterielle Hypertonie	17 (73.9)
Dyslipidämie	11 (47.8)
Diabetes mellitus	7 (30.4)
Nikotinkonsum	4 (17.4)
Übergewicht	9 (39.1)
Herzrhythmus	
VHF	3 (13)
Sinusrhythmus	20 (87)
KHK	
1-Gefäß-KHK	1 (4.3)
2-Gefäß-KHK	2 (8.7)
3-Gefäß-KHK	3 (13)
Andere relevante Komorbiditäten	
Chronische Niereninsuffizienz	1 (4.3)
Asthma	3 (13)
COPD	1 (4.3)
Herzinsuffizienz	1 (4.3)
Malignome	1 (4.3)
Lebererkrankungen	1 (4.3)
Vorangegangener ischämischer Schlaganfall	4 (17.4)
Herzmedikation bei Studienbeginn	
Orale Antikoagulation	4 (17.4)
ACE-Hemmer oder ARB	9 (39.1)

MRA	4 (17.4)
Diuretika	4 (17.4)
Kalziumkanalblocker	4 (17.4)
Betablocker	13 (56.5)
Statine	10 (43.5)
ASS	8 (34.8)
P2Y12-Inhibitoren	2 (8.7)
Herzmedikation bei Entlassung aus dem Krankenhaus	
Orale Antikoagulation	1 (4.3)
ACE-Hemmer oder ARB	12 (52.2)
MRA	2 (8.7)
Diuretika	4 (17.4)
Kalziumkanalblocker	3 (13)
Betablocker	10 (43.5)
Statine	11 (47.8)
ASS	9 (39.1)
P2Y12-Inhibitoren	1 (4.3)

Die Werte sind n (%) oder werden als Median und Interquartilsbereich (IQR) angegeben. ACE - Angiotensin Converting Enzyme. VHF - Vorhofflimmern. ARB - Angiotensin-II-Rezeptorblocker. ARDS - Akutes Respiratorisches Distress-Syndrom. ASS - Acetylsalicylsäure. BMI - Body-Mass-Index. KHK - Koronare Herzkrankheit. MRA - Mineralokortikoidrezeptor-Antagonisten. COPD - Chronisch obstruktive Lungenerkrankung.

Tabelle 3. Unerwünschte Ereignisse während des FU

Parameter	Alle Patienten, N=23
Unerwünschte Ereignisse	
Tod	0 (0)
Myokardinfarkt	1 (4.3)
ECLS/ECMO	0 (0)
Schlaganfall	0 (0)
Thrombosen / Thrombembolie	0 (0)
Blutung	0 (0)
Re-Hospitalisation	1 (4,3)

Die Werte sind n (%) oder werden als Median und Interquartilsbereich (IQR) angegeben. ECLS/ECMO - Extrakorporaler Life-Support/ Extrakorporale Membranoxygenierung.

Tabelle 4. Längsschnittdaten der Studienpopulation.

Parameter	Akute Infektion, N=23	Post-Infektion, N=23	p-Wert
Symptome bei der stationären Aufnahme			
Husten	12 (52.2)	1 (4.3)	<0.001
Atemnot	12 (52.2)	10 (43.5)	0.555
Fieber	14 (60.9)	0 (0)	<0.001
Echokardiographisch Parameter			
Linksventrikuläre Hypertrophie	11 (47.8)	11 (47.8)	0.763
Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (%)	60 (55-65)	60 (55-65)	0,989
Mitralklappeninsuffizienz	16 (69.6)	18 (78.3)	0.164
Trikuspidalklappeninsuffizienz	11 (47.8)	15 (65.2)	0.132

Eingeschränkte rechtsventrikuläre Funktion	1 (4.3)	0 (0)	0.334
Rechtsventrikuläre Dilatation	2 (8.7)	1 (4.3)	0.626
Perikarderguss	11 (47.8)	3 (13)	0.010
Pleuraerguss	7 (30.4)	2 (8.7)	0.046
PAPSys (mmHg)	25 (20-29.5)	20 (20-30.75)	0.696
Radiologische Parameter			
Bilaterale knotige Verschattungen	13 (56.5)	0 (0)	0.001
Milchglastrübung	4 (17.4)	1 (4.3)	0.155
Peribronchiale Verdickung	1 (4.3)	1 (4.3)	1
Fokale Konsolidierungen	4 (17.4)	1 (4.3)	0.155
Pulmonal-venöse Stauung	2 (8.7)	0 (0)	0.148
Atelektasen	0 (0)	1 (4.3)	0.312
Elektrokardiographische Parameter			
Herzfrequenz (bpm)	74 (68-86)	71 (63-79.5)	0.306
Systolischer Blutdruck (mmHg)	140 (120-150)	140 (130-150)	0.631
QRS (ms)	87.5 (80-100)	89 (81.5-93.5)	0.900
Rechtsschenkelblockmorphologie	2 (8.7)	2 (8.7)	0.924
QTc (ms)	4 (17.4)	1 (4.3)	0.144
T-Negativierung	3 (12)	1 (4.3)	0.340
ST-Streckensenkung	2 (8.7)	0 (0)	0.167
Sinusrhythmus	21 (91.3)	20 (86.9)	0.401
Vorhofflimmern	0 (0)	1 (4.3)	
Schrittmacherrhythmus	1 (4.3)	0 (0)	

Supraventrikuläre Tachykardie	1 (4.3)	0 (0)	
Laborwerte und Biomarker			
Leukozyten (1000/ μ L)	6550 (4090-8860)	7240 (6020-9110)	0.227
Lymphozyten (1000/ μ L)	660 (530-1150)	1540 (1280-2090)	<0.001
Thrombozyten (1000/ μ L)	167 (143-228)	233 (191-297)	0.024
Hb (g/dL)	13.2 (11.7-14.3)	13 (12.5-14.9)	0.435
INR (%)	1.1 (1-1.1)	1 (1-1.1)	0.273
PTT (s)	24 (22-28)	23 (22-2)	0.991
D-Dimere (μ g/dL)	0.9 (0.6-1.9)	-	-
Kreatinin (mg/dL)	0.8 (0.7-1.2)	0.9 (0.6-1.2)	0.900
GFR-MDRD (ml/m ²)	82.3 (53.5-105.4)	84.1 (59.5-99.1)	0.820
Natrium (mmol/L)	136 (134-139)	141 (139-142)	<0.001
CRP (mg/dL)	2.5 (1.3-12.5)	0.1 (0.0-1.1)	<0.001
PCT (ng/mL)	0.1 (0.1-0.2)	-	-
IL-6 (ng/L)	27.3 (9.5-37.4)	2.7 (2.7-4.2)	<0.001
hsTnl (ng/dL)	8.5 (3-18.5)	4 (3-8)	0.092
NT-pro-BNP (ng/L)	323 (132.5-825.5)	161 (44.5-326)	0.048
CK (U/L)	167.5 (71.5-260.8)	85 (62.5-123.5)	0.045
AST (U/L)	38 (20-46.5)	14 (12.8-21)	<0.001

ALT (U/L)	36 (19-44)	18 (12.8-26)	0.006
LDH (U/L)	263.5 (225-339.5)	191.5 (166.8-207)	<0.001
HbA1c (%)	6.3 (6-6.5)	5.8 (5.4-6.3)	0.014

Die Werte sind n (%) oder werden als Median und Interquartilsbereich (IQR) angegeben. ALT - Alanin-Amino-Transferase. AST - Aspartat-Aminotransferase. CK - Kreatinin-Kinase. CRP - C-reaktives Protein. GFR - MDRD-glomeruläre Filtrationsrate. Hb - Hämoglobin. hs TnI - hochsensitives Troponin I. INR - international normalized ratio. LDH - Laktatdehydrogenase. NT-pro-BNP - N-Terminal pro- brain natriuretic peptide. Pap Sys - Pulmonal-arterieller systolischer Druck. PCT - Procalcitonin. PTT - Partielle Thromboplastinzeit. HbA1c (%) - Glykiertes Hämoglobin.

3.2 Darstellung der Veränderung der Leukozytenzahl nach SARS-CoV-2

Kürzlich wurde gezeigt, dass bei einer akuten Infektion mit SARS-CoV-2 eine reduzierte Anzahl von nicht-klassischen Monozyten (CD14^{dim}CD16⁺) mit einer raschen Progression der respiratorischen Insuffizienz assoziiert ist (Mueller et al., 2021). Dies wurde auf eine Akkumulation dieser Monozytenlinie im entzündeten Lungengewebe zurückgeführt. Im Rahmen dieser Studie wurden die verschiedenen Subtypen der zirkulierenden Monozyten unserer Studienpopulation mit der gesunden Kontrollgruppe verglichen. Dieser Vergleich wurde wie oben beschrieben, durch eine detaillierte Immunphänotypisierung mittels Multicolor-Durchflusszytometrie sowohl in der akuten Phase der Hyperinflammation als auch nach einer dreimonatigen Erholungsphase durchgeführt. Schlussfolgernd zeigte sich, dass die Leukozytenzahl bei den COVID-19-Patienten in der akuten Phase der Hyperinflammation im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe und nach drei Monaten Rekonvaleszenz leicht abnahm. Diese Veränderung war jedoch statistisch nicht signifikant (siehe Abbildung 2).

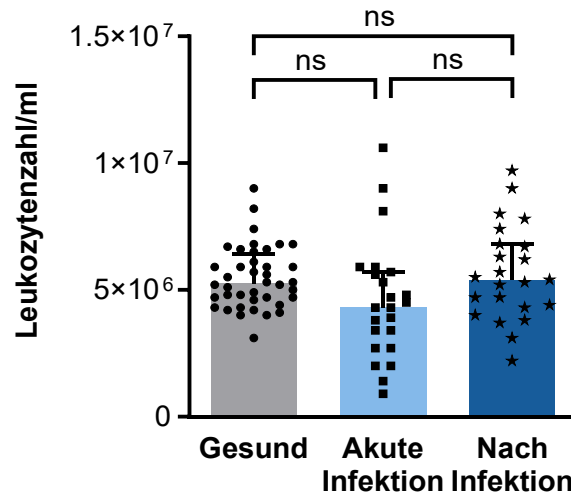


Abbildung 2. Leukozytenzahl/ml mit IQR während der akuten Infektion, während der Rekonvaleszenz und in der gesunden Kontrollgruppe. Statistik: Kruskal-Wallis-Test. Für diese Analyse wurde ein p-Wert $\leq 0,050$ als signifikant angesehen, angezeigt durch *, p-Wert $\leq 0,010$ angezeigt durch **, p-Wert $\leq 0,001$ angezeigt durch ***, p-Wert $\leq 0,0001$ gekennzeichnet durch **** und nicht signifikante Werte gekennzeichnet durch ns.

3.3 Veränderungen der Thrombozytenzahl nach Infektion mit SARS-CoV-2

In der akuten Phase der Infektion und nach einer Rekonvaleszenzzeit von drei Monaten wurde eine leichte Abnahme der Thrombozytenzahl im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe beobachtet. Die statistische Auswertung der Ergebnisse zeigt, dass die beobachteten Schwankungen der Thrombozytenzahl im Zusammenhang mit einer SARS-CoV-2-Infektion wahrscheinlich eher auf zufällige Schwankungen zurückzuführen sind, da keine signifikanten Korrelationen oder Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden wurden. Vor diesem Hintergrund kann die Thrombozytenzahl nicht als zuverlässiger Indikator für die Infektion oder den Genesungsverlauf angesehen werden (siehe Abbildung 3).

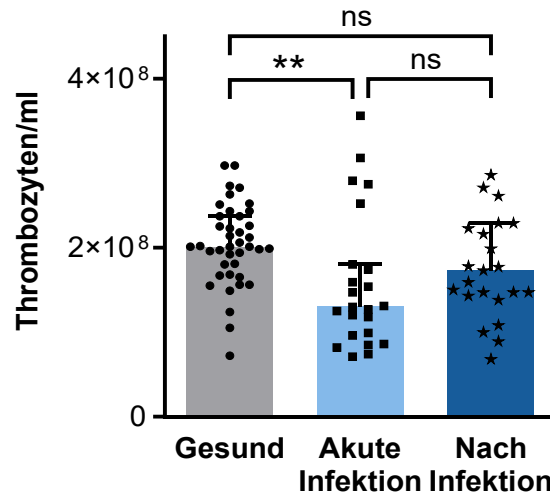


Abbildung 3. Thrombozytenzahl/ml mit IQR bei akuter Infektion, dreimonatiger Rekonvaleszenz und gesunder Kontrollgruppe. Statistik: Kruskal-Wallis-Test. Für diese Analyse wurde ein p-Wert $\leq 0,050$ als signifikant angesehen, angezeigt durch *, p-Wert $\leq 0,010$ angezeigt durch **, p-Wert $\leq 0,001$ angezeigt durch ***, p-Wert $\leq 0,0001$ gekennzeichnet durch **** und nicht signifikante Werte gekennzeichnet durch ns.

3.3 Veränderungen der Thrombozyten/Leukozyten-Aggregate nach Infektion mit SARS-CoV-2

In dieser Analyse wurde die Anzahl der Thrombozyten/Leukozyten-Aggregate (PLA) bei Patienten in der Akutphase im Vergleich zur Rekonvaleszenzphase und zur gesunden Kontrollgruppe untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass es keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Thrombozyten/Leukozyten-Aggregate zwischen den Gruppen gibt, wobei die Werte in der akuten Phase und in der Rekonvaleszenzphase tendenziell ähnlich sind wie in der gesunden Kontrollgruppe. (siehe Abbildung 4).

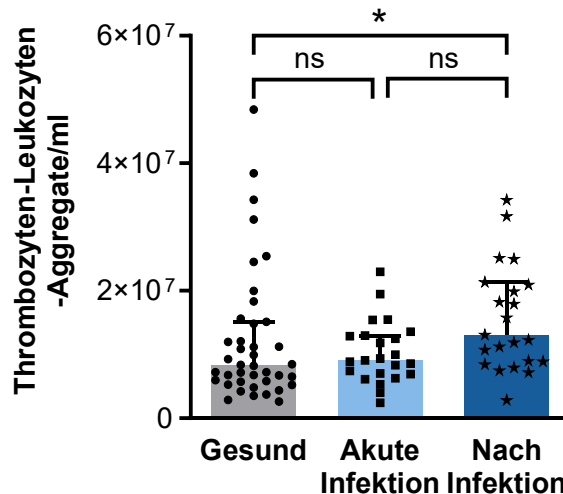


Abbildung 4. PLA/ml mit IQR in der akuten Phase und nach dreimonatiger Rekonvaleszenz, verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe. Statistik: Kruskal-Wallis-Test. Für diese Analyse wurde ein p-Wert $\leq 0,050$ als signifikant angesehen, angezeigt durch *, p-Wert $\leq 0,010$ angezeigt durch **, p-Wert $\leq 0,001$ angezeigt durch ***, p-Wert $\leq 0,0001$ gekennzeichnet durch **** und nicht signifikante Werte gekennzeichnet durch ns.

3.4 Charakterisierung von Veränderungen des Immunphänotyps zirkulierender peripherer Monozyten nach SARS-CoV-2-Infektion mittels Durchflusszytometrie

In Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen (Mueller et al., 2021) zeigte sich, dass die Anzahl der nicht-klassischen Monozyten ($CD14^{dim}CD16^+$) während der akuten Infektionsphase signifikant reduziert war, aber nach drei Monaten Rekonvaleszenz nahezu normale Werte erreichte. Dies wurde durch die Analyse mittels Median und IQR veranschaulicht. Konkret zeigte die Anzahl der nicht-klassischen Monozyten in der akuten Phase, Werte von 1640 (IQR 500 - 6100), die nach drei Monaten Genesung auf 12190 (IQR 2400 - 30000) anstiegen, verglichen mit 21905 (IQR 13900 - 36400) in der gesunden Kontrollgruppe. Die statistische Auswertung der Ergebnisse zeigte signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Phasen. Während der akuten Infektionsphase war die Anzahl der nicht-klassischen Monozyten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant niedriger ($p < 0,001$). Nach drei Monaten Rekonvaleszenz stieg die Anzahl dieser Monozyten signifikant an ($p = 0,001$), erreichte aber noch nicht das Niveau der gesunden Kontrollgruppe ($p = 0,07$). Ähnlich verhielt es sich mit den klassischen Monozyten ($CD14^+CD16^-$), deren Anzahl während der akuten Infektionsphase leicht reduziert war und nach drei Monaten Rekonvaleszenz wieder

normale Werte erreichte. Die Werte der klassischen Monozyten lagen in der akuten Phase bei 193070 (IQR 122800 - 321200) und stiegen nach drei Monaten Rekonvaleszenz auf 340280 (IQR 285100 - 491200) im Vergleich zu 292455 (IQR 240400 - 393900) in der gesunden Kontrollgruppe. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zwischen der akuten Phase und der Rekonvaleszenzphase ($p=0,01$) sowie zwischen der akuten Phase und der gesunden Kontrollgruppe ($p=0,08$) beobachtet. Es wurde jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der Rekonvaleszenzphase und der gesunden Kontrollgruppe festgestellt ($p=0,75$). Bemerkenswert ist, dass die Anzahl der intermediären Monozyten ($CD14^+CD16^+$) während der Infektion unverändert blieb. Diese Ergebnisse verdeutlichen die unterschiedliche Reaktion verschiedener Monozyten-Subtypen auf die akute Infektion und den anschließenden Genesungsprozess im Zusammenhang mit SARS-CoV-2 (siehe Abbildung 5 A, 5B, 5C).

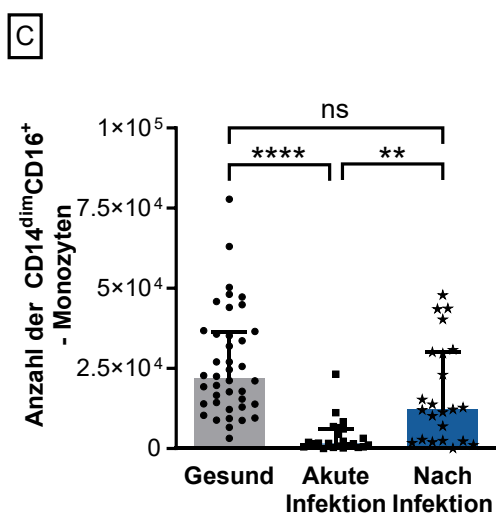
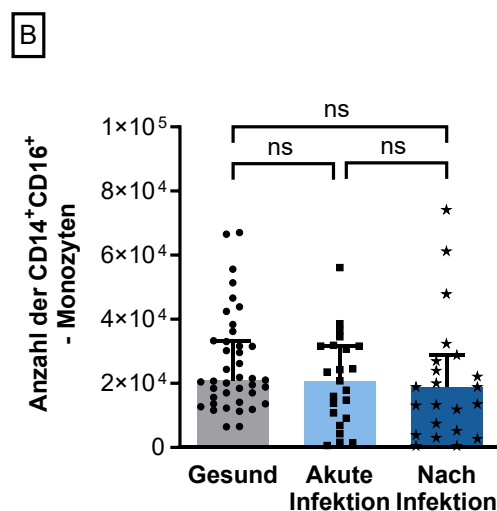
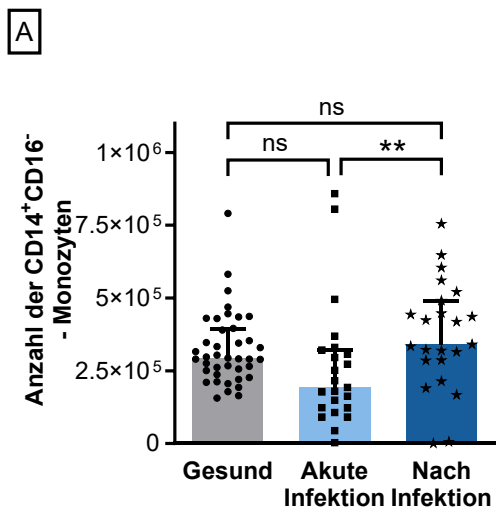


Abbildung 5A, 5B und 5C. Vergleich der Immunphänotypen von zirkulierenden peripheren Monozyten in der Studienpopulation. Die Grafiken zeigen die Anzahl (Median) der klassischen, der nicht-klassischen und der intermediären Monozyten mit IQR während der akuten Infektionsphase, der Rekonvaleszenz und in einer gesunden Kontrollgruppe. Statistik: Kruskal-Wallis-Test. Für diese Analyse wurde ein p -Wert $\leq 0,050$ als signifikant angesehen, angezeigt durch *, p -Wert $\leq 0,010$ angezeigt durch **, p -Wert $\leq 0,001$ angezeigt durch ***, p -Wert $\leq 0,0001$

3.5 Untersuchung der Expression von Markern für Adhäsion, Migration und T-Zell-Aktivierung auf Monozyten-Subtypen

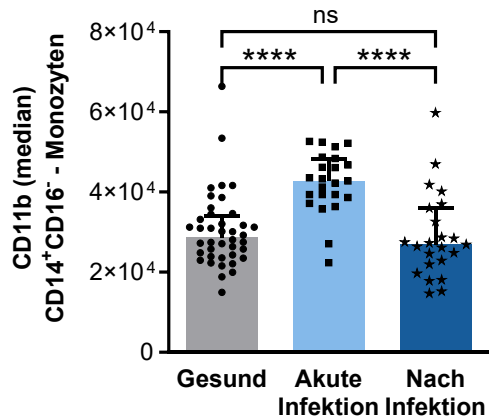
Frühere Studien haben gezeigt, dass bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) und akuter SARS-CoV-2-Infektion die Funktion zirkulierender Monozyten beeinträchtigt ist, was sich in einer verminderten Expression etablierter Adhäsions-, Migrations- und T-Zell-Aktivierungsmarker wie CD62L, CX3CR1 und HLA-DR äußert (Mueller et al., 2021). In dieser Studie wurde auch die Expression von Markern auf Monozyten-Subtypen untersucht, die bei den genannten Prozessen eine entscheidende Rolle spielen, wie CD11a, CD11b, CCR2 und ACKR3.

3.5.1 Veränderung der CD11b-Expression während der akuten SARS-CoV-2-Infektion auf Monozyten-Subtypen

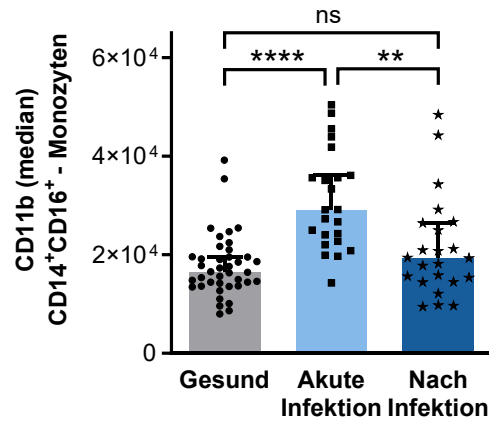
Von besonderem Interesse war die Beobachtung, dass die Expression des Aktivierungsmarkers CD11b (MAC-1) während der akuten Infektionsphase auf allen Monozyten-Subtypen signifikant erhöht war und sich nach drei Monaten Rekonvaleszenz wieder auf Normalwerte erholt hatte. Die statistische Analyse erfolgte durch Berechnung von Median und IQR. Bei den klassischen Monozyten lag die CD11b-Expression in der akuten Phase bei 42753 (IQR 38600 - 48400), nach drei Monaten Genesung sank sie auf 26892 (IQR 22000 - 36000), während die gesunde Kontrollgruppe einen Wert von 28654 (IQR 24000 - 34100) aufwies. Die statistische Auswertung dieser Ergebnisse ergab erhebliche Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen: Während der akuten Phase der SARS-CoV-2-Infektion ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede zur Rekonvaleszenzphase ($p < 0,001$) und zur Gruppe der gesunden Probanden ($p < 0,001$). Der Vergleich zwischen der Rekonvaleszenzphase und der gesunden Gruppe ergab hingegen keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p > 0,99$). Diese Ergebnisse belegen, dass während der akuten Infektionsphase signifikante Veränderungen der untersuchten Parameter auftreten, die sich deutlich von der Rekonvaleszenzphase und den gesunden Kontrollen unterscheiden. Ähnliche Muster wurden bei intermediären und nicht-klassischen Monozyten beobachtet. Diese Ergebnisse unterstreichen die komplexe Dynamik zwischen verschiedenen Monozyten-Subtypen, Markern für Adhäsion, Migration und T-Zell-Aktivierung und der akuten SARS-CoV-2-Infektion im Kontext

kardiovaskulärer Erkrankungen (CVD) und kardiovaskulärer Risikofaktoren (CVRF). Dieses Verständnis könnte dazu beitragen, die pathophysiologischen Zusammenhänge während der Infektion besser zu verstehen und therapeutische Ansätze zu entwickeln.

A



B



C

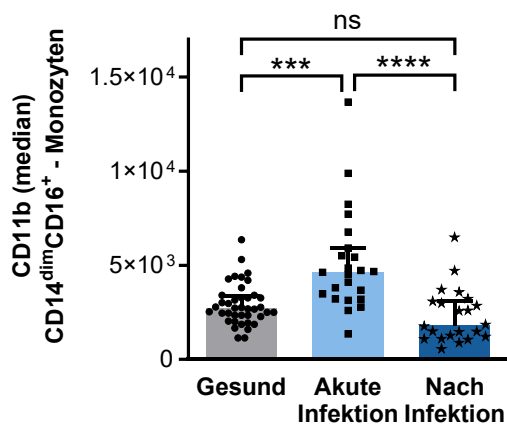


Abbildung 6A, 6B und 6C. CD11b-Expression auf Monozyten-Subtypen. Die Grafiken zeigen die CD11b-Expression (Median) mit IQR auf verschiedenen Monozyten-Subtypen während der akuten Infektion, nach dreimonatiger Rekonvaleszenz und bei gesunden Kontrollpersonen. Statistik: Kruskal-Wallis-Test. Für diese Analyse wurde ein p-Wert $\leq 0,050$ als signifikant angesehen, angezeigt durch *, p-Wert $\leq 0,010$ angezeigt durch **, p-Wert $\leq 0,001$ angezeigt durch ***, p-Wert $\leq 0,0001$ gekennzeichnet durch **** und nicht signifikante Werte gekennzeichnet durch ns

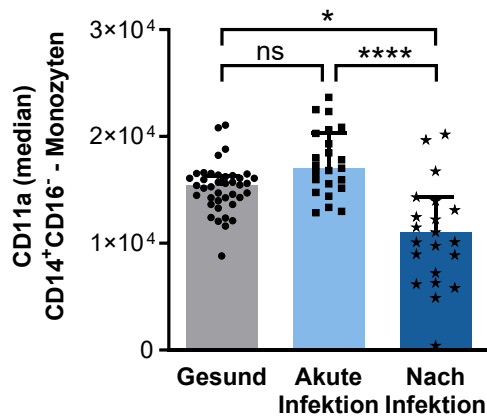
ns

3.5.2 Veränderung der CD11a-Expression während der akuten SARS-CoV-2-Infektion auf Monozyten-Subtypen

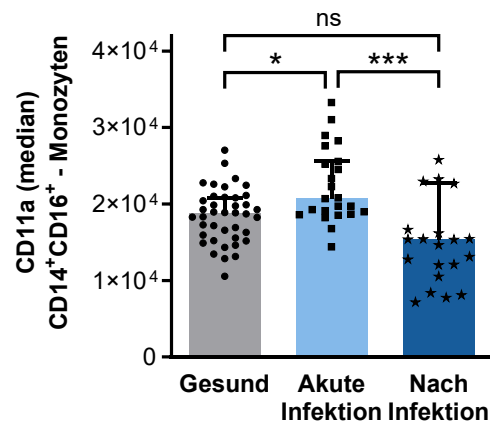
Die Ergebnisse zeigten unter anderem, dass während der akuten Phase der SARS-CoV-2-Infektion die Expression des Aktivierungsmarkers CD11a auf allen untersuchten Monozyten-Subtypen im Vergleich zur Rekonvaleszenzphase signifikant erhöht war. Die statistische Auswertung erfolgte wiederum mittels Median und IQR. Bei den klassischen Monozyten lag die CD11a-Expression in der akuten Phase bei 17045 (IQR 15200 - 20300), während sie sich in der Rekonvaleszenzphase auf 11045 (IQR 7200 - 14300) normalisierte. Im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe mit einer CD11a-Expression von 15437 (IQR 14000 - 16300) ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen akuter Phase und Rekonvaleszenz ($p < 0,001$), zwischen akuter Phase und gesunder Kontrollgruppe ($p = 0,05$) sowie zwischen Rekonvaleszenz und gesunder Kontrollgruppe ($p = 0,02$). Intermediäre Monozyten zeigten ein ähnliches Muster mit einer CD11a-Expression von 20715 (IQR 18700 - 25600) während der akuten Phase und einer Normalisierung auf 15366 (IQR 11600 - 22700) während der Rekonvaleszenz. Im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe mit einer CD11a-Expression von 18787 (IQR 15700 - 20900) zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der akuten Phase und der Rekonvaleszenz ($p = 0,001$) sowie zwischen der akuten Phase und der gesunden Kontrollgruppe ($p = 0,04$). Der Unterschied zwischen Rekonvaleszenz und gesunder Kontrollgruppe war nicht signifikant ($p = 0,25$). Bei den nicht-klassischen Monozyten lag die CD11a-Expression in der akuten Phase im Median bei 14857 (IQR 12600 - 17400) und in der Rekonvaleszenz bei 11869 (IQR 8800 - 16400). Im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe mit einer CD11a-Expression von 15582 (IQR 13200 - 18500) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen akuter Phase und Rekonvaleszenz ($p = 0,29$), jedoch zwischen akuter Phase und gesunder Kontrollgruppe ($p > 0,99$) sowie zwischen Rekonvaleszenz und gesunder Kontrollgruppe ($p = 0,03$). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression von CD11a auf Monozyten-Subtypen während der akuten Phase einer SARS-CoV-2-Infektion bei Patienten mit CVD und/oder CVRF signifikant erhöht ist und sich während der Rekonvaleszenz normalisiert, wobei die Expression je nach Monozyten-Subtyp variieren kann. Dies wiederum deutet darauf hin, dass die Adhäsionsfähigkeit der Monozyten während einer akuten SARS-CoV-2-Infektion beeinträchtigt ist. Diese Veränderungen könnten auf mögliche Veränderungen der

Zell-Zell-Interaktionen und der Entzündungsreaktion hinweisen. Die dynamische Modulation der CD11a-Expression während der verschiedenen Phasen der Infektion und Genesung könnte eine wichtige Rolle bei der Immunantwort und dem Verlauf der Virusinfektion spielen. Dies unterstreicht erneut die komplexe Rolle der Monozyten im Kontext der immunologischen Prozesse während einer SARS-CoV-2 Infektion.

A



B



C

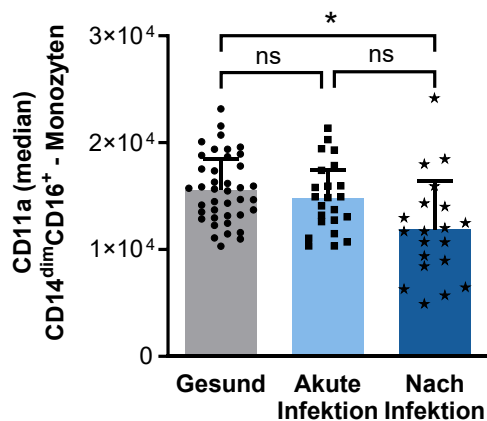


Abbildung 7A, 7B und 7C. CD11a-Expression auf Monozyten-Subtypen. Die Grafiken zeigen die CD11a-Expression (Median) mit IQR auf verschiedenen Monozyten-Subtypen während der akuten Infektion, nach dreimonatiger Rekonvaleszenz und bei gesunden Kontrollpersonen Statistik: Kruskal-Wallis-Test. Für diese Analyse wurde ein p-Wert $\leq 0,050$ als signifikant angesehen, angezeigt durch *, p-Wert $\leq 0,010$ angezeigt durch **, p-Wert $\leq 0,001$ angezeigt durch ***, p-Wert $\leq 0,0001$ gekennzeichnet durch **** und nicht signifikante Werte gekennzeichnet durch ns.

3.5.3 Die CCR2-Expression während der akuten Phase der SARS-CoV-2-Infektion und in der Rekonvaleszenzphase

Im Fokus standen unter anderem die Konzentrationen von Chemokinrezeptoren, die maßgeblich an der Zellmigration (CCR2/CCL2 = MCP-2) sowie an der Regulation des Chemokin-induzierten Überlebens (ACKR3/CXCL12) beteiligt sind. Die Daten zeigen signifikante Veränderungen der CCR2-Expression auf verschiedenen Monozyten-Subtypen während verschiedener Phasen der SARS-CoV-2-Infektion bei Patienten mit CVD und/oder CVRF. Während der akuten Infektionsphase wurde ein signifikanter Anstieg der CCR2-Expression auf klassischen Monozyten mit einem Median von 50531 (IQR 39800 - 54100) im Vergleich zur Rekonvaleszenzphase mit 35507 (IQR 23300 - 42200) und zur gesunden Kontrollgruppe mit 46367 (IQR 44500 - 51500) beobachtet. Die festgestellten Unterschiede erwiesen sich als statistisch signifikant ($p < 0,001$) zwischen der akuten Infektionsphase und der Rekonvaleszenzphase sowie zwischen der Rekonvaleszenzphase und der gesunden Kontrollgruppe, was auf tatsächliche Unterschiede in den betrachteten Merkmalen hinweist. Es wurde jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der akuten Infektionsphase und der gesunden Kontrollgruppe festgestellt ($p > 0,99$).

Die intermediären Monozyten zeigten ebenfalls eine erhöhte CCR2-Expression während der akuten Phase, jedoch ohne signifikanten Unterschied zur Rekonvaleszenzphase ($p = 0,05$) und ohne signifikanten Unterschied zur gesunden Kontrollgruppe ($p = 0,17$). Die Veränderung zwischen der Rekonvaleszenzphase und der gesunden Kontrollgruppe war ebenfalls nicht signifikant ($p > 0,99$). Die nicht-klassischen Monozyten zeigten einen signifikanten Anstieg der CCR2-Expression während der akuten Phase im Vergleich zur Rekonvaleszenzphase mit einem Median von 862 (IQR 600 - 1100) gegenüber 168,5 (IQR 100 - 500) in der Rekonvaleszenzphase und 690 (IQR 600 - 700) in der gesunden Kontrollgruppe. Die beobachteten Veränderungen waren sowohl zwischen der akuten Phase und der Rekonvaleszenzphase ($p < 0,001$) als auch zwischen der Rekonvaleszenzphase und der gesunden Kontrollgruppe ($p < 0,001$) signifikant. Lediglich die Veränderung zwischen akuter Phase und gesunder Kontrollgruppe war nicht signifikant ($p = 0,71$). Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Patienten mit CVD und/oder CVRF und SARS-CoV-2-Infektion im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eine erhöhte CCR2-Expression auf allen Monozyten-Subtypen aufweisen. Dies könnte

auf eine verstärkte Immunantwort während der akuten Infektionsphase hinweisen. Interessanterweise normalisierte sich die CCR2-Expression auf den Monozyten-Subtypen nach einer Erholungszeit von drei Monaten und lag sogar unter den Werten der gesunden Kontrollgruppe. Diese Beobachtung spricht dafür, dass die Migrationseigenschaften der Monozyten während der Erholungsphase beeinträchtigt sein könnten, da eine verminderte CCR2-Expression die gerichtete Wanderung dieser Zellen in entzündetes Gewebe beeinflussen könnte. Die detaillierte Analyse der Chemokinrezeptor-Expression auf verschiedenen Monozyten-Subtypen zeigt eine dynamische Veränderung im Verlauf der SARS-CoV-2-Infektion und der anschließenden Genesung.

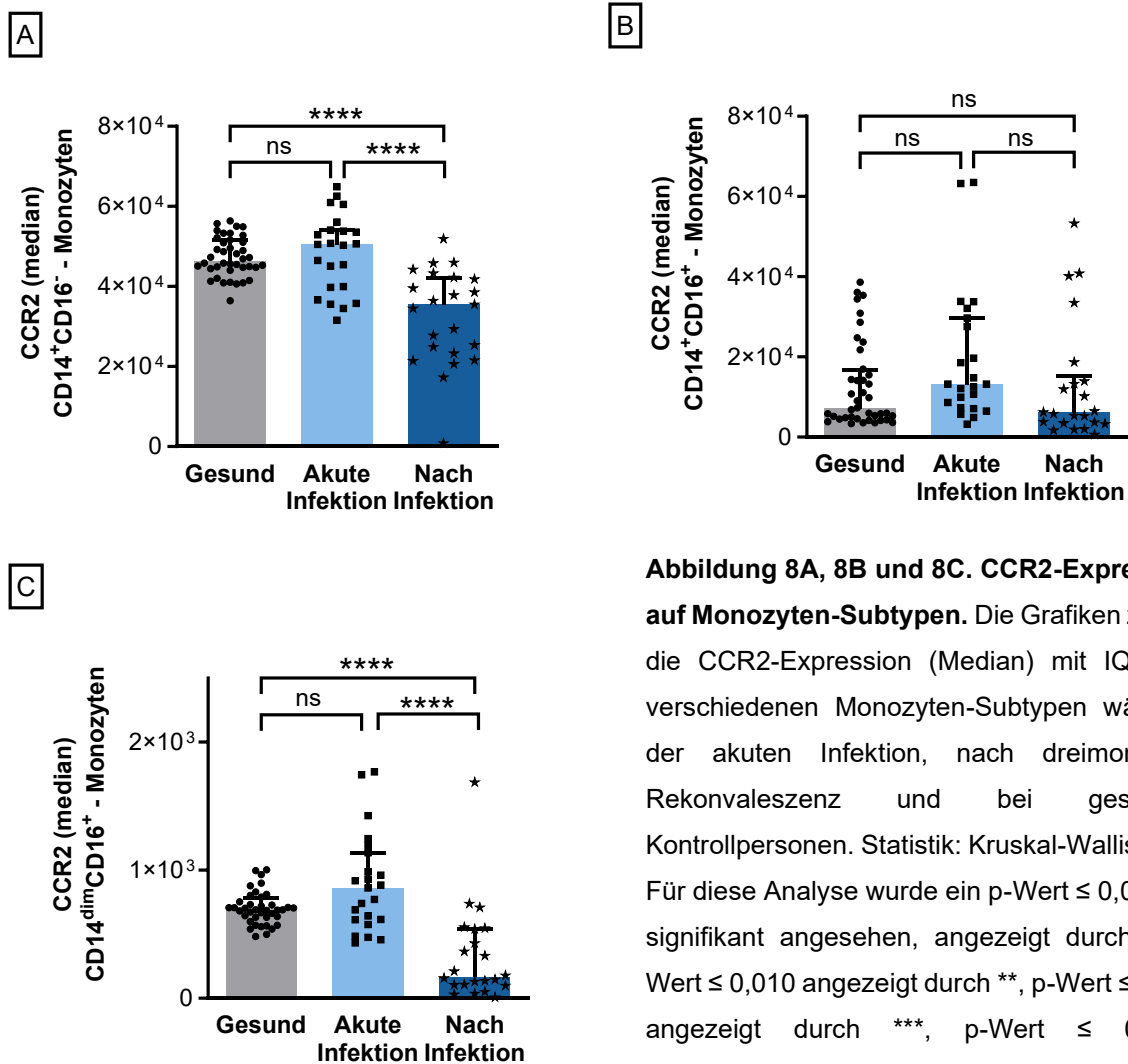


Abbildung 8A, 8B und 8C. CCR2-Expression auf Monozyten-Subtypen. Die Grafiken zeigen die CCR2-Expression (Median) mit IQR auf verschiedenen Monozyten-Subtypen während der akuten Infektion, nach dreimonatiger Rekonvaleszenz und bei gesunden Kontrollpersonen. Statistik: Kruskal-Wallis-Test. Für diese Analyse wurde ein p-Wert $\leq 0,050$ als signifikant angesehen, angezeigt durch *, p-Wert $\leq 0,010$ angezeigt durch **, p-Wert $\leq 0,001$ angezeigt durch ***, p-Wert $\leq 0,0001$ gekennzeichnet durch **** und nicht signifikante Werte gekennzeichnet durch ns.

3.5.4 Die ACKR3-Expression während der akuten Phase der SARS-CoV-2-Infektion und in der Rekonvaleszenzphase

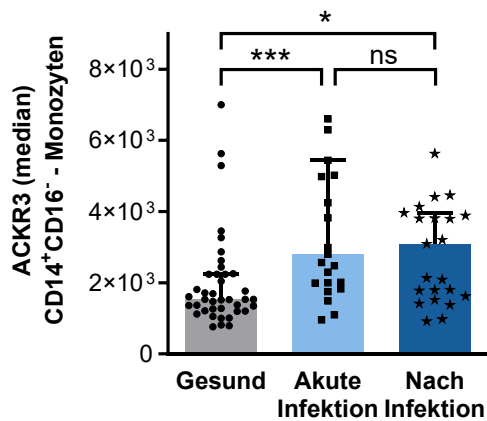
Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass ACKR3, ein Chemokin-Rezeptor, der für die Regulation der Zellmigration und des überlebensrelevanten Chemokin-Signals verantwortlich ist, während einer akuten SARS-CoV-2-Infektion auf Monozyten verstärkt exprimiert wird. Die statistische Analyse ergab, dass während der akuten Phase der SARS-CoV-2-Infektion die ACKR3-Expression in klassischen Monozyten einen Median von 2804 (IQR 2000 - 5400) aufwies. Im Vergleich dazu hatte die gesunde Kontrollgruppe einen Median von 1535 (IQR 1200 - 2200). Die statistische Analyse ergab signifikante Unterschiede zwischen der akuten Phase und der gesunden Kontrollgruppe ($p=0,001$). In der Rekonvaleszenzphase wurde ein Median von 3095 (IQR 1600 - 4000) ermittelt, der sich ebenfalls signifikant von der gesunden Kontrollgruppe unterschied ($p=0,02$).

Der Unterschied zwischen der akuten Infektionsphase und der Rekonvaleszenzphase war hingegen nicht signifikant ($p>0,99$). Für die nicht-klassischen Monozyten wurde in der akuten Phase ein Median von 2452 (IQR 1600 - 5400) ermittelt, während die gesunde Kontrollgruppe einen Median von 1204 (IQR 1000 - 2000) aufwies. Die Unterschiede zwischen der akuten Phase und der gesunden Kontrollgruppe waren signifikant ($p=0,001$). In der Rekonvaleszenzphase lag der Median bei 3951 (IQR 2000 - 5100), auch hier war der Unterschied zur gesunden Kontrollgruppe signifikant ($p=0,0002$). Der Unterschied zwischen akuter Phase und Rekonvaleszenzphase war nicht signifikant ($p > 0,99$). Bei den intermediären Monozyten lag der Median der ACKR3-Expression während der akuten Phase bei 3034 (IQR 1800 - 5600), während die gesunde Kontrollgruppe einen Median von 1340 (IQR 1100 - 2200) aufwies. Der Unterschied zwischen der akuten Phase und der gesunden Kontrollgruppe war signifikant ($p=0,001$). In der Rekonvaleszenzphase wurde ein Median von 4556 (IQR 2100 - 5300) gemessen, der sich ebenfalls signifikant von der gesunden Kontrollgruppe unterschied ($p=0,0004$). Der Unterschied zwischen Akut- und Rekonvaleszenzphase war nicht signifikant ($p>0,99$). Bemerkenswert ist, dass die erhöhte ACKR3-Expression auch nach drei Monaten Rekonvaleszenz bei den Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe erhöht blieb.

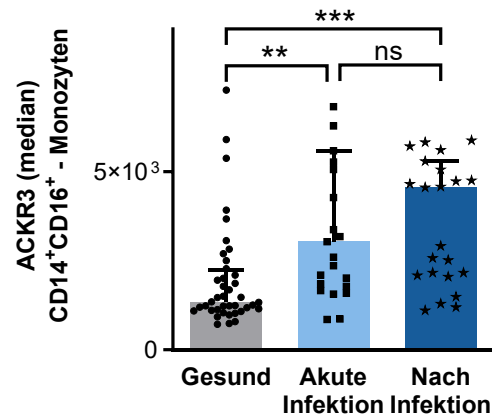
Klassische, intermediäre und nicht-klassische Monozyten zeigen eine ähnliche Dynamik der ACKR3-Expression. Diese Beobachtung deutet auf eine Veränderung

des Immunsystems im Sinne einer anhaltenden Immunantwort hin, die möglicherweise über die akute Phase der Infektion hinausgeht, insbesondere im Zusammenhang mit der Migration und dem Überleben von Monozyten während der Erholungsphase nach einer SARS-CoV-2-Infektion.

A



B



C

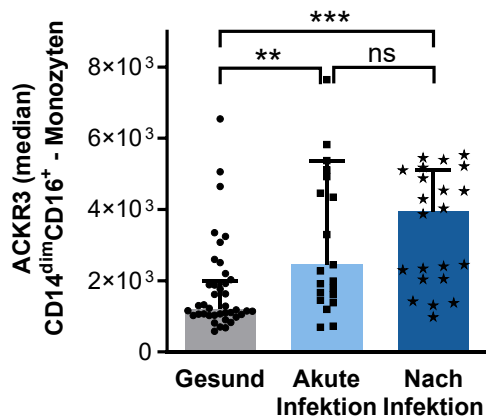


Abbildung 9A, 9B und 9C. ACKR3-Expression auf Monozyten-Subtypen. Die Grafiken zeigen die ACKR3-Expression (Median) mit IQR auf verschiedenen Monozyten-Subtypen während der akuten Infektion, nach dreimonatiger Rekonvaleszenz und bei gesunden Kontrollpersonen. Statistik: Kruskal-Wallis-Test. Für diese Analyse wurde ein p-Wert $\leq 0,050$ als signifikant angesehen, angezeigt durch *, p-Wert $\leq 0,010$ angezeigt durch **, p-Wert $\leq 0,001$ angezeigt durch ***, p-Wert $\leq 0,0001$ gekennzeichnet durch **** und nicht signifikante Werte gekennzeichnet durch ns.

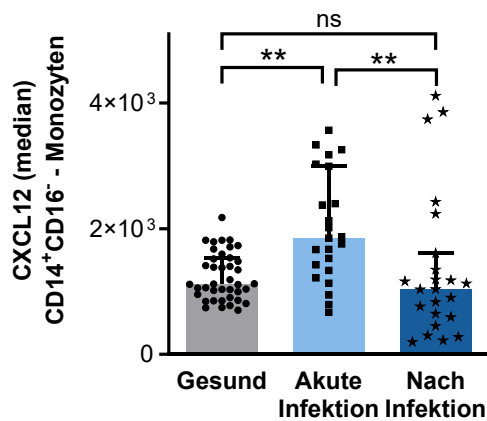
3.6 Untersuchung der intrazellulären Expression von CXCL 12 und MIF

Zur umfassenden Charakterisierung der Immunphänotypen wurde zusätzlich die intrazelluläre Expression der Chemokine CXCL12 und MIF in den drei Subtypen zirkulierender Monozyten analysiert. Die Chemokine CXCL12 und MIF spielen eine wichtige Rolle bei der chemotaktischen Regulation von Lymphozyten und Monozyten, die wiederum eine wichtige Rolle bei entzündlichen und atherosklerotischen Prozessen spielt (Calandra et al., 1998, Gao et al., 2019, van der Vorst et al., 2015).

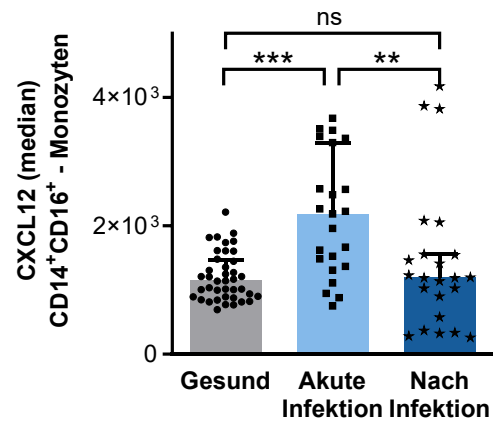
3.6.1 Die Expression von CXCL12 während der akuten SARS-CoV-2-Infektion und in der Rekonvaleszenzphase

Die Analyse der CXCL12-Expression zeigte einen signifikanten Anstieg in allen Monozyten-Subtypen während der akuten Infektionsphase. Nach drei Monaten war die CXCL12-Expression vergleichbar mit der gesunden Kontrollgruppe. Für die klassischen Monozyten ergab sich für die akute Phase der SARS-CoV-2-Infektion ein Median der CXCL12-Expression von 1849 (IQR 1300 - 3000), für die Rekonvaleszenzphase von 1038 (IQR 600 - 1600) und für die gesunde Kontrollgruppe von 1118 (IQR 915,3 - 1534). Bei den intermediären Monozyten betrug der Median der CXCL12-Expression während der akuten Infektion 2185 (IQR 1400 - 3300), in der Rekonvaleszenzphase 1190 (IQR 600 - 1600) und in der gesunden Kontrollgruppe 1142 (IQR 900 - 1500). Die nicht-klassischen Monozyten zeigten eine mediane CXCL12-Expression von 1573 (IQR 1000 - 2300) während der akuten Infektion, von 947 (IQR 600 - 1300) während der Rekonvaleszenz und von 928 (IQR 700 - 1200) in der gesunden Kontrollgruppe. Die statistische Analyse ergab für alle Subtypen signifikante Unterschiede zwischen der akuten Phase und Rekonvaleszenzphase sowie zwischen der akuten Phase und der gesunden Kontrollgruppe (p-Werte < 0,05). Diese Ergebnisse zeigen, dass CXCL12 während der akuten Infektion verstärkt exprimiert wird und sich nach der Genesung auf ähnliche Werte wie in der gesunden Kontrollgruppe normalisiert. Dies spricht für eine mögliche Rolle von CXCL12 in der akuten Entzündungsreaktion, die während der Erholungsphase abklingt.

A



B



C

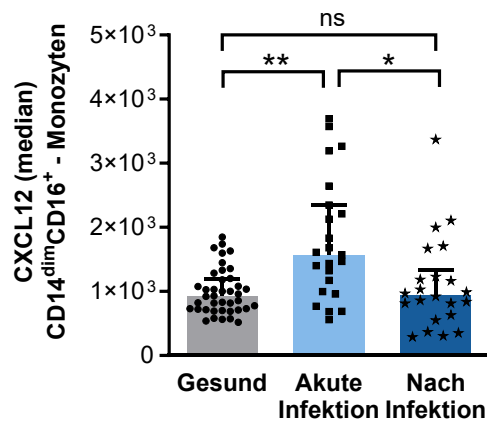


Abbildung 10A, 10B und 10C. CXCL12-Expression in Monozyten-Subtypen.

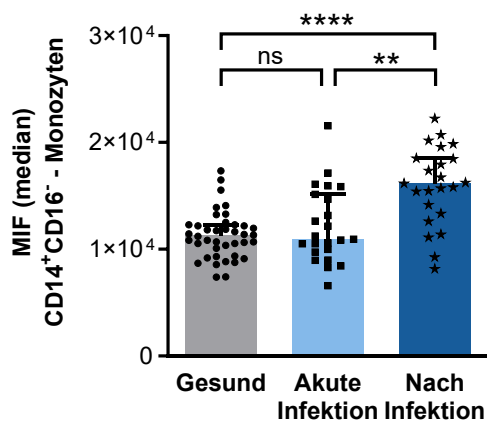
Die Grafiken zeigen die CXCL12-Expression (Median) mit IQR in verschiedenen Monozyten-Subtypen während der akuten Infektion, nach dreimonatiger Rekonvaleszenz und bei gesunden Kontrollpersonen. Statistik: Kruskal-Wallis-Test. Für diese Analyse wurde ein p-Wert $\leq 0,050$ als signifikant angesehen, angezeigt durch *, p-Wert $\leq 0,010$ angezeigt durch **, p-Wert $\leq 0,001$ angezeigt durch ***, p-Wert $\leq 0,0001$ gekennzeichnet durch **** und nicht signifikante Werte gekennzeichnet durch ns.

3.6.2 MIF-Expression in der Rekonvaleszenzphase

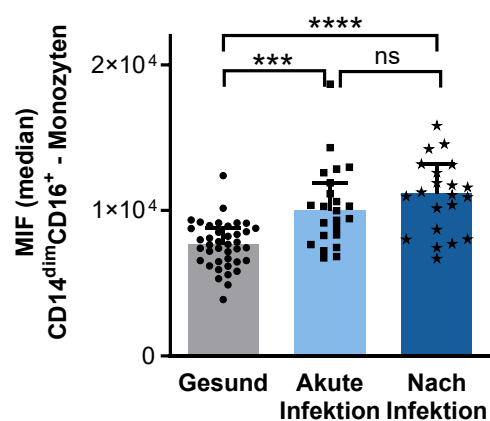
Im Gegensatz dazu war die Expression von MIF auch nach drei Monaten noch signifikant erhöht. Für klassische Monozyten in den Gruppen der akuten Phase, der Rekonvaleszenzphase und der gesunden Kontrolle ergaben sich Medianwerte der MIF-Expression von 10945 (IQR 9700 - 15100), 16154 (IQR 13300 - 18500) und 11274 (IQR 9500 - 12300). Für intermediäre Monozyten betragen die Mediane 11507 (IQR 9500 - 14300), 16535 (IQR 12600 - 200000) und 10958 (IQR 9100 - 12000) in den Gruppen der akuten Phase, der Rekonvaleszenzphase und der gesunden Kontrollen. Nicht-klassische Monozyten zeigten Mediane von 9974 (IQR 8300 - 11900), 11159

(IQR 8500 - 13200) und 7655 (IQR 6500 - 8800) in den gleichen Gruppen. Die statistische Analyse zeigte für alle Subtypen signifikante Unterschiede zwischen der akuten und der Rekonvaleszenzphase sowie zwischen der akuten Phase und der gesunden Kontrollgruppe (p-Werte < 0,05). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die erhöhte Expression von MIF, im Gegensatz zur normalisierten Expression von CXCL12, auch nach drei Monaten Genesung bestehen bleibt. Dies könnte auf eine anhaltende Beteiligung von MIF an Entzündungsprozessen über die Erholungsphase hinaus schließen lassen.

A



C



B

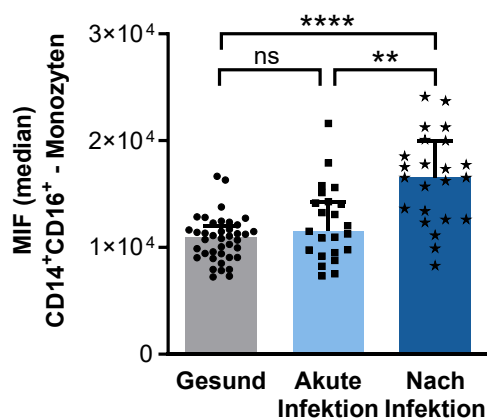
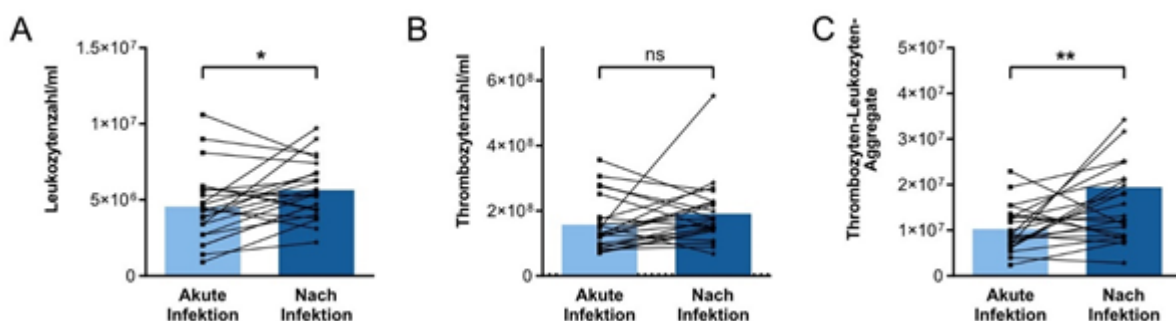


Abbildung 11A, 11B und 11C. MIF-Expression in Monozyten-Subtypen.

Die Grafiken zeigen die MIF-Expression (Median) mit IQR in verschiedenen Monozyten-Subtypen während der akuten Infektion, nach dreimonatiger Rekonvaleszenz und bei gesunden Kontrollpersonen. Statistik: Kruskal-Wallis-Test. Für diese Analyse wurde ein p-Wert $\leq 0,050$ als signifikant angesehen, angezeigt durch *, p-Wert $\leq 0,010$ angezeigt durch **, p-Wert $\leq 0,001$ angezeigt durch ***, p-Wert $\leq 0,0001$ gekennzeichnet durch **** und nicht signifikante Werte gekennzeichnet durch ns

3.6.3 Thrombozyten/Leukozyten-Aggregate und nicht-klassische Monozyten während der Rekonvaleszenzphase

Die Ergebnisse belegen, dass die Fähigkeit der Monozyten zur Chemotaxis, Adhäsion, Migration und Aktivierung von B/T-Zellen durch eine akute Infektion mit SARS-CoV-2 beeinträchtigt wird und sich nach einer dreimonatigen Rekonvaleszenz wieder erholt. Es zeigt sich, dass einige der Veränderungen der Monozytenfunktion in diesem Zeitraum nicht vollständig reversibel sind, da die Expressionsniveaus der gesunden Kontrollgruppe in diesen Fällen nicht erreicht werden. Für einen direkten Vergleich der individuellen Patientendaten während der akuten Infektionsphase und nach drei Monaten Rekonvaleszenz wurden für jeden untersuchten Marker und jede Zellzahl separate Grafiken generiert. Diese Vorgehensweise ermöglicht eine differenzierte Betrachtung der zeitlichen Entwicklung und verdeutlicht die Dynamik der immunologischen Veränderungen im Kontext einer SARS-CoV-2-Infektion und der anschließenden Rekonvaleszenzphase. Dieser direkte Vergleich zeigte für die Gesamtzahl der Leukozyten sowie für die klassischen Monozyten einen Anstieg in der Rekonvaleszenzphase (p -Wert $\leq 0,05$). Noch erstaunlicher war das Ergebnis bei PLA und den nicht-klassischen Monozyten. Hier konnte ein deutlicher Anstieg der PLA (p -Wert $\leq 0,01$) sowie der nicht-klassischen Monozyten (p -Wert $\leq 0,001$) in der Rekonvaleszenzphase beobachtet werden. Die Thrombozytenzahlen und die Anzahl der intermediären Monozyten zeigten im direkten Vergleich keine signifikante Dynamik.



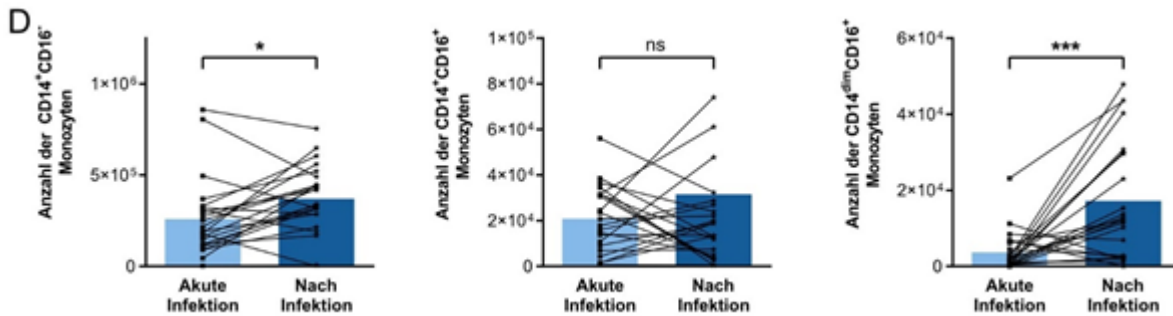


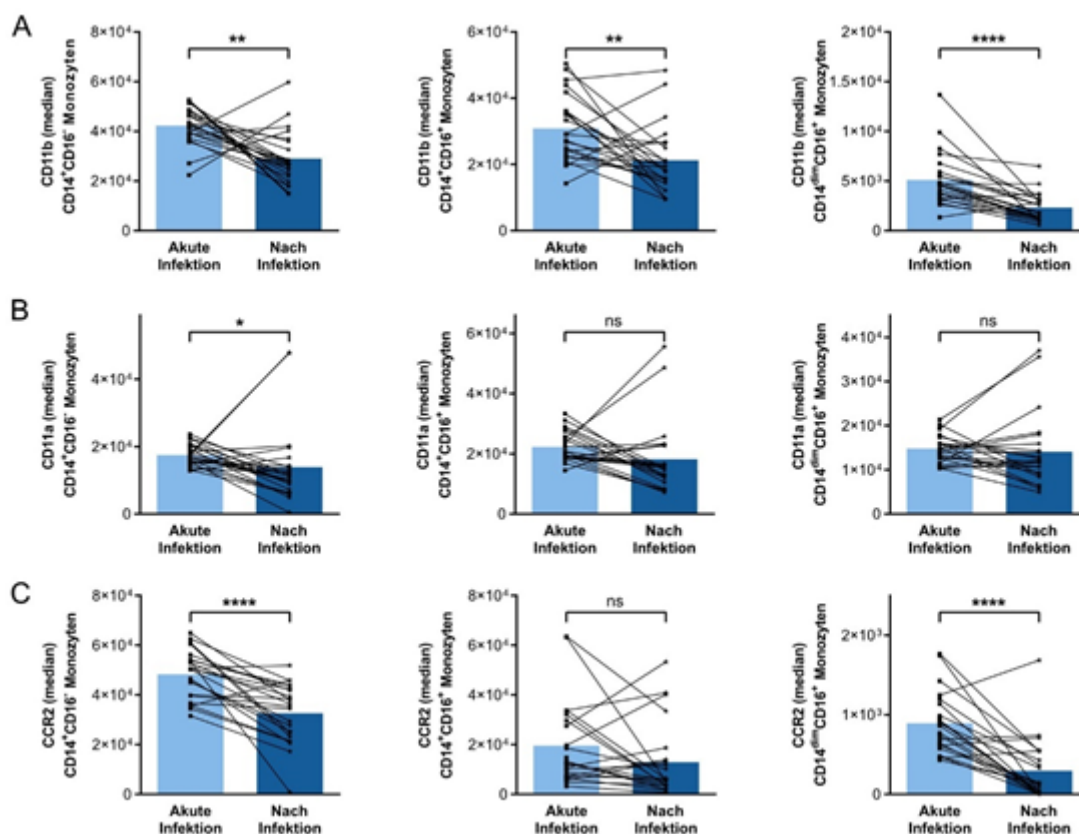
Abbildung 12A, 12B, 12C und 12D. Anzahl (Median) der Leukozyten, Monozyten, Thrombozyten und Thrombozyten/Leukozyten-Aggregate mit IQR im Vergleich zwischen Akut- und Rekonvaleszenzphase für jeden einzelnen Patienten. Die Linien stellen zusammenhängende Patienten dar. Die folgenden Zellzahlen wurden gemessen: (A) Leukozytenzahl/ml (B) Thrombozyten/ml (C) Thrombozyten-/Leukozytenaggregate und (D) Klassisch, nicht-klassische und intermediäre Monozyten. Statistik: Mann-Whitney U-Test. Für diese Analyse wurde ein p-Wert $\leq 0,050$ als signifikant angesehen, angezeigt durch *, p-Wert $\leq 0,010$ angezeigt durch **, p-Wert $\leq 0,001$ angezeigt durch *** und p-Wert $\leq 0,0001$ gekennzeichnet durch ****.

3.6.4 MIF in klassischen und intermediären Monozyten während der Rekonvaleszenzphase

Als nächstes verglichen wir die Oberflächenmarker für Aktivierung und Migration auf Monozyten-Subtypen zwischen der akuten und der Rekonvaleszenzphase einer SARS-CoV-2-Infektion bei jedem einzelnen Patienten und stellten die Ergebnisse für jeden einzelnen Patienten auch gegenüber. Besonders auffällig war die Expression von CD11b auf allen Monozyten-Subtypen, die Expression von CCR2 auf klassischen Monozyten, die Expression von CXCL12 auf nicht-klassischen Monozyten und die Expression von MIF auf klassischen und intermediären Monozyten.

Die CD11b-Expression auf klassischen und intermediären Monozyten zeigte eine signifikante Abnahme in der Rekonvaleszenzphase (p-Wert $\leq 0,01$). Die Abnahme der CD11b-Expression auf nicht-klassischen Monozyten war noch ausgeprägter (p-Wert $\leq 0,001$). Auch die CD11a-Expression zeigte auf allen Monozyten-Subtypen eine tendenzielle Abnahme, die sich jedoch nur auf den klassischen Monozyten als signifikant erwies (p-Wert $\leq 0,05$). Die CCR2-Expression auf klassischen und nicht-klassischen Monozyten nahm signifikant ab (p-Wert $\leq 0,0001$). Erstaunlicherweise

konnten wir keine relevante Dynamik in der ACKR3-Expression auf allen Monozyten-Subtypen feststellen, obwohl auch hier eine tendenzielle Abnahme in der Rekonvaleszenzphase zu erkennen war, jedoch ohne Signifikanz. Die CXCL12-Expression in allen Monozyten-Subtypen erfuhr eine signifikante Abnahme, jedoch am stärksten in den nicht-klassischen Monozyten (p -Wert $\leq 0,01$). Im Vergleich zu den anderen bisher genannten Markern stieg die Expression von MIF in der Rekonvaleszenzphase in allen Monozyten-Subtypen an, am stärksten in den klassischen und intermediären Monozyten (p -Wert $\leq 0,01$). Diese Ergebnisse legen nahe, dass es während der Genesungsphase nach einer Infektion mit SARS-CoV-2 zu Veränderungen in der Expression von oberflächlichen Markern auf Monozyten kommt, die auf eine Modulation der Immunantwort und möglicherweise auf eine Regulation entzündlicher Prozesse hindeuten.



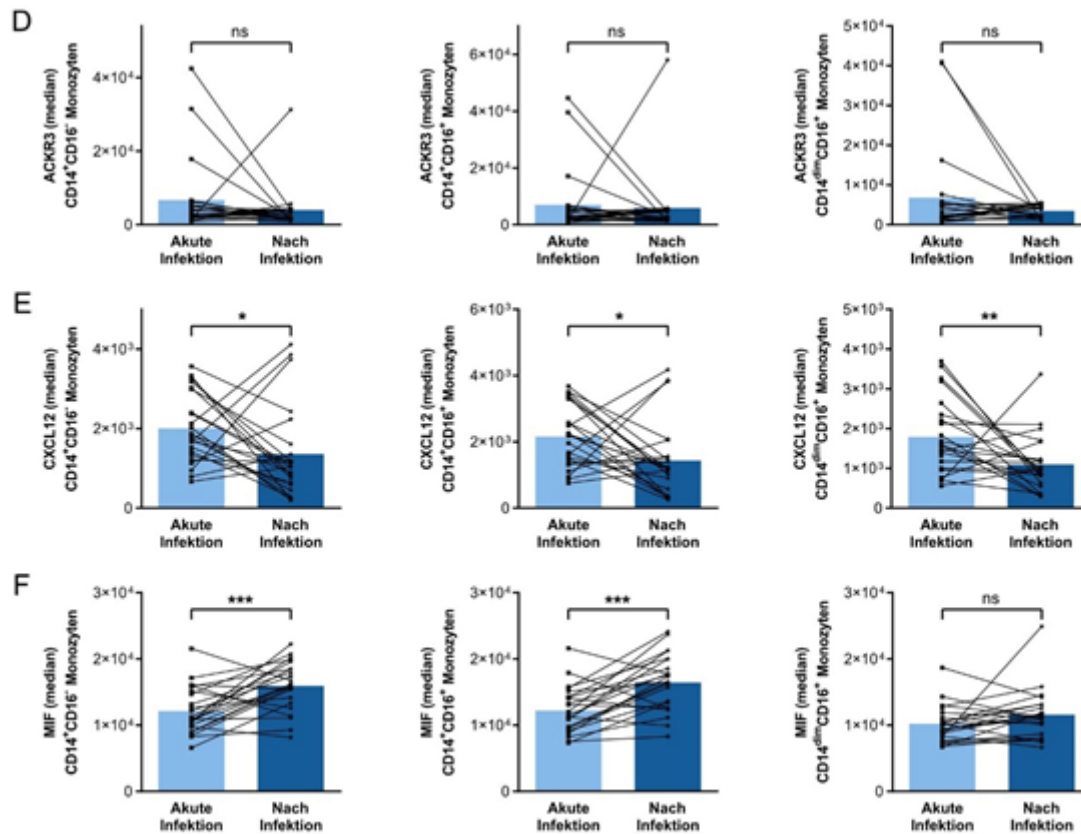


Abbildung 13A, 13B, 13C, 13D, 13E und 13F. Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker für Aktivierung und Migration auf Monozyten-Subtypen im Vergleich zwischen akuter und Rekonvaleszenzphase einer SARS-CoV-2-Infektion. Die Linien stellen zusammenhängende Patienten dar. Diagramme, die Oberflächenmarker-Expression von klassischen, nicht-klassischen und intermediären Monozyten: (A) Median von CD11b (B) Median von CD11a (C) Median von CCR2 und (D) Median von ACKR3. Folgende Marker wurden intrazellulär angefärbt: (E) Median von CXCL12 (F) Median von MIF. Dargestellt: Median mit Interquartilsbereich (IQR); Statistik: Mann-Whitney U-Test. Für diese Analyse wurde ein p-Wert $\leq 0,050$ als signifikant angesehen, angezeigt durch *, p-Wert $\leq 0,010$ angezeigt durch **, p-Wert $\leq 0,001$ angezeigt durch *** und p-Wert ≤ 0.0001 angezeigt durch ****.

3.7 Hierarchisches Clustering von Monozyten-Subtypen identifiziert spezifische Phänotypen in der akuten Phase der SARS-CoV-2-Infektion und nach dreimonatiger Rekonvaleszenz

Als Ergänzung zur etablierten manuellen Gating-Methode in der Multicolor-Durchflusszytometrie nutzten wir eine explorative Datenanalyse, um zusätzliche Erkenntnisse aus unseren Daten zu gewinnen. Dazu verwendeten wir eine

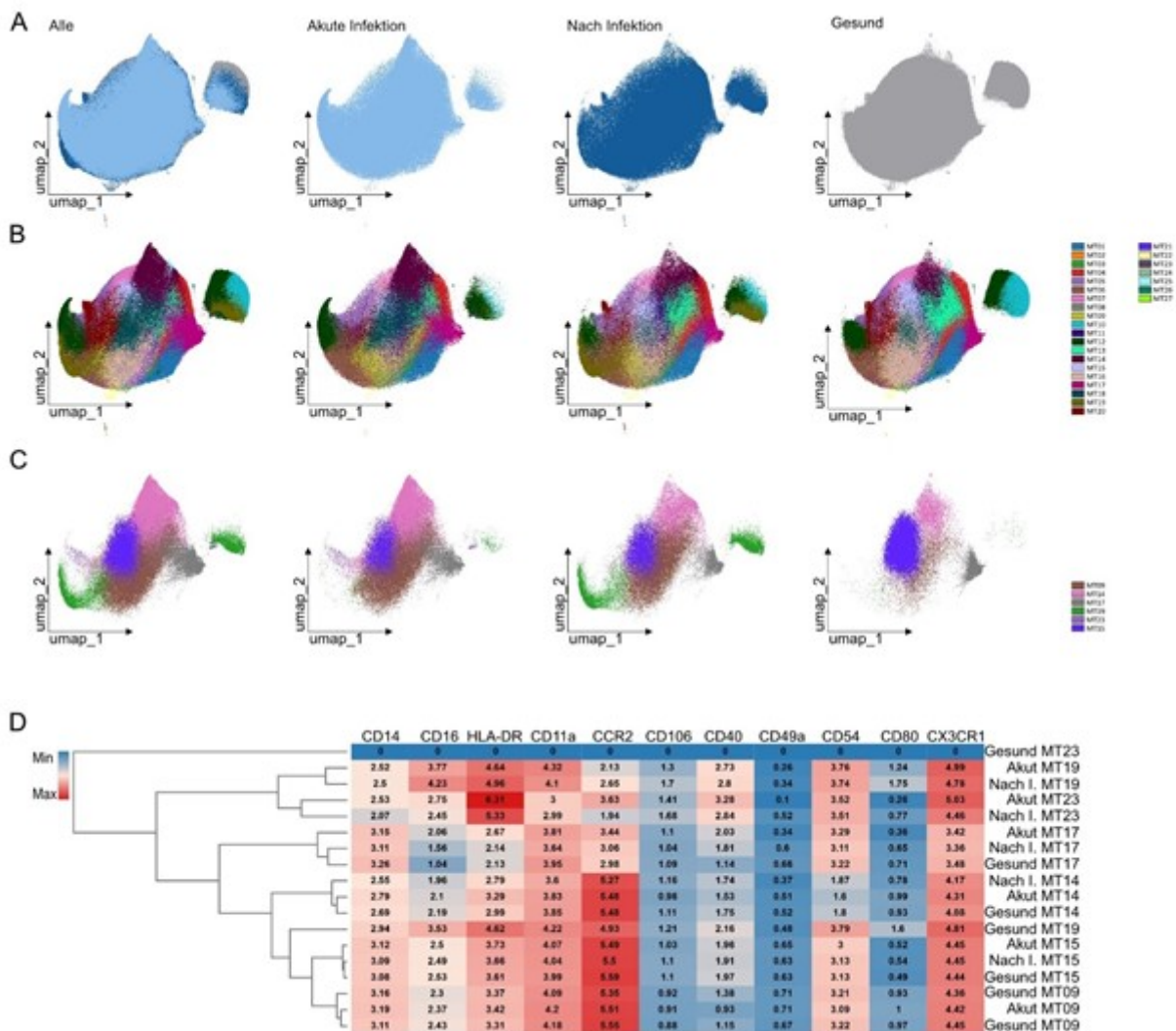
Dimensionsreduktionstechnik (UMAP), um die bereits durch das Gating identifizierten Monozyten weiter zu charakterisieren (Becht et al., 2018). Unser Ziel war es, phänotypisch ähnliche Ereignisse zu identifizieren und zu Gruppen zusammenzufassen, um eine differenziertere Analyse zu ermöglichen. Durch die Anwendung von unkontrolliertem Clustering mit PhenoGraph (Levine et al., 2015) wurden 28 Cluster (MT01 – MT28) von Monozyten identifiziert. Interessanterweise zeigten diese Cluster signifikante Unterschiede in den Expressionsprofilen der Oberflächenmarker zwischen Patienten in der akuten Phase der Infektion und Patienten, bei denen die Infektion bereits abgeklungen war. Die Validität dieser Ergebnisse wurde durch eine unkontrollierte OMIQ-Analyse bestätigt. In den Abbildungen 19 und 20 wurde vor allem die Visualisierung der relevanten signifikanten Ergebnisse vorgenommen und dargestellt.

3.7.1 Expression von CXCL12 und CXCL14 während der akuten SARS-CoV-2-Infektion

Besonders signifikant waren die Veränderungen in der Expression von CXCL12 und CXCL14: Einige Cluster wie MT03 und MT24 zeigten eine Zunahme von CXCL12 und gleichzeitig eine Abnahme von CXCL14 während der akuten Infektionsphase. MT27 hingegen zeigte eine erhöhte Expression von CXCL12 und CXCL14 (siehe Abbildung 14). Diese Befunde könnten auf komplexe Veränderungen der Immunantwort hindeuten, bei der Monozyten in unterschiedlichem Ausmaß an der Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen beteiligt sind. Der Anstieg von CXCL12 könnte auf eine verstärkte Anlockung und Einwanderung von Monozyten in infiziertes Gewebe hinweisen, um die Immunantwort gegen die Virusinfektion zu verstärken. Gleichzeitig könnte die Abnahme von CXCL14 darauf hindeuten, dass Monozyten möglicherweise weniger effektiv Immunzellen an den Ort der Infektion führen. Die Gründe für dieses Verhalten müssen weiter erforscht werden.

3.7.2 Die Aktivierungs- und Migrationseigenschaften von Monozyten in der akuten Phase der SARS-CoV-2-Infektion und in der Rekonvaleszenzphase

Zusätzlich war die Expression von Aktivierungs- und Migrationsmarkern wie CCR2 und CD11a in einigen Clustern wie MT23, MT17 und MT14 während der akuten Phase erhöht (siehe Abbildung 14). Die Abnahme der Expression von CD11b in den Clustern MT27, MT14, MT03 und MT24 während der Rekonvaleszenzphase könnte auf eine anhaltende veränderte Adhäsionsfähigkeit oder Aktivität der Monozyten hinweisen (siehe Abbildung 14 und 15).



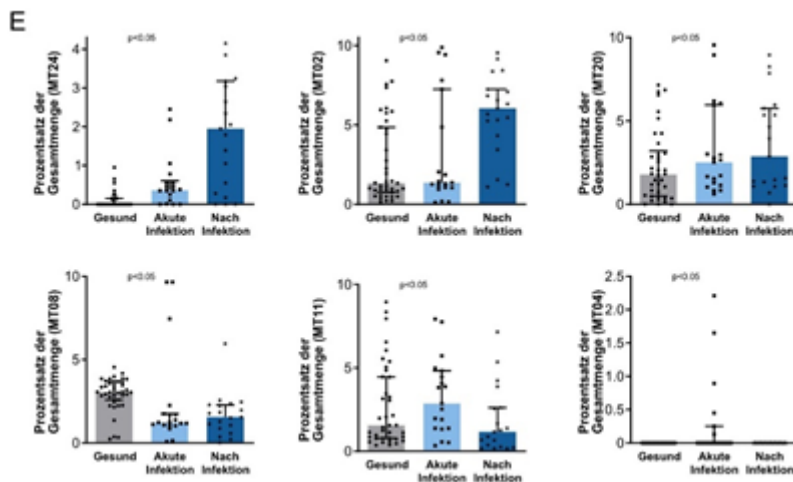
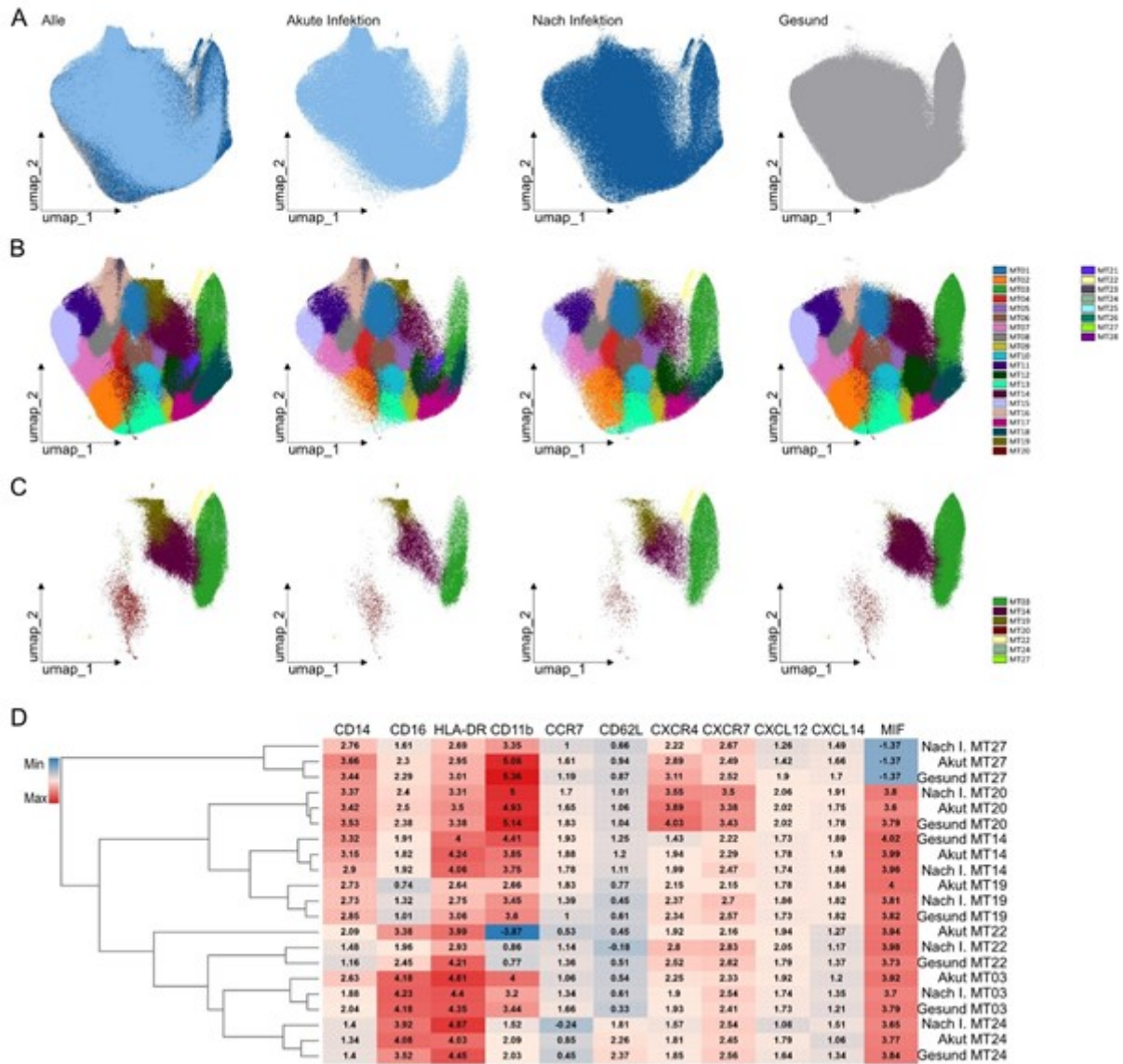


Abbildung 14A, 14B, 14C, 14D und 14E. Immunphänotypisierung und hochdimensionale Analyse von Monozytendaten aus der Durchflusszytometrie. (A) UMAP-Analyse (Neighbours n=70) des Monozyten-Durchflusszytometrie-Panels 2 von SARS-CoV-2-infizierten Patienten im akuten Stadium, drei Monate nach der Infektion und gesunden Kontrollpersonen. Das linke Diagramm zeigt eine Overlay-Grafik und die beiden anderen Diagramme zeigen die einzelnen Patientengruppen und gesunden Kontrollen. (B) Analyse der Monozyten-Subpopulationen. Der PhenoGraph-Algorithmus wurde für das unüberwachte Clustering aller Patientenproben (n=86) verwendet, die mittels Monozyten-Durchflusszytometrie erfasst wurden (nearest neighbors k = 20). Das linke Diagramm zeigt ein Overlay der Monozyten von Patienten in der akuten Infektions- und Rekonvaleszenzphase und der gesunden Kontrollgruppe, gefolgt von Einzeldiagrammen der Monozyten aller Cluster. (C) Die gleiche Analyse der Monozyten-Subpopulationen wird in den unteren Diagrammen gezeigt, die nur signifikant unterschiedliche Cluster darstellen. (D) Geclusterte Heatmaps der signifikant unterschiedlichen Cluster MT23, MT19, MT17, MT14, MT15 und MT09 aus (C) zeigen die mediane Expression der angegebenen Marker für den Vergleich von Patienten mit akuter Infektion, Patienten in Rekonvaleszenz und gesunden Kontrollpersonen. (E) Box-Plots zeigen die Häufigkeit der Zellen für jeden Cluster für jeden Patienten, geschichtet nach akuter Infektion, Rekonvaleszenz und gesunden Kontrollen. Es werden nur relevante Diagramme gezeigt. Dargestellt: Median \pm IQR; Statistik: Mann-Whitney-U-Test. Die Grafiken wurden mit der Datenanalysesoftware OMIQ erstellt.

3.7.3 Expression von CD14 und CD16 auf der Oberfläche von Monozyten während der akuten Phase und in der Rekonvaleszenzphase

CD14 und CD16 sind wichtige Oberflächenmoleküle auf Monozyten und dienen als Marker für deren Aktivierung und Funktionalität im Immunsystem (Sharygin et al., 2023, Georg et al., 2022). Während der akuten Phase einer Infektion, wie in diesem Fall SARS-CoV-2, werden Monozyten aktiviert, um ihre Rolle in der Immunantwort zu verstärken. Diese Aktivierung führt zu einer erhöhten Expression von CD14 und CD16

auf ihrer Oberfläche. Dies deutet darauf hin, dass Monozyten in dieser Phase besonders funktionsfähig sind und eine Schlüsselrolle bei der Bekämpfung der Infektion spielen könnten (siehe Abbildung 15).



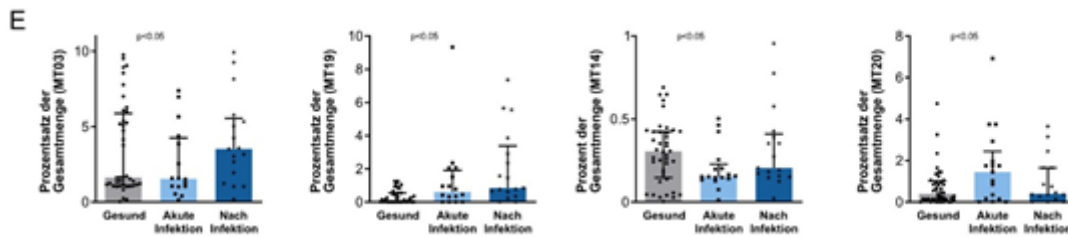


Abbildung 15A, 15B, 15C, 15D und 15E. Immunphänotypisierung und hochdimensionale Analyse von Monozytendaten aus der Durchflusszytometrie. UMAP-Analyse (Neighbours $n=70$) des Monozyten-Durchflusszytometrie-Panels 1 von SARS-CoV-2-infizierten Patienten im akuten Stadium, drei Monate nach der Infektion und gesunden Kontrollpersonen. Das linke Diagramm zeigt eine Overlay-Grafik und die beiden anderen Diagramme zeigen die einzelnen Patientengruppen und gesunden Kontrollen. (B) Analyse der Monozyten-Subpopulationen. Der PhenoGraph-Algorithmus wurde für das unüberwachte Clustering aller Patientenproben ($n=86$) verwendet, die mittels Monozyten-Durchflusszytometrie erfasst wurden (nearest neighbors $k = 20$). Das linke Diagramm zeigt ein Overlay der Monozyten von Patienten in der akuten Infektions- und Rekonvaleszenzphase und der gesunden Kontrollgruppe, gefolgt von Einzeldiagrammen der Monozyten aller Cluster. (C) Die gleiche Analyse der Monozyten-Subpopulationen wird in den unteren Diagrammen gezeigt, die nur signifikant unterschiedliche Cluster darstellen. (D) Geclusterte Heatmaps der signifikant unterschiedlichen Cluster MT27, MT20, MT14, MT19, MT22, MT03 und MT24 aus (C) zeigen die mediane Expression der angegebenen Marker im Vergleich zwischen der akuten Infektionsphase und der Rekonvaleszenzphase. (E) Boxplots zeigen die Häufigkeit der Zellen in jedem Cluster für jeden Patienten, geschichtet nach akuter Infektionsphase, Rekonvaleszenzphase und gesunden Kontrollpersonen. Es werden nur relevante Diagramme gezeigt. Dargestellt: Median \pm IQR; Statistik: Mann-Whitney-U-Test. Die Grafiken wurden mit der Datenanalysesoftware OMIQ erstellt.

3.8 MIF-Plasmaspiegel in der akuten Phase der SARS-CoV-2-Infektion

Vor diesem Hintergrund untersuchten wir, ob die systemische Entzündung während der akuten Phase einer SARS-CoV-2-Infektion charakterisiert werden kann. Dazu untersuchten wir das Plasma von unseren Patienten sowohl während der akuten Infektionsphase als auch nach einer dreimonatigen Rekonvaleszenzphase. Unsere Analyse umfasste ein Entzündungspanel von 26 Chemokinen und Zytokinen. Die Plasmaspiegel mehrerer proinflammatorischer Mediatoren, nämlich MIF, CXCL10, IL-18, CCL2, IL-6, IL-8, IFN- γ und CXCL11, zeigten während der akuten Infektionsphase bei Patienten mit CVD und/ oder CVRF im Vergleich zur Rekonvaleszenzphase signifikante Erhöhungen. Beispielsweise waren die Plasmaspiegel von MIF in der

akuten Phase (Median 1667 pg/mL) im Vergleich zur Rekonvaleszenzphase (Median 625 pg/mL) signifikant erhöht ($p < 0,001$). Interessanterweise waren einige dieser proinflammatorischen Mediatoren, darunter IL-33, CXCL5, CCL11, CXCL1, IL-17A, CCL20 und CCL4, nach drei Monaten der Rekonvaleszenz im Vergleich zur akuten Infektionsphase signifikant erhöht. Beispielsweise zeigte IL-33 einen signifikanten Anstieg ($p = 0,012$) in der Rekonvaleszenzphase (Median 177 pg/mL) im Vergleich zur akuten Phase (Median 36 pg/mL). Andere getestete Mediatoren wie IL-10, IFN- α , IL-23, IL-1 β , CXCL8, CCL5, CCL17, TNF- α , CXCL9, IL-12p70 und CCL3 zeigten ähnliche Plasmaspiegel in beiden Phasen. Wir beobachteten jedoch einen signifikanten Anstieg der proinflammatorischen Chemokine/Zytokine wie MIF, CCL2, IL-6 und IFN- γ während der akuten Infektionsphase. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Infektion mit SARS-CoV-2 mit einer deutlichen Veränderung des Entzündungsprofils im Plasma von Patienten mit CVD und/oder CVRF einhergeht. Der Anstieg bestimmter proinflammatorischer Mediatoren während der akuten Phase und ihre teilweise Persistenz nach der Genesung deuten auf eine mögliche Rolle dieser Mediatoren bei der Hyperinflammation während der Infektion hin (akute vs. Rekonvaleszenzphase; MIF: pg/mL; Median; 1667 (IQR 1055 - 2994) vs 625 (IQR 424 - 1029), $p < 0,001$; CXCL10: pg/mL; Median; 583 (IQR 117 - 1045) vs 80 (IQR 45 - 106), $p < 0,0001$; IL-18: pg/mL; Median; 322 (IQR 189 - 517) vs 40 (IQR 14 - 116), $p < 0,0001$; CCL2: pg/mL; Median; 287 (IQR 233 - 564) vs 226 (IQR 183 - 267), $p = 0,003$; IL-6: pg/mL; Median; 50 (IQR 29 - 146) vs 11 (IQR 8 - 21), $p < 0,001$; IL-8: pg/mL; Median; 33 (IQR 17 - 81) vs 8 (IQR 6 - 21), $p < 0,001$; IFN- γ : pg/mL; Median; 20 (IQR 14 - 35) vs 7 (IQR 3 - 19), $p < 0,02$; CXCL11: pg/mL; Median; 9 (IQR 8 - 46) vs 6 (IQR 6 - 9), $p < 0,002$ (siehe Abbildung 16)

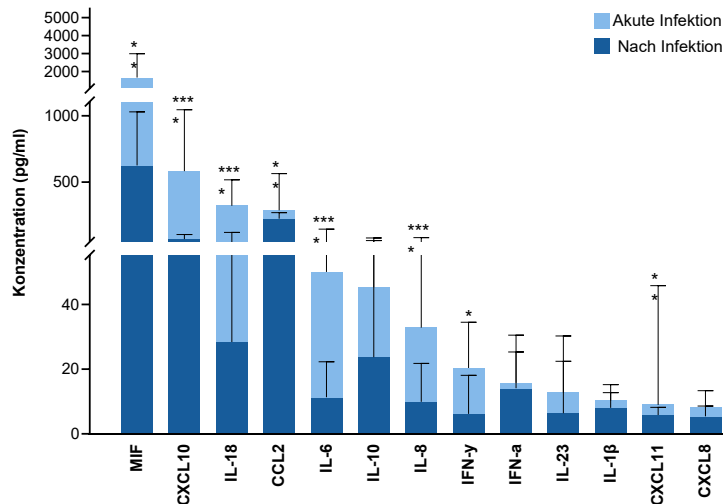


Abbildung 16. Untersuchung von Zytokin-Konzentrationen im Plasma. In 23 Plasmaproben von SARS-CoV-2-infizierten Patienten im akuten Stadium und drei Monate nach der Infektion wurden verschiedene Zytokin- und Chemokinkonzentrationen mittels LEGENDPlex und die MIF-Konzentration im Plasma mittels ELISA bestimmt. Dargestellt ist die Konzentration (pg/ml) der angegebenen Zytokine/Chemokine (A) MIF, CXCL10, IL-18, CCL2, IL-6, IL-10, IL-8, IFN- γ , IFN- α , IL-23, IL-1 β , CXCL11 und CXCL8 (B) CCL5, IL-33, CXCL5, CCL11, CCL17, CXCL1, TNF- α , CXCL9, IL-12p70, IL-17A, CCL3, CCL20 und CCL4. Dargestellt: Median und IQR; Statistik: Mann-Whitney-U-Test. Für diese Analyse wurde ein p-Wert $\leq 0,050$ als signifikant angesehen und mit * gekennzeichnet, ein p-Wert $\leq 0,010$ mit ** gekennzeichnet, ein p-Wert $\leq 0,001$ mit *** gekennzeichnet und ein p-Wert $\leq 0,0001$ mit **** gekennzeichnet.

Interessanterweise waren IL-33, CXCL5, CCL11, CXCL1, IL-17A, CCL20 und CCL4 nach drei Monaten signifikant höher als zum Zeitpunkt der akuten Infektion (akute vs. Rekonvaleszenzphase; IL-33: pg/mL; Median; 36 (IQR 14 - 85) vs 177 (IQR 39 - 359), $p=0,011$; CXCL5: pg/mL; Median; 108 (IQR 37 - 163) vs 151 (IQR 67 - 235), $p=0,04$; CCL11: pg/mL; Median; 22 (IQR 16 - 36) vs 45 (IQR 36 - 49), $p=0,0003$; CXCL1: pg/mL; Median; 18 (IQR 18 - 71) vs 35 (IQR 21 - 78), $p=0,05$; IL-17A: pg/mL; Median; 1 (IQR 0,5 - 2,5) vs 8 (IQR 3 - 13), $p=0,01$; CCL20: pg/mL; Median; 4,6 (IQR 4,6 - 6) vs 6 (IQR 6 - 10), $p=0,001$; CCL4: pg/mL; Median; 2 (IQR 2 - 3) vs 3 (IQR 3,1 - 3,2), $p=0,0002$ (siehe Abbildung 17).

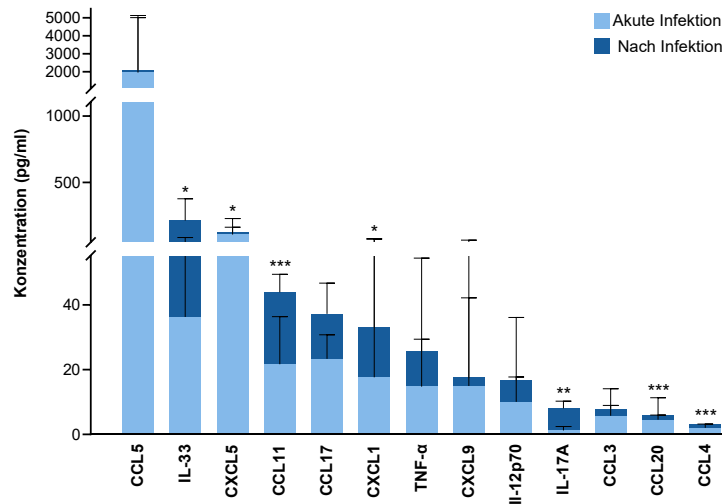


Abbildung 17. Untersuchung von Zytokin-Konzentrationen im Plasma. In 23 Plasmaproben von SARS-CoV-2-infizierten Patienten im akuten Stadium und drei Monate nach der Infektion wurden verschiedene Zytokin- und Chemokinkonzentrationen mittels LEGENDPlex und die MIF-Konzentration im Plasma mittels ELISA analysiert. Dargestellt ist die Konzentration (pg/ml) der angegebenen Zytokine/Chemokine (A) MIF, CXCL10, IL-18, CCL2, IL-6, IL-10, IL-8, IFN- γ , IFN- α , IL-23, IL-1 β , CXCL11 und CXCL8 (B) CCL5, IL-33, CXCL5, CCL11, CCL17, CXCL1, TNF- α , CXCL9, IL-12p70, IL-17A, CCL3, CCL20 und CCL4. Dargestellt: Median mit Interquartilsbereich (IQR); Statistik: Mann-Whitney-U-Test. Für diese Analyse wurde ein p-Wert $\leq 0,050$ als signifikant angesehen und mit * gekennzeichnet, ein p-Wert $\leq 0,010$ mit ** gekennzeichnet, ein p-Wert $\leq 0,001$ mit *** gekennzeichnet und ein p-Wert $\leq 0,0001$ mit **** gekennzeichnet.

4 Diskussion

4.1 Kernaussagen der Studie

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit sind:

1. Eine akute schwere SARS-CoV-2-Infektion geht mit einer signifikanten Abnahme der zirkulierenden nicht-klassischen (CD14^{dim}CD16⁺) Monozyten einher. Der Plasmaspiegel dieses Monozyten-Subtyps steigt nach einer Rekonvaleszenz von drei Monaten wieder an und nähert sich den Werten der gesunden Kontrollgruppe an.
2. Während der akuten SARS-CoV-2-Infektion sind der adhäsive (CD11b⁺) und der inflammatorische (ACKR3⁺, CCR2⁺, CXCL12⁺, CXCL14⁺) Phänotyp der zirkulierenden Monozyten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant verändert. Auch hier konnte nach drei Monaten Rekonvaleszenz eine Erholung beobachtet werden, so dass diese Subtypen mit denen der gesunden Kontrollgruppe vergleichbar waren.
3. Die MIF-Expression war in allen Monozyten-Subtypen nach drei Monaten Rekonvaleszenz höher als zum Zeitpunkt der akuten SARS-CoV-2-Infektion und höher als in der gesunden Kontrollgruppe.
4. Das Chemokin-Profilung zeigte signifikante Unterschiede zwischen der akuten Infektionsphase und der Phase nach drei Monaten Rekonvaleszenz. Die Plasmaspiegel der Chemokine der akuten Phase waren während der akuten SARS-CoV-2-Infektion signifikant höher als nach drei Monaten Rekonvaleszenz. Einige Chemokine (IL-33, CCL11, CXCL1, IL17A) zeigten jedoch erhöhte Plasmaspiegel nach drei Monaten.

4.2 Persistierende Immunaktivierung nach schwerer SARS-CoV-2-Infektion bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen und/oder kardiovaskulären Risikofaktoren

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung von Veränderungen der Monozyten-Subtypen und relevanter Plasma-Chemokine während der akuten COVID-19- und der Rekonvaleszenzphase mit einer Nachbeobachtungszeit von 3 Monaten bei Patienten mit CVD und/oder CVRF. Wir haben uns in unserer Studie auf diese Patientengruppe konzentriert, da sie ein erhöhtes Risiko für kardiopulmonale Schädigung und Multiorganversagen haben (Schieffer et al., 2021, 2022b). Eine SARS-CoV-2-Infektion ist zudem durch proinflammatorische und prothrombotische Ereignisse gekennzeichnet, die bei Patienten mit CVD, insbesondere bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK), aufgrund einer möglicherweise vorbestehenden rechtsventrikulären und diastolischen Dysfunktion zu einer akuten Rechtsherzinsuffizienz führen können. (Tang et al., 2020, Dandel, 2022). Darüber hinaus wurde die Infiltration von entzündlichen Immunzellen wie Monozyten oder Makrophagen bei KHK-Patienten mit atherosklerotischen Läsionen in Verbindung gebracht, die auf eine erhöhte Expression von Zytokinen zurückzuführen sind (Woollard and Geissmann, 2010, Swirski and Nahrendorf, 2018, Wolf and Ley, 2019).

Ferner kann eine schwere SARS-CoV-Infektion mit einer systemischen Hyperinflammation einhergehen (Silva et al., 2023). Klinisch kann sie sich durch respiratorische Insuffizienz, Mikrozirkulationsstörungen und Multiorganversagen manifestieren (Cenko et al., 2021, Gustine and Jones, 2021, Iba et al., 2020). So konnte kürzlich gezeigt werden, dass bei KHK-Patienten mit zusätzlich schwerem COVID-19 eine Monozytenaktivierung mit vermehrter pulmonaler Sequestrierung insbesondere nicht-klassischer Monozyten ($CD14^{dim}CD16^{+}$) auftritt, meist begleitet von einer Verschlechterung der respiratorischen Situation (Mueller et al., 2021, Chilunda et al., 2021, Degauque et al., 2021).

Unsere Daten deuten darauf hin, dass sowohl in der akuten als auch in der Rekonvaleszenzphase einer SARS-CoV-2-Infektion signifikante Veränderungen der zirkulierenden Monozyten und Chemokine bei Patienten mit CVD und/oder CVRF auftreten. Die erhöhte intrazelluläre MIF-Expression in klassischen ($CD14^{++}CD16^{-}$), intermediären ($CD14^{+}CD16^{+}$) und nicht-klassischen ($CD14^{dim}CD16^{+}$) Monozyten und der Anstieg bestimmter Chemokine in der Erholungsphase zeigen an, dass die

Immunantwort über das akute infektiöse Geschehen hinaus anhält und sogar langfristige Veränderungen der Monozyten-Subtypen und ihrer Zytokine verursacht. Es ist daher anzunehmen, dass Monozyten als entscheidende Entzündungszellen an der akuten Infektionsabwehr beteiligt sind. Bei der Nachbeobachtung nach drei Monaten berichtete fast die Hälfte der untersuchten Patienten (43,5 %) über anhaltende Atemnot, fünf Patienten (21,7 %) klagten über chronische Müdigkeit als auffälligstes klinisches Symptom und Anzeichen einer möglichen Long-COVID. 56,5 % der eingeschlossenen Patienten zeigten eine vollständige klinische Genesung von der anfänglich schweren SARS-CoV-2-Infektion und waren frei von kardiovaskulären und neurologischen Symptomen.

4.3 Persistierende Immunaktivierung und erhöhte Expression von MIF

Des Weiteren stellten wir fest, dass die Veränderungen der Monozyten-Subtypen in einem dreimonatigen Zeitraum sehr dynamisch waren. Ein auffälliges Ergebnis war, dass die MIF-Expression in Monozyten in der akuten Phase der SARS-CoV-2-Infektion, verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe nicht verändert war, jedoch drei Monate später anstieg. MIF ist ein Chemokin-ähnliches Protein, das ubiquitär exprimiert wird und sich als wichtiger Regulator der angeborenen Immunität erwiesen hat (Calandra et al., 1998). Die Bindung von MIF an Zellen induziert die Aktivierung von NF- κ B, was zu einer verstärkten Expression von proinflammatorischen Zytokinen führt. Dies fördert Entzündungsprozesse, Zellmigration und Zellüberlebensmechanismen (Calandra et al., 1998, Kim et al., 2017).

Unsere Daten unterstreichen auch die Rolle von MIF und zirkulierenden Monozyten bei der Immunabwehr nach einer Virusinfektion mit SARS-CoV-2. Eine anhaltende Expression von MIF in zirkulierenden Monozyten kann zur zellbasierten Immunabwehr bei COVID-19 beitragen. Monozyten sind myeloide Zellen und wichtige Bestandteile des angeborenen Immunsystems, die frühe zelluläre Reaktionen bei akuten Infektionen auslösen können. (Jakubzick et al., 2017). Während klassische (CD14⁺⁺CD16⁻) Monozyten für die initiale Entzündungsreaktion entscheidend sind, werden nicht-klassische „patrouillierende“ (CD14^{dim}CD16⁺) Monozyten allgemein als entzündungshemmende Wächter des angeborenen Immunsystems angesehen (Buscher et al., 2017).

Unsere Ergebnisse stimmen mit der aktuellen Literatur überein, die zeigt, dass sich die zirkulierenden Monozyten-Subtypen nach einer Nachbeobachtungszeit von sechs Monaten nach der Infektion wieder normalisieren (Utrero-Rico et al., 2021). Der Großteil der Literatur konzentriert sich auf die Immunphänotypisierung von Monozyten und Makrophagen während der akuten Infektionsphase. Studien zeigen, dass inflammatorische Monozyten hyperaktiviert sind und große Mengen proinflammatorischer Zytokine sezernieren (Merad and Martin, 2020, Knoll et al., 2021). Es ist daher anzunehmen, dass insbesondere MIF-positive Monozyten ein Zeichen für eine schwere SARS-CoV-2-Infektion sind, die zur Immunität und Reinfektion beitragen kann.

4.4 Veränderungen des Zytokinprofils als Hinweis auf die anhaltende Immunantwort

Die obige Schlussfolgerung wird durch die Tatsache untermauert, dass eine Vielzahl von Chemokinen (z.B. IL-33, CCL17, CXCL1, IL-17A) noch Monate nach der SARS-CoV-2-Infektion erhöht waren. IL-33 ist ein Zytokin, das die Aktivierung von T-Helfer-2-Zellen (Th2) induziert (Komai-Koma et al., 2007). CCL17 ist chemotaktisch für T-Regulatorzellen. CXCL1 dient als Chemoattraktor für Neutrophile (Sawant et al., 2016, Metzemaekers et al., 2020). IL-17A wurde mit der Immunantwort auf infektiöse Pathogene in Verbindung gebracht (Ge et al., 2020). Unsere Beobachtungen deuten darauf hin, dass diese erhöhten Zytokin-/Chemokin-Spiegel auch mit einer veränderten und sogar teilweise verstärkten Immunantwort assoziiert sind, selbst nach einer dreimonatigen Erholungsphase nach COVID-19. Allerdings können wir derzeit nicht nachweisen, dass die hier beobachteten Veränderungen der Plasma-Chemokine und der zirkulierenden Monozyten-Subtypen eine Rolle für einen anhaltenden Schutz vor einer erneuten Infektion mit SARS-CoV-2 spielen. Wir kommen zu dem Schluss, dass Patienten mit CVD und/oder CVRF und akuter SARS-CoV-2-Infektion nach drei Monaten Genesung Veränderungen im Monozytenphänotyp und im Chemokinprofil zeigen. Man kann spekulieren, dass die MIF-Expression als zusätzlicher Biomarker dienen könnte, um Patienten zu identifizieren, bei denen das Risiko einer veränderten, möglicherweise verlängerten Immunantwort nach einer akuten SARS-CoV-2-Infektion besteht.

4.5 Vergleich mit bereits vorhandenen Forschungsergebnissen und andere mögliche Erklärungen für unsere Resultate

Unsere Ergebnisse werden durch andere Studien bestätigt. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit untersuchte den Zusammenhang zwischen spezifischen immunologischen Reaktionen und der allmählichen Wiederherstellung der Immunhomöostase nach einer schweren SARS-CoV-2-Infektion (Torres-Ruiz et al., 2022). Es konnte hier gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen der Schwere der Symptome und der Entwicklung einer persistierenden humoralen Immunantwort besteht. Eine anhaltende Erhöhung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF-Alpha wurde hierbei nachgewiesen.

Ein besonders auffälliges Ergebnis unserer Studie war, dass die Expression von MIF in Monozyten während der akuten Phase der SARS-CoV-2-Infektion im Vergleich zu gesunden Probanden unverändert blieb. Wie oben erwähnt, wurde jedoch nach drei Monaten Rekonvaleszenz ein signifikanter Anstieg dieses Zytokins in der Studienpopulation beobachtet. Ob MIF möglicherweise nicht primär an der akuten Entzündungsreaktion beteiligt ist, dafür aber eine Rolle bei der Chronifizierung der Entzündung spielt, sollte in größeren Studien untersucht werden. Eine langfristige epigenetische Reprogrammierung der Monozyten könnte eine weitere Erklärung dafür sein. Ähnliche Hypothesen hatten unsere Kollegen Theobald et al. bereits für SARS-CoV-2 und Makrophagen formuliert (Theobald et al., 2021).

Als eine weitere alternative Erklärung ist eine persistierende Viruslast in Immunzellen zu diskutieren. Bereits für Epstein-Barr-Viren oder Herpesviren wurden ähnliche Mechanismen beschrieben (Hatton et al., 2014). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass SARS-CoV-2 in bestimmten Organen länger persistiert als in anderen (Natarajan et al., 2022). Ob ähnliche Mechanismen für den Anstieg der MIF während der Rekonvaleszenz verantwortlich sind, muss noch untersucht werden.

4.6. Klinische Relevanz und mögliche Konsequenzen für die weitere Forschung

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass Patienten mit CVD und/oder CVRF nach einer schweren SARS-CoV-2-Infektion eine verlängerte Aktivierung des Immunsystems zeigen. Dies geht einher mit persistierenden Veränderungen der

Monozyten-Subtypen und einer erhöhten Expression von MIF. Aus unseren Daten lassen sich verschiedene Hypothesen ableiten, die jedoch in Langzeitbeobachtungsstudien mit einer größeren Studienpopulation überprüft werden müssten:

- Da wir von einer unvollständigen Erholung der nicht-klassischen ($CD14^{dim}CD16^{+}$) Monozyten ausgehen, könnten die verschiedenen Monozyten-Subtypen als Biomarker für ein verändertes Immunsystem dienen
- Darüber hinaus könnte MIF genutzt werden, um Patienten mit erhöhtem Risiko für kardiovaskuläre Spätfolgen frühzeitig zu identifizieren
- Zur Wiederherstellung der Monozyten-Homoöstase könnte ggf. sogar eine Immunmodulation beitragen

4.7. Limitation unserer Studie

Wir sind uns bewusst, dass unsere Studie eher beobachtend und hypothesengenerierend ist, insbesondere da die Analyse durch die geringe Anzahl von Patienten in der Beobachtungsgruppe eingeschränkt ist. Darüber hinaus können wir nur Daten nach einer Nachbeobachtungszeit von drei Monaten liefern und keine Daten nach sechs oder zwölf Monaten. Daher sind unsere Daten auch in ihrer Aussagekraft bezüglich Long-COVID begrenzt. Zur Validierung unserer Beobachtungen zum prädiktiven Wert von MIF und anderen proinflammatorischen Zytokinen für die Erholung der Immunantwort nach einer akuten SARS-CoV-2-Infektion und deren Auswirkungen auf die Prognose von Patienten mit einem Risiko für einen ungünstigen Verlauf von COVID-19 und Long-COVID sind groß angelegte randomisierte Studien erforderlich.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist das Fehlen funktioneller Tests in unserer Studie. Wir konnten zwar Immunveränderungen nachweisen, aber nicht, wie diese Veränderungen die tatsächliche Immunfunktion und insbesondere die klinischen Symptome beeinflussen. In diesem Zusammenhang sollte auch untersucht werden, ob diese Veränderungen typisch für Patienten mit CVD und/oder CVRF mit schwerer SARS-CoV-2-Infektion sind oder ob sie z.B. auch bei anderen viralen Erregern in einer ähnlichen Studienpopulation zu finden sind.

5 Zusammenfassung

Ausgangspunkt dieser Studie war die COVID-19-Pandemie. Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen (CVD) und/oder kardiovaskulären Risikofaktoren (CVRF) zeichneten sich durch schwere COVID-19-Verläufe aus. Dies zeigte sich bereits früh im Verlauf der Pandemie, wobei die systemische Hyperinflammation als Ursache angenommen wurde. Die akute Immunantwort auf SARS-CoV-2 ist gut charakterisiert, jedoch gibt es bisher nur wenige Daten zu persistierenden Immunveränderungen nach der akuten Infektion. Ziel der Studie war daher die Untersuchung der Monozyten-Subtypen und Zytokin-Profile von Patienten mit CVD und/oder CVRF, die an einer schweren COVID-19 erkrankt waren. Besonderes Augenmerk wurde auf deren Veränderungen innerhalb von drei Monaten gelegt. Der Makrophagenmigrations-Inhibitionsfaktor (MIF), ein proinflammatorisches Zytokin, das eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Immunantwort spielt, wurde in diesem Zusammenhang besonders berücksichtigt.

Ausgehend davon, haben wir unsere Arbeit auf die Untersuchung von 23 Patienten mit CVD und/oder CVRF und schwerer akuter SARS-CoV-2-Infektion konzentriert. Diese wurden innerhalb von 12 Stunden nach Aufnahme in die Klinik in die Studie eingeschlossen. Als Vergleichsgruppe dienten 40 gesunde Personen. Neben klinischer Untersuchung, Anamnese und apparativer Diagnostik wurden umfangreiche laborchemische Untersuchungen durchgeführt. Nach einer Rekonvaleszenzzeit von drei Monaten wurden die 23 Patienten erneut untersucht.

Klinisch hatten sie sich von der akuten SARS-CoV-2-Infektion erholt, die radiologischen Befunde waren rückläufig. Nur ein Patient wurde in diesem Zeitraum wegen eines NSTEMI hospitalisiert. Die Analyse des Zytokin-Panels und die Charakterisierung der Monozyten zeigten, dass es während der akuten Infektion zu einer signifikanten Reduktion der nicht-klassischen ($CD14^{dim}CD16^{+}$) Monozyten gekommen war. Nach drei Monaten konnte eine Erholung beobachtet werden, die Anzahl der Monozyten erreichte jedoch nicht das Niveau der Kontrollgruppe. Die Expression von MIF war in der akuten Phase kaum verändert, nach drei Monaten zeigte sich jedoch ein signifikanter Anstieg der intrazellulären MIF-Expression in allen Monozyten-Subtypen. Überraschenderweise sank gleichzeitig die Konzentration von MIF im Plasma. Dies deutet auf eine gewebespezifische Immunantwort oder einen erhöhten Verbrauch durch Immunzellen hin. Darüber hinaus konnte auch nach drei

Monaten Rekonvaleszenz ein Anstieg der Zytokine IL-33, CCL17, CXCL1 und IL17A festgestellt werden. Diese Zytokine werden mit der Aktivierung von T-Zellen, der Rekrutierung von Neutrophilen und der Persistenz der Entzündung in Verbindung gebracht.

Die Ergebnisse sind in vielerlei Hinsicht von klinischer Bedeutung. Sie legen nahe, dass die Aktivierung des Immunsystems bei Patienten mit CVD und/oder CVRF nach einer schweren SARS-CoV-2-Infektion die akute Phase überdauert. Die erhöhte Expression von MIF könnte zur Pathogenese der kardiovaskulären Spätfolgen beitragen. Dies impliziert, dass MIF als potenzieller Biomarker für eine anhaltende Immunantwort nach COVID-19 und möglicherweise sogar als Zielstruktur für Therapien dienen könnte.

Angesichts des weltweiten Ausmaßes von COVID-19 mit Millionen von Todesfällen ist die Definition von Risikofaktoren und deren detaillierte Untersuchung von großer Bedeutung. Eine Limitation unserer Studie in diesem Zusammenhang war vor allem die begrenzte Stichprobengröße und die kurze Nachbeobachtungszeit. Zukünftig sind daher größere Studien mit einer deutlich längeren Nachbeobachtungszeit notwendig. Solche gezielten Studien sollen ebenso dazu beitragen, präventive Strategien zu entwickeln.

6 Literaturverzeichnis

- 2022a. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes Care*, 45, S17-s38.
- 2022b. ESC guidance for the diagnosis and management of cardiovascular disease during the COVID-19 pandemic: part 2-care pathways, treatment, and follow-up. *Eur Heart J*, 43, 1059-1103.
- ADA 2022. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes Care*, 45, S17-s38.
- ALI, R. A., WUESCHER, L. M. & WORTH, R. G. 2015. Platelets: essential components of the immune system. *Curr Trends Immunol*, 16, 65-78.
- ALLEN, S. J., CROWN, S. E. & HANDEL, T. M. 2007. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol*, 25, 787-820.
- AMIN, M., SOROOR, M. K. & KASRY, A. 2020. Comparing the Binding Interactions in the Receptor Binding Domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *J Phys Chem Lett*, 11, 4897-4900.
- AN, Y., XU, B. T., WAN, S. R., MA, X. M., LONG, Y., XU, Y. & JIANG, Z. Z. 2023. The role of oxidative stress in diabetes mellitus-induced vascular endothelial dysfunction. *Cardiovasc Diabetol*, 22, 237.
- ANDERSSON, C., NAYOR, M., TSAO, C. W., LEVY, D. & VASAN, R. S. 2021. Framingham Heart Study: JACC Focus Seminar, 1/8. *J Am Coll Cardiol*, 77, 2680-2692.
- ARNAOUT, M. A. 1990. Leukocyte adhesion molecules deficiency: its structural basis, pathophysiology and implications for modulating the inflammatory response. *Immunol Rev*, 114, 145-80.
- ARVANITIS, M. & LOWENSTEIN, C. J. 2023. Dyslipidemia. *Ann Intern Med*, 176, Itc81-itc96.
- ASSOCIATION, A. D. & COMMITTEE, P. P. 2022. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes Care*, 45, S17-s38.
- BACHELERIE, F., BEN-BARUCH, A., BURKHARDT, A. M., COMBADIÈRE, C., FARBER, J. M., GRAHAM, G. J., HORUK, R., SPARRE-ULRICH, A. H., LOCATI, M., LUSTER, A. D., MANTOVANI, A., MATSUSHIMA, K., MURPHY, P. M., NIBBS, R., NOMIYAMA, H., POWER, C. A., PROUDFOOT, A. E., ROSENKILDE, M. M., ROT, A., SOZZANI, S., THELEN, M., YOSHIE, O. & ZLOTNIK, A. 2014. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacol Rev*, 66, 1-79.
- BÄCKHED, F., DING, H., WANG, T., HOOPER, L. V., KOH, G. Y., NAGY, A., SEMENKOVICH, C. F. & GORDON, J. I. 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 15718-23.
- BALLARD-HERNANDEZ, J. & SALL, J. 2023. Dyslipidemia Update. *Nurs Clin North Am*, 58, 295-308.
- BARTEE, E. & MCFADDEN, G. 2013. Cytokine synergy: an underappreciated contributor to innate antiviral immunity. *Cytokine*, 63, 237-40.
- BECHT, E., MCINNES, L., HEALY, J., DUTERTRE, C. A., KWOK, I. W. H., NG, L. G., GINHOUX, F. & NEWELL, E. W. 2018. Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP. *Nat Biotechnol*.
- BERBERICH, A. J. & HEGELE, R. A. 2022. A Modern Approach to Dyslipidemia. *Endocr Rev*, 43, 611-653.
- BERNARD, I., LIMONTA, D., MAHAL, L. K. & HOBMAN, T. C. 2020. Endothelium Infection and Dysregulation by SARS-CoV-2: Evidence and Caveats in COVID-19. *Viruses*, 13.
- BERNHAGEN, J., CALANDRA, T., MITCHELL, R. A., MARTIN, S. B., TRACEY, K. J., VOELTER, W., MANOGUE, K. R., CERAMI, A. & BUCALA, R. 1993. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature*, 365, 756-9.
- BEZDEK, S., LENG, L., BUSCH, H., MOUSAVI, S., RADES, D., DAHLKE, M., ZILLIKENS, D., BUCALA, R. & SADIK, C. D. 2018. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Drives Murine Psoriasiform Dermatitis. *Front Immunol*, 9, 2262.

- BLOOM, B. R. & BENNETT, B. 1966. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science*, 153, 80-2.
- BOZZA, F. A., GOMES, R. N., JAPIASSÚ, A. M., SOARES, M., CASTRO-FARIA-NETO, H. C., BOZZA, P. T. & BOZZA, M. T. 2004. Macrophage migration inhibitory factor levels correlate with fatal outcome in sepsis. *Shock*, 22, 309-13.
- BUSCHER, K., MARCOVECCHIO, P., HEDRICK, C. C. & LEY, K. 2017. Patrolling Mechanics of Non-Classical Monocytes in Vascular Inflammation. *Front Cardiovasc Med*, 4, 80.
- CALANDRA, T., SPIEGEL, L. A., METZ, C. N. & BUCALA, R. 1998. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 11383-8.
- CALIRI, A. W., TOMMASI, S. & BESARATINIA, A. 2021. Relationships among smoking, oxidative stress, inflammation, macromolecular damage, and cancer. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 787, 108365.
- CENKO, E., BADIMON, L., BUGIARDINI, R., CLAEYS, M. J., DE LUCA, G., DE WIT, C., DERUMEAUX, G., DOROBANTU, M., DUNCKER, D. J., ERINGA, E. C., GOROG, D. A., HASSAGER, C., HEINZEL, F. R., HUBER, K., MANFRINI, O., MILICIC, D., OIKONOMOU, E., PADRO, T., TRIFUNOVIC-ZAMAKLAR, D., VASILJEVIC-POKRAJIC, Z., VAVLUKIS, M., VILAHUR, G. & TOUSOULIS, D. 2021. Cardiovascular disease and COVID-19: a consensus paper from the ESC Working Group on Coronary Pathophysiology & Microcirculation, ESC Working Group on Thrombosis and the Association for Acute CardioVascular Care (ACVC), in collaboration with the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Cardiovasc Res*, 117, 2705-2729.
- CHAN, J. F., KOK, K. H., ZHU, Z., CHU, H., TO, K. K., YUAN, S. & YUEN, K. Y. 2020. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect*, 9, 221-236.
- CHEN, B. 2019. Molecular Mechanism of HIV-1 Entry. *Trends Microbiol*, 27, 878-891.
- CHEN, B. & FRANGOGIANNIS, N. G. 2021. Chemokines in Myocardial Infarction. *J Cardiovasc Transl Res*, 14, 35-52.
- CHEN, H. R., CHUANG, Y. C., LIN, Y. S., LIU, H. S., LIU, C. C., PERNG, G. C. & YEH, T. M. 2016. Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Induces Vascular Leakage through Macrophage Migration Inhibitory Factor and Autophagy. *PLoS Negl Trop Dis*, 10, e0004828.
- CHILUNDA, V., MARTINEZ-AGUADO, P., XIA, L. C., CHENEY, L., MURPHY, A., VEKSLER, V., RUIZ, V., CALDERON, T. M. & BERMAN, J. W. 2021. Transcriptional Changes in CD16+ Monocytes May Contribute to the Pathogenesis of COVID-19. *Front Immunol*, 12, 665773.
- CHIONG, J. R., ARONOW, W. S., KHAN, I. A., NAIR, C. K., VIJAYARAGHAVAN, K., DART, R. A., BEHRENBECK, T. R. & GERACI, S. A. 2008. Secondary hypertension: current diagnosis and treatment. *Int J Cardiol*, 124, 6-21.
- CHUNG, Y. S., LAM, C. Y., TAN, P. H., TSANG, H. F. & WONG, S. C. 2024. Comprehensive Review of COVID-19: Epidemiology, Pathogenesis, Advancement in Diagnostic and Detection Techniques, and Post-Pandemic Treatment Strategies. *Int J Mol Sci*, 25.
- COILLARD, A. & SEGURA, E. 2019. In vivo Differentiation of Human Monocytes. *Front Immunol*, 10, 1907.
- COMMITTEE, A. D. A. P. P. 2022. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes Care*, 45, S17-s38.
- CONCEICAO, C., THAKUR, N., HUMAN, S., KELLY, J. T., LOGAN, L., BIALY, D., BHAT, S., STEVENSON-LEGGETT, P., ZAGRAJEK, A. K., HOLLINGHURST, P., VARGA, M., TSIRIGOTI, C., TULLY, M., CHIU, C., MOFFAT, K., SILESIA, A. P., HAMMOND, J. A., MAIER, H. J., BICKERTON, E., SHELTON, H., DIETRICH, I., GRAHAM, S. C. & BAILEY, D. 2020. The SARS-CoV-2 Spike protein has a broad tropism for mammalian ACE2 proteins. *PLoS Biol*, 18, e3001016.
- CORWIN, E. J. 2000a. Understanding cytokines. Part I: Physiology and mechanism of action. *Biol Res Nurs*, 2, 30-40.
- CORWIN, E. J. 2000b. Understanding cytokines. Part II: Implications for nursing research and practice. *Biol Res Nurs*, 2, 41-8.

- DA ROSA MESQUITA, R., FRANCELINO SILVA JUNIOR, L. C., SANTOS SANTANA, F. M., FARIAS DE OLIVEIRA, T., CAMPOS ALCÂNTARA, R., MONTEIRO ARNOZO, G., RODRIGUES DA SILVA FILHO, E., GALDINO DOS SANTOS, A. G., OLIVEIRA DA CUNHA, E. J., SALGUEIRO DE AQUINO, S. H. & FREIRE DE SOUZA, C. D. 2021. Clinical manifestations of COVID-19 in the general population: systematic review. *Wien Klin Wochenschr*, 133, 377-382.
- DANDEKAR, R. & BARBASTATHIS, G. 2020. Neural Network aided quarantine control model estimation of COVID spread in Wuhan, China. *arXiv preprint arXiv:2003.09403*.
- DANDEL, M. 2022. Heart-lung interactions in COVID-19: prognostic impact and usefulness of bedside echocardiography for monitoring of the right ventricle involvement. *Heart Fail Rev*, 27, 1325-1339.
- DAVIES, L. C., JENKINS, S. J., ALLEN, J. E. & TAYLOR, P. R. 2013. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol*, 14, 986-95.
- DEGAUQUE, N., HAZIOT, A., BROUARD, S. & MOONEY, N. 2021. Endothelial cell, myeloid, and adaptive immune responses in SARS-CoV-2 infection. *Faseb j*, 35, e21577.
- DIAZ-PAPKOVICH, A., ANDERSON-TROCMÉ, L. & GRAVEL, S. 2021. A review of UMAP in population genetics. *J Hum Genet*, 66, 85-91.
- DÍAZ CREGO, M. A., KOTANIDIS, S. & EUROPEAN PARLIAMENT EUROPEAN PARLIAMENTARY RESEARCH SERVICE MEMBERS' RESEARCH, S. 2020. States of emergency in response to the coronavirus crisis : normative response and parliamentary oversight in the EU Member States during the first wave of the pandemic. Brussels: [European Parliament].
- DING, N., SANG, Y., CHEN, J., BALLEW, S. H., KALBAUGH, C. A., SALAMEH, M. J., BLAHA, M. J., ALLISON, M., HEISS, G., SELVIN, E., CORESH, J. & MATSUSHITA, K. 2019. Cigarette Smoking, Smoking Cessation, and Long-Term Risk of 3 Major Atherosclerotic Diseases. *J Am Coll Cardiol*, 74, 498-507.
- DIVANGAHI, M., KING, I. L. & PERNET, E. 2015. Alveolar macrophages and type I IFN in airway homeostasis and immunity. *Trends Immunol*, 36, 307-14.
- DRUSZCZYŃSKA, M., GODKOWICZ, M., KULEZA, J., WAWROCKI, S. & FOL, M. 2022. Cytokine Receptors-Regulators of Antimycobacterial Immune Response. *Int J Mol Sci*, 23.
- EHIRCHIOU, D., XIONG, Y., XU, G., CHEN, W., SHI, Y. & ZHANG, L. 2007. CD11b facilitates the development of peripheral tolerance by suppressing Th17 differentiation. *J Exp Med*, 204, 1519-24.
- ENSMINGER S, T. H., RUDOLPH V 2024. Der Deutsche Herzbericht – Update 2024 – Eine Zusammenfassung der wichtigsten ErkenntnisseThe German Heart Report—Update 2024—A summary of the most important findings. *Die Kardiologie*, 18.
- EPELMAN, S., LAVINE, K. J. & RANDOLPH, G. J. 2014. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity*, 41, 21-35.
- ESPINOZA, V. E. & EMMADY, P. D. 2022. Histology, Monocytes. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.
- FARNSWORTH, R. H., KARNEZIS, T., MACIBURKO, S. J., MUELLER, S. N. & STACKER, S. A. 2019. The Interplay Between Lymphatic Vessels and Chemokines. *Front Immunol*, 10, 518.
- FERNANDEZ-BOTRAN, R. 1991. Soluble cytokine receptors: their role in immunoregulation. *Faseb j*, 5, 2567-74.
- FINSTERBUSCH, M., SCHROTTMAIER, W. C., KRAL-POINTNER, J. B., SALZMANN, M. & ASSINGER, A. 2018. Measuring and interpreting platelet-leukocyte aggregates. *Platelets*, 29, 677-685.
- GAFFEN, S. L. 2009. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol*, 9, 556-67.
- GALLI, S. J., BORREGAARD, N. & WYNN, T. A. 2011. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol*, 12, 1035-44.
- GAO, J. H., YU, X. H. & TANG, C. K. 2019. CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) in atherosclerosis: An underlying therapeutic target. *Clin Chim Acta*, 495, 538-544.

- GARCÍA-CUESTA, E. M., SANTIAGO, C. A., VALLEJO-DÍAZ, J., JUARRANZ, Y., RODRÍGUEZ-FRADE, J. M. & MELLADO, M. 2019. The Role of the CXCL12/CXCR4/ACKR3 Axis in Autoimmune Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10, 585.
- GE, Y., HUANG, M. & YAO, Y. M. 2020. Biology of Interleukin-17 and Its Pathophysiological Significance in Sepsis. *Front Immunol*, 11, 1558.
- GEORG, P., ASTABURUAGA-GARCÍA, R., BONAGURO, L., BRUMHARD, S., MICHALICK, L., LIPPERT, L. J., KOSTEVC, T., GÄBEL, C., SCHNEIDER, M., STREITZ, M., DEMICHEV, V., GEMÜND, I., BARONE, M., TOBER-LAU, P., HELBIG, E. T., HILLUS, D., PETROV, L., STEIN, J., DEY, H. P., PACLIK, D., IWERT, C., MÜLLEDER, M., AULAKH, S. K., DJUDJAJ, S., BÜLOW, R. D., MEI, H. E., SCHULZ, A. R., THIEL, A., HIPPENSTIEL, S., SALIBA, A. E., EILS, R., LEHMANN, I., MALL, M. A., STRICKER, S., RÖHMEL, J., CORMAN, V. M., BEULE, D., WYLER, E., LANDTHALER, M., OBERMAYER, B., VON STILLFRIED, S., BOOR, P., DEMIR, M., WESSELMANN, H., SUTTORP, N., UHRIG, A., MÜLLER-REDETZKY, H., NATTERMANN, J., KUEBLER, W. M., MEISEL, C., RALSER, M., SCHULTZE, J. L., ASCHENBRENNER, A. C., THIBEAULT, C., KURTH, F., SANDER, L. E., BLÜTHGEN, N. & SAWITZKI, B. 2022. Complement activation induces excessive T cell cytotoxicity in severe COVID-19. *Cell*, 185, 493-512.e25.
- GÉRARD, A., COPE, A. P., KEMPER, C., ALON, R. & KÖCHL, R. 2021. LFA-1 in T cell priming, differentiation, and effector functions. *Trends Immunol*, 42, 706-722.
- GESIERICH, W. 2020. [Not Available]. *Pneumo News*, 12, 10-12.
- GHADGE, S. K., MÜHLSTEDT, S., OZCELIK, C. & BADER, M. 2011. SDF-1 α as a therapeutic stem cell homing factor in myocardial infarction. *Pharmacol Ther*, 129, 97-108.
- GHISLIN, S., OBINO, D., MIDDENDORP, S., BOGGETTO, N., ALCAIDE-LORIDAN, C. & DESHAYES, F. 2012. LFA-1 and ICAM-1 expression induced during melanoma-endothelial cell co-culture favors the transendothelial migration of melanoma cell lines in vitro. *BMC Cancer*, 12, 455.
- GIACCO, F. & BROWNLEE, M. 2010. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*, 107, 1058-70.
- GILLIS, S. 1991. Cytokine receptors. *Curr Opin Immunol*, 3, 315-9.
- GINHOUX, F., MILDNER, A., GAUTIER, E. L., SCHLITZER, A., JAKUBZICK, C., VAROL, C., BAIN, C. & GUERMONPREZ, P. 2021. Editorial: Monocyte Heterogeneity and Function. *Frontiers in Immunology*, 11.
- GUILLIAMS, M., GINHOUX, F., JAKUBZICK, C., NAIK, S. H., ONAI, N., SCHRAML, B. U., SEGURA, E., TUSSIWAND, R. & YONA, S. 2014. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol*, 14, 571-8.
- GUILLIAMS, M., MILDNER, A. & YONA, S. 2018. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity*, 49, 595-613.
- GUSTINE, J. N. & JONES, D. 2021. Immunopathology of Hyperinflammation in COVID-19. *Am J Pathol*, 191, 4-17.
- HARJUNPÄÄ, H., LLORT ASENS, M., GUENTHER, C. & FAGERHOLM, S. C. 2019. Cell Adhesion Molecules and Their Roles and Regulation in the Immune and Tumor Microenvironment. *Front Immunol*, 10, 1078.
- HARREITER, J. & RODEN, M. 2023. [Diabetes mellitus: definition, classification, diagnosis, screening and prevention (Update 2023)]. *Wien Klin Wochenschr*, 135, 7-17.
- HARRISON, S. L., BUCKLEY, B. J. R., RIVERA-CARAVACA, J. M., ZHANG, J. & LIP, G. Y. H. 2021. Cardiovascular risk factors, cardiovascular disease, and COVID-19: an umbrella review of systematic reviews. *Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes*, 7, 330-339.
- HASHIMOTO, D., CHOW, A., NOIZAT, C., TEO, P., BEASLEY, M. B., LEBOEUF, M., BECKER, C. D., SEE, P., PRICE, J., LUCAS, D., GRETER, M., MORTHA, A., BOYER, S. W., FORSBERG, E. C., TANAKA, M., VAN ROOIJEN, N., GARCÍA-SASTRE, A., STANLEY, E. R., GINHOUX, F., FRENETTE, P. S. & MERAD, M. 2013. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*, 38, 792-804.

- HATTON, O. L., HARRIS-ARNOLD, A., SCHAFFERT, S., KRAMS, S. M. & MARTINEZ, O. M. 2014. The interplay between Epstein-Barr virus and B lymphocytes: implications for infection, immunity, and disease. *Immunol Res*, 58, 268-76.
- HE, X. X., YANG, J., DING, Y. W., LIU, W., SHEN, Q. Y. & XIA, H. H. X. 2006. Increased epithelial and serum expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in gastric cancer: potential role of MIF in gastric carcinogenesis. *Gut*, 55, 797.
- HOEHL, S. & CIESEK, S. 2020. [The virology of SARS-CoV-2]. *Pneumologe (Berl)*, 17, 378-384.
- HÖPKEN, U. E., DROESE, J., LI, J. P., JOERGENSEN, J., BREITFELD, D., ZERWES, H. G. & LIPP, M. 2004. The chemokine receptor CCR7 controls lymph node-dependent cytotoxic T cell priming in alloimmune responses. *Eur J Immunol*, 34, 461-70.
- HU, B., GUO, H., ZHOU, P. & SHI, Z. L. 2021a. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol*, 19, 141-154.
- HU, B., HUANG, S. & YIN, L. 2021b. The cytokine storm and COVID-19. *J Med Virol*, 93, 250-256.
- HUGHES, C. E. & NIBBS, R. J. B. 2018. A guide to chemokines and their receptors. *Febs j*, 285, 2944-2971.
- IBA, T., CONNORS, J. M. & LEVY, J. H. 2020. The coagulopathy, endotheliopathy, and vasculitis of COVID-19. *Inflamm Res*, 69, 1181-1189.
- ISHIDA, M., SAKAI, C., KOBAYASHI, Y. & ISHIDA, T. 2024. Cigarette Smoking and Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *J Atheroscler Thromb*, 31, 189-200.
- JAKUBZICK, C. V., RANDOLPH, G. J. & HENSON, P. M. 2017. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat Rev Immunol*, 17, 349-362.
- JOHNSTON, B. & BUTCHER, E. C. 2002. Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. *Semin Immunol*, 14, 83-92.
- KAPPELOS, T. S., BONAGURO, L., GEMÜND, I., REUSCH, N., SAGLAM, A., HINKLEY, E. R. & SCHULTZE, J. L. 2019. Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Frontiers in Immunology*, 10.
- KARWACIAK, I., SAŁKOWSKA, A., KARAŚ, K., DASTYCH, J. & RATAJEWSKI, M. 2021. Nucleocapsid and Spike Proteins of the Coronavirus SARS-CoV-2 Induce IL6 in Monocytes and Macrophages- Potential Implications for Cytokine Storm Syndrome. *Vaccines (Basel)*, 9.
- KASTAUN, S., BROWN, J., BROSE, L. S., RATSCHEN, E., RAUPACH, T., NOWAK, D., CHOLMAKOW-BODECHTEL, C., SHAHAB, L., WEST, R. & KOTZ, D. 2017. Study protocol of the German Study on Tobacco Use (DEBRA): a national household survey of smoking behaviour and cessation. *BMC Public Health*, 17, 378.
- KHAN, S. Q., KHAN, I. & GUPTA, V. 2018. CD11b Activity Modulates Pathogenesis of Lupus Nephritis. *Front Med (Lausanne)*, 5, 52.
- KIM, M. J., KIM, W. S., KIM, D. O., BYUN, J. E., HUY, H., LEE, S. Y., SONG, H. Y., PARK, Y. J., KIM, T. D., YOON, S. R., CHOI, E. J., HA, H., JUNG, H. & CHOI, I. 2017. Macrophage migration inhibitory factor interacts with thioredoxin-interacting protein and induces NF-κB activity. *Cell Signal*, 34, 110-120.
- KIM, S. J., MESQUITA, F. C. P. & HOCHMAN-MENDEZ, C. 2023. New Biomarkers for Cardiovascular Disease. *Tex Heart Inst J*, 50.
- KNOLL, R., SCHULTZE, J. L. & SCHULTE-SCHREPPING, J. 2021. Monocytes and Macrophages in COVID-19. *Front Immunol*, 12, 720109.
- KOMAI-KOMA, M., XU, D., LI, Y., MCKENZIE, A. N., MCINNES, I. B. & LIEW, F. Y. 2007. IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. *Eur J Immunol*, 37, 2779-86.
- KRAUS, S., KOLMAN, T., YEUNG, A. & DEMING, D. 2021. Chemokine Receptor Antagonists: Role in Oncology. *Curr Oncol Rep*, 23, 131.
- KULLMANN, S., VALENTA, V., WAGNER, R., TSCHRITTER, O., MACHANN, J., HÄRING, H.-U., PREISSEL, H., FRITSCHKE, A. & HENI, M. 2020. Brain insulin sensitivity is linked to adiposity and body fat distribution. *Nature Communications*, 11, 1841.
- LAM, F. W., VIJAYAN, K. V. & RUMBAUT, R. E. 2015. Platelets and Their Interactions with Other Immune Cells. *Compr Physiol*, 5, 1265-80.

- LARRICK, J. W. & WRIGHT, S. C. 1992. Native cytokine antagonists. *Baillieres Clin Haematol*, 5, 681-702.
- LEVINE, J. H., SIMONDS, E. F., BENDALL, S. C., DAVIS, K. L., AMIR EL, A. D., TADMOR, M. D., LITVIN, O., FIENBERG, H. G., JAGER, A., ZUNDER, E. R., FINCK, R., GEDMAN, A. L., RADTKE, I., DOWNING, J. R., PE'ER, D. & NOLAN, G. P. 2015. Data-Driven Phenotypic Dissection of AML Reveals Progenitor-like Cells that Correlate with Prognosis. *Cell*, 162, 184-97.
- LIN, X. & LI, H. 2021. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 12, 706978.
- LIRA, S. A. & FURTADO, G. C. 2012. The biology of chemokines and their receptors. *Immunol Res*, 54, 111-20.
- MACH, F., BAIGENT, C., CATAPANO, A. L., KOSKINAS, K. C., CASULA, M., BADIMON, L., CHAPMAN, M. J., DE BACKER, G. G., DELGADO, V., FERENEC, B. A., GRAHAM, I. M., HALLIDAY, A., LANDMESSER, U., MIHAYLOVA, B., PEDERSEN, T. R., RICCARDI, G., RICHTER, D. J., SABATINE, M. S., TASKINEN, M.-R., TOKGOZOGLU, L., WIKLUND, O. & GROUP, E. S. C. S. D. 2020. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk: The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS). *European Heart Journal*, 41, 111-188.
- MAGNUSSEN, C., OJEDA, F. M., LEONG, D. P., ALEGRE-DIAZ, J., AMOUYEL, P., AVILES-SANTA, L., DE BACQUER, D., BALLANTYNE, C. M., BERNABÉ-ORTIZ, A., BOBAK, M., BRENNER, H., CARRILLO-LARCO, R. M., DE LEMOS, J., DOBSON, A., DÖRR, M., DONFRANCESCO, C., DRYGAS, W., DULLAART, R. P., ENGSTRÖM, G., FERRARIO, M. M., FERRIÈRES, J., DE GAETANO, G., GOLDBOURT, U., GONZALEZ, C., GRASSI, G., HODGE, A. M., HVEEM, K., IACOVIELLO, L., IKRAM, M. K., IRAZOLA, V., JOBE, M., JOUSILAHTI, P., KALEEBU, P., KAVOUSI, M., KEE, F., KHALILI, D., KOENIG, W., KONTSEVAYA, A., KUULASMAA, K., LACKNER, K. J., LEISTNER, D. M., LIND, L., LINNEBERG, A., LORENZ, T., LYNGBAKKEN, M. N., MALEKZADEH, R., MALYUTINA, S., MATHIESEN, E. B., MELANDER, O., METSPALU, A., MIRANDA, J. J., MOITRY, M., MUGISHA, J., NALINI, M., NAMBI, V., NINOMIYA, T., OPPERMANN, K., D'ORSI, E., PAJAK, A., PALMIERI, L., PANAGIOTAKOS, D., PERIANAYAGAM, A., PETERS, A., POUSTCHI, H., PRENTICE, A. M., PRESCOTT, E., RISÉRUS, U., SALOMAA, V., SANS, S., SAKATA, S., SCHÖTTKER, B., SCHUTTE, A. E., SEPANLOU, S. G., SHARMA, S. K., SHAW, J. E., SIMONS, L. A., SÖDERBERG, S., TAMOSIUNAS, A., THORAND, B., TUNSTALL-PEDOE, H., TWERENBOLD, R., VANUZZO, D., VERONESI, G., WAIBEL, J., WANNAMETHEE, S. G., WATANABE, M., WILD, P. S., YAO, Y., ZENG, Y., ZIEGLER, A. & BLANKENBERG, S. 2023. Global Effect of Modifiable Risk Factors on Cardiovascular Disease and Mortality. *N Engl J Med*, 389, 1273-1285.
- MAHAD, D. J. & RANSOHOFF, R. M. 2003. The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Semin Immunol*, 15, 23-32.
- MAHMOOD, S. S., LEVY, D., VASAN, R. S. & WANG, T. J. 2014. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. *Lancet*, 383, 999-1008.
- MARIN, V., POULSEN, K., ODENA, G., MCMULLEN, M. R., ALTAMIRANO, J., SANCHO-BRU, P., TIRIBELLI, C., CABALLERIA, J., ROSSO, N., BATALLER, R. & NAGY, L. E. 2017. Hepatocyte-derived macrophage migration inhibitory factor mediates alcohol-induced liver injury in mice and patients. *J Hepatol*, 67, 1018-1025.
- MASOOD, B. & MOORTHY, M. 2023. Causes of obesity: a review. *Clin Med (Lond)*, 23, 284-291.
- MCEVOY, J. W., MCCARTHY, C. P., BRUNO, R. M., BROUWERS, S., CANAVAN, M. D., CECONI, C., CHRISTODORESCU, R. M., DASKALOPOULOU, S. S., FERRO, C. J., GERDTS, E., HANSEN, H., HARRIS, J., LAUDER, L., MCMANUS, R. J., MOLLOY, G. J., RAHIMI, K., REGITZ-ZAGROSEK, V., ROSSI, G. P., SANDSET, E. C., SCHEENAERTS, B., STAESSEN, J. A., UCHMANOWICZ, I., VOLTERRANI, M., TOUYZ, R. M. & GROUP, E. S. C. S. D. 2024. 2024 ESC Guidelines for the management of elevated blood pressure and hypertension: Developed by the task force on the management of elevated blood pressure and hypertension of the European Society of

- Cardiology (ESC) and endorsed by the European Society of Endocrinology (ESE) and the European Stroke Organisation (ESO). *European Heart Journal*, 45, 3912-4018.
- MERAD, M. & MARTIN, J. C. 2020. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol*, 20, 355-362.
- METZEMAEKERS, M., GOUWY, M. & PROOST, P. 2020. Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords. *Cell Mol Immunol*, 17, 433-450.
- MILLER, M. C. & MAYO, K. H. 2017. Chemokines from a Structural Perspective. *Int J Mol Sci*, 18.
- MONACO, G., CHEN, H., POIDINGER, M., CHEN, J., DE MAGALHÃES, J. P. & LARBI, A. 2016. flowAI: automatic and interactive anomaly discerning tools for flow cytometry data. *Bioinformatics*, 32, 2473-80.
- MOSER, B. & WILLIMANN, K. 2004. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann Rheum Dis*, 63 Suppl 2, ii84-ii89.
- MUELLER, K. A. L., LANGNAU, C., GÜNTER, M., PÖSCHEL, S., GEKELER, S., PETERSEN-URIBE, Á., KREISSELMEIER, K. P., KLINGEL, K., BÖSMÜLLER, H., LI, B., JAEGER, P., CASTOR, T., RATH, D., GAWAZ, M. P. & AUTENRIETH, S. E. 2021. Numbers and phenotype of non-classical CD14^{dim}CD16⁺ monocytes are predictors of adverse clinical outcome in patients with coronary artery disease and severe SARS-CoV-2 infection. *Cardiovasc Res*, 117, 224-239.
- NATARAJAN, A., ZLITNI, S., BROOKS, E. F., VANCE, S. E., DAHLEN, A., HEDLIN, H., PARK, R. M., HAN, A., SCHMIDTKE, D. T., VERMA, R., JACOBSON, K. B., PARSONNET, J., BONILLA, H. F., SINGH, U., PINSKY, B. A., ANDREWS, J. R., JAGANNATHAN, P. & BHATT, A. S. 2022. Gastrointestinal symptoms and fecal shedding of SARS-CoV-2 RNA suggest prolonged gastrointestinal infection. *Med*, 3, 371-387.e9.
- NAUMANN, U., CAMERONI, E., PRUENSTER, M., MAHABALESHWAR, H., RAZ, E., ZERWES, H. G., ROT, A. & THELEN, M. 2010. CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS One*, 5, e9175.
- NEUHAUSER, H., KUHNERT, R. & BORN, S. 2017. 12-Month prevalence of hypertension in Germany. *J Health Monit*, 2, 51-57.
- NIBBS, R. J. & GRAHAM, G. J. 2013. Immune regulation by atypical chemokine receptors. *Nat Rev Immunol*, 13, 815-29.
- OGUNTIBEJU, O. O. 2019. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 11, 45-63.
- OH, D. Y., BÖTTCHER, S., KRÖGER, S. & VON KLEIST, M. 2021. [SARS-CoV-2 transmission routes and implications for self- and non-self-protection]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 64, 1050-1057.
- OPAL, S. M. & DEPALO, V. A. 2000. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, 117, 1162-72.
- OZAKI, K. & LEONARD, W. J. 2002. Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *J Biol Chem*, 277, 29355-8.
- PELLOWE, A. S., SAULER, M., HOU, Y., MEROLA, J., LIU, R., CALDERON, B., LAURIDSEN, H. M., HARRIS, M. R., LENG, L., ZHANG, Y., TILSTAM, P. V., POBER, J. S., BUCALA, R., LEE, P. J. & GONZALEZ, A. L. 2019. Endothelial cell-secreted MIF reduces pericyte contractility and enhances neutrophil extravasation. *Faseb j*, 33, 2171-2186.
- PETTY, H. R. & TODD, R. F., 3RD 1993. Receptor-receptor interactions of complement receptor type 3 in neutrophil membranes. *J Leukoc Biol*, 54, 492-4.
- PICHÉ, M. E., TCHERNOF, A. & DESPRÉS, J. P. 2020. Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. *Circ Res*, 126, 1477-1500.
- POLTORAK, M. P. & SCHRAML, B. U. 2015. Fate Mapping of Dendritic Cells. *Frontiers in Immunology*, 6.
- PROPPER, D. J. & BALKWILL, F. R. 2022. Harnessing cytokines and chemokines for cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 19, 237-253.
- RAGHU, H., LEPUS, C. M., WANG, Q., WONG, H. H., LINGAMPALLI, N., OLIVIERO, F., PUNZI, L., GIORI, N. J., GOODMAN, S. B., CHU, C. R., SOKOLOVE, J. B. & ROBINSON, W. H. 2017. CCL2/CCR2, but

- not CCL5/CCR5, mediates monocyte recruitment, inflammation and cartilage destruction in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 76, 914-922.
- RAJAGOPAL, S., KIM, J., AHN, S., CRAIG, S., LAM, C. M., GERARD, N. P., GERARD, C. & LEFKOWITZ, R. J. 2010. Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 628-32.
- RAMAN, D., SOBOLIK-DELMARE, T. & RICHMOND, A. 2011. Chemokines in health and disease. *Exp Cell Res*, 317, 575-89.
- REBELOS, E., NUMMENMAA, L., DADSON, P., LATVA-RASKU, A. & NUUTILA, P. 2021. Brain insulin sensitivity is linked to body fat distribution-the positron emission tomography perspective. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 48, 966-968.
- REN, G., ROBERTS, A. I. & SHI, Y. 2011. Adhesion molecules: key players in Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Cell Adh Migr*, 5, 20-2.
- RICH, A. R. & LEWIS, M. R. 1932. The nature of allergy in tuberculosis as revealed by tissue culture studies. *Bull. Johns Hopkins Hosp*, 50, 106.
- ROGER, T., DAVID, J., GLAUSER, M. P. & CALANDRA, T. 2001. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature*, 414, 920-4.
- ROGER, T., SCHNEIDER, A., WEIER, M., SWEEP, F. C., LE ROY, D., BERNHAGEN, J., CALANDRA, T. & GIANNONI, E. 2016. High expression levels of macrophage migration inhibitory factor sustain the innate immune responses of neonates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, E997-1005.
- ROSS, R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 362, 801-9.
- SAMANI, N. J., ERDMANN, J., HALL, A. S., HENGSTENBERG, C., MANGINO, M., MAYER, B., DIXON, R. J., MEITINGER, T., BRAUND, P., WICHMANN, H. E., BARRETT, J. H., KÖNIG, I. R., STEVENS, S. E., SZYMCZAK, S., TREGOUET, D. A., ILES, M. M., PAHLKE, F., POLLARD, H., LIEB, W., CAMBIEN, F., FISCHER, M., OUWEHAND, W., BLANKENBERG, S., BALMFORTH, A. J., BAESSLER, A., BALL, S. G., STROM, T. M., BRAENNE, I., GIEGER, C., DELOUKAS, P., TOBIN, M. D., ZIEGLER, A., THOMPSON, J. R. & SCHUNKERT, H. 2007. Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med*, 357, 443-53.
- SAWANT, K. V., POLURI, K. M., DUTTA, A. K., SEPURU, K. M., TROSHKINA, A., GAROFALO, R. P. & RAJARATHNAM, K. 2016. Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. *Sci Rep*, 6, 33123.
- SCHEIDT-NAVE, C., DU, Y., KNOPF, H., SCHIENKIEWITZ, A., ZIESE, T., NOWOSSADECK, E., GÖßWALD, A. & BUSCH, M. 2013. Verbreitung von Fettstoffwechselstörungen bei Erwachsenen in Deutschland. Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung.
- SCHERÜBL, H. 2021. [Smoking tobacco and cancer risk]. *Dtsch Med Wochenschr*, 146, 412-417.
- SCHEUFELE R, R. L., KRAUSE L, KLINGER A 2025. Gesundheitsberichterstattung - Daten zu nichtübertragbaren Erkrankungen. *RKI*.
- SCHIEFFER, E., SCHIEFFER, B. & HILFIKER-KLEINER, D. 2021. [Cardiovascular diseases and COVID-19 : Pathophysiology, complications and treatment]. *Herz*, 46, 107-114.
- SCHIENKIEWITZ, A., KUHNERT, R., BLUME, M. & MENSINK, G. B. M. 2022. Übergewicht und Adipositas bei Erwachsenen in Deutschland - Ergebnisse der Studie GEDA 2019/2020-EHIS. *Journal of Health Monitoring*, 23-31.
- SCHIRALDI, M., RAUCCI, A., MUÑOZ, L. M., LIVOTI, E., CELONA, B., VENEREAU, E., APUZZO, T., DE MARCHIS, F., PEDOTTI, M., BACHI, A., THELEN, M., VARANI, L., MELLADO, M., PROUDFOOT, A., BIANCHI, M. E. & UGUCCIONI, M. 2012. HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4. *J Exp Med*, 209, 551-63.
- SCHUNKERT, H., KÖNIG, I. R., KATHIRESAN, S., REILLY, M. P., ASSIMES, T. L., HOLM, H., PREUSS, M., STEWART, A. F., BARBALIC, M., GIEGER, C., ABSHER, D., AHERRAHROU, Z., ALLAYEE, H., ALTSHULER, D., ANAND, S. S., ANDERSEN, K., ANDERSON, J. L., ARDISSINO, D., BALL, S. G., BALMFORTH, A. J., BARNES, T. A., BECKER, D. M., BECKER, L. C., BERGER, K., BIS, J. C., BOEKHOLDT, S. M., BOERWINKLE, E., BRAUND, P. S., BROWN, M. J., BURNETT, M. S., BUYSSCHAERT, I., CARLQUIST, J. F., CHEN, L., CICHON, S., CODD, V., DAVIES, R. W.,

- DEDOUSSIS, G., DEGHAN, A., DEMISSIE, S., DEVANEY, J. M., DIEMERT, P., DO, R., DOERING, A., EIFERT, S., MOKHTARI, N. E., ELLIS, S. G., ELOSUA, R., ENGERT, J. C., EPSTEIN, S. E., DE FAIRE, U., FISCHER, M., FOLSOM, A. R., FREYER, J., GIGANTE, B., GIRELLI, D., GRETARSDOTTIR, S., GUDNASON, V., GULCHER, J. R., HALPERIN, E., HAMMOND, N., HAZEN, S. L., HOFMAN, A., HORNE, B. D., ILLIG, T., IRIBARREN, C., JONES, G. T., JUKEMA, J. W., KAISER, M. A., KAPLAN, L. M., KASTELEIN, J. J., KHAW, K. T., KNOWLES, J. W., KOLOVOU, G., KONG, A., LAAKSONEN, R., LAMBRECHTS, D., LEANDER, K., LETTRE, G., LI, M., LIEB, W., LOLEY, C., LOTERY, A. J., MANNUCCI, P. M., MAOUCHE, S., MARTINELLI, N., MCKEOWN, P. P., MEISINGER, C., MEITINGER, T., MELANDER, O., MERLINI, P. A., MOOSER, V., MORGAN, T., MÜHLEISEN, T. W., MUHLESTEIN, J. B., MÜNDEL, T., MUSUNURU, K., NAHRSTAEDT, J., NELSON, C. P., NÖTHEN, M. M., OLIVIERI, O., et al. 2011. Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nat Genet*, 43, 333-8.
- SHAH, S. A., JEFFREY, K., ROBERTSON, C. & SHEIKH, A. Impact of COVID-19 pandemic on elective care backlog trends, recovery efforts, and capacity needs to address backlogs in Scotland (2013–2023): a descriptive analysis and modelling study. *The Lancet Regional Health – Europe*.
- SHARYGIN, D., KONIARIS, L. G., WELLS, C., ZIMMERS, T. A. & HAMIDI, T. 2023. Role of CD14 in human disease. *Immunology*, 169, 260-270.
- SHENG, J., RUEDL, C. & KARJALAINEN, K. 2015. Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells. *Immunity*, 43, 382-93.
- SHI, Y., RIESE, D. J., 2ND & SHEN, J. 2020. The Role of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis in Cancer. *Front Pharmacol*, 11, 574667.
- SILVA, M. J. A., RIBEIRO, L. R., GOUVEIA, M. I. M., MARCELINO, B. D. R., SANTOS, C. S. D., LIMA, K. V. B. & LIMA, L. 2023. Hyperinflammatory Response in COVID-19: A Systematic Review. *Viruses*, 15.
- SPEKTRUM. 2023. *Membran, Lexikon der Biologie* [Online]. Available: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/membran/42042> [Accessed].
- SPRINGER, T. A. 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 346, 425-34.
- STANDIFORD, T. J. 2000. Anti-inflammatory cytokines and cytokine antagonists. *Curr Pharm Des*, 6, 633-49.
- STEFATER, J. A., 3RD, REN, S., LANG, R. A. & DUFFIELD, J. S. 2011. Metchnikoff's policemen: macrophages in development, homeostasis and regeneration. *Trends Mol Med*, 17, 743-52.
- SUNGNAK, W., HUANG, N., BÉCAVIN, C. & BERG, M. 2020. SARS-CoV-2 Entry Genes Are Most Highly Expressed in Nasal Goblet and Ciliated Cells within Human Airways. *ArXiv*.
- SWIRSKI, F. K. & NAHRENDORF, M. 2018. Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol*, 18, 733-744.
- TANG, N., BAI, H., CHEN, X., GONG, J., LI, D. & SUN, Z. 2020. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. *J Thromb Haemost*, 18, 1094-1099.
- THEOBALD, S. J., SIMONIS, A., GEORGOMANOLIS, T., KREER, C., ZEHNER, M., EISFELD, H. S., ALBERT, M. C., CHHEN, J., MOTAMENY, S., ERGER, F., FISCHER, J., MALIN, J. J., GRÄB, J., WINTER, S., POUIKLI, A., DAVID, F., BÖLL, B., KOEHLER, P., VANSHYLLA, K., GRUELL, H., SUÁREZ, I., HALLEK, M., FÄTKENHEUER, G., JUNG, N., CORNELY, O. A., LEHMANN, C., TESSARZ, P., ALTMÜLLER, J., NÜRNBERG, P., KASHKAR, H., KLEIN, F., KOCH, M. & RYBNIKER, J. 2021. Long-lived macrophage reprogramming drives spike protein-mediated inflammasome activation in COVID-19. *EMBO Mol Med*, 13, e14150.
- TORRES-RUIZ, J., LOMELÍN-GASCÓN, J., VARGAS-CASTRO, A. S., LIRA-LUNA, J., PÉREZ-FRAGOSO, A., TAPIA-CONYER, R., NUÑEZ-AGUIRRE, M., ALCALÁ-CARMONA, B., ABSALÓN-AGUILAR, A., MARAVILLAS-MONTERO, J. L., MEJÍA-DOMÍNGUEZ, N. R., NÚÑEZ-ÁLVAREZ, C., RULL-GABAYET, M., LLORENTE, L., ROMERO-RAMÍREZ, S., SOSA-HERNÁNDEZ, V. A., CERVANTES-DÍAZ, R., JUÁREZ-VEGA, G., MEZA-SÁNCHEZ, D. E., MARTÍNEZ-JUÁREZ, L. A., MORALES-JUÁREZ, L., LÓPEZ-LÓPEZ, L. N., NEGRETE-TRUJILLO, J. A., FALCÓN-LEZAMA, J. A., VALDEZ-

- VÁZQUEZ, R. R., GALLARDO-RINCÓN, H. & GÓMEZ-MARTÍN, D. 2022. Clinical and immunological features associated to the development of a sustained immune humoral response in COVID-19 patients: Results from a cohort study. *Front Immunol*, 13, 943563.
- UTRERO-RICO, A., GONZÁLEZ-CUADRADO, C., CHIVITE-LACABA, M., CABRERA-MARANTE, O., LAGUNA-GOYA, R., ALMENDRO-VAZQUEZ, P., DÍAZ-PEDROCHE, C., RUIZ-RUIGÓMEZ, M., LALUEZA, A., FOLGUEIRA, M. D., VÁZQUEZ, E., QUINTAS, A., BERGES-BUXEDA, M. J., MARTÍN-RODRIGUEZ, M., DOPAZO, A., SERRANO-HERNÁNDEZ, A., AGUADO, J. M. & PAZ-ARTAL, E. 2021. Alterations in Circulating Monocytes Predict COVID-19 Severity and Include Chromatin Modifications Still Detectable Six Months after Recovery. *Biomedicines*, 9.
- VAN DER VORST, E. P., DÖRING, Y. & WEBER, C. 2015. MIF and CXCL12 in Cardiovascular Diseases: Functional Differences and Similarities. *Front Immunol*, 6, 373.
- VAN GINNEKEN, E., REED, S., SICILIANI, L., ERIKSEN, A., SCHLEPPER, L., TILLE, F. & ZAPATA, T. 2022. European Observatory Policy Briefs. *Addressing backlogs and managing waiting lists during and beyond the COVID-19 pandemic*. Copenhagen (Denmark): European Observatory on Health Systems and Policies
- © World Health Organization 2022 (acting as the host organization for, and secretariat of, the European Observatory on Health Systems and Policies).
- VAROL, C., MILDNER, A. & JUNG, S. 2015. Macrophages: development and tissue specialization. *Annu Rev Immunol*, 33, 643-75.
- VICARI, A. P. & CAUX, C. 2002. Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 13, 143-54.
- WEBER, C., ERL, W. & WEBER, P. C. 1995. Enhancement of monocyte adhesion to endothelial cells by oxidatively modified low-density lipoprotein is mediated by activation of CD11b. *Biochem Biophys Res Commun*, 206, 621-8.
- WEISER, W. Y., POZZI, L. M. & DAVID, J. R. 1991. Human recombinant migration inhibitory factor activates human macrophages to kill *Leishmania donovani*. *J Immunol*, 147, 2006-11.
- WOLF, D. & LEY, K. 2019. Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. *Circ Res*, 124, 315-327.
- WOOLLARD, K. J. & GEISSMANN, F. 2010. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol*, 7, 77-86.
- YADDANAPUDI, K. & MITCHELL, R. A. 2017. MIF-Dependent Regulation of Monocyte/Macrophage Polarization. In: BUCALA, R. & BERNHAGEN, J. (eds.) *MIF Family Cytokines in Innate Immunity and Homeostasis*. Cham: Springer International Publishing.
- YANAI, H. & YOSHIDA, H. 2021. Secondary dyslipidemia: its treatments and association with atherosclerosis. *Glob Health Med*, 3, 15-23.
- YUSUF, S., HAWKEN, S., OUNPUU, S., DANS, T., AVEZUM, A., LANAS, F., MCQUEEN, M., BUDAJ, A., PAIS, P., VARIGOS, J. & LISHENG, L. 2004. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*, 364, 937-52.
- ZDANYTE, M. & RATH, D. 2021. Cardiovascular Risk Assessment in COVID-19. *Hamostaseologie*, 41, 350-355.
- ZHANG, H., YANG, K., CHEN, F., LIU, Q., NI, J., CAO, W., HUA, Y., HE, F., LIU, Z., LI, L. & FAN, G. 2022. Role of the CCL2-CCR2 axis in cardiovascular disease: Pathogenesis and clinical implications. *Front Immunol*, 13, 975367.
- ZHANG, M., QIU, L., ZHANG, Y., XU, D., ZHENG, J. C. & JIANG, L. 2017. CXCL12 enhances angiogenesis through CXCR7 activation in human umbilical vein endothelial cells. *Sci Rep*, 7, 8289.
- ZHENG, D., LIU, J., PIAO, H., ZHU, Z., WEI, R. & LIU, K. 2022. ROS-triggered endothelial cell death mechanisms: Focus on pyroptosis, parthanatos, and ferroptosis. *Front Immunol*, 13, 1039241.
- ZHOU, Y., FU, B., ZHENG, X., WANG, D., ZHAO, C., QI, Y., SUN, R., TIAN, Z., XU, X. & WEI, H. 2020. Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. *Natl Sci Rev*, 7, 998-1002.

ZHU, N., ZHANG, D., WANG, W., LI, X., YANG, B., SONG, J., ZHAO, X., HUANG, B., SHI, W., LU, R., NIU, P., ZHAN, F., MA, X., WANG, D., XU, W., WU, G., GAO, G. F. & TAN, W. 2020. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*, 382, 727-733.

ZLOTNIK, A. & YOSHIE, O. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 12, 121-7.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Promotionsarbeit mit dem Titel „Zusammenhang zwischen kardiovaskulären Erkrankungen, kardiovaskulären Risikofaktoren und schweren SARS-CoV-2-Infektionen: Eine Studie über systemische Hyperinflammation und anhaltende Immunantwort“ wurde an der Abteilung für Kardiologie und Angiologie des Universitätsklinikums Tübingen unter der Betreuung von Frau PD Dr. med. Karin Müller durchgeführt. Das Studiendesign wurde von mir, Hüseyin Kocaman - Graf, in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. med. Karin Müller erstellt. Die Datenerhebung wurde von mir und Frau Langnau durchgeführt. Die statistische Auswertung wurde von Frau Langnau und mir durchgeführt. Die Echokardiographien wurden in der Abteilung für Kardiologie und Angiologie unter Supervision von Frau PD Dr. med. Karin durchgeführt. Auszüge dieser Arbeit wurden international publiziert (Langnau et al., 2023).

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen benutzt zu haben.

Tübingen, den 10.02.2025

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich auf dem Weg zur Fertigstellung meiner Dissertation unterstützt haben. Ohne ihre Hilfe und Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau PD Dr. Müller bedanken. Ihre fachliche Expertise und unermüdliche Unterstützung haben mir nicht nur wertvolle Einblicke in das Forschungsthema gegeben, sondern mich auch ermutigt, meine Grenzen zu erweitern. Ihre Ratschläge und kritischen Diskussionen waren von unschätzbarem Wert und haben meine Arbeit bereichert.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Frau Dr. sc. hum. Castor. Ihre Geduld und Ihr Engagement bei der Betreuung meiner Arbeit haben mir geholfen, die Komplexität meiner Forschung zu bewältigen. Ihre Hinweise und Ratschläge haben mir wertvolle Einsichten und Perspektiven eröffnet.

Frau Bercem Kocaman gilt mein besonderer Dank für die kritische Durchsicht der Doktorarbeit.

Ich möchte Herrn Dr. Cem Aksoy für seine fortwährende Unterstützung, seine wertvollen Ratschläge und seine motivierenden Worte danken, die wesentlich zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben.

Schließlich möchte ich Professor Gawaz für seine Unterstützung und Inspiration danken. Sein Weitblick und sein Engagement für die akademische Forschung haben mich stets motiviert und inspiriert. Seine fachliche Expertise und sein Engagement für meine Arbeit sind für mich von unschätzbarem Wert.