

**Aus dem Institut der Veterinärimmunologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin
und
dem Institut für Medizinische Immunologie
der Charité Berlin**

**Untersuchung von T_{EMRA}-Zellen und deren Subsets
in Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose
sowie die vergleichende Untersuchung von
zwei unterschiedlichen Behandlungsmethoden im Hinblick
auf das adaptive Immunsystem**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Birthe Inken Sumpf
Tierärztin
aus Celle**

**Berlin 2018
Journal-Nr.: 4001**

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Susanne Hartmann
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Hans-Dieter Volk
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Carsten Tschöpe

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): man, aortic valve stenosis (MeSH), transplantation, transplants, cytokines, immunology, CD8 antigens, CD4 antigens, CD8+ lymphocytes, CD4+ lymphocytes, T helper lymphocytes

Tag der Promotion: 10.04.2018

Meiner lieben Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 <i>Das Immunsystem</i>	1
1.2 <i>T-Lymphozyten: Entstehung, Prägung und Aktivierung</i>	1
1.2.1 Naive-, Effektor-, Zentrale- und Terminal differenzierte Gedächtniszellen .	2
1.2.3 Besonderheiten von T _{EM} / T _{EMRA} Zellen.....	4
1.2.3.1 T _{EMRA} -Zell-Subsets.....	5
1.2.3.2 T _{EMRA} -Zellen im Krankheitsgeschehen der Aortenklappenstenose	6
1.3 <i>Inflammatorisch bedeutsame Zytokine und Oberflächenmarker des adaptiven Immunsystems</i>	6
1.3.1 Freisetzung von Zytokinen nach Stimulation.....	6
1.3.2 Oberflächenmarker aktivierter Immunzellen.....	7
1.3.3 CD107.....	8
1.4 <i>Die schwere Aortenklappenstenose</i>	9
1.4.1 Epidemiologie der nichtrheumatischen Aortenklappenstenose	9
1.4.2 Pathophysiologie	9
1.4.3 Therapie	11
2. Zielsetzung	12
3. Material	13
3.1 <i>Blutproben</i>	13
3.1.1 Gesunde Spender	13
3.1.2 Aortenklappenstenose-Patienten.....	13
3.1.3 Kardiovaskuläre Kontrollgruppe.....	13
3.2 <i>Chemikalien und Gebrauchslösungen</i>	14
3.3 <i>Gebrauchsgegenstände und Geräte</i>	15
3.4 <i>Antikörper</i>	16
4. Methoden	17
4.1 <i>Durchflusszytometrie</i>	17
4.1.1 Kompensation.....	18
4.2 <i>Vorgehen</i>	18
4.2.1 Blutaufbereitung	18
4.2.2 Bestimmung der Zellzahl.....	19
4.2.3 In vitro Stimulation von Lymphozyten	20
4.2.4 Auswahl der Antikörper und Antikörperfärbung.....	20
4.2.5 Antikörperfärbung.....	21
4.3 <i>Antikörperfärbung von Patienten-Vollblut</i>	22
4.4 <i>Nachweis von Interleukin 8</i>	22
4.5. <i>Statistische Auswertung</i>	23
5. Ergebnisse	24
5.1 <i>Etablierung eines durchflusszytometrischen Multiparameter-Protokolls zum Nachweis verschiedener T-Zellpopulationen</i>	24
5.2 <i>Charakterisierung und Untersuchung von T_{EMRA}-Zellen und deren Subsets</i>	26
5.2.1 Untersuchung der gesunden Kontrollgruppe.....	27
5.2.1.1 Analyse von CD8- und CD4-positiven T _{EMRA} -Zellen sowie Subsets unter Berücksichtigung des CMV-Status	28
5.2.1.2 Funktionale und phänotypische Analyse von CD8-positiven T _{EMRA} -Zellsubsets CMV-positiver Spender	30
5.2.1.3 Vergleich von CD8-positiven T _{EMRA} -Subsets unter Berücksichtigung der Oberflächenmarker CCR7 und CD45RA	33

Inhaltsverzeichnis

5.2.1.4 Vergleich von CD8-positiven T _{EMRA} -Subsets mit T-Effektor-Gedächtniszellen	35
5.2.1.5 Phänotypische und funktionale Unterschiede von CD4-positiven T _{EMRA} -Subsets	39
5.2.2 Phänotypische und funktionale Untersuchung von CD8- und CD4-positiven T _{EMRA} -Zellen und deren Subsets bei Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose	41
5.3 Untersuchung von T-Gedächtniszellen, T _{EMRA} -Zellen und deren Subsets zur Charakterisierung immunologisch-assoziiertes Mechanismen im Kontext der schweren Aortenklappenstenose.....	45
5.4 Post-interventionelle immunologische Charakterisierung von Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose zu verschiedenen Zeitpunkten	47
5.5 Direkter Vergleich von zwei verschiedenen Klappenersatzverfahren im Hinblick auf das adaptive Immunsystems	52
5.5.1 Vergleich von Leukozyten, Lymphozyten und T-Gedächtniszellen	52
5.6 Die Bestimmung von IL-8 in Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose	64
6. Diskussion	66
6.1 Zusammenfassung der erhobenen Daten.....	66
6.2 Etablierung eines Testsystems zur Identifizierung verschiedener T _{EMRA} -Zellsubsets	67
6.3 Untersuchung von Zellen des adaptiven Immunsystems sowie präinterventioneller Entzündungsparameter in Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose	73
6.3.1 Das adaptive Immunsystem im Kontext der Aortenklappenstenose.....	73
6.3.2 Entzündungsparameter im Kontext der Aortenklappenstenose.....	74
6.3.3 T _{EMRA} -Zellen im Kontext der Aortenklappenstenose.....	75
6.4 Vergleichende immunologische Untersuchung von zwei möglichen Therapieverfahren zur Behandlung der schweren Aortenklappenstenose.....	76
6.5 Fazit.....	78
7. Zusammenfassung:.....	79
8. Summary.....	80
9. Literaturverzeichnis.....	81
10. Abbildungsverzeichnis	89
11. Tabellenverzeichnis.....	97
12. Supplemente	98
13. Danksagung	126
14. Selbstständigkeitserklärung	127

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Lymphorgane, lymphatische Zellen, humorale Signale und Zytokine bilden im menschlichen Körper ein engmaschiges Netzwerk: das Immunsystem. Die Hauptaufgabe des Immunsystems ist die Erhaltung der Integrität des Organismus und besonders das Verhindern des Eindringens von pathogenen Organismen sowie die Kontrolle endogener Prozesse (Parkin and Cohen 2001).

Das Immunsystem wird didaktisch in eine angeborene und eine erworbene Komponente unterteilt. Beide Arten der immunologischen Reaktionen unterscheiden sich in Reaktionszeit und Spezifität. Das angeborene Immunsystem gewährleistet eine schnelle aber antigen-unspezifische Immunantwort. Es umfasst physische Barrieren, wie Haut und Schleimhäute und zelluläre Bestandteile, wie Monozyten, Makrophagen, natürliche Killerzellen, neutrophile Granulozyten, Akute-Phase-Proteine und lösliche Faktoren wie das Komplementsystem (Parkin and Cohen 2001).

Das adaptive Immunsystem ist durch das Vorhandensein antigenspezifischer Rezeptoren auf B- und T-Zellen charakterisiert. Um eine effektive Immunantwort zu generieren, wird zuerst ein Antigen durch antigenpräsentierende Zellen (APC) präsentiert. Antigen-spezifische T-Zellen erkennen das ihnen präsentierte Antigen und reagieren darauf mit Aktivierungsprozessen und Zelldifferenzierung in spezialisierten lymphatischen Geweben (Parkin and Cohen 2001).

Durch das Entstehen eines immunologischen Gedächtnisses, kann bei erneuter Exposition eine schnellere und qualitativ bessere Immunantwort des Körpers gewährleistet werden (Parkin and Cohen 2001)

1.2 T-Lymphozyten: Entstehung, Prägung und Aktivierung

T-Lymphozyten werden im Thymus gebildet. Die Hauptzahl $CD4^{pos} CD8^{pos}$ (doppelt positiv) kortikaler Thymozyten wird nach einer kurzen Zeitspanne im Thymus eliminiert. Einige Zellen reifen jedoch zu $CD4^{pos} CD8^{neg}$ (einfach positiv) oder $CD8^{pos} CD4^{neg}$ medullären Thymozyten heran. Dies geschieht durch einen Prozess, der auf der Erkennung wirtseigener Oberflächenmoleküle (Haupthistokompatibilitätskomplex, MHC) basiert. Diesen Vorgang bezeichnet man als positive Selektion. Die Anzahl der reifenden Thymozyten ist wiederum durch eine negative Selektion beschränkt, die gewährleistet, dass Zellen mit exzessiver autoreaktiver Aktivität eliminiert werden (Egerton, Scollay et al. 1990).

Die Erkennung und Eliminierung fremder Antigene oder Zellen, wie zum Beispiel Mikroorganismen ist eine der Hauptaufgaben von T-Zellen und ihren Produkten. Für diese intrazelluläre Interaktion benutzen sie ein Erkennungssystem, das sich von dem der B-Zellen unterscheidet. T-Zellen interagieren mit wirtsfremden Antigenen, die auf der Oberfläche der Wirtszellen exprimiert werden. Der zelleigene T-Zellrezeptor (TCR) interagiert zur Aktivierung mit zwei Komponenten der Wirtszelle. Zum einen mit einem Teil des präsentierten Antigens und zum anderen mit dem MHC der Wirtszelle (Egerton, Scollay et al. 1990). MHC Klasse-1 Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert und dienen der Präsentation von zelleigenen Proteinfragmenten auf ihrer Oberfläche. Zudem präsentieren sie fremde Antigene, die zuvor im Zytosol durch proteosomale Degradation verdaut, im endoplasmatischen Retikulum bearbeitet und anschließend zur Zelloberfläche transloziert wurden (Neefjes, Jongma et al. 2011). Der TCR besteht aus zwei Protein-Untereinheiten (α - und β -Polypeptide) und ist mit einem unveränderbaren CD3-Komplex assoziiert (Smith, Williams et al. 1989). Die α - und β -Untereinheiten des TCR sind variabel und treten mit dem Antigen-MHC-Komplex

Einleitung

in Interaktion, wohingegen der invariable CD3-Komplex für die Signaltransduktion zuständig ist. Der TCR/CD3-Komplex teilt also die Erkennung des Liganden und die Signalweiterleitung innerhalb seiner verschiedenen Komponenten auf. Eine koordinierte Expression dieser beiden Untereinheiten ist für eine vollständige Ausbildung des TCR/CD3-Komplexes auf der Zelloberfläche erforderlich (San Jose, Sahuquillo et al. 1998). Zusätzlich zur Bindung über den MHC können T-Zellen auch durch bakterielle Superantigene sowie durch Antikörperbindung am TCR/CD3-Komplex aktiviert werden. Dabei variiert die erforderliche Menge des Liganden zur T-Zellaktivierung in Abhängigkeit vom T-Zell-Stadium (naive T-Zellen, zentrale T-Gedächtniszellen (T_{CM}) oder Effektor-T-Gedächtniszellen (T_{EM})) und der Anzahl an adhäsions- und kostimulatorischer Moleküle auf den Antigenpräsentierenden Zellen (APC) (Germain 1994, Viola and Lanzavecchia 1996, Coico and Sunshine 2009).

Die Kostimulation stellt einen zentralen Mechanismus in der T-Zellaktivierung dar. Die alleinige Stimulation des T-Zellrezeptors resultiert in einem anergen Zustand der T-Zelle, in dem die Zellen nicht reagieren und refraktär gegenüber einer Restimulation sind. Die Aktivierung von anderen Oberflächenrezeptoren hingegen ermöglicht die Generierung zusätzlich erforderlicher Signale, die einer Anergie entgegenwirken und eine T-Zellaktivierung induzieren. Viele Zelloberflächenmoleküle sind in der Lage kostimulatorisch zu agieren und die Signaltransduktion durch den TCR zu verstärken. CD28 ist das am stärksten kostimulatorisch wirkende Molekül. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass CD28 die T-Zellproliferation, die Zytokinproduktion, das Zellüberleben und zelluläre Metabolismen induziert (Pasceri and Yeh 1999, Smith-Garvin, Koretzky et al. 2009). Auch CD40L, ebenso als CD154 bezeichnet, spielt in der Kostimulation von T-Zellen, vor allem von CD4-positiven Zellen, eine Rolle. CD40L ist hauptsächlich auf aktivierten CD4-positiven T-Zellen, B-Zellen und Thrombozyten exprimiert. Unter inflammatorischen Bedingungen ist es zusätzlich auf Monozyten, zytotoxischen Zellen, Mastzellen und basophilen Zellen exprimiert und reguliert ein weites Spektrum molekularer und zellulärer Prozesse, wie unter anderem die Initiation und den Ablauf zellulärer und humoraler adaptiver Immunabwehr (Elgueta, Benson et al. 2009).

1.2.1 Naive-, Effektor-, Zentrale- und Terminal differenzierte Gedächtniszellen

Häufig verwendete Marker zur Definition von T-Zellsubpopulationen sind die Oberflächenmarker CD45RA und CCR7 (Sallusto, Lenig et al. 1999). Diese bieten die Möglichkeit, T-Zellen in naive T-Zellen, T-Effektor-Gedächtniszellen, zentrale Gedächtniszellen und Terminal differenzierte Effektor-Gedächtniszellen (T_{EMRA}) zu unterteilen.

Der C-C-Chemokin-Rezeptor 7 (CCR7) ist ein sogenannter „Homing Rezeptor“ („nach Hause bringen“). Er veranlasst die Migration verschiedener T-Zellsubpopulationen und antigenpräsentierender Zellen in die Lymphknoten. Dort ermöglicht der enge physische Kontakt zwischen T-Zellen und Dendritischen Zellen eine antigenspezifische Aktivierung der T-Zellen. Werden CD8-positive T-Zellen durch Antigenkontakt aktiviert, wird CCR7 herunterreguliert und die aktivierten T-Zellen gelangen in das periphere Blutsystem. Dieses ist von großer Bedeutung für den Aufbau der protektiven Immunität sowie auch für die Induktion der peripheren Toleranz durch immunregulierende regulatorische T-Zellen. Folglich gilt CCR7 als Marker für naive- und zentrale Gedächtnis-T-Zellen im Lymphgewebe (Forster, Davalos-Misslitz et al. 2008).

Die Expression von CD45RA dient der Identifizierung von naiven T-Zellen, die noch keinen Antigenkontakt hatten. Der Oberflächenmarker CD45RO beschreibt einen vorangegangenen Antigenkontakt und dient damit der Identifizierung von Gedächtniszellen (Sallusto, Lenig et al. 1999). Zellen, die CD45RA reexprimieren

Einleitung

bezeichnet man als Terminal differenzierte Effektor Gedächtniszellen (T_{EMRA}) (Willinger, Freeman et al. 2005).

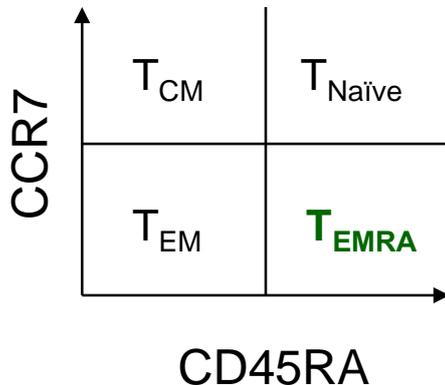


Abb. 1: Darstellung der Untergliederung von T-Zellen. Einteilung in naive T-Zellen (T_{naive}), Zentral-Gedächtniszellen (T_{CM}), Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}) und T_{EMRA} -Zellen (T_{EMRA}) mithilfe der Oberflächenmarker CCR7 und CD45RA.

Naive T-Zellen exprimieren sowohl CCR7 als auch CD45RA. Antigen-spezifische CD8-positive T-Zellen können in jeweils eine von drei Gedächtniszellsubpopulationen eingeordnet werden. Zentrale Gedächtniszellen (T_{CM}) sind eine Zellpopulation, die sich ortsständig in den Lymphknoten befindet. Sie zeichnen sich durch die Expression von CCR7 und das Fehlen von CD45RA aus. Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}) zirkulieren im peripheren Blut und exprimieren kein CCR7. Zudem fehlt das Oberflächenmolekül CD45RA. Ein weiteres im Blut zirkulierendes T-Zellsubset, Terminal differenzierte Effektor-Gedächtniszellen (T_{EMRA}), exprimiert CD45RA, aber kein CCR7 (Willinger, Freeman et al. 2005).

Die Expression diverser Chemokinrezeptoren, wie zum Beispiel CXCR3 ermöglicht T_{EM} - und T_{EMRA} -Zellen die Migration in peripheres inflammatorisches Gewebe (Willinger, Freeman et al. 2005). Effektor-Gedächtniszellen sind hinsichtlich der Abwehrfunktion stärker differenziert als zentrale Gedächtniszellen. Sie weisen eine hohe ex vivo Zytotoxizität auf und produzieren vornehmlich, die TH1-Immunantwort stimulierende, Zytokine. Ein Beispiel hierfür ist Interferon γ ($INF\gamma$) (Sallusto, Lanzavecchia et al. 1998). T_{CM} produzieren hauptsächlich Interleukin-2 (IL-2). Zudem zeigte sich in den Untersuchungen von Willinger et al., dass T_{CM} ein höheres proliferatives Potential und eine größere Resistenz gegenüber Apoptose einleitenden Mechanismen aufweisen, wobei T_{EM} und T_{EMRA} ein verändertes TCR-Repertoire zeigen und durch eine „senescente“ Replikation gekennzeichnet sind (Willinger, Freeman et al. 2005).

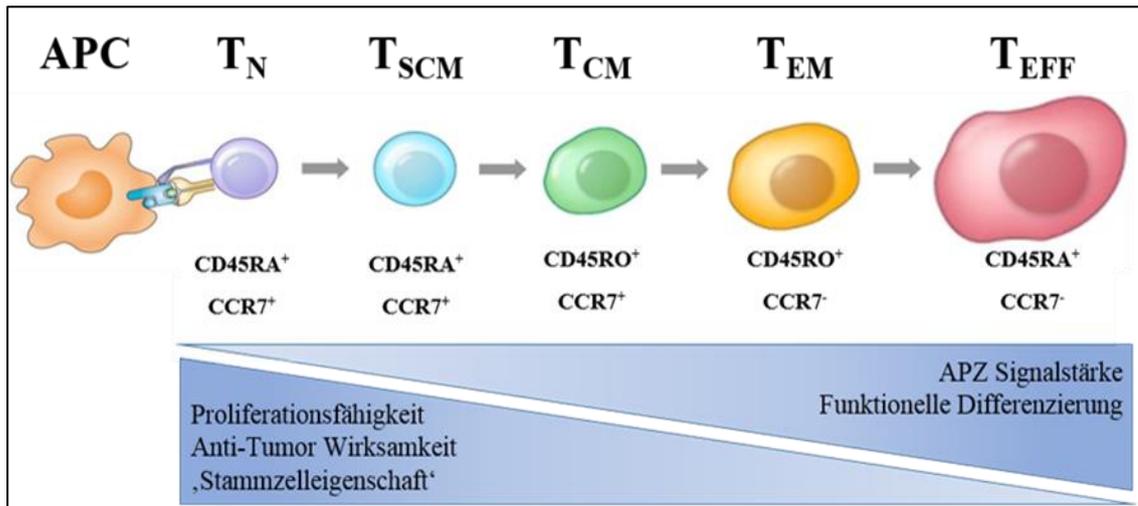


Abb. 2: Die Differenzierung von T-Lymphozyten im adaptiven Immunsystem. Die Expression der Oberflächenmarker CD45RA und CCR7 wurde der Definition von naiven-, zentralen-, Effektor-Gedächtnis- und Terminal differenzierten Effektor-Zellsubpopulationen zu Grunde gelegt. Die Proliferationsfähigkeit sinkt bei gleichzeitig steigender Differenzierung. APC, Antigenpräsentierende Zelle; T_N, naive T-Zelle; T_{SCM}, Gedächtnis Stammzelle; T_{CM}, zentrale T-Gedächtniszelle; T_{EM}, T-Effektor-Gedächtniszelle; T_{EFF}, Terminal differenzierte Effektor-T-Zelle (adaptiert aus (Restifo 2014)).

1.2.3 Besonderheiten von T_{EM} / T_{EMRA} Zellen

Reinke et al. konnten in ihrer Studie bereits aufzeigen, dass T_{EMRA}-Zellen offenbar antigen-unspezifisch, ohne Antigenstimulus, zu Entzündungsorten migrieren und dort durch lokale Zytokinsekretion Regenerationsprozesse im Knochen und anderen Geweben hemmen können. Diese Fähigkeit bescheinigt T_{EMRA}-Zellen eine bedeutende Rolle im Krankheitsgeschehen von entzündlichen Prozessen wie zum Beispiel im Falle der Knochenheilung (Reinke, Geissler et al. 2013). T_{EMRA}-Zellen produzieren große Mengen der Zytokine IFN γ und Tumornekrosefaktor α (TNF α), auch ohne Kostimulus, und sind damit stark proinflammatorisch wirksam. Durch eine weitere Differenzierung von T_{EMRA}-Zellen mittels der Oberflächenmarker CD57 und CD28 ergeben sich weitere T_{EMRA}-Zell-Subgruppen. CD57 ist ein Marker, der im Rahmen der Seneszenz Terminal differenzierter Zellen eine wichtige Rolle spielt. CD57-positive T-Zellen fehlt die Fähigkeit zur Proliferation was sich unter anderem an einer verkürzten Telomerlänge zeigt (Brenchley, Karandikar et al. 2003). Der CD28-Rezeptor ist als kostimulatorisch agierendes Molekül ein wichtiger Bestandteil der T-Zellaktivierung. Für die Aktivierung einer T-Zelle werden für gewöhnlich zwei Signale benötigt. Zum einen die antigenspezifische Interaktion der T-Zelle mit dem an den MHC gebundenen Antigen auf antigenpräsentierenden Zellen und zum anderen die Bindung des kostimulatorischen CD28-Rezeptors auf der T-Zelle mit Oberflächenmolekülen auf antigenpräsentierenden Zellen. Die Bindung des CD28-Rezeptors an Lymphozyten mit Rezeptoren aus der B7-Familie ist einer der wichtigsten, auf Kostimulation beruhenden, Signalwege. Diese Signale induzieren eine T-Zellaktivierung mit nachfolgender klonaler Expansion und inhibieren die T-Zell-Apoptose. Eine fehlende Kostimulation des CD28-Rezeptors bei der T-Zellrezeptor-Aktivierung führt zu einer Anergie oder Apoptose der Zelle (Pasceri and Yeh 1999). Bei fehlender Expression des CD28-Rezeptors wird eine Migration der Zelle in entzündliches Gewebe ohne Mechanismus der Kostimulation möglich.

Die Anzahl an CD8-positiven T_{EMRA}-Zellen steigt mit zunehmendem Alter und zeigt eine positive Korrelation mit selbigem (Koch, Larbi et al. 2008). Diese Beobachtung wird im

Einleitung

Zusammenhang mit chronischen Infektionen diskutiert. So ist bekannt, dass Patienten, die an chronisch-persistierenden Infektionen leiden, wie zum Beispiel einer Zytomegalievirus (CMV)-Infektion, eine signifikant höhere Konzentration von CD8-positiven T_{EMRA} -Zellen im peripheren Blut aufweisen als CMV-negative Probanden (Winchester and Kodali 2011).

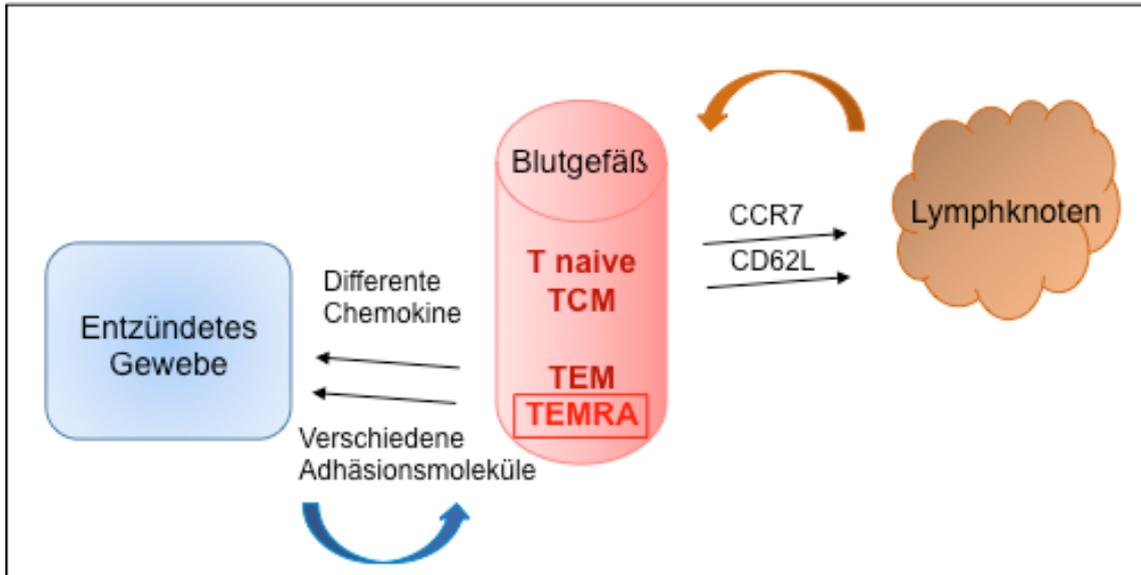


Abb. 3: Darstellung des Zirkulationsmechanismus von Gedächtniszellen. T_{EMRA} -Zellen können antigenunabhängig in entzündliches Gewebe migrieren und dort proinflammatorisch aktiv sein, als auch in entzündlichem Gewebe entstehen und anschließend, proinflammatorisch aktiv, in das periphere Blut gelangen.

1.2.3.1 T_{EMRA} -Zell-Subsets

Klassisch definierte T_{EMRA} -Zellen lassen sich durch die Expression von CD45RA und dem Fehlen von Chemokin-Rezeptor-7 (CCR7) beschreiben. Zur weiteren Untersuchung von T_{EMRA} -Zellsubpopulationen werden der Enddifferenzierungsmarker CD57 und der Kostimulationsmarker CD28 verwendet.

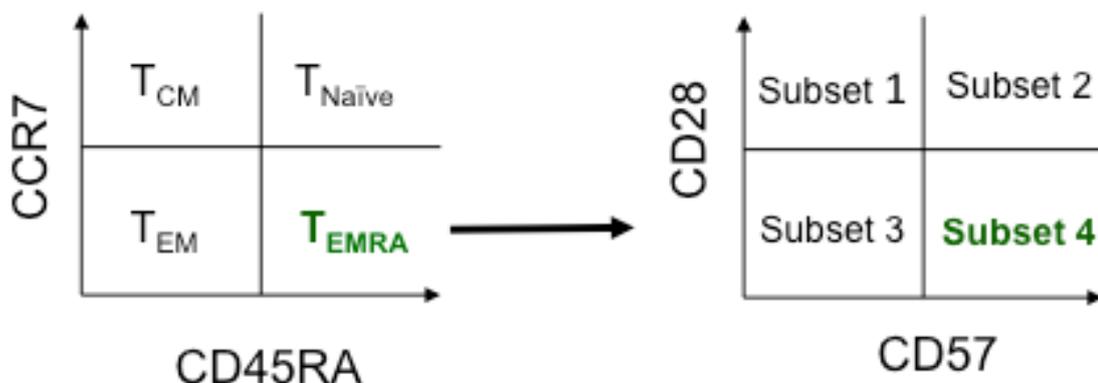


Abb. 4: Darstellung des Auswertungsvorgangs von T_{EMRA} -Subsets. links: Darstellung der verschiedenen Gedächtniszellen und naiven T-Zellen, rechts: Analysefenster der verschiedenen T_{EMRA} -Subsets im Hinblick auf die Marker CD57 und CD28

4.2.3.2 T_{EMRA}-Zellen im Krankheitsgeschehen der Aortenklappenstenose

Bereits im Jahr 2011 entdeckten Winchester et al. aktivierte HLA-DR positive T-Zellen im Klappengewebe von Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose (Winchester and Kodali 2011). Die Expression von HLA-DR (Human Leukocyte Antigen, MHC II) auf Zellen ist für die Antigenpräsentation und folglich für die Induktion einer Immunantwort von Bedeutung. HLA-DR wird unter anderem auf aktivierten T-Zellen exprimiert (Bottazzo, Pujol-Borrell et al. 1983).

Die erhöhten T_{EMRA}-Werte (CD8^{pos}CD57^{pos} und CD8^{pos}CD28^{neg}-Zellen) korrelierten positiv mit der Schwere der Kalzifikation der Aortenklappen. Darüber hinaus konnten die Zellen (Zellklone), die in den Aortenklappen histologisch nachgewiesen wurden, auch im Blut der Patienten gemessen werden. Winchester et al. gingen hier der Frage nach, ob die im Klappengewebe nachgewiesenen T_{EMRA}-Zellen als Folge einer oligoklonalen Expansion von im Klappengewebe entstandenen T_{EMRA}-Zellen in die Peripherie getreten sind oder ob im peripheren Blut zirkulierende Zellen unspezifisch in das inflammatorische Gewebe migriert sind. Nach diesen Studien zeigt sich eine Kombination aus beiden Möglichkeiten. Zum einen das unspezifische Migrieren peripherer T_{EMRA}-Zellen in entzündliches Klappengewebe und zum anderen von im Klappengewebe generierten antigenspezifischen T_{EMRA}-Zellen, die von ihrem Ursprungsort in die Peripherie gelangen und dort inflammatorisch aktiv sind (Wu, Maurer et al. 2007, Winchester, Wiesendanger et al. 2011). Diese Daten weisen auf eine wichtige Rolle der T_{EMRA}-Zellen bei der Pathogenese und auch im Krankheitsverlauf der Aortenklappenstenose hin.

1.3 Inflammatorisch bedeutsame Zytokine und Oberflächenmarker des adaptiven Immunsystems

Zytokine sind von Immunzellen produzierte kleine Proteinmoleküle, die der interzellularen Übertragung von Signalen dienen. Sie umfassen Interleukine, Interferone und Chemokine. Die immunmodulierenden Wirkungen kommen durch die Bindung des Zytokins an seinen Rezeptor zustande und induzieren eine Reihe intrazellulärer Signalkaskaden, welche die Expression von Genen herauf oder herabregulieren. Dies kann in einer gesteigerten Zellproliferation - der gesteigerten Sekretion oder Hemmung weiterer Zytokine - sowie in der eigenen Hemmung resultieren (Mak and Saunders 2006). In dieser Arbeit wurden die Aktivierungsmarker INF γ , TNF α , IL-2, 6 und 8, CD107a und CD154 untersucht sowie die Oberflächenmarker PD-1 und CCR5, mit dem Ziel die T_{EMRA}-Subpopulationen funktionell, als auch phänotypisch zu charakterisieren.

1.3.1 Freisetzung von Zytokinen nach Stimulation

INF γ ist ein Zytokin, das mit seiner massig antiviralen Aktivität andere Immunzellen stark beeinflusst. Es wird hauptsächlich von aktivierten CD4-positiven T-Helferzellen, aber auch von CD8-positiven T-Zellen und natürlichen Killerzellen produziert. Es induziert die Aktivierung von Makrophagen, dient der Hochregulation von Oberflächenmolekülen, wie zum Beispiel MHC-1, und steigert die endogene Antigenprozessierung. Zudem induziert oder inhibiert es die Apoptose anderer Immunzellen (Mak and Saunders 2006).

TNF α ist ein Zytokin mit proinflammatorischer als auch immunregulatorischer Wirkung. Es wird von vielen Immunzellen unter physiologischen sowie pathologischen Konditionen sezerniert (Mak and Saunders 2006).

IL-2 ist ein Zytokin, das sich durch seine T-Zellstimulierende Wirksamkeit auszeichnet. Es wird mittels CD28 kostimulatorischer Signale von antigen-aktivierten T-Zellen

produziert und stimuliert die Proliferation aktivierter IL-2-Rezeptor positiver Immunzellen. In CD8-positiven T-Zellen induziert IL-2 neben der Proliferation auch die Differenzierung von naiven T-Zellen in Effektor- sowie in Gedächtnis-T-Zellen. Es gewährleistet zudem nicht nur eine protektive Immunität sondern vielmehr auch eine durch die Aktivierung regulatorischer T-Zellen (Treg) vermittelte periphere Immuntoleranz (Mak and Saunders 2006, Boyman and Sprent 2012).

Interleukin-6 (IL-6) wird im Inflammationsgeschehen gebildet und spielt in der Akute-Phase-Antwort eine entscheidende Rolle indem es Einfluss auf die Produktion von Akute-Phase-Proteinen nimmt. IL-6 diktiert in Kombination mit seinem löslichen Rezeptor (IL-6R) den Übergang von der akuten zur chronischen Inflammation indem es das Gleichgewicht von neutrophilen Granulozyten hin zu Monozyten und Makrophagen verschiebt. Zusätzlich hat IL-6 stimulatorische Effekte auf T- und B-Zellen, was eine chronische Entzündung begünstigt (Gabay 2006). Zudem spielt IL-6, als Entzündungsmarker, eine bedeutende Rolle in der Pathogenese einiger kardiovaskulärer Erkrankungen, wie zum Beispiel bei der koronaren Herzerkrankung und der Atherosklerose (Yudkin, Kumari et al. 2000).

Interleukin-8 (IL-8) ist ein Chemokin, das bei Entzündungsreaktionen produziert wird und der Anlockung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten und anderer Immunzellen dient. IL-8 wird von diversen Zellen sezerniert, wie zum Beispiel von neutrophilen Granulozyten und Monozyten sowie auch von Endothelzellen. Durch seine Funktion auf die Immunzellen besitzt IL-8 eine Schlüsselfunktion im humanen Abwehrmechanismus. Allerdings kann ein erhöhtes IL-8 Aufkommen in der Zirkulation, herbeigeführt durch beispielsweise ein verlängertes Inflammationsgeschehen oder eine chronische Entzündung, zu Gewebeschädigungen unterschiedlichen Grades führen (Dong and Zheng 2015). Erythrozyten binden kompetitiv IL-8 und entfernen es dadurch aus dem Plasma, was einer systemischen Entzündung antagonistisch entgegenwirkt und den Chemokin-Gradient zum Gewebe erhält. (Darbonne, Rice et al. 1991).

1.3.2 Oberflächenmarker aktivierter Immunzellen

CD154, auch als CD40L bezeichnet, wird in erster Linie als kostimulatorisches Oberflächenmolekül auf aktivierten CD4-positiven T-Zellen exprimiert. CD40L bindet an den CD40 Rezeptor auf antigenpräsentierenden Zellen und induziert dadurch seine Aktivierung. Durch seine transiente Hochregulation auf CD4-positiven T-Zellen kann CD40L auch als spezifischer Marker stimulierter CD4-positiver Zellen benutzt werden (Frentsch, Arbach et al. 2005, Meier, Stark et al. 2008).

Der PD-1 Rezeptor (Programmed cell death protein 1) ist Bestandteil der CD28-Familie, die im Rahmen der T-Zellaktivierung modulierende Eigenschaften übernimmt. PD-1 ist unter anderem auf virusspezifisch aktivierten CD4- und CD8-positiven Zellen hochreguliert und interagiert mit den Liganden PD-L1 und PD-L2. Die PD-1 Aktivierung limitiert die TCR/CD28- induzierte Signaltransduktion indem sie die antigenspezifische Sensitivität von T-Zellen herabsetzt (Duraiswamy, Ibegbu et al. 2011, Hong, Amancha et al. 2013). Die funktionelle Bedeutung von PD-1 ist in der aktuellen Literatur umstritten. PD-1 wird als Marker für „Exhaustion“ beschrieben, der zur funktionellen Erschöpfung von T-Zellen führt, gekennzeichnet durch eine abnehmende Proliferationsfähigkeit und den Verlust der Zytokinproduktion. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass das selektive Blocken von PD-1 zur funktionellen Reaktivierung von erschöpften T-Zellen führt (Barber, Wherry et al. 2006, Hong, Amancha et al. 2013, Wei, Zhong et al. 2013, Odorizzi, Pauken et al. 2015). Duraiswamy et al. beschreiben in ihren Untersuchungen, dass PD-1 neben seinen immunsuppressiven Eigenschaften auch immunoregulatorische Funktionen besitzt und zudem im größeren Ausmaß auf aktivierten T-Effektorzellen exprimiert wird, als auf Terminal differenzierten „erschöpften“ T-Zellen (Duraiswamy, Ibegbu et al. 2011). Es bestehen demnach zwei Theorien: PD-1 könnte, wenn exprimiert, zu einer funktionalen Erschöpfung der Zellen

führen, so dass PD-1-positive Zellen weniger proinflammatorische Zytokine produzieren. Dem steht die Theorie gegenüber, dass PD-1 eine immunregulatorische Funktion übernimmt, indem Zellen, die PD-1 exprimieren, weniger Zytokine bilden und somit eine überschießende Immunantwort reguliert wird und damit der Entstehung terminal differenzierter funktional ausgeschöpfter T-Zellen entgegenwirken (Wherry 2011, Odorizzi, Pauken et al. 2015, Wherry and Kurachi 2015).

Der CCR5 (CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5) ist ein auf aktivierten T-Gedächtniszellen befindlicher Chemokinrezeptor. CCR5 bindet unter anderem an RANTES (CCL5), das von zytotoxischen T-Zellen produziert wird, und gewährleistet dadurch die zielgerichtete Migration in inflammatorisches Gewebe, aber auch die autokrine Aktivierung dieser Zellen. Weitere Liganden sind MIP-1 α (Makrophage inflammatory protein 1 α) und MIP 1 β (Makrophage inflammatory protein 1 β). Diese Liganden werden vor allem in inflammatorischem Gewebe exprimiert (Qin, Rottman et al. 1998). CCR5-exprimierende Zellen sind in großer Anzahl in entzündlichem Gewebe zu finden, verglichen mit einer relativ geringen Präsenz in peripherem Blut und Lymphknoten. Die CCR5-Expression könnte peripheren Blutzellen allerdings die Möglichkeit verleihen, zielgerichtet in peripheres Gewebe zu migrieren (Qin, Rottman et al. 1998). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von CCR5 auf CD4- und CD8-positiven Zellen spezifisch durch IL-12 induziert wird, während eine durch IL-2 induzierte Stimulation von ruhenden Zellen nicht zur Hochregulation von CCR5 führt. Auf nicht aktivierten T-Zellen wird CCR5 kaum exprimiert und auch nur marginal durch eine TCR-Stimulierung induziert (Iwasaki, Mukai et al. 2001).

1.3.3 CD107

CD107a und b (Lysosomal assoziiertes Membranprotein 1 und 2) sind in der Zellmembran eingelagerte Proteine, die vorübergehend auf der T-Zelloberfläche exprimiert werden und die Fähigkeit zur Degranulation besitzen. CD107a wird daher auch als Degranulationsmarker bezeichnet und verwendet (Betts, Brenchley et al. 2003, Betts and Koup 2004).

1.4 Die schwere Aortenklappenstenose

1.4.1 Epidemiologie der nichtrheumatischen Aortenklappenstenose

Die Aortenklappenstenose stellt mit einer Prävalenz von 5 % die häufigste Herzklappenerkrankung in der Altersgruppe der über 75-Jährigen dar (Steiner, Krbal et al. 2012) und ist die dritthäufigste kardiovaskuläre Erkrankung beim Menschen (Akerstrom, Barderas et al. 2013).

Sie tritt im Allgemeinen aufgrund verschiedener ätiologischer Ursachen auf. Man unterscheidet zwei Typen der Aortenklappenstenose: die kongenitale bikuspidale Klappe und die degenerativ kalzifizierte Aortenklappe. Die bikuspidale Klappe ermöglicht zwar eine normale Klappen- und Herzfunktion, ist aber sehr anfällig gegenüber normalerweise harmlosen hämodynamischen Belastungen und neigt verfrüht zur Kalzifizierung, Verdickung und weiteren Stenosierung (Akerstrom, Barderas et al. 2013). Die degenerative kalzifizierte Aortenklappenstenose tritt gehäuft in der älteren Bevölkerung auf. Verantwortlich sind pathologisch-anatomisch degenerative Veränderungen in den Klappen. Ätiologisch ähnelt die Aortenklappenstenose in vielerlei Hinsicht der Atherosklerose. Risikofaktoren wie Bluthochdruck, Hypercholesterinämie und auch Diabetes mellitus Typ 2 begünstigen die Entstehung der Aortenklappenstenose. Allerdings bestehen auch einige wichtige Unterschiede zwischen beiden Erkrankungen, die unterstreichen, dass es sich um eigenständige Krankheitsbilder handelt. Zum Beispiel leidet nicht jeder an Atherosklerose erkrankte Patient auch an einer Aortenklappenstenose. Ebenso wie ein an einer Stenose der Aortenklappe erkrankter Mensch nicht zwangsläufig eine Arteriosklerose aufweist. Lipidsenkende Medikamente wie Statine zeigen nur in der Therapie der Atherosklerose einen positiven Effekt, wobei sie bei der Therapie der Aortenklappenstenose hingegen erfolglos bleiben (Akerstrom, Barderas et al. 2013).

Insgesamt besteht in der medikamentösen Therapie der Aortenklappenstenose kein kurativer Therapieansatz. Eine tatsächliche Behebung der Stenose besteht derzeit allein im Aortenklappenersatz (Steiner, Krbal et al. 2012). Da es sich bei der schweren Aortenklappenstenose überwiegend um Patienten in einem Alter von über 65 Jahren handelt und eine Operation am offenen Herzen den Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine erfordert, liegt die Letalität peri- aber auch postoperativ bei 3 bis 5 %. Zudem müssen Patienten von mehr als 80 Jahren und zusätzlich auftretende Komorbiditäten durch den resultierenden Risikoanstieg oft von dieser Therapie ausgeschlossen werden (Bach, Cimino et al. 2007).

Die transarterielle Aortenklappenimplantation (TAVI) sowie die transapikale Aortenklappenintervention stellen alternative Klappenersatzverfahren zum konventionellen chirurgischen Klappenersatz dar. Vor allem für die Hochrisikopatienten eröffnen diese weniger invasiven Verfahren eine weitere Option zur Behandlung der Aortenklappenstenose.

Sowohl für die chirurgische Versorgung, als auch für den minimalinvasiven Eingriff mittels Katheter konnte gezeigt werden, dass es postoperativ bzw. eingriffsbedingt zu einer systemischen Inflammation kommen kann (Stahli, Grunfelder et al. 2012). Diese könnte in den Zusammenhang mit kardiovaskulären Komplikationen gestellt werden, die ebenfalls häufig im Verlauf bei den Patienten auftreten.

Die postoperative 1-Jahres-Mortalität beträgt bei der TAVI 14,2 % und bei der chirurgischen Aortenklappenimplantation 19,1 %, wobei verschiedene ursächliche Komplikationen zusammengefasst wurden (Adams, Popma et al. 2014).

1.4.2 Pathophysiologie

Histologische Studien haben gezeigt, dass die Entwicklung und Progression der kalzifizierten Aortenklappenstenose nicht ausschließlich degenerative Ursachen hat,

Einleitung

sondern vielmehr eine inflammatorische Genese vermuten lässt (Olsson, Dalsgaard et al. 1994, Winchester, Wiesendanger et al. 2011, Galeone, Paparella et al. 2013). Bedingt durch sogenannten „Shear Stress“ (hämodynamische Belastungen, zum Beispiel in Folge arterieller Hypertension) kann es zu Mikrorupturen am Klappenendothelium sowie einem Anstieg der Kollagen- und Glykosaminyklykansynthese kommen (Akerstrom, Barderas et al. 2013). Die anschließende Verdickung der Klappe ist charakterisiert durch die Einlagerung von inflammatorischem Material, welches z.B. Makrophagen, T-Lymphozyten und oxidierte Lipide einschließt. Die Makrophagen und T-Lymphozyten finden sich vornehmlich an der aortikalen Klappenoberfläche. Immunhistochemische Studien haben gezeigt, dass auch Apolipoproteine, Schaumzellen und Low Density Proteine (LDLs) dort lokalisiert sind (Sverdlov, Ngo et al. 2011). Die Oxidierung der angelagerten Lipide führt zu einer erhöhten Sekretion inflammatorischer Proteine, wie unter anderem TNF α . Diese inflammatorischen Prozesse induzieren die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Diese produzieren gesteigert Kollagen, das sich schließlich ungeordnet im Klappengewebe anreichert. Weiterhin ist eine Differenzierung der Myofibroblasten in Osteoblasten möglich, welche die darauf folgenden Kalzifizierungsprozesse initiieren (Dweck, Boon et al. 2012).

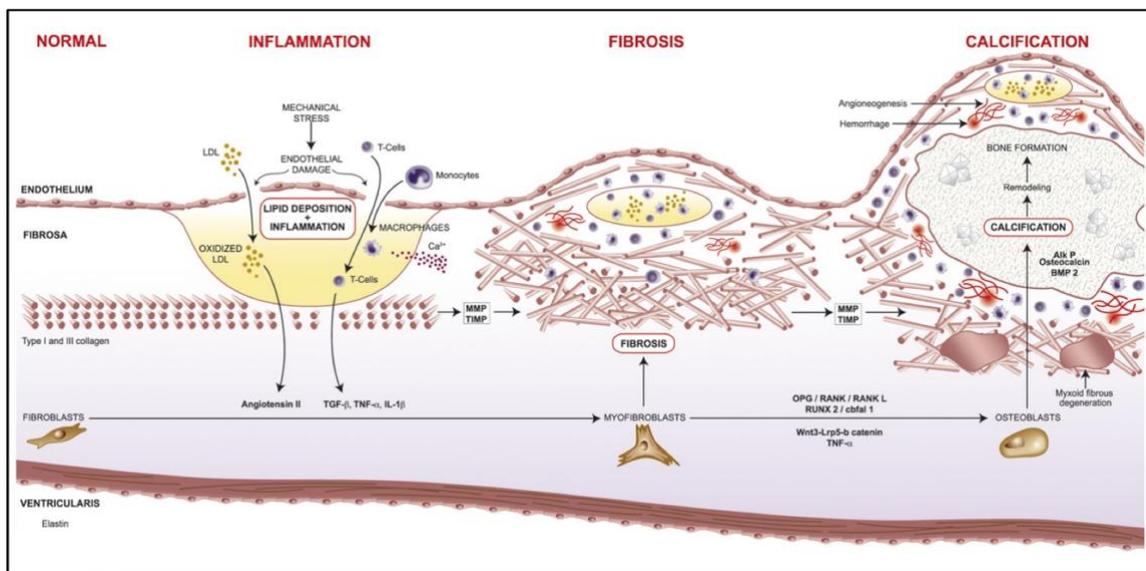


Abb. 5: Endotheliale Läsionen im Klappengewebe erlauben die Migration von T-Zellen und Lipiden in das Klappengewebe. Die Oxidierung der angelagerten Lipide führt zu einer erhöhten Sekretion inflammatorischer Proteine, wie unter anderem TNF α . Diese inflammatorischen Prozesse induzieren die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Diese produzieren gesteigert Kollagen, das sich schließlich ungeordnet im Klappengewebe anreichert. Weiterhin ist eine Differenzierung der Myofibroblasten in Osteoblasten möglich, welche die darauf folgenden Kalzifizierungsprozesse initiieren (Dweck, Boon et al. 2012)

Mit der Zeit vermindert sich der Durchmesser des linksventrikulären Ausflusstraktes zunehmend und die Obstruktion nimmt parallel zu, was zu einer steigenden Nachlast innerhalb des linken Ventrikels führt. Es folgt eine kompensatorische, konzentrische linksventrikuläre Hypertrophie, um einer Verminderung des Herzzeitvolumens entgegenzuwirken. Durch diesen kompensatorischen Prozess bleibt das physiologische Ejektionsvolumen erhalten und der Patient jahrelang symptomfrei (Pohle, Maffert et al. 2001). Da sich die Klappenöffnung aber progressiv verkleinert, ist der Herzmuskel ab einem bestimmten Punkt nicht mehr in der Lage die Auswurfmenge durch die Ventrikelhypertrophie zu kompensieren und es kommt zu einer Verringerung des Ejektionsvolumens. Dies wiederum führt zu einer Minderversorgung des

Organismus mit Sauerstoff und damit zu klinischen Symptomen, wie Dyspnoe, Angina Pectoris und Synkopen (Pohle, Maffert et al. 2001).

Zeigt der Patient erst einmal die typischen Symptome, liegt die Mortalitätsrate innerhalb der nächsten zwei Jahre unbehandelt bei 50 % (Leon, Smith et al. 2010).

1.4.3 Therapie

Die einzig wirksamen Therapien liegen im chirurgischen Klappenersatz sowie im minimalinvasiven Eingriff mittels transfemoralem Katheter (TAVI) bei Hochrisikopatienten.

Der Goldstandard für die Therapie der symptomatischen schweren Aortenklappenstenose ist jedoch der chirurgische Aortenklappenersatz. Mit Einführung der Herz-Lungen-Maschine im Jahr 1953 wurde 1960 der erste operative Aortenklappenersatz möglich (Ziemer and Haverich 2010). Mit einer 3-Jahres-Überlebensrate von 87 % ist er der medikamentösen Therapie mit 21 % klar überlegen (Schwarz, Baumann et al. 1982). Dieser deutliche Überlebensgewinn erklärt die Etablierung des operativen Aortenklappenersatzes in den letzten Jahrzehnten.

Nach den aktuellen Leitlinien besteht die Operationsindikation bei einer symptomatischen, schweren Aortenklappenstenose (Vahanian, Baumgartner et al. 2007), das heißt nach dem Auftreten klinisch relevanter Symptome wie Dyspnoe, Angina Pectoris oder Synkopen (Pohle, Maffert et al. 2001).

Die TAVI ist ein neu etabliertes Verfahren für Patienten, die an einer hochgradigen Aortenklappenstenose leiden, deren operatives Risiko jedoch zu hoch ist. Der Eingriff wurde im Jahre 2002 zum ersten Mal durchgeführt (Smith, Leon et al. 2011). Eingesetzt wird die Klappe mittels eines transfemoralem Katheters, der über einen peripheren arteriellen Zugang bis hin zur Aorta vorgeschoben wird. Dort wird die neue Klappe in Position gebracht und über die alte Aortenklappe gesetzt.

2. Zielsetzung

Die bisher erhobenen Daten zur Funktionalität von T_{EMRA}-Zellen hinsichtlich der T-Zell-Exhaustion sowie ihre Rolle in pathologischen Situationen sind widersprüchlich. Dies hängt, zumindest zum Teil mit der unklaren Definition von T_{EMRA}-Zellen und deren Subsets zusammen. In den bisher veröffentlichten Arbeiten wurden stets nur einzelne Marker zur Identifikation der T_{EMRA}-Zellen eingesetzt. Eine Untersuchung mit der Kombination der verschiedenen bekannten Oberflächenmarker, ist in der aktuellen Literatur bisher nicht beschrieben.

1. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die bis heute nicht vollständig charakterisierte T-Zellpopulation, die sogenannten T_{EMRA}, Terminal differenzierte Effektor T-Zellen, auf ihre funktionellen und phänotypischen Eigenschaften hin tiefergehend zu untersuchen und unter Berücksichtigung von Subpopulationen weiter zu charakterisieren.

Zur Charakterisierung der T_{EMRA}-Zellsubsets wurde Blut von gesunden CMV-positiven Spendern sowie von Patienten die an einer Aortenklappenstenose erkrankt sind untersucht. Hier wurden neben der Charakterisierung der verschiedenen T_{EMRA}-Subgruppen, ebenfalls deren Funktionalität und Oberflächenstruktur Bedeutung geschenkt, indem verschiedene inflammatorisch wirksame Zytokine und Oberflächenmarker untersucht werden.

2. Ein weiterer Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Verteilung von T_{EMRA}-Zellen im Kontext der schweren Aortenklappenstenose. Die aktuelle Literatur zeigt, dass die Aortenklappenstenose kein passiver Prozess ist, sondern vielmehr aktiv durch inflammatorische Mechanismen beeinflusst wird (Winchester and Kodali 2011). Daher ist eine detaillierte immunologische Charakterisierung von Aortenklappenstenose-Patienten und im Besonderen von T_{EMRA}-Zellen von großem Interesse. Innerhalb dieses Projektes soll die immunologische Auswirkung zweier unterschiedlicher Eingriffe (die chirurgische- und TAVI-Behandlung) in einem direkten Vergleich untersucht werden. Der akute Einfluss des chirurgischen Eingriffs könnte viel deutlichere peri-operative Veränderungen innerhalb der Immunzellpopulationen hervorrufen, da allein der Einsatz der Herz-Lungenmaschine, die längere Operation und damit Narkosezeit nachweislich eine Aktivierung des Immunsystems verursachen. Diese hochgradigen inflammatorischen Veränderungen könnten sich nach einigen Tagen bzw. Wochen allerdings wieder vollständig normalisieren. Bei den TAVI-Patienten wiederum könnte der minimalinvasive Eingriff peri-operativ einen geringeren Einfluss auf das Immunsystem haben. Das im Körper des Patienten verbleibende entzündliche Klappengewebe könnte allerdings auf lange Zeit als „Trigger“ für persistierende Entzündungsreaktionen fungieren.

3. Material

3.1 Blutproben

Für die Charakterisierung der T_{EMRA}-Zellen und ihrer Subsets wurde im ersten Teil eine gesunde CMV-positive Spendergruppe untersucht, da diese chronisch infizierte Kohorte nachweislich mehr T_{EMRA}-Zellen aufweist (Brenchley, Karandikar et al. 2003, Winchester, Wiesendanger et al. 2011). Zum Vergleich wurden auch gesunde CMV-negative Spender untersucht.

Ziel war es zu untersuchen, ob sich T_{EMRA}-Zellen und Subsets der Patienten, die unter Aortenklappenstenose leiden, hinsichtlich ihrer Verteilung, Funktion und ihrer phänotypischen Merkmale von den in gesunden Spendern vorkommenden T_{EMRA}-Zellen unterscheiden. Dies könnte eine mögliche Verbindung von T_{EMRA}-Zellen und Subsets zum Krankheitsbild der Aortenklappenstenose erklären.

3.1.1 Gesunde Spender

Es wurde das Blut von 18 gesunden Spendern im Alter von 20 bis 35 Jahren untersucht. Zehn Spender waren CMV-positiv und acht Spender CMV-negativ. Es wurden jeweils 10 ml Vollblut mittels Heparin-Röhrchen entnommen. Dieses wurde zur Charakterisierung der T_{EMRA}-Zellsubsets aufbereitet (siehe 4.2) und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Ergebnisse des CMV-negativen und CMV-positiven Blutes wurden im Anschluss statistisch ausgewertet und verglichen.

3.1.2 Aortenklappenstenose-Patienten

Nach positivem Ethikvotum (EA1-175-12) wurden Patienten mit gesicherter Aortenklappenstenose rekrutiert. Dies geschah nach vorhergehender Aufklärung und Einwilligung zur Studienteilnahme. Ausgeschlossen aus der Studie wurden Patienten, die eine Assoziation mit pathologischen Veränderungen des Immunsystems, einen insulinpflichtigen Diabetes mellitus, ein akutes Koronarsyndrom, eine akute Infektion, eine Operation innerhalb der letzten 30 Tage, eine Knochenfraktur in den letzten drei Monaten oder eine fortbestehende maligne Erkrankung aufwiesen. Die hämatologischen Parameter, wie die Leukozytenzahl, der CRP-Wert und die glomeruläre Filtrationsrate der Niere mussten im Normbereich liegen. Zudem musste eine hochgradige Aortenklappenstenose mit einer Klappenöffnungsfläche von weniger als 1,0 cm² bestehen. Es wurden 10 ml Heparin-Blut zur Untersuchung der T_{EMRA}-Zellsubsets entnommen, aufbereitet und im Durchflusszytometer gemessen.

Um den Zusammenhang zwischen den Interventionen und nachweisbaren Immunzellen im peripheren Blut zu untersuchen wurden weitere Patienten rekrutiert. Den chirurgischen Patienten und TAVI-Patienten sollte zu den verschiedenen Zeitpunkten je 5 ml EDTA-Blut für die Untersuchungen abgenommen werden: jeweils einen Tag vor dem Eingriff, fünf Tage nach dem Eingriff sowie drei und sechs Monate nach dem Eingriff.

Blutbild und weitere Parameter wurden den Patientenakten entnommen und in die Auswertung einbezogen.

3.1.3 Kardiovaskuläre Kontrollgruppe

Es wurden 35 Patienten, nach Geschlecht und Alter passend zur Studiengruppe, von der kardiologischen Station ausgewählt, bei denen diagnostisch eine Aortenklappenstenose ausgeschlossen wurde.

3.2 Chemikalien und Gebrauchslösungen

Zur Vorbereitung der Blutproben für die durchflusszytometrische Messung wurden Fertigerstellungen sowie selbst hergestellte Gebrauchslösungen verwendet. Diese sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 1: Darstellung der verwendeten Chemikalien mit jeweiligen Hersteller Angaben

Name	Hersteller
Ampuwa	Fresenius Kabi
Biocoll Separationsmedium	Biochrom (Berlin, D)
Breveldin A	Sigmar Aldrich, St. Louis, USA
Decosept	Dr. Schuhmacher
DMSO Hybri-Max®	Sigmar Aldrich, St. Louis, USA
Dulbeccos Phosphat-gepufferte Saline (D-PBS)	Invitrogen Life Technologien (Karlsruhe, D)
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom (Berlin, D)
Formaldehyd 37%	Carl Roth GmbH + Co Kg (Karlsruhe, D)
Ionomycin Kalzium Salz, 1 mg	Sigmar Aldrich, St. Louis, USA
Monensin Sodium Salt, 90-95% (TLC)	Sigmar Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin 10'000 U/ml/Streptomycin 10'000 µg/ml	Biochrom (Berlin, D)
PerFix-nc Kit	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
BD Perm/Wash (10x)	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
Phorbol-12 Myristate 13 Acetate (PMA) 1 mg	Sigmar Aldrich, St. Louis, USA
Trypan Blue Solution, 02 um Filtered	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
VersaLyse™ Lysing Solution	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
VLE RPMI 1640 Medium 1 mg	Biochrom (Berlin, D)

Tab. 2: Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Gebrauchslösungen

Name	Zusammensetzung	Hersteller
RPMI-Vollmedium (RPMI+++)	RPMI-1640 + 2mM L-Glutamin 10 % FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	Biochrom (Berlin, D)
Isoflow™ Sheath Fluid	FACS Puffer 2 % FCS	Beckman Coulter Biochrom (Berlin, D)
4 % Formalinlösung	37 % Formaldehyd	Roth

3.3 Gebrauchsgegenstände und Geräte

In dieser Arbeit wurden folgende Gebrauchsgegenstände und Geräte zur Bearbeitung und Auswertung der Proben verwendet.

Tab. 3: Verwendete Einweg-Materialien

Einwegprodukte	Hersteller
BD Falcon Pipette, 5 ml	BD Falcon
BD Falcon Pipette, 10 ml	BD Falcon
BD Falcon Pipette, 20 ml	BD Falcon
Pasteurpipette, 3,5 ml	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen, Falcon®, rund 5 ml	BD Falcon
Zentrifugenröhrchen, Falcon®, konisch 15 ml	BD Falcon
Zentrifugenröhrchen, Falcon®, konisch 50 ml	BD Falcon

Tab. 4: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Hera Safe Safety Cabinet	Thermo Scientific
Hera Safe 2020	Thermo Scientific
Heraeus MULTIFUGE X1R Centrifuge	Thermo Scientific
Heraeus MULTIFUGE 3SR+ Centrifuge	Thermo Scientific
Mikroskop Model CK2-TR	Olympus
Neubauer, verbessertes Hämozytometer, Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm²	Neubauer
Sanyo CO₂ Inkubator Model MCO-18AIC	Sanyo
Navios™ Durchflusszytometer (10 Farben, 3 Laser)	Beckman Coulter
LSR Fortessa Durchflusszytometer (16 Farben, 4 Laser)	BD Biosciences

Tab. 5: Verwendete Software

Software	Hersteller
BD FACSDiva™ Software Version 6.1.3	BD Biosciences
FlowJo Version 9.8.1	TreeStar
Kaluza Analysis Auswertesoftware 1.3	Beckman Coulter

Material

GraphPad Prism Version 6	GraphPad Software, La Jolla, USA
--------------------------	----------------------------------

3.4 Antikörper

Zum Nachweis der verschiedenen Zellpopulationen wurden an Fluorochrome gekoppelte Antikörper eingesetzt die mittels Durchflusszytometrie gemessen wurden.

Tab. 6: Die Tabelle zeigt die benutzten Antikörper mit ihren jeweiligen Fluorochromen, Spezifitäten, Klone und Herstellern.

Fluorochrom	Spezifität	Isotyp	Klone	Hersteller
FITC	CD45RA	MouseIgG2b, k	HI100 (RUO)	BD Pharmingen
	CD57	IgM Mouse	NC1	BeckmanCoulter
PE	CCR7	Mouse IgG2A	150503	R&D Systems,
ECD	CD28	IgG1 Mouse	CD28.2	BeckmanCoulter
	HLA-DR	IgG1 (Mouse)	Immu-357	BeckmanCoulter
PC7	CD27	IgG1 (Mouse)	1A4CD27	BeckmanCoulter
APC	CD4	IgG1 Mouse	13B8.2	BeckmanCoulter
	CD107a	Mouse IgG1, k	H4A3	BioLegend
PacBlue	CD45RA	IgG1 Mouse	2H4	BeckmanCoulter
	CD57	Mouse IgM, k	HCD57	BioLegend
APC_A700	CD8	IgG1 (Mouse)	B9.11	BeckmanCoulter
APC_A750	CD3	IgG1 k, Mouse	UCHT1	BeckmanCoulter
KrO	CD45	IgG1 Mouse	J.33	BeckmanCoulter
PerCP Cy5.5	CD28	Mouse IgG1, k	CD28.2	BioLegend
	TNF alpha	IgG1, kappa, Mouse	MAb11	eBioscience
	PD1 (CD279)	IgG2b Mouse	PD1.3	BeckmanCoulter
BV785	INF γ	Mouse IgG1, k	4S.B3	BioLegend
BV711	CD154	Mouse IgG1, k	24-31	BioLegend
PE Cy 7	IL-2	Rat IgG2a, k	MQ1-17H12	BioLegend
	CCR5	J418F1	Rat IgG2b, κ	BioLegend
Zombie	Lebend-Tot-Antikörper			BioLegend

4. Methoden

4.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS, fluorescence-activated cell sorter) ist ein technisches Verfahren, bei dem Zellen mittels Antikörper-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen charakterisiert werden. Es können sowohl Oberflächenmoleküle als auch intrazelluläre Strukturen nachgewiesen werden. Verschiedene Filter gewährleisten, dass der Laserstrahl mit einer bestimmten Wellenlänge auf die Zelle trifft. Es wird eine Einzelzellsuspension durch eine Messkammer geleitet, in der verschiedene Laserstrahlen unterschiedlicher Wellenlängen auf die Zellen treffen. Eine Mikroküvette gewährleistet, dass jede Zelle einzeln nacheinander durch die Messkammer fließt. Größe, Granularität sowie die verschiedenen, an die Zellen gebundenen Fluorochrome, bewirken eine unterschiedliche Ablenkung der Laserstrahlen. Diese Streuung des Lichts wird mittels Detektoren gemessen und aufgezeichnet. Die Zellgröße wird hierbei als Vorwärtsstreulicht in einem Winkel von 2 bis 15° gemessen (FSC, forward scatter) und die Granularität der Zelle als Seitwärtsstreulicht (SSC, sideward scatter) in einem 90° Winkel. Zum Nachweis spezifischer Oberflächenmarker oder intrazellulärer Zytokine werden die an Antikörper gebundenen, verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe an antigenspezifische Antikörper gekoppelt. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden individuell durch Licht unterschiedlicher Wellenlängen angeregt und emittieren daraufhin Licht einer bestimmten Wellenlänge, das anschließend gemessen wird. Auf diese Weise ermöglicht die Durchflusszytometrie sowohl die qualitative Auswertung verschiedener Zelleigenschaften als auch deren quantitative Erfassung (Zeilinger and Hübl , Ibrahim and van den Engh 2007).

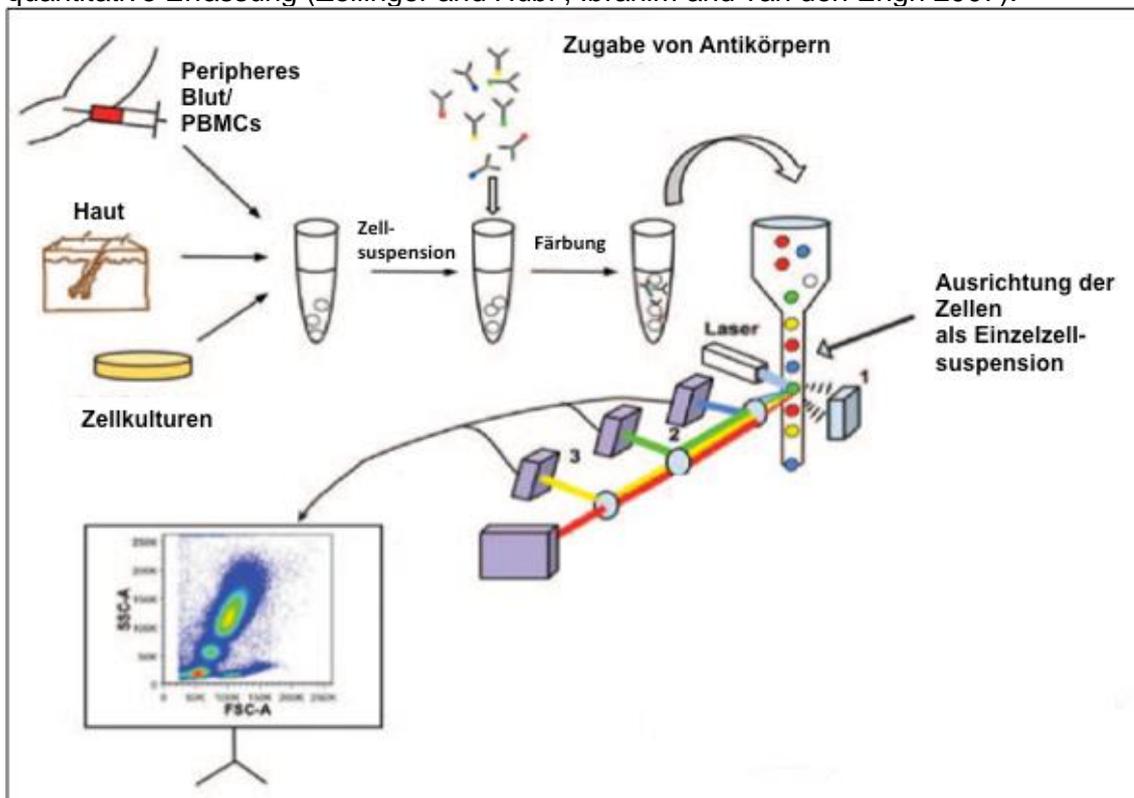


Abb. 6: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers. (1) Detektor für das Vorwärtsstreulicht (2) Detektor für das Seitwärtsstreulicht (3) Fluoreszenzdetektor. Adaptiert nach (Jahan-Tigh, Ryan et al. 2012)

4.1.1 Kompensation

In der Durchflusszytometrie wird in der Regel das emittierte Licht mehrerer angeregter Fluorochrome gemessen, das mittels verschiedener Filter selektiv detektiert wird. Da Fluorochrome aber nicht wie erwünscht bei jeweils nur einer ganz bestimmten Wellenlänge Licht emittieren, kann es dazu führen, dass auch Laser, die nicht dafür bestimmt sind, Fluorochrome anregen und somit falsche positive Signale in einem anderen Kanal messen (Erickson, Lu et al. 2015). Diese überlappenden Signale müssen schließlich herausgerechnet werden. Dieser Vorgang wird als Kompensation bezeichnet.

Um optimale Ergebnisse und eine adäquate Darstellung der Daten zu erzielen, wurde vor Einsatz des Panels mit Hilfe von Einzelfärbungen kompensiert.

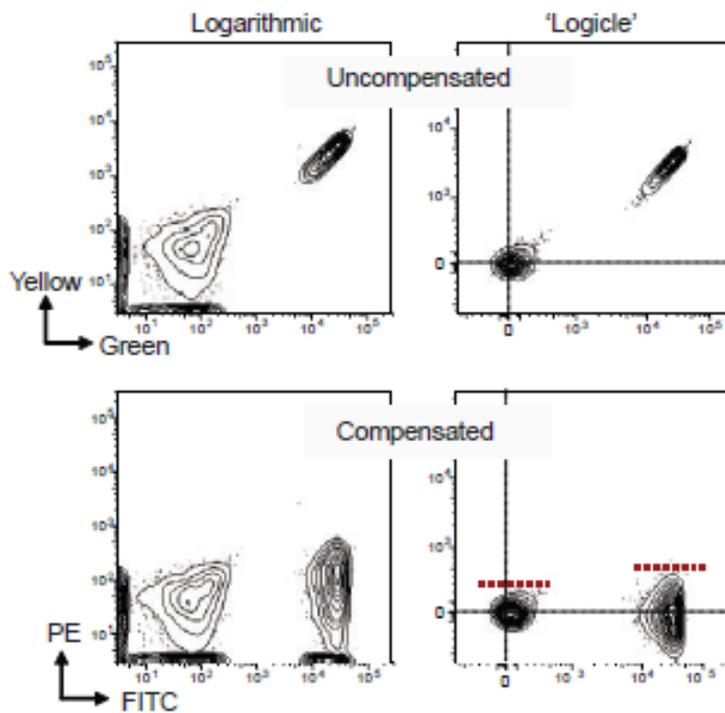


Abb. 7: Darstellung der Kompensation eines Dotplots. Unkompensierter Dotplot (oben) und nachträglich kompensierter Dotplot (unten). Um optimale Ergebnisse und eine adäquate Darstellung der Daten zu erzielen, wurde vor Einsatz des Panels mit Hilfe von Einzelfärbungen kompensiert. Es wurde jedes Fluorochrom mit jedem kombiniert und im Dotplot dargestellt. Anhand der Darstellung kann ermittelt werden, wo falsche Signale auftreten und diese herausgerechnet werden. Abbildung nach (Herzenberg, Tung et al. 2006)

4.2 Vorgehen

Es wurde ein neues Panel zur Untersuchung der T_{EMRA}-Zellsubsets etabliert. Das Blut wurde je nach Versuchsteil aufbereitet, mit Antikörpern gefärbt und mit dem Durchflusszytometer gemessen.

4.2.1 Blutaufbereitung

Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)

Methoden

Mittels einer Zwei-Phasen-Dichtegradientenzentrifugation mit einer Biocoll-Lösung konnten mononukleäre Zellen, wie Lymphozyten und Monozyten aus peripherem Blut von Granulozyten, Erythrozyten und toten Zellen getrennt werden.

Hierfür wurden 9 ml heparinisiertes Spenderblut in einem 15 ml Falcon 1:1 mit PBS-Puffer verdünnt und auf 15 ml Biocoll-Trennlösung aufgeschichtet. Biocoll ist ein synthetisch hergestelltes polysaccharidähnliches Polymer, das der Trennung und Isolierung von Zellen dient. Anschließend wurde die Probe für 20 Minuten bei 1000 g, Raumtemperatur, einer Beschleunigung der Stufe 3 und ohne Bremse zentrifugiert. Diese Einstellungen sollen eine schonende Zentrifugation sowie einen Aufbau der unterschiedlichen Phasen ermöglichen. Die PBMCs befinden sich in dem Interphase-Ring zwischen dem Plasma-Phosphatpuffer-Gemisch und der Biocoll-Lösung. Die mononukleären Zellen wurden vorsichtig mittels einer Pasteurpipette abgenommen und in zwei aufeinander folgenden Zentrifugationsschritten gewaschen. Hierfür wurden die Zellen mit PBS-Puffer versetzt. Anschließend wurde die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

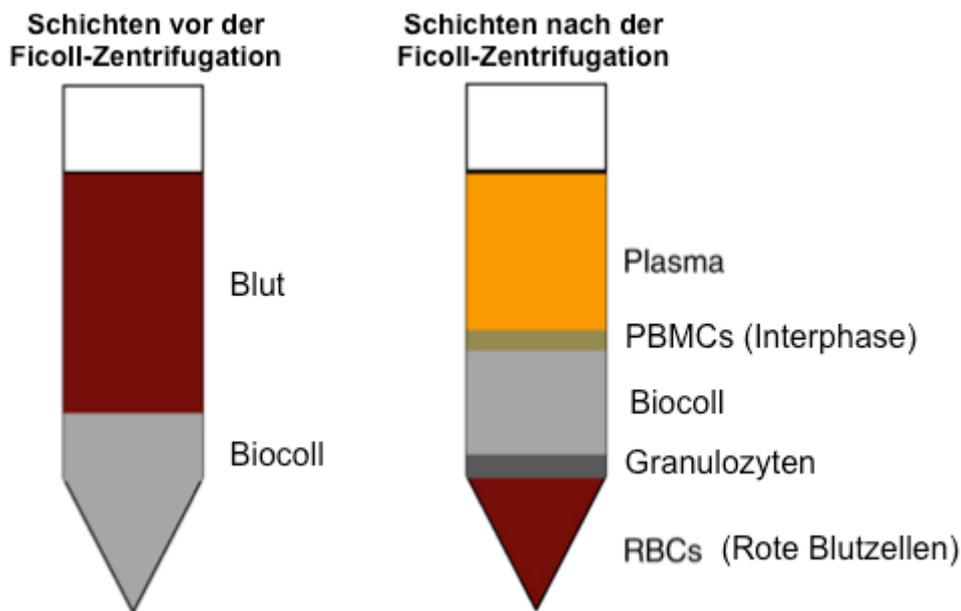


Abb. 8: Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) mittels Biocoll-Lösung. Aufsichtung von Blut auf Biocoll-Lösung (links), Auftrennung in die verschiedenen Phasen nach der Zentrifugation (rechts). Adaptiert nach (Lin, Chiang et al. 2014)

4.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Dazu wurden 10 μ l einer Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit einer 0,5 prozentigen Trypanblaulösung versetzt und im Mikroskop im von der Zählkammer vorgegebenen Raster gezählt. Da Trypanblau nur tote Zellen anfärbt, können diese von intakten und vitalen Zellen unterschieden werden. Die Zellen in den vier vorgegebenen Quadranten wurden ausgezählt und die Zellkonzentration pro Milliliter ermittelt werden, indem die durchschnittliche Zellzahl pro Quadrat mit dem Verdünnungsfaktor 2 und dem Faktor 10^4 multipliziert wurde.

Die Zellen wurden anschließend in RPMI (100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 10 % FCS) über Nacht inkubiert und am nächsten Tag gefärbt.

Methoden

4.2.3 In vitro Stimulation von Lymphozyten

Die Zellen wurden nach Zugabe von Phorbol-12-myristat-13-aceat (PMA) und Ionomycin (Iono) vier Stunden bei 37° C inkubiert. Der CD107a-APC Antikörper wurde zeitgleich mit PMA/Iono dazugegeben. PMA ist ein Phorboldiester, der als Diacylglycerol-Analogon an die Kalzium-abhängige Proteinkinase C bindet und damit die Aktivierung immunmodulierender Proteine beschleunigt sowie die Stimulation von Zytokinen induziert (Ballester and Rosen 1985). Ionomycin ist ein von Streptomyces conglobatus produziertes Antibiotikum, das als Ionophor dem intrazellulären Anstieg von Kalzium dient (Liu and Hermann 1978). Hierdurch trägt es zur Aktivierung der Proteinkinase C und damit zur Steigerung der Zytokinproduktion bei.

Nach einer Stunde wurden Brefeldin A und Monensin dazugegeben. Brefeldin A blockiert den Transport von Proteinen in den Golgi-Apparat und induziert deren Akkumulation im endoplasmatischen Retikulum (Lippincott-Schwartz, Yuan et al. 1991). Monensin ist ein Na⁺-Ionophor, das viele zelluläre Funktionen reguliert einschließlich Apoptose und der Zellproliferation (Park, Seol et al. 2002). Es verhindert ebenfalls die Protein-Sekretion, indem es Transportprozesse während der Zellaktivierung hemmt (Mollenhauer, Morre et al. 1990). Hiermit wird eine Akkumulation der Proteine in der Zelle erreicht, sodass diese anschließend mittels Durchflusszytometrie dargestellt werden können.

Tab. 7: Verwendete Stimulationsreagenzien

Reagenzien	Endkonzentration	Konzentration im Stock
PMA	50 ng/ml	1 mg/ml
Ionomycin	600 ng/ml	50 µg/ml
Brefeldin A	10 ng/ml	5 mg/ml
Monensin	5 µg/ml	5 mg/ml

4.2.4 Auswahl der Antikörper und Antikörperfärbung

Da nicht jede Kombination von Fluorochromen möglich ist, wurden verschiedene Kombinationen von Fluorochromen und Klonen getestet, bis ein Panel entstand, mit dem die gewünschten Zellen gut dargestellt und ausgewertet werden konnten. Es sollte zum einen ein Panel entstehen, welches bestimmte Oberflächenmarker darstellt und zum anderen ein Panel mit dem die Funktionalität, das heißt der intrazelluläre Nachweis von Zytokinen, untersucht werden konnte.

Folgende Panel wurden etabliert:

Tab. 8: Funktioneller Versuchsansatz

Spezifität	Fluorchrom	Verdünnung (10 ⁶ Zellen / 100µl)
CD3	APC-A750	1 / 50
CD8	APC-A700	1 / 200
CD4	APC	1 / 25
CCR7	PE	1 / 10

Methoden

CD45RA	FITC	1 / 10
CD57	PacBlue	1 / 20
CD28	ECD	1 / 12,5
CD154	PerCPCy5.5	1 / 25
CD107a	PE/Cy7	1 / 12,5
INFγ	BV785	1 / 20
TNFα	PerCPCy5.5	1 / 33,33
IL-2	PECy7	1 / 20
Zombie	Lebend-Tot_Antikörper	1 / 200

Tab. 9: Oberflächenmarker Versuchsansatz

Spezifität	Fluorchrom	Volumen (10^6 Zellen / 100 μ l)
CD3	APC-A750	1 / 50
CD8	APC-A700	1 / 200
CD4	APC	1 / 25
CCR7	PE	1 / 10
CD45RA	FITC	1 / 10
CD57	PacBlue	1 / 20
CD28	ECD	1 / 12,5
PD1	PerCPCy5.5	1 / 25
CCR5	PE/Cy7	1 / 25
Zombie	Lebend-Tot-Antikörper	1 / 200

4.2.5 Antikörperfärbung

Nach der Isolation der PBMCs wurde die Oberfläche von 1×10^6 Zellen in einem Volumen von 100 μ l 15 Minuten lang gefärbt. Im Anschluss wurden die Zellen mit einer 4-%igen Formalin-Lösung fixiert, gewaschen und am Durchflusszytometer (Fortessa) gemessen.

Für die intrazelluläre Färbung wurde nach der Zellstimulation zunächst die Oberfläche gefärbt, danach ebenfalls fixiert und anschließend zehn Minuten lang mit WashPerm-Puffer (10x) inkubiert, was zur Permeabilisierung der Zellmembranen führt. Auf diese Weise können die Antikörper-Fluorochrom-Komplexe in die Zelle gelangen und dort die Zytokine sowie internalisierte Oberflächenmarker, wie beispielsweise der CD3-Oberflächenmarker, erreichen und binden. Nach der intrazellulären Färbung wurden die Zellen wieder mit WashPerm Puffer gewaschen, um verbleibende Antikörper aus der Probe zu entfernen. Die Proben wurden anschließend mit dem Durchflusszytometer gemessen.

4.3 Antikörperfärbung von Patienten-Vollblut

Für die Untersuchung des Patientenblutes wurden 100 µl EDTA-Vollblut mit verschiedenen Antikörpern versetzt und 15 Minuten lang bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Um störende Erythrozyten aus dem Vollblut zu entfernen, wurden die Zellen 15 Minuten lang mit Versa Lyse inkubiert, was zu einer Lyse der Erythrozyten führt. Anschließend wurde zweimal mit Isoflow Puffer gewaschen und am Durchflusszytometer (Navios) gemessen.

Es wurde folgende Antikörperkombination (Panel) eingesetzt, mit dem Ziel Effektor-Gedächtniszellen, zentrale Gedächtniszellen, T_{EMRA}-Zellen und naive T-Zellen bestimmen und auswerten zu können.

Tab. 10: Versuchsansatz : Gedächtnis- und T_{EMRA}-Zellen

Spezifität	Fluorchrom	Volumen (100µl Vollblut)
CD3	APC AF 750	1 / 50
CD4	APC	1 / 25
CD8	APC 700	1 / 200
CD57	FITC	1 / 6,25
CD28	PerCPCy 5.5	1 / 33,33
CD45	KrO	1 / 25
CD45RA	PacBlue	1 / 10
CCR7	PE	1 / 10
HLA-DR	ECD	1 / 20
CD27	PC7	1 / 25

4.4 Nachweis von Interleukin 8

Um den chronischen Entzündungsstatus der Patienten in die Untersuchung einzubringen, wurde das in vielen entzündlichen Prozessen wirksame Zytokin Interleukin-8 (IL-8) im Spenderblut einen Tag vor dem Eingriff sowie drei und sechs Monate nach dem Eingriff bestimmt. Hierzu wurde bei minus 80°C eingefrorenes EDTA-Patientenblut zur Untersuchung in ein akkreditiertes Diagnostik Labor (Labor Berlin) geschickt. Da IL-8 nicht nur in löslicher Form im Blut vorkommt, sondern auch gebunden an Leukozyten sowie an das sogenannte Duffy-Antigen von Erythrozyten, wurde eine Erythrozyten-Lyse durchgeführt und das IL-8 mittels Immulite™ (vollautomatisiertes Chemilumineszenz-Immunoassay System) ausgewertet. Durch die Erythrozyten-Lyse konnte sowohl das lösliche als auch das zellgebundene IL-8 gemessen werden und erlaubt dadurch eine Beurteilung der vorliegenden Entzündung der letzten 120 Tage (LaborBerlin).

4.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit GraphPad PRISM® Version 6.00. Zu Beginn wurde mithilfe des Shapiro Wilk Tests auf Normalverteilung getestet. Da nicht alle Messungen normalverteilt waren, wurde bei der weiteren Auswertung von keiner Normalverteilung in allen Messungen ausgegangen, um einheitlich statistische Tests anwenden zu können. Es wurden nichtparametrische statistische Tests angewendet. Der Mann Whitney U Test im direkten Vergleich zweier unabhängiger Gruppen und der Wilcoxon Rangsummen Test in der statistischen Auswertung von Verlaufsmessungen. Im direkten Vergleich der beiden untersuchten Aortenklappenersatzverfahren wurde zur Auswertung eine lineare Regression angewendet. Hierdurch konnten die Kovarianten Alter und Geschlecht berücksichtigt und herausgerechnet werden.

In den Abbildungen sind jeweils die Darstellungsart der Daten, der angewendete statistische Test sowie die statistische Signifikanz ($p < 0,05$) dargestellt.

5. Ergebnisse

5.1 Etablierung eines durchflusszytometrischen Multiparameter-Protokolls zum Nachweis verschiedener T-Zellpopulationen

Ziel des Versuches war die Etablierung eines Protokolls zur durchflusszytometrischen Analyse verschiedener Immunzellpopulationen des adaptiven Immunsystems. Hierfür mussten verschiedene Oberflächenmoleküle von Immunzellen kombiniert werden, um eine Differenzierung der verschiedenen Immunzellpopulationen zu ermöglichen. Zellen können in der Durchflusszytometrie anhand ihrer Größe, Granularität und Oberflächenmoleküle unterschieden werden. So tragen die Zellen aufgrund ihrer Aufgaben und Funktionen unterschiedliche Moleküle, wie beispielsweise Rezeptoren an der Zelloberfläche. Färbt man diese Strukturen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern, können die Zellen anhand ihres Phänotyps unterteilt und identifiziert werden. Die Zusammenstellung der verschiedenen Antikörper für eine Messung hängt unter anderem von der Art der an die Antikörper gekoppelten Fluorochromen, der Antikörperaffinität zur Zielstruktur und zum Beispiel der Dichte des jeweiligen Oberflächenmoleküls auf der Zellmembran ab. Viele Aspekte müssen demnach berücksichtigt werden, um ein Protokoll zu etablieren, welches eine zuverlässige und valide Bestimmung der Zellen ermöglicht. Ziel der Arbeit war es, eine Antikörperzusammenstellung zu finden, mit der es möglich ist T_{EMRA}-Zellen und ihre Untergruppen (Subsets) darzustellen. Auf diese Weise können sowohl die Frequenz der Zellen jedes Subsets bestimmt werden als auch ihre Funktion und ihr Phänotyp näher untersucht werden.

Ein bereits bestehendes Protokoll wurde hierfür angepasst und optimiert. Das Protokoll wurde mit weiteren Antikörpern ergänzt, um die Identifizierung der Zellpopulationen zu verbessern. Anfänglich ergaben sich Probleme bei der Darstellung der CD8-positiven T-Zellen. Es konnten keine glaubhaften Mengen an CD8-positiven T-Zellen gemessen werden, die Werte waren stets zu gering. Eine häufig festgestellte Ratio zwischen CD8-positiven und CD4-positiven T-Zellen betrug 1:5 bis 1:7. Physiologisch ist jedoch ein Verhältnis von 1:2 bis 1:3. Zudem war die Trennung der Zellen, die mit dem Antikörper für CCR7-BV650 markiert wurden, nicht zufriedenstellend. Die valide Bestimmung und Darstellung eines entsprechenden Analysefensters war somit nicht möglich.

Ziel war es deshalb das Protokoll in Hinblick auf eine valide Messung der CD8-positiven T-Zellen zu optimieren. Es wurden hierfür unterschiedliche Antikörper unter Berücksichtigung ihres jeweils gekoppelten Fluorochroms und des jeweiligen Zellklons miteinander kombiniert, bis ein reproduzierbares Ergebnis erreicht wurde.

Ergebnisse

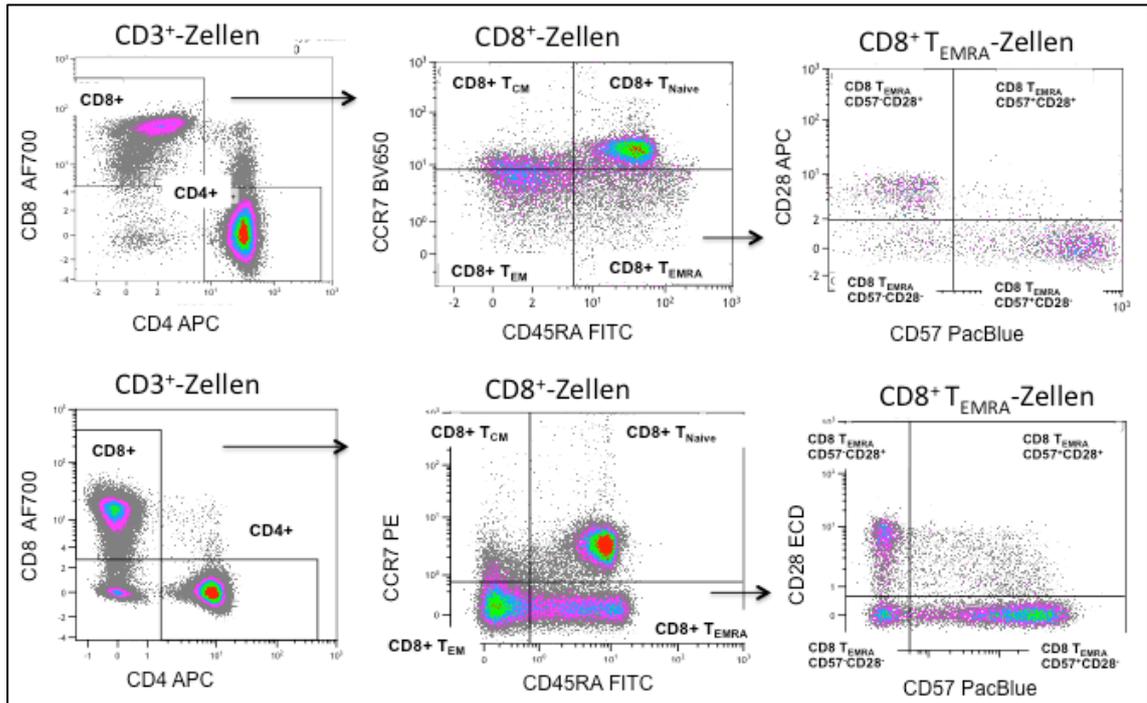


Abb. 9: Darstellung des Ausgangsprotokolls und des neu etablierten Protokolls. Ausgangsprotokoll (oben) links: unphysiologische CD8/CD4-Ratio, oben-Mitte: schlechte Trennung der CCR7-exprimierenden Zellen, oben-rechts: Darstellung der T_{EMRA}-Subsets und Darstellung des neu etablierten Protokolls (unten): unten-links: physiologische CD8/CD4-Ratio, unten-Mitte: reproduzierbare klare Darstellung der für CCR7-positiver bzw. -negativer Zellen, unten-rechts: Darstellung der T_{EMRA}-Subsets.

5.2 Charakterisierung und Untersuchung von T_{EMRA}-Zellen und deren Subsets

T_{EMRA}-Zellen wurden mittels der Oberflächenmoleküle CD3/CD8/CD45RA/CCR7/CD28/CD57 in verschiedene Subsets unterteilt, welche in Abbildung 11 dargestellt sind. Zudem wurden zentrale- und Effektor-Gedächtniszellen sowie naive T-Zellen anhand ihrer Expression von CCR7 und CD45RA differenziert und als Vergleichsgruppen analysiert.

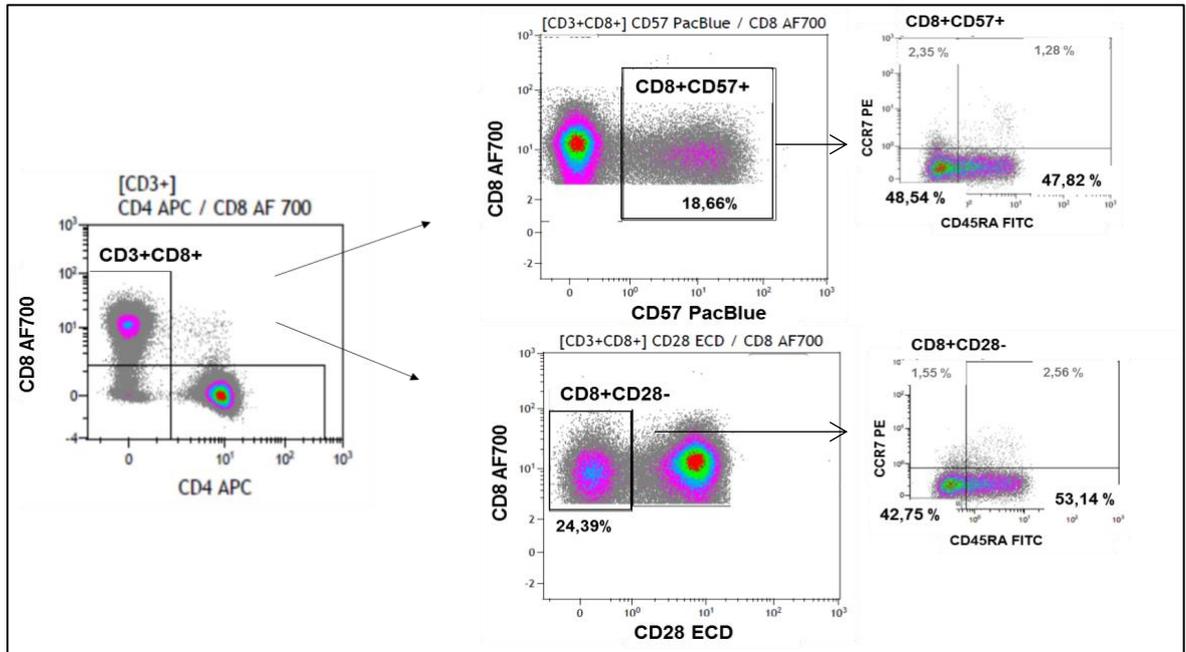


Abb. 10: Darstellung der Definition der Auswertestrategie von CD8-positiven CD57^{pos} und CD8^{pos}CD28^{neg}-Subsets. Die Auswertung dieser Subsets geht aus einer CD3-positiven und CD8-positiven Population hervor (links), ohne Berücksichtigung von CCR7 und CD45RA (mitte). Darstellung von CD8^{pos}CD57^{pos}- und CD8^{pos}CD28^{neg}-Zellen unter Berücksichtigung der Marker CCR7 und CD45RA (rechts).

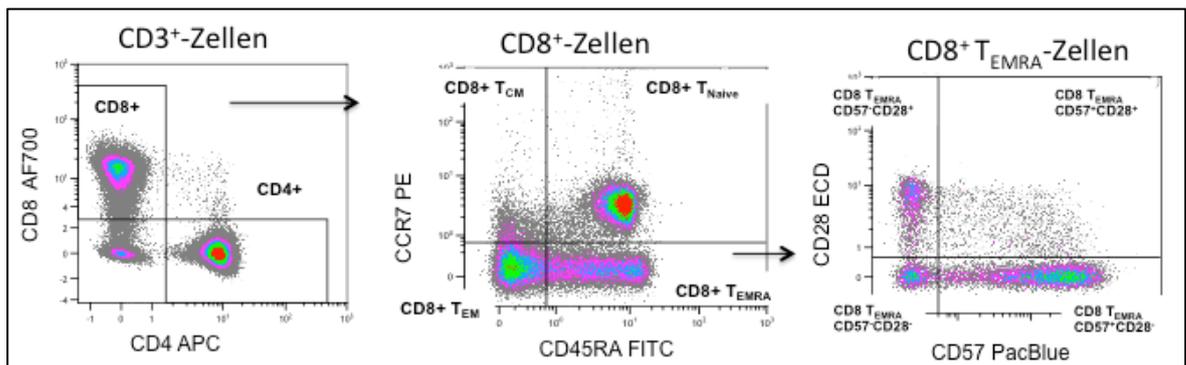


Abb. 11: Darstellung der Definition und Auswertung von CD8-positiven T_{EMRA}-Subsets unter Berücksichtigung von CCR7 und CD45RA und CD57 und CD28.

5.2.1 Untersuchung der gesunden Kontrollgruppe

CMV-positive Personen weisen besonders hohe Frequenzen von CD8-positiven T_{EMRA} -Zellen im peripheren Blut auf (van de Berg, Yong et al. 2012). Da höhere Frequenzen an T_{EMRA} -Zellen auch den Nachweis der jeweiligen T_{EMRA} -Subsets erleichtern, wurden die ersten Analysen mit Blut von gesunden CMV-positiven Spendern im Alter zwischen 20 bis 35 Jahren durchgeführt. Die T_{EMRA} -Zellen und ihre Subsets wurden auf ihre phänotypischen Eigenschaften sowie auf ihre Funktionalität untersucht. Um CMV-spezifische Phänomene ausschließen zu können, wurden im Verlauf ebenfalls CMV-negative Spender untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen. Zudem wurden zentrale Gedächtniszellen, Effektor-Gedächtniszellen und naive T-Zellen untersucht, um potentielle Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu den T_{EMRA} -Zellen herauszufinden und damit die jeweiligen Subsets besser verstehen und deren Eigenschaften besser interpretieren zu können.

Im Hinblick auf die Verteilung der Gedächtniszellen zeigte sich eine klassische Verteilung. Naive T-Zellen wiesen die höchste Frequenz auf, gefolgt von Effektor- und T_{EMRA} -Zellen. Am geringsten vertreten waren die zentralen Gedächtniszellen in der CD8-positiven Zellpopulation. Dies zeigte sich sowohl in den CMV-positiven als auch in den CMV-negativen Spendern.

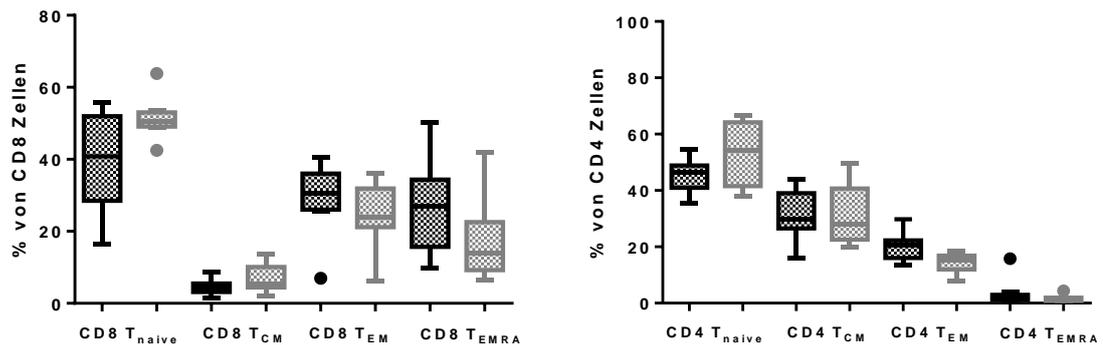
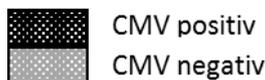


Abb. 12: Prozentuale Darstellung der Verteilung von CD8- und CD4-positiven Gedächtnis-T-Zellen. T_{naive} = naive T-Zellen, T_{CM} = zentrale T-Gedächtniszellen, T_{EM} = T-Effektor-Gedächtniszellen, T_{EMRA} = Terminal differenzierte T-Gedächtniszellen, CMV positiv ($n=10$), CMV negativ ($n=8$). Darstellung der Rohdaten in Boxplots. Die Signifikanz von Unterschieden zwischen den Vergleichsgruppen wurde mit dem Mann-Whitney-Test bestimmt. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die Darstellung der Gedächtniszellen zeigte eine klassische Verteilung. Naive T-Zellen wiesen die höchste Frequenz auf, gefolgt von Effektor- und T_{EMRA} -Zellen bei CD8-positiven Zellen. Am geringsten vertreten waren die zentralen Gedächtniszellen. Bei CD4-positiven Zellen waren die Effektor- und T_{EMRA} -Zellen am geringsten vertreten. Es konnten in den Gedächtniszellen und naiven T-Zellen keine signifikanten Unterschiede zwischen CMV-positiven und CMV-negativen Spendern nachgewiesen werden.

Ergebnisse

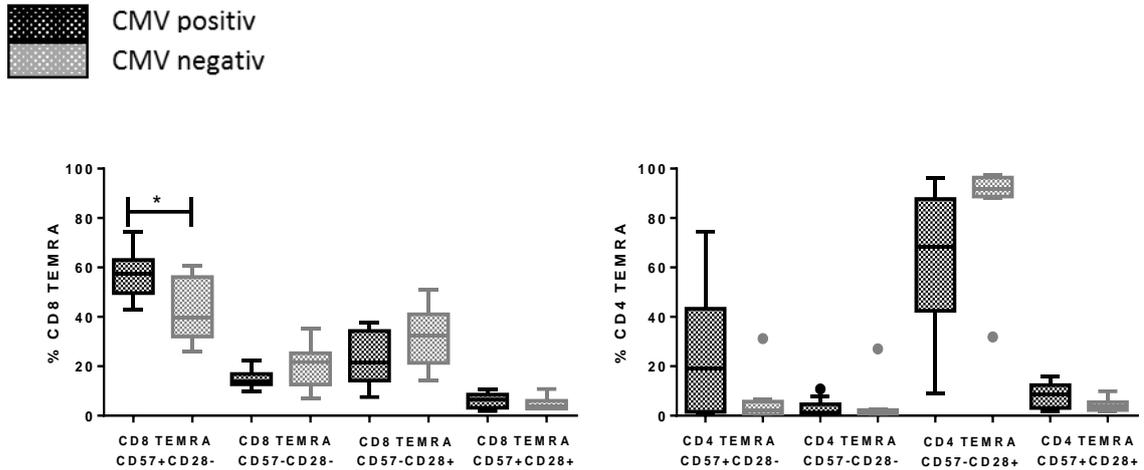


Abb. 13: Prozentuale Darstellung der Verteilung von CD8- und CD4-positiven T_{EMRA} -Zellsubsets. CMV-positiv ($n=10$), CMV-negativ ($n=8$). Darstellung der Rohdaten in Boxplots. Die Signifikanz von Unterschieden zwischen den Vergleichsgruppen wurde mit dem Mann-Whitney-Test bestimmt. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die Darstellung der T_{EMRA} -Subpopulationen zeigt, dass CMV-positive Spender signifikant mehr CD8 positive T_{EMRA} $CD57^{pos}CD28^{neg}$ Zellen aufweisen als CMV-negative Spender (* $p < 0,05$). Die prozentuale Verteilung der vier Subsets ist in CMV-positiven und CMV-negativen Spendern gleich. So zeigt sich in beiden Spendergruppen die CD8-positive T_{EMRA} $CD57^{pos}CD28^{neg}$ -Population am prominentesten und die doppelt-positive Population als am wenigsten vertreten.

Die Untersuchung der T_{EMRA} -Subpopulationen zeigte, dass CMV-positive Spender signifikant mehr CD8-positive T_{EMRA} $CD57^{pos}CD28^{neg}$ Zellen aufweisen als CMV-negativen Spender (* $p < 0,05$). Die prozentuale Verteilung der vier Subsets war in CMV-positiven und CMV-negativen Spendern jedoch gleich. So war in beiden Spendergruppen die CD8-positive T_{EMRA} $CD57^{pos}CD28^{neg}$ -Population am prominentesten wohingegen die doppelt-positive Population nur einen sehr geringen Teil einnahm.

In den CD4-positiven T_{EMRA} -Zellsubsets waren in der Verteilung keine signifikanten Unterschiede zwischen CMV-positiven und CMV-negativen Spendern zu erkennen. Den prominentesten Anteil nahmen die CD4-positiven T_{EMRA} $CD57^{neg}CD28^{pos}$ -Zellen ein. Am geringsten vertreten waren die CD4-positiven T_{EMRA} $CD57^{neg}CD28^{neg}$ -Zellen. Die restlichen beiden Subsets waren in CMV-positiven sowie in CMV-negativen Spendern relativ gering vertreten. Bei den CMV-positiven Spendern nahmen die CD4-positiven T_{EMRA} $CD57^{pos}CD28^{neg}$ -Zellen die zweitstärkste Population ein. Bei den CMV-negativen Spendern sind es die CD4-positiven T_{EMRA} $CD57^{pos}CD28^{pos}$ -Zellen (Abb.13).

5.2.1.1 Analyse von CD8- und CD4-positiven T_{EMRA} -Zellen sowie Subsets unter Berücksichtigung des CMV-Status

Es wurden die Zytokine INF γ , TNF α und IL-2 sowie der Degranulationsmarker CD107a und der Aktivierungsmarker CD154 untersucht. Die Zellpopulationen wurden nach ihrem Funktionsprofil eingeteilt. Dieses bezieht sich auf die proinflammatorische Aktivität und beinhaltet unter anderem die oben beschriebenen Zytokine. Je nachdem, wie viele proinflammatorische Marker in den Zellen nachweisbar waren, wurden einfach-positive Zellen, triple- und vierfach-positive Zellen untersucht. Einfach-positive Zellen weisen einen bestimmten Marker auf, beispielsweise INF γ , ohne Berücksichtigung der weiteren Marker. Triple-positive Zellen sind positiv für INF γ , TNF α und CD107a oder IL-2. Vierfach-positive Zellen exprimieren alle vier Marker.

Ergebnisse

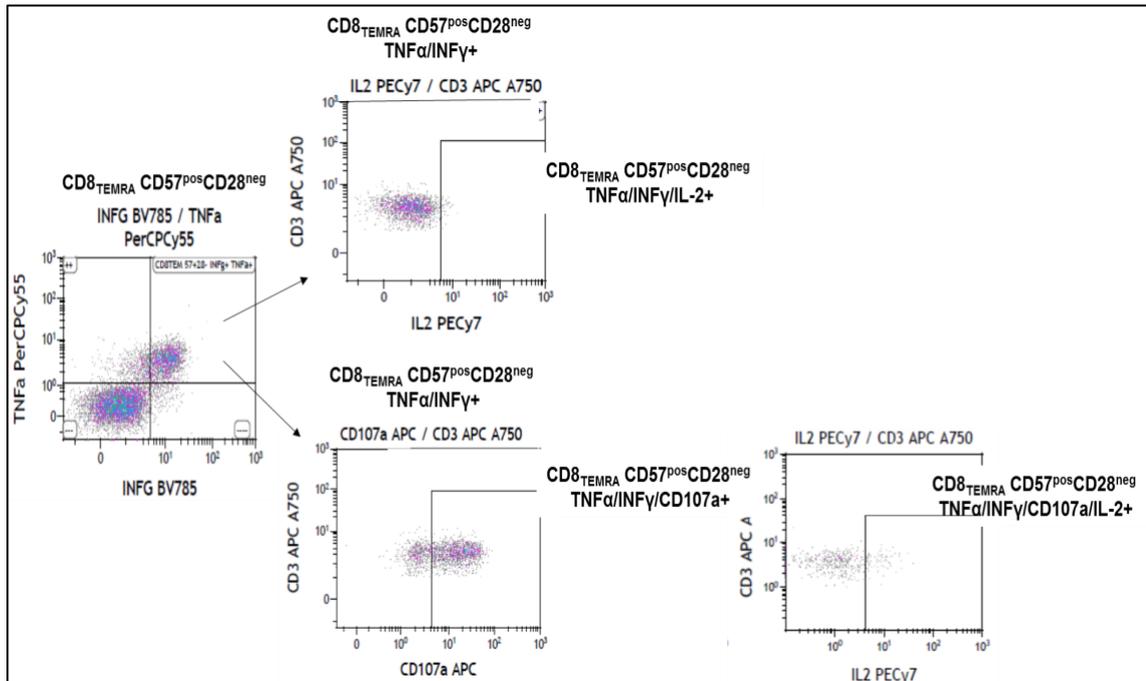


Abb. 14: Darstellung des Auswertevorgangs für triple- (INFG/TNF α /IL-2 und INFG/TNF α /CD107a) und vierfach-positive (INFG/TNF α /CD107a/IL-2) T-Zellen. Die Zellpopulationen wurden nach ihrem Funktionsprofil eingeteilt. Dieses bezieht sich auf die proinflammatorische Aktivität und beinhaltet unter anderem die oben beschriebenen Zytokine. Je nachdem, wie viele proinflammatorische Marker in den Zellen nachweisbar waren, wurden einfach-positive Zellen, triple- und vierfach-positive Zellen untersucht. Einfach-positive Zellen weisen einen bestimmten Marker auf, beispielsweise INFG, ohne Berücksichtigung der weiteren Marker. Triple-positive Zellen sind positiv für INFG, TNF α und CD107a oder IL-2. Vierfach-positive Zellen synthetisieren respektive exprimieren alle vier Marker.

In der Oberflächenfärbung wurde die PD-1-Expression (Programmed death 1 protein), ein Marker für die sogenannte Zellerschöpfung („Exhaustion“) und Regulation der Immunantwort, (Wei, Zhong et al. 2013) sowie CCR5, ein Marker, der die Migration von aktivierten T-Zellen in inflammatorisches Gewebe induziert und fördert (Qin, Rottman et al. 1998), untersucht. Hier wurden einfach- und zweifach-positive Zellen untersucht. Betrachtet man die Funktionalität der T_{EMRA}-Zellen, lassen sich statistisch signifikante Differenzen in der Interleukin-2-Produktion beobachten. Das CD57^{pos}CD28^{neg}-T_{EMRA}-Subset sowie das CD57^{pos}CD28^{pos}-T_{EMRA}-Zellsubset von CMV-negativen Spendern produzieren signifikant mehr Interleukin-2 (* = p < 0,05), als die entsprechenden T_{EMRA}-Zellsubsets aus CMV-positiven Spendern. Insgesamt produzieren CD8-positive T_{EMRA}-Zellen aus CMV-negativen Spendern mehr INFG, TNF α und CD107a, jedoch ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen. Dies zeigt sich in den für INFG, TNF α , IL-2, CD107a und CD154 positiven Zellen, sowie für dreifach- und vierfach-positive Zellen. CMV-positive Spender zeigten eine verstärkte Expression von PD-1 und CCR5 im Vergleich zu den CMV-negativen Spendern. Nur bei einem T_{EMRA}-Subset erreichten diese Unterschiede einen statistisch signifikanten Unterschied. Diese Signifikanz war nur in der CCR5 Expression im CD8-positiven T_{EMRA} CD57^{neg}CD28^{neg}-Subset zu erkennen.

Entsprechende Tabellen zu den beschriebenen Ergebnissen sind in den Supplementen (S1 bis S8) enthalten.

Die Untersuchung der Funktionalität von CD4-positiven T_{EMRA}-Zellsubsets zeigte, dass signifikante Unterschiede, sowohl in der Produktion von IL-2, als auch INFG, TNF α und CD107a zwischen Zellen aus CMV-positivem und CMV-negativem Spenderblut

Ergebnisse

bestehen. T_{EMRA}-Zellen aus CMV-negativem Spenderblut produzieren mehr inflammatorisch wirksame Zytokine als CD4-positive T_{EMRA}-Zellen aus CMV-positivem Spenderblut.

Die Analyse der Oberflächenmoleküle PD-1 und CCR5 zeigte eine erhöhte Expression von PD-1 im Blut von CMV-negativen Spendern. Die CCR5 Expression hingegen ist bei CMV-positiven Spendern größer als bei den T_{EMRA}-Zellen aus CMV-negativem Spenderblut. Ein signifikant relevanter Unterschied besteht jedoch nur in der CCR5-Expression in den CD4-positiven T_{EMRA} CD57^{pos}CD28^{neg}-Zellen und dem CD4-positiven T_{EMRA} CD57^{pos}CD28^{pos}-Subset.

Die entsprechenden Daten sind in den Supplementen S9 - S16 aufgeführt.

5.2.1.2 Funktionale und phänotypische Analyse von CD8-positiven T_{EMRA}-Zellsubsets CMV-positiver Spender

Zur weiteren Charakterisierung wurde ausschließlich das Blut von CMV-positiven Spendern untersucht da diese nachweislich mehr T_{EMRA}-Zellen aufweisen und demnach eine Untersuchung dieser Zellen erleichtern. Die Untersuchung der inflammatorisch-relevanten Zytokine INF γ , TNF α und IL-2 sowie des Degranulationsmarkers CD107a und des Aktivierungsmarker CD154 ergaben folgende Ergebnisse:

Hinsichtlich der INF γ -Synthese ergaben sich keine bedeutenden Unterschiede zwischen den verschiedenen T_{EMRA}-Zellsubsets. Der größte Unterschied zeigt sich zwischen den CD8-positiven T_{EMRA} CD57^{pos}CD28^{neg}-Zellen und dem doppelt-positiven Subset. Das CD57^{pos}CD28^{pos}-T_{EMRA}-Subset produziert signifikant mehr INF γ als das CD57^{pos}CD28^{neg}-T_{EMRA}-Subset (**p < 0,01). Die Analyse der TNF α -, IL-2-, CD107a- und CD154-Expression, respektive Synthese führte zu deutlicheren Unterschieden zwischen den Subsets. T_{EMRA}-Subsets, die das CD28 Molekül auf ihrer Oberfläche tragen produzieren die größte Anzahl von Zytokinen und weisen die höchste Expression von CD107a auf. Das mengenmäßig bedeutendste Subset (CD8-positiv T_{EMRA} CD57^{pos}CD28^{neg}-Zellen) weist dahingegen die geringste inflammatorische Aktivität auf.

Das hohe inflammatorische Potenzial von CD28 positiven Subsets spiegelt sich auch in den triple- und vierfach-positiven Zellen wieder.

Die Expression der Oberflächenmarker PD-1 und CCR5 alleine, sowie deren Koexpression, ist ebenfalls auf CD28-positiven Zellen am stärksten zu verzeichnen.

Bei der statistischen Auswertung mit dem Wilcoxon Rangsummen-Test muss berücksichtigt werden, dass das „pairing“ der Gruppen nicht immer positiv war und die statistische signifikant daher unter Vorbehalt betrachtet werden sollte. Dies war bei folgenden Subsets der Fall: TNF α -Synthese von CD8-positiven T_{EMRA} CD57^{pos}CD28^{neg} im Vergleich zu CD8-positiven T_{EMRA} CD57^{neg}CD28^{pos} und CD57^{pos}CD28^{pos} (**p < 0,01). CD154-Expression im Vergleich CD8-positiven T_{EMRA} CD57^{neg}CD28^{neg} mit CD8-positiven T_{EMRA} CD57^{pos}CD28^{pos} (*p < 0,05). INF γ /TNF α /IL-2/CD107a-Synthese von CD8-positiven T_{EMRA} CD57^{pos}CD28^{neg} im Vergleich zu CD8-positiven CD57^{neg}CD28^{pos} und CD57^{pos}CD28^{pos} (**p < 0,01). CCR5-Expression von CD8-positiven T_{EMRA} CD57^{neg}CD28^{pos} im Vergleich zu CD8-positiven CD57^{neg}CD28^{neg} und CD57^{pos}CD28^{neg} (**p < 0,01).

Ergebnisse

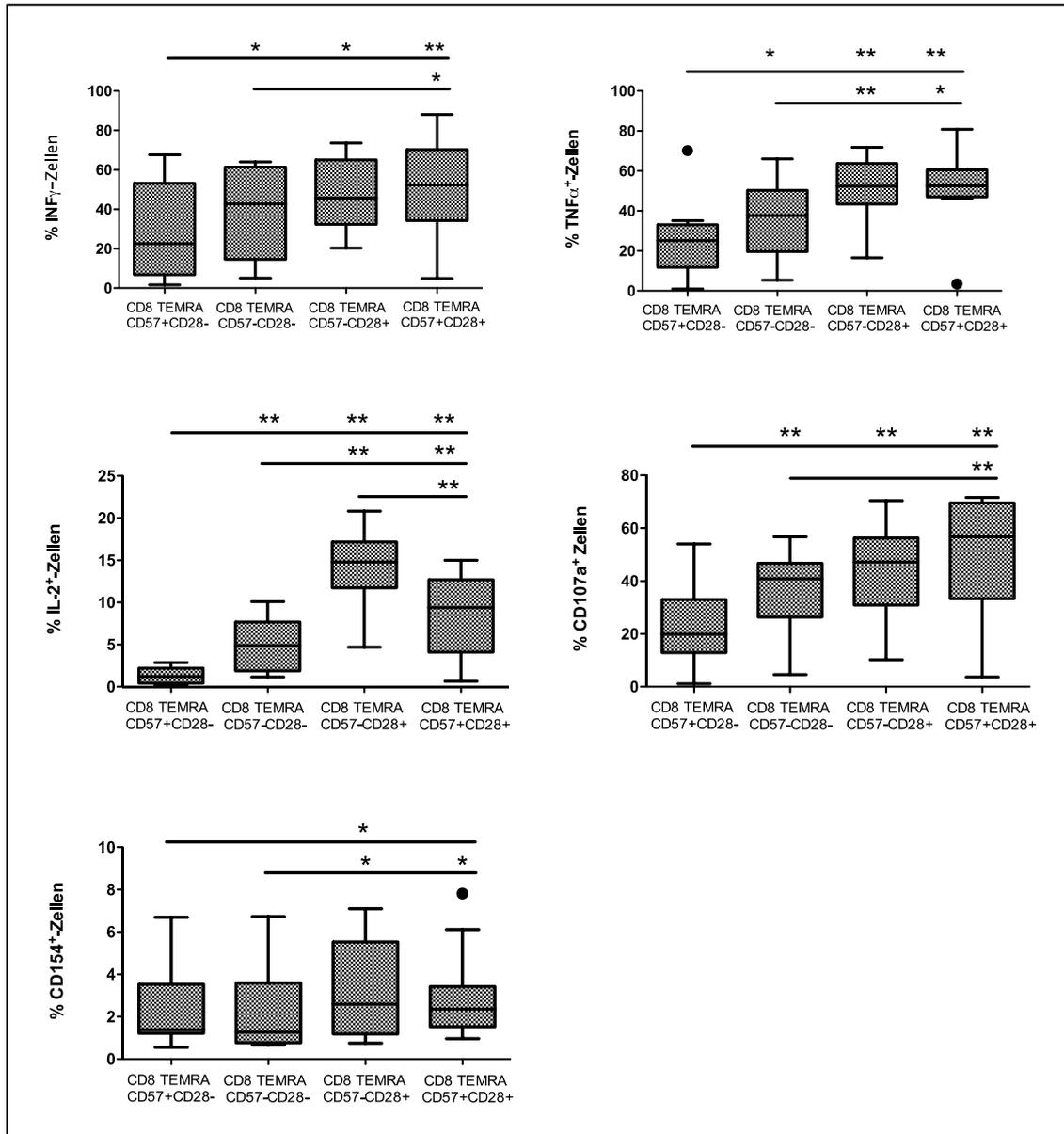


Abb. 15: Prozentuale Darstellung der INF γ , TNF α , IL-2, CD107a und CD154 Expression in CD8-positiven TEMRA-Subpopulationen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Blutstatus: CMV-positiv ($n=10$). Darstellung der Rohdaten in Boxplots. Die Signifikanz von Unterschieden zwischen den TEMRA-Subsets wurde mit dem Wilcoxon Rangsummentest bestimmt. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet. Oben-links: INF γ -positive TEMRA-Subsets, oben-rechts: TNF α -positive TEMRA-Subsets, Mitte-links: IL-2-positive TEMRA-Subsets, Mitte-rechts: CD107a-positive TEMRA-Subsets, unten-links: CD154-positive TEMRA-Subsets. Die Grafik zeigt, dass CD28-positive TEMRA-Subsets eine signifikant höhere inflammatorische Aktivität aufweisen als CD28-negative TEMRA-Subsets.

Ergebnisse

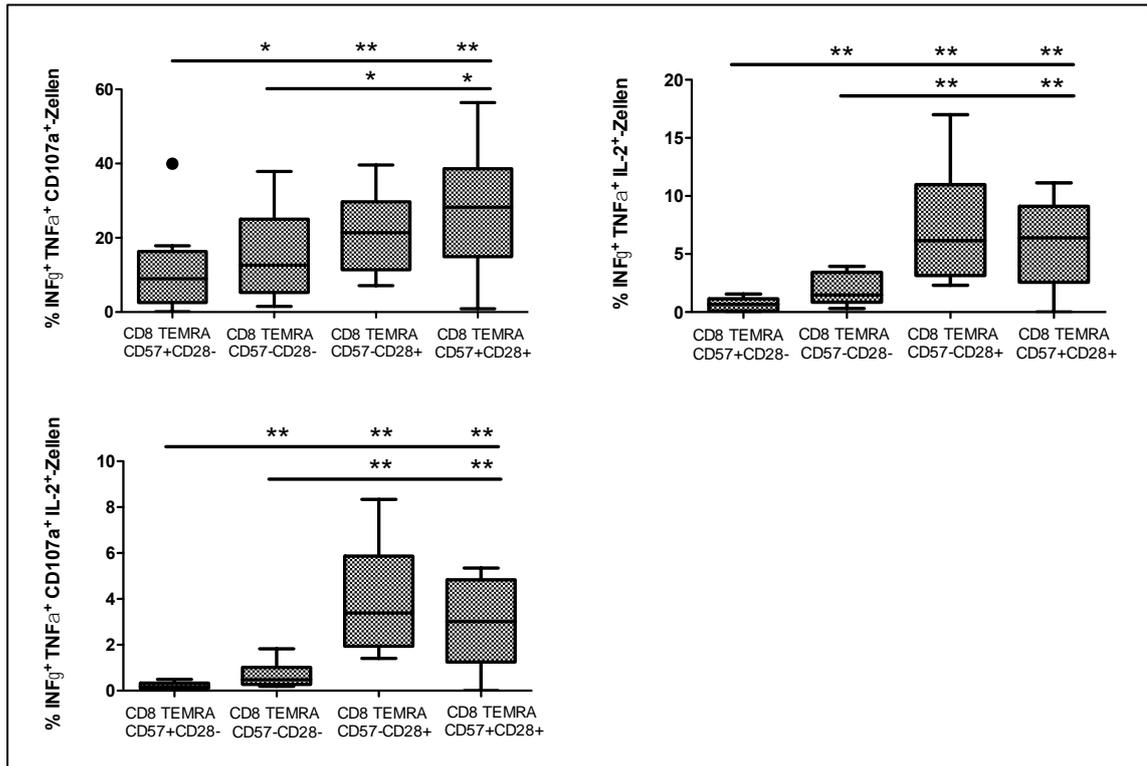


Abb. 16: Relative Darstellung der Multifunktionalität bei CD8-positiven T_{EMRA} Subsets. * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$, Blutstatus: CMV-positiv ($n=10$). Darstellung der Rohdaten in Boxplots. Die Signifikanz von Unterschieden zwischen den T_{EMRA} -Subsets wurde mit dem Wilcoxon Rangsummentest bestimmt. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet. Oben: triple-positive Zellen: oben-links: Für INF γ , TNF α und CD107a- positive T_{EMRA} -Subsets, oben-rechts: Für INF γ , TNF α und IL-2-positive T_{EMRA} -Subsets, unten: vierfach-positive T_{EMRA} -Subsets. Die Grafik zeigt, dass CD28-positive T_{EMRA} -Subsets signifikant mehr Zytokine produzieren als CD28-negative T_{EMRA} -Subsets.

Ergebnisse

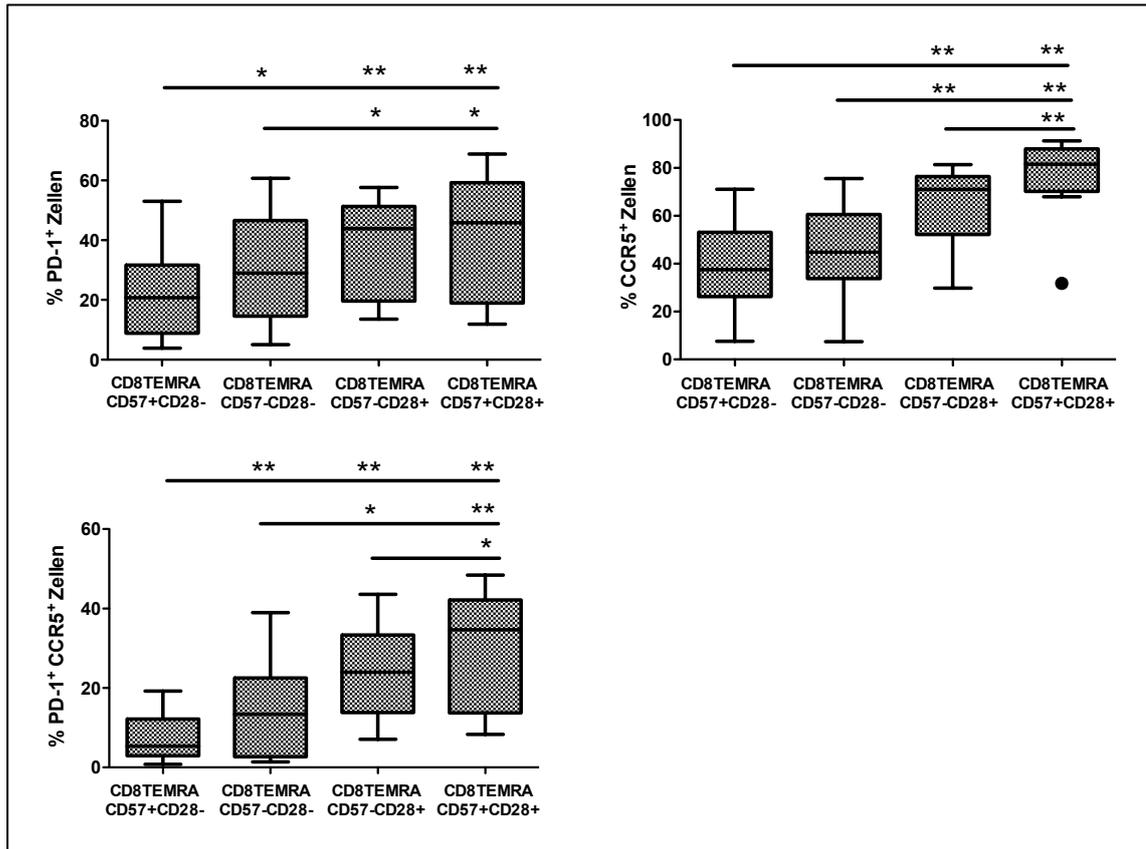


Abb. 17: Prozentuale Darstellung der PD-1 und CCR5 Expression auf CD8-positiven T_{EMRA} -Subsets. * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$, Blutstatus: CMV-positiv ($n=10$). Darstellung der Rohdaten in Boxplots. Die Signifikanz von Unterschieden zwischen den T_{EMRA} -Subsets wurde mit dem Wilcoxon Rangsummentest bestimmt. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet. Links: PD-1-positive T_{EMRA} -Subsets, oben-rechts: CCR5-positive T_{EMRA} -Subsets, unten: PD-1/CCR5-doppelt-positive T_{EMRA} -Subsets. Die Grafik zeigt, dass CD28-positive T_{EMRA} -Subsets signifikant mehr CCR5 und PD1 exprimieren, dieses zeigt sich sowohl in den einfach- als auch in den doppelt-positiven Subsets.

5.2.1.3 Vergleich von CD8-positiven T_{EMRA} -Subsets unter Berücksichtigung der Oberflächenmarker CCR7 und CD45RA

Ebenfalls Bestandteil der Auswertung war die Analyse von den bereits in verschiedenen Studien gebräuchlichen T_{EMRA} Zelldefinitionen, $CD8^{pos}CD57^{pos}$ T_{EMRA} Zellen und den $CD8^{pos}CD28^{neg}$ T_{EMRA} Zellen.

Die Daten der Auswertung von $CD8^{pos}CD57^{pos}$ T_{EMRA} Zellen und $CD8^{pos}CD28^{neg}$ T_{EMRA} Zellen, ohne und mit Berücksichtigung der Marker CCR7 und CD45RA, sind in Abbildung 18 und 19 dargestellt.

Der Vergleich dieser ausschließlich mittels der Marker CD57 und CD28 definierten Subsets im Vergleich zu den T_{EMRA} -Subsets, die zusätzlich CCR7 und CD45RA exprimieren macht deutlich, dass es sich bei den untersuchten T_{EMRA} -Subsets nicht um identische Zellen handelt. Im Vergleich von $CD8^{pos}CD28^{neg}$ T_{EMRA} -Zellen mit $CD8^{pos}CCR7^{neg}CD45RA^{pos}CD28^{neg}$ T_{EMRA} -Zellen sind signifikante Unterschiede in der IL-2 Synthese, sowohl in den single-positiven Zellen als auch in den für INF γ /TNF α /IL-2 triple-positiven Zellen vorhanden (** $< 0,01$). Auch in den INF γ /TNF α /CD107a triple-positiven Zellen konnte ein signifikanter Unterschied gezeigt werden (** $< 0,01$). Im Vergleich der phänotypischen Marker zeigen sich signifikante Unterschiede in der Expression von PD-1 sowie in der Koexpression von PD-1/CCR5 (** $< 0,01$), siehe Abbildung 18.

Ergebnisse

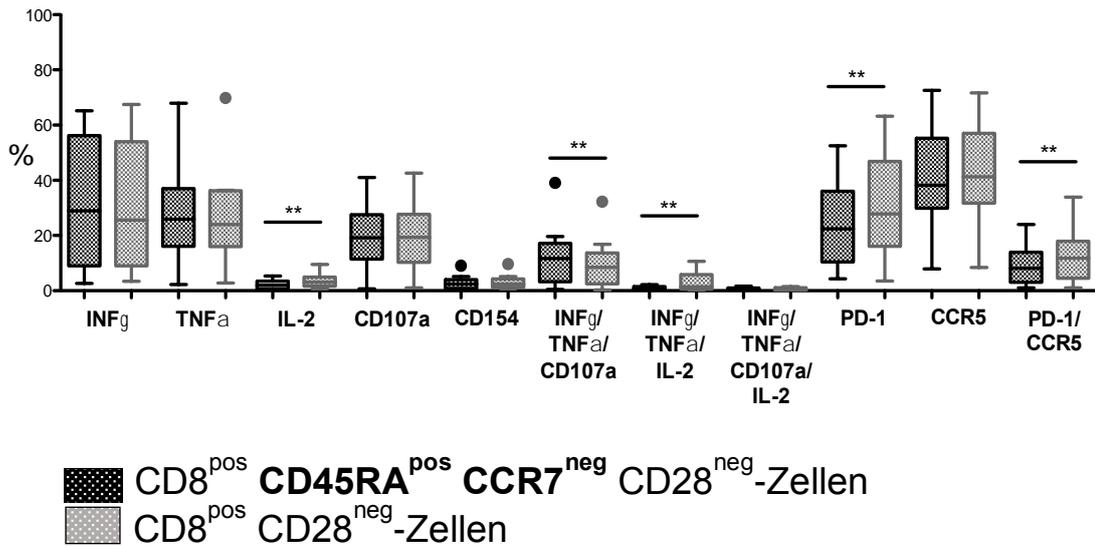


Abb. 18: Darstellung der Daten der Auswertung von CD8^{pos}CD28^{neg} Zellen ohne und mit Berücksichtigung der Marker CCR7 und CD45RA. Der Vergleich dieser ausschließlich mittels des Markers CD28 definierten Subsets im Vergleich zu den T_{EMRA}-Subsets, die zusätzlich CCR7 und CD45RA exprimieren macht deutlich, dass es sich bei den untersuchten T_{EMRA}-Subsets nicht um identische Zellen handelt. Es bestehen statistisch signifikante Unterschiede in der inflammatorischen Aktivität (Produktion von IL-2, INF γ , TNF α /IL-2, INF γ , TNF α /CD107a) sowie in den untersuchten phänotypischen Markern PD-1 und PD-1/CCR5. Darstellung der Rohdaten in Boxplots. Die Signifikanz von Unterschieden zwischen den Zellpopulationen wurde mit dem Wilcoxon Rangsummentest bestimmt. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet, n = 10.

Im Vergleich von CD8^{pos}CD57^{pos} T_{EMRA}-Zellen mit CD8^{pos}CCR7^{neg}CD45RA^{pos}CD57^{pos} T_{EMRA}-Zellen zeigen sich in fast allen untersuchten funktionalen und phänotypischen Markern signifikante Unterschiede. Der einzige Marker bei dem kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Vergleichsgruppen besteht ist CD154. In der INF γ und TNF α Synthese zeigen sich signifikante Unterschied mit einem *p < 0,05 auf, während die restlichen untersuchten Marker der Vergleichsgruppen sich mit einer Signifikanz von **p < 0,01 unterscheiden, siehe Abbildung 19.

Ergebnisse

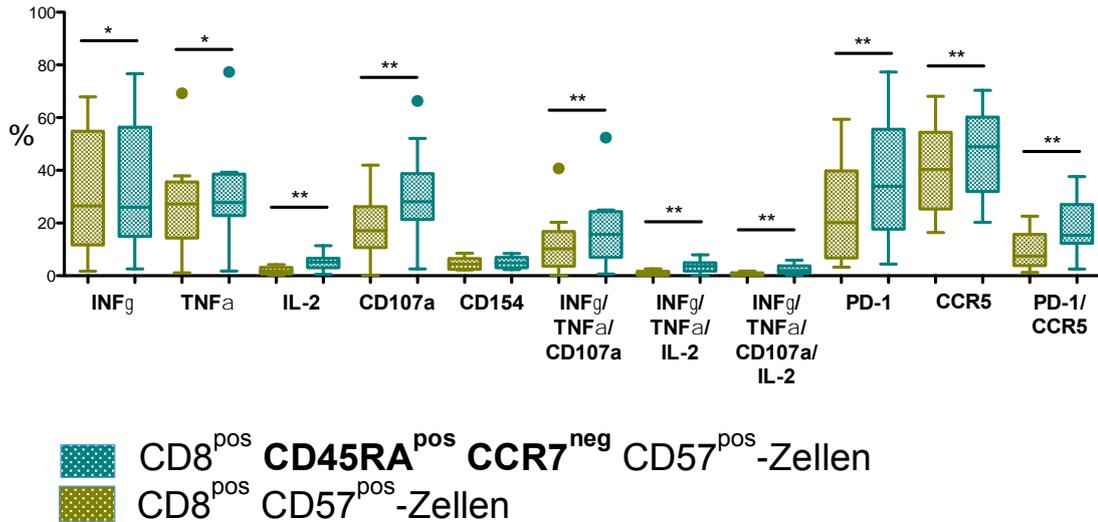


Abb. 19: Darstellung der Daten der Auswertung von CD8^{pos}CD57^{pos} Zellen ohne und mit Berücksichtigung der Marker CCR7 und CD45RA. Der Vergleich dieser ausschließlich mittels des Markers CD57 definierten Subsets im Vergleich zu den T_{EMRA}-Subsets, die zusätzlich CCR7 und CD45RA exprimieren macht deutlich, dass es sich bei den untersuchten T_{EMRA}-Subsets nicht um identische Zellen handelt. Es bestehen statistisch signifikante Unterschiede in der inflammatorischen Aktivität (Produktion von INF γ , TNF α ; IL-2, CD107a und den triple-positiven Zellen) sowie in den untersuchten phänotypischen Markern PD-1, CCR5 und PD1/CCR5. Darstellung der Rohdaten in Boxplots. Die Signifikanz von Unterschieden zwischen den Zellpopulationen wurde mit dem Wilcoxon Rangsummentest bestimmt. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet, n = 10.

5.2.1.4 Vergleich von CD8-positiven T_{EMRA}-Subsets mit T-Effektor-Gedächtniszellen

Um potentielle Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den T_{EMRA}-Zellsubpopulationen und weiteren Gedächtniszellen evaluieren zu können, wurden neben Terminal differenzierten T-Zellen zusätzlich zentrale Gedächtniszellen, Effektor-Gedächtniszellen und naive T-Zellen untersucht und ausgewertet.

Die in Abbildung 20 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass eine große funktionelle Ähnlichkeit zwischen T-Effektor-Gedächtniszellen und dem CD8^{pos}CD57^{neg}CD28^{pos}-T_{EMRA}-Subset besteht. Statistisch signifikante Unterschiede bestehen ausschließlich in der CD154, der PD-1 und der PD-1/CCR5-Expression (**p < 0,01).

Ergebnisse

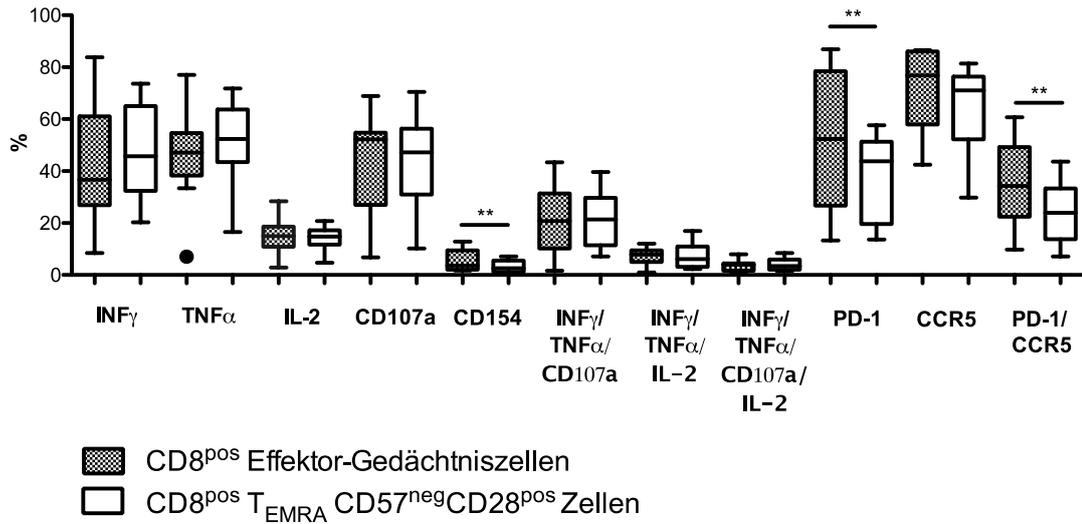


Abb. 20: Vergleichende Darstellung des CD8-positiven T_{EMRA} CD57^{neg}CD28^{pos}-Subset mit CD8-positiven T-Effektor-Gedächtniszellen. Die Abbildung zeigt, dass eine enorme funktionelle Ähnlichkeit zwischen T-Effektor-Gedächtniszellen und dem CD8^{pos}CD57^{neg}CD28^{pos}- T_{EMRA}-Subset besteht. Statistisch signifikante Unterschiede bestehen ausschließlich in der CD154 und PD-1-Expression. Darstellung der Rohdaten in Boxplots. Die Signifikanz von Unterschieden zwischen den Zellpopulationen wurde mit dem Wilcoxon Rangsummentest bestimmt. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet, n = 10.

Die gewonnenen Ergebnisse erfordern die genauere Bestimmung der Expressionsmuster, weshalb der geometrische Mittelwert (MFI = Mean of Fluorescence Intensity) des Oberflächenmoleküls CD45RA auf CD8-positiven T_{EMRA}-Subsets sowie auf den T-Gedächtniszellen bestimmt wurde. Der MFI-Wert kann Aufschluss darüber geben, ob sich die Expression von CD45RA auf CD28-positiven und CD28-negativen Zellen unterscheidet. Dies könnte dafür sprechen, dass Effektor-Gedächtniszellen im Analysefenster („Gate“) von den CD45RA-positiven Zellen vorhanden sind oder dass sich die Problematik auf ein falsches Setzen des Gates zurückführen lässt.

Um dies zu untersuchen, wurde zunächst ein sogenanntes „Backgating“ durchgeführt. Hierbei wird die Lage der T_{EMRA}-Subsets im Analysefenster der CD8-positiven T_{EMRA}-Zellen bestimmt. Die Zellen werden in den vorherigen Analysefenstern zurückverfolgt. Ihre Lage wird dabei in allen Analysefenstern dargestellt (siehe Abbildung 21).

Ergebnisse

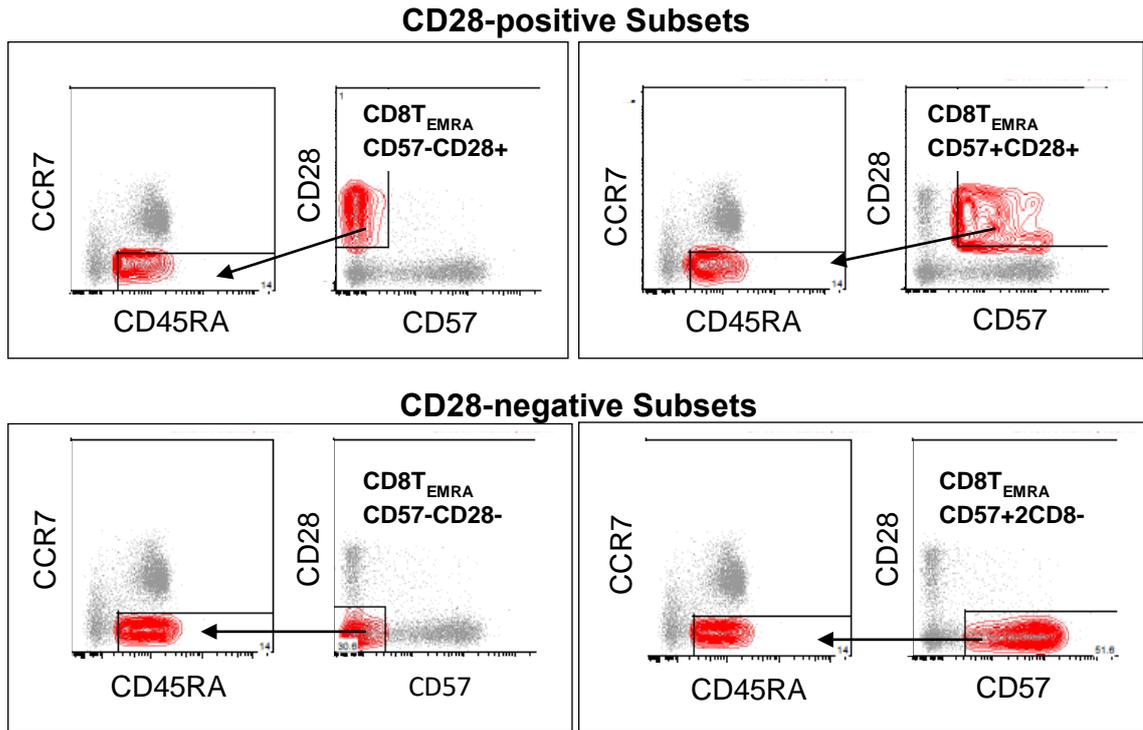


Abb. 21: Darstellung der T_{EMRA} -Subsets im T_{EMRA} -Analysefenster („Backgating“). Dargestellt sind hier zum einen die verschiedenen CD8-positiven T_{EMRA} -Subsets (jeweils rechts) und zum anderen das Analysefenster von CD8-positiven T_{EMRA} -Zellen (jeweils links) davon. Für die Auswertung wurde die Dichte des jeweiligen Subsets im T_{EMRA} -Analysefenster analysiert und beurteilt. Die Lage im Analysefenster spiegelt die Expressionsrate von CD45RA wieder. Aus der Abbildung geht augenscheinlich hervor, dass sich CD28-positive Zellen weiter links im Analysefenster befinden und somit eine geringere CD45RA-Expression aufweisen als die heterogen verteilten CD28-negativen Subsets.

Dargestellt sind hier zum einen die verschiedenen CD8-positiven T_{EMRA} -Subsets (jeweils rechts) und zum anderen das Analysefenster von CD8-positiven T_{EMRA} -Zellen, jeweils links davon. Für die Auswertung wurde die Dichte des jeweiligen Subsets im T_{EMRA} -Analysefenster analysiert und beurteilt. Die Lage im Analysefenster spiegelt die Expressionsrate von CD45RA wieder. Aus der Abbildung geht augenscheinlich hervor, dass sich CD28-positive Zellen weiter links im Analysefenster befinden und somit eine geringere CD45RA-Expression aufweisen als die heterogen verteilten CD28-negativen Subsets.

Um dies mit konkreten Zahlenwerten zu überprüfen, wurde der MFI von CD45RA ermittelt (Abbildung 22).

Ergebnisse

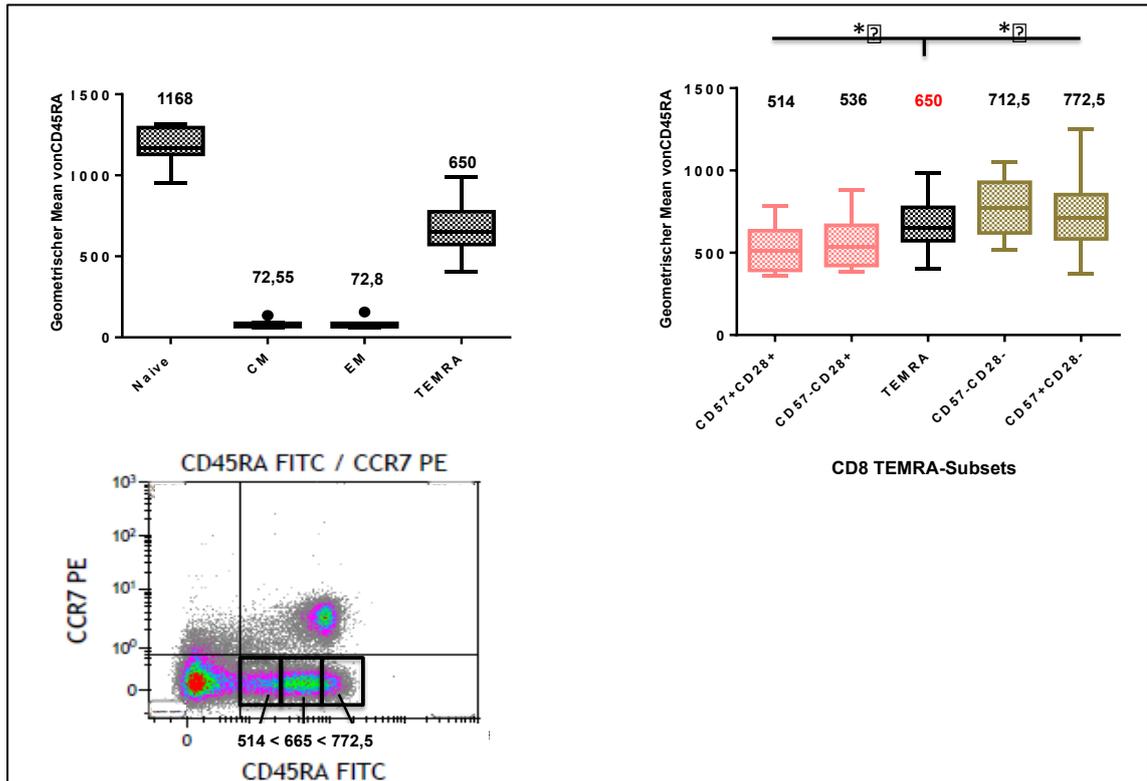


Abb. 22: Darstellung des MFI (Mean of Fluorescence Intensity) des Oberflächenmarkers CD45RA. $n = 10$. Oben links: MFI von naiven T-Zellen, zentralen Gedächtniszellen (TCM) Effektor-Gedächtniszellen (TEM) und T_{EMRA} -Zellen. Oben rechts: Darstellung des MFI der verschiedenen T_{EMRA} -Subsets und der klassischen T_{EMRA} -Zellen. Unten links: CD45RA Analysefenster mit Darstellung der Lage der MFIs der T_{EMRA} -Zellen und Subsets. Die verschiedenen Abbildungen zeigen, dass CD28-positive T_{EMRA} -Subsets einen signifikant unterschiedlichen MFI von CD45RA aufweisen als CD28-negative T_{EMRA} -Subsets. Darstellung der Rohdaten in Boxplots. Die Signifikanz von Unterschieden zwischen den T_{EMRA} -Subsets wurde mit dem Wilcoxon Rangsummentest bestimmt. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

Dieser wurde bei den CD8-positiven T_{EMRA} -Subsets sowie bei naiven-, zentralen-, Effektor-Gedächtniszellen und klassischen T_{EMRA} -Zellen bestimmt. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass der geometrische Mittelwert (MFI) von CD45RA auf CD28-positiven Zellen kleiner ist als der MFI der klassischen CD8-positiven T_{EMRA} -Population. Der MFI CD28-negativer Zellen wiederum ist größer als der klassische MFI von CD8-positiven T_{EMRA} -Zellen. Der MFI der Effektor-Gedächtniszellen liegt mit 72,8 deutlich entfernt vom MFI CD28-positiver Zellen der zwischen 514 und 536 liegt. Zudem wurde die Verteilung von CD8-positiven T_{EMRA} -Subsets, hervorgehend aus zwei verschiedenen Zellpopulationen mit unterschiedlicher CD45RA-Expressionsrate, ermittelt (siehe Abb. 23).

Ergebnisse

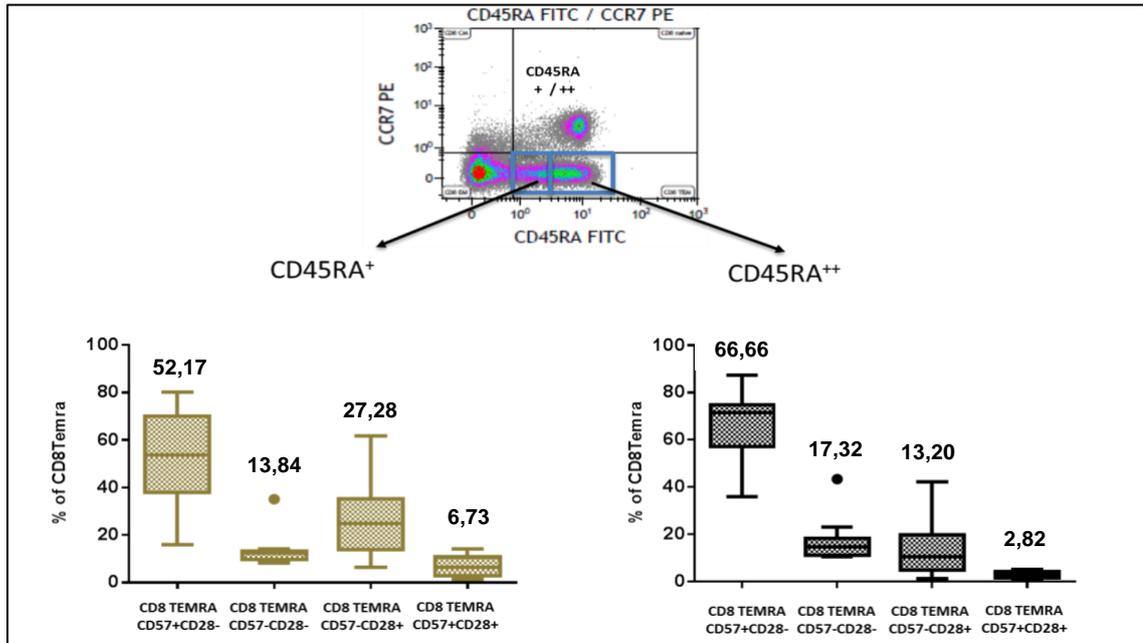


Abb. 23: Prozentuale Darstellung der Verteilung der CD8 T_{EMRA} -Subsets, ausgewertet aus einem CD45RA-positiven und einem CD45RA-hochpositiven Bereich des Auswertefensters. $n = 10$ (oben). T_{EMRA} -Subsets, die aus dem CD45RA-hochpositiven Areal resultieren entwickeln sich tendenziell mehr in CD28-negative Subsets (unten rechts, Mittelwerte), wohingegen Zellen, die aus einem CD45RA-positiven Areal resultieren sich mehr zu CD28-positiven Zellen entwickeln (unten links, Mittelwerte).

Diese Ergebnisse legen dar, dass Subsets, die aus einer Zellpopulation mit hoher CD45RA-Expressionsrate resultieren, tendenziell weniger CD28 auf ihrer Oberfläche exprimieren, als jene Subsets, die aus einer Zellpopulation mit geringerer CD45RA-Expression hervorgehen.

5.2.1.5 Phänotypische und funktionale Unterschiede von CD4-positiven T_{EMRA} -Subsets

CD4-positive T_{EMRA} -Subsets weisen im Vergleich zu CD8-positiven Zellen untereinander weniger deutliche Unterschiede auf. Das CD4 T_{EMRA} CD57^{pos}CD28^{pos}-Subset produziert signifikant mehr INF γ als das CD4 T_{EMRA} CD57^{neg}CD28^{pos}-Subset (* $p < 0,05$). Zu berücksichtigen ist in diesem Vergleich ein negatives „pairing“ der Gruppen beim Wilcoxon Rangsummen Test wobei die statistische Signifikanz unter Vorbehalt zu betrachten ist. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede in der TNF α -Produktion zwischen den einzelnen Subsets. Das CD4-positive T_{EMRA} CD57^{neg}CD28^{pos}-Subset synthetisiert signifikant mehr IL-2 als die restlichen CD4-positiven T_{EMRA} -Subsets (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Das CD4-positive T_{EMRA} CD57^{neg}CD28^{neg}-Subset sowie das CD4-positive T_{EMRA} CD57^{pos}CD28^{pos}-Subset produzieren signifikant mehr CD107a als das CD4-positive T_{EMRA} CD57^{pos}CD28^{neg}-Subset. CD154 wird statistisch signifikant am stärksten vom CD4-positiven T_{EMRA} -Subset CD57^{neg}CD28^{pos} exprimiert. Im Hinblick auf die triple-positiven Zellen (INF γ /TNF α /CD107a) zeigen sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Subsets. In den für INF γ /TNF α /IL-2 und vierfach-positiven Subsets zeigt sich eine signifikant höhere Produktivität in den CD28-positiven CD4 T_{EMRA} -Subsets (siehe Abb. 24). Hier beruht die statistische Signifikanz im Vergleich von CD4-positiven T_{EMRA} CD57^{neg}CD28^{pos} im Vergleich zu CD4-positiven T_{EMRA} CD57^{pos}CD28^{neg} und CD57^{pos} CD28^{pos} auf einem negativen „pairing“ beim Wilcoxon Rangsummen Test. Dieses muss bei der Auswertung berücksichtigt werden.

Ergebnisse

Die Analyse der Oberflächenmarker PD-1 und CCR5 auf CD4-positiven T_{EMRA} -Zellsubsets ergab, bis auf eine Ausnahme, keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Subsets. Alleinig das CD4-positiv T_{EMRA} $CD57^{neg}CD28^{pos}$ -Subset exprimiert jeweils signifikant weniger PD-1 und CCR5 als die anderen CD4-positiven T_{EMRA} -Subsets. Wobei die CD4-positiven T_{EMRA} $CD57^{pos}CD28^{pos}$ -Zellen signifikant mehr PD-1/CCR5 exprimieren als die restlichen Subsets (siehe Abbildung 25).

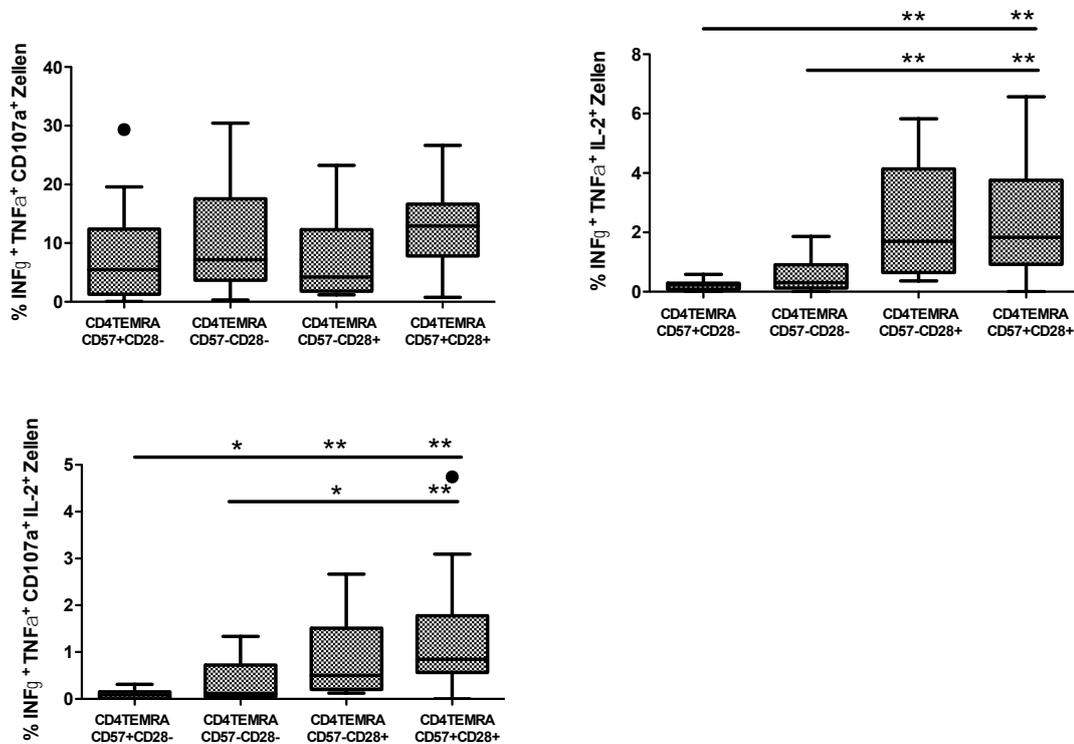


Abb. 24: Darstellung der triple-positiven Zellen ($INF\gamma/TNF\alpha/CD107a$ und $INF\gamma/TNF\alpha/IL-2$) sowie vierfach-positiven $CD4 T_{EMRA}$ -Subsets. In den für $INF\gamma/TNF\alpha/CD107a$ positiven Subsets zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. In den für $INF\gamma/TNF\alpha/IL-2$ -positiven Subsets und den vierfach-positiven Subsets zeigt sich eine signifikant höhere Produktivität in den $CD28$ -positiven $CD4 T_{EMRA}$ -Subsets, CMV-positives Spenderblut. Darstellung der Rohdaten in Boxplots. Die Signifikanz von Unterschieden zwischen den T_{EMRA} -Subsets wurde mit dem Wilcoxon Rangsummentest bestimmt. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet, $n = 10$.

Ergebnisse

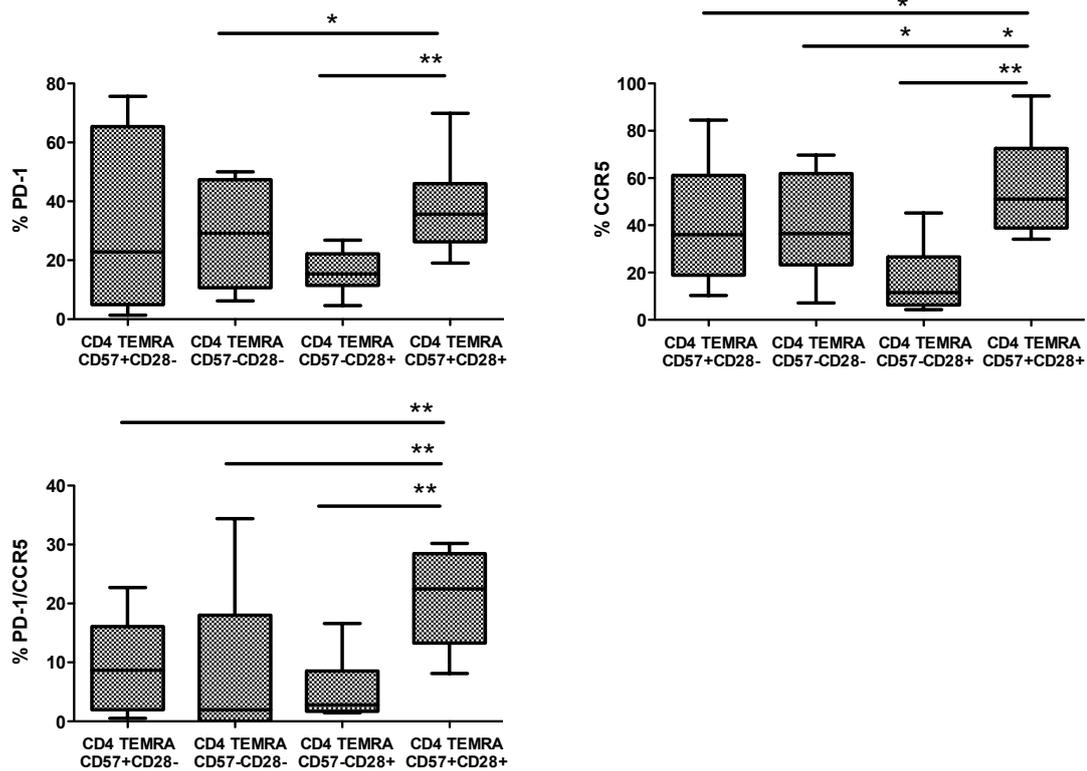


Abb. 25 Die Analyse der Oberflächenmarker PD-1 und CCR5 auf CD4-positiven T_{EMRA} -Zellsubsets ergab, dass das CD4-positiv T_{EMRA} $CD57^{neg}CD28^{pos}$ -Subset jeweils signifikant weniger PD-1, CCR5 und PD1/CCR5 als die anderen CD4-positiven T_{EMRA} -Subsets exprimiert. Die CD4-positiven T_{EMRA} $CD57^{pos}CD28^{pos}$ -Zellen exprimieren signifikant mehr PD-1/CCR5 als die restlichen Subsets, CMV-positives Spenderblut. Darstellung der Rohdaten in Boxplots. Die Signifikanz von Unterschieden zwischen den T_{EMRA} -Subsets wurde mit dem Wilcoxon Rangsummentest bestimmt. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet, $n = 10$.

5.2.2 Phänotypische und funktionale Untersuchung von CD8- und CD4-positiven T_{EMRA} -Zellen und deren Subsets bei Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose

Nach der Untersuchung von gesunden CMV-positiven Spendern, soll das Blut von Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose untersucht werden.

Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass die Pathogenese der Aortenklappenstenose kein passiver Prozess ist, sondern viel mehr aktiv von inflammatorischen Mechanismen beeinflusst wird (Dweck, Boon et al. 2012). Bereits in früheren Studien wurde ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten T_{EMRA} -Zell-Frequenz im peripheren Blut und dem Auftreten der Aortenklappenstenose beschrieben (Wu, Maurer et al. 2007, Winchester, Wiesendanger et al. 2011).

In der hier vorgestellten Arbeit wurden neun Patienten eingeschlossen, die unter einer schweren Aortenklappenstenose leiden und zehn Kontrollpatienten, bei welchen eine Aortenklappenstenose ausgeschlossen werden konnte. Die Probanden sind bezüglich des Alters und Geschlechts aufeinander abgestimmt. Die kardiologische Kontrollgruppe umfasst Patienten, die unter diversen kardiovaskulären Erkrankungen leiden, wie zum Beispiel Bluthochdruck.

Ergebnisse

Tab. 11: Anzahl, Alter (Mittelwert \pm Standardabweichung) und Geschlecht von Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose und der kardiologischen Kontrollgruppe.

	Aortenklappenstenose Patienten	Kardiologische Kontrollgruppe
Anzahl der Probanden (n)	9	10
Alter in Jahren	75,89 \pm 3,10	74,9 \pm 2,07
Geschlecht (m/w)	6 / 3	6 / 4

In der Verteilung der CD8-positiven T_{EMRA}-Zellsubsets in Aortenklappenstenose-Patienten zeigen sich im Vergleich zu der kardiologischen Kontrollgruppe keine statistisch signifikanten Unterschiede. Das CD8-positive T_{EMRA} CD57^{pos} CD28^{neg}-Subset ist mit einem relativen Anteil von ca. 70 % das am stärksten vertretende Subset gefolgt von den CD8-positiven T_{EMRA} CD57^{neg} CD28^{pos}-Zellen und dem doppelt-negativem Subset. Das doppelt-positive Subset ist mit einem relativen Anteil von ca. 5 % am geringsten vertreten.

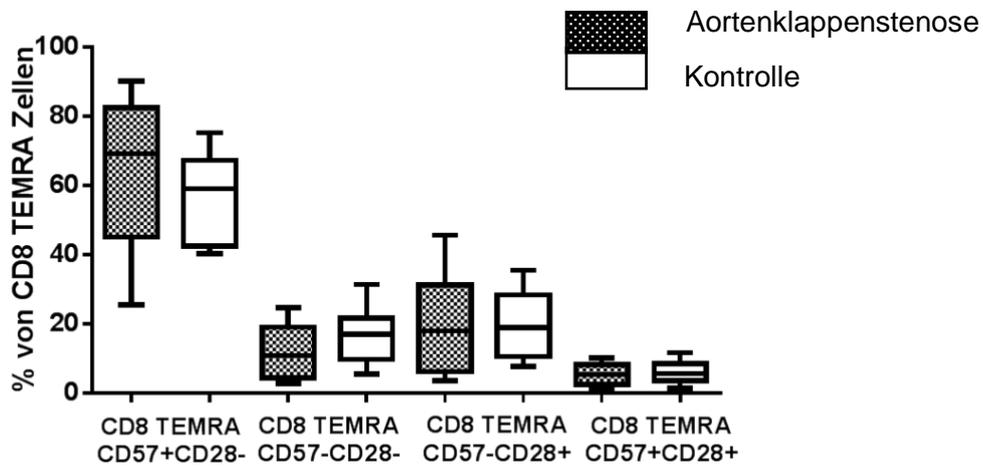


Abb. 26: Vergleichende Darstellung der CD8-positiven T_{EMRA}-Subset-Verteilung in Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose und einer Kontrollgruppe. Aortenklappenstenose (n = 9), Kontrollgruppe (n = 10). Das CD8-positive T_{EMRA} CD57^{pos} CD28^{neg}-Subset ist mit einem relativen Anteil von ca. 70 % das am stärksten vertretende Subset gefolgt von den CD8-positiven T_{EMRA} CD57^{neg} CD28^{pos}-Zellen und dem doppelt-negativem Subset. Das doppelt-positive Subset ist mit einem relativen Anteil von ca. 5 % am geringsten vertreten. Die Abbildung zeigt, dass keine statistisch signifikanten Unterschiede in der T_{EMRA}-Zellverteilung zwischen Aortenklappenstenose-Patienten und der Kontrollgruppe bestehen. Darstellung der Rohdaten in Boxplots. Die Signifikanz von Unterschieden zwischen den klinischen Gruppen wurde mit dem Man Whitney Test bestimmt. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

Die Auswertung der proinflammatorischen Aktivität der CD8-positiven T_{EMRA}-Subsets in Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose ergab, dass hinsichtlich der Synthese von INF γ , TNF α und der CD107a Expression das CD8-positive T_{EMRA} CD57^{pos} CD28^{pos}-Subset, wie auch in der kardiologischen Kontrollgruppe, die höchste proinflammatorische Aktivität aufzeigt. In der Beurteilung der Interleukin-2-Synthese konnte eine statistisch signifikant gesteigerte Bildung im CD8-positiven T_{EMRA} CD57^{neg} CD28^{pos}-Subset nachgewiesen werden. Das CD8-positive CD57^{pos} CD28^{neg}-Subset zeigte eine signifikant stärkere Expression von CD154 als das doppelt negative Subset (**p < 0,01).

Ergebnisse

Diese Tendenzen zeigen sich auch in den multifunktionalen Zellen. Die T_{EMRA} -Subsets, welche CD28 an ihrer Oberfläche exprimieren, weisen die höchste proinflammatorische Aktivität auf.

Untersuchungen der Expression der Oberflächenmarker PD-1 und CCR5 zeigten eine Hochregulation von CCR5 auf doppelt-positiven Zellen sowie eine gesteigerte Expression von PD-1 auf CD28 positiven Subsets. Dies zeigte sich auch in den für beide Marker doppelt positiven Zellen.

Im Vergleich von Aortenklappenstenose-Patienten mit der kardiologischen Kontrollgruppe zeigten sich lediglich statistisch signifikante Unterschiede in den IL-2-produzierenden Zellen, wobei zu berücksichtigen ist, dass es sich hier nicht um „wahre“ IL-2 einfach-positive Zellen handelt. Bei der Auswertung der IL-2-positiven Zellen wurde lediglich die IL-2-Synthese der jeweiligen Zellpopulation untersucht, wobei die Synthese der weiteren Zytokine in diesem Auswertevorgang unberücksichtigt blieb (Abbildung 27). Was in dieser Untersuchung leider unberücksichtigt blieb, ist der jeweilige CMV-Status der untersuchten Patienten. Ein potentieller Einfluss des CMV-Status auf die IL-2-Produktion der Zellen bleibt hier demnach zu berücksichtigen.

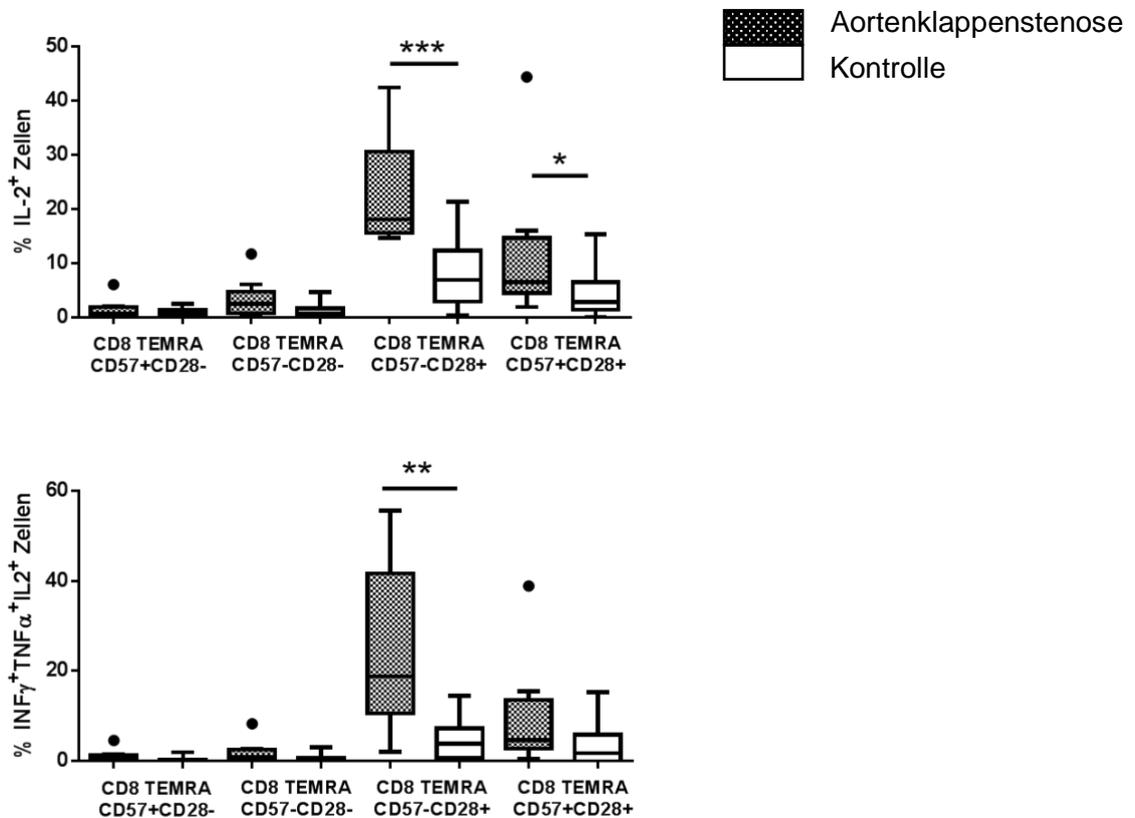


Abb. 27: Darstellung der IL-2-produzierenden Zellen (oben) und der triple-positiven Zellen (unten) in Aortenklappenstenose-Patienten ($n = 9$) und einer kardiologischen Kontrollgruppe ($n = 10$). $*p < 0,5$ und $**p < 0,01$. Die Abbildung zeigt die bestehenden signifikanten Unterschiede in der IL-2-Produktion der CD28-positiven T_{EMRA} -Zellen von Aortenklappenstenose-Patienten im Vergleich zur kardiologischen Kontrollgruppe. Darstellung der Rohdaten in Boxplots. Die Signifikanz von Unterschieden zwischen den klinischen Gruppen wurde mit dem Man Whitney Test bestimmt. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

Ergebnisse

In der Verteilung der CD4-positiven T_{EMRA} -Zellsubsets in Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose zeigten sich im Vergleich zu der kardiologischen Kontrollgruppe keine statistisch signifikanten Unterschiede. Das CD4-positive T_{EMRA} $CD57^{neg}CD28^{pos}$ -Subset ist mit einem relativen Anteil von ca. 85 % das am stärksten vertretene Subset gefolgt von den CD4-positiven T_{EMRA} $CD57^{pos}CD28^{neg}$ -Zellen und dem doppelt-positiven Subset. Das doppelt-negative Subset ist mit einem relativen Anteil von ca. 1 % kaum messbar (Abbildung 28).

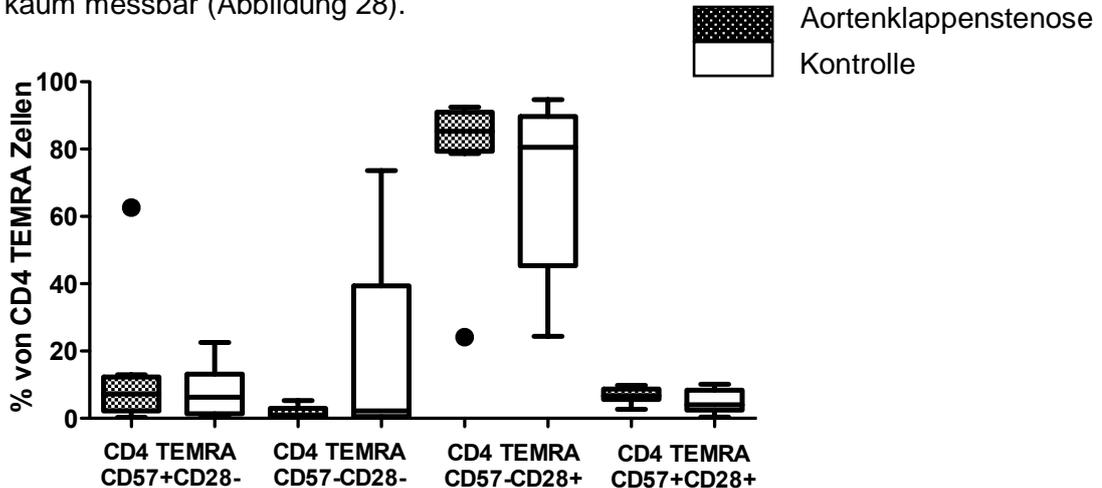


Abb. 28: Vergleichende Darstellung der CD4-positiven T_{EMRA} -Subset-Verteilung in Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose und einer Kontrollgruppe. Aortenklappenstenose ($n = 9$), Kontrollgruppe ($n = 10$). Das CD4-positive T_{EMRA} $CD57^{neg} CD28^{pos}$ -Subset ist mit einem relativen Anteil von ca. 85 % das am stärksten vertretene Subset gefolgt von den CD4-positiven T_{EMRA} $CD57^{pos}CD28^{neg}$ -Zellen und dem doppelt-positiven Subset. Das doppelt-negative Subset ist mit einem relativen Anteil von ca. 1 % sehr gering. Die Abbildung zeigt, dass keine statistisch signifikanten Unterschiede in der T_{EMRA} -Zellverteilung zwischen Aortenklappenstenose-Patienten und der Kontrollgruppe bestehen. Darstellung der Rohdaten in Boxplots. Die Signifikanz von Unterschieden zwischen den klinischen Gruppen wurde mit dem Man Whitney Test bestimmt. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

Die funktionelle Analyse der Zellen ließ keine signifikanten Unterschiede in der $INF\gamma$ - und $TNF\alpha$ -Produktion verzeichnen. Ähnlich den Ergebnissen aus den CD8-positiven Populationen, konnte auch hier belegt werden, dass die CD28-positiven Subsets im Vergleich zu den restlichen Subsets eine signifikant höhere Menge an Interleukin-2 synthetisieren. Dies bestätigte sich ebenso in den triple- und vierfach-positiven Zellen ($INF\gamma/TNF\alpha/IL-2$ und $INF\gamma/TNF\alpha/IL-2/CD107a$). Das CD4-positive T_{EMRA} $CD57^{neg}CD28^{pos}$ -Subset zeichnet sich besonders durch eine hohe IL-2- und CD154-Synthese im Gegensatz zu den restlichen Subsets aus. Die statistische Signifikanz liegt hier bei $**p < 0,01$. Die Expression des Degranulationsmarkers CD107a zeigt sich im doppelt-negativen Subset am prominentesten.

Die phänotypische Analyse von PD-1 und CCR5 auf CD4-positiven T_{EMRA} -Subsets zeigte eine signifikant höhere Expression von PD-1 auf dem doppelt positiven Subset und eine signifikant geringere Expression von CCR5 auf CD4-positiven T_{EMRA} $CD28^{pos}CD57^{neg}$ -Zellen im Vergleich zu den restlichen Subsets. Die relative Anzahl von CCR5 und PD-1 doppelt positiven Zellen ist im CD4-positiven T_{EMRA} $CD28^{pos}CD57^{pos}$ -Subset am bedeutendsten.

Der direkte Vergleich von T_{EMRA} -Subsets aus dem Blut von Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose mit einer kardiologischen Kontrollgruppe zeigt keine signifikanten Unterschiede in der funktionellen sowie phänotypischen Analyse der Zelle.

5.3 Untersuchung von T-Gedächtniszellen, T_{EMRA}-Zellen und deren Subsets zur Charakterisierung immunologisch-assoziierten Mechanismen im Kontext der schweren Aortenklappenstenose

Verschiedene Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass Zellen des adaptiven Immunsystems eine Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen spielen. Winchester und Wu zeigten beispielsweise bereits 2011, dass eine erhöhte Frequenz an T_{EMRA}-Zellen mit dem Auftreten der Aortenklappenstenose assoziiert ist (Wu, Maurer et al. 2007, Winchester and Kodali 2011, Winchester, Wiesendanger et al. 2011).

Zu Beginn der Studie und vor jeglicher invasiven Behandlung wurden Patienten mit einer schweren Aortenklappenstenose näher untersucht. Es galt Veränderungen innerhalb der naiven- und Gedächtnis-T-Zellen, insbesondere der T_{EMRA} Zellen genau zu untersuchen. Diese Untersuchungen erfolgten im Vergleich zu einer kardiologischen Kontrollgruppe. Diese Kontrollgruppe schließt Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen ein, bei denen diagnostisch eine Aortenklappenstenose zuvor ausgeschlossen wurde. So gelang es eine zum Alter und Geschlecht passende Kontrollgruppe für die Aortenklappenstenose-Patienten zu bilden. Es wurden nicht nur die verschiedenen T-Zellpopulationen untersucht, sondern auch proinflammatorisch wirksamen Zytokine wie zum Beispiel TNF α und IL-6, die Leukozytenzahl, der CRP-Wert und das NT-proBNP aus den Routinelaboruntersuchungen erfasst und ausgewertet. Zudem wurde eine umfangreiche Anamnese hinsichtlich der Medikamente und Krankengeschichte erfasst.

Die immunologische Charakterisierung des adaptiven Immunsystems von Aortenklappenstenose-Patienten und der kardiologischen Kontrollgruppe erfolgte mittels Durchflusszytometrie und wurde mit linearer Regression unter Berücksichtigung der Kovarianten Alter und Geschlecht statistisch ausgewertet.

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden 56 Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose und 35 Kontrollpatienten einbezogen. Die Aortenklappenstenose-Patienten waren $79,71 \pm 0,83$ (SEM) Jahre alt und die Kontrollpatienten $77,20 \pm 0,84$ (SEM) Jahre alt. Die Geschlechterverteilung (m/w) lag bei 30/26 bei Patienten mit Aortenklappenstenose und bei 21/14 bei den Kontrollpatienten (siehe Tab. 12).

NT-proBNP, ein Marker zur Erfassung der Herzinsuffizienz wies einen signifikanten Unterschied (**p < 0,001) zwischen den beiden Gruppen auf. Das NT-pro BNP war im Blut von Aortenklappenstenose-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Zudem sind die Zytokine IL-6 und IL-8 in Patienten mit Aortenklappenstenose ebenfalls signifikant erhöht (**p < 0,0002, *p = 0,0011) (siehe Tab. 13).

Tab. 12: Darstellung von Patientenzahl, Alter (Mittelwert \pm Standardfehler, SEM) und Geschlechter-Verhältnis von TAVI-Patienten und kardiologischer Kontrollgruppe.

	Aortenklappenstenose Patienten	Kardiologische Kontrollgruppe
Anzahl der Probanden	56	35
Alter in Jahren	$79,71 \pm 0,83$	$77,20 \pm 0,84$
Geschlecht (m/w)	30/26	21/14

Tab. 13: Darstellung der Parameter Leukozytenzahl/nl, CRP (mg/dl), NT pro BNP (pg/ml), TNF α (pg/ml), IL-6 (pg/ml) und IL-8 (pg/ml) von Aortenklappenstenose-Patienten, die im Anschluss

Ergebnisse

eine TAVI erhielten (n = 56) und der kardiovaskulären Kontrollgruppe (n = 35). Mann-Whitney-U-Test, Signifikanz: *p = < 0,05, **p = > 0,01, ***p = > 0,001, Routinelaborparameter, Median.

	Aortenklappenstenose Patienten	p-Wert	Kardiologische Kontrollgruppe
Leukozyten / nl	6,75	ns = 0,3841	6,12
CRP (mg/dl)	2,05	ns = 0,4730	1,90
NT pro BNP (pg/ml)	1266	*** = < 0,0003	346,5
TNFα (pg/nl)	10,70	ns = 0,1457	9,70
Interleukin 6 (pg/ml)	3,90	*** = 0,0005	2,20
Interleukin 8 (pg/ml)	351	** = 0,0011	140

Der mittels Durchflusszytometrie durchgeführte Vergleich von Zellen des adaptiven Immunsystems von Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose und einer kardiologischen Kontrollgruppe führte lediglich zu einem statistisch signifikanten Unterschied in der absoluten Leukozytenzahl/nl. Im Hinblick auf Lymphozyten und T-Zellen sowie CD8- und CD4-positive naive T-Zellen, T-Effektor-Gedächtniszellen, zentrale Gedächtniszellen, T_{EMRA}-Zellen und deren Subsets zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse sind als Medianwerte tabellarisch in den Supplementen S17-S20 nachzuvollziehen. Es wurde die absolute Zellzahl pro Nanoliter sowie der relative Zellanteil, gemessen und ausgewertet. Zur statistischen Auswertung wurde der Mann Whitney U Test angewendet.

5.4 Post-interventionelle immunologische Charakterisierung von Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose zu verschiedenen Zeitpunkten

Es wurden sowohl mit TAVI behandelte Aortenklappenstenose-Patienten, als auch Patienten, die einen chirurgischen Aortenklappenersatz erhielten, untersucht. Hierfür wurde das Blut einen Tag vor dem Eingriff sowie einen und fünf Tage nach der Intervention analysiert. Zusätzlich wurden Messungen nach drei und sechs Monaten durchgeführt. Die im Folgenden erläuterten Ergebnisse sind in den Tabellen S21 - S28 der Supplemente nachzuvollziehen.

Die Ergebnisse zeigen in beiden Behandlungsgruppen einen statistisch signifikanten Anstieg von Leukozyten sowie einen Abfall von Lymphozyten und T-Zellen einen Tag post interventionem. Bereits fünf Tage nach dem Eingriff zeigt sich im Blut von TAVI-Patienten eine Zu- bzw. Abnahme von Lymphozyten und Leukozyten so dass sich die Populationen im Hinblick zu den Ausgangskonzentrationen der Zellen wieder annähern. In der chirurgisch-behandelten Patientengruppe bleiben die Veränderungen in den Immunzellen bis fünf Tage post-operationem deutlich erkennbar. So bestehen um den Zeitpunkt fünf Tage nach dem Eingriff noch deutlichere Unterschiede in den Zellzahlen bezogen auf die Ausgangspopulation (S21-S28). In Betrachtung der Langzeitwerte, drei- sowie sechs Monate nach dem Eingriff, zeigt sich bei TAVI-Patienten in den Lymphozyten (T-Zellen und CD4-positive Zellen) eine signifikante Abnahme in der absoluten Zellzahl (* $p < 0,05$). CD4- sowie CD8-positive Effektor- und zentrale Gedächtniszellen zeigen sechs Monate nach dem Eingriff eine signifikante Abnahme in ihrer absoluten Zellzahl. In der relativen Zellzahl, gemessen in Prozent an CD8-positiven Zellen, zeigt sich bei CD8-positiven Effektor T-Zellen ebenfalls eine Abnahme drei und sechs Monate post operationem, die jedoch lediglich nach sechs Monaten signifikant ist (* $p = < 0,05$). In der relativen Zellzahl der CD8-positiven naiven T-Zellen zeigt sich dahingegen eine signifikante Zunahme der relativen Zellzahl nach drei Monaten (* $p = < 0,05$), die nach sechs Monaten aber nicht mehr signifikant ist, jedoch weiterhin besteht. Bei Patienten, die chirurgisch einen Aortenklappenersatz erhielten, zeigt sich, im Hinblick auf die Langzeitwerte lediglich in der CD8-positiven Effektor T-Zellpopulation nach drei Monaten ein statistisch signifikanter Anstieg (Zellen/nl, * $p = < 0,05$).

Betrachtet man die CD8- und CD4- T_{EMRA} -Subsets in den jeweiligen Behandlungsgruppen (Abb. 29 - 32), so zeigt sich auch hier, dass einen Tag post-interventionem, in beiden Behandlungsgruppen statistisch signifikante Unterschiede zu den Ausgangswerten erkennbar sind. Im weiteren Verlauf nach fünf Tagen sowie nach drei und sechs Monaten sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen mehr erkennbar.

Ergebnisse


 TAVI
 Chirurgische AKE

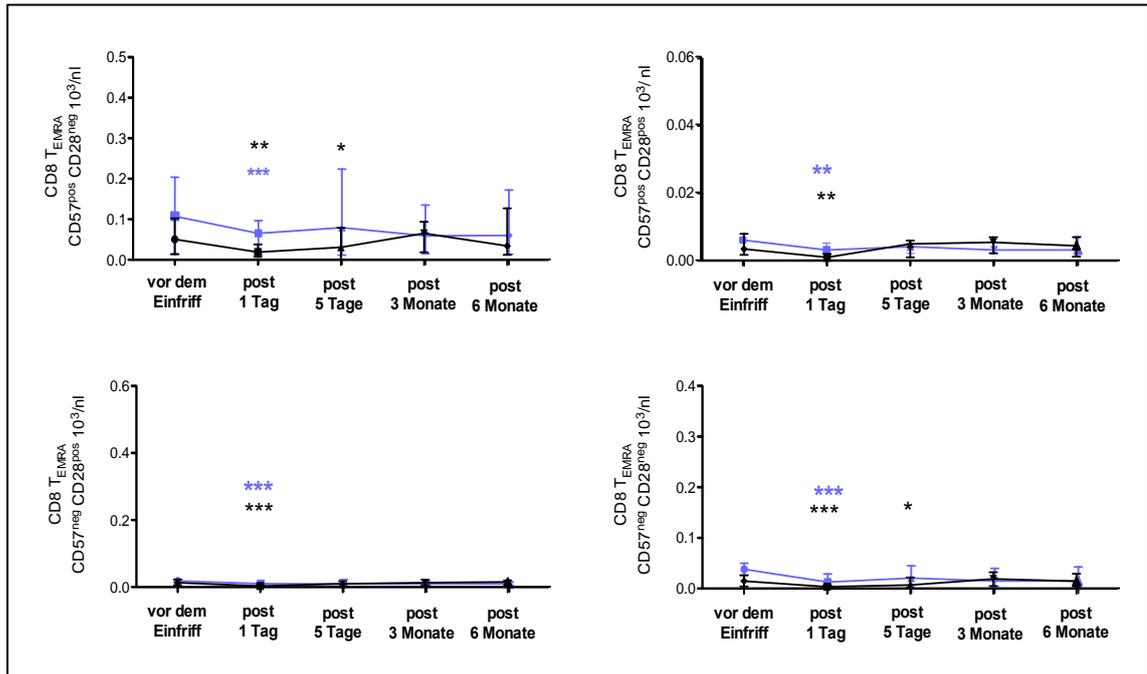


Abb. 29: Darstellung der CD8-positiven T_{EMRA}-Subsets/nl aus TAVI-Patienten sowie aus chirurgisch-behandelten Patienten. Dargestellt ist der Verlauf vom Zeitpunkt vor dem Eingriff sowie einen und fünf Tage nach und drei und sechs Monate nach dem Eingriff. In beiden Behandlungsgruppen zeigt sich einen Tag nach dem Eingriff eine signifikante Abnahme der T_{EMRA}-Subsets, die bereits fünf Tage nach dem Eingriff nicht mehr besteht. Darstellung der Rohdaten in Boxplots. Die Signifikanz von Unterschieden im zeitlichen Verlauf wurde mit dem Wilcoxon Rangsummentest bestimmt. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

Ergebnisse



TAVI
Chirurgische AKE

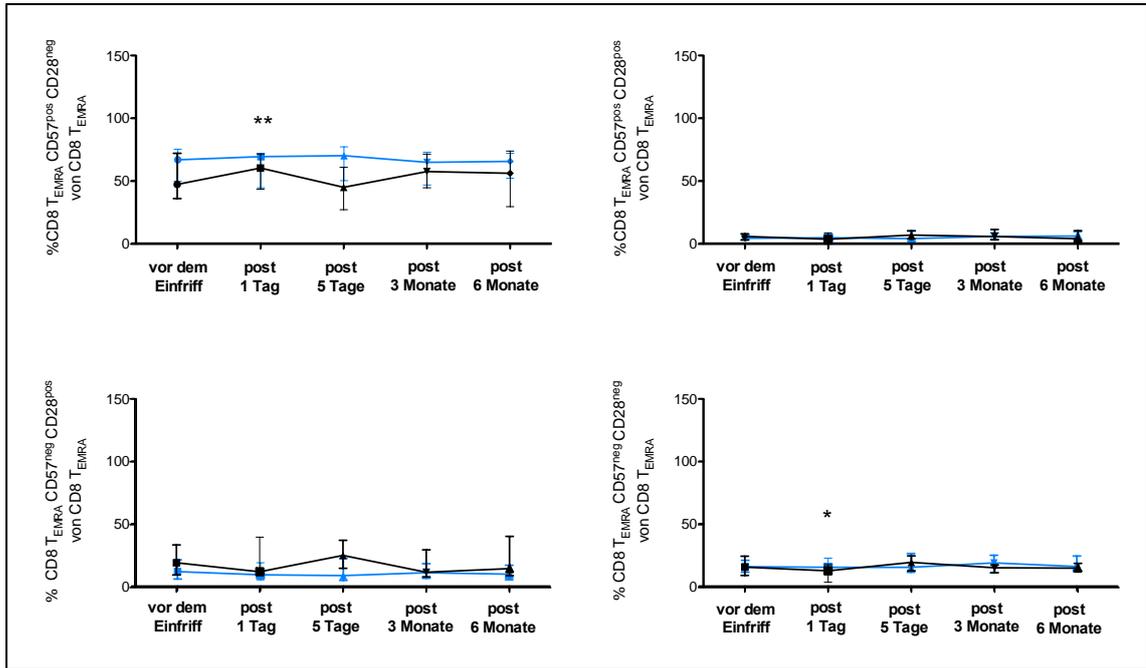


Abb. 30: Darstellung der CD8-positiven T_{EMRA} -Subsets in Prozent von $CD8 T_{EMRA}$ aus TAVI-Patienten sowie aus chirurgisch-behandelten Patienten. Dargestellt ist der Verlauf vom Zeitpunkt vor dem Eingriff sowie einen und fünf Tage nach und drei und sechs Monate nach dem Eingriff. In der chirurgisch-behandelten Gruppe zeigt sich im $CD8 T_{EMRA} CD57^{pos} CD28^{neg}$ ein relativ signifikanter Anstieg sowie im $CD8 T_{EMRA} CD57^{neg} CD28^{neg}$ -Subset eine relativ signifikante Abnahme einen Tag nach dem Eingriff. Darstellung der Rohdaten in Boxplots. Die Signifikanz von Unterschieden im zeitlichen Verlauf wurde mit dem Wilcoxon Rangsummentest bestimmt. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Ergebnisse



TAVI
Chirurgische AKE

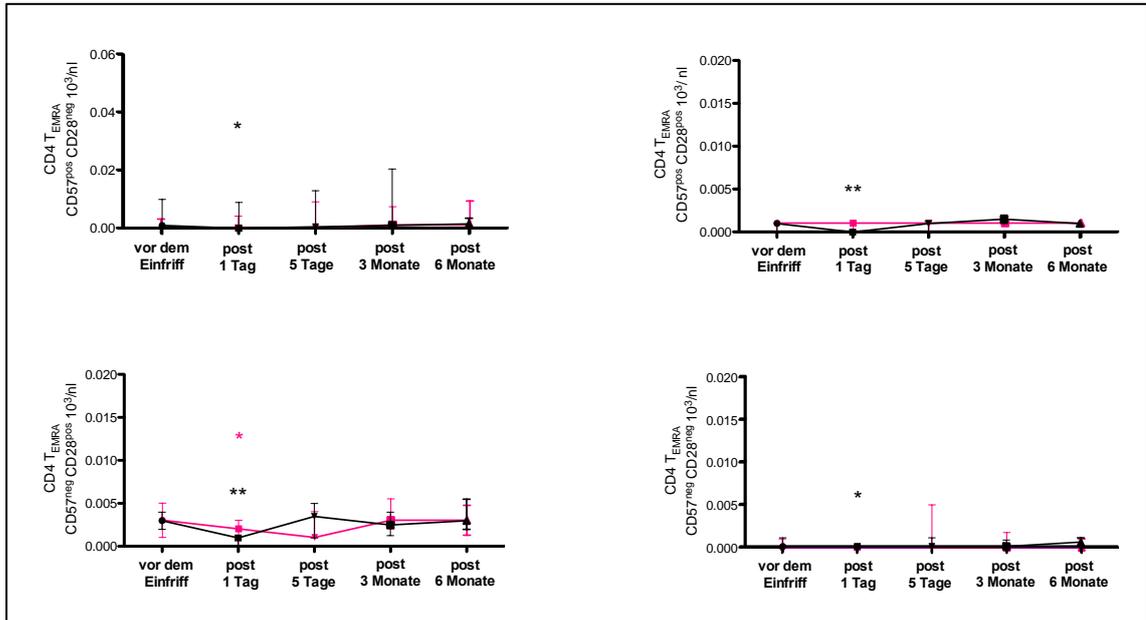


Abb. 31: Darstellung der CD4-positiven $TEMRA$ -Subsets/nl aus TAVI-Patienten sowie aus chirurgisch-behandelten Patienten. Dargestellt ist der Verlauf vom Zeitpunkt vor dem Eingriff sowie einen und fünf Tage nach und drei und sechs Monate nach dem Eingriff. In der chirurgischen Behandlungsgruppe zeigt sich einen Tag nach dem Eingriff eine signifikante Abnahme der $TEMRA$ -Subsets, welche in der TAVI-Kohorte nur im CD4-positiven $TEMRA$ $CD57^{neg}CD28^{pos}$ -Subset signifikant ist. Darstellung der Rohdaten in Boxplots. Die Signifikanz von Unterschieden im zeitlichen Verlauf wurde mit dem Wilcoxon Rangsummentest bestimmt. P -Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Ergebnisse



TAVI
Chirurgische AKE

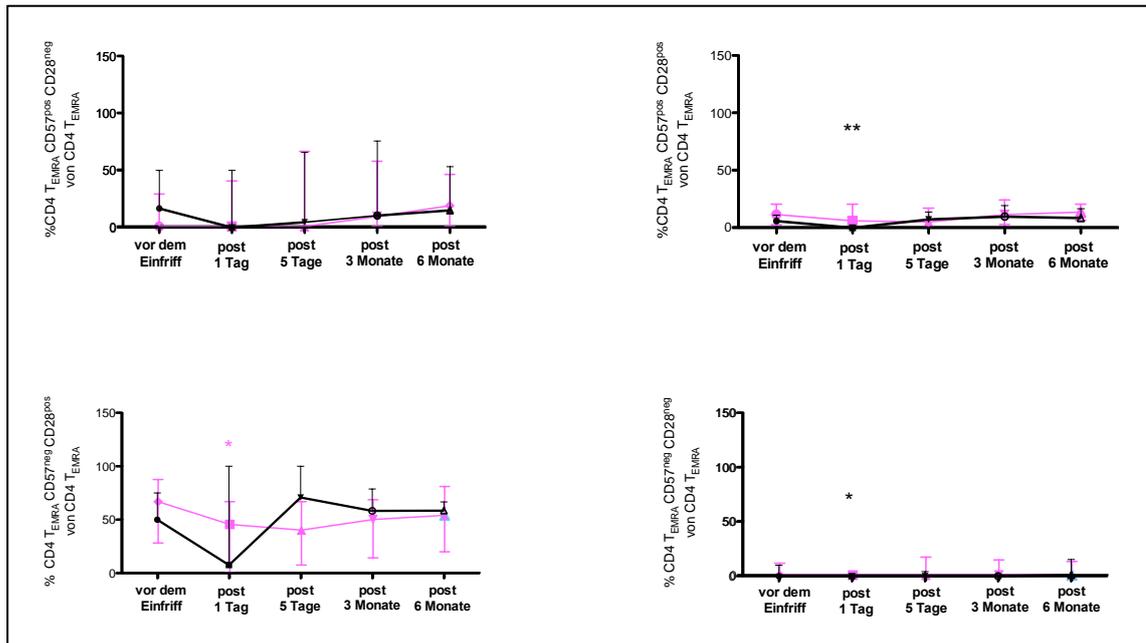


Abb. 32: Darstellung der CD4-positiven T_{EMRA} -Subsets in Prozent von CD4-positiven T_{EMRA} aus TAVI-Patienten sowie aus chirurgisch-behandelten Patienten. Dargestellt ist der Verlauf vom Zeitpunkt vor dem Eingriff sowie einen und fünf Tage nach und drei und sechs Monate nach dem Eingriff. In der chirurgisch-behandelten Gruppe zeigt sich im CD4-positive T_{EMRA} $CD57^{pos}CD28^{pos}$ eine relative signifikante Abnahme sowie im CD4-positiven T_{EMRA} $CD57^{neg}CD28^{neg}$ -Subset eine relativ signifikante Zunahme einen Tag nach dem Eingriff. Darstellung der Rohdaten in Boxplots. Die Signifikanz von Unterschieden im zeitlichen Verlauf wurde mit dem Wilcoxon Rangsummentest bestimmt. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.5 Direkter Vergleich von zwei verschiedenen Klappenersatzverfahren im Hinblick auf das adaptive Immunsystems

Zur Untersuchung des adaptiven Immunsystems wurden Aortenklappenstenose-Patienten rekrutiert die zum einen mit einer TAVI und zum anderen mit einem chirurgischen Klappenersatz behandelt wurden. Im Rahmen der transarteriellen Katheterintervention (TAVI) werden die neuen Klappen, fixiert an einen Katheter, über die Femoralarterie zum Herzen geführt und über das alte Klappenmaterial aufgespannt. Der Goldstandard liegt allerdings im chirurgischen Klappenersatz, bei dem unter Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine die kranken Herzklappen aus dem Herzen entfernt werden und neues Klappengewebe eingesetzt wird (Schwarz, Baumann et al. 1982).

Ziel war es, potentielle interventionsbedingte Veränderungen des adaptiven Immunsystems zu erkennen. Hierfür wurden CD8- und CD4-positive naive-, zentrale-, Effektor-Gedächtnis- und T_{EMRA}-Zellen sowie deren Subsets analysiert.

Das Blut der Patienten wurde einen Tag vor dem Eingriff, einen und fünf Tage nach dem Eingriff sowie drei und sechs Monate post interventionem vergleichend immunologisch untersucht.

Tab. 14: Darstellung der Anzahl der zum jeweiligen Zeitpunkt miteinander verglichenen Patienten.

Tag der Blutabnahme	Anzahl der Patienten TAVI (n)	Anzahl der Patienten Chirurgische AKE (n)
Pre_1	45	18
Post_1 Tag	23	15
Post_5 Tage	15	10
Post_3 Monate	20	12
Post_6 Monate	20	12

5.5.1 Vergleich von Leukozyten, Lymphozyten und T-Gedächtniszellen

In der Untersuchung der Leukozyten zeigte sich einen Tag nach dem Eingriff eine statistisch erhöhte Zellzahl der Leukozyten in der chirurgischen Behandlungsgruppe, welche im weiteren Verlauf nicht mehr zu verzeichnen war (siehe Abb. 33). Die Lymphozyten-Population wies bereits vor der Intervention eine signifikant erhöhte absolute Zellzahl der Lymphozyten in der chirurgischen-Kohorte auf (p-Wert: 0,023, adjustiert nach Alter und Geschlecht), welches sich einen Tag nach dem Eingriff umkehrte (p-Wert von 0,022, adjustiert nach Alter und Geschlecht). Die relative Zellzahl der Lymphozyten, gemessen in Prozent an Leukozyten, wiesen bei chirurgischen Patienten statistisch signifikant weniger Lymphozyten einen Tag nach dem Eingriff auf, welches sich drei Monate post interventionem umkehrte (siehe Abb. 33). CD3-positive T-Zellen sind einen Tag nach dem Eingriff in ihrer absoluten Zellzahl statistisch signifikant geringer in chirurgischen Patienten nachzuweisen als in TAVI-Patienten. In ihrer relativen Zellzahl, gemessen in Prozent an Lymphozyten, zeigen sich bereits einen Tag vor-, als auch einen Tag nach dem Eingriff bei chirurgischen Patienten signifikant weniger T-Zellen als in TAVI-Patienten (siehe Abb. 33).

Ergebnisse

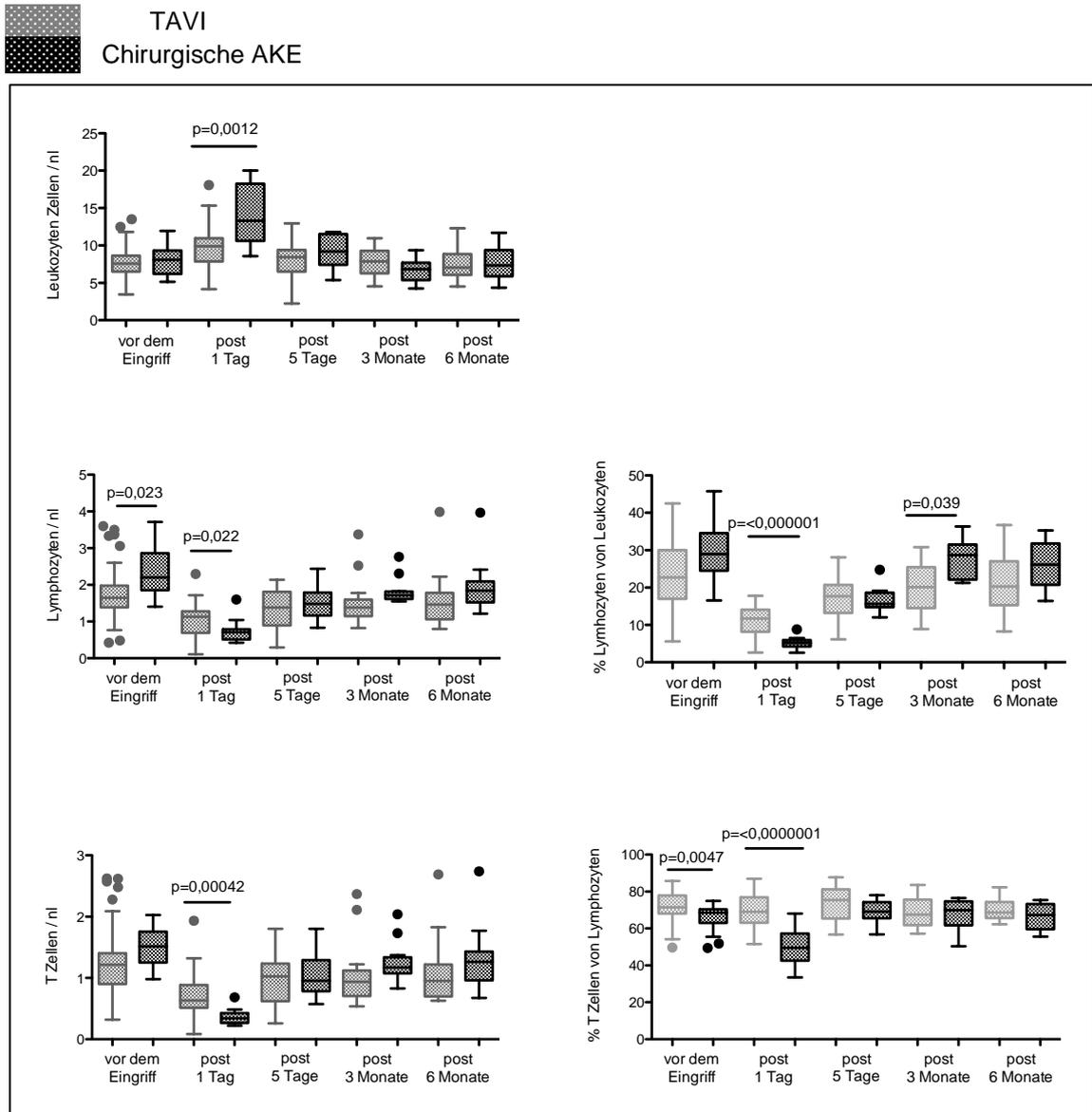


Abb. 33: In der Untersuchung der Leukozyten zeigte sich einen Tag nach dem Eingriff eine statistisch erhöhte Zellzahl der Leukozyten in der chirurgischen Behandlungsgruppe, welche im weiteren Verlauf nicht mehr zu verzeichnen war. Die Lymphozyten-Population wies bereits vor der Intervention eine signifikant erhöhte absolute Zellzahl der Lymphozyten in der chirurgischen-Kohorte auf (p-Wert: 0,023, adjustiert nach Alter und Geschlecht), welches sich einen Tag nach dem Eingriff umkehrte (p-Wert von 0,022, adjustiert nach Alter und Geschlecht). Die relative Zellzahl der Lymphozyten, gemessen in Prozent an Leukozyten, wiesen chirurgische Patienten statistisch signifikant weniger Lymphozyten einen Tag nach dem Eingriff auf, welches sich drei Monate post interventionem umkehrte. CD3-positive T-Zellen sind einen Tag nach dem Eingriff in ihrer absoluten Zellzahl statistisch signifikant geringer in chirurgischen Patienten nachzuweisen als in TAVI-Patienten. In ihrer relativen Zellzahl, gemessen in Prozent an Lymphozyten, zeigen sich bereits einen Tag vor- als auch einen Tag nach dem Eingriff bei chirurgischen Patienten signifikant weniger T-Zellen als in TAVI-Patienten. pre_1 (TAVI, n = 45, chirg. AKE, n=19), post_1 Tag (TAVI, n = 23, chirg. AKE, n =16), post_5 Tage (TAVI, n = 15, chirg. AKE, n=10), post_3 Monate (TAVI, n = 20, chirg. AKE, n=14), post_6 Monate (TAVI, n = 20, chirg. AKE, n=13)

Die Verteilung der Rohdaten wurde in Boxplots dargestellt (Prism). Die Signifikanz von Unterschieden zwischen den klinischen Gruppen wurde mittels linearer Regressionsmodelle bestimmt, bei denen das Alter und das Geschlecht der Spender zur Adjustierung als Covariate verwendet wurden (R). Zur Vermeidung eines Anstiegs der falsch-negativen Ergebnisse (Typ II Fehler) und damit dem Verlust potentiell wichtiger Informationen (explorative Studie) wurde auf

Ergebnisse

eine Korrektur der alters- und geschlechtsadjustierten *p*-Werte bezüglich der Testanzahl verzichtet. Adjustierte *p*-Werte kleiner als 0.05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

In der CD4- und CD8-positiven Zellpopulation aus TAVI- und chirurgischen Patienten konnte eine signifikant erniedrigte Zellzahl bei chirurgischen Patienten einen Tag nach dem Eingriff sowie bei CD8-positiven Zellen fünf Tage nach dem Eingriff festgestellt werden (Abb. 34).

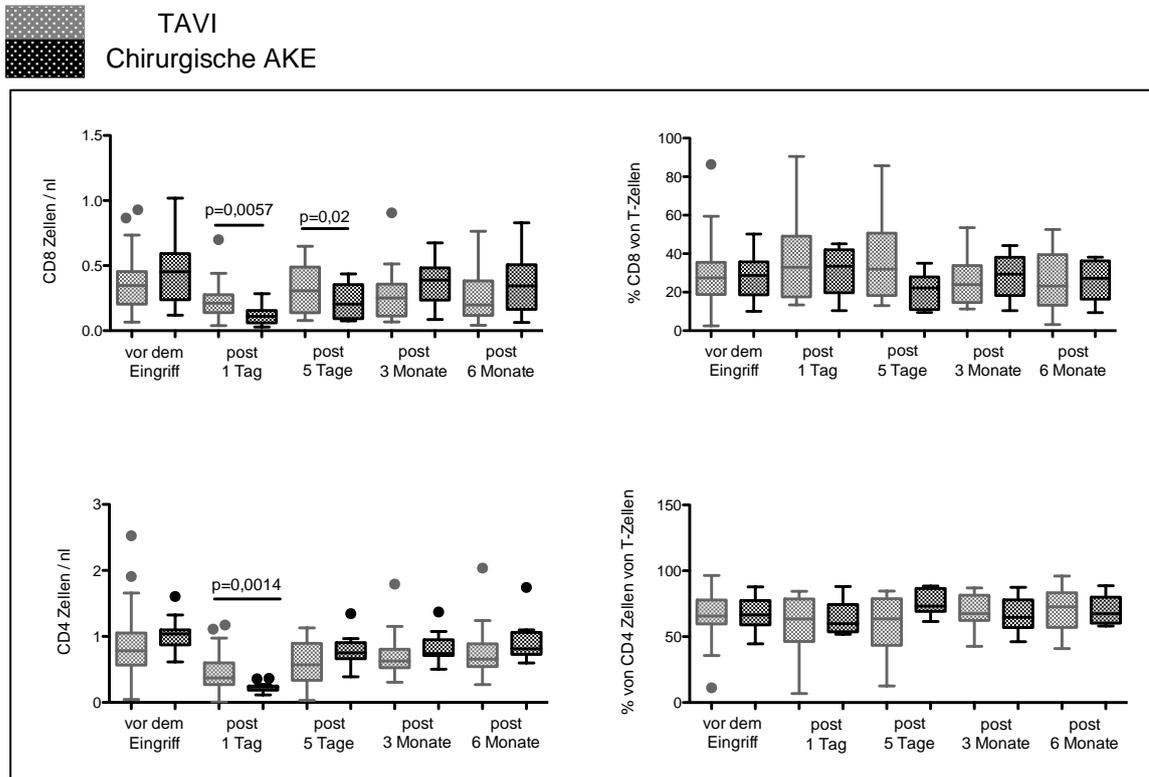


Abb. 34: Darstellung der absoluten Zellzahl von CD8- und CD4-positiven Zellen im Hinblick auf die zwei untersuchten Behandlungsverfahren. TAVI und chirurgischer Klappenersatz (chirg. AKE) einen Tag vor dem Eingriff sowie einen und fünf Tage und drei und sechs Monate nach dem Eingriff. Es bestehen in der absoluten Zellzahl von CD4- und CD8-positiven Zellen einen Tag nach dem Eingriff sowie bei CD8-positiven Zellen fünf Tage nach dem Eingriff eine signifikant erniedrigte Zellzahl in chirurgischen Patienten im Vergleich zu TAVI-Patienten. pre_1 (TAVI, n = 45, chirg. AKE, n = 19), post_1 Tag (TAVI, n = 23, chirg. AKE, n = 16), post_5 Tage (TAVI, n = 15, chirg. AKE, n = 10), post_3 Monate (TAVI, n = 20, chirg. AKE, n = 14), post_6 Monate (TAVI, n = 20, chirg. AKE, n = 13)

Die Verteilung der Rohdaten wurde in Boxplots dargestellt (Prism). Die Signifikanz von Unterschieden zwischen den klinischen Gruppen wurde mittels linearer Regressionsmodelle bestimmt, bei denen das Alter und das Geschlecht der Spender zur Adjustierung als Covariate verwendet wurden (R). Zur Vermeidung eines Anstiegs der falsch-negativen Ergebnisse (Typ II Fehler) und damit dem Verlust potentiell wichtiger Informationen (explorative Studie) wurde auf eine Korrektur der alters- und geschlechtsadjustierten *p*-Werte bezüglich der Testanzahl verzichtet. Adjustierte *p*-Werte kleiner als 0.05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

In der Untersuchung der CD8-positiven naiven T-Zellen konnte gezeigt werden, dass Patienten, die einen chirurgischen Aortenklappenersatz erhielten, fünf Tage und sechs Monate nach dem Eingriff signifikant mehr CD8-positive naive T-Zellen (in Prozent an CD8-positiven Zellen) aufweisen als TAVI-Patienten. In der absoluten Zellzahl der naiven T-Zellen besteht ein Tag post operationem ein signifikanter Unterschied

Ergebnisse

zwischen TAVI- und chirurgischen Patienten. Hier weisen TAVI-Patienten signifikant mehr CD8-positive naive T-Zellen einen Tag nach dem Eingriff auf, als chirurgische Patienten (siehe Abb.35).

Zentrale Gedächtniszellen sind bereits vor dem Eingriff in Patienten, die einen chirurgischen Aortenklappenersatz erhalten in ihrer relativen Zellzahl, gemessen in Prozent an CD8-positiven Zellen, signifikant erhöht. In der absoluten Zellzahl CD8-positiver zentraler Gedächtniszellen sind keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen TAVI und chirurgischen Patienten zu verzeichnen (siehe Abb.35).

Im Vergleich von Effektor-Gedächtniszellen in TAVI- und chirurgischen Patienten konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden (Abb.35).

In den CD8-positiven T_{EMRA}-Zellen zeigen sich einen Tag sowie fünf Tage nach dem Eingriff signifikante Unterschiede in der absoluten Zellzahl, wobei TAVI-Patienten signifikant mehr CD8-positive T_{EMRA}-Zellen aufweisen als Patienten, die einen chirurgischen Aortenklappenersatz erhielten. In der Beurteilung der relativen Zellzahl von CD8-positiven T_{EMRA}-Zellen, gemessen an CD8-positiven Zellen, weisen TAVI-Patienten bereits eine höhere Anzahl von CD8-positiven T_{EMRA}-Zellen auf als Patienten, die im Verlauf einen chirurgischen Aortenklappenersatz erhalten werden. Postoperativ weisen TAVI-Patienten ausschließlich fünf Tage nach dem Eingriff signifikant mehr CD8-positive T_{EMRA}-Zellen auf als chirurgische Patienten. Im weiteren Verlauf sind keine signifikanten Unterschiede mehr zu verzeichnen (siehe Abb.35).

Ergebnisse

TAVI
Chirurgische AKE

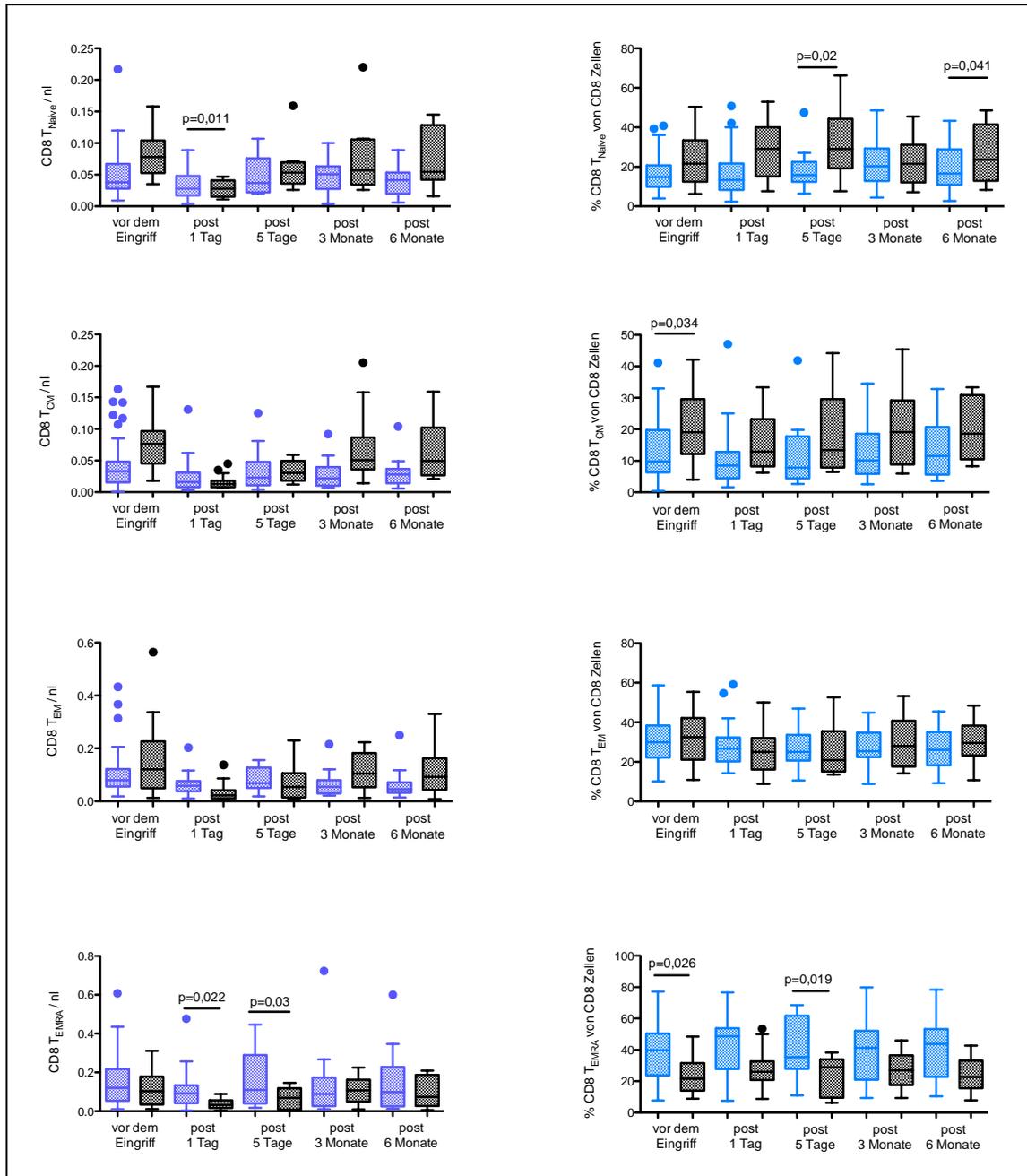


Abb. 35: In der Untersuchung der CD8-positiven naiven T-Zellen konnte gezeigt werden, dass Patienten, die einen chirurgischen Aortenklappenersatz erhielten, fünf Tage und sechs Monate nach dem Eingriff signifikant mehr CD8-positiv naive T-Zellen (in Prozent an CD8-positiven Zellen) aufweisen als TAVI-Patienten. In der absoluten Zellzahl der naiven T-Zellen besteht ein Tag post operationem ein signifikanter Unterschied zwischen TAVI- und chirurgischen Patienten. So weisen TAVI-Patienten signifikant mehr CD8-positiv naive T-Zellen einen Tag nach dem Eingriff auf, als chirurgische Patienten. Zentrale Gedächtniszellen sind bereits vor dem Eingriff in Patienten, die einen chirurgischen Aortenklappenersatz erhalten in ihrer relativen Zellzahl, gemessen in Prozent an CD8-positiven Zellen, signifikant erhöht. In der absoluten Zellzahl CD8-positiver zentraler Gedächtniszellen sind keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen TAVI und chirurgischen Patienten zu verzeichnen. Im Vergleich von Effektor-Gedächtniszellen in TAVI- und chirurgischen Patienten konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. In den CD8-positiven T_{EMRA}-Zellen zeigen sich einen Tag sowie fünf Tage nach dem Eingriff signifikante Unterschiede in der absoluten Zellzahl, wobei

Ergebnisse

TAVI-Patienten signifikant mehr CD8-positive T_{EMRA}-Zellen aufweisen als Patienten, die einen chirurgischen Aortenklappenersatz erhielten. In der Beurteilung der relativen Zellzahl von CD8-positiven T_{EMRA}-Zellen, gemessen an CD8-positiven Zellen, weisen TAVI-Patienten bereits eine höhere Anzahl von CD8-positiven T_{EMRA}-Zellen auf als Patienten, die im Verlauf einen chirurgischen Aortenklappenersatz erhalten werden. Postoperativ weisen TAVI-Patienten ausschließlich fünf Tage nach dem Eingriff signifikant mehr CD8-positive T_{EMRA}-Zellen auf als chirurgische Patienten. Im weiteren Verlauf sind keine signifikanten Unterschiede mehr zu verzeichnen. pre_1 (TAVI, n = 45, chirg. AKE, n = 19), post_1 Tag (TAVI, n = 23, chirg. AKE, n = 16), post_5 Tage (TAVI, n = 15, chirg. AKE, n = 10), post_3 Monate (TAVI, n = 20, chirg. AKE, n = 14), post_6 Monate (TAVI, n = 20, chirg. AKE, n = 13).

Die Verteilung der Rohdaten wurde in Boxplots dargestellt (Prism). Die Signifikanz von Unterschieden zwischen den klinischen Gruppen wurde mittels linearer Regressionsmodelle bestimmt, bei denen das Alter und das Geschlecht der Spender zur Adjustierung als Covariate verwendet wurden (R). Zur Vermeidung eines Anstiegs der falsch-negativen Ergebnisse (Typ II Fehler) und damit dem Verlust potentiell wichtiger Informationen (explorative Studie) wurde auf eine Korrektur der alters- und geschlechtsadjustierten p-Werte bezüglich der Testanzahl verzichtet. Adjustierte p-Werte kleiner als 0.05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

Die Untersuchung von CD8-positiven T_{EMRA}-Subsets im Blut von Aortenklappenstenose-Patienten zeigt einen Tag postoperativ einen signifikanten Unterschied zwischen chirurgisch behandelten Patienten und Patienten die eine TAVI erhielten. So lassen sich im Blut von chirurgischen Patienten absolut signifikant weniger CD8-positive T_{EMRA} CD57^{pos}CD28^{neg}-Zellen und CD8-positive T_{EMRA} CD57^{neg}CD28^{pos}-Zellen sowie CD8-positive T_{EMRA} CD57^{pos}CD28^{pos}-Zellen nachweisen als bei TAVI-Patienten. In der relativen Zellzahl von CD8-positiven T_{EMRA} CD57^{pos}CD28^{neg}-Zellen bestätigt sich diese signifikant höhere Zellzahl in TAVI-Patienten ebenfalls fünf Tage post operationem. Im Verlauf weisen chirurgisch behandelte Patienten drei Monate nach dem Eingriff signifikant absolut mehr CD8-positive T_{EMRA} CD57^{pos}CD28^{pos}-Zellen auf als TAVI-Patienten. Dieses spiegelt sich auch in der relativen Zellzahl, gemessen in Prozent an CD8-positiven T_{EMRA}-Zellen wieder (siehe Abb.36).

Ergebnisse

TAVI
Chirurgische AKE

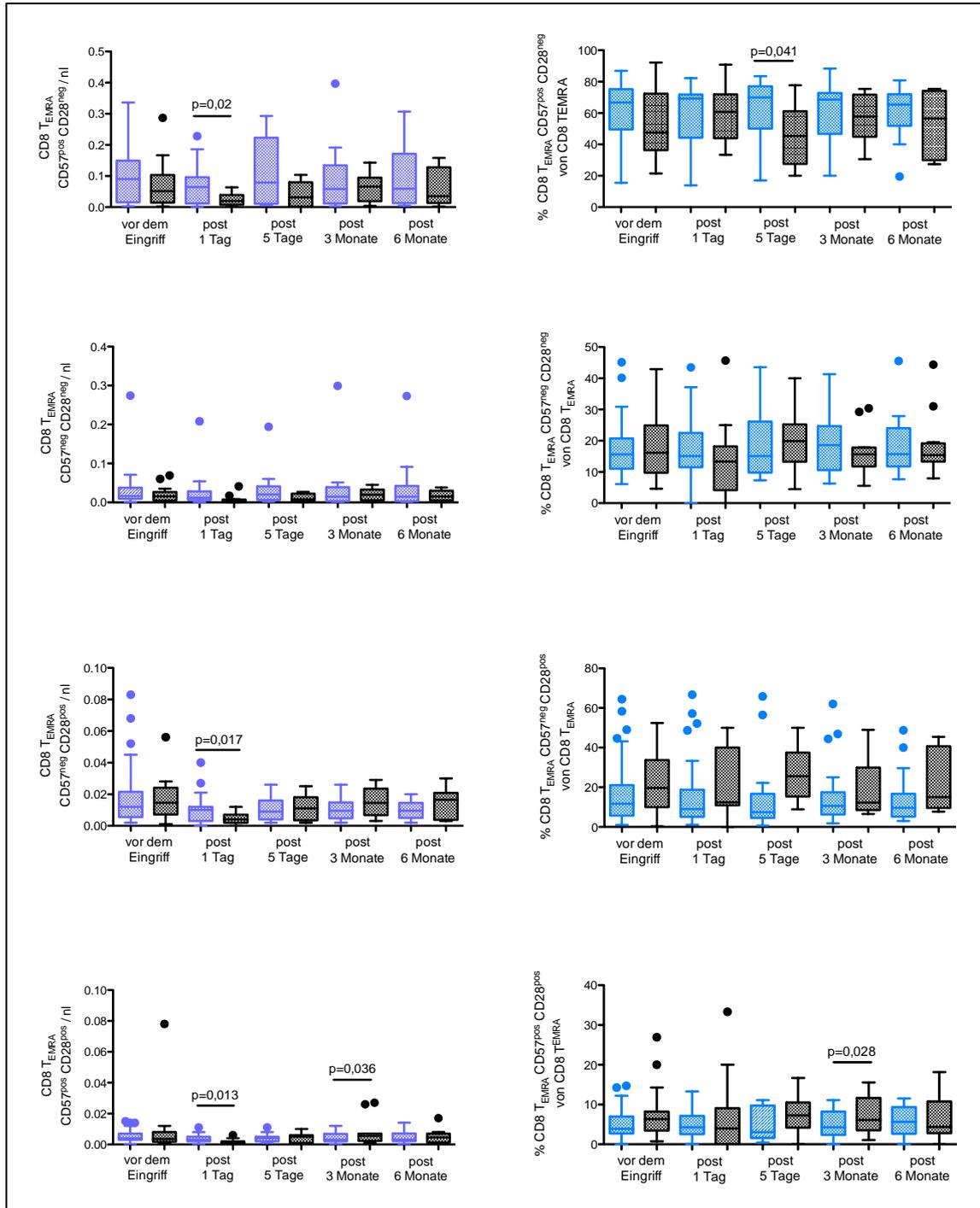


Abb. 36: Die Untersuchung von CD8-positiven TEMRA-Subsets im Blut von Aortenklappenstenose-Patienten zeigt einen Tag postoperativ einen signifikanten Unterschied zwischen chirurgisch behandelten Patienten und Patienten die eine TAVI erhielten. So lassen sich im Blut von chirurgischen Patienten absolut signifikant weniger CD8-positive TEMRA CD57^{pos}CD28^{neg}-Zellen und CD8-positive TEMRA CD57^{neg}CD28^{pos}-Zellen sowie CD8-positive TEMRA CD57^{pos}CD28^{pos}-Zellen nachweisen als in TAVI-Patienten. In der relativen Zellzahl von CD8-positiven CD57^{pos}CD28^{neg}-Zellen bestätigt sich diese signifikant höhere Zellzahl in TAVI-Patienten ebenfalls fünf Tage post operationem. Im Verlauf weisen chirurgisch behandelte Patienten drei Monate nach dem Eingriff signifikant absolut mehr CD8-positiven TEMRA

Ergebnisse

CD57^{pos}CD28^{pos}-Zellen auf als TAVI-Patienten. Dieses spiegelt sich auch in der relativen Zellzahl, gemessen in Prozent an CD8-positiven T_{EMRA}-Zellen wieder. pre_1 (TAVI, n = 45, chirg. AKE, n =19), post_1 Tag (TAVI, n = 23, chirg. AKE, n =16), post_5 Tage (TAVI, n = 15, chirg. AKE, n =10), post_3 Monate (TAVI, n = 20, chirg. AKE, n =14), post_6 Monate (TAVI, n = 20, chirg. AKE, n =13).

Die Verteilung der Rohdaten wurde in Boxplots dargestellt (Prism). Die Signifikanz von Unterschieden zwischen den klinischen Gruppen wurde mittels linearer Regressionsmodelle bestimmt, bei denen das Alter und das Geschlecht der Spender zur Adjustierung als Covariate verwendet wurden (R). Zur Vermeidung eines Anstiegs der falsch-negativen Ergebnisse (Typ II Fehler) und damit dem Verlust potentiell wichtiger Informationen (explorative Studie) wurde auf eine Korrektur der alters- und geschlechtsadjustierten p-Werte bezüglich der Testanzahl verzichtet. Adjustierte p-Werte kleiner als 0.05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

Betrachtet man die CD4-positiven naiven,- Effektor- und zentralen Gedächtnis-T-Zellen, zeigt sich einen Tag nach dem Eingriff ein signifikanter Unterschied in der absoluten Zellzahl. So weisen chirurgisch behandelte Patienten einen Tag post interventionem signifikant weniger naive-, Effektor- und zentrale Gedächtnis-T-Zellen im peripheren Blut auf (siehe Abb.37). In der zentralen Gedächtniszellpopulation zeigt sich bereits vor dem Eingriff eine signifikant höhere relative Zellzahl, gemessen in Prozent an CD4-positiven Zellen, bei Patienten, die im Verlauf einen chirurgischen Aortenklappenersatz erhalten (siehe Abb.37)

Ergebnisse

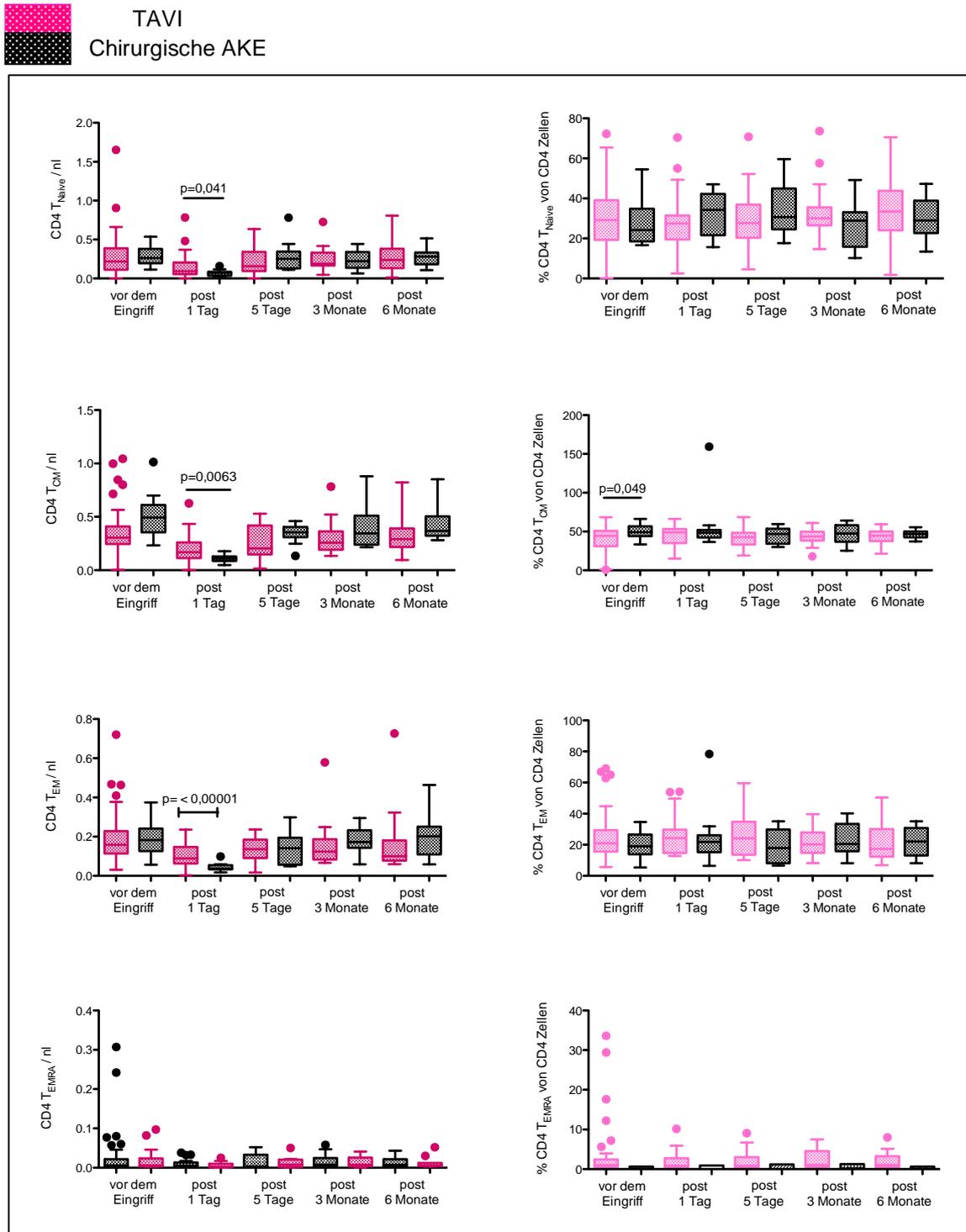


Abb. 37: Betrachtet man die CD4-positiven naiven,- Effektor- und zentralen Gedächtnis-T-Zellen, zeigt sich einen Tag nach dem Eingriff bei TAVI-Patienten ein signifikanter Unterschied in der absoluten Zellzahl. So weisen chirurgisch behandelte Patienten einen Tag post interventionem signifikant weniger naive-, Effektor- und zentrale Gedächtnis-T-Zellen im peripheren Blut auf. In der zentralen Gedächtniszellpopulation zeigt sich bereits vor dem Eingriff eine signifikant höhere relative Zellzahl, gemessen in Prozent an CD4-positiven Zellen, bei Patienten, die im Verlauf einen chirurgischen Aortenklappenersatz erhalten. pre_1 (TAVI, n = 45, chirg. AKE, n =19), post_1 Tag (TAVI, n = 23, chirg. AKE, n =16), post_5 Tage (TAVI, n = 15, chirg. AKE, n =10), post_3 Monate (TAVI, n = 20, chirg. AKE, n =14), post_6 Monate (TAVI, n = 20, chirg. AKE, n =13).

Ergebnisse

Die Verteilung der Rohdaten wurde in Boxplots dargestellt (Prism). Die Signifikanz von Unterschieden zwischen den klinischen Gruppen wurde mittels linearer Regressionsmodelle bestimmt, bei denen das Alter und das Geschlecht der Spender zur Adjustierung als Covariate verwendet wurden (R). Zur Vermeidung eines Anstiegs der falsch-negativen Ergebnisse (Typ II Fehler) und damit dem Verlust potentiell wichtiger Informationen (explorative Studie) wurde auf eine Korrektur der alters- und geschlechtsadjustierten p-Werte bezüglich der Testanzahl verzichtet. Adjustierte p-Werte kleiner als 0.05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

Die Untersuchung CD4-positiven T_{EMRA}-Subsets zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied in CD4-positiven T_{EMRA} CD57^{neg}CD28^{pos} fünf Tage nach dem Eingriff und dem CD4-positiven T_{EMRA} CD57^{neg}CD28^{neg}-Subset einen Tag nach dem Eingriff (siehe Abb. 38). In beiden Subset-Populationen ist die Zellzahl in TAVI-Patienten höher als in chirurgischen Patienten. In den CD4-positiven T_{EMRA} CD57^{neg}CD28^{neg}-Zellen spiegelt sich dieser Unterschied ebenfalls in der relativen Zellzahl, gemessen in Prozent an CD4-positiven T_{EMRA}-Zellen, wieder (siehe Abb.38).

Ergebnisse



TAVI
Chirurgische AKE

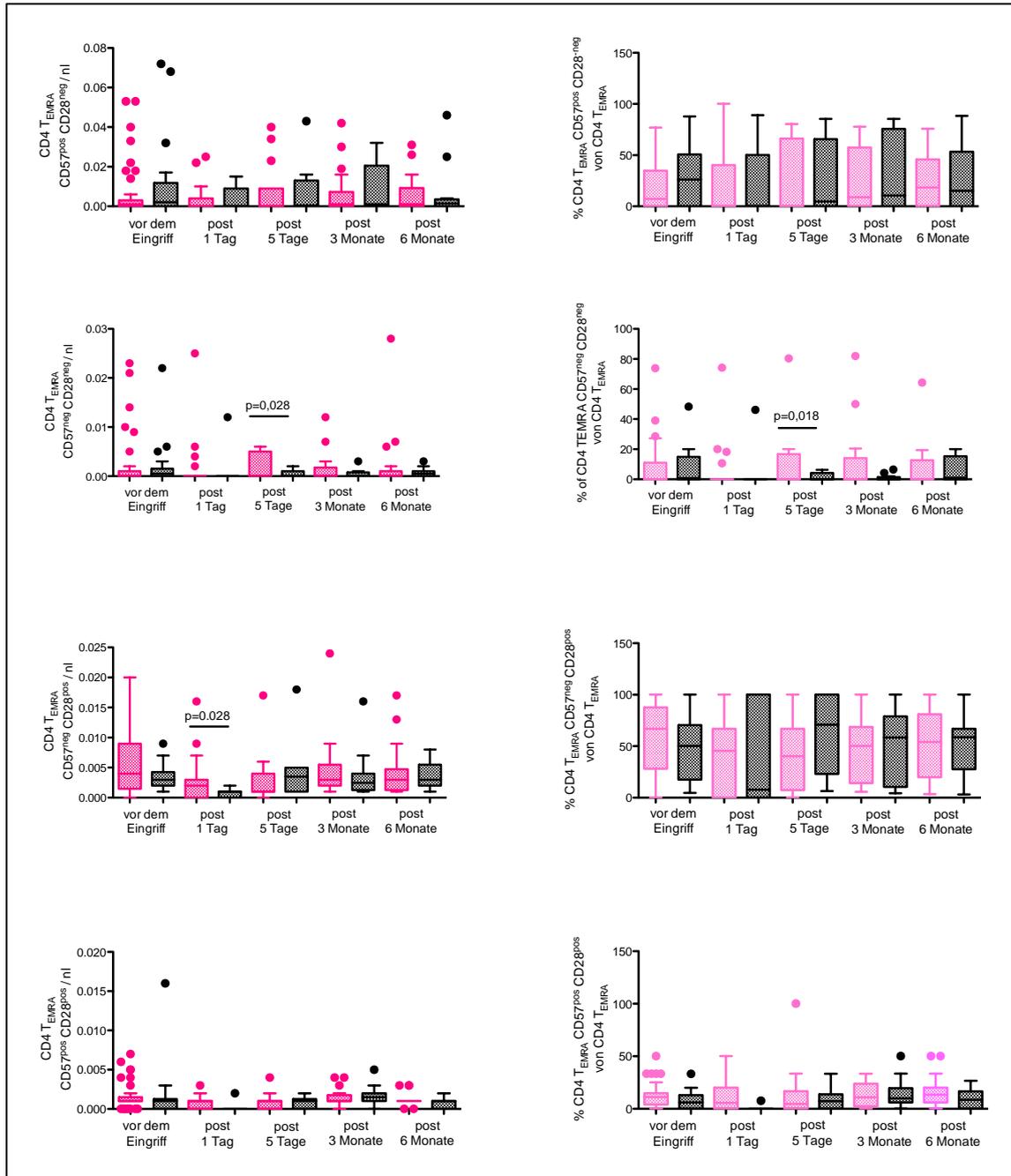


Abb. 38: Die Untersuchung CD4-positiven T_{EMRA} -Subsets zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied in CD4-positiven T_{EMRA} $CD57^{neg}CD28^{pos}$ fünf Tage nach dem Eingriff und dem CD4-positiven T_{EMRA} $CD57^{neg}CD28^{neg}$ -Subset einen Tag nach dem Eingriff. In beiden Subset-Populationen ist die Zellzahl in TAVI-Patienten höher als in chirurgischen Patienten. In den CD4-positiven T_{EMRA} $CD57^{neg}CD28^{neg}$ -Zellen spiegelt sich dieser Unterschied ebenfalls in der relativen Zellzahl, gemessen in Prozent an CD4-positiven T_{EMRA} -Zellen, wieder. pre_1 (TAVI, n = 45, chirg. AKE, n = 19), post_1 Tag (TAVI, n = 23, chirg. AKE, n = 16), post_5 Tage (TAVI, n = 15, chirg. AKE, n = 10), post_3 Monate (TAVI, n = 20, chirg. AKE, n = 14), post_6 Monate (TAVI, n = 20, chirg. AKE, n = 13).

Die Verteilung der Rohdaten wurde in Boxplots dargestellt (Prism). Die Signifikanz von Unterschieden zwischen den klinischen Gruppen wurde mittels linearer Regressionsmodelle bestimmt, bei denen das Alter und das Geschlecht der Spender zur Adjustierung als Covariate verwendet wurden (R). Zur Vermeidung eines Anstiegs der falsch-negativen Ergebnisse (Typ II

Ergebnisse

Fehler) und damit dem Verlust potentiell wichtiger Informationen (explorative Studie) wurde auf eine Korrektur der alters- und geschlechtsadjustierten p-Werte bezüglich der Testanzahl verzichtet. Adjustierte p-Werte kleiner als 0.05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

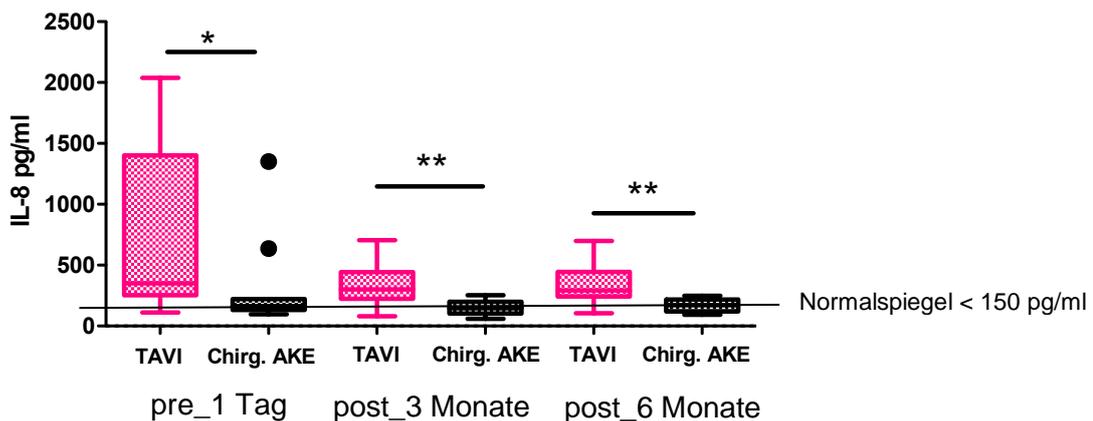
Zusammenfassend sind im Vergleich des chirurgischen Aortenklappenersatzes mit der TAVI hauptsächlich perioperativ statistisch signifikante Unterschiede im adaptiven Immunsystem der zwei Behandlungsgruppen zu sehen. Einen bis fünf Tage nach der Intervention weisen chirurgische Patienten im Vergleich zu TAVI-Patienten eine erhöhte Anzahl von Leukozyten sowie eine Abnahme der Lymphozyten und deren Untergruppen auf. Langzeitveränderungen der Zellen des adaptiven Immunsystems, wie zum Beispiel einer Zunahme von proinflammatorisch wirksamen Zellen in TAVI-Patienten, bei denen im Gegensatz zu chirurgisch-behandelten Patienten das pathologisch-veränderte Klappenmaterial im Körper verbleibt, konnten nicht nachgewiesen werden.

5.6 Die Bestimmung von IL-8 in Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose

Als besonders sensibler Marker für ein chronisches Entzündungsgeschehen wurde aus Vollblutproben die IL-8-Konzentration in TAVI- und chirurgischen Patienten sowie der Kontrollgruppe gemessen und ausgewertet (siehe Material und Methoden). Die Blutabnahme fand einen Tag vor dem Eingriff sowie drei und sechs Monate nach der Intervention statt.

In Abbildung 39 ist der Verlauf der IL-8-Konzentration im Blut von mit TAVI-behandelten Patienten und mit chirurgisch-behandelten Patienten vor dem Aortenklappenersatz sowie drei und sechs Monate post interventionem dargestellt. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede im zeitlichen Verlauf der jeweiligen Untersuchungsgruppen.

Betrachtet man den IL-8-Wert von Aortenklappenstenose-Patienten vor und nach dem Eingriff im direkten Vergleich mit der chirurgisch behandelten Vergleichsgruppe (Abb. 39), zeigt sich, dass TAVI-Patienten signifikant mehr IL-8 prä- sowie postoperativ im Blut aufweisen als chirurgisch-behandelten Patienten. Der im Vergleich gemessene erhöhte IL-8-Wert in TAVI-Patienten bleibt noch bis sechs Monate nach dem Eingriff bestehen, obwohl postoperativ bei TAVI-Patienten ein Trend zur Normalisierung zu beobachten ist.



Wie bereits in Tabelle 13 gezeigt, weisen TAVI Patienten ebenso statistisch signifikant mehr IL-8 im Blut auf als die untersuchten Kontrollpatienten. TAVI-Patienten weisen demnach ein insgesamt erhöhtes inflammatorisches Profil im Blut auf als Kontrollpatienten und chirurgisch behandelte Kontrollpatienten. Abbildung 40, siehe unten, zeigt dass TAVI- Patienten präoperativ signifikant erhöhte proinflammatorische Marker, wie IL-8, IL-6 und NT-proBNP im peripheren Blut aufweisen als Patienten, die einen chirurgischen Aortenklappenersatz erhalten sowie als die kardiologische Kontrollgruppe.

Ergebnisse

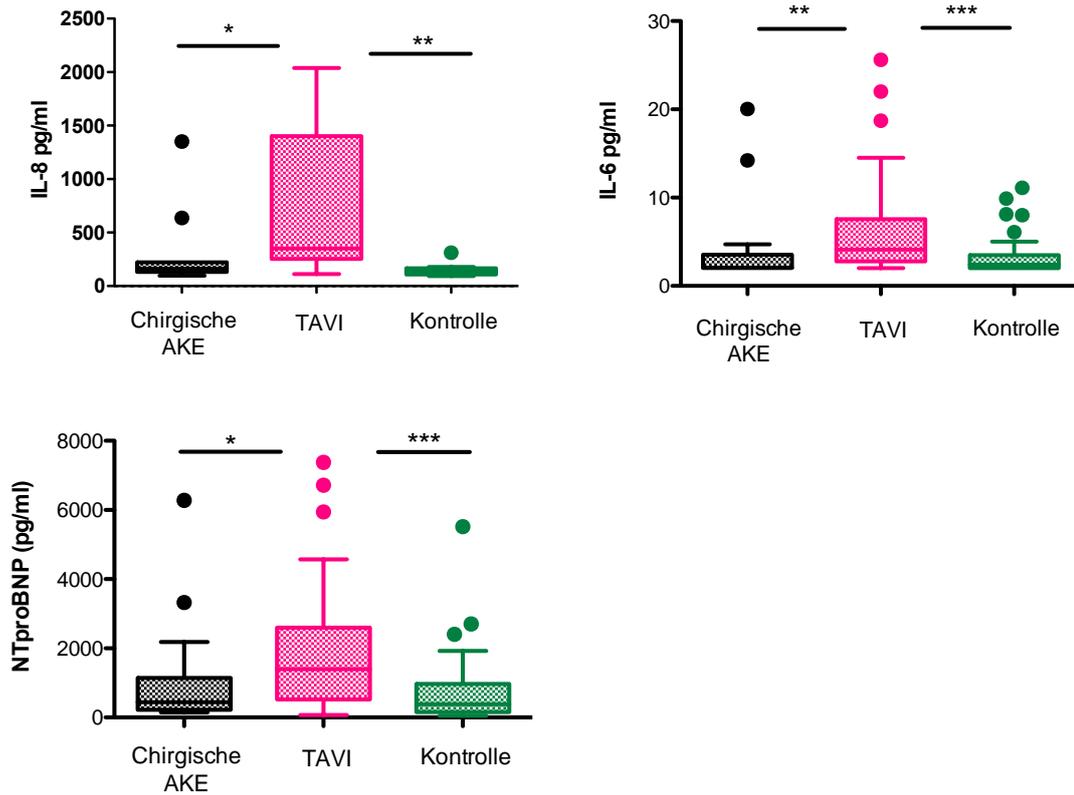


Abb. 40: Vergleichende Darstellung der Inflammationsmarker IL-8 (oben links), IL-6 (oben rechts) und NT-proBNP (unten links) im Blut von TAVI-Patienten mit chirurgischen Patienten und mit kardiologischen Kontrollpatienten. TAVI- Patienten weisen präoperativ signifikant mehr IL-8, IL-6 und NT-proBNP auf als chirurgisch- behandelte Patienten sowie als die kardiologische Kontrollgruppe.

6. Diskussion

6.1 Zusammenfassung der erhobenen Daten

Die erhobenen Daten dieser Arbeit bestätigen unsere Hypothese, dass die in der Literatur beschriebenen T_{EMRA} -Zellen keine einheitliche Zellpopulation darstellen. Dieses zeigt sich sowohl in der Verteilung der Subsets als auch im phänotypischen und funktionellen Vergleich. Wir konnten mindestens vier verschiedene T_{EMRA} -Subsets mittels der Marker CD57 und CD28 identifizieren.

Der kostimulatorische Marker CD28 scheint, laut der in dieser Arbeit generierten Daten, einen Einfluss auf die inflammatorische Aktivität der T_{EMRA} -Zellsubsets zu haben, wonach CD28-positive Zellsubsets eine signifikant höhere Produktion inflammatorischer Zytokine aufweisen. Ebenso scheint der mit T_{EMRA} -Zellen assoziierte Marker CD45RA, in der Stärke seiner Expression, einen Einfluss auf die Funktionalität von T_{EMRA} -Subsets zu haben. So zeigen Zellen, die weniger CD45RA exprimieren, eine höhere Expressionsrate von CD28 und demnach ein höheres inflammatorisches Potential als Zellen mit einer hohen Expression von CD45RA (Abb. 41).

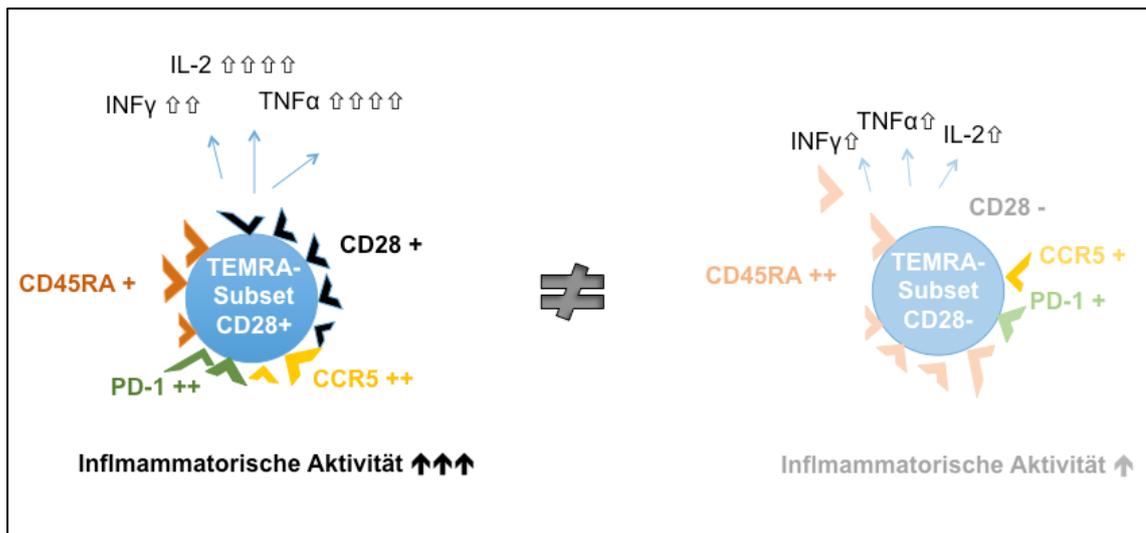


Abb. 41: Darstellung eines CD28-positiven T_{EMRA} -Subsets im Vergleich zu einem CD28-negativen T_{EMRA} -Subset. Das kostimulatorische Oberflächenmolekül CD28 scheint einen Einfluss auf die inflammatorische Aktivität der T_{EMRA} -Zellsubsets zu haben, wonach CD28-positive Zellsubsets eine signifikant höhere Produktion inflammatorisch-wirksamer Zytokine aufweisen. Ebenso scheint der mit T_{EMRA} -Zellen assoziierte Marker CD45RA einen Einfluss auf die Funktionalität von T_{EMRA} -Subsets zu haben. So zeigen Zellen, die weniger CD45RA exprimieren, eine höhere Expressionsrate von CD28 und demnach ein höheres inflammatorisches Potential als Zellen mit einer hohen Expression von CD45RA.

Die Hypothese, dass das adaptive Immunsystem und besonders T_{EMRA} -Zellen und ihre Subsets einen negativen Einfluss auf die Pathogenese der Aortenklappenstenose haben, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Im altersabgestimmten Vergleich von Patienten mit Aortenklappenstenose mit einer kardiologischen Kontrollgruppe zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der Zellverteilung der T_{EMRA} -Subsets. Lediglich funktionelle Untersuchungen zeigten signifikante Unterschiede. So waren IL-2- sowie IL-8-produzierende Zellen in Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose signifikant häufiger als in der kardiologischen Kontrollgruppe. Die gezeigte IL-2-

Produktivität von T_{EMRA}-Zellen war überraschend, da dieses bisher primär den Eigenschaften von CD4-positiven T-Helferzellen zugeordnet wurde. Die Rolle von IL-2-produzierenden Zellen in der CD8-positiven Zellpopulation, vor allem in Patienten mit Aortenklappenstenose, bleibt demnach noch zu beantworten. Ebenso war der Marker NT-proBNP signifikant in Aortenklappenstenose-Patienten im Vergleich zur kardiologischen Kontrollgruppe erhöht. Weiter erfasste Entzündungsmarker, wie die Leukozytenzahl, TNF α und der CRP-Werte ließen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Vergleichsgruppen erkennen.

Die Hypothese, dass das im Körper verbliebene Klappenmaterial von TAVI-Patienten als Trigger für pathologisch-immunologische Mechanismen wirken könnte wurde in dieser Arbeit nicht bestätigt. Ebenso zeigte die vergleichende immunologische Untersuchung von TAVI-Patienten mit chirurgischen Patienten nach drei sowie sechs Monaten post operationem keine statistisch-signifikanten Unterschiede hinsichtlich der untersuchten Immunzellen. Die vergleichende Untersuchung des chronischen Entzündungsmarkers IL-8 im Blut von TAVI- und chirurgisch-behandelten Patienten zeigte prä- sowie auch postoperativ statistisch signifikante Unterschiede. So wiesen TAVI-Patienten statistisch signifikant mehr IL-8 im peripheren Blut auf als chirurgisch-behandelte Patienten was auf ein chronisches Entzündungsgeschehen schließen lässt. Es lässt sich im postoperativen Verlauf allerdings ein Trend hinsichtlich einer Normalisierung der IL-8-Werte erkennen.

6.2 Etablierung eines Testsystems zur Identifizierung verschiedener T_{EMRA}-Zellsubsets

Terminal differenzierte Effektor-T-Zellen, T_{EMRA}-Zellen, sind klassisch als CD45RA-positiv und CCR7-negativ definiert. CD45RA-positive Effektor-T_{EMRA}-Zellen sind die am meisten differenzierten Gedächtniszellen. Sie weisen eine hohe Apoptose-Empfänglichkeit auf und exprimieren große Mengen an zytotoxischen Molekülen, wie zum Beispiel Perforin und Fas-Ligand (D'Asaro, Dieli et al. 2006). Sie besitzen die Fähigkeit antigen-unspezifisch zu Entzündungsorten zu migrieren und dort durch lokale Zytokinsekretion Regenerationsprozesse hemmen können. Diese Fähigkeit bescheinigt T_{EMRA}-Zellen zum Beispiel eine bedeutende Rolle im Krankheitsgeschehen von entzündlichen Prozessen wie zum Beispiel im Falle der Knochenheilung (Reinke, Geissler et al. 2013). T_{EMRA}-Zellen produzieren große Mengen der Zytokine IFN γ und TNF α , auch ohne Kostimulus, und sind damit stark proinflammatorisch wirksam. Durch ihre gesteigerte proinflammatorische Aktivität nehmen T_{EMRA}-Zellen auch im Rahmen von Abstoßungsreaktionen eine bedeutende Rolle ein. So wiesen D'Asaro et al. eine erhöhte Menge terminaldifferenzierter T_{EMRA}-Zellen im peripheren Blut von Patienten auf, bei denen eine Abstoßungsreaktion in Folge einer hämatogenen Stammzell-Transplantation auftrat (D'Asaro, Dieli et al. 2006). Auch bei Patienten, die eine Nieren-Transplantation erhielten, konnten T_{EMRA}-Zellen mit einem erhöhten Risiko für Abstoßungsreaktionen assoziiert werden (Betjes, Meijers et al. 2012).

Eine klare Definition von T_{EMRA}-Zellen und ihren Subsets ist bis heute in der Literatur jedoch nicht beschrieben. So sind in verschiedenen Studien T_{EMRA}-Zellen unter Verwendung verschiedener Marker unterschiedlich definiert. Einige Autoren bezeichnen T_{EMRA}-Zellen als CD8^{pos}CCR7^{neg}CD45RA^{pos} (Willinger, Freeman et al. 2005, Gupta and Gollapudi 2007), andere als CD8^{pos}CD57^{pos} oder CD8^{pos}CD28^{neg}, wie zum Beispiel Winchester und Wu in zahlreichen Untersuchungen im Kontext mit der Pathogenese der Aortenklappenstenose (Wu, Maurer et al. 2007). Reinke et al., wiesen etwa einen negativen Einfluss von T_{EMRA}-Zellen, definiert als CD8^{pos}CD11^{doppelt-pos}CD28^{neg}CD57^{pos}, auf die Knochenheilung nach (Reinke, Geissler et al. 2013). In weiteren durchflusszytometrischen Untersuchungen zur Charakterisierung von Gedächtniszellen wurden T_{EMRA}-Zellen als CD8^{pos}CCR7^{neg}CD45RA^{pos/neg}CD28^{neg}

Diskussion

bezeichnet (Appay, van Lier et al. 2008), wohingegen in einer weiteren Veröffentlichung CD8^{pos}CCR7^{neg}CD45RA^{pos}-Zellen lediglich als Effektor-Zellen beschrieben wurden (Maecker, McCoy et al. 2012).

Ein wesentliches Ziel dieser Doktorarbeit war es zu untersuchen, ob es sich bei den genannten Zellpopulationen um ähnliche, identische oder eigenständige Zellpopulationen beziehungsweise T_{EMRA}-Subsets handelt. Für die durchflusszytometrische Untersuchung wurde ein Protokoll etabliert, das die vergleichende Untersuchung eben dieser verschiedenen T_{EMRA}-Zellsubpopulation sowohl in funktioneller als auch in phänotypischer Hinsicht ermöglicht.

Es wurde hierfür das Blut von gesunden CMV-positiven und CMV-negativen Spendern sowie unter pathologischen Veränderungen bei Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose untersucht. Es wurden CMV-positive Spender ausgewählt, da sie nachweislich mehr T_{EMRA}-Zellen im Blut aufweisen als CMV-negative Spender (van de Berg, Yong et al. 2012). CMV-negative Spender wurden ergänzend analysiert, um potentielle CMV-spezifische Einflüsse zu identifizieren. Um einen direkten Vergleich zu kranken Patienten zu stellen, die unter einer potentiell immunassoziierten Erkrankung leiden, wurden Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose untersucht.

Zur Identifizierung von potentiellen T_{EMRA}-Zellen wurden die am häufigsten in der Literatur beschriebenen und etablierten T_{EMRA}-spezifischen Marker miteinander kombiniert und die dabei entstandenen Subsets analysiert. Als Ausgangspopulation wurde die konventionelle T_{EMRA}-Zellpopulation gewählt, die als CCR7-negativ und CD45RA-positiv beschrieben wird und den T_{EMRA}-Zellen ihren Namen verleiht (T-Effector-Memory-CD45RA^{pos}-cells).

Unter Verwendung der Marker CD57 und CD28 wurden schließlich T_{EMRA}-Zellsubsets untersucht. CD57 ist ein Oberflächenmolekül, das zum einen ein Marker für natürliche Killerzellen darstellt (Brenchley, Karandikar et al. 2003) und zum anderen die Enddifferenzierung einer Zelle markiert verbunden mit der Unfähigkeit zur weiteren Proliferation (Brenchley, Karandikar et al. 2003). Dies zeigt sich beispielsweise in einer verkürzten Telomerlänge, als Folge zahlreicher Zellteilungen (Meyer-Olson, Simons et al. 2010). CD28 spielt als Kostimulationsmarker in der T-Zellaktivierung eine wichtige Rolle (Brenchley, Karandikar et al. 2003). T-Zellen, die CD28 nicht auf ihrer Oberfläche exprimieren besitzen die Fähigkeit TCR-unabhängig proinflammatorisch aktiv zu sein und antigenunspezifisch in entzündliches Gewebe zu migrieren (Reinke, Geissler et al. 2013). Der Phänotyp, der mit der Enddifferenzierung einer Effektor-T-Zelle assoziiert ist, ist nicht vollständig definiert, allerdings im Allgemeinen mit dem Vorhandensein von CD57 und dem Fehlen von CD28 assoziiert (Brenchley, Karandikar et al. 2003). Da proinflammatorisch aktive T_{EMRA}-Zellen in der Literatur als CD57-positiv und/oder CD28-negativ beschrieben sind (Wu, Maurer et al. 2007, Winchester, Wiesendanger et al. 2011), ist das CD8^{pos}CCR7^{neg}CD45RA^{pos}CD57^{pos}CD28^{neg}-Subset von großem Interesse in den hier vorgestellten Untersuchungen.

Zur Beurteilung der Funktionalität der T_{EMRA}-Subsets wurden die Zytokine INF γ , TNF α und IL-2, der Degranulationsmarker CD107a sowie der Aktivierungsmarker CD154 untersucht. In einem zweiten Versuchsansatz wurden die Oberflächenmoleküle PD-1 und CCR5 auf den T_{EMRA}-Zellen untersucht.

TNF α wird im Rahmen von verschiedenen, chronisch-entzündlichen Prozessen eine bedeutende Rolle zugeschrieben, wie beispielsweise in der Pathogenese der Aortenklappenstenose und der Arthritis (Galeone, Paparella et al. 2013). Es konnte zudem in immunhistochemischen Untersuchungen von Aortenklappen eine vermehrte Expression des IL-2-Rezeptors und T-Lymphozyten nachgewiesen werden (Olsson, Dalsgaard et al. 1994). Aufgrund seiner Rolle als Induktor der Expansion und Proliferation von T-Zellen könnte IL-2 demnach im Kontext mit immun-assoziierten Erkrankungen eine besondere Bedeutung zukommen, indem es als Trigger für gesteigerte Immunreaktionen wirkt. CD154, auch als CD40L bezeichnet, ist ein Aktivierungsmarker, der vornehmlich von CD4-positiven T-Helferzellen exprimiert wird

Diskussion

und der Aktivierung von Antigen-präsentierenden-Zellen (APC) dient (Frentsch, Arbach et al. 2005, Meier, Stark et al. 2008). In verschiedenen Studien konnte jedoch auch gezeigt werden, dass auch CD8-positive zentrale- und Effektor-Gedächtniszellen eine nicht unbedeutende Menge an CD40L exprimieren. CD40L-positive CD8-positive Zellen weisen ebenfalls potente Helferfunktionen auf, wie zum Beispiel die Aktivierung von APCs. Zudem weisen sie ein den CD4-Helferzellen-ähnliches Zytokinprofil auf, was sich insbesondere in der INF γ und IL-2 Synthese zeigt (Frentsch, Listopad et al. 2012, Stark, Frentsch et al. 2012). Es ist demnach offensichtlich, dass T-Helferzellfunktionen nicht alleinig durch MHCII-induzierte Stimuli CD4-positiver Helferzellen bedingt sind, sondern dass auch auf MHC I-beschränkte Stimuli durch CD8-positive T-Effektor-Zellen, im Rahmen von T-Helfer-Funktionen von Bedeutung sind (Frentsch, Listopad et al. 2012, Stark, Frentsch et al. 2012). Auch die autokrine Sekretion von IL-2 von CD8-positiven Gedächtniszellen wurde bereits beschrieben. So zeigen Feau et al., dass CD8-positive T-Zellen, viel mehr als CD4-positive T-Zellen, die zelluläre Quelle der IL-2 Synthese bei der Generierung des CD8-T-Zellgedächtnisses darstellen (Feau, Arens et al. 2011). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass unter Einsatz der unterschiedlichen Oberflächenmarker funktionell sowie phänotypisch unterschiedliche T_{EMRA}-Subsets zu identifizieren sind. T_{EMRA}-Zellen stellen demnach eine sehr heterogene Gruppe von Zellen dar, die insbesondere funktionell nicht mit den bisher eingesetzten Oberflächenmarkern zusammengefasst werden können. Diese Heterogenität zeigt sich besonders darin, dass vor allem die CD28-positiven Subsets das stärkste proinflammatorische Potential aufweisen, unabhängig von der CD57-Expression auf diesen Zellen. Die CD28-positiven Subsets produzieren signifikant mehr INF γ , TNF α , CD154 und CD107a als die CD28-negativen Subpopulationen. Das CD8-positive T_{EMRA} CD57^{neg}CD28^{pos}-Subset produziert signifikant mehr IL-2 als die anderen drei Subpopulationen. In den triple- und vierfach-positiven Populationen waren ebenfalls die CD28-positiven Zellen am stärksten proinflammatorisch aktiv. Es könnte anhand unserer Untersuchungen demnach ein Zusammenhang zwischen der Funktionalität der Zellen, insbesondere der IL-2-Synthese und der Expression von CD28 bestehen. Eine Assoziation immunassoziierter Erkrankungen mit einer erhöhten Expression von IL-2 könnte daher gerade in der Pathogenese der Aortenklappenstenose von Bedeutung sein und könnte im Rahmen immunhistochemischer Analysen weiter untersucht werden. Der kombinierte Nachweis von IL-2 auf CD28-positiven Zellen im Klappengewebe wäre hier additiv sinnvoll, um nachzuweisen, ob es sich bei den Zytokin-produzierenden Zellen im Klappengewebe in erster Linie, um die vielfach beschriebenen CD28-negativen T_{EMRA}-Zellen handelt oder vielmehr um CD28-**positive** Zellpopulationen.

Die signifikant erhöhte Expressionsrate von CD154 (CD40L) auf CD28-positiven T_{EMRA}-Subsets könnte im Kombination mit der gesteigerten IL-2 Synthese im Hinblick auf potentielle T-Helferzeleigenschaften CD8-positiver T-Zellen von Bedeutung sein. So könnte die gezielte Untersuchung von CD8-positiven T-Helferzellen im Zusammenhang mit immunassozierten Erkrankungen von großem Interesses sein. Im Hinblick auf die gesteigerte proinflammatorische Aktivität von CD28-positiven Zellen ist ebenso von Bedeutung, dass die in dieser Arbeit angewandte PMA/Ionomycin-Stimulation eine TCR-unabhängige Form der Stimulation darstellt und die Zellen somit ungeachtet ihrer CD28-Expression stimuliert werden. So erhalten alle Zellen die selbe Stimulation und ein möglicher stimulationsassoziierter Einfluss kann ausgeschlossen werden.

Die Untersuchungen der Oberflächenmarker PD-1 und CCR5 wurden in einem separaten Versuchsansatz durchgeführt, indem die Zellen keiner PMA/Ionomycin-Stimulation ausgesetzt waren. Die Ergebnisse der phänotypischen Analyse zeigen, dass T_{EMRA}-Subsets, die eine hohe Expression von PD-1 (ca. 45% der CD28-positiven Subsets exprimieren PD-1, siehe Abb. 17) aufweisen, auch die Subsets waren, die in den funktionellen Untersuchungen die höchste Zytokin-Sekretion zeigten (ca. 50 % der CD28-positiven Subsets sezernieren TNF α , INF γ oder CD107a, siehe Abb. 16). T_{EMRA}-

Diskussion

Subsets, die in der funktionellen Analyse eine verminderte proinflammatorische Aktivität aufwiesen, zeigten hingegen in der Analyse der Oberflächenmarker eine vergleichsweise geringe PD-1-Expression. Dies ist erstaunlich, da PD-1 in der Literatur größtenteils als „Exhaustion“-Marker beschrieben wird. Die Erwartung, dass PD-1 dementsprechend auf Zellen hochreguliert ist, die nur eine geringe proinflammatorische Aktivität zeigen, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Es wurde dem PD-1-Rezeptor aber bereits in diversen Studien auch eine immunregulierende Funktion in der T-Zellerschöpfung zugeschrieben. Odorizzi et al. schreiben PD-1 eine immunmodulierende Funktion zu, welche die proinflammatorische T-Zellaktivität von bereits aktiven Zellen herabsetzt um eine Überstimulation der aktivierten T-Zellen zu verhindern. Das würde zugleich die Entstehung funktional erschöpfter Zellen verhindern. Ein definitiver Zusammenhang zwischen PD-1 und der T-Zellerschöpfung ist bisher jedoch nicht eindeutig beschrieben. Und obgleich unumstritten ist, dass die meisten Zellen, die funktionell erschöpft sind, eine hohe Expressionsrate von PD-1 aufweisen, so verlieren nicht alle Zellen, die PD-1 exprimieren ihre Funktionalität (Wei, Zhong et al. 2013). Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse unterstützen allerdings die Annahme, dass der PD-1-Rezeptor, nach Bindung an seinen Liganden, immunmodulierende Aufgaben übernimmt und auf funktionell aktiven Zellen hochreguliert ist, die anhand der von in dieser Arbeit generierten Daten CD28-positiv sind. Diese Hochregulation von PD-1 könnte die Zellen vor einer Überstimulation und dem Übergang zu funktional erschöpften Zellen schützen.

Ein weiterer Oberflächenmarker, der auf den T_{EMRA}-Zellsubsets untersucht wurde, ist der CCR5, der bedingt durch seine Stimulation die inflammatorisch aktive T-Gedächtniszelle befähigt in entzündliches Gewebe zu migrieren (Qin, Rottman et al. 1998, Iwasaki, Mukai et al. 2001).

Die Ergebnisse der phänotypischen Untersuchungen zeigen eine erhöhte Expression von CCR5 sowie Co-Expression von PD-1/CCR5 auf CD28-positiven T_{EMRA}-Zellsubsets. Da CCR5 ein proinflammatorisches Molekül ist, war dessen Expression auf den am stärksten proinflammatorisch aktiven Zellen zu erwarten. Die gleichzeitige Expression des Proinflammationsmarker CCR5 und des immunmodulierenden Markers PD-1 (PD-1/CCR5) könnte wie folgt seine Ursache haben: Die Expression von CCR5 ermöglicht aktivierten T-Zellen die Migration in entzündliches Gewebe, wo PD-1 seinen Liganden PD-1L bindet und dann immunmodulierend agiert. PD-1L wird besonders auf B-Zellen, Dendritischen Zellen, Makrophagen und T-Zellen durch deren Aktivierung hochreguliert. Die Bindung zwischen PD-1 und PD-1L liefert immun-inhibitorische Signale, welche die T-Zell-Aktivierung und die Immuntoleranz regulieren sowie immunassoziierte Gewebeschäden verhindern (Francisco, Sage et al. 2010). Damit übernimmt PD-1 eine bedeutende proinflammatorische sowie immunmodulierende Rolle im Immungeschehen.

Bei der statistischen Auswertung mit dem Wilcoxon Rangsummen-Test muss allerdings berücksichtigt werden, dass das „pairing“ der Gruppen nicht immer positiv war und die statistische Signifikanz daher unter Vorbehalt betrachtet werden sollte. Dies war bei folgenden Subsets der Fall: TNF α -Synthese von CD8^{pos}T_{EMRA} CD57^{pos}CD28^{neg} im Vergleich zu CD8^{pos} CD57^{neg}CD28^{pos}/CD8^{pos} T_{EMRA} CD57^{pos}CD28^{pos} (**p < 0,01). CD154-Expression im Vergleich CD8^{pos} CD57^{neg}CD28^{neg} mit CD8^{pos} T_{EMRA} CD57^{pos}CD28^{pos} (*p < 0,05). INF γ /TNF α /II-2/CD107a-Synthese von CD8^{pos}T_{EMRA} CD57^{pos}CD28^{neg} im Vergleich zu CD8^{pos} CD57^{neg}CD28^{pos}/CD8^{pos} T_{EMRA} CD57^{pos}CD28^{pos} (**p < 0,01). CCR5-Expression von CD8^{pos}T_{EMRA} CD57^{neg}CD28^{pos} im Vergleich zu CD8^{pos} CD57^{neg}CD28^{neg}/CD8^{pos} T_{EMRA} CD57^{pos}CD28^{neg} (**p < 0,01).

Da die Untersuchungen von Oberflächenmarkern und Zytokinen in zwei unterschiedlichen Versuchsansätzen durchgeführt wurden, konnten die Ergebnisse der Oberflächenmoleküle PD-1 oder CCR5 jedoch nicht im direkten Zusammenhang mit der proinflammatorischen Aktivität dieser Zellen beurteilt werden. Dieses soll in

Diskussion

nachfolgenden Untersuchungen erfolgen, um den Zusammenhang der Expression von PD-1 auf proinflammatorisch aktiven Zellen zu überprüfen. Zudem könnten zukünftige Experimente mittels Immunhistochemie die gleichzeitige Expression von PD1 und CD28 auf Zellen im Aortenklappengewebe untersuchen. Winchester und Wu konnten in ihren Untersuchungen bereits zeigen, dass $CD8^{pos}CD28^{neg}$ -Zellen im Klappengewebe von Aortenklappenstenose-Patienten existieren (Wu, Maurer et al. 2007, Winchester and Kodali 2011). CD28-positive Zellen wurden in diesen Untersuchungen allerdings nicht berücksichtigt. Diese könnten aber aufgrund ihres proinflammatorischen Potentials eine größere Bedeutung im Zusammenhang mit der Pathogenese der Aortenklappenstenose haben.

Da T_{EMRA} -Zellen in der aktuellen Literatur häufig oder oftmals als CD28-negativ beschrieben werden, sollte überprüft werden, ob es sich bei den analysierten CD28-positiven T_{EMRA} -Subsets tatsächlich um T_{EMRA} -Zellen handelt oder um andere T-Zellpopulationen, wie beispielsweise Effektor-T-Zellen. Dafür wurden in dieser Arbeit neben T_{EMRA} -Zellen auch zentrale Gedächtniszellen sowie T-Effektor-Gedächtniszellen untersucht. Der Vergleich der Ergebnisse im Hinblick auf funktionelle sowie phänotypische Charakteristika zeigt, dass eine große Ähnlichkeit zwischen den Effektor-Gedächtniszellen und dem CD8-positivem T_{EMRA} $CD57^{neg}CD28^{pos}$ -Subset besteht. Dieses Ergebnis könnte die Zugehörigkeit dieses T_{EMRA} -Zellsubsets zu der Effektor-Gedächtniszellpopulation bedeuten. Effektor-Gedächtniszellen werden klassisch als negativ für die Oberflächenmarker CCR7 und CD45RA definiert, während T_{EMRA} -Zellen sich durch die Reexpression von CD45RA auszeichnen.

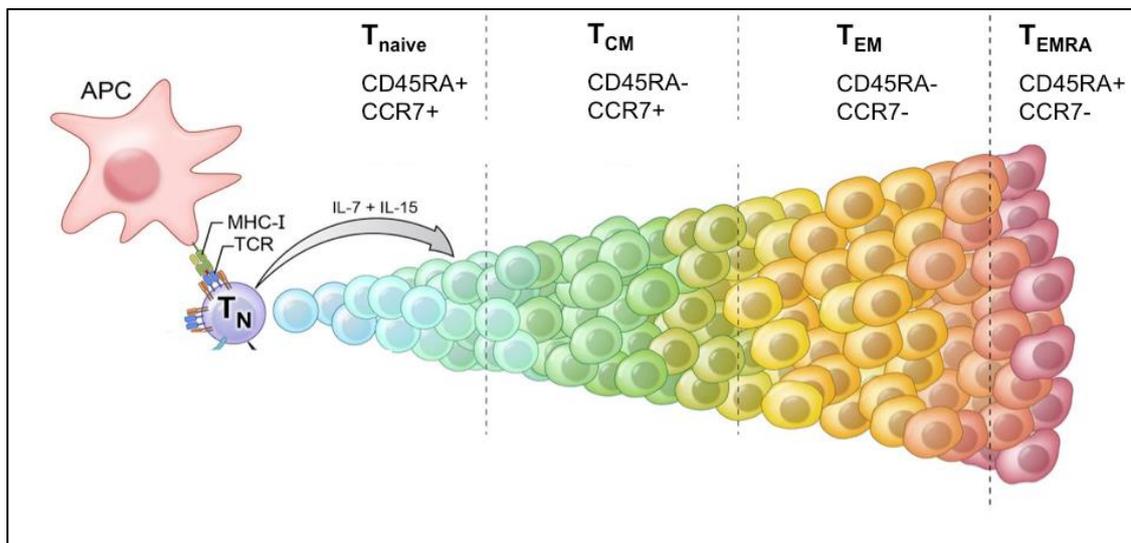


Abb. 42: Darstellung der Differenzierung von naiven T-Zellen zu Gedächtniszellen unter Berücksichtigung der Marker CD45RA und CCR7. APC: Antigen-präsentierende Zelle, T_{naive}/T_N : naive T-Zellen, T_{CM} : zentrale Gedächtniszelle, T_{EM} : Effektor-T-Zelle, T_{EMRA} : Terminal differenzierte Effektor-T-Zelle. Adaptiert nach (Gattinoni and Restifo 2013)

Um ein Vermischen dieser beiden Gedächtniszellpopulationen zu verhindern wurde der MFI (Mean of fluorescence activity) von CD45RA bestimmt.

Die Beurteilung des MFI von CD45RA könnte einen möglichen Fehler beim Setzen des Analysefensters aufdecken und damit ein versehentliches Einbeziehen CD45RA-negativer Zellen zur Folge haben. In diesem Fall würde dies bedeuten, dass es sich bei dem T_{EMRA} $CD57^{neg}CD28^{pos}$ Subset nicht ausschließlich um ein T_{EMRA} -Zellsubset handelt, sondern vielmehr um fälschlicherweise einbezogene Effektor-Gedächtniszellen. Aus den Ergebnissen der MFI-Bestimmung von CD45RA ging

Diskussion

jedoch hervor, dass alle T_{EMRA}-Subsets CD45RA exprimieren. Die Annahme, dass es sich um eine Verunreinigung durch Effektor-Gedächtniszellen handelt, konnte also nicht bestätigt werden. Allerdings zeigten die Ergebnisse auch, dass die Lage der Subsets im CD45RA-Analysefenster nicht einheitlich war. So lagen CD28-positiv T_{EMRA}-Zellsubsets näher am Analysefenster der Effektor-Gedächtniszellen als CD28-negative Zellen. Dies weist demnach auf eine unterschiedliche CD45RA-Expressionsrate hin. Die Expression des Oberflächenmoleküls CD45RA scheint daher eine entscheidende Rolle im Hinblick auf die Funktionalität zu spielen. So sind Zellen mit einer hohen CD45RA-Expressionsrate weniger proinflammatorisch aktiv als Zellen mit einer niedrigen CD45RA-Expression, siehe Abbildung 41.

Die am stärksten proinflammatorisch aktive T_{EMRA}-Zellsubpopulation ist für CD57 negativ und CD28 positiv. Eine mögliche Hypothese zur Entstehung von T_{EMRA}-Subpopulationen lässt sich nach folgendem Schema erklären:

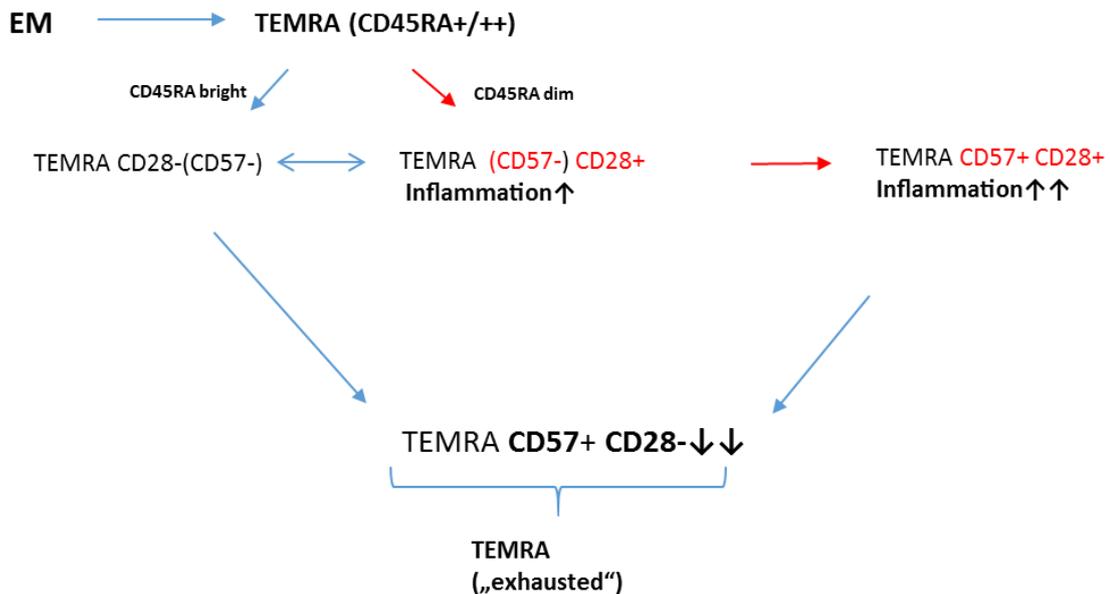


Abb. 43: Schematische Darstellung einer hypothetischen T_{EMRA}-Subset-Entwicklung. Durch das Reexprimieren von CD45RA werden aus Effektor-Gedächtniszellen terminal differenzierte T-Zellen, für CCR7-negative, T_{EMRA}-Zellen. Hier könnte sich der gemeinsame Weg der Entstehung der T_{EMRA}-Subpopulationen bereits aufspalten. Zum einen in eine Zellpopulation, die eine hohe Expressionsrate von CD45RA aufweist und zum anderen in eine Zellgruppe, die CD45RA nur schwach exprimiert. Aus diesen zwei Populationen könnten schließlich zwei funktionell unterschiedliche T_{EMRA}-Subpopulationen hervorgehen. Die Zellen, die CD45RA nur schwach exprimieren könnten sich zu einem für CD28-positiven Subset entwickeln, das ein hohes proinflammatorisches Potential aufweist. Im Gegensatz dazu könnten CD45RA-hochpositive Zellen zu CD28-negativen Zellen mit verringerter proinflammatorischer Aktivität reifen.

Das CD28-positive und das CD28-negative Subset exprimieren zu Beginn kein CD57. Exprimieren diese Subsets schließlich CD57 auf ihrer Oberfläche, entsteht zum einen das enddifferenzierte, wenig proinflammatorisch aktive Subset (CD57^{pos}CD28^{neg}) und zum anderen das am stärksten proinflammatorisch aktive Subset (CD57^{pos}CD28^{pos}), welches direkt, durch den anschließenden Verlust von CD28, in das enddifferenzierte CD57^{pos}CD28^{neg}-Subset übergehen könnte.

Durch das Reexprimieren von CD45RA werden aus Effektor-Gedächtniszellen terminal differenzierte T-Zellen, für CCR7-negative, T_{EMRA}-Zellen. Hier könnte sich der gemeinsame Weg der Entstehung der T_{EMRA}-Subpopulationen bereits aufspalten. Zum einen in eine Zellpopulation, die eine hohe Expressionsrate von CD45RA aufweist und zum anderen in eine Zellgruppe, die CD45RA nur schwach exprimiert. Aus diesen zwei

Populationen könnten schließlich zwei funktionell unterschiedliche T_{EMRA}-Subpopulationen hervorgehen. Die Zellen, die CD45RA nur schwach exprimieren könnten sich zu einem für CD28-positiven Subset entwickeln, das ein hohes proinflammatorisches Potential aufweist. Im Gegensatz dazu könnten CD45RA-hochpositive Zellen zu CD28-negativen Zellen mit verringerter proinflammatorischer Aktivität reifen.

Das CD28-positive und das CD28-negative Subset exprimieren zu Beginn kein CD57. Exprimieren diese Subsets schließlich CD57 auf ihrer Oberfläche, entstünde zum einen das enddifferenzierte, wenig proinflammatorisch aktive Subset (CD57^{pos}CD28^{neg}) und zum anderen das am stärksten proinflammatorisch aktive Subset (CD57^{pos}CD28^{pos}), welches direkt, durch den anschließenden Verlust von CD28, in das enddifferenzierte CD57^{pos}CD28^{neg}-Subset übergehen könnte.

Um diese mögliche Art der T_{EMRA}-Subset Entstehungsweise zu überprüfen, könnten TCR-Repertoire-Analysen der verschiedenen Subsets von Bedeutung sein und Aufschluss über die Herkunft der Zellen geben.

Bei der vergleichenden Auswertung der in der Literatur beschriebenen CD28-negativen oder CD57-positiven T_{EMRA}-Zellen mit den in unseren Untersuchungen generierten Subsets, muss berücksichtigt werden, dass Oberflächenmarker wie CCR7 und CD45RA in vielen Studien nicht berücksichtigt wurden. Die Verwendung dieser Marker sind besonders wichtig, um andere T-Zellpopulationen, wie beispielsweise Effektorzellen aus der Auswertung ausschließen zu können. Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse bestätigen diesbezüglich, dass sich T_{EMRA}-Subsets, die als CCR7-negativ und CD45RA-positiv charakterisiert sind, in vielen funktionellen sowie phänotypischen Eigenschaften statistisch signifikant von T_{EMRA}-Subsets unterscheiden, die ohne Berücksichtigung dieser Marker definiert waren (siehe Abb. 19 und 20).

Ein Zusammenfassen der bisher in der Literatur beschriebenen T_{EMRA}-Subsets ist demnach nicht möglich. Es handelt sich bei den beschriebenen T_{EMRA}-Definitionen weder um eine funktionell- noch um eine phänotypisch einheitliche Zellpopulation.

6.3 Untersuchung von Zellen des adaptiven Immunsystems sowie präinterventioneller Entzündungsparameter in Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose

6.3.1 Das adaptive Immunsystem im Kontext der Aortenklappenstenose

Unterschiedliche Studien haben bereits einen Zusammenhang zwischen dem adaptiven Immunsystem und der Pathogenese der Aortenklappenstenose beschrieben. Die betroffenen Aortenklappen zeigen eine atherosklerotisch veränderte Herzklappensubstanz und Zeichen einer chronischen Inflammation mit einer vermehrten Infiltration von T-Zellen im betroffenen Klappengewebe (Wu, Maurer et al. 2007, Winchester, Wiesendanger et al. 2011, Steiner, Krbal et al. 2012). Immunhistochemische Untersuchungen und Blutanalysen zeigen, dass CD4- sowie CD8-positiv T-Zellen im Klappenmaterial sowie in peripherem Blut von Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose existieren und damit neben dem angeborenen Immunsystem eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Aortenklappenstenose einnehmen könnten (Wu, Maurer et al. 2007, Winchester, Wiesendanger et al. 2011). Seit geraumer Zeit weist die Literatur daraufhin, dass es sich bei der Pathogenese der Aortenklappenstenose nicht um einen passiven, degenerativen Prozess handelt, sondern vielmehr um ein aktives, inflammatorisches Geschehen (Olsson, Dalsgaard et al. 1994, Otto, Kuusisto et al. 1994, Winchester, Wiesendanger et al. 2011). So konnten Winchester und Wu eine Korrelation zwischen dem Auftreten von HLA-DR^{pos} CD8^{pos} T-Zellen sowie CD8^{pos}CD57^{pos}CD28^{neg} T-Zellen und der Schwere der

Aortenklappenstenose nachweisen (Wu, Maurer et al. 2007, Winchester, Wiesendanger et al. 2011). Eine genaue Kenntnis über das adaptive Immunsystem und insbesondere über T_{EMRA}-Zellen ist daher bei Patienten, die unter einer schweren Aortenklappenstenose leiden von großer Bedeutung.

6.3.2 Entzündungsparameter im Kontext der Aortenklappenstenose

Um einen präoperativen immunologischen bzw. inflammatorischen Status dieser Patienten zu erhalten wurden vor dem operativen Eingriff Parameter wie die Leukozytenzahl, CRP-Wert, TNF α , NT-pro BNP, IL-6 und IL-8 erfasst und innerhalb der Studie gemeinsam mit den experimentellen Ergebnissen ausgewertet.

Aus diesen Untersuchungen ging hervor, dass das NT-pro BNP, welches ein Marker für die Herzinsuffizienz darstellt, sowie der Entzündungsmarker IL-6 signifikant bei Patienten mit Aortenklappenstenose erhöht waren, $***p < 0,001$. Sinning et al. untersuchten bereits die Auswirkung von NT-pro BNP und IL-6 im Hinblick auf die Mortalitätsrate von TAVI-Patienten. Sie konnten zeigen, dass erhöhte präoperative Plasmaspiegel an NT-pro BNP und IL-6 mit einer gestiegenen Mortalitätsrate assoziiert sind (Sinning, Wollert et al. 2015). Auch Goodman et al. wiesen in einer Studie eine positive Korrelation zwischen der Konzentration von NT-pro BNP und der Mortalitätsrate von Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose nach. Das Plasmalevel an NT-pro BNP, das mit einer Veränderung der Mortalitätsrate assoziiert werden könnte, wurde in dieser Studie jedoch nicht definiert (Goodman, Kusunose et al. 2016). Spargias et al. zeigten allerdings in einer Studie eine 100%ige Überlebensrate für Patienten mit einem NT-proBNP-Ausgangswert von < 1200 pg/ml (Spargias, Polymeros et al. 2011). Bei einem präinterventionellen Cut-off-Level von > 2000 pg/ml stieg die Mortalität bereits innerhalb von vier Jahren nach TAVI signifikant an (Ribeiro, Urena et al. 2014). Zudem konnte in NT-proBNP-Verlaufsmessungen ein signifikanter Abfall des NT-proBNP-Levels im Blut der Patienten bereits 1-6 Monate nach dem TAVI-Eingriff festgestellt werden (Borz, Durand et al. 2014, Ribeiro, Urena et al. 2014).

Ein Zusammenhang zwischen dem IL-6-Status und einer erhöhten Mortalitätsrate konnte nach Sinning et al. allerdings nicht bestätigt werden (Sinning, Wollert et al. 2015).

Da IL-6 in unseren Untersuchungen bei Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose, die im Verlauf eine TAVI erhielten, im Vergleich zu einer altersabgestimmten kardiologischen Kontrollgruppe signifikant erhöht war, sollte dessen potentielle Relevanz als Biomarker im Hinblick auf die Pathogenese der Aortenklappenstenose in zukünftigen Untersuchungen jedoch berücksichtigt werden. So könnte IL-6, als proinflammatorisch aktives Zytokin als potentieller Trigger für die zielgerichtete Migration proinflammatorisch aktiver T-Zellen ins Aortenklappengewebe wirken. Es ist bereits beschrieben, dass IL-6 im Rahmen der Kalzifizierungsvorgänge in der pathologischen Aortenklappe eine Rolle spielt. Mathieu et al. beschreiben eine erhöhte Expression von IL-6 in valvulär-interstitiellen Zellen (VICs) im mineralisiertem Klappengewebe. IL-6 nimmt hier durch auto/parakrine Effekte eine bedeutende Rolle bei der osteogenetischen Transition der VICs ein. Diesbezüglich konnte bereits durch das Dämmen der IL-6 Expression in VICs eine Abnahme des osteogenetischen Potentials gezeigt werden (Mathieu, Bouchareb et al. 2015).

Immunhistochemische Untersuchungen von IL-6 im Klappengewebe könnten wertvolle Informationen hierüber liefern. Ebenso wie eine funktionelle Analyse von T_{EMRA}-Zellen im Hinblick auf deren IL-6-Synthese sinnvoll wäre. Es bleibt jedoch die Frage offen, warum Aortenklappenstenose-Patienten, die eine TAVI erhielten ebenso präoperativ signifikant mehr IL-6 aufwiesen als Aortenklappenstenose-Patienten, die im Verlauf einen chirurgischen Aortenklappenersatz erhielten (siehe Abb. 41). Auch die Untersuchung des chronischen Inflammationsmarkers IL-8 zeigte eine signifikant höhere IL-8-Konzentration im Blut von TAVI-Patienten im Vergleich zur

altersabgestimmten kardiologischen Kontrollgruppe. Die erhöhte Menge von IL-8 im Blut von TAVI-Patienten könnte demnach als Spiegel einer chronischen Inflammation zu werten sein, das aber weder durch das Alter allein noch durch die Aortenklappenstenose bedingt sein kann.

Es konnten anhand, der in dieser Arbeit generierten Ergebnisse, im Vergleich von Aortenklappenstenose-Patienten mit einer altersangepassten kardiologischen Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede, die **spezifisch** für das Auftreten der Aortenklappenstenose sind, nachgewiesen werden.

6.3.3 T_{EMRA}-Zellen im Kontext der Aortenklappenstenose

Die aufgestellte Hypothese, dass T_{EMRA}-Zellen durch ihr Potential antigenunspezifisch in inflammatorisches Gewebe migrieren und in erhöhten Konzentrationen in Patienten mit Aortenklappenstenose nachzuweisen sind oder als Folge solcher verändert sein könnten, konnten durch die in dieser Arbeit erhobenen Daten, nicht bestätigt werden. Dies ist besonders im Hinblick auf den Vergleich mit früheren Studien von Bedeutung. So zeigten Winchester und Wu ein erhöhtes Vorkommen von T_{EMRA}-Zellen (CD8^{pos}HLA-DR^{pos} und CD8^{pos}CD57^{pos}CD28^{neg}) im Klappengewebe und peripheren Blut von Patienten mit Aortenklappenstenose (Wu, Maurer et al. 2007, Winchester, Wiesendanger et al. 2011). Hier muss allerdings berücksichtigt werden, dass Winchester und Wu T_{EMRA}-Zellen ohne Verwendung der Marker CCR7 und CD45RA definierten. Da unter Verwendung dieser Definition keine CD45RA-negativen Zellen ausgeschlossen wurden, könnte es sich in den Untersuchungen von Winchester und Wu auch um mit in die Auswertung eingeschlossene Effektor- und zentrale Gedächtniszellen, handeln.

Da folglich eine eindeutige Definition von T_{EMRA}-Zellen bis heute in der aktuellen Literatur nicht erfolgt und zudem die Bedeutung T_{EMRA}-spezifischer Marker wie CCR7/CD45RA/CD57 und CD28 nicht gänzlich geklärt ist, bedarf es weiterer Untersuchungen. Es lässt sich mit den allein in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen, keine endgültige Aussage bezüglich eines Zusammenhangs von „T_{EMRA}“ Zellen mit der Pathogenese der Aortenklappenstenose tätigen.

Zudem muss in unseren Untersuchungen berücksichtigt werden, dass es sich bei der Auswahl der Kontrollgruppe nicht um „gesunde“ Probanden handelte, sondern um kardiologische Patienten. Die Schwierigkeit bestand darin kardiovaskulär gesunde Patienten in einem Alter von 80 Jahren in ausreichender Anzahl einzuschließen. Dieses Vorhaben ließ sich nicht umsetzen. Daher wurden Patienten der kardiologischen Station eingeschlossen, bei denen das Vorliegen einer Aortenklappenstenose ausgeschlossen wurde, wobei Alter und Geschlecht gut mit der zu vergleichenden Aortenklappenstenose-Kohorte abgeglichen waren. Die Wahl dieser Kontrollgruppe ist daher sicherlich ein repräsentativer Durchschnitt für kardiovaskuläre Erkrankungen, wie zum Beispiel der Hypertonus in dieser Altersgruppe. Zu berücksichtigen ist hier allerdings, dass auch andere mit dem Immunsystem assoziierte Erkrankungen, wie beispielsweise eine Arteriosklerose, negative Einflüsse auf das Immungeschehen haben könnten.

Im Hinblick auf die inflammatorische Funktionalität der Immunzellen, zeigen die Untersuchungen allerdings, dass T_{EMRA}-Zellen aus Blut von Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose statistisch signifikant mehr IL-2 synthetisieren als T_{EMRA}-Zellen aus dem Blut der kardiologischen Kontrollgruppe. So zeigten, an Aortenklappenstenose erkrankte Patienten, eine signifikant höhere Anzahl an IL-2-produzierenden CD8-positiven T_{EMRA} CD57^{neg}CD28^{pos}-Zellen (**p < 0,001) und CD8-positiven T_{EMRA} CD57^{pos}CD28^{pos}-Zellen (*p < 0,05). Auch Zellen, die dreifach-positiv für INF γ , TNF α und IL-2 waren, konnten bei Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose signifikant vermehrt nachgewiesen werden (**p < 0,01). Wie

auch in der Untersuchung der gesunden CMV-positiven Spendergruppe waren es vor allem CD28-positive Subsets, die das stärkste proinflammatorische Potential aufwiesen. Besonders IL-2 könnte, anhand der in dieser Arbeit generierten Daten, als proinflammatorisch-aktives Zytokin im Verlauf der Aortenklappenstenose eine nicht unbeachtliche Bedeutung einnehmen, in dem es zum Beispiel als Trigger für autoimmunbedingte Reaktionen agiert und somit eine stetige Aktivierung des Immunsystems unterhält.

6.4 Vergleichende immunologische Untersuchung von zwei möglichen Therapieverfahren zur Behandlung der schweren Aortenklappenstenose

Der aktuelle Goldstandard zur Therapie der Aortenklappenstenose ist der chirurgische Klappenersatz (Bach, Cimino et al. 2007). Dieser Eingriff erfordert den Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine und bedeutet daher für die meist über 65-jährigen Patienten ein enormes peri- sowie postoperatives Risiko (Stahli, Grunenfelder et al. 2012).

Durch den resultierenden Risikoanstieg müssen Patienten, die sehr alt sind und unter Komorbiditäten leiden, häufig von dieser Therapie ausgeschlossen werden (Stahli, Grunenfelder et al. 2012).

Für dieses Patientenkollektiv steht ein alternatives Klappenersatzverfahren zur Verfügung, die interventionelle, kathetergestützte (TAVI) und transapikale Aortenklappenimplantation. Diese minimal-invasiven Verfahren eröffnen gerade der Hochrisikogruppe eine Option auf eine kurative Behandlung der Aortenklappenstenose. Daten einer randomisierten klinischen Studie zeigten im Vergleich beider Therapieformen ähnliche Überlebensraten. Die postoperative 1-Jahres-Mortalität beträgt bei der TAVI 14,2 % und bei der chirurgischen Aortenklappenimplantation 19,1 %, wobei verschiedene ursächliche Komplikationen zusammengefasst wurden (Adams, Popma et al. 2014). Die hieraus resultierende Frage, warum die Überlebensrate von TAVI-Patienten, trotz des minimal-invasiven Eingriffs im Vergleich zum chirurgischen Aortenklappenersatz dennoch 14,2% beträgt, könnte neben zahlreichen anderen möglichen Faktoren in einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems liegen.

Bei der TAVI-Intervention wird mithilfe eines Katheters eine neue Klappe über das alte Klappengewebe gespannt. Das pathologisch veränderte Klappenmaterial verbleibt im Körper des Patienten. Informationen über die Folgen des Eingriffs hinsichtlich einer möglichen Induktion einer systemischen oder chronischen Inflammation fehlen derzeit in der aktuellen Literatur. Es ist vollkommen unbekannt welche Rolle das verbleibende pathologische Klappenmaterial spielt und ob es als entzündlicher „Trigger“ fungiert, selbst nach erfolgreicher Intervention. Hier könnten T_{EMRA}-Zellen eine besondere Bedeutung einnehmen, da sie zum einen antigenunspezifisch in das entzündlich-veränderte Klappengewebe migrieren können und dort ihre proinflammatorische Wirkung entfalten können. Zudem ist denkbar, dass inflammatorisch wirksame Zellen im Klappengewebe vorliegen und schließlich ins periphere Blut gelangen und auf diese Weise eine systemische Inflammation begünstigen. Sowohl für die TAVI als auch für die chirurgische Intervention konnte bereits in vorausgegangenen Untersuchungen gezeigt werden, dass es postoperativ bzw. eingriffsbedingt zu einer systemischen Inflammation kommen kann. Stähli et al wiesen in ihren Untersuchungen postoperativ eine erhöhte CRP- sowie Leukozyten-Werte in den behandelten Patienten nach (Stahli, Grunenfelder et al. 2012). Die Pathogenese der postoperativen Inflammation scheint multifaktoriell zu sein. Es könnten mechanisch-bedingte Traumata, Ischämische Reperfusionsschäden sowie der Kontakt von Blutkomponenten mit körperfremden Oberflächen von beispielweise kardiopulmonalen Bypass-Systemen als Ursache in Frage kommen. Allerdings scheinen den neuesten Untersuchungen zufolge primär lokale Traumata des Myokards Ursache der postoperativen Inflammation zu sein und

Diskussion

diese sind in der transfemorale Prozedur weniger schwerwiegend als im chirurgischen Aortenklappenersatz (Stahli, Grunenfelder et al. 2012). Die mögliche Ursache für die relativ hohe 1-Jahres-Mortalitätsrate in TAVI-Patienten scheint demnach woanders begründet zu sein.

In dieser Studie wurde Patientenblut nach einem und fünf Tagen postoperativ sowie drei und sechs Monaten nach dem Eingriff abgenommen und untersucht. Ziel war es neben kurzfristigen, unmittelbar nach der Intervention, bedingten immunologischen Veränderungen auch langfristige Veränderungen erfassen zu können. Die Blutanalysen zeigten nach der Intervention signifikante Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen. So zeigt sich bei Patienten, die einen chirurgischen Aortenklappenersatz erhielten, nach einem Tag bzw. nach fünf Tagen postinterventionell eine vergleichsweise stärkere Aktivierung des adaptiven Immunsystems als bei Patienten nach erfolgter TAVI. Der akute Einfluss des chirurgischen Eingriffs scheint hier demnach viel deutlichere perioperative Veränderungen innerhalb der Immunzellpopulationen zu induzieren, da allein der Einsatz der Herz-Lungen-Maschine, die längere Operationszeit und damit Narkosezeit nachweislich eine Aktivierung des Immunsystems verursachen (Stahli, Grunenfelder et al. 2012). Im Vergleich dazu hat die minimalinvasive TAVI-Intervention einen geringeren perioperativen Einfluss auf die Immunzellpopulationen (S21-S28).

Die vergleichende Untersuchung des Blutes nach drei und sechs Monaten post interventionem zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen. Allerdings konnte im zeitlichen Verlauf, von mit TAVI-behandelten Patienten, nach sechs Monaten ein statistisch signifikanter Abfall von CD4- sowie CD8-positiven zentralen Gedächtniszellen sowie Effektor-T-Zellen in ihrer absoluten Zellzahl beobachtet werden, welcher bei chirurgisch-behandelten Patienten im Verlauf nicht beobachtet werden konnte. Die Ursache hierfür könnte unter anderem durch das in der Auswertung mit dem Wilcoxon Rangsummen Test nicht berücksichtigte Alter oder Geschlecht in den Vergleichsgruppen zu erklären sein.

Es ist allerdings zu erwähnen, dass in der statistischen Auswertung mit dem Wilcoxon Rangsummentest, das sogenannte „pairing“ bei einigen Zellgruppen aus der chirurgischen Vergleichsgruppe, nicht in jedem Fall effektiv war. So das dies bei der Auswertung der folgenden Zellgruppen zu berücksichtigen bleibt. Die statistisch signifikante Abnahme von CD4^{pos}-Zellen / nl (post_1, ***p < 0,001, post_5 und post_3 Monate, *p<0,05, CD4^{pos}-CM-Zellen / nl post_1 Tag (***p<0,001) und post_6 Monate (*p<0,05), CD4^{pos} T_{EMRA} CD57^{pos}CD28^{pos} / nl (**p<0,01), CD4^{pos} T_{EMRA} CD57^{neg}CD28^{pos} / nl (**p<0,01), Abnahme der relativen Anzahl von Lymphozyten an Leukozyten post_1 (***p<0,001) und post_5 (**p<0,01) und CD4^{pos} T_{EMRA} CD57^{pos}CD28^{pos} von CD4 T_{EMRA} Zellen post_1 Tag (**p<0,01) bleibt daher unter Vorbehalt (S25-S28).

Die vergleichende Untersuchung des chronischen Entzündungsmarkers IL-8 in peripherem Blut von chirurgisch-behandelten Patienten und von Patienten, die eine TAVI erhielten, zeigte im Verlauf nach drei als auch nach sechs Monaten post interventionem keine signifikante Veränderung in Gegenüberstellung zum präoperativen Ausgangswert.

Allerdings konnte im direkten Vergleich von chirurgisch-behandelten Patienten mit TAVI-Patienten bereits vor dem Eingriff ein signifikanter Unterschied in der IL-8-Konzentration in peripherem Blut nachgewiesen werden. So ließen sich im Blut von Patienten, die im Verlauf eine TAVI erhalten sollten, signifikant höhere IL-8-Level nachweisen als im Blut von chirurgischen Patienten. Dieser signifikante Unterschied war auch nach drei und sechs Monaten post interventionem vorhanden. Die Vermutung, dies könnte im höheren Alter der TAVI-Patienten begründet sein konnte durch den Vergleich der Daten mit einer altersabgestimmten Kontrollgruppe widerlegt werden. Es zeigte sich auch hier eine signifikant höhere IL-8-Konzentration im Blut von TAVI-Patienten im Vergleich zur altersabgestimmten kardiologischen Kontrollgruppe.

Die erhöhte Menge von IL-8 im Blut von TAVI-Patienten könnte demnach als Spiegel einer chronischen Inflammation zu werten sein, das aber weder durch das Alter allein

noch durch die Aortenklappenstenose bedingt sein kann. So könnten weitere altersbedingte Komorbiditäten, eine Erklärung für ein erhöhtes IL-8 in diesen Patienten sein. Eine erhöhte IL-8-Konzentration in älteren TAVI-Patienten könnte neben einer erhöhten IL-6 und NT-pro BNP-Konzentration ein Trigger für weitere immunpathologische Prozesse sein.

6.5 Fazit

Die Hypothese, dass in TAVI-Patienten verbliebenes entzündliches Klappenmaterial als „Trigger“ für Entzündungen fungieren könnte und zu einer persistierenden Veränderung im Immunstatus führt, konnte mit unseren Ergebnissen nicht bestätigt werden.

Die Annahme, dass verbliebenes Klappenmaterial in Patienten auch in Zusammenhang mit der Mortalitätsrate gebracht werden kann, konnte nicht bestätigt werden. Es ist zu berücksichtigen, dass auch das hohe Alter der Patienten sowie Komorbiditäten einen Einfluss auf die Mortalitätsrate haben kann. Die Annahme, dass durch die Behandlung mit TAVI eine ausgeprägte perioperative Aktivierung der Immunzellen nur gering ausgeprägt ist konnte in unseren Untersuchungen bestätigt werden. Auch eine dauerhafte Aktivierung der Immunzellen und eine damit verbundene chronische Aktivierung des Immunsystems oder die Induktion einer Inflammation konnte in unserer Studie nicht bestätigt werden.

Die Vermutung, dass eine „Alterung“ des adaptiven Immunsystems, reflektiert durch eine Zunahme terminal differenzierter T-Zellen (T_{EMRA}-Zellen), die durch antigenunabhängige Migration in Entzündungsgewebe und die unspezifische Sekretion proinflammatorisch-wirksamer Zytokine, mit einem höheren Risiko für Komplikationen assoziiert sein könnte, wurde folglich ebenso wenig bestätigt.

7. Zusammenfassung:

Untersuchung von T_{EMRA}-Zellsubsets in Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose sowie die Untersuchung von zwei unterschiedlichen Behandlungsmethoden im Hinblick auf das adaptive Immunsystem

Die Aortenklappenstenose ist die häufigste Herzklappenerkrankung in westlichen Ländern und zugleich die dritt häufigste kardiovaskuläre Erkrankung nach der koronaren Herzerkrankung und Bluthochdruck. Ihre Prävalenz steigt mit zunehmendem Alter, was zu einem Auftreten der Erkrankung bei ca. 5 % aller über 75-jährigen führt.

Die aktuelle Literatur zeigt, dass die Aortenklappenstenose kein passiver degenerativer Prozess ist, sondern viel mehr aktiv von inflammatorischen Mechanismen beeinflusst wird. Eine detaillierte immunologische Charakterisierung von Patienten, die an Aortenklappenstenose erkrankt sind ist daher von großer Relevanz,

Ziel dieser Arbeit ist die differenzierte Untersuchung von T_{EMRA}-Zellen und deren potentieller Subsets. Da diese Zellen bereits in verschiedenen Studien mit der Aortenklappenstenose in Zusammenhang gebracht werden konnten, wurden T_{EMRA}-Zellen sowohl in gesunden als auch in Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose untersucht. Sie zeichnen sich durch ein hohes proinflammatorisches Potential sowie die Fähigkeit zur antigenunspezifischen Migration in entzündliches Gewebe.

Da T_{EMRA}-Zellen in der aktuellen Literatur nicht einheitlich beschrieben sind, wurden in dieser Arbeit verschiedene potentielle funktionelle- und phänotypische T_{EMRA}-Zell-Definitionen bestimmt und analysiert. Dies wurde durch die Bestimmung verschiedener Subpopulationen unter Verwendung T_{EMRA}-assoziierter Marker wie CCR7, CD45RA, CD57 und CD28, realisiert. Hierfür wurde das Blut von gesunden Probanden sowie Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose untersucht. Die Ergebnisse des ersten Teils dieser Arbeit zeigen, dass es sich bei den untersuchten T_{EMRA}-Subpopulationen nicht um eine einheitliche Zellpopulation handelt, sondern vielmehr um funktionell als auch phänotypisch unterschiedliche Zellen. Dies ist im Hinblick auf den Vergleich bisher bestehender Daten von großer Bedeutung, besonders im Kontext immunassoziierter Erkrankungen. Eine klare Definition von T_{EMRA}-Zellen ist in zukünftigen Studien daher unerlässlich.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit bestand in der vergleichenden Untersuchung zweier aktueller Behandlungsverfahren der Aortenklappenstenose im Hinblick auf mögliche Veränderungen im immunologischen Geschehen. Der Goldstandard zur Therapie der Aortenklappenstenose ist aktuell der chirurgische Klappenersatz, bei dem das pathologische Klappenmaterial vollständig entfernt wird. Eine alternative Behandlung ist der Transarterielle Aortenklappenersatz. Hier wird mithilfe eines Katheters eine neue Klappe über das alte Klappengewebe gespannt. Das pathologisch veränderte Klappenmaterial verbleibt im Körper des Patienten. Es wird angenommen, dass das im Körper verbliebene Klappenmaterial ein Trigger für proinflammatorische Prozesse im Körper sein könnte.

Die vergleichende Untersuchung der zwei unterschiedlichen Behandlungsverfahren im Hinblick auf das adaptive Immunsystem ergab einen kurzfristigen interventionsbedingten Unterschied. Patienten, die einen chirurgischen Aortenklappenersatz erhielten, zeigten im Vergleich zu TAVI-Patienten eine stärkere Aktivierung des Immunsystems innerhalb der ersten Woche nach dem Eingriff. Langfristig zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede, sodass die Hypothese, verbliebenes Klappenmaterial in TAVI-Patienten könne langfristig einen Einfluss auf das immunologische Geschehen haben, nicht bestätigt werden konnte.

8. Summary

Characterization of T_{EMRA}-Subsets in patients that suffer from severe aortic valve stenosis and the investigation of two different treatments regarding the adaptive immune system

The severe aortic valve stenosis is the most frequent heart valve disease as well as the third most prevalent cardiovascular disease besides coronary heart disease and hypertension in western countries. Its incidence increases with age, leading to a frequency of five percent in the population of over 75 year old people suffering from the aortic valve stenosis. Without treatment there is only a poor prognosis for those patients.

The actual literature revealed that Aortic valve stenosis is not only a passive degenerative process, but rather more actively controlled by immunological mechanisms. Therefore a detailed immunological analysis of aortic valve stenosis patients is of high importance.

The aim of the study is to characterize a special type of t cells, that were shown to be associated with the pathogenesis of the aortic valve stenosis, named T_{EMRA}, terminally differentiated effector t cells. T_{EMRA}-cells are characterized by their high proinflammatory potential in combination with the ability to migrate antigen unspecificly into inflammatory sites

In literature T_{EMRA}-cells are defined in different ways using different surfacemarkers for phenotyping. This prevents a precise comparison of existing data in the context of immunological induced or influenced diseases.

T_{EMRA} specific cell surface markers are CCR7,CD45RA,CD57 and CD28, that were also used in this study to analyse different temra subpopulations regarding their function and phenotyp. For this we analyzed peripheral blood of aortic valve stenosis patients and control patients.

The results of this work show that the analysed temra subpopulations are not all the same cells, but show rather more a functional and phenotypical heterogenous cellpopulations. So this is important especially in comparing data, when talking about temra cells.

A further part of this thesis was to compare two different treatments of the aortic valve stenosis in regard of potential impact on cells of the adaptive immune system. Surgical treatment is still considered as the common first line therapy, including the use of the heart-lung-support. During surgery the pathologically transformed valve tissue is totally removed and replaced.

An alternative treatment nowadays is TAVI (transaortic valve implantation), a catheter based intervention. TAVI is used for patients, that are excluded from surgery. These patients have a higher surgical risk, due to their age or other comorbidities. By using TAVI a new valve is overlaid the old valve, so that the old pathological valve tissue remains in the patients body.

The hypothesis of this investigation is to proof if the remaining valve tissue could show inflammatory activity and act as a trigger to long lasting systemic inflammation, even after intervention.

To proof that peripheral blood of TAVI treated and surgical treated patients was investigated before intervention, and also one and five days after intervention and for long term analyses three and six month after treatment.

The comparing investigation of the adaptive immune system after tavi and surgical treatment do not show significantly differences on long term. There is only shown a difference directly after treatment, whereat we see an increased activation of the immune system in surgical treatments.

So the hypothesis, that the remaining valve tissue could have an impact on the adaptive immune system on long term could not be proved in this study.

9. Literaturverzeichnis

Adams, D. H., J. J. Popma and M. J. Reardon (2014). "Transcatheter aortic-valve replacement with a self-expanding prosthesis." N Engl J Med **371**(10): 967-968.

Akerstrom, F., M. G. Barderas and L. Rodriguez-Padial (2013). "Aortic stenosis: a general overview of clinical, pathophysiological and therapeutic aspects." Expert Rev Cardiovas Ther **11**(2): 239-250.

Appay, V., R. A. van Lier, F. Sallusto and M. Roederer (2008). "Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues." Cytometry A **73**(11): 975-983.

Bach, D. S., N. Cimino and G. M. Deeb (2007). "Unoperated patients with severe aortic stenosis." J Am Coll Cardiol **50**(20): 2018-2019.

Ballester, R. and O. M. Rosen (1985). "Fate of immunoprecipitable protein kinase C in GH3 cells treated with phorbol 12-myristate 13-acetate." J Biol Chem **260**(28): 15194-15199.

Barber, D. L., E. J. Wherry, D. Masopust, B. Zhu, J. P. Allison, A. H. Sharpe, G. J. Freeman and R. Ahmed (2006). "Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection." Nature **439**(7077): 682-687.

Betjes, M., R. Meijers, E. Wit, W. Weimar and N. Litjens (2012). "Terminally Differentiated CD8+ Temra Cells Are Associated With the Risk for Acute Kidney Allograft Rejection." Transplantation **94**(1): 63-69.

Betts, M. R., J. M. Brenchley, D. A. Price, S. C. De Rosa, D. C. Douek, M. Roederer and R. A. Koup (2003). "Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation." J Immunol Methods **281**(1-2): 65-78.

Betts, M. R. and R. A. Koup (2004). "Detection of T-cell degranulation: CD107a and b." Methods Cell Biol **75**: 497-512.

Borz, B., E. Durand, M. Godin, C. Tron, A. Canville, C. Hauville, F. Bauer, A. Cribier and H. Eltchaninoff (2014). "Does residual aortic regurgitation after transcatheter aortic valve implantation increase mortality in all patients? The importance of baseline natriuretic peptides." Int J Cardiol **173**(3): 436-440.

Bottazzo, G. F., R. Pujol-Borrell, T. Hanafusa and M. Feldmann (1983). "Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity." Lancet **2**(8359): 1115-1119.

Boyman, O. and J. Sprent (2012). "The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system." Nat Rev Immunol **12**(3): 180-190.

Literaturverzeichnis

Brenchley, J. M., N. J. Karandikar, M. R. Betts, D. R. Ambrozak, B. J. Hill, L. E. Crotty, J. P. Casazza, J. Kuruppu, S. A. Migueles, M. Connors, M. Roederer, D. C. Douek and R. A. Koup (2003). "Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8(+) T cells." Blood **101**(7): 2711-2720.

Coico, R. and G. Sunshine (2009). Immunology- A Short Course. New Jersey, John Wiley & Sons.

D'Asaro, M., F. Dieli, N. Caccamo, M. Musso, F. Porretto and A. Salerno (2006). "Increase of CCR7- CD45RA+ CD8 T cells (T(EMRA)) in chronic graft-versus-host disease." Leukemia **20**(3): 545-547.

Darbonne, W. C., G. C. Rice, M. A. Mohler, T. Apple, C. A. Hebert, A. J. Valente and J. B. Baker (1991). "Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin." J Clin Invest **88**(4): 1362-1369.

Dong, R. and S. Zheng (2015). "Interleukin-8: A critical chemokine in biliary atresia." J Gastroenterol Hepatol **30**(6): 970-976.

Duraiswamy, J., C. C. Ibegbu, D. Masopust, J. D. Miller, K. Araki, G. H. Doho, P. Tata, S. Gupta, M. J. Zilliox, H. I. Nakaya, B. Pulendran, W. N. Haining, G. J. Freeman and R. Ahmed (2011). "Phenotype, function, and gene expression profiles of programmed death-1(hi) CD8 T cells in healthy human adults." J Immunol **186**(7): 4200-4212.

Dweck, M. R., N. A. Boon and D. E. Newby (2012). "Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium." J Am Coll Cardiol **60**(19): 1854-1863.

Egerton, M., R. Scollay and K. Shortman (1990). "Kinetics of mature T-cell development in the thymus." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(7): 2579-2582.

Elgueta, R., M. J. Benson, V. C. de Vries, A. Wasiuk, Y. X. Guo and R. J. Noelle (2009). "Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system." Immunological Reviews **229**: 152-172.

Erickson, J. J., P. Lu, S. Wen, A. K. Hastings, P. Gilchuk, S. Joyce, Y. Shyr and J. V. Williams (2015). "Acute Viral Respiratory Infection Rapidly Induces a CD8+ T Cell Exhaustion-like Phenotype." J Immunol **195**(9): 4319-4330.

Feau, S., R. Arens, S. Togher and S. P. Schoenberger (2011). "Autocrine IL-2 is required for secondary population expansion of CD8(+) memory T cells." Nature Immunology **12**(9): 908-U132.

Forster, R., A. C. Davalos-Miszlitz and A. Rot (2008). "CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance." Nat Rev Immunol **8**(5): 362-371.

Francisco, L. M., P. T. Sage and A. H. Sharpe (2010). "The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity." Immunol Rev **236**: 219-242.

Literaturverzeichnis

Frentsch, M., O. Arbach, D. Kirchhoff, B. Moewes, M. Worm, M. Rothe, A. Scheffold and A. Thiel (2005). "Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression." Nat Med **11**(10): 1118-1124.

Frentsch, M., J. J. Listopad, R. Stark, N. Matzmohr, A. N. Hegazy, S. Meier, F. Gebhardt, A. Frohlich, A. R. Schulz, J. C. Hafalla, K. Matuschewski, M. Lohning, D. Busch, T. Blankenstein and A. Thiel (2012). "CD40L expression identifies human and mouse CD8(+) helper T cells." Immunology **137**: 350-351.

Gabay, C. (2006). "Interleukin-6 and chronic inflammation." Arthritis Res Ther **8 Suppl 2**: S3.

Galeone, A., D. Paparella, S. Colucci, M. Grano and G. Brunetti (2013). "The role of TNF-alpha and TNF superfamily members in the pathogenesis of calcific aortic valvular disease." ScientificWorldJournal **2013**: 875363.

Gattinoni, L. and N. P. Restifo (2013). "Moving T memory stem cells to the clinic." Blood **121**(4): 567-568.

Germain, R. N. (1994). "MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation." Cell **76**(2): 287-299.

Goodman, A., K. Kusunose, Z. B. Popovic, R. Parikh, T. Barr, J. F. Sabik, L. L. Rodriguez, L. G. Svensson, B. P. Griffin and M. Y. Desai (2016). "Synergistic Utility of Brain Natriuretic Peptide and Left Ventricular Strain in Patients With Significant Aortic Stenosis." J Am Heart Assoc **5**(1).

Gupta, S. and S. Gollapudi (2007). "Effector memory CD8+ T cells are resistant to apoptosis." Ann N Y Acad Sci **1109**: 145-150.

Herzenberg, L. A., J. Tung, W. A. Moore, L. A. Herzenberg and D. R. Parks (2006). "Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed." Nat Immunol **7**(7): 681-685.

Hong, J. J., P. K. Amancha, K. Rogers, A. A. Ansari and F. Villinger (2013). "Re-evaluation of PD-1 expression by T cells as a marker for immune exhaustion during SIV infection." PLoS One **8**(3): e60186.

Ibrahim, S. F. and G. van den Engh (2007). "Flow cytometry and cell sorting." Adv Biochem Eng Biotechnol **106**: 19-39.

Iwasaki, M., T. Mukai, P. Gao, W. R. Park, C. Nakajima, M. Tomura, H. Fujiwara and T. Hamaoka (2001). "A critical role for IL-12 in CCR5 induction on T cell receptor-triggered mouse CD4(+) and CD8(+) T cells." Eur J Immunol **31**(8): 2411-2420.

Jahan-Tigh, R. R., C. Ryan, G. Obermoser and K. Schwarzenberger (2012). "Flow cytometry." J Invest Dermatol **132**(10): e1.

Literaturverzeichnis

Koch, S., A. Larbi, E. Derhovanessian, D. Ozcelik, E. Naumova and G. Pawelec (2008). "Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people." Immun Ageing **5**: 6.

LaborBerlin. "Interleukin-8 gesamt (nach Erythrozytenlyse)." from [http://www.laborberlin.com/leistungsverzeichnis.html?k=7&ue1=171&u=892&index=.](http://www.laborberlin.com/leistungsverzeichnis.html?k=7&ue1=171&u=892&index=)

Leon, M. B., C. R. Smith, M. Mack, D. C. Miller, J. W. Moses, L. G. Svensson, E. M. Tuzcu, J. G. Webb, G. P. Fontana, R. R. Makkar, D. L. Brown, P. C. Block, R. A. Guyton, A. D. Pichard, J. E. Bavaria, H. C. Herrmann, P. S. Douglas, J. L. Petersen, J. J. Akin, W. N. Anderson, D. Wang, S. Pocock and P. T. Investigators (2010). "Transcatheter aortic-valve implantation for aortic stenosis in patients who cannot undergo surgery." N Engl J Med **363**(17): 1597-1607.

Lin, Z., N. Y. Chiang, N. Chai, D. Seshasayee, W. P. Lee, M. Balazs, G. Nakamura and L. R. Swem (2014). "In vivo antigen-driven plasmablast enrichment in combination with antigen-specific cell sorting to facilitate the isolation of rare monoclonal antibodies from human B cells." Nat Protoc **9**(7): 1563-1577.

Lippincott-Schwartz, J., L. Yuan, C. Tipper, M. Amherdt, L. Orci and R. D. Klausner (1991). "Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic." Cell **67**(3): 601-616.

Liu, C. and T. E. Hermann (1978). "Characterization of ionomycin as a calcium ionophore." J Biol Chem **253**(17): 5892-5894.

Maecker, H. T., J. P. McCoy and R. Nussenblatt (2012). "Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project." Nat Rev Immunol **12**(3): 191-200.

Mak, T. and M. Saunders (2006). The Immune Response: Basics and Clinical Principles, ELSEVIER.

Mathieu, P., R. Bouchareb and M. C. Boulanger (2015). "Innate and Adaptive Immunity in Calcific Aortic Valve Disease." J Immunol Res **2015**: 851945.

Meier, S., R. Stark, M. Frentsch and A. Thiel (2008). "The Influence of Different Stimulation Conditions on the Assessment of Antigen-induced CD154 Expression on CD4(+) T Cells." Cytometry Part A **73A**(11): 1035-1042.

Meyer-Olson, D., B. C. Simons, J. A. Conrad, R. M. Smith, L. Barnett, S. L. Lorey, C. B. Duncan, R. Ramalingam and S. A. Kalams (2010). "Clonal expansion and TCR-independent differentiation shape the HIV-specific CD8+ effector-memory T-cell repertoire in vivo." Blood **116**(3): 396-405.

Mollenhauer, H. H., D. J. Morre and L. D. Rowe (1990). "Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity." Biochim Biophys Acta **1031**(2): 225-246.

Literaturverzeichnis

Neefjes, J., M. L. Jongsma, P. Paul and O. Bakke (2011). "Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation." Nat Rev Immunol **11**(12): 823-836.

Odorizzi, P. M., K. E. Pauken, M. A. Paley, A. Sharpe and E. J. Wherry (2015). "Genetic absence of PD-1 promotes accumulation of terminally differentiated exhausted CD8+ T cells." J Exp Med **212**(7): 1125-1137.

Olsson, M., C. J. Dalsgaard, A. Haegerstrand, M. Rosenqvist, L. Ryden and J. Nilsson (1994). "Accumulation of T lymphocytes and expression of interleukin-2 receptors in nonrheumatic stenotic aortic valves." J Am Coll Cardiol **23**(5): 1162-1170.

Otto, C. M., J. Kuusisto, D. D. Reichenbach, A. M. Gown and K. D. O'Brien (1994). "Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies." Circulation **90**(2): 844-853.

Park, W. H., J. G. Seol, E. S. Kim, W. K. Kang, Y. H. Im, C. W. Jung, B. K. Kim and Y. Y. Lee (2002). "Monensin-mediated growth inhibition in human lymphoma cells through cell cycle arrest and apoptosis." Br J Haematol **119**(2): 400-407.

Parkin, J. and B. Cohen (2001). "An overview of the immune system." Lancet **357**(9270): 1777-1789.

Pasceri, V. and E. T. Yeh (1999). "A tale of two diseases: atherosclerosis and rheumatoid arthritis." Circulation **100**(21): 2124-2126.

Pohle, K., R. Maffert, D. Ropers, W. Moshage, N. Stilianakis, W. G. Daniel and S. Achenbach (2001). "Progression of aortic valve calcification: association with coronary atherosclerosis and cardiovascular risk factors." Circulation **104**(16): 1927-1932.

Qin, S., J. B. Rottman, P. Myers, N. Kassam, M. Weinblatt, M. Loetscher, A. E. Koch, B. Moser and C. R. Mackay (1998). "The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions." J Clin Invest **101**(4): 746-754.

Reinke, S., S. Geissler, W. R. Taylor, K. Schmidt-Bleek, K. Juelke, V. Schwachmeyer, M. Dahne, T. Hartwig, L. Akyuz, C. Meisel, N. Unterwalder, N. B. Singh, P. Reinke, N. P. Haas, H. D. Volk and G. N. Duda (2013). "Terminally differentiated CD8(+) T cells negatively affect bone regeneration in humans." Sci Transl Med **5**(177): 177ra136.

Restifo, N. P. (2014). "Big bang theory of stem-like T cells confirmed." Blood **124**(4): 476-477.

Ribeiro, H. B., M. Urena, F. Le Ven, L. Nombela-Franco, R. Allende, M. A. Clavel, A. Dahou, M. Cote, J. Laflamme, L. Laflamme, H. DeLarochelliere, R. DeLarochelliere, D. Doyle, E. Dumont, S. Bergeron, P. Pibarot and J. Rodes-Cabau (2014). "Long-term prognostic value and serial changes of plasma N-terminal prohormone B-type natriuretic peptide in patients undergoing transcatheter aortic valve implantation." Am J Cardiol **113**(5): 851-859.

Literaturverzeichnis

Sallusto, F., A. Lanzavecchia and C. R. Mackay (1998). "Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses." Immunol Today **19**(12): 568-574.

Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp and A. Lanzavecchia (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." Nature **401**(6754): 708-712.

San Jose, E., A. G. Sahuquillo, R. Bragado and B. Alarcon (1998). "Assembly of the TCR/CD3 complex: CD3 epsilon/delta and CD3 epsilon/gamma dimers associate indistinctly with both TCR alpha and TCR beta chains. Evidence for a double TCR heterodimer model." Eur J Immunol **28**(1): 12-21.

Schwarz, F., P. Baumann, J. Manthey, M. Hoffmann, G. Schuler, H. C. Mehmel, W. Schmitz and W. Kubler (1982). "The effect of aortic valve replacement on survival." Circulation **66**(5): 1105-1110.

Sinning, J. M., K. C. Wollert, A. Sedaghat, C. Widera, M. C. Radermacher, C. Descoups, C. Hammerstingl, M. Weber, A. Stundl, A. Ghanem, J. Widder, M. Vasa-Nicotera, F. Mellert, W. Schiller, J. Bauersachs, B. Zur, S. Holdenrieder, A. Welz, E. Grube, M. J. Pencina, G. Nickenig, N. Werner and T. Kempf (2015). "Risk scores and biomarkers for the prediction of 1-year outcome after transcatheter aortic valve replacement." Am Heart J **170**(4): 821-829.

Smith, C. A., G. T. Williams, R. Kingston, E. J. Jenkinson and J. J. Owen (1989). "Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures." Nature **337**(6203): 181-184.

Smith, C. R., M. B. Leon, M. J. Mack, D. C. Miller, J. W. Moses, L. G. Svensson, E. M. Tuzcu, J. G. Webb, G. P. Fontana, R. R. Makkar, M. Williams, T. Dewey, S. Kapadia, V. Babaliaros, V. H. Thourani, P. Corso, A. D. Pichard, J. E. Bavaria, H. C. Herrmann, J. J. Akin, W. N. Anderson, D. Wang, S. J. Pocock and P. T. Investigators (2011). "Transcatheter versus surgical aortic-valve replacement in high-risk patients." N Engl J Med **364**(23): 2187-2198.

Smith-Garvin, J. E., G. A. Koretzky and M. S. Jordan (2009). "T cell activation." Annu Rev Immunol **27**: 591-619.

Spargias, K., S. Polymeros, A. Dimopoulos, A. Manginas, G. Pavlides, M. Balanika, A. Smirli, G. Stavridis, G. Dangas and D. V. Cokkinos (2011). "The predictive value and evolution of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels following transcatheter aortic valve implantation." J Interv Cardiol **24**(5): 462-469.

Stahli, B. E., J. Grunenfelder, S. Jacobs, V. Falk, U. Landmesser, M. B. Wischnewsky, T. F. Luscher, R. Corti, W. Maier and L. A. Altwegg (2012). "Assessment of inflammatory response to transfemoral transcatheter aortic valve implantation compared to transapical and surgical procedures: a pilot study." J Invasive Cardiol **24**(8): 407-411.

Stark, R., M. Frentsch, J. Listopad, A. Schulz, S. Meier, T. Blankenstein and A. Thiel (2012). "CD40L expression by CD8+T cells is essential for successful rejection of SV40

Literaturverzeichnis

T antigen expressing tumor cells in the absence of CD4+T cells." Journal of Immunology **188**.

Steiner, I., L. Krbal, T. Rozkos, J. Harrer and J. Laco (2012). "Calcific aortic valve stenosis: Immunohistochemical analysis of inflammatory infiltrate." Pathol Res Pract **208**(4): 231-234.

Sverdlov, A. L., D. T. Ngo, M. J. Chapman, O. A. Ali, Y. Y. Chirkov and J. D. Horowitz (2011). "Pathogenesis of aortic stenosis: not just a matter of wear and tear." Am J Cardiovasc Dis **1**(2): 185-199.

Vahanian, A., H. Baumgartner, J. Bax, E. Butchart, R. Dion, G. Filippatos, F. Flachskampf, R. Hall, B. Lung, J. Kasprzak, P. Nataf, P. Tornos, L. Torracca, A. Wenink, C. Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of and E. S. C. C. f. P. Guidelines (2007). "Guidelines on the management of valvular heart disease: The Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology." Eur Heart J **28**(2): 230-268.

van de Berg, P. J., S. L. Yong, E. B. Remmerswaal, R. A. van Lier and I. J. ten Berge (2012). "Cytomegalovirus-induced effector T cells cause endothelial cell damage." Clin Vaccine Immunol **19**(5): 772-779.

Viola, A. and A. Lanzavecchia (1996). "T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds." Science **273**(5271): 104-106.

Wei, F., S. Zhong, Z. Ma, H. Kong, A. Medvec, R. Ahmed, G. J. Freeman, M. Krogsgaard and J. L. Riley (2013). "Strength of PD-1 signaling differentially affects T-cell effector functions." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(27): E2480-2489.

Wei, F., S. Zhong, Z. Y. Ma, H. Kong, A. Medvec, R. Ahmed, G. J. Freeman, M. Krogsgaard and J. L. Riley (2013). "Strength of PD-1 signaling differentially affects T-cell effector functions." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **110**(27): E2480-E2489.

Wherry, E. J. (2011). "T cell exhaustion." Nat Immunol **12**(6): 492-499.

Wherry, E. J. and M. Kurachi (2015). "Molecular and cellular insights into T cell exhaustion." Nat Rev Immunol **15**(8): 486-499.

Willingner, T., T. Freeman, H. Hasegawa, A. J. McMichael and M. F. Callan (2005). "Molecular signatures distinguish human central memory from effector memory CD8 T cell subsets." J Immunol **175**(9): 5895-5903.

Winchester, R. and S. Kodali (2011). The Inflammatory Infiltrate in Calcific Aortic Stenosis is Characterized by Clonal Expansions of T cells and is Associated with Elevated Proportions of Circulating Activated and Effector Memory CD8 T Cells, Aortic Stenosis - Etiology, Pathophysiology and Treatment, Dr. Masanori Hirota (Ed.), INTECH.

Literaturverzeichnis

Winchester, R., M. Wiesendanger, W. O'Brien, H. Z. Zhang, M. S. Maurer, L. D. Gillam, A. Schwartz, C. Marboe and A. S. Stewart (2011). "Circulating activated and effector memory T cells are associated with calcification and clonal expansions in bicuspid and tricuspid valves of calcific aortic stenosis." J Immunol **187**(2): 1006-1014.

Wu, H. D., M. S. Maurer, R. A. Friedman, C. C. Marboe, E. M. Ruiz-Vazquez, R. Ramakrishnan, A. Schwartz, M. D. Tilson, A. S. Stewart and R. Winchester (2007). "The lymphocytic infiltration in calcific aortic stenosis predominantly consists of clonally expanded T cells." J Immunol **178**(8): 5329-5339.

Yudkin, J. S., M. Kumari, S. E. Humphries and V. Mohamed-Ali (2000). "Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link?" Atherosclerosis **148**(2): 209-214.

Zeilinger, M. and W. Hübl. (2006-02-04). "Durchflusszytometrie - eine Einführung." Retrieved 2016-05-10, from http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/durchflusszytometrie/lbef_durchflusszytometrie.htm.

Ziemer, G. and A. Haverich (2010). Herzchirurgie: Die Eingriffe am Herzen und an den herznahen Gefäßen, Springer Verlag.

10. Abbildungsverzeichnis

- ABB. 1: DARSTELLUNG DER UNTERGLIEDERUNG VON T-ZELLEN. EINTEILUNG IN NAIVE T-ZELLEN (T_{NAIVE}), ZENTRAL-GEDÄCHTNISZELLEN (T_{CM}), EFFEKTOR-GEDÄCHTNISZELLEN (T_{EM}) UND T_{EMRA} -ZELLEN (T_{EMRA}) MIT HILFE DER OBERFLÄCHENMARKER CCR7 UND CD45RA..... 3
- ABB. 2: DIE DIFFERENZIERUNG VON T-LYMPHOZYTEN IM ADAPTIVEN IMMUNSYSTEM. DIE EXPRESSION DER OBERFLÄCHENMARKER CD45RA UND CCR7 WURDE DER DEFINITION VON NAIVEN-, ZENTRALEN-, EFFEKTOR-GEDÄCHTNIS- UND TERMINAL DIFFERENZIIERTEN EFFEKTOR-ZELLSUBPOPULATIONEN ZU GRUNDE GELEGT. DIE PROLIFERATIONSFÄHIGKEIT SINKT BEI GLEICHZEITIG STEIGENDER DIFFERENZIERUNG. APC, ANTIGENPRÄSENTIERENDE ZELLE; T_N , NAIVE T-ZELLE; T_{SCM} , GEDÄCHTNIS STAMMZELLE; T_{CM} , ZENTRALE T-GEDÄCHTNISZELLE; T_{EM} , T-EFFEKTOR-GEDÄCHTNISZELLE; T_{EFF} , TERMINAL DIFFERENZIIERTE EFFEKTOR-T-ZELLE (ADAPTIERT AUS (RESTIFO 2014)). 4
- ABB. 3: DARSTELLUNG DES ZIRKULATIONSMECHANISMUS VON GEDÄCHTNISZELLEN. T_{EMRA} -ZELLEN KÖNNEN ANTIGENUNABHÄNGIG IN ENTZÜNDLICHES GEWEBE MIGRIEREN UND DORT PROINFLAMMATORISCH AKTIV SEIN, ALS AUCH IN ENTZÜNDLICHEM GEWEBE ENTSTEHEN UND ANSCHLIEßEND, PROINFLAMMATORISCH AKTIV, IN DAS PERIPHERE BLUT GELANGEN..... 5
- ABB. 4: DARSTELLUNG DES AUSWERTUNGSVORGANGS VON T_{EMRA} -SUBSETS. LINKS: DARSTELLUNG DER VERSCHIEDENEN GEDÄCHTNISZELLEN UND NAIVEN T-ZELLEN, RECHTS: ANALYSEFENSTER DER VERSCHIEDENEN T_{EMRA} -SUBSETS IM HINBLICK AUF DIE MARKER CD57 UND CD28 5
- ABB. 5: ENDOTHELIALE LÄSIONEN IM KLAPPENGEWEBE ERLAUBEN DIE MIGRATION VON T-ZELLEN UND LIPIDEN IN DAS KLAPPENGEWEBE. DIE OXIDIERUNG DER ANGELAGERTEN LIPIDE FÜHRT ZU EINER ERHÖHTEN SEKRETION INFLAMMATORISCHER PROTEINE, WIE UNTER ANDEREM TNFA. DIESE INFLAMMATORISCHEN PROZESSE INDUZIEREN DIE DIFFERENZIERUNG VON FIBROBLASTEN ZU MYOFIBROBLASTEN. DIESE PRODUZIEREN GESTEIGERT KOLLAGEN, DAS SICH SCHLIEßLICH UNGEORDNET IM KLAPPENGEWEBE ANREICHERT. WEITERHIN IST EINE DIFFERENZIERUNG DER MYOFIBROBLASTEN IN OSTEOPLASTEN MÖGLICH, WELCHE DIE DARAUF FOLGENDEN KALZIFIZIERUNGSPROZESSE INITIIEREN (DWECK, BOON ET AL. 2012) 10
- ABB. 6: SCHEMATISCHER AUFBAU EINES DURCHFLUSSZYTOMETERS. (1) DETEKTOR FÜR DAS VORWÄRTSSTREULICHT (2) DETEKTOR FÜR DAS SEITWÄRTSSTREULICHT (3) FLUORESCENZDETEKTOR. ADAPTIERT NACH (JAHAN-TIGH, RYAN ET AL. 2012) 17
- ABB. 7: DARSTELLUNG DER KOMPENSATION EINES DOTPLOTS. UNKOMPENSIIERTER DOTPLOT (OBEN) UND NACHTRÄGLICH KOMPENSIIERTER DOTPLOT (UNTEN). UM OPTIMALE ERGEBNISSE UND EINE ADÄQUATE DARSTELLUNG DER DATEN ZU ERZIELEN, WURDE VOR EINSATZ DES PANELS MIT HILFE VON EINZELFÄRBUNGEN KOMPENSIIERT. ES WURDE JEDES FLUOROCHROM MIT JEDEM KOMBINIERT UND IM DOTPLOT DARGESTELLT. ANHAND DER DARSTELLUNG KANN ERMITTELT WERDEN, WO FALSCHES SIGNALE AUFTRETEN UND DIESE HERAUSGERECHNET WERDEN. ABBILDUNG NACH (HERZENBERG, TUNG ET AL. 2006) 18
- ABB. 8: ISOLIERUNG VON PERIPHEREN MONONUKLEAREN BLUTZELLEN (PBMCs) MITTELS BIOCOLL-LÖSUNG. AUFSCHICHTUNG VON BLUT AUF BIOCOLL-LÖSUNG (LINKS), AUFTRENNUNG IN DIE VERSCHIEDENEN PHASEN NACH DER ZENTRIFUGATION (RECHTS). ADAPTIERT NACH (LIN, CHIANG ET AL. 2014) 19
- ABB. 9: DARSTELLUNG DES AUSGANGSPROTOKOLLS UND DES NEU ETABLIERTEN PROTOKOLLS. AUSGANGSPROTOKOLL (OBEN) LINKS: UNPHYSIOLOGISCHE CD8/CD4-RATIO, OBEN-MITTE: SCHLECHTE TRENNUNG DER CCR7-EXPRIMIERENDEN ZELLEN, OBEN-RECHTS: DARSTELLUNG DER T_{EMRA} -SUBSETS UND DARSTELLUNG DES NEU ETABLIERTEN PROTOKOLLS (UNTEN): UNTEN-LINKS: PHYSIOLOGISCHE CD8/CD4-RATIO, UNTEN-MITTE: REPRODUZIERBARE KLARE DARSTELLUNG DER FÜR CCR7-POSITIVER BZW. -NEGATIVER ZELLEN, UNTEN-LINKS: DARSTELLUNG DER T_{EMRA} -SUBSETS. 25

Abbildungsverzeichnis

- ABB. 10: DARSTELLUNG DER DEFINITION DER AUSWERTESTRATEGIE VON CD8-POSITIVEN CD57^{POS} UND CD8^{POS}CD28^{NEG}-SUBSETS. DIE AUSWERTUNG DIESER SUBSETS GEHT AUS EINER CD3-POSITIVEN UND CD8-POSITIVEN POPULATION HERVOR (LINKS), OHNE BERÜCKSICHTIGUNG VON CCR7 UND CD45RA (MITTE). DARSTELLUNG VON CD8^{POS}CD57^{POS}- UND CD8^{POS}CD28^{NEG}-ZELLEN UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER MARKER CCR7 UND CD45RA (RECHTS)..... 26
- ABB. 11: DARSTELLUNG DER DEFINITION UND AUSWERTUNG VON CD8-POSITIVEN T_{EMRA}-SUBSETS UNTER BERÜCKSICHTIGUNG VON CCR7 UND CD45RA UND CD57 UND CD28. 26
- ABB. 12: PROZENTUALE DARSTELLUNG DER VERTEILUNG VON CD8- UND CD4-POSITIVEN GEDÄCHTNIS-T-ZELLEN. T_{NAIVE} = NAIVE T-ZELLEN, T_{CM} = ZENTRALE T-GEDÄCHTNISZELLEN, T_{EM} = T-EFFEKTOR-GEDÄCHTNISZELLEN, T_{EMRA} = TERMINAL DIFFERENZIERTE T-GEDÄCHTNISZELLEN, CMV POSITIV (N=10), CMV NEGATIV (N=8). DARSTELLUNG DER ROHDATEN IN BOXPLOTS. DIE SIGNIFIKANZ VON UNTERSCHIEDEN ZWISCHEN DEN VERGLEICHSGRUPPEN WURDE MIT DEM MANN-WHITNEY-TEST BESTIMMT. P-WERTE UNTER 0,05 WURDEN ALS STATISTISCH SIGNIFIKANT BETRACHTET. DIE DARSTELLUNG DER GEDÄCHTNISZELLEN ZEIGTE EINE KLASSISCHE VERTEILUNG. NAIVE T-ZELLEN WIESEN DIE HÖCHSTE FREQUENZ AUF, GEFOLGT VON EFFEKTOR- UND T_{EMRA}-ZELLEN BEI CD8-POSITIVEN ZELLEN. AM GERINGSTEN VERTRETEN WAREN DIE ZENTRALEN GEDÄCHTNISZELLEN. BEI CD4-POSITIVEN ZELLEN WAREN DIE EFFEKTOR- UND T_{EMRA}-ZELLEN AM GERINGSTEN VERTRETEN. ES KONNTEN IN DEN GEDÄCHTNISZELLEN UND NAIVEN T-ZELLEN KEINE SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE ZWISCHEN CMV-POSITIVEN UND CMV-NEGATIVEN SPENDERN NACHGEWIESEN WERDEN. 27
- ABB. 13: PROZENTUALE DARSTELLUNG DER VERTEILUNG VON CD8- UND CD4-POSITIVEN T_{EMRA}-ZELLSUBSETS. CMV-POSITIV (N=10), CMV-NEGATIV (N=8). DARSTELLUNG DER ROHDATEN IN BOXPLOTS. DIE SIGNIFIKANZ VON UNTERSCHIEDEN ZWISCHEN DEN VERGLEICHSGRUPPEN WURDE MIT DEM MANN-WHITNEY-TEST BESTIMMT. P-WERTE UNTER 0,05 WURDEN ALS STATISTISCH SIGNIFIKANT BETRACHTET. DIE DARSTELLUNG DER T_{EMRA}-SUBPOPULATIONEN ZEIGT, DASS CMV-POSITIVE SPENDER SIGNIFIKANT MEHR CD8 POSITIVE T_{EMRA} CD57^{POS}CD28^{NEG} ZELLEN AUFWEISEN ALS CMV-NEGATIVE SPENDER (*P < 0,05). DIE PROZENTUALE VERTEILUNG DER VIER SUBSETS IST IN CMV-POSITIVEN UND CMV-NEGATIVEN SPENDERN GLEICH. SO ZEIGT SICH IN BEIDEN SPENDERGRUPPEN DIE CD8-POSITIVE T_{EMRA} CD57^{POS}CD28^{NEG}-POPULATION AM PROMINENTESTEN UND DIE DOPPELT-POSITIVE POPULATION ALS AM WENIGSTEN VERTRETEN. ... 28
- ABB. 14: DARSTELLUNG DES AUSWERTEVORGANGS FÜR TRIPLE- (INFF/TNFA/IL-2 UND INFF/TNFA/CD107A) UND VIERFACH-POSITIVE (INFF /TNFA /CD107A /IL-2) T-ZELLEN. DIE ZELLPOPULATIONEN WURDEN NACH IHREM FUNKTIONSPROFIL EINGETEILT. DIESES BEZIEHT SICH AUF DIE PROINFLAMMATORISCHE AKTIVITÄT UND BEINHÄLTET UNTER ANDEREM DIE OBEN BESCHRIEBENEN ZYTOKINE. JE NACHDEM, WIE VIELE PROINFLAMMATORISCHE MARKER IN DEN ZELLEN NACHWEISBAR WAREN, WURDEN EINFACH-POSITIVE ZELLEN, TRIPLE- UND VIERFACH-POSITIVE ZELLEN UNTERSUCHT. EINFACH-POSITIVE ZELLEN WEISEN EINEN BESTIMMTEN MARKER AUF, BEISPIELSWEISE INFF, OHNE BERÜCKSICHTIGUNG DER WEITEREN MARKER. TRIPLE-POSITIVE ZELLEN SIND POSITIV FÜR INFF, TNFA UND CD107A ODER IL-2. VIERFACH-POSITIVE ZELLEN SYNTHETISIEREN RESPEKTIVE EXPRIEMIEREN ALLE VIER MARKER. 29
- ABB. 15: PROZENTUALE DARSTELLUNG DER INFF, TNFA, IL-2, CD107A UND CD154 EXPRESSION IN CD8-POSITIVEN T_{EMRA}-SUBPOPULATIONEN. *P < 0,05, **P < 0,01, BLUTSTATUS: CMV-POSITIV (N=10). DARSTELLUNG DER ROHDATEN IN BOXPLOTS. DIE SIGNIFIKANZ VON UNTERSCHIEDEN ZWISCHEN DEN T_{EMRA}-SUBSETS WURDE MIT DEM WILCOXON RANGSUMMENTEST BESTIMMT. P-WERTE UNTER 0,05 WURDEN ALS STATISTISCH SIGNIFIKANT BETRACHTET. OBEN-LINKS: INFF-POSITIVE T_{EMRA}-SUBSETS, OBEN-RECHTS: TNFA-POSITIVE T_{EMRA}-SUBSETS, MITTE-LINKS: IL-2-POSITIVE T_{EMRA}-SUBSETS, MITTE-RECHTS: CD107A-POSITIVE T_{EMRA}-SUBSETS, UNTEN-LINKS: CD154-POSITIVE T_{EMRA}-SUBSETS DIE GRAFIK ZEIGT, DASS CD28-POSITIVE T_{EMRA}-SUBSETS EINE SIGNIFIKANT HÖHERE INFLAMMATORISCHE AKTIVITÄT AUFWEISEN ALS CD28-NEGATIVE T_{EMRA}-SUBSETS. 31
- ABB. 16: RELATIVE DARSTELLUNG DER MULTIFUNKTIONALITÄT BEI CD8-POSITIVEN T_{EMRA} SUBSETS. *P < 0,05 UND **P < 0,01, BLUTSTATUS: CMV-POSITIV (N=10). DARSTELLUNG DER ROHDATEN IN BOXPLOTS. DIE SIGNIFIKANZ VON UNTERSCHIEDEN ZWISCHEN DEN T_{EMRA}-SUBSETS WURDE MIT

Abbildungsverzeichnis

- DEM WILCOXON RANGSUMMENTEST BESTIMMT. P-WERTE UNTER 0,05 WURDEN ALS STATISTISCH SIGNIFIKANT BETRACHTET. OBEN: TRIPLE-POSITIVE ZELLEN: OBEN-LINKS: FÜR INF γ , TNFA UND CD107A- POSITIVE T_{EMRA}-SUBSETS, OBEN-RECHTS: FÜR INF γ , TNFA UND IL-2-POSITIVE T_{EMRA}-SUBSETS, UNTEN: VIERFACH-POSITIVE T_{EMRA}-SUBSETS. DIE GRAFIK ZEIGT, DASS CD28-POSITIVE T_{EMRA}-SUBSETS SIGNIFIKANT MEHR ZYTOKINE PRODUZIEREN ALS CD28-NEGATIVE T_{EMRA}-SUBSETS. 32
- ABB. 17: PROZENTUALE DARSTELLUNG DER PD-1 UND CCR5 EXPRESSION AUF CD8-POSITIVEN T_{EMRA}-SUBSETS. *P < 0,05 UND **P < 0,01, BLUTSTATUS: CMV-POSITIV (N=10). DARSTELLUNG DER ROHDATEN IN BOXPLOTS. DIE SIGNIFIKANZ VON UNTERSCHIEDEN ZWISCHEN DEN T_{EMRA}-SUBSETS WURDE MIT DEM WILCOXON RANGSUMMENTEST BESTIMMT. P-WERTE UNTER 0,05 WURDEN ALS STATISTISCH SIGNIFIKANT BETRACHTET. LINKS: PD-1-POSITIVE T_{EMRA}-SUBSETS, OBEN-RECHTS: CCR5-POSITIVE T_{EMRA}-SUBSETS, UNTEN: PD-1/CCR5-DOPPELT-POSITIVE T_{EMRA}-SUBSETS. DIE GRAFIK ZEIGT, DASS CD28-POSITIVE T_{EMRA}-SUBSETS SIGNIFIKANT MEHR CCR5 UND PD1 EXPRIEMIEREN, DIESES ZEIGT SICH SOWOHL IN DEN EINFACH- ALS AUCH IN DEN DOPPELT-POSITIVEN SUBSETS. 33
- ABB. 18: DARSTELLUNG DER DATEN DER AUSWERTUNG VON CD8^{POS}CD28^{NEG} ZELLEN OHNE UND MIT BERÜCKSICHTIGUNG DER MARKER CCR7 UND CD45RA. DER VERGLEICH DIESER AUSSCHLIEßLICH MITTELS DES MARKERS CD28 DEFINIERTEN SUBSETS IM VERGLEICH ZU DEN T_{EMRA}-SUBSETS, DIE ZUSÄTZLICH CCR7 UND CD45RA EXPRIEMIEREN MACHT DEUTLICH, DASS ES SICH BEI DEN UNTERSUCHTEN T_{EMRA}-SUBSETS NICHT UM IDENTISCHE ZELLEN HANDELT. ES BESTEHEN STATISTISCH SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE IN DER INFLAMMATORISCHEN AKTIVITÄT (PRODUKTION VON IL-2, INF γ ,/TNFA/IL-2 INF γ ,/TNFA/CD107A) SOWIE IN DEN UNTERSUCHTEN PHÄNOTYPISCHEN MARKERN PD-1 UND PD-1/CCR5. DARSTELLUNG DER ROHDATEN IN BOXPLOTS. DIE SIGNIFIKANZ VON UNTERSCHIEDEN ZWISCHEN DEN ZELLPULATIONEN WURDE MIT DEM WILCOXON RANGSUMMENTEST BESTIMMT. P-WERTE UNTER 0,05 WURDEN ALS STATISTISCH SIGNIFIKANT BETRACHTET, N = 10..... 34
- ABB. 19: DARSTELLUNG DER DATEN DER AUSWERTUNG VON CD8^{POS}CD57^{POS} ZELLEN OHNE UND MIT BERÜCKSICHTIGUNG DER MARKER CCR7 UND CD45RA. DER VERGLEICH DIESER AUSSCHLIEßLICH MITTELS DES MARKERS CD57 DEFINIERTEN SUBSETS IM VERGLEICH ZU DEN T_{EMRA}-SUBSETS, DIE ZUSÄTZLICH CCR7 UND CD45RA EXPRIEMIEREN MACHT DEUTLICH, DASS ES SICH BEI DEN UNTERSUCHTEN T_{EMRA}-SUBSETS NICHT UM IDENTISCHE ZELLEN HANDELT. ES BESTEHEN STATISTISCH SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE IN DER INFLAMMATORISCHEN AKTIVITÄT (PRODUKTION VON INF γ , TNFA; IL-2, CD107A UND DEN TRIPLE-POSITIVEN ZELLEN) SOWIE IN DEN UNTERSUCHTEN PHÄNOTYPISCHEN MARKERN PD-1, CCR5 UND PD1/CCR5. DARSTELLUNG DER ROHDATEN IN BOXPLOTS. DIE SIGNIFIKANZ VON UNTERSCHIEDEN ZWISCHEN DEN ZELLPULATIONEN WURDE MIT DEM WILCOXON RANGSUMMENTEST BESTIMMT. P-WERTE UNTER 0,05 WURDEN ALS STATISTISCH SIGNIFIKANT BETRACHTET, N = 10. 35
- ABB. 20: VERGLEICHENDE DARSTELLUNG DES CD8-POSITIVEN T_{EMRA} CD57^{NEG}CD28^{POS}-SUBSET MIT CD8-POSITIVEN T-EFFEKTOR-GEDÄCHTNISZELLEN. DIE ABBILDUNG ZEIGT, DASS EINE ENORME FUNKTIONELLE ÄHNLICHKEIT ZWISCHEN T-EFFEKTOR-GEDÄCHTNISZELLEN UND DEM CD8^{POS}CD57^{NEG}CD28^{POS}- T_{EMRA}-SUBSET BESTEHT. STATISTISCH SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE BESTEHEN AUSSCHLIEßLICH IN DER CD154 UND PD-1-EXPRESSION. DARSTELLUNG DER ROHDATEN IN BOXPLOTS. DIE SIGNIFIKANZ VON UNTERSCHIEDEN ZWISCHEN DEN ZELLPULATIONEN WURDE MIT DEM WILCOXON RANGSUMMENTEST BESTIMMT. P-WERTE UNTER 0,05 WURDEN ALS STATISTISCH SIGNIFIKANT BETRACHTET, N = 10. 36
- ABB. 21: DARSTELLUNG DER T_{EMRA}-SUBSETS IM T_{EMRA}-ANALYSEFENSTER („BACKGATING“).DARGESTELLT SIND HIER ZUM EINEN DIE VERSCHIEDENEN CD8-POSITIVEN T_{EMRA}-SUBSETS (JEWEILS RECHTS) UND ZUM ANDEREN DAS ANALYSEFENSTER VON CD8-POSITIVEN T_{EMRA}-ZELLEN (JEWEILS LINKS) DAVON. FÜR DIE AUSWERTUNG WURDE DIE DICHT DES JEWEILIGEN SUBSETS IM T_{EMRA}-ANALYSEFENSTER ANALYSIERT UND BEURTEILT. DIE LAGE IM ANALYSEFENSTER SPIEGELT DIE EXPRESSIONSRATE VON CD45RA WIEDER. AUS DER ABBILDUNG GEHT AUGENSCHENLICH HERVOR, DASS SICH CD28-POSITIVE ZELLEN WEITER LINKS IM ANALYSEFENSTER BEFINDEN UND SOMIT EINE GERINGERE CD45RA-EXPRESSION AUFWEISEN ALS DIE HETEROGEN VERTEILTEN CD28-NEGATIVEN SUBSETS..... 37

Abbildungsverzeichnis

- ABB. 22: DARSTELLUNG DES MFI (MEAN OF FLUORESCENCE INTENSITY) DES OBERFLÄCHENMARKERS CD45RA. N = 10. OBEN LINKS: MFI VON NAIVEN T-ZELLEN, ZENTRALEN GEDÄCHTNISZELLEN (TCM) EFFEKTOR-GEDÄCHTNISZELLEN (TEM) UND T_{EMRA}-ZELLEN. OBEN RECHTS: DARSTELLUNG DES MFI DER VERSCHIEDENEN T_{EMRA}-SUBSETS UND DER KLASSISCHEN T_{EMRA}-ZELLEN. UNTEN LINKS: CD45RA ANALYSEFENSTER MIT DARSTELLUNG DER LAGE DER MFIS DER T_{EMRA}-ZELLEN UND SUBSETS. DIE VERSCHIEDENEN ABBILDUNGEN ZEIGEN, DASS CD28-POSITIVE T_{EMRA}-SUBSETS EINEN SIGNIFIKANT UNTERSCHIEDLICHEN MFI VON CD45RA AUFWEISEN ALS CD28-NEGATIVE T_{EMRA}-SUBSETS. DARSTELLUNG DER ROHDATEN IN BOXPLOTS. DIE SIGNIFIKANZ VON UNTERSCHIEDEN ZWISCHEN DEN T_{EMRA}-SUBSETS WURDE MIT DEM WILCOXON RANGSUMMENTEST BESTIMMT. P-WERTE UNTER 0,05 WURDEN ALS STATISTISCH SIGNIFIKANT BETRACHTET. 38
- ABB. 23: PROZENTUALE DARSTELLUNG DER VERTEILUNG DER CD8 T_{EMRA}-SUBSETS, AUSGEWERTET AUS EINEM CD45RA-POSITIVEN UND EINEM CD45RA-HOCHPOSITIVEN BEREICH DES AUSWERTEFENSTERS. N = 10 (OBEN). T_{EMRA}-SUBSETS, DIE AUS DEM CD45RA-HOCHPOSITIVEN AREAL RESULTIEREN ENTWICKELN SICH TENDENZIELL MEHR IN CD28-NEGATIVE SUBSETS (UNTEN RECHTS, MITTELWERTE), WOHINGEGEN ZELLEN, DIE AUS EINEM CD45RA-POSITIVEN AREAL RESULTIEREN SICH MEHR ZU CD28-POSITIVEN ZELLEN ENTWICKELN (UNTEN LINKS, MITTELWERTE)..... 39
- ABB. 24: DARSTELLUNG DER TRIPLE-POSITIVEN ZELLEN (INF γ /TNFA/CD107A UND INF γ /TNFA/IL-2) SOWIE VIERFACH-POSITIVEN CD4 T_{EMRA}-SUBSETS. IN DEN FÜR INF γ /TNFA/CD107A POSITIVEN SUBSETS ZEIGEN SICH KEINE SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE. IN DEN FÜR INF γ /TNFA/IL-2-POSITIVEN SUBSETS UND DEN VIERFACH-POSITIVEN SUBSETS ZEIGT SICH EINE SIGNIFIKANT HÖHERE PRODUKTIVITÄT IN DEN CD28-POSITIVEN CD4 T_{EMRA}-SUBSETS, CMV-POSITIVES SPENDERBLUT. DARSTELLUNG DER ROHDATEN IN BOXPLOTS. DIE SIGNIFIKANZ VON UNTERSCHIEDEN ZWISCHEN DEN T_{EMRA}-SUBSETS WURDE MIT DEM WILCOXON RANGSUMMENTEST BESTIMMT. P-WERTE UNTER 0,05 WURDEN ALS STATISTISCH SIGNIFIKANT BETRACHTET, N = 10.40
- ABB. 25 DIE ANALYSE DER OBERFLÄCHENMARKER PD-1 UND CCR5 AUF CD4-POSITIVEN T_{EMRA}-ZELLSUBSETS ERGAB, DASS DAS CD4-POSITIVE T_{EMRA} CD57^{NEG}CD28^{POS}-SUBSET JEWEILS SIGNIFIKANT WENIGER PD-1, CCR5 UND PD1/CCR5 ALS DIE ANDEREN CD4-POSITIVEN T_{EMRA}-SUBSETS EXPRIMIERT. DIE CD4-POSITIVEN T_{EMRA} CD57^{POS}CD28^{POS}-ZELLEN EXPRIMIEREN SIGNIFIKANT MEHR PD-1/CCR5 ALS DIE RESTLICHEN SUBSETS, CMV-POSITIVES SPENDERBLUT. DARSTELLUNG DER ROHDATEN IN BOXPLOTS. DIE SIGNIFIKANZ VON UNTERSCHIEDEN ZWISCHEN DEN T_{EMRA}-SUBSETS WURDE MIT DEM WILCOXON RANGSUMMENTEST BESTIMMT. P-WERTE UNTER 0,05 WURDEN ALS STATISTISCH SIGNIFIKANT BETRACHTET, N = 10..... 41
- ABB. 26: VERGLEICHENDE DARSTELLUNG DER CD8-POSITIVEN T_{EMRA}-SUBSET-VERTEILUNG IN PATIENTEN MIT SCHWERER AORTENKLAPPENSTENOSE UND EINER KONTROLLGRUPPE. AORTENKLAPPENSTENOSE (N = 9), KONTROLLGRUPPE (N = 10). DAS CD8-POSITIVE T_{EMRA} CD57^{POS}CD28^{NEG}-SUBSET IST MIT EINEM RELATIVEN ANTEIL VON CA. 70 % DAS AM STÄRKSTEN VERTRETENDE SUBSET GEFOLGT VON DEN CD8-POSITIVEN T_{EMRA} CD57^{NEG}CD28^{POS}-ZELLEN UND DEM DOPPELT-NEGATIVEM SUBSET. DAS DOPPELT-POSITIVE SUBSET IST MIT EINEM RELATIVEN ANTEIL VON CA. 5 % AM GERINGSTEN VERTRETEN. DIE ABBILDUNG ZEIGT, DASS KEINE STATISTISCH SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE IN DER T_{EMRA}-ZELLVERTEILUNG ZWISCHEN AORTENKLAPPENSTENOSE-PATIENTEN UND DER KONTROLLGRUPPE BESTEHEN. DARSTELLUNG DER ROHDATEN IN BOXPLOTS. DIE SIGNIFIKANZ VON UNTERSCHIEDEN ZWISCHEN DEN KLINISCHEN GRUPPEN WURDE MIT DEM MAN WHITNEY TEST BESTIMMT. P-WERTE UNTER 0,05 WURDEN ALS STATISTISCH SIGNIFIKANT BETRACHTET. 42
- ABB. 27: DARSTELLUNG DER IL-2-PRODUZIERENDEN ZELLEN (OBEN) UND DER TRIPLE-POSITIVEN ZELLEN (UNTEN) IN AORTENKLAPPENSTENOSE-PATIENTEN (N = 9) UND EINER KARDIOLOGISCHEN KONTROLLGRUPPE (N = 10). *P < 0,5 UND **P < 0,01. DIE ABBILDUNG ZEIGT DIE BESTEHENDEN SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE IN DER IL-2-PRODUKTION DER CD28-POSITIVEN T_{EMRA}-ZELLEN VON AORTENKLAPPENSTENOSE-PATIENTEN IM VERGLEICH ZUR KARDIOLOGISCHEN KONTROLLGRUPPE. DARSTELLUNG DER ROHDATEN IN BOXPLOTS. DIE SIGNIFIKANZ VON UNTERSCHIEDEN ZWISCHEN DEN KLINISCHEN GRUPPEN WURDE MIT DEM MAN WHITNEY TEST BESTIMMT. P-WERTE UNTER 0,05 WURDEN ALS STATISTISCH SIGNIFIKANT BETRACHTET. 43

Abbildungsverzeichnis

- ABB. 28: VERGLEICHENDE DARSTELLUNG DER CD4-POSITIVEN T_{EMRA} -SUBSET-VERTEILUNG IN PATIENTEN MIT SCHWERER AORTENKLAPPENSTENOSE UND EINER KONTROLLGRUPPE. AORTENKLAPPENSTENOSE (N = 9), KONTROLLGRUPPE (N = 10). DAS CD4-POSITIVE T_{EMRA} CD57^{NEG} CD28^{POS}-SUBSET IST MIT EINEM RELATIVEN ANTEIL VON CA. 85 % DAS AM STÄRKSTEN VERTRETENE SUBSET GEFOLGT VON DEN CD4-POSITIVEN T_{EMRA} CD57^{POS} CD28^{NEG}-ZELLEN UND DEM DOPPELT-POSITIVEN SUBSET. DAS DOPPELT-NEGATIVE SUBSET IST MIT EINEM RELATIVEN ANTEIL VON CA. 1 % SEHR GERING. DIE ABBILDUNG ZEIGT, DASS KEINE STATISTISCH SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE IN DER T_{EMRA} -ZELLVERTEILUNG ZWISCHEN AORTENKLAPPENSTENOSE-PATIENTEN UND DER KONTROLLGRUPPE BESTEHEN. DARSTELLUNG DER ROHDATEN IN BOXPLOTS. DIE SIGNIFIKANZ VON UNTERSCHIEDEN ZWISCHEN DEN KLINISCHEN GRUPPEN WURDE MIT DEM MAN WHITNEY TEST BESTIMMT. P-WERTE UNTER 0,05 WURDEN ALS STATISTISCH SIGNIFIKANT BETRACHTET. 44
- ABB. 29: DARSTELLUNG DER CD8-POSITIVEN T_{EMRA} -SUBSETS/NL AUS TAVI-PATIENTEN SOWIE AUS CHIRURGISCH-BEHANDELTEN PATIENTEN. DARGESTELLT IST DER VERLAUF VOM ZEITPUNKT VOR DEM EINGRIFF SOWIE EINEN UND FÜNF TAGE NACH UND DREI UND SECHS MONATE NACH DEM EINGRIFF. IN BEIDEN BEHANDLUNGSGRUPPEN ZEIGT SICH EINEN TAG NACH DEM EINGRIFF EINE SIGNIFIKANTE ABNAHME DER T_{EMRA} -SUBSETS, DIE BEREITS FÜNF TAGE NACH DEM EINGRIFF NICHT MEHR BESTEHT. DARSTELLUNG DER ROHDATEN IN BOXPLOTS. DIE SIGNIFIKANZ VON UNTERSCHIEDEN IM ZEITLICHEN VERLAUF WURDE MIT DEM WILCOXON RANGSUMMENTEST BESTIMMT. P-WERTE UNTER 0,05 WURDEN ALS STATISTISCH SIGNIFIKANT BETRACHTET, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001. 48
- ABB. 30: DARSTELLUNG DER CD8-POSITIVEN T_{EMRA} -SUBSETS IN PROZENT VON CD8 T_{EMRA} AUS TAVI-PATIENTEN SOWIE AUS CHIRURGISCH-BEHANDELTEN PATIENTEN. DARGESTELLT IST DER VERLAUF VOM ZEITPUNKT VOR DEM EINGRIFF SOWIE EINEN UND FÜNF TAGE NACH UND DREI UND SECHS MONATE NACH DEM EINGRIFF. IN DER CHIRURGISCH-BEHANDELTEN GRUPPE ZEIGT SICH IM CD8 T_{EMRA} CD57^{POS} CD28^{NEG} EIN RELATIVER SIGNIFIKANTER ANSTIEG SOWIE IM CD8 T_{EMRA} CD57^{NEG} CD28^{NEG}-SUBSET EINE RELATIV SIGNIFIKANTE ABNAHME EINEN TAG NACH DEM EINGRIFF. DARSTELLUNG DER ROHDATEN IN BOXPLOTS. DIE SIGNIFIKANZ VON UNTERSCHIEDEN IM ZEITLICHEN VERLAUF WURDE MIT DEM WILCOXON RANGSUMMENTEST BESTIMMT. P-WERTE UNTER 0,05 WURDEN ALS STATISTISCH SIGNIFIKANT BETRACHTET, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001. 49
- ABB. 31: DARSTELLUNG DER CD4-POSITIVEN T_{EMRA} -SUBSETS/NL AUS TAVI-PATIENTEN SOWIE AUS CHIRURGISCH-BEHANDELTEN PATIENTEN. DARGESTELLT IST DER VERLAUF VOM ZEITPUNKT VOR DEM EINGRIFF SOWIE EINEN UND FÜNF TAGE NACH UND DREI UND SECHS MONATE NACH DEM EINGRIFF. IN DER CHIRURGISCHEN BEHANDLUNGSGRUPPE ZEIGT SICH EINEN TAG NACH DEM EINGRIFF EINE SIGNIFIKANTE ABNAHME DER T_{EMRA} -SUBSETS, WELCHE IN DER TAVI-KOHORTE NUR IM CD4-POSITIVEN T_{EMRA} CD57^{NEG} CD28^{POS}-SUBSET SIGNIFIKANT IST. DARSTELLUNG DER ROHDATEN IN BOXPLOTS. DIE SIGNIFIKANZ VON UNTERSCHIEDEN IM ZEITLICHEN VERLAUF WURDE MIT DEM WILCOXON RANGSUMMENTEST BESTIMMT. P-WERTE UNTER 0,05 WURDEN ALS STATISTISCH SIGNIFIKANT BETRACHTET, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001. 50
- ABB. 32: DARSTELLUNG DER CD4-POSITIVEN T_{EMRA} -SUBSETS IN PROZENT VON CD4-POSITIVEN T_{EMRA} AUS TAVI-PATIENTEN SOWIE AUS CHIRURGISCH-BEHANDELTEN PATIENTEN. DARGESTELLT IST DER VERLAUF VOM ZEITPUNKT VOR DEM EINGRIFF SOWIE EINEN UND FÜNF TAGE NACH UND DREI UND SECHS MONATE NACH DEM EINGRIFF. IN DER CHIRURGISCH-BEHANDELTEN GRUPPE ZEIGT SICH IM CD4-POSITIVE T_{EMRA} CD57^{POS} CD28^{POS} EINE RELATIVE SIGNIFIKANTE ABNAHME SOWIE IM CD4-POSITIVEN T_{EMRA} CD57^{NEG} CD28^{NEG}-SUBSET EINE RELATIV SIGNIFIKANTE ZUNAHME EINEN TAG NACH DEM EINGRIFF. DARSTELLUNG DER ROHDATEN IN BOXPLOTS. DIE SIGNIFIKANZ VON UNTERSCHIEDEN IM ZEITLICHEN VERLAUF WURDE MIT DEM WILCOXON RANGSUMMENTEST BESTIMMT. P-WERTE UNTER 0,05 WURDEN ALS STATISTISCH SIGNIFIKANT BETRACHTET, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001. 51
- ABB. 33: IN DER UNTERSUCHUNG DER LEUKOZYTEN ZEIGTE SICH EINEN TAG NACH DEM EINGRIFF EINE STATISTISCH ERHÖHTE ZELLZAHL DER LEUKOZYTEN IN DER CHIRURGISCHEN BEHANDLUNGSGRUPPE, WELCHE IM WEITEREN VERLAUF NICHT MEHR ZU VERZEICHNEN WAR. DIE LYMPHOZYTEN-POPULATION WIES BEREITS VOR DER INTERVENTION EINE SIGNIFIKANT ERHÖHTE

Abbildungsverzeichnis

- ABSOLUTE ZELLZAHL DER LYMPHOZYTEN IN DER CHIRURGISCHEN-KOHORTE AUF (P-WERT: 0,023, ADJUSTIERT NACH ALTER UND GESCHLECHT), WELCHES SICH EINEN TAG NACH DEM EINGRIFF UMKEHRTE (P-WERT VON 0,022, ADJUSTIERT NACH ALTER UND GESCHLECHT). DIE RELATIVE ZELLZAHL DER LYMPHOZYTEN, GEMESSEN IN PROZENT AN LEUKOZYTEN, WIESEN CHIRURGISCHE PATIENTEN STATISTISCH SIGNIFIKANT WENIGER LYMPHOZYTEN EINEN TAG NACH DEM EINGRIFF AUF, WELCHES SICH DREI MONATE POST INTERVENTIONEM UMKEHRTE. CD3-POSITIVE T-ZELLEN SIND EINEN TAG NACH DEM EINGRIFF IN IHRER ABSOLUTEN ZELLZAHL STATISTISCH SIGNIFIKANT GERINGER IN CHIRURGISCHEN PATIENTEN NACHZUWEISEN ALS IN TAVI-PATIENTEN. IN IHRER RELATIVEN ZELLZAHL, GEMESSEN IN PROZENT AN LYMPHOZYTEN, ZEIGEN SICH BEREITS EINEN TAG VOR- ALS AUCH EINEN TAG NACH DEM EINGRIFF BEI CHIRURGISCHEN PATIENTEN SIGNIFIKANT WENIGER T-ZELLEN ALS IN TAVI-PATIENTEN. PRE_1 (TAVI, N = 45, CHIRG. AKE, N =19), POST_1 TAG (TAVI, N = 23, CHIRG. AKE, N =16), POST_5 TAGE (TAVI, N = 15, CHIRG. AKE, N =10), POST_3 MONATE (TAVI, N = 20, CHIRG. AKE, N =14), POST_6 MONATE (TAVI, N = 20, CHIRG. AKE, N =13) 53
- ABB. 34: DARSTELLUNG DER ABSOLUTEN ZELLZAHL VON CD8- UND CD4-POSITIVEN ZELLEN IM HINBLICK AUF DIE ZWEI UNTERSUCHTEN BEHANDLUNGSVERFAHREN. TAVI UND CHIRURGISCHER KLAPPENERSATZ (CHIRG. AKE) EINEN TAG VOR DEM EINGRIFF SOWIE EINEN UND FÜNF TAGE UND DREI UND SECHS MONATE NACH DEM EINGRIFF. ES BESTEHEN IN DER ABSOLUTEN ZELLZAHL VON CD4- UND CD8-POSITIVEN ZELLEN EINEN TAG NACH DEM EINGRIFF SOWIE BEI CD8-POSITIVEN ZELLEN FÜNF TAGE NACH DEM EINGRIFF EINE SIGNIFIKANT ERNIEDRIGTE ZELLZAHL IN CHIRURGISCHEN PATIENTEN IM VERGLEICH ZU TAVI-PATIENTEN. PRE_1 (TAVI, N = 45, CHIRG. AKE, N =19), POST_1 TAG (TAVI, N = 23, CHIRG. AKE, N =16), POST_5 TAGE (TAVI, N = 15, CHIRG. AKE, N =10), POST_3 MONATE (TAVI, N = 20, CHIRG. AKE, N =14), POST_6 MONATE (TAVI, N = 20, CHIRG. AKE, N =13) 54
- ABB. 35: IN DER UNTERSUCHUNG DER CD8-POSITIVEN NAIVEN T-ZELLEN KONNTE GEZEIGT WERDEN, DASS PATIENTEN, DIE EINEN CHIRURGISCHEN AORTENKLAPPENERSATZ ERHIELTEN, FÜNF TAGE UND SECHS MONATE NACH DEM EINGRIFF SIGNIFIKANT MEHR CD8-POSITIVE NAIVE T-ZELLEN (IN PROZENT AN CD8-POSITIVEN ZELLEN) AUFWEISEN ALS TAVI-PATIENTEN. IN DER ABSOLUTEN ZELLZAHL DER NAIVEN T-ZELLEN BESTEHT EIN TAG POST OPERATIONEM EIN SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED ZWISCHEN TAVI- UND CHIRURGISCHEN PATIENTEN. SO WEISEN TAVI-PATIENTEN SIGNIFIKANT MEHR CD8-POSITIVE NAIVE T-ZELLEN EINEN TAG NACH DEM EINGRIFF AUF, ALS CHIRURGISCHE PATIENTEN. ZENTRALE GEDÄCHTNISZELLEN SIND BEREITS VOR DEM EINGRIFF IN PATIENTEN, DIE EINEN CHIRURGISCHEN AORTENKLAPPENERSATZ ERHALTEN IN IHRER RELATIVEN ZELLZAHL, GEMESSEN IN PROZENT AN CD8-POSITIVEN ZELLEN, SIGNIFIKANT ERHÖHT. IN DER ABSOLUTEN ZELLZAHL CD8-POSITIVER ZENTRALER GEDÄCHTNISZELLEN SIND KEINE STATISTISCH RELEVANTEN UNTERSCHIEDE ZWISCHEN TAVI UND CHIRURGISCHEN PATIENTEN ZU VERZEICHNEN. IM VERGLEICH VON EFFEKTOR-GEDÄCHTNISZELLEN IN TAVI- UND CHIRURGISCHEN PATIENTEN KONNTEN KEINE SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE NACHGEWIESEN WERDEN. IN DEN CD8-POSITIVEN T_{EMRA}-ZELLEN ZEIGEN SICH EINEN TAG SOWIE FÜNF TAGE NACH DEM EINGRIFF SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE IN DER ABSOLUTEN ZELLZAHL, WOBEI TAVI-PATIENTEN SIGNIFIKANT MEHR CD8-POSITIVE T_{EMRA}-ZELLEN AUFWEISEN ALS PATIENTEN, DIE EINEN CHIRURGISCHEN AORTENKLAPPENERSATZ ERHIELTEN. IN DER BEURTEILUNG DER RELATIVEN ZELLZAHL VON CD8-POSITIVEN T_{EMRA}-ZELLEN, GEMESSEN AN CD8-POSITIVEN ZELLEN, WEISEN TAVI-PATIENTEN BEREITS EINE HÖHERE ANZAHL VON CD8-POSITIVEN T_{EMRA}-ZELLEN AUF ALS PATIENTEN, DIE IM VERLAUF EINEN CHIRURGISCHEN AORTENKLAPPENERSATZ ERHALTEN WERDEN. POSTOPERATIV WEISEN TAVI-PATIENTEN AUSSCHLIEßLICH FÜNF TAGE NACH DEM EINGRIFF SIGNIFIKANT MEHR CD8-POSITIVE T_{EMRA}-ZELLEN AUF ALS CHIRURGISCHE PATIENTEN. IM WEITEREN VERLAUF SIND KEINE SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE MEHR ZU VERZEICHNEN. PRE_1 (TAVI, N = 45, CHIRG. AKE, N =19), POST_1 TAG (TAVI, N = 23, CHIRG. AKE, N =16), POST_5 TAGE (TAVI, N = 15, CHIRG. AKE, N =10), POST_3 MONATE (TAVI, N = 20, CHIRG. AKE, N =14), POST_6 MONATE (TAVI, N = 20, CHIRG. AKE, N =13). 56
- ABB. 36: DIE UNTERSUCHUNG VON CD8-POSITIVEN T_{EMRA}-SUBSETS IM BLUT VON AORTENKLAPPENSTENOSE-PATIENTEN ZEIGT EINEN TAG POSTOPERATIV EINEN SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED ZWISCHEN CHIRURGISCH BEHANDELTEN PATIENTEN UND PATIENTEN DIE EINE TAVI ERHIELTEN. SO LASSEN SICH IM BLUT VON CHIRURGISCHEN PATIENTEN ABSOLUT SIGNIFIKANT

Abbildungsverzeichnis

- WENIGER CD8-POSITIVE T_{EMRA} CD57^{POS}CD28^{NEG}-ZELLEN UND CD8-POSITIVE T_{EMRA} CD57^{NEG}CD28^{POS}-ZELLEN SOWIE CD8-POSITIVE T_{EMRA} CD57^{POS}CD28^{POS}-ZELLEN NACHWEISEN ALS IN TAVI-PATIENTEN. IN DER RELATIVEN ZELLZAHL VON CD8-POSITIVE CD57^{POS}CD28^{NEG}-ZELLEN BESTÄTIGT SICH DIESE SIGNIFIKANT HÖHERE ZELLZAHL IN TAVI-PATIENTEN EBENFALLS FÜNF TAGE POST OPERATIONEM. IM VERLAUF WEISEN CHIRURGISCH BEHANDELTE PATIENTEN DREI MONATE NACH DEM EINGRIFF SIGNIFIKANT ABSOLUT MEHR CD8-POSITIVE T_{EMRA} CD57^{POS}CD28^{POS}-ZELLEN AUF ALS TAVI-PATIENTEN. DIESES SPIEGELT SICH AUCH IN DER RELATIVEN ZELLZAHL, GEMESSEN IN PROZENT AN CD8-POSITIVEN T_{EMRA} -ZELLEN WIEDER. PRE_1 (TAVI, N = 45, CHIRG. AKE, N =19), POST_1 TAG (TAVI, N = 23, CHIRG. AKE, N =16), POST_5 TAGE (TAVI, N = 15, CHIRG. AKE, N =10), POST_3 MONATE (TAVI, N = 20, CHIRG. AKE, N =14), POST_6 MONATE (TAVI, N = 20, CHIRG. AKE, N =13). 58
- ABB. 37: BETRACHTET MAN DIE CD4-POSITIVEN NAIVEN,- EFFEKTOR- UND ZENTRALEN GEDÄCHTNIS-T-ZELLEN, ZEIGT SICH EINEN TAG NACH DEM EINGRIFF BEI TAVI-PATIENTEN EIN SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED IN DER ABSOLUTEN ZELLZAHL. SO WEISEN CHIRURGISCH BEHANDELTE PATIENTEN EINEN TAG POST INTERVENTIONEM SIGNIFIKANT WENIGER NAIVE-, EFFEKTOR- UND ZENTRALE GEDÄCHTNIS-T-ZELLEN IM PERIPHEREN BLUT AUF. IN DER ZENTRALEN GEDÄCHTNISZELLPOPULATION ZEIGT SICH BEREITS VOR DEM EINGRIFF EINE SIGNIFIKANT HÖHERE RELATIVE ZELLZAHL, GEMESSEN IN PROZENT AN CD4-POSITIVEN ZELLEN, BEI PATIENTEN, DIE IM VERLAUF EINEN CHIRURGISCHEN AORTENKLAPPENERSATZ ERHALTEN. PRE_1 (TAVI, N = 45, CHIRG. AKE, N =19), POST_1 TAG (TAVI, N = 23, CHIRG. AKE, N =16), POST_5 TAGE (TAVI, N = 15, CHIRG. AKE, N =10), POST_3 MONATE (TAVI, N = 20, CHIRG. AKE, N =14), POST_6 MONATE (TAVI, N = 20, CHIRG. AKE, N =13). 60
- ABB. 38: DIE UNTERSUCHUNG CD4-POSITIVEN T_{EMRA} -SUBSETS ZEIGT EINEN STATISTISCH SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED IN CD4-POSITIVEN T_{EMRA} CD57^{NEG}CD28^{POS} FÜNF TAGE NACH DEM EINGRIFF UND DEM CD4-POSITIVEN T_{EMRA} CD57^{NEG}CD28^{NEG}-SUBSET EINEN TAG NACH DEM EINGRIFF. IN BEIDEN SUBSET-POPULATIONEN IST DIE ZELLZAHL IN TAVI-PATIENTEN HÖHER ALS IN CHIRURGISCHEN PATIENTEN. IN DEN CD4-POSITIVEN T_{EMRA} CD57^{NEG}CD28^{NEG}-ZELLEN SPIEGELT SICH DIESER UNTERSCHIED EBENFALLS IN DER RELATIVEN ZELLZAHL, GEMESSEN IN PROZENT AN CD4-POSITIVEN T_{EMRA} -ZELLEN, WIEDER. PRE_1 (TAVI, N = 45, CHIRG. AKE, N =19), POST_1 TAG (TAVI, N = 23, CHIRG. AKE, N =16), POST_5 TAGE (TAVI, N = 15, CHIRG. AKE, N =10), POST_3 MONATE (TAVI, N = 20, CHIRG. AKE, N =14), POST_6 MONATE (TAVI, N = 20, CHIRG. AKE, N =13). 62
- ABB. 39: VERGLEICHENDE DARSTELLUNG DES IL-8 LEVELS VON TAVI UND CHIRURGISCH-BEHANDELTEN PATIENTEN VOR DEM EINGRIFF SOWIE DREI- UND SECHS MONATE NACH DEM EINGRIFF. TAVI-PATIENTEN WEISEN PRÄOPERATIV IM VERGLEICH ZU CHIRURGISCH-BEHANDELTEN PATIENTEN SIGNIFIKANT MEHR IL-8 IM BLUT AUF. DER ERHÖHTE IL-8-WERT IN TAVI-PATIENTEN BLEIBT NOCH BIS SECHS MONATE NACH DEM EINGRIFF BESTEHEN, MANN WHITNEY U TEST, N = 10, *P < 0,05, **P < 0,01. 64
- ABB. 40: VERGLEICHENDE DARSTELLUNG DER INFLAMMATIONSMARKER IL-8 (OBEN LINKS), IL-6 (OBEN RECHTS) UND NT-PROBNP (UNTEN LINKS) IM BLUT VON TAVI-PATIENTEN MIT CHIRURGISCHEN PATIENTEN UND MIT KARDIOLOGISCHEN KONTROLLPATIENTEN. TAVI- PATIENTEN WEISEN PRÄOPERATIV SIGNIFIKANT MEHR IL-8, IL-6 UND NT-PROBNP AUF ALS CHIRURGISCH-BEHANDELTE PATIENTEN SOWIE ALS DIE KARDIOLOGISCHE KONTROLLGRUPPE..... 65
- ABB. 41: DARSTELLUNG EINES CD28-POSITIVEN T_{EMRA} -SUBSETS IM VERGLEICH ZU EINEM CD28-NEGATIVEN T_{EMRA} -SUBSET. DAS KOSTIMULATORISCHE OBERFLÄCHENMOLEKÜL CD28 SCHEINT EINEN EINFLUSS AUF DIE INFLAMMATORISCHE AKTIVITÄT DER T_{EMRA} -ZELLSUBSETS ZU HABEN, WONACH CD28-POSITIVE ZELLSUBSETS EINE SIGNIFIKANT HÖHERE PRODUKTION INFLAMMATORISCH-WIRKSAMER ZYTOKINE AUFWEISEN. EBENSO SCHEINT DER MIT T_{EMRA} -ZELLEN ASSOZIIERTE MARKER CD45RA EINEN EINFLUSS AUF DIE FUNKTIONALITÄT VON T_{EMRA} -SUBSETS ZU HABEN. SO ZEIGEN ZELLEN, DIE WENIGER CD45RA EXPRIMIEREN, EINE HÖHERE EXPRESSIONSRATE VON CD28 UND DEMNACH EIN HÖHERES INFLAMMATORISCHES POTENTIAL ALS ZELLEN MIT EINER HOHEN EXPRESSION VON CD45RA..... 66

Abbildungsverzeichnis

- ABB. 42: DARSTELLUNG DER DIFFERENZIERUNG VON NAIVEN T-ZELLEN ZU GEDÄCHTNISZELLEN UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER MARKER CD45RA UND CCR7. APC: ANTIGEN-PRÄSENTIERENDE ZELLE, T_{NAIVE}/T_N : NAIVE T-ZELLEN, T_{CM} : ZENTRALE GEDÄCHTNISZELLE, T_{EM} : EFFEKTOR-T-ZELLE, T_{EMRA} : TERMINAL DIFFERENZIERTER EFFEKTOR-T-ZELLE. ADAPTIERT NACH (GATTINONI AND RESTIFO 2013) 71
- ABB. 43: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINER HYPOTHETISCHEN T_{EMRA} -SUBSET-ENTWICKLUNG. DURCH DAS REEXPRIMIEREN VON CD45RA WERDEN AUS EFFEKTOR-GEDÄCHTNISZELLEN TERMINAL DIFFERENZIERTER T-ZELLEN, FÜR CCR7-NEGATIVE, T_{EMRA} -ZELLEN. HIER KÖNNTE SICH DER GEMEINSAME WEG DER ENTSTEHUNG DER T_{EMRA} -SUBPOPULATIONEN BEREITS AUFSPALTEN. ZUM EINEN IN EINE ZELLPOPULATION, DIE EINE HOHE EXPRESSIONSRATE VON CD45RA AUFWEIST UND ZUM ANDEREN IN EINE ZELLGRUPPE, DIE CD45RA NUR SCHWACH EXPRIMIERT. AUS DIESEN ZWEI POPULATIONEN KÖNNTEN SCHLIEßLICH ZWEI FUNKTIONELL UNTERSCHIEDLICHE T_{EMRA} -SUBPOPULATIONEN HERVORGEHEN. DIE ZELLEN, DIE CD45RA NUR SCHWACH EXPRIMIEREN KÖNNTEN SICH ZU EINEM FÜR CD28-POSITIVEM SUBSET ENTWICKELN, DAS EIN HOHES PROINFLAMMATORISCHES POTENTIAL AUFWEIST. IM GEGENSATZ DAZU KÖNNTEN CD45RA-HOCHPOSITIVE ZELLEN ZU CD28-NEGATIVEN ZELLEN MIT VERRINGERTER PROINFLAMMATORISCHER AKTIVITÄT REIFEN. 72

11. Tabellenverzeichnis

TAB. 1: DARSTELLUNG DER VERWENDETEN CHEMIKALIEN MIT JEWEILIGEN HERSTELLER ANGABEN	14
TAB. 2: ZUSAMMENSETZUNG DER IN DIESER ARBEIT VERWENDETEN GEBRAUCHSLÖSUNGEN	14
TAB. 3: VERWENDETE EINWEG-MATERIALIEN	15
TAB. 4: VERWENDETE GERÄTE	15
TAB. 5: VERWENDETE SOFTWARE	15
TAB. 6: DIE TABELLE ZEIGT DIE BENUTZTEN ANTIKÖRPER MIT IHREN JEWEILIGEN FLUOROCHROMEN, SPEZIFITÄTEN, KLONEN UND HERSTELLERN.....	16
TAB. 7: VERWENDETE STIMULATIONSREAGENZIEN	20
TAB. 8: FUNKTIONELLER VERSUCHSANSATZ	20
TAB. 9: OBERFLÄCHENMARKER VERSUCHSANSATZ	21
TAB. 10: VERSUCHSANSATZ : GEDÄCHTNIS- UND T _{EMRA} -ZELLEN	22
TAB. 11: ANZAHL, ALTER (MITTELWERT ± STANDARDABWEICHUNG) UND GESCHLECHT VON PATIENTEN MIT SCHWERER AORTENKLAPPENSTENOSE UND DER KARDIOLOGISCHEN KONTROLLGRUPPE.	42
TAB. 12: DARSTELLUNG VON PATIENTENZAHL, ALTER (MITTELWERT ± STANDARDFEHLER, SEM) UND GESCHLECHTER-VERHÄLTNIS VON TAVI-PATIENTEN UND KARDIOLOGISCHER KONTROLLGRUPPE.	45
TAB. 13: DARSTELLUNG DER PARAMETER LEUKOZYTENZAH/NL, CRP (MG/DL), NT PRO BNP (PG/ML), TNFA (PG/ML), IL-6 (PG/ML) UND IL-8 (PG/ML) VON AORTENKLAPPENSTENOSE-PATIENTEN, DIE IM ANSCHLUSS EINE TAVI ERHIELTEN (N = 56) UND DER KARDIOVASKULÄREN KONTROLLGRUPPE (N = 35). MANN-WHITNEY-U-TEST, SIGNIFIKANZ: *P = < 0,05, **P = > 0,01, ***P = > 0,001, ROUTINELABORPARAMETER, MEDIAN.	45
TAB. 14: DARSTELLUNG DER ANZAHL DER ZUM JEWEILIGEN ZEITPUNKT MITEINANDER VERGLICHENEN PATIENTEN.....	52

12. Supplemente

Supplemente zu den Ergebnissen 5.2.1.1

S 1: Vergleich funktioneller und phänotypischer Marker auf CD8 T_{EMRA} CD57^{pos}CD28^{neg}-Zellen zwischen CMV-positiven (n = 10) und CMV-negativen (n = 8) Spendern, Mann Whitney U Test, p-Wert: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001.

	CMV pos CD8 T _{EMRA} CD57 ^{pos} CD28 ^{neg}	CMV neg CD8 T _{EMRA} CD57 ^{pos} CD28 ^{neg}	p-Wert
INF γ	22,67	39,38	ns
TNF α	25,10	50,70	ns
IL-2	1,215	3,515	*
CD107a	19,88	26,25	ns
CD154	1,385	2,385	ns
INF γ /TNF α /CD107a	8,978	16,57	ns
INF γ /TNF α /IL-2	0,6505	2,163	*
INF γ /TNF α /CD107a /IL-2	0,1710	1,262	**
PD-1	20,77	25,47	ns
CCR5	37,52	25,02	ns
PD-1/CCR5	12,15	6,70	ns

S 2: Vergleich funktioneller und phänotypischer Marker auf CD8 T_{EMRA} CD57^{neg}CD28^{neg}-Zellen zwischen CMV-positiven (n = 10) und CMV-negativen (n = 8) Spendern, Mann Whitney U Test, p-Wert: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001.

	CMV pos CD8 T _{EMRA} CD57 ^{neg} CD28 ^{neg}	CMV neg CD8 T _{EMRA} CD57 ^{neg} CD28 ^{neg}	p-Wert
INFγ	42,74	39,18	ns
TNFα	37,69	42,56	ns
IL-2	4,890	6,830	ns
CD107a	40,88	35,78	ns
CD154	1,275	1,640	ns
INFγ / TNFα / CD107a	12,63	20,59	ns
INFγ / TNFα / IL-2	1,470	4,549	**
INFγ / TNFα / CD107a / IL-2	0,4785	2,375	***
PD-1	28,98	18,80	ns
CCR5	44,77	19,80	*
PD-1/CCR5	22,52	5,16	ns

S 3: Vergleich funktioneller und phänotypischer Marker auf CD8 T_{EMRA} CD57^{neg}CD28^{pos}-Zellen zwischen CMV-positiven (n = 10) und CMV-negativen (n = 8) Spendern, Mann Whitney U Test, p-Wert: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001.

	CMV pos CD8 T _{EMRA} CD57 ^{neg} CD28 ^{pos}	CMV neg CD8 T _{EMRA} CD57 ^{neg} CD28 ^{pos}	p-Wert
INFγ	45,70	46,70	ns
TNFα	52,38	54,64	ns
IL-2	14,81	21,85	ns
CD107a	47,20	44,24	ns
CD154	2,595	2,775	ns
INFγ/TNFα/CD107a	21,38	23,32	ns
INFγ/TNFα/IL-2	6,155	12,24	ns
INFγ/TNFα/CD107a/IL-2	3,385	6,143	ns
PD-1	43,83	34,49	ns
CCR5	71,08	59,82	ns
PD-1/CCR5	33,30	18,75	ns

S 4: Vergleich funktioneller und phänotypischer Marker auf CD8 T_{EMRA} CD57^{pos}CD28^{pos} Zellen zwischen CMV positiven (n =10) und CMV-negativen (n = 8) Spendern, Mann Whitney U Test, p-Wert: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001.

	CMV pos CD8 T _{EMRA} CD57 ^{pos} CD28 ^{pos}	CMV neg CD8 T _{EMRA} CD57 ^{pos} CD28 ^{pos}	p-Wert
INFγ	52,38	72,15	ns
TNFα	52,53	74,95	ns
IL-2	9,395	18,88	*
CD107a	56,78	52,58	ns
CD154	2,360	2,120	ns
INFγ/TNFα/CD107a	28,29	34,71	ns
INFγ/TNFα/IL-2	6,395	16,04	*
INFγ/TNFα/CD107a/IL-2	3,013	6,907	**
PD-1	45,82	39,69	ns
CCR5	81,18	71,29	ns
PD-1/CCR5	42,18	26,96	ns

S 5: Vergleich funktioneller und phänotypischer Marker auf CD8 T_{EMRA} Zellen zwischen CMV-positiven (n =10) und CMV-negativen (n = 8) Spendern, Mann Whitney U Test, p-Wert: * < 0,05, ** < 0,01,*** < 0,001.

	CMV pos	CMV neg	p-Wert
	CD8 T_{EMRA}	CD8 T_{EMRA}	
INFγ	37,23	42,14	ns
TNFα	37,54	52,74	ns
IL-2	5,935	10,78	*
CD107a	33,86	31,20	ns
CD154	1,620	2,100	ns
INFγ/TNFα/CD107a	14,53	15,85	ns
INFγ/TNFα/IL-2	2,760	6,468	**
INFγ/TNFα/CD107a/IL-2	1,213	2,734	*
PD-1	27,55	26,01	ns
CCR5	49,12	35,23	ns
PD-1/CCR5	10,90	11,01	ns

S 6: Vergleich funktioneller und phänotypischer Marker auf CD8-positiven Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}) zwischen CMV-positiven (n =10) und CMV-negativen (n = 8) Spendern, Mann Whitney U Test, p-Wert: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001.

	CMV pos CD8 T _{EM}	CMV neg CD8 T _{EM}	p
INFγ	36,73	52,68	ns
TNFα	47,14	67,18	ns
IL-2	14,96	23,14	*
CD107a	52,17	51,87	ns
CD154	3,655	4,195	ns
INFγ/TNFα/CD107a	20,78	17,82	ns
INFγ/TNFα/IL-2	7,910	10,84	*
INFγ/TNFα/CD107a/IL-2	3,963	4,963	ns
PD-1	52,34	46,32	ns
CCR5	76,83	76,86	ns
PD-1/CCR5	34,31	37,19	ns

S 7: Vergleich funktioneller und phänotypischer Marker auf CD8-positiver Zentralen-Gedächtniszellen (T_{CM}) zwischen CMV-positiven (n =10) und CMV-negativen (n = 8) Spendern, Mann Whitney U Test, p-Wert: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001.

	CMV pos	CMV neg	p-Wert
	CD8 T_{CM}	CD8 T_{CM}	
INFγ	31,67	39,51	ns
TNFα	54,59	59,66	ns
IL-2	46,25	55,09	ns
CD107a	32,71	28,26	ns
CD154	13,75	12,40	ns
INFγ/TNFα/CD107a	11,67	10,38	ns
INFγ/TNFα/IL-2	15,55	18,43	ns
INFγ/TNFα/CD107a/IL-2	4,384	6,182	ns
PD-1	40,22	31,51	ns
CCR5	23,48	24,56	ns
PD-1/CCR5	12,41	14,16	ns

S 8: Vergleich funktioneller und phänotypischer Marker auf CD8-positiven Naiven-T-Zellen (T_{naive}) zwischen CMV-positiven (n =10) und CMV-negativen (n = 8) Spendern, Mann Whitney U Test, p-Wert: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001.

	CMV pos CD8 T_{naive}	CMVneg CD8 T_{naive}	p
INFγ	3,30	3,38	ns
TNFα	4,92	7,13	ns
IL-2	3,79	3,78	ns
CD107a	28,10	24,86	ns
CD154	1,42	1,23	ns
INFγ/TNFα/CD107a	0,49	0,42	ns
INFγ/TNFα/IL-2	0,52	0,54	ns
INFγ/TNFα/CD107a/IL-2	0,12	0,14	ns
PD-1	3,87	2,10	ns
CCR5	2,64	2,61	ns
PD-1/CCR5	0,55	0,55	ns

S 9: Vergleich funktioneller und phänotypischer Marker auf CD4-positiven T_{EMRA} CD57^{pos}CD28^{neg}-Zellen zwischen CMV-positiven (n = 10) und CMV-negativen (n = 8) Spendern, Mann Whitney U Test, p-Wert: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001.

	CMV pos CD4 T _{EMRA} CD57 ^{pos} CD28 ^{neg}	CMV neg CD4 T _{EMRA} CD57 ^{pos} CD28 ^{neg}	p-Wert
INFγ	21,68	35,87	ns
TNFα	23,20	54,97	ns
IL-2	0,48	1,34	**
CD107a	14,78	32,86	*
CD154	2,59	4,34	ns
INFγ/TNFα/CD107a	5,47	17,39	*
INFγ/TNFα/IL-2	0,23	0,83	**
INFγ/TNFα/CD107a/IL-2	0,09	0,52	**
PD-1	22,81	48,94	ns
CCR5	36,02	6,16	*
PD-1/CCR5	8,70	2,46	ns

S 10: Vergleich funktioneller und phänotypischer Marker auf CD4-positiven T_{EMRA} CD57^{neg}CD28^{neg}-Zellen zwischen CMV-positiven (n = 10) und CMV-negativen (n = 8) Spendern, Mann Whitney U Test, p-Wert: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001.

	CMV pos CD4 T _{EMRA} CD57 ^{neg} CD28 ^{neg}	CMV neg CD4 T _{EMRA} CD57 ^{neg} CD28 ^{neg}	p-Wert
INFγ	27,92	36,44	ns
TNFα	25,92	43,79	ns
IL-2	1,255	3,285	*
CD107a	29,10	37,46	ns
CD154	3,180	4,830	ns
INFγ/TNFα/CD107a	7,186	19,97	ns
INFγ/TNFα/IL-2	0,3130	2,721	**
INFγ/TNFα/CD107a/IL-2	0,1100	1,823	**
PD-1	29,17	45,26	ns
CCR5	36,43	22,62	ns
PD-1/CCR5	1,96	13,40	ns

S 11: Vergleich funktioneller und phänotypischer Marker auf CD4-positiven T_{EMRA} CD57^{neg}CD28^{pos}-Zellen zwischen CMV-positiven (n =10) und CMV-negativen (n = 8) Spendern, Mann Whitney U Test, p-Wert: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001.

	CMV pos CD4 T _{EMRA} CD57 ^{neg} CD28 ^{pos}	CMV neg CD4 T _{EMRA} CD57 ^{neg} CD28 ^{pos}	p-Wert
INFγ	12,57	29,93	**
TNFα	24,73	44,87	*
IL-2	6,42	12,17	ns
CD107a	27,17	34,21	ns
CD154	14,29	19,04	ns
INFγ/TNFα/CD107a	4,217	14,95	ns
INFγ/TNFα/IL-2	1,70	5,69	*
INFγ/TNFα/CD107a/IL-2	0,50	2,10	*
PD-1	15,35	22,35	ns
CCR5	11,58	19,28	ns
PD-1/CCR5	2,78	4,35	ns

S 12: Vergleich funktioneller und phänotypischer Marker auf CD4-positiven T_{EMRA} CD57^{pos} CD28^{pos}-Zellen zwischen CMV-positiven (n = 10) und CMV-negativen (n = 8) Spendern, Mann Whitney U Test, p-Wert: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001.

	CMV pos CD4 T _{EMRA} CD57 ^{pos} CD28 ^{pos}	CMVneg CD4 T _{EMRA} CD57 ^{pos} CD28 ^{pos}	p-Wert
INFγ	25,74	51,22	*
TNFα	27,64	61,21	*
IL-2	3,25	13,31	*
CD107a	36,23	43,47	ns
CD154	7,565	7,48	ns
INFγ/TNFα/CD107a	12,93	29,12	**
INFγ/TNFα/IL-2	1,83	8,82	*
INFγ/TNFα/CD107a/IL-2	0,85	3,78	*
PD-1	35,61	39,29	ns
CCR5	51,11	33,23	*
PD-1/CCR5	22,50	13,89	ns

S 13: Vergleich funktioneller und phänotypischer Marker auf CD4-positiven T_{EMRA}-Zellen zwischen CMV-positiven (n =10) und CMV-negativen (n = 8) Spendern, Mann Whitney U Test, p-Wert: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001.

	CMV pos CD4 T _{EMRA}	CMV neg CD4 T _{EMRA}	p
INFγ	21,65	31,01	ns
TNFα	24,63	48,39	ns
IL-2	2,955	8,845	*
CD107a	26,46	31,22	ns
CD154	7,905	13,67	ns
INFγ/TNFα/CD107a	7,229	16,19	ns
INFγ/TNFα/IL-2	0,9600	4,746	**
INFγ/TNFα/CD107a/IL-2	0,4200	1,914	**
PD-1	17,42	23,26	ns
CCR5	29,80	19,53	ns
PD-1/CCR5	5,25	4,78	ns

S 14: Vergleich funktioneller und phänotypischer Marker auf CD4-positiven Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}) zwischen CMV-positiven (n =10) und CMV-negativen (n = 8) Spendern, Mann Whitney U Test, p-Wert: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001.

	CMV pos	CMV neg	
	CD4 T_{EM}	CD4 T_{EM}	p
INFγ	18,57	24,40	ns
TNFα	31,95	60,02	ns
IL-2	12,67	29,54	ns
CD107a	27,02	32,43	ns
CD154	15,90	30,20	*
INFγ/TNFα/CD107a	3,164	6,30	ns
INFγ/TNFα/IL-2	5,044	8,36	ns
INFγ/TNFα/CD107a/IL-2	0,56	1,16	ns
PD-1	44,59	46,43	ns
CCR5	39,88	34,64	ns
PD-1/CCR5	18,76	19,42	ns

S 15: Vergleich funktioneller und phänotypischer Marker auf CD4-positiven zentralen Gedächtniszellen (T_{CM}) zwischen CMV-positiven (n =10) und CMV-negativen (n = 8) Spendern, Mann Whitney U Test, p-Wert: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001

	CMV pos CD4 T _{CM}	CMVneg CD4 T _{CM}	p-Wert
INFγ	4,27	9,78	ns
TNFα	40,91	53,43	ns
IL-2	22,38	34,45	ns
CD107a	17,99	27,10	ns
CD154	34,12	48,18	ns
INFγ/TNFα/CD107a	0,50	0,67	ns
INFγ/TNFα/IL-2	2,09	4,86	ns
INFγ/TNFα/CD107a/IL-2	0,27	0,33	ns
PD-1	22,86	26,29	ns
CCR5	7,02	7,41	ns
PD-1/CCR5	2,48	2,65	ns

S 16: Vergleich funktioneller und phänotypischer Marker auf CD4-positiven naiven-T-Zellen (T_{naive}) zwischen CMV-positiven (n =10) und CMV-negativen (n = 8) Spendern, Mann Whitney U Test, p-Wert: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001.

	CMV pos CD4 T _{naive}	CMV neg CD4 T _{naive}	p-Wert
INFγ	0,58	0,68	ns
TNFα	8,86	6,61	ns
IL-2	5,63	4,675	ns
CD107a	26,17	24,60	ns
CD154	23,87	17,98	ns
INFγ/TNFα/CD107a	0,037	0,09	ns
INFγ/TNFα/IL-2	0,10	0,14	ns
INFγ/TNFα/CD107a/IL-2	0,01	0,029	ns
PD-1	1,19	1,43	ns
CCR5	1,07	1,13	ns
PD-1/CCR5	0,09	0,12	ns

Ergebnisse von 5.3: Untersuchung von T-Gedächtniszellen, T_{EMRA}-Zellen und deren Subsets zur Charakterisierung immunologisch-assoziiierter Mechanismen im Kontext der schweren Aortenklappenstenose

S 17: Vergleichende immunologische Untersuchung von Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose (n=45), die im Verlauf eine TAVI erhielten mit einer Kardiologischen Kontrollgruppe (n=35) vor dem Eingriff. Darstellung der absoluten Zellzahlen / nl von Leukozyten, Lymphozyten und CD4 und CD8 T-Gedächtniszellen, Statistischer Test: Mann Whitney U Test: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001, Median.

Zellen / nl	TAVI-Patient vor dem Eingriff	p	Kontrolle
Leukozyten	7,560	*	6,220
Lymphozyten	1,645	ns	1,606
T Zellen	1,216	ns	1,148
CD4 Zellen	0,784	ns	0,799
CD4 T _{naive}	0,219	ns	0,235
CD4 T _{CM}	0,305	ns	0,292
CD4 T _{EM}	0,158	ns	0,200
CD4 T _{EMRA}	0,006	ns	0,013
CD8 Zellen	0,347	ns	0,353
CD8 T _{naive}	0,038	ns	0,041
CD8 T _{CM}	0,033	ns	0,024
CD8 T _{EM}	0,080	ns	0,089
CD8 T _{EMRA}	0,121	ns	0,106

S 18: Vergleichende immunologische Untersuchung von Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose (n=45), die im Verlauf eine TAVI erhielten mit einer Kardiologischen Kontrollgruppe (n=35) vor dem Eingriff. Darstellung der relativen Konzentration von Leukozyten, Lymphozyten und CD4 und CD8 T-Gedächtniszellen gemessen an der Mutterkonzentration, Statistischer Test: Man Whitney U Test: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001, Median.

%	TAVI-Patient vor dem Eingriff	p	Kontrolle
Lymphozyten	22,73	ns	26,09
T Zellen	71,49	ns	71,77
CD4 Zellen	65,75	ns	70,92
CD4 T_{naive}	29,15	ns	30,67
CD4 T_{CM}	44,41	ns	40,64
CD4 T_{EM}	20,97	ns	26,67
CD4 T_{EMRA}	1,006	ns	1,58
CD8 Zellen	27,45	ns	23,50
CD8 T_{naive}	14,82	ns	15,43
CD8 T_{CM}	9,779	ns	7,56
CD8 T_{EM}	29,93	ns	33,77
CD8 T_{EMRA}	39,83	ns	38,66

S 19: Vergleichende immunologische Untersuchung von Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose (n=45), die im Verlauf eine TAVI erhielten mit einer Kardiologischen Kontrollgruppe (n=35) vor dem Eingriff. Darstellung der absoluten Zellzahlen / nl (oben) und der relativen Anzahl (unten) der CD8-positiven T_{EMRA}-Subsets, Statistischer Test: Man Whitney U Test: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001, Median.

Zellen / nl	TAVI-Patient vor dem Eingriff	p	Kontrolle
CD8 T_{EMRA} CD57+CD28-	0,090	ns	0,077
CD8 T_{EMRA} CD57+CD28+	0,004	ns	0,004
CD8 T_{EMRA} CD57-CD28+	0,012	ns	0,008
CD8 T_{EMRA} CD57-CD28-	0,016	ns	0,014

% von CD8 T _{EMRA}	TAVI-Patient vor dem Eingriff	p	Kontrolle
CD8 T_{EMRA} CD57+CD28-	66,67	ns	61,52
CD8 T_{EMRA} CD57+CD28+	3,916	ns	3,713
CD8 T_{EMRA} CD57-CD28+	11,69	ns	9,470
CD8 T_{EMRA} CD57-CD28-	15,58	ns	15,56

S 20: Vergleichende immunologische Untersuchung von Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose (n=45), die im Verlauf eine TAVI erhielten mit einer Kardiologischen Kontrollgruppe (n=35) vor dem Eingriff. Darstellung der absoluten Zellzahlen / nl (oben) und der relativen Anzahl (unten) der CD8-positiven TEMRA-Subsets, Statistischer Test: Man Whitney U Test: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001, Median.

Zellen / nl	TAVI-Patient vor dem Eingriff	p	Kontrolle
CD4 TEMRA CD57+CD28-	0,001	ns	0,001
CD4 TEMRA CD57+CD28+	0,001	ns	0,001
CD4 TEMRA CD57-CD28+	0,004	ns	0,007
CD4 TEMRA CD57-CD28-	0,000	ns	0,001

% von CD4 TEMRA	TAVI-Patient vor dem Eingriff	p	Kontrolle
CD4 TEMRA CD57+CD28-	7,143	ns	10,00
CD4 TEMRA CD57+CD28+	11,11	ns	5,556
CD4 TEMRA CD57-CD28+	66,67	ns	66,67
CD4 TEMRA CD57-CD28-	0,00	ns	1,961

Ergebnisse von 5.4: Post interventionelle immunologische Charakterisierung von Aortenklappenstenose Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten

TAVI-Patienten

S 21: Zeitlicher Verlauf von Leukozyten, Lymphozyten und CD4-/CD8-positiven Gedächtniszellen. Absolute Zellen pro Nanoliter, einen Tag nach dem Eingriff (post_1d), fünf Tage nach dem Eingriff (post_5d) sowie drei (post_3m) und sechs Monate nach dem Eingriff (post_6m) in TAVI Patienten. Die Daten sind jeweils zu den entsprechenden Prä-Werten (pre_1) dargestellt. Statistische Auswertung mit gepaartem Wilcoxon Rangsummen Test, p-Wert: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001.

Zellen / nl	pre_1		post_1d	pre_1		post_5d	pre_1		post_3m	pre_1		post_6m
Leukozyten	7,350	***	9,880	7,350	ns	8,440	7,455	ns	7,855	7,355	ns	7,045
Lymphozyten	1,645	***	1,129	1,645	ns	1,382	1,658	*	1,381	1,669	*	1,462
T Zellen	1,101	***	0,633	1,101	ns	1,026	1,086	*	0,937	1,156	*	0,953
CD4 Zellen	0,712	***	0,372	0,634	ns	0,571	0,716	*	0,630	0,737	*	0,656
CD4 T_{naive}	0,150	**	0,092	0,159	ns	0,158	0,200	ns	0,189	0,217	ns	0,238
CD4 T_{CM}	0,293	**	0,168	0,252	ns	0,205	0,302	ns	0,259	0,374	*	0,292
CD4 T_{EM}	0,140	***	0,089	0,140	ns	0,136	0,149	ns	0,124	0,160	*	0,101
CD4 T_{EMRA}	0,006	*	0,005	0,004	ns	0,003	0,009	ns	0,009	0,011	ns	0,007
CD8 Zellen	0,354	***	0,212	0,373	ns	0,307	0,245	*	0,252	0,291	ns	0,199
CD8 T_{naive}	0,038	*	0,028	0,038	ns	0,037	0,036	ns	0,052	0,033	ns	0,042
CD8 T_{CM}	0,027	**	0,016	0,030	ns	0,023	0,026	ns	0,022	0,031	*	0,028
CD8 T_{EM}	0,089	***	0,059	0,091	ns	0,063	0,064	ns	0,063	0,066	*	0,046
CD8 T_{EMRA}	0,163	***	0,092	0,163	*	0,110	0,094	ns	0,089	0,099	ns	0,098
	n = 23			n = 15			n = 20			n = 20		

S 22: Zeitlicher Verlauf von Lymphozyten und CD4-/CD8-positiven Gedächtniszellen in Prozent von der jeweiligen Mutterkonzentration, Lymphozyten in % von Leukozyten, T-Zellen in % von Lymphozyten, CD4 Zellen in % von T-Zellen, CD4 / CD8 T_{naive}, T_{EM}, T_{CM}, T_{EMRA} in % von CD4 / CD8 Zellen. Blutuntersuchung einen Tag nach dem Eingriff (post_1d), fünf Tage nach dem Eingriff (post_5d) sowie drei (post_3m) und sechs Monate nach dem Eingriff (post_6m) in TAVI Patienten. Die Daten sind jeweils zu den entsprechenden Prä-Werten (pre_1) dargestellt. Statistische Auswertung mit gepartem Wilcoxon Rangsummen Test, p-Wert: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001

%	pre_1		post_1d		pre_1		post_5d		pre_1		post_3m		pre_1		post_6m	
Lymphozyten	22,73	***	11,76	22,73	**	17,70	22,44	ns	20,12	24,00	ns	20,29				
T Zellen	71,34	ns	69,04	75,09	ns	75,45	70,61	ns	67,52	71,11	ns	68,60				
CD4 Zellen	64,42	ns	63,45	63,84	*	63,61	68,18	ns	67,54	71,08	ns	72,72				
CD4 T_{naive}	26,39	ns	27,50	29,15	ns	29,83	28,40	ns	30,05	29,55	ns	33,42				
CD4 T_{CM}	48,59	ns	48,74	45,00	ns	42,65	49,61	ns	43,63	47,18	ns	44,52				
CD4 T_{EM}	22,17	ns	24,31	24,06	ns	24,25	20,42	ns	20,26	20,42	ns	17,37				
CD4 T_{EMRA}	0,98	ns	0,80	1,25	ns	0,77	1,20	ns	1,03	1,14	ns	1,02				
CD8 Zellen	30,93	ns	32,99	33,65	ns	31,97	23,47	ns	23,99	23,26	ns	23,20				
CD8 T_{naive}	15,09	ns	13,39	15,09	*	15,84	15,79	**	21,33	14,69	ns	16,57				
CD8 T_{CM}	9,30	ns	8,50	7,17	ns	7,80	10,01	ns	10,09	11,42	ns	11,53				
CD8 T_{EM}	29,85	ns	26,71	25,68	ns	25,00	30,01	ns	25,33	29,52	*	26,01				
CD8 T_{EMRA}	44,17	ns	48,72	45,72	ns	35,40	40,98	ns	41,30	42,00	ns	43,78				
	n = 23			n = 15			n = 20			n = 20						

S23: Zeitlicher Verlauf von CD8 T_{EMRA}-Subpopulationen. Absolute Zellen pro Nanoliter, einen Tag nach dem Eingriff (post_1d), fünf Tage nach dem Eingriff (post_5d) sowie drei (post_3m) und sechs Monate nach dem Eingriff (post_6m) TAVI Patienten. Die Daten sind jeweils zu den entsprechenden Prä-Werten (pre_1) dargestellt. Statistische Auswertung mit gepaartem Wilcoxon Rangsummen Test, p-Wert: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001

Zellen / nl	pre_1		post_1d		pre_1		post_5d		pre_1		post_3m		pre_1		post_6m	
CD8 T_{EMRA} CD57+CD28-	0,107	***	0,065	0,107	ns	0,079	0,062	ns	0,059	0,074	ns	0,060				
CD8 T_{EMRA} CD57+CD28+	0,005	**	0,003	0,005	ns	0,004	0,004	ns	0,003	0,004	ns	0,003				
CD8 T_{EMRA} CD57-CD28+	0,012	***	0,010	0,011	ns	0,009	0,012	ns	0,010	0,011	ns	0,010				
CD8 T_{EMRA} CD57-CD28-	0,023	***	0,012	0,029	ns	0,020	0,015	ns	0,015	0,020	ns	0,015				
	n = 23		n = 15		n = 20		n = 20									

% von CD8 T _{EMRA}	pre_1		post_1d		pre_1		post_5d		pre_1		post_3m		pre_1		post_6m	
CD8 T_{EMRA} CD57+CD28-	66,67	ns	69,23	73,43	ns	69,98	66,67	ns	64,66	64,29	ns	65,40				
CD8 T_{EMRA} CD57+CD28+	4,225	ns	4,286	3,167	ns	3,738	4,196	ns	5,429	3,822	ns	5,641				
CD8 T_{EMRA} CD57-CD28+	8,517	ns	9,000	6,236	ns	8,411	10,10	ns	10,64	8,425	ns	9,624				
CD8 T_{EMRA} CD57-CD28-	16,23	ns	15,09	14,78	ns	15,10	16,37	ns	18,58	19,77	ns	15,74				
	n = 23		n = 15		n = 20		n = 20									

S 24: Zeitlicher Verlauf von CD4 T_{EMRA}-Subpopulationen. Absolute Zellen pro Nanoliter, einen Tag nach dem Eingriff (post_1d), fünf Tage nach dem Eingriff (post_5d) sowie drei (post_3m) und sechs Monate nach dem Eingriff (post_6m) in TAVI-Patienten. Die Daten sind jeweils zu den entsprechenden Prä-Werten (pre_1) dargestellt. Statistische Auswertung mit gepaartem Wilcoxon Rangsummen Test, p-Wert: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001.

Zellen / nl	pre_1		post_1d		pre_1		post_5d		pre_1		post_3m		pre_1		post_6m	
CD4 T_{EMRA} CD57+CD28-	0,000	ns	0,000	0,001	ns	0,000	0,001	ns	0,001	0,001	ns	0,001	0,001	ns	0,001	
CD4 T_{EMRA} CD57+CD28+	0,001	ns	0,001	0,001	ns	0,001	0,001	ns	0,001	0,001	ns	0,001	0,001	ns	0,001	
CD4 T_{EMRA} CD57-CD28+	0,003	*	0,002	0,002	ns	0,001	0,004	ns	0,003	0,003	ns	0,003	0,003	ns	0,003	
CD4 T_{EMRA} CD57-CD28-	0,000	ns	0,000	0,0	ns	0,000	0,000	ns	0,000	0,001	ns	0,000	0,001	ns	0,000	
	n = 23			n = 15			n = 20			n = 20						

% von CD4 T _{EMRA}	pre_1		post_1d		pre_1		post_5d		pre_1		post_3m		pre_1		post_6m	
CD4 T_{EMRA} CD57+CD28-	0,00	ns	0,00	19,57	ns	0,00	11,81	ns	8,76	12,70	ns	18,33				
CD4 T_{EMRA} CD57+CD28+	11,11	ns	5,56	4,55	ns	4,55	8,89	ns	10,90	8,67	ns	13,15				
CD4 T_{EMRA} CD57-CD28+	66,67	*	45,46	50,00	ns	40,00	64,58	ns	50,00	63,33	ns	53,95				
CD4 T_{EMRA} CD57-CD28-	0,00	ns	0,0	0,00	ns	0,00	0,00	ns	0,00	0,30	ns	0,00				
	n = 23			n = 15			n = 20			n = 20						

Chirurgischer Aortenklappenersatz

S 25: Zeitlicher Verlauf von Leukozyten, Lymphozyten und CD4-/CD8-positiven Gedächtniszellen. Absolute Zellen pro Nanoliter, einen Tag nach dem Eingriff (post_1d), fünf Tage nach dem Eingriff (post_5d) sowie drei (post_3m) und sechs Monate nach dem Eingriff (post_6m) in chirurgisch-behandelten Patienten. Die Daten sind jeweils zu den entsprechenden Prä-Werten (pre_1) dargestellt. Statistische Auswertung mit gepaartem Wilcoxon Rangsummen Test, p-Wert: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001.

Zellen / nl	pre_1		post_1d		pre_1		post_5d		pre_1		post_3m		pre_1		post_6m	
Leukozyten	7,990	***	13,30		7,960	ns	9,205		8,140	ns	6,830		8,140	ns	7,350	
Lymphozyten	2,176	***	0,711		2,165	**	1,485		2,205	ns	1,717		2,205	ns	1,843	
T Zellen	1,510	***	0,339		1,507	*	0,954		1,513	ns	1,171		1,566	ns	1,264	
CD4 Zellen	1,023	***	0,233		1,074	*	0,752		1,059	*	0,741		1,096	ns	0,814	
CD4 T_{naive}	0,300	***	0,069		0,311	ns	0,251		0,230	ns	0,223		0,311	ns	0,281	
CD4 T_{CM}	0,488	***	0,110		0,493	**	0,355		0,493	*	0,346		0,540	*	0,369	
CD4 T_{EM}	0,181	***	0,037		0,172	*	0,141		0,207	ns	0,173		0,198	ns	0,202	
CD4 T_{EMRA}	0,006	***	0,002		0,007	ns	0,008		0,006	ns	0,008		0,006	ns	0,006	
CD8 Zellen	0,449	***	0,111		0,337	**	0,205		0,398	ns	0,389		0,398	ns	0,344	
CD8 T_{naive}	0,078	***	0,028		0,081	*	0,054		0,078	ns	0,057		0,078	ns	0,055	
CD8 T_{CM}	0,077	***	0,013		0,075	**	0,031		0,079	ns	0,051		0,077	ns	0,050	
CD8 T_{EM}	0,113	***	0,023		0,068	**	0,055		0,121	*	0,106		0,098	ns	0,093	
CD8 T_{EMRA}	0,100	***	0,032		0,103	**	0,069		0,103	ns	0,107		0,103	ns	0,074	
	n = 15			n = 10			n = 12			n = 12						

S 26: Zeitlicher Verlauf von Lymphozyten und CD4-/CD8-positiven Gedächtniszellen in Prozent von der jeweiligen Mutterkonzentration. Lymphozyten in % von Leukozyten, T Zellen in % von Lymphozyten, CD4-positive Zellen in % von T-Zellen, CD4- / CD8-positiv T_{naive}-, T_{EM}, T_{CM}, T_{EMRA} in % von CD4- / CD8-positiven Zellen. Blutuntersuchung einen Tag nach dem Eingriff (post_1d), fünf Tage nach dem Eingriff (post_5d) sowie drei (post_3m) und sechs Monate nach dem Eingriff (post_6m) in chirurgisch-behandelten Patienten. Die Daten sind jeweils zu den entsprechenden Prä-Werten (pre_1) dargestellt. Statistische Auswertung mit gepaarten Wilcoxon Rangsummen Test, p-Wert: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001.

%	pre_1		post_1d		pre_1		post_5d		pre_1		post_3m		pre_1		post_6m	
Lymphozyten	29,26	***	5,203	27,95	**	15,66	28,97	ns	28,68	27,95	ns	26,13				
T Zellen	67,61	***	49,51	67,73	*	69,08	69,54	ns	69,94	68,52	ns	67,25				
CD4 Zellen	67,32	*	59,80	68,57	**	73,14	66,54	ns	64,63	67,44	ns	67,45				
CD4 T_{naive}	25,45	ns	34,24	24,41	*	30,71	21,87	ns	28,93	24,41	ns	28,99				
CD4 T_{CM}	48,37	ns	48,40	52,10	*	46,84	49,16	ns	47,42	51,33	ns	46,66				
CD4 T_{EM}	18,94	ns	21,85	16,10	ns	17,87	21,47	ns	20,56	19,85	ns	22,17				
CD4 T_{EMRA}	0,70	ns	0,84	0,83	ns	1,18	0,60	ns	1,24	0,60	ns	0,61				
CD8 Zellen	28,16	*	33,45	26,23	**	22,18	28,10	ns	29,36	27,55	ns	27,21				
CD8 T_{naive}	26,97	*	29,17	32,90	ns	29,03	15,93	ns	21,58	21,64	ns	23,61				
CD8 T_{CM}	16,67	**	12,90	16,62	ns	13,38	19,05	ns	19,10	19,09	ns	18,60				
CD8 T_{EM}	28,94	*	25,00	23,11	ns	20,88	32,53	ns	28,03	26,98	ns	29,54				
CD8 T_{EMRA}	21,74	***	26,00	26,32	ns	28,90	21,61	ns	26,94	21,61	ns	22,72				
	n = 15			n = 10			n = 12			n = 12						

S 27: Zeitlicher Verlauf von CD8-positiven T_{EMRA}-Subpopulationen. Absolute Zellen pro Nanoliter, einen Tag nach dem Eingriff (post_1d), fünf Tage nach dem Eingriff (post_5d) sowie drei (post_3m) und sechs Monate nach dem Eingriff (post_6m) in chirurgisch-behandelten Patienten. Die Daten sind jeweils zu den entsprechenden Prä-Werten (pre_1) dargestellt. Statistische Auswertung mit gepaartem Wilcoxon Rangsummen Test, p-Wert: * < 0,05, ** < 0,01,*** < 0,001

124

Zellen / nl	pre_1		post_1d		pre_1		post_5d		pre_1		post_3m		pre_1		post_6m	
CD8 T_{EMRA} CD57+CD28-	0,051	**	0,020	0,052	*	0,032	0,052	ns	0,066	0,052	ns	0,035				
CD8 T_{EMRA} CD57+CD28+	0,004	**	0,001	0,006	ns	0,005	0,006	ns	0,006	0,006	ns	0,005				
CD8 T_{EMRA} CD57-CD28+	0,017	***	0,004	0,013	ns	0,011	0,015	ns	0,015	0,015	ns	0,017				
CD8 T_{EMRA} CD57-CD28-	0,011	***	0,004	0,016	*	0,008	0,016	ns	0,020	0,014	ns	0,015				
	n = 15			n = 10			n = 12			n = 12						

%	pre_1		post_1d		pre_1		post_5d		pre_1		post_3m		pre_1		post_6m	
CD8 T_{EMRA} CD57+CD28-	46,88	**	60,61	49,09	ns	45,37	49,09	ns	57,79	49,09	ns	56,46				
CD8 T_{EMRA} CD57+CD28+	6,250	ns	4,000	6,786	ns	7,282	6,697	ns	6,151	6,340	ns	4,386				
CD8 T_{EMRA} CD57-CD28+	21,54	ns	12,50	20,83	ns	25,55	20,83	ns	12,21	20,93	ns	15,09				
CD8 T_{EMRA} CD57-CD28-	15,63	*	13,33	20,71	ns	19,89	15,41	ns	15,70	16,39	ns	15,39				
	n = 15			n = 10			n = 12			n = 12						

S 28: Zeitlicher Verlauf von CD4-positiven T_{EMRA}-Subpopulationen. Absolute Zellen pro Nanoliter, einen Tag nach dem Eingriff (post_1d), fünf Tage nach dem Eingriff (post_5d) sowie drei (post_3m) und sechs Monate nach dem Eingriff (post_6m) in Chirurgischen Patienten. Die Daten sind jeweils zu den entsprechenden Prä-Werten (pre_1) dargestellt. Statistische Auswertung mit gepaartem Wilcoxon Rangsummen Test, p-Wert: * < 0,05, ** < 0,01,*** < 0,001

Zellen / nl	pre_1		post_1d		pre_1		post_5d		pre_1		post_3m		pre_1		post_6m	
CD4 T_{EMRA} CD57+CD28-	0,0010	*	0,0	0,0015	ns	0,0005	0,0015	ns	0,0010	0,0015	ns	0,0015	ns	0,0015	ns	0,0015
CD4 T_{EMRA} CD57+CD28+	0,0010	**	0,0	0,0010	ns	0,0010	0,0010	ns	0,0015	0,0010	ns	0,0015	0,0010	ns	0,0010	0,0010
CD4 T_{EMRA} CD57-CD28+	0,0030	**	0,0010	0,0030	ns	0,0035	0,0030	ns	0,0025	0,0030	ns	0,0025	0,0030	ns	0,0030	0,0030
CD4 T_{EMRA} CD57-CD28-	0,0	*	0,0	0,0	ns	0,0	0,0005	ns	0,0	0,0005	ns	0,0	0,0005	ns	0,0005	0,0005
	n = 15			n = 10			n = 12			n = 12						

%	pre_1		post_1d		pre_1		post_5d		pre_1		post_3m		pre_1		post_6m	
CD4 T_{EMRA} CD57+CD28-	16,67	ns	0,0	17,71	ns	4,546	17,71	ns	10,42	16,52	ns	15,00	ns	15,00	ns	15,00
CD4 T_{EMRA} CD57+CD28+	5,882	**	0,0	5,214	ns	7,292	5,398	ns	9,812	3,939	ns	8,556	ns	8,556	ns	8,556
CD4 T_{EMRA} CD57-CD28+	50,00	ns	7,692	50,00	ns	70,83	50,00	ns	58,33	50,00	ns	58,57	ns	58,57	ns	58,57
CD4 T_{EMRA} CD57-CD28-	0,0	*	0,0	0,0	ns	0,0	0,7575	ns	0,0	0,7575	ns	1,000	ns	1,000	ns	1,000
	n = 15			n = 10			n = 12			n = 12						

13. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre ohne den Rat und die Unterstützung anderer nicht möglich gewesen, daher möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bei allen Mitwirkenden bedanken.

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. Hans-Dieter Volk für das Ermöglichen einer externen Promotion am Institut für medizinische Immunologie der Charité danken. Ein besonderer Dank gilt dahingehend auch Frau Prof. Susanne Hartmann aus dem Fachbereich der Veterinärmedizin, die sich bereit erklärt hat, meine Doktorarbeit als Erstgutachterin zu betreuen.

Mein allerherzlichster Dank gilt Frau Dr. Carolin Giannini für die Bereitstellung des Themas der vorliegenden Dissertation, ihre umfassende Unterstützung bei der Klärung von Problemen und ihr außergewöhnlich großes Engagement während der Entstehung dieser Arbeit. Zudem möchte ich mich für die geduldige Einarbeitung in die experimentelle Forschung bedanken.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Anke Jurisch für ihre große Hilfe im Labor sowie bei auftretenden Problemen.

Für die herausragende Hilfe in durchflusszytometrischen Fragestellungen danke ich Herrn Mathias Streitz ganz herzlich. Mit großem Engagement hat er jederzeit tatkräftig geholfen spezielle Probleme der Etablierung des Antikörper-Panels zu lösen.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts für medizinische Immunologie für die gute Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt hier Jacqueline Wending, die mir als sehr gute Freundin in Laborangelegenheiten sowie im zwischenmenschlichen Bereich stets zur Seite stand.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Karsten Jürchott, der mir bei der statistischen Auswertung der Daten eine große Hilfe war.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Stangl und Herrn Prof. Baumann für die Möglichkeit der Kooperation mit der Herzklinik am Campus Mitte.

Hier möchte ich besonders auch Herrn Sebastian Chiep-Au und Frau Rena Ellerbroek für die Rekrutierung der kardiologischen Patienten und der damit verbundenen Blutabnahmen danken.

Allen meinen lieben Freunden danke ich für die Ausdauer, Ruhe und Geduld mit der sie mir stets zur Seite standen und mich immer wieder aufgemuntert haben.

Besonders danken möchte ich hier nochmals Carolin Giannini sowie Anna Pfeffer und meiner Schwester für das sorgfältige Korrekturlesen.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir das Studium der Veterinärmedizin ermöglichen haben und mir auch während der Anfertigung der Doktorarbeit stets unterstützend und liebevoll zur Seite standen.

14. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen Anspruch genommen habe.

Berlin, den 10.04.2018

Birthe Inken Sumpf