

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

Relevanz humaner Chemokine und zirkulierender  
dendritischer Zellen bei valvulär bedingter Herzinsuffizienz –  
MitraClip® als Interventionsmodell

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Mandel, Sarah Brigitte

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Langer

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Riessen

Tag der Disputation: 22.07.2021

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	III
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
1. Einleitung.....	1
1.1 Herzinsuffizienz als Erkrankung .....	1
1.2 Herzinsuffizienz und Immunmechanismen.....	3
1.3 Chemokine .....	4
1.4 Dendritische Zellen.....	8
1.5 Dendritische Zellen und Chemokine.....	13
1.6 MitraClip®-Therapie und deren Auswirkungen .....	14
2. Fragestellung und Zielsetzung.....	17
3. Material und Methoden.....	19
3.1 Untersuchungskollektiv und Studienaufbau .....	19
3.2 Durchflusszytometrie.....	20
3.3 Analyse proinflammatorischer Chemokine mittels Immunoassay .....	21
3.4 Korrelationen mit klinischen Parametern.....	23
3.5 Analyse dendritischer Zellen mittels Durchflusszytometrie.....	23
3.6 Antikörper, Reagenzien und Lösungen .....	26
3.7 Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien .....	27
3.8 Geräte .....	28
3.9 Statistische Auswertung .....	29
4. Ergebnisse.....	31
4.1 Patientencharakteristika .....	31
4.2 Multiplex-Assay, Ergebnisse der Chemokine in Gruppen .....	33
4.2.1 MIP-1 $\alpha$ (CCL3) .....	33

---

4.2.2	MIP-1 $\beta$ (CCL4) .....	34
4.2.3	MCP-1 (CCL2).....	35
4.2.4	TARC (CCL17) .....	35
4.2.5	RANTES (CCL5).....	36
4.2.6	Interferon- $\gamma$ -induzierte Chemokine: MIG (CXCL9), IP-10 (CXCL10) und I-TAC (CXCL11) .....	36
4.2.7	IL-8 (CXCL8).....	38
4.2.8	GRO $\alpha$ (CXCL1) .....	38
4.2.9	ENA-78 (CXCL5) .....	39
4.2.10	Eotaxin (CCL11) .....	40
4.2.11	MIP-3 $\alpha$ (CCL20) .....	40
4.3	Korrelationen mit klinischen Parametern.....	40
4.4	DC Analyse, Anzahl der mDCs, pDCs, Leukozyten, Reifemarker.....	41
4.4.1	Myeloische dendritische Zellen.....	42
4.4.2	Plasmazytoide dendritische Zellen .....	43
4.4.3	Oberflächenmoleküle der DCs.....	44
5.	Diskussion .....	48
5.1	Untersuchungskollektiv .....	48
5.2	Chemokin-Assay und Korrelationen mit klinischen Parametern.....	49
5.3	Anzahl und Phänotyp dendritischer Zellen .....	58
5.4	Schlussfolgerung.....	64
5.5	Limitation der Studie.....	66
6.	Zusammenfassung .....	67
	Literaturverzeichnis .....	VIII
	Erklärung zum Eigenanteil.....	XIX
	Danksagung .....	XX

## Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
BDCA	Blood dendritic cell antigen
BNP	Brain natriuretic peptide
BSA	Bovines Serumalbumin
CCR	Rezeptor für Chemokine der CC-Klasse
CD	Cluster of differentiation
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin-Oligonukleotid
CTL	C-Typ-Lektin-Rezeptor
CTLA	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein
CXCR	Rezeptor für Chemokine der CXC-Klasse
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DC	Dendritische Zelle
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EF	Ejektionsfraktion
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ENA	Epithelial-derived neutrophil-activating peptide
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FcR	Fc-Rezeptor, bindet konstantes Fc-Teil von Immunglobulinen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forwardscatter, Vorwärtsstreulicht
g	Gravitationskonstante
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GRO	Growth-related oncogene
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen – antigen D Related (Isotyp DR)
ICAM	Intercellular adhesion molecule
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
INF	Interferon
IP	Interferon $\gamma$ -induced protein
I-TAC	Interferon-inducible T cell $\alpha$ -chemoattractant
KHK	Koronare Herzkrankheit
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen
LPS	Lipopolysaccharide
LVEDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVEF	Linksventrikulären Ejektionsfraktion
MCP	Monocyte chemoattractant protein
mDC	Myeloische dendritische Zelle
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHCI/II	Major Histocompatibility Complex
MIG	Monokine induced by Gamma-Interferon
MIP	Macrophage inflammatory protein
mRNA	Messenger RNA
NYHA	New York Heart Association Klassifikation zur Einteilung der Herzinsuffizienz
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate-Buffered Saline
pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PFA	Paraformaldehyd
PRR	Pattern Recognition Receptor
RANTES	Regulated on activation normal T cell expressed and secreted
RNA	Ribonukleinsäure
SA-PE	Streptavidin-Phycoerythin
SSC	Siedescatter, Seitwärtsstreulicht
TARC	Thymus- and activation-related chemokine
TEE	Transösophageale Echokardiographie

TGF	Transforming growth factor
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TZR	T-Zell-Rezeptor

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Weg der dendritischen Zellen .....	12
Abbildung 2: Multiplex-Chemokine-Assay .....	22
Abbildung 3: MFI von MIP-1 $\alpha$ aus dem Multiplex-Chemokine-Assay .....	33
Abbildung 4: MFI von MIP-1 $\beta$ aus dem Multiplex-Chemokine-Assay.....	34
Abbildung 5: MFI von TARC aus dem Multiplex-Chemokine-Assay.....	35
Abbildung 6: MFI von IP-10 und I-TAC aus dem Multiplex-Chemokine-Assay.	37
Abbildung 7: MFI von IL-8 aus dem Multiplex-Chemokine-Assay .....	38
Abbildung 8: MFI von GRO $\alpha$ aus dem Multiplex-Chemokine-Assay. ....	39
Abbildung 9: MFI von IL-8 und MIP-1 $\alpha$ vor der Intervention abhängig von der NYHA-Klasse .....	40
Abbildung 10: Prozentualer Anteil der mDCs an den Leukozyten im Blut .....	42
Abbildung 11: Prozentualer Anteil der pDCs an den Leukozyten im Blut .....	43
Abbildung 12: MFI der CD86-Rezeptoren auf mDCs (A) und pDCs (B) .....	44
Abbildung 13: MFI der CD11a-Rezeptoren auf mDCs (A) und pDCs (B) .....	46

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: NYHA-Klassifikation.....	2
Tabelle 2: Übersicht der Chemokine .....	7
Tabelle 3: Antikörper-Pipettierschema .....	24
Tabelle 4: Patientencharakteristika .....	32

# 1. Einleitung

## 1.1 Herzinsuffizienz als Erkrankung

Die chronische Herzinsuffizienz ist eine Diagnose von immer weiter zunehmender Relevanz. Laut Deutschem Herzbericht 2018 nahm die Erkrankungshäufigkeit in Deutschland in den letzten Jahren deutlich zu; die Herzinsuffizienz ist die führende alleinstehende Diagnose bei stationär behandelten Patienten in Deutschland (1). Nach dem Ergebnis der groß angelegten Framingham Heart Study liegt das Lebenszeitrisiko für eine Herzinsuffizienz im Alter über 40 Jahren bei etwa 20 % und das 5-Jahres-Risiko, an Herzinsuffizienz zu erkranken, steigt mit zunehmendem Alter an (2). Während die Prävalenz der Herzinsuffizienz in der 2004 veröffentlichten Rotterdam Heart Study bei den 55- bis 64-Jährigen bei 0.9 % lag, betrug diese bei den über 85-Jährigen 17.4 % (3). Trotz immer weiter verbesserten Behandlungsmöglichkeiten sind Erkrankungen des Herz- und Kreislaufsystems weiterhin die häufigsten Todesursachen in Deutschland. Nach der chronisch ischämischen Herzkrankheit und dem akuten Myokardinfarkt stand die Herzinsuffizienz im Jahr 2015 an dritter Stelle. Etwa 45.000 Menschen sterben jährlich in Deutschland an Herzinsuffizienz (4). Die mit dem Alter zunehmende Prävalenz in Kombination mit der steigenden Lebenserwartung führt dazu, dass es zunehmend mehr Patienten mit der Diagnose einer Herzinsuffizienz gibt, weshalb eine Weiterentwicklung der Therapien notwendig ist.

Als Herzinsuffizienz wird die Unfähigkeit des Herzens bezeichnet, durch seine Pumpleistung den Körper mit ausreichend Blut – und damit auch Sauerstoff – zu versorgen (5). Die chronische Herzinsuffizienz ist eine komplexe und multifaktoriell bedingte Erkrankung. Die häufigsten Ursachen sind die koronare Herzkrankheit (KHK) sowie die arterielle Hypertonie. Aber auch andere Ursachen wie Kardiomyopathien, Herzrhythmusstörungen und Erkrankungen der Herzklappen können zu einer Herzinsuffizienz führen (5).

Im Rahmen der hier durchgeführten Studie wurden Patienten mit einer valvulär bedingten Herzinsuffizienz als Folge einer Mitralklappeninsuffizienz untersucht. Die Mitralklappeninsuffizienz resultiert aus strukturellen Veränderungen und

Umbauprozessen am Herzskelett oder der Herzklappe selbst (primäre Mitralklappeninsuffizienz). Ursachen können beispielsweise degenerative Veränderungen, Endokarditis, ischämische Schädigung, Trauma oder Inflammation sein. Eine sekundäre Undichtigkeit der Mitralklappe entsteht durch eine Pathologie des linken Ventrikels - zum Beispiel einer Kardiomyopathie oder Myokarditis - und einer daraus entstehenden Dilatation des Mitralklappenannulus (6–8). Durch den Blutrückfluss in den Vorhof kommt es zu einem Pendelvolumen zwischen Vorhof und Ventrikel. Es entsteht eine Volumenbelastung des Vorhofs und des Ventrikels, wodurch es zu deren Dilatation kommt. Zusätzlich kann es durch weitere Faktoren, wie beispielsweise einer bestehenden arteriellen Hypertonie (Nachlast), zu einer Druckbelastung des Herzens kommen. Trichon et al. konnten bei 56.2 % der untersuchten Patienten mit symptomatischer Herzinsuffizienz und einer Ejektionsfraktion (EF) von < 40 % eine Mitralklappeninsuffizienz nachweisen (9). Aus der Druck- und Volumenbelastung resultiert eine chronische Überbeanspruchung des Herzmuskels, vor allem des linken Herzens, aus der sich eine Herzinsuffizienz entwickeln kann. Gemeinsam mit der Schädigung des Herzmuskels stellen diese Mechanismen die wesentlichen Bestandteile der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz dar (10). Die multiätiologische Schädigung des Herzens führt schließlich zu einer Abnahme der kardialen Auswurfleistung.

Die Einteilung der chronischen Herzinsuffizienz erfolgt anhand der Klassifikation der New York Heart Association (NYHA) in vier Stadien (vergleiche Tabelle 1). Bei dieser Einteilung ist insbesondere die Beurteilung der Belastbarkeit im Alltag von Bedeutung. Die Klassifikation dient unter anderem als Grundlage für die Therapieentscheidung, zur Verlaufskontrolle und Prognoseeinschätzung (5).

*Tabelle 1: NYHA-Klassifikation*

*Klassifikation der Herzinsuffizienz anhand der Belastbarkeit im Alltag. Einbezogen werden die Symptome körperliche Erschöpfung, Herzrhythmusstörungen, Dyspnoe und Angina pectoris (5).*

<b>Klinische Symptomatik</b>	
NYHA I	Asymptomatisch, keine Beschwerden bei alltäglicher Belastung
NYHA II	Leichte Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit, Symptome bei stärkerer Belastung (z.B. Treppensteigen)
NYHA III	Symptome bei geringer körperlicher Belastung
NYHA IV	Symptome bei jeder körperlichen Belastung und in Ruhe

## 1.2 Herzinsuffizienz und Immunmechanismen

Immunologische und inflammatorische Prozesse scheinen eine Rolle in der Herzinsuffizienzentstehung und -progression zu spielen, weshalb die Aktivierung des Immunsystems in diesem Zusammenhang zunehmend in den Fokus der Forschung rückt.

Insbesondere proinflammatorische Zytokine könnten einen Einfluss auf kardiovaskuläre Erkrankungen haben. Im Herzen werden, als Folge von Gewebeerstörung, die angeborene und adaptive Immunreaktion aktiviert. Der Gewebeschaden kann sowohl von einem Pathogen stammen als auch beispielsweise durch Ischämie oder Volumenbelastung entstanden sein. Primär dienen die Zytokine dazu, protektiv zu wirken und eine kurzzeitige Anpassung an den Gewebeschaden zu ermöglichen. Kommt es jedoch zu einer länger andauernden Exposition oder pathologischen Konzentrationen an Zytokinen, führen diese zu verschiedenen Pathologien am Herzen (11,12). So wurde zum Beispiel beim akuten Myokardinfarkt, bei instabiler Angina Pectoris, Myokarditis und Kardiomyopathien eine Assoziation mit proinflammatorischen Zytokinen beschrieben (13–15). Möglicherweise spielen Zytokine also eine Rolle bei Umbauprozessen des Herzens und haben dadurch Einfluss auf die Struktur und Funktion dessen.

Studien zeigen, dass proinflammatorische Zytokine auch bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz erhöht sind. So wurden im Jahr 1990 erstmalig von Levine et al. bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz der NYHA-Klassen III und IV, im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe, erhöhte Serumkonzentrationen von Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) nachgewiesen (16). Auch andere proinflammatorische Zytokine wurden im Zusammenhang mit Herzinsuffizienz untersucht, dabei konnten eine erhöhte Konzentration der Interleukine (IL) IL-1 und IL-6 gefunden werden (17,18). Die Zytokinkonzentrationen sind in verschiedenen Stadien der Herzinsuffizienz erhöht und steigen mit der Schwere der Herzinsuffizienz beziehungsweise der NYHA-Klasse an (19,20). Diese Korrelation konnte unabhängig von der Ätiologie der Herzinsuffizienz gezeigt werden (20,21). Außerdem haben die Konzentrationen der Zytokine möglicherweise eine prognostische Bedeutung. An

einer großen Population konnte gezeigt werden, dass erhöhte Konzentrationen von TNF- $\alpha$  und IL-6 bei Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz mit einer erhöhten Mortalität einhergehen. TNF- $\alpha$  und IL-6 scheinen unabhängige Prädiktoren für die Mortalität dieser Patienten zu sein (20,22).

Auch der zelluläre Anteil des Immunsystems scheint in der Pathogenese kardialer Erkrankungen von Bedeutung zu sein. So sind an einer inflammatorischen Reaktion infolge von ischämischer oder nicht-ischämischer Schädigung und Reparaturprozessen sowohl ortsständige als auch eingewanderte Immunzellen beteiligt (23). Am besten untersucht sind diese Mechanismen für akute ischämische Ereignisse. Nach einer primären Aktivierung von Leukozyten kommt es durch proinflammatorische Chemokine und Zytokine zu einer Rekrutierung weiterer Immunzellen ins geschädigte Gewebe. Hierzu zählen, sowohl bei einer ischämisch bedingten Schädigung als auch bei mechanischer Belastung des Herzmuskels, zunächst neutrophile Granulozyten und im Anschluss Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (DCs). Außerdem folgt eine Aktivierung von Lymphozyten (23,24). Schließlich kommt es zu Fibrose und Hypertrophie des Myokards (23). In Tierexperimenten zum Myokardinfarkt konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte Rekrutierung von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen in infarziertes Gewebe zu einem schlechten linksventrikulären Remodelling beiträgt, was der Ausgangspunkt für eine chronische Herzinsuffizienz sein kann (25).

### **1.3 Chemokine**

Neben den klassischen inflammatorischen Zytokinen sind möglicherweise auch chemotaktische Zytokine, im Folgenden Chemokine genannt, an der Pathogenese der Herzinsuffizienz beteiligt. Dies geschieht zum einen indirekt durch die Rekrutierung der Leukozyten ins entzündliche Gewebe und deren Aktivierung. Chemokine scheinen aber auch direkten Einfluss auf Myokardzellen zu haben (26,27).

Chemokine sind wichtige Signalmoleküle im menschlichen Körper. Sie haben sehr vielfältige Aufgaben in der adaptiven Immunantwort und tragen zur Entstehung vieler Krankheiten bei (28). Unter anderem sind sie an

Entzündungsprozessen, Zellrekrutierung und der Zirkulation von Lymphozyten beteiligt. Sie tragen aber auch zur Wundheilung sowie zur Entwicklung von lymphatischen Organen und Immunzellen bei und haben eine Bedeutung in der Angiogenese und der Metastasenentstehung (29). Dies sind nur einige Beispiele, um die vielfältigen Funktionen dieser Moleküle zu verdeutlichen. Allen Chemokinen gemeinsam ist ihre chemotaktische Aktivität, also das Anlocken von Immunzellen in bestimmte Gewebe und entzündliche Bereiche (30). Dennoch kann man die Chemokine anhand ihrer vorherrschenden Wirkung in zwei Gruppen einteilen. Die inflammatorischen Chemokine werden nach Stimulation von vielen Gewebszellen und Leukozyten sezerniert. Auslösendes Signal für die Sezernierung können beispielsweise Bakterientoxine oder bestimmte Zytokine wie IL-1, TNF oder Interferone sein. Die zweite Gruppe der Chemokine ist in erster Linie für die Rezirkulation („Homing“) von Lymphozyten und dendritischen Zellen in die Lymphknoten und die Milz verantwortlich. Sie werden kontinuierlich in lymphatischen Geweben ausgeschüttet. Die Chemokine sind somit essentiell für die Reifung, Proliferation, Differenzierung und Aktivierung der Immunzellen (30,31).

Derzeit sind etwa 40 humane Chemokine bekannt. Sie werden anhand ihrer chemischen Struktur in einer systemischen Nomenklatur in Klassen unterteilt (32). Chemokine sind aus 70-130 Aminosäuren aufgebaut und enthalten vier Cystein-Reste (30). Die Einteilung in zwei Hauptklassen erfolgt anhand der ersten zwei im Protein vorkommenden Cystein-Reste und deren Lage zueinander (32). Die größte Familie ist die der CC-Chemokine, bei denen die ersten zwei Cystein-Reste direkt nebeneinanderliegen. Als zweite Klasse sind die CXC-Chemokine zu nennen. Diese enthalten einen Aminosäure-Rest (X) zwischen den ersten beiden Cystein-Resten (32). Zwischen den Cystein-Resten bestehen Disulfid-Brücken, durch welche die dreidimensionale Form der Chemokine entsteht, die für die Rezeptorbindung und die Wirkung unabdinglich ist (30).

Des Weiteren gibt es zwei Chemokine, welche in keine der oben beschriebenen Klassen passen und deshalb jeweils eine eigene Klasse darstellen. Das Chemokin CX<sub>3</sub>C, Fraktalkin, entspricht der dritten Klasse. Es enthält drei

Aminosäure-Reste zwischen den ersten beiden Cystein-Resten. Es kommt sowohl membrangebunden als auch als lösliches Chemokin vor (33). Lymphotactin ist der einzige Vertreter der vierten Klasse und enthält nur zwei Cystein-Reste. Es kann somit nur eine Disulfidbrücke ausbilden (34). Der Großteil der Chemokine wird in den Extrazellularraum sezerniert, wo sie entweder an Matrix binden oder als lösliche Proteine vorliegen. Sie erzeugen so Konzentrationsgradienten, die dauerhaft oder vorübergehend bestehen (35). Eine Übersicht der in der vorliegenden Studie betrachteten Chemokine ist in Tabelle 2 dargestellt.

Die Wirkung von Chemokinen wird durch die Bindung an Chemokin-Rezeptoren vermittelt. Diese sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren an Zelloberflächen, welche aus sieben Transmembran-Domänen bestehen (28). Es sind 18 verschiedene Chemokin-Rezeptoren bekannt (36). Die Rezeptoren sind unterschiedlich spezifisch und es können mehrere Chemokine der gleichen Klasse an dieselbe Art von Rezeptor binden. Außerdem gibt es Chemokine, die an mehrere Rezeptoren binden können (36). Die Rezeptoren erfüllen drei wichtige Aufgaben. Sie binden das Chemokin, entschlüsseln die Nachricht und lösen eine intrazelluläre Signalkaskade aus (31). Die Wirkung des Chemokins am Rezeptor ist außerdem abhängig von der Bindungsaffinität, der Wirkung als Agonist oder Antagonist und der Effizienz der ausgelösten Reaktion (31). Insgesamt entsteht hierdurch eine große Bandbreite an Interaktionen. Für die Wechselwirkung des Chemokins mit dem Rezeptor sind vor allem zwei Strukturen von Bedeutung: Zum einen der Aminosäure-Loop (Loop = engl. für Schleife) im Protein und zum anderen das N-terminale Ende. Der Aminosäure-Loop beginnt nach dem zweiten Cystein-Rest und behält seine Konformität dauerhaft bei. Er bindet zunächst an den Rezeptor und erleichtert so die Bindung des N-terminalen Endes des Chemokines, welches schließlich die Reaktion am Rezeptor auslöst (30).

Immunzellen können unterschiedliche Chemokinrezeptoren exprimieren und die Rezeptorausstattung kann beispielsweise je nach Reife- und Aktivierungsstatus variieren. So können die Zellen verschiedene Aufgaben in der Immunantwort übernehmen (30).

Durch die vielfältigen Aufgaben der Chemokine in der Regulation von Leukozyten, Immunantwort und Inflammation sind sie und ihre Rezeptoren Gegenstand aktueller Forschung in vielen Bereichen der Medizin. Vor allem als mögliches Target für neue Medikamente und Therapien rücken sie zunehmend in den Fokus.

*Tabelle 2: Übersicht der Chemokine*

*In dieser Studie untersuchte Chemokine nach Gruppen gegliedert. Mit systematischer Nomenklatur, Eigennamen der Chemokine und Rezeptoren, an die sie binden können (30,32,36).*

<b>Systematische Nomenklatur</b>	<b>Eigenname</b>		<b>Rezeptoren</b>
<b>CC-Chemokine</b>			
CCL2	MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein 1</i>	CCR2
CCL3	MIP-1 $\alpha$	<i>macrophage inflammatory protein 1<math>\alpha</math></i>	CCR1 CCR5
CCL4	MIP-1 $\beta$	<i>macrophage inflammatory protein 1<math>\beta</math></i>	CCR5
CCL5	RANTES	<i>regulated on activation normal T cell expressed and secreted</i>	CCR1, CCR3, CCR5
CCL11	Eotaxin		CCR3
CCL17	TARC	<i>thymus- and activation-related chemokine</i>	CCR4
CCL20	MIP-3 $\alpha$	<i>macrophage inflammatory protein 3<math>\alpha</math></i>	CCR6
<b>CXC-Chemokine</b>			
CXCL1	GRO $\alpha$	<i>growth-related oncogene</i>	CXCR2 > CXCR1
CXCL5	ENA-78	<i>epithelial cell-derived neutrophil-activating factor, 78 amino acids</i>	CXCR2
CXCL8	IL-8	<i>Interleukin-8</i>	CXCR1, CXCR2
CXCL9	MIG	<i>monokine induced by <math>\gamma</math>-interferon</i>	CXCR3
CXCL10	IP-10	<i>interferon <math>\gamma</math>-induced protein</i>	CXCR3
CXCL11	I-TAC	<i>interferon-inducible T cell <math>\alpha</math>-chemoattractant</i>	CXCR3

## 1.4 Dendritische Zellen

Die dendritischen Zellen (DCs) gehören zur Familie der Leukozyten und machen unter 0.1 % dieser aus (37). Gemeinsam mit den Makrophagen und den B-Lymphozyten bilden sie die Gruppe der professionell antigenpräsentierenden Zellen (APZ) (38). Die dendritischen Zellen stellen hierbei die potentesten APZs dar und sind ein wichtiges Bindeglied zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort (5). Sie kommen in fast allen Geweben des menschlichen Körpers vor und haben im Immunsystem eine Reihe von Aufgaben (39). Bei der Betrachtung der dendritischen Zellen sind verschiedene Unterformen zu unterscheiden. Für die Fragestellung dieser Untersuchung von Bedeutung sind die myeloischen dendritischen Zellen (mDC), auch Typ-I-DCs genannt, und die plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC), auch Typ-II-DC, sowie deren jeweilige unreife Vorstufen im Blut. Beide Zelltypen entstammen einer gemeinsamen hämatopoetischen Stammzelle des Knochenmarks. Während sich die mDCs aus einer myeloischen Stammzelle entwickeln, stammen die pDCs von einer lymphoiden Stammzelle ab (40). Aus dieser unterschiedlichen Entwicklung ergibt sich auch die Ausstattung an Oberflächenmolekülen der beiden Zelllinien mit beispielsweise CD-Molekülen (Cluster of differentiation) und Toll-like-Rezeptoren (TLR). Einige dieser Rezeptoren sind in Abbildung 1 angegeben.

Die Hauptaufgaben der dendritischen Zellen sind die Aufnahme und Prozessierung von Antigenen und die Initiierung der T-Zell-abhängigen Immunantwort (37). Sie können naive T-Zellen zur klonalen Expansion und zur Differenzierung zu T-Effektorzellen anregen. Um T-Zellen aktivieren zu können, durchlaufen die dendritischen Zellen einen Reifungsprozess. Aus dem Knochenmark gelangen die DC-Vorläuferzellen über das Blut in nicht-lymphatische Gewebe und kommen dort im Interstitium von Organen und in Epithelien mit Antigenen in Kontakt (39). Die unreifen DCs haben die Fähigkeit, Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und auf einem Major Histocompatibility Complex (MHC) als MHC-Antigen-Komplexe zu präsentieren (41). CD8<sup>+</sup>-T-Zellen werden durch MHC-Klasse-I-Moleküle auf DCs aktiviert und differenzieren sich dann zu CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen. Durch Antigene auf

MHC-Klasse-II-Molekülen werden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aktiviert, die sich unter anderem zu T<sub>H</sub>1-Zellen (T-Helfer-Zellen), T<sub>H</sub>2-Zellen oder T<sub>H</sub>17-Zellen differenzieren (41,42). Für die Erkennung von Antigenen exprimieren die DCs bestimmte Oberflächenrezeptoren (prozessierender Phänotyp). DCs tragen Rezeptoren, welche damage-associated molecular patterns (DAMPs), die bei Zellschädigung in den Extrazellularraum gelangen, erkennen. Ebenso Pattern Recognition Receptors (PRR), die für Pathogene typische Merkmale (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) detektieren. Die wichtigsten PRRs sind hierbei Toll-like-Rezeptoren (TLR) und C-Typ-Lektin-Rezeptoren (CTL), außerdem werden Fc-Rezeptoren (FcR) exprimiert. Durch Pathogene, die PRRs aktivieren, und inflammatorische Signale wird die Reifung der DCs ausgelöst (43,44). Die mDCs exprimieren unter anderem TLR2 und TLR4, die durch bakterielle Peptidoglykane und Lipopolysaccharide aktiviert werden können. Die pDCs hingegen weisen TLR7 und TLR9 auf, die beispielsweise durch CpG Oligonukleotide (Cytosin-Phosphat-Guanin-Oligonukleotide) und Viren aktiviert werden (45,46). DCs können Antigene mittels verschiedener Mechanismen aufnehmen. Sie besitzen die Fähigkeit zur rezeptorvermittelten Endozytose (in Abbildung 1A dargestellt), Phagozytose und Pinozytose (41,42,47). Die Aufarbeitung der Antigene erfolgt lysosomal und endosomal im Zellinneren. Im Anschluss an die Prozessierung werden die Proteine dann über MHC-I- oder MHC-II-Rezeptoren an der Zelloberfläche präsentiert (42). Durch die verschiedenen Aufnahmemechanismen und die unterschiedliche Ausstattung mit Oberflächenmolekülen der mDCs und pDCs können diese eine Vielzahl von Pathogenen erkennen und abhängig vom Stimulus unterschiedliche Arten der Immunreaktion auslösen. Neben dem Kontakt zu den Antigenen spielen Zytokine eine wichtige Rolle in der Reifung der DCs. Es handelt sich hierbei vor allem um inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und Interleukine aus dem Gewebe. Auch granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) kann als Wachstumsfaktor die Reifung induzieren (41,48). Wichtig sind diese Botenstoffe auch direkt und indirekt für die Mobilisierung der DCs in die T-Zell-Regionen der lymphatischen Organe (39,48).

Die reifenden DCs wandern über afferente Lymphgefäße in Lymphknoten ein oder über den Blutstrom in die Milz (48).

Durch die TLR-Signale und die Reifung ändern die DCs ihre Erscheinungsform von Antigen prozessierenden Zellen zum präsentierenden Phänotyp. Die endozytotische Aktivität nimmt ab und es werden andere Oberflächenmoleküle exprimiert. So kommt es zu einer Hochregulation von MHC-I und MHC-II, wie beispielsweise Human Leukocyte Antigen - Isotyp DR (HLA-DR), Adhäsionsmolekülen, wie CD54, und costimulatorischer Moleküle, wie CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2), sowie einer veränderten Expression von Chemokinrezeptoren (45).

In den sekundär lymphatischen Organen aktivieren die DCs die T-Zellen. Hierfür sind mehrere Signale notwendig, von denen folgend die wichtigsten beschrieben werden: Über das Adhäsionsmolekül lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) bindet die naive T-Zelle zunächst mit geringer Affinität an das Intercellular adhesion molecule 1 und 2 (ICAM-1 und 2) auf der dendritischen Zelle. Erkennt nun die T-Zelle mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TZR) ihr spezifisches über MHC-Moleküle präsentiertes Antigenfragment, kommt es zu einer Konformationsänderung von LFA-1, wodurch die Affinität der Bindung zunimmt (42). Die Bindung des TZR an das spezifische Antigen stellt das erste wichtige Signal in der Aktivierung der T-Zelle dar. Außerdem sind costimulatorische Signale an der Aktivierung beteiligt. Das CD28-Antigen der T-Zellen bindet an CD80/86. Dieses Signal ist für die klonale Vermehrung der T-Zelle von Bedeutung (42). Als weitere Reaktion auf diese Interaktionen wird das cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4-Antigen = CD152) der T-Zellen vermehrt exprimiert. Auch dies ist ein Rezeptor für CD80/86, jedoch mit einer höheren Affinität. Dadurch wird die T-Zell-Aktivierung beendet und so eine überschießende Immunreaktion verhindert (49). Der letzte Schritt zur vollständigen Reifung der DCs, und ebenso wichtig für die Aktivierung der T-Zellen, ist die Bindung eines CD40-Liganden an den CD40-Rezeptor der DCs. Die verschiedenen Rezeptorbindungen zur Aktivierung sind in Abbildung 1B dargestellt.

Ist die Bindung des CD40-Liganden erfolgt, können mDCs und pDCs, je nach Stimulus der Reifung, unterschiedliche Zytokine wie IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) in variablen Mengen sezernieren. Abhängig von den Konzentrationen der verschiedenen Zytokine differenzieren sich die T-Zellen zu T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17, zytotoxischen T-Zellen oder anderen Unterformen. Durch hohe Konzentrationen an IL-12, die von DCs gebildet werden, differenzieren sich die T-Zellen zu T<sub>H</sub>1-Zellen, welche vor allem INF- $\gamma$  und IL-2 produzieren. Die T<sub>H</sub>1-Antwort ist wesentlich für die Aktivierung von Makrophagen und die Stimulation von B-Zellen. Niedrigere Konzentrationen an IL-12 und hohe Konzentrationen an IL-4 aktivieren die T<sub>H</sub>2-Antwort. Die T<sub>H</sub>2-Zellen führen zu einer Bildung von IL-4 und IL-10 und es werden insbesondere die B-Zellen zur Differenzierung zu Plasmazellen und zur Antikörperproduktion angeregt (38,42). Neben der Zellaktivierung dienen die inflammatorischen Zytokine der Chemotaxis für weitere Immunzellen wie Monozyten. Reife pDCs sind in der direkten T-Zell-Aktivierung weniger effizient als mDCs. Diese bilden jedoch große Mengen an IFN- $\alpha$  und INF- $\beta$  und werden deshalb auch als Interferon-produzierende Zellen bezeichnet. IFN- $\alpha$  initiiert wie IL-12 eine T<sub>H</sub>1-Antwort und wirkt antiviral (42,44–46).

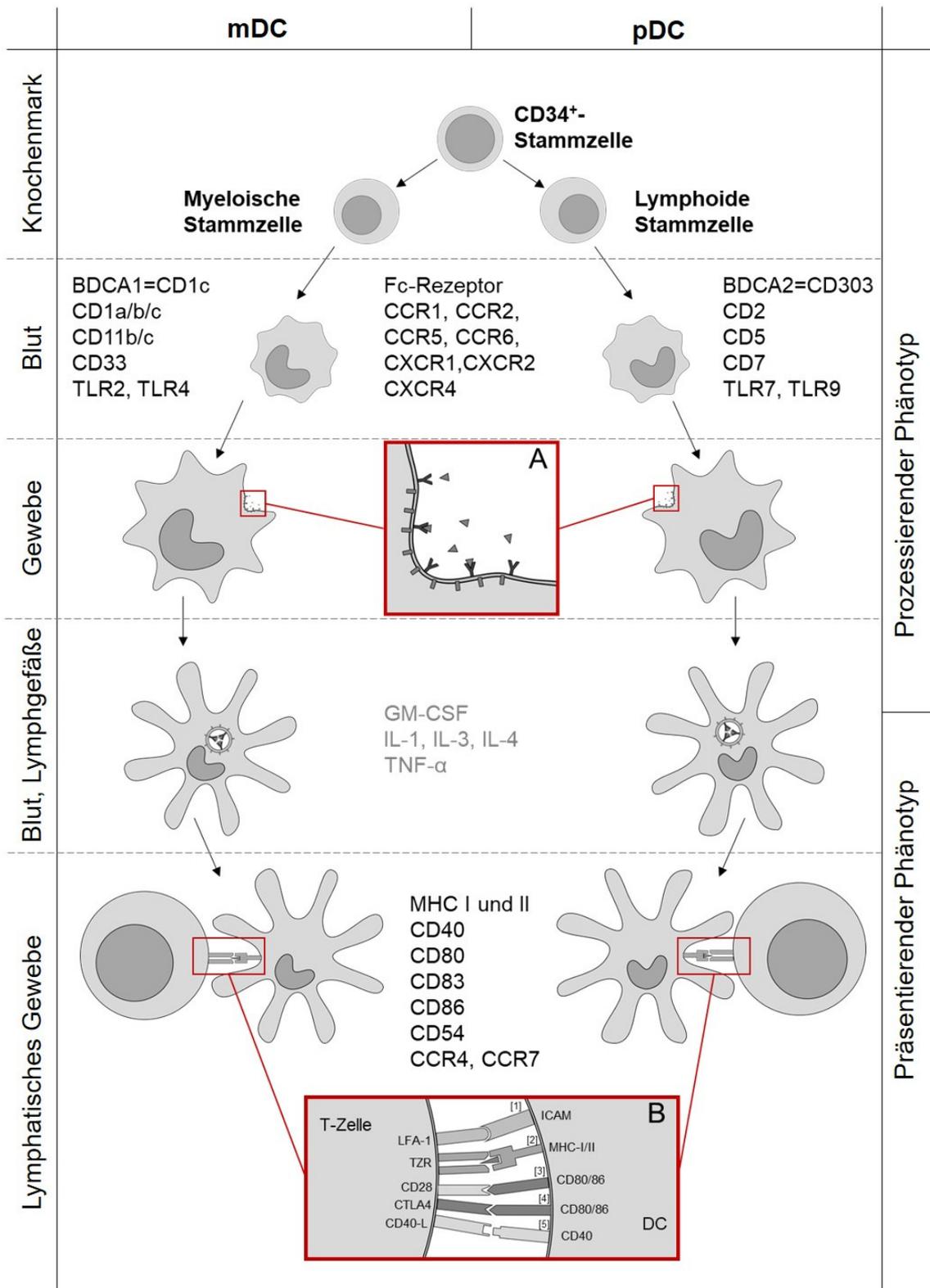


Abbildung 1: Der Weg der dendritischen Zellen

Die dendritischen Zellen lassen sich in mDCs und pDCs unterteilen. Da sie sich aus verschiedenen Stammzellen des Knochenmarks entwickeln, exprimieren sie unterschiedliche Oberflächenrezeptoren. Die unreifen DCs haben die Fähigkeit, Antigene aufzunehmen, zu verarbeiten und als MHC-Antigen-Komplexe zu präsentieren. Für die Erkennung von Antigenen exprimieren die DCs bestimmte Oberflächenrezeptoren wie TLR. Sie besitzen die Fähigkeit zur rezeptorvermittelten Endozytose (A), Phagozytose und Pinozytose.

*In Anschluss an die Prozessierung werden die Proteine dann über MHC-I- oder MHC-II-Rezeptoren an der Zelloberfläche präsentiert. Neben dem Kontakt zu den Antigenen spielen Zytokine und Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle in der Reifung der DCs. Hierzu zählen GM-CSF, IL-1, IL-3, IL-4 und TNF- $\alpha$ . Nach der Prozessierung der Antigene ändern die DCs ihre Erscheinungsform. Die endozytotische Aktivität nimmt ab und es werden andere Oberflächenmoleküle exprimiert. In den sekundär lymphatischen Organen aktivieren die DCs die T-Zellen, hierfür sind mehrere Signale notwendig, von denen hier die wichtigsten beschrieben werden.*

**B:** *Über das Adhäsionsmolekül LFA-1 bindet die naive T-Zelle mit geringer Affinität an ICAM-1 und -2 auf der DC [1]. Anschließend kommt es, durch die Bindung des TZR an das MHC-Molekül [2], zu einer Konformationsänderung von LFA-1, wodurch die Affinität der Bindung zunimmt. Außerdem sind costimulatorische Signale an der Aktivierung beteiligt. Das CD28-Antigen der T-Zellen bindet an CD80/86 [3]. Ebenso bindet ein CD40-Ligand an den CD40-Rezeptor der DCs [5]. Ist dies erfolgt, können mDCs und pDCs je nach Stimulus der Reifung unterschiedliche Zytokine wie IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  und INF- $\gamma$  in variablen Mengen sezernieren. Abhängig von den Konzentrationen der verschiedenen Zytokine differenzieren sich die T-Zellen zu  $T_H1$ ,  $T_H2$ ,  $T_H17$ , zytotoxischen T-Zellen oder anderen Unterformen. (38–42,45,48,49)*

*mDC: myeloische dendritische Zellen, pDC: plasmazytoide dendritische Zellen, GM-CSF: granulocyte macrophage colony-stimulating factor, IL: Interleukin, TNF: Tumornekrosefaktor, INF: Interferon, LFA: lymphocyte function-associated antigen, ICAM: Intercellular adhesion molecule, MHC: Major Histocompatibility Complex, TLR: Toll-like-Rezeptoren, CD: cluster of differentiation, CTLA: cytotoxic T-lymphocyte-associated protein*

## 1.5 Dendritische Zellen und Chemokine

Die genaue Regulation der Migration der dendritischen Zellen ist noch immer nicht vollständig geklärt. Neben einigen oben genannten Signalstoffen wurde die Beeinflussung durch Chemokine für verschiedene Untergruppen der dendritischen Zellen untersucht. Dendritische Zellen enthalten messenger RNA (mRNA) für die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2 und CCR5 sowie CXCR1, CXCR2 und CXCR4 (39). Je nach Stadium der oben beschriebenen Reifung exprimieren die dendritischen Zellen verschiedene Chemokinrezeptoren, welche in Abbildung 1 dargestellt sind. Die Rezeptoren CCR1, CCR2, CCR5 und CCR6 sowie CXCR1, CXCR2 und CXCR4 sind auf der Oberfläche der unreifen dendritischen Zellen vermehrt vorhanden (prozessierender Phänotyp) (50). Bei Inflammation werden Chemokine ausgeschüttet, die an diese binden. Hierzu zählen beispielsweise RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  und MCP (30). Sozzani et al. konnten zeigen, dass RANTES, MCP-3 und MCP-4 sowie MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  in vitro chemotaktisch auf DCs wirken (39,51). Xu et al. zeigten dies auch für MCP-1 und MCP-2, während diese Chemokine in einer anderen Untersuchung nicht chemotaktisch auf die DCs wirkten (52). Nach Aufnahme von Antigenen verändert sich die Rezeptorausstattung während der Reifung der Zelle. CCR1, CCR2 und CCR5 werden herunterreguliert und CCR4 und CCR7 vermehrt exprimiert (30). Dies führt dazu, dass die Zellen aus dem inflammatorischen

Gewebe auswandern können. Durch die Chemokine MIP-3 $\beta$  (CCL19) und SLC (CCL21), die an CCR7 binden, und TARC, welches an CCR4 bindet, wandern die Zellen über afferente Lymphgefäße in die lymphatischen Organe ein (30,35). Dort gelangen sie über den Randsinus in die T-Zone. Außerdem dienen die Chemokine CCL19 und CCL21 als weitere Signale zur Reifung der DCs (42). Für die Änderung der Rezeptorausstattung scheint vor allem die CD40-Ligation ausschlaggebend zu sein, aber auch IL-1, TNF und Lipopolysaccharide (LPS), die ebenso die Reifung der DCs auslösen können, verändern das Reaktionsverhalten der Zellen auf Chemokine (53).

## **1.6 MitraClip®-Therapie und deren Auswirkungen**

In der vorliegenden Studie wurden Patienten mit Mitralklappeninsuffizienz untersucht, die eine interventionelle Rekonstruktion der Mitralklappe erhalten hatten (MitraClip® der Firma Abbott Vascular, Santa Clara, USA). Für Patienten, die unter einer symptomatischen Mitralklappeninsuffizienz leiden, stellt weiterhin die chirurgische Rekonstruktion der Klappe die erste Wahl der Behandlung dar. Die Indikationsstellung für die interventionelle Behandlung mit einem MitraClip® wird in einem interdisziplinären Herzteam besprochen und erfolgt für jeden Patienten individuell. Für diese Entscheidung von Bedeutung sind insbesondere die Operabilität und die Komorbiditäten des Patienten, und das damit verbundene Risiko, außerdem die linksventrikuläre Funktion, Ursache und Schwere der Mitralklappeninsuffizienz und die Morphologie der Mitralklappe. Die Entscheidung des Herzteams orientiert sich an den Empfehlungen der Leitlinien der Deutschen und Europäischen Gesellschaften für Kardiologie und des EuroSCOREs zur Risikoevaluation vor herzchirurgischen Eingriffen (8,54,55). Die Implantation des MitraClip® wird in Allgemeinanästhesie oder unter tiefer Sedierung durchgeführt und mittels transösophagealer Echokardiographie (TEE) gesteuert und überwacht. Die kathetergestützte Intervention erfolgt über eine Punktion der rechten Vena femoralis. Ein Katheter mit Führungsdraht wird in das rechte Atrium vorgeschoben, von dort gelangt er durch Punktion des Vorhofseptums in das linke Atrium. Über den Katheter kann anschließend der MitraClip® ins linke Atrium einbracht und die Cliparme geöffnet werden. Der Clip

wird durch die Mitralklappe in den linken Ventrikel vorgeschoben und so positioniert, dass er die beiden Segel der Klappe fassen kann. Nach korrekter Positionierung und Verschluss des Clips entsteht auf beiden Seiten des Clips eine kleinere Öffnung, durch die das Blut vom Atrium in den Ventrikel strömen kann. Anschließend wird der Katheter entfernt (54).

In einer Untersuchung von Patzelt et al. konnte durch echokardiographische Messungen belegt werden, dass durch den Mitraclip® nicht nur die Öffnungsfläche zwischen den Segeln geringer wird, sondern sich zusätzlich der Durchmesser des Mitralklappenanulus verkleinert. Insbesondere der anterior-posterior Durchmesser ist auch im Follow-up nach Monaten deutlich geringer als vor der Intervention. Für die Reduktion des Anulusdurchmessers konnte eine negative Korrelation mit der nach der Intervention weiter bestehenden Mitralklappeninsuffizienz gezeigt werden (56).

Durch die Implantation des MitraClip® ändert sich unmittelbar die Hämodynamik des Patienten. Dies wurde unter anderem von Gaemperli et al. an Patienten nach MitraClip®-Intervention gezeigt. Durch die Behandlung der Mitralklappeninsuffizienz und dem dadurch geringeren Rückstrom in den Vorhof wird die Vorlast des linken Ventrikels gesenkt. Der pulmonalarterielle Druck verringert sich, die Kontraktilität bleibt erhalten und der enddiastolische linksventrikuläre Druck ist niedriger als vor der Intervention (57). Patzelt et al. untersuchten die kardiale Auswurfleistung im Zusammenhang mit der MitraClip®-Intervention durch invasive und echokardiographische Messung des Herzzeitvolumens. Bei beiden Messmethoden ergab sich, nach Implantation des Clips, ein höheres Herzzeitvolumen. Außerdem zeigte sich auch in dieser Studie eine Reduktion des systolischen Pulmonalarteriendrucks (58). Ebenso belegte eine Studie von Siegel et al. nach der Intervention eine verbesserte Auswurfleistung des Herzens, die zu einer guten Aufrechterhaltung des mittleren systemischen arteriellen Druckes führt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sowohl das enddiastolische Volumen als auch der Druck im linken Ventrikel gesenkt werden (59,60). Durch die enddiastolisch verringerte Belastung des linken Herzens durch Druck und Volumen scheint es zu einem positiven Reverse-Remodelling des Herzens zu kommen (60).

Feldmann et al. untersuchten in den EVEREST (Endovascular Valve Edge-to-Edge Repair) Studien I und II die MitraClip®-Intervention im Vergleich zur chirurgischen Behandlung der Mitralklappeninsuffizienz. Nach 12 sowie 24 Monaten war kein Unterschied hinsichtlich linksventrikulärer Größe, NYHA-Klasse, Lebensqualität sowie Anzahl verstorbener Patienten nachweisbar. Dennoch war die operative Rekonstruktion, insbesondere bezüglich des Grades der Reduktion der Mitralklappeninsuffizienz und der Notwendigkeit eines erneuten Eingriffs, überlegen. Nach MitraClip®-Intervention traten in den ersten 30 Tagen weniger Komplikationen auf (61,62). Im Follow-up nach fünf Jahren zeigte sich weiter die Überlegenheit der Operation bezüglich der Mitralklappeninsuffizienz. Die Ergebnisse der Symptomkontrolle, des Überlebens und die Struktur des linken Ventrikels blieben jedoch in beiden Gruppen vergleichbar (63,64).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Reduktion der Mitralklappeninsuffizienz insgesamt positive Auswirkungen auf die Hämodynamik der Patienten hat. Die daraus resultierende Minderung der Belastung scheint sich positiv auf die Herzstruktur und demzufolge auf die Pumpleistung des Herzens auszuwirken.

## 2. Fragestellung und Zielsetzung

Durch die zunehmende Alterung der Gesellschaft ist die Herzinsuffizienz eine Diagnose mit besonderer Relevanz in der Medizin. Die häufigsten Ursachen der Herzinsuffizienz sind die koronare Herzerkrankung sowie die arterielle Hypertonie. Darüber hinaus können auch andere Ursachen, wie Kardiomyopathien, Herzrhythmusstörungen und Erkrankungen der Herzklappen zu einer Herzinsuffizienz führen (5). Insbesondere die frühe Diagnose der Herzinsuffizienz ist wichtig für eine frühzeitige, gute Behandlung der Patienten. Hierfür sind neue Biomarker notwendig, die zu einer verbesserten Diagnostik führen, möglicherweise zu einer Therapieentscheidung beitragen und prognostische Bedeutung haben. Aufgrund verschiedener Studien gibt es Hinweise darauf, dass Immunmechanismen und eine systemische Entzündungsreaktion an Pathologien des Herzens beteiligt sind. Die Entzündungsreaktion scheint das Outcome und die Progression einer Herzinsuffizienz negativ zu beeinflussen. Dennoch ist bisher nicht vollständig verstanden, welche Rolle Entzündungsprozesse bei der Herzinsuffizienz spielen. Die bisher beschriebenen Mechanismen beziehen sich vor allem auf Herzinsuffizienz, die als Folge von Myokardschädigung, Ischämie oder bei Atherosklerose entsteht. Wenig untersucht ist dagegen der Mechanismus, der als Folge von Volumenbelastung, zu einer Herzinsuffizienz führt.

Die in die vorliegende Studie eingeschlossenen Patienten erhielten eine interventionelle Rekonstruktion der Mitralklappe mittels MitraClip®. Dies dient als Modell für die Herzinsuffizienz mit einer Volumenbelastung durch Mitralklappeninsuffizienz. Die Intervention hat durch die Reduktion der Regurgitation in den Vorhof positive Auswirkungen auf die Hämodynamik der Patienten. Der MitraClip® stellt deshalb hier ein Modell dar zur Beurteilung der Auswirkungen nach hämodynamischer Veränderung durch die Intervention, insbesondere auf eine mögliche Beteiligung inflammatorischer Zellen und Mediatoren.

Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden je vor dem Eingriff und 6 Monate nach dem Eingriff durchgeführt. Außerdem wurde eine Kontrollgruppe untersucht, die keinen MitraClip® erhalten hatte.

Analysiert wurden die dendritischen Zellen als Initiatoren der zellulären Immunantwort sowie die Serumlevel proinflammatorischer Chemokine im Blut.

Ziel war es, zu untersuchen, ob Unterschiede bei den folgenden Parametern auftreten, wenn die verschiedenen Untersuchungsgruppen miteinander verglichen werden:

- Anzahl der mDCs und pDCs
- Phänotyp/Rezeptorexpression der mDCs und pDCs
- Serumkonzentration der Chemokine MCP-1 (CCL2), MIP-1 $\alpha$  (CCL3), MIP-1 $\beta$  (CCL4), RANTES (CCL5), Eotaxin (CCL11), TARC (CCL17), MIP-3 $\alpha$  (CCL20), GRO $\alpha$  (CXCL1), ENA-78 (CXCL5), IL-8 (CXCL8), MIG (CXCL9), IP-10 (CXCL10) und I-TAC (CXCL11)

Außerdem sollte untersucht werden, ob Korrelationen zwischen den gemessenen Werten und klinischen Parametern bestehen, um Rückschlüsse auf mögliche Zusammenhänge ziehen zu können.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Untersuchungskollektiv und Studienaufbau**

Das Kollektiv der Studie bestand aus 160 Patienten der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, Abteilung Innere Medizin III, Kardiologie und Kreislauferkrankungen. Die eingeschlossenen Patienten erhielten im Zeitraum von Juni 2014 bis März 2017 in einem kathetergestützten Verfahren einen MitraClip® zur Behandlung einer Mitralklappeninsuffizienz. Das für die Studie verwendete Blut wurde vor Beginn des Eingriffs aus der Femoralarterienschleuse entnommen und direkt im Anschluss weiterbearbeitet. Dazu wurde Blut in je einer EDTA-Monovette (ethylene diamine tetraacetic acid), einer Zitrat-Monovette und einer Lithium-Heparin-Monovette bei 1250 g für 10 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge Hettich universal 32R, Hettich GmbH & Co.KG Lab Technology, Tuttlingen, Deutschland). Nachdem das Blut nach etwa 30 Minuten geklottet war, wurde der Vorgang mit der Serum-Monovette wiederholt. Je zweimal 1000 µl des Plasma- und Serum- Überstandes wurden abpipettiert und in Reaktionsgefäßen bei -80 °C in einer Biobank asserviert. Ebenso Vollblut in zwei kleinen EDTA-Monovetten.

Nach 6 Monaten wurden nach einer erneuten Blutentnahme die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen erneut durchgeführt. Hierfür wurde das Blut aus einer peripheren Vene entnommen.

Zudem wurde eine Kontrollgruppe mit 40 Patienten erstellt. Diese bestand aus zufällig ausgewählten Patienten des Herzkatheterlabors der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, Abteilung Innere Medizin III.

Für die Durchführung des Immunoassays wurden die asservierten Plasma-Aliquots verwendet, die aus dem Zitratblut gewonnen worden waren. Diese waren bis zur Durchführung bei -80 °C asserviert. Alle Patienten, die in die Studie eingeschlossen waren, wurden über die Teilnahme aufgeklärt und stimmten dieser schriftlich zu. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Tübingen genehmigt (Ethikvota: 270/2011B01, 260/2015R und 757/2018B02).

### 3.2 Durchflusszytometrie

Sowohl die Analyse der dendritischen Zellen als auch die des Immunoassays erfolgte mittels Durchflusszytometrie, auch als FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) bezeichnet.

Für die Analyse der dendritischen Zellen wurde das Gerät BD FACSCalibur™ verwendet, für die Auswertung des Immunoassay das BD FACSLyric™. Beides sind Geräte der Firma BD Biosciences (Becton Dickinson Biosciences GmbH, Franklin Lakes, USA). Mithilfe der Durchflusszytometrie können Zelltypen und deren exprimierte Oberflächenrezeptoren bestimmt werden. Das Durchflusszytometer beinhaltet eine Durchflussmesszelle, Laser als Lichtquelle, Filter zur Auftrennung der Fluoreszenzsignale, Detektoren und Signalverstärker. Die Zellen werden in das Gerät aufgenommen und treffen einzeln auf einen Laserstrahl. Es entstehen ein Streulicht und, je nach verwendetem Farbstoff, ein Fluoreszenzsignal, welche durch Photodetektoren aufgenommen werden. Anhand des durch die Zellstruktur entstehenden Streulichts können die Zellen nach Größe (Vorwärtsstreulicht, „Forward scatter“, FSC) und Granularität (Seitwärtsstreulicht, „Side scatter“, SSC) aufgetrennt und charakterisiert werden. Zur Differenzierung der dendritischen Zellen wurden außerdem monoklonale Antikörper verwendet, die mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythin (PE), Allophycocyanin (APC) und Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) konjugiert sind. Die Farbstoffe auf den Antikörpern, die spezifisch an Oberflächenstrukturen binden, werden durch den Laserstrahl angeregt und senden dem Fluoreszenzfarbstoff entsprechende Lichtsignale an die Detektoren des Gerätes. So können weitere Eigenschaften der Zellen, wie die Expression von Proteinen an der Zelloberfläche, detektiert werden. Die gemessenen Daten wurden anschließend mithilfe spezieller Computerprogramme ausgewertet (65).

Auch bei dem durchgeführten Immunoassay wurden Fluoreszenzsignale von konjugierten Antikörpern detektiert, welche an die zu bestimmenden Analyten gebunden haben. Das emittierte Fluoreszenzlicht ist proportional zur Zahl der gebundenen Fluorochrommoleküle. Zur Auswertung der Daten wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Messungen verwendet.

### 3.3 Analyse proinflammatorischer Chemokine mittels Immunoassay

Für die Studie wurde das LEGENDplex™ Assay für humane proinflammatorische Chemokine (13-plex) der Firma BioLegend® (San Diego, Kalifornien) verwendet (Cat. No. 740003). Es handelt sich hierbei um ein Bead-basiertes Immunoassay. Mit dem Assay wurde über die mittlere Fluoreszenzintensität in der Durchflusszytometrie die Konzentration 13 verschiedener Chemokine quantitativ bestimmt. Dies waren die CC-Chemokine MCP-1 (CCL2), MIP-1 $\alpha$  (CCL3), MIP-1 $\beta$  (CCL4), RANTES (CCL5), Eotaxin (CCL11), TARC (CCL17) und MIP-3 $\alpha$  (CCL20) sowie die CXC-Chemokine GRO $\alpha$  (CXCL1), ENA-78 (CXCL5), IL-8 (CXCL8), MIG (CXCL9), IP-10 (CXCL10) und I-TAC (CXCL11).

Für den Assay wurden Blutproben der 160 Patienten in einer Citrat-Monovette für 10 Minuten bei 1250 g zentrifugiert und 1000  $\mu$ l des Überstands gewonnen. Die Proben wurden bis zur Durchführung des Assays bei -80 °C aufbewahrt.

Der Assay wurde nach Herstelleranleitung mit den im Kit enthaltenen Reagenzien durchgeführt. Verwendet wurde außerdem eine 96-well Mikroplatte (Polypropylen, V-Boden), wovon in 2 mal 8 Wells (Well = engl. für „Schacht“) die Standardkurve pipettiert wurde, in den übrigen Wells die Proben von 20 Patienten prä- und post-MitraClip®, in jeweils doppeltem Ansatz. Ebenso wurde mit den Proben der Kontrollgruppe verfahren.

Bei den verwendeten Beads lassen sich zwei Gruppen mit unterschiedlicher Größe und Granularität voneinander abgrenzen sowie eine unterschiedlich starke APC-Fluoreszenzintensität innerhalb der Gruppen detektieren. Insgesamt sind 6 Beads der Gruppe A und 7 Beads der Gruppe B enthalten, die jeweils einen für einen Analyten spezifischen Antikörper auf der Oberfläche tragen. Jedes Chemokin im zugegebenen Blutplasma bindet an entsprechende Beads. Außerdem wurden dem Ansatz biotinylierte Detektions-Antikörper zugefügt, die an den Analyten auf den Beads binden. Nach zwei Stunden Inkubationszeit wurde Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) zugegeben, welches durch die starken Wechselwirkungen mit Biotin an die Detektions-Antikörper bindet und ein Fluoreszenzsignal proportional zur Menge des gebundenen Analyten erzeugt. Die Funktionsweise des Assays ist in Abbildung 2A dargestellt. Nach zwei

Waschschritten wurde der Assay mit dem BD FACSLyric™ analysiert. Hierbei wurden zunächst die zwei Gruppen an Beads anhand der Größe und Granularität der Beads voneinander abgegrenzt (Abbildung 2B). Anschließend wurde für die Bead-Gruppen mit unterschiedlichen APC-Fluoreszenzsignalen die Fluoreszenzintensität des PE-Signals gemessen, was der Menge der jeweils gebundenen Chemokine entspricht (Abbildungen 2C und 2D).

Zur Auswertung des Assays wurde die dem Kit beiliegende Software LEGENDplex™ der Firma BD verwendet.

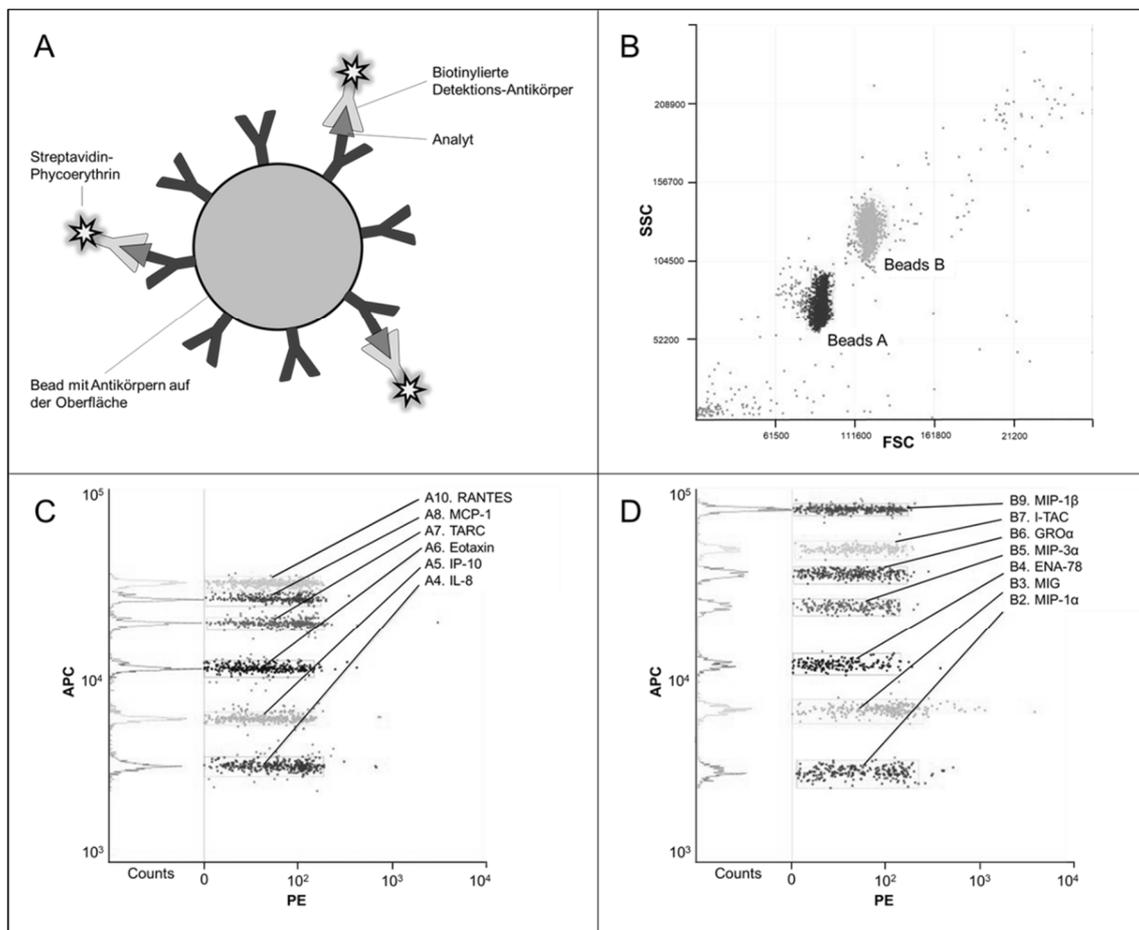


Abbildung 2: Multiplex-Chemokine-Assay

**A:** Schematische Darstellung der Funktionsweise des Assays: Zu den Beads, mit spezifischen Antikörpern auf der Oberfläche, wurde die zu analysierende Lösung gegeben. Die Analyten binden an die für sie spezifischen Antikörper auf den Beads. Die anschließend zugegebenen biotinylierten Detektions-Antikörper binden an die Analyten. Anschließend wurde Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) zugegeben, welches, durch die starken Wechselwirkungen mit Biotin, an die Detektions-Antikörper bindet und ein Fluoreszenzsignal proportional zur Menge des gebundenen Analyten erzeugt.

**B:** Zu sehen sind die beiden Bead Gruppen A und B, die sich durch ihre Größe (FSC) und ihre Granularität (SSC) voneinander abgrenzen lassen.

**C und D:** Insgesamt sind 6 Beads der Gruppe A und 7 Beads der Gruppe B im Ansatz enthalten. Die Bead-Gruppen wurden getrennt voneinander analysiert. Sie enthalten jeweils Beads mit unterschiedlichen APC-Fluoreszenzsignalen, von denen jeweils die Fluoreszenzintensität des PE-Signals gemessen wird, was der Menge des jeweils gebundenen Analyten entspricht. (66)

FSC: Forward scatter, SSC: Side scatter, APC: Allophycocyanin, PE: Phycoerythrin

### **3.4 Korrelationen mit klinischen Parametern**

Die Daten des Immunoassays wurden mit verschiedenen klinischen Parametern korreliert. Die Korrelationsanalysen erfolgten mit den Chemokinkonzentrationen im Serum vor der Intervention sowie der Veränderung der Chemokinkonzentrationen zwischen dem Zeitpunkt vor der Intervention und dem Follow-up (Differenz aus MFI im Follow-up und präinterventionell). Für folgende Parameter wurden die Analysen durchgeführt:

- Mitralklappeninsuffizienz vor der Intervention
- Reduktion der Mitralklappeninsuffizienz durch die Intervention
- LVEDD (Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser) vor der Intervention mittels TEE
- 6-Minuten-Gehtest
- Anzahl der herzinsuffizienzbedingten Krankenhauseinweisungen im Zeitraum von 19 Monaten nach der Intervention
- Zeitraum bis zur Wiederaufnahme ins Krankenhaus nach der Intervention

Die klinischen Daten wurden während des Aufenthaltes in der Klinik sowie anhand telefonischer Befragungen erhoben. Der 6-Minuten-Gehtest wurde unter standardisierten Bedingungen in der Klinik durchgeführt.

### **3.5 Analyse dendritischer Zellen mittels Durchflusszytometrie**

Das Patientenkollektiv der im Folgenden beschriebenen Untersuchung bestand aus 68 Patienten. Diese stellten eine Subpopulation des untersuchten Gesamtkollektivs dar. Zur Färbung der Zellen für die Durchflusszytometrie wurde Vollblut in einer Lithium-Heparin Monovette verwendet. Zunächst wurde mithilfe des Hämatologieanalyzers (Sysmex-21N, Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) ein Blutbild des Patienten erstellt. Für die anschließende Analyse wurden je 300 µl Lithium-Heparin-Vollblut in 9 Round-Bottom-Tubes (engl. für „Röhrchen“) pipettiert. Hinzu kamen jeweils 3 ml Pufferlösung. Der Ansatz wurde mittels Vortex-Mischer durchmischt und dann mit 300 g für 5 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge Heraeus Multifuge 3S+,

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Anschließend wurde mithilfe eines Absaugsystems mit Vakuumpumpe der Überstand abgesaugt. Der Buffy-Coat wurde im Tube belassen. Um die Erythrozyten zu lysieren, wurden je 3 ml Ammonium-Chlorid zum Pellet gegeben und mittels Vortex-Mischer gut gemischt. Danach wurden die Tubes für 10 Minuten auf Eis inkubiert und nach 5 und 10 Minuten erneut durchgemischt. Sobald der Probenansatz nicht mehr trüb war, wurde mit 300 g für 5 Minuten wiederum zentrifugiert und anschließend der Überstand komplett abgesaugt.

Zu den am Boden der Tubes anhaftenden Pellets wurden 3 ml Pufferlösung gegeben, erneut mit dem Vortex-Mischer gemischt, mit 450 g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand komplett abgesaugt. Im nächsten Schritt wurden in jede Probe 50 µl Blocking-Solution hinzugefügt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit je 2 ml Pufferlösung aufgefüllt. Wiederum wurde mit 450 g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Röhrchen wurden abschließend beschriftet (1.1-1.4 und 2.1-2.4) und die Antikörper sowie Antikörper-Lösungen nach dem in der Tabelle 3 angegebenen Schema hinzugefügt. Die Zusammensetzung der Antikörper-Lösungen ist im anschließenden Kapitel angegeben.

*Tabelle 3: Antikörper-Pipettierschema*

*Schema der zugefügten Antikörper und Antikörper-Lösungen der Tubes 1.1-1.4 und 2.1-2.4 mit Mengenangabe.*

	<b>Antikörper-Lösung 1</b> <b>40 µl</b>	<b>Antikörper-Lösung 2</b> <b>40 µl</b>
CD1c-PE, human 10 µl	1.1	2.1
DC303-PE, human 10 µl	1.2	2.2
IgG1-PE, Maus 10 µl	1.3	2.3
IgG2a-PE, Maus 10 µl	1.4	2.4

Einer Probe wurden anstatt der Antikörper 50 µl Pufferlösung zugefügt. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Ansätze vor Lichtexposition geschützt und zunächst 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Ansätze mit je 3 ml Pufferlösung resuspendiert, bei 450 g für 5 Minuten zentrifugiert und der

Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden dann mit 250 µl der 1 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert und für 10 Minuten lichtgeschützt inkubiert, nachfolgend mit je 3 ml Pufferlösung aufgefüllt, mit 450 g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand erneut abgesaugt. Im letzten Schritt wurde zu jedem Ansatz 300 µl Pufferlösung hinzugefügt. Die Ansätze wurden anschließend bis zur Analyse, die noch am selben Tag erfolgte, lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

Die Messung erfolgte mit dem Durchflusszytometer BD FACSCalibur™ und der CellQuest™-Software des Unternehmens BD Biosciences. Zur Kalibrierung des Gerätes wurde eine Messung mit dem ungefärbten Ansatz durchgeführt. Um unspezifische Antikörperbindungen zu detektieren, wurden außerdem Proben mit Immunglobulin G1 und G2a (IgG1 und IgG2a) als Isotypenkontrollen gemessen. Im Anschluss an alle Messungen erfolgte die Auswertung der Daten mit der Software FlowJo (Tree Star, Ashland, USA).

Für die Analyse der dendritischen Zellen wurde ein bestimmtes Gating-Schema verwendet. Grundlage hierfür war die Zellpopulation der Leukozyten. Die Granulozyten wurden durch ihre Granularität im SSC ausgeschlossen sowie ebenso die Monozyten durch eine CD14-Markierung und die B-Lymphozyten durch eine Markierung mit CD19. Anschließend wurden die beiden Untergruppen der DCs durch ihre Oberflächenmoleküle identifiziert (vergleiche Abbildung 1), die mDCs über CD1c (Blood dendritic cell antigen, BDCA-1) und die pDCs über CD303 (BDCA-2). Ermittelt wurde so der prozentuale Anteil der jeweiligen DC-Population an den Leukozyten. Für die mDCs und pDCs wurde außerdem jeweils die MFI der Oberflächenmarker CD40, HLA-DR, CD86 und CD11a gemessen.

### 3.6 Antikörper, Reagenzien und Lösungen

#### Pufferlösung

- 5g Bovines Serumalbumin (BSA), Albumin Fraction V, pH 7.0  
(*Pan Reac, AppliChem GmbH, ITW Reagents, Darmstadt, Deutschland*)
- 1g Na-Azid/4 ml 4 % Na-Azid-Lösung, Natriumazid  $\geq 99$  % p.a.  
(*ROTH, Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland*)
- 2 Phosphate Buffered Saline (PBS) Tabletten  
(*gibco® life technologies TM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA*)
- 1000 ml Destilliertes Wasser

#### Ammonium-Chlorid-Lösung

- 4,4 g Ammonium-Chlorid,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , Molecular biology grade  
(*Pan Reac, AppliChem GmbH, ITW Reagents, Darmstadt, Deutschland*)
- 0,5 g Kaliumhydrogencarbonat,  $\text{KHCO}_3$   
(*MERCK, Darmstadt, Deutschland*)
- 100  $\mu\text{l}$  EDTA, Ultra Pure™, 0,5 M EDTA, pH 8.0  
(*Thermo Fisher Scientific, Waltham, US*)
- 500 ml Destilliertes Wasser

#### 1 % PFA-Lösung

- 10 ml 4 % Paraformaldehyd-Lösung (PFA), neutral gepuffert, mit Methanol stabilisiert  
(*Otto Fischer GmbH & Co.KG, Saarbrücken, Deutschland*)
- 30 ml Phosphate Buffered Saline (PBS)  
(*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland*)

#### FcR-Blocker-Lösung

- 140  $\mu\text{l}$  FcR Blocking Reagent, human  
(*MACS Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland*)
- 560  $\mu\text{l}$  hergestellte Pufferlösung (siehe oben)

### Antikörper-Lösung 1

- 11 µl CD40, FITC anti-human CD 40, Clone G28.5
- 11 µl CD86, APC anti-human CD 86, Clone IT2.2
- 11 µl CD14, PerCPCy5.5 anti-human CD 14, Clone M5E2
- 11 µl CD19, PerCPCy5.5 anti-human CD19, Clone HIB19  
(*BioLegend®*, San Diego, Kalifornien)
- 132 µl hergestellte Pufferlösung (siehe oben)

### Antikörper-Lösung 2

- 11 µl CD11a, FITC anti-human CD 11a, Clone HI111
- 11 µl HLA-DR, APC anti-human HLA-DR, Clone L243
- 11 µl CD14, PerCPCy5.5 anti-human CD 14, Clone M5E2
- 11 µl CD19, PerCPCy5.5 anti-human CD19, Clone HIB19  
(*BioLegend®*, San Diego, Kalifornien)
- 132 µl hergestellte Pufferlösung (siehe oben)

### Weitere verwendete Antikörper:

- CD1c (BDCA-1)-PE, human
- CD303 (BDCA-2)-PE, human
- IgG1 Mouse IgG1-PE
- IgG2a Mouse IgG1-PE  
(*MACS Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland*)

## 3.7 Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien

- Monovetten
  - Rot 2,7 ml (K2E: 1,6 mg EDTA/ ml Blut) 66x11 mm
  - Rot 9,0 ml (K3E: 1,6 mg EDTA/ ml Blut) 92x16 mm
  - Grün 10 ml (9NC: 0,106 mol/l) 92x16 mm
  - Orange 5,5 ml (LH: 16 I.U./ml) 75x15 mm
  - Weiß 7,5 ml (Z: clot activator) 92x15 mm  
(*Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht, Deutschland*)

- Rotilabo®-Reaktionsgefäße 1,5 ml (verschiedene Farben)  
(*Carl Rothe GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland*)
- Polystyrene Round-Bottom Tube, 12x75 mm  
(*BD Biosciences, Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA*)
- Pipetten verschiedener Größen (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)  
(*Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland*)
- Mehrkanalpipette, 30-300 µl  
(*Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland*)
- Multipette®plus  
(*Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland*)
- Ratiolab Pipettenspitzen, 200-1200 µl  
(*Ratiolab GmbH, Deieich, Deutschland*)
- Pipettenspitzen Sarstedt, 200 µl  
(*Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht, Deutschland*)
- Pipettenspitzen Biozym Scientific, 10 µl  
(*Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland*)
- epT.I.P.S.® Reloads 20-300 µl, 10x96, Pipettenspitzen  
(*Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland*)
- Combitips advanced®, 0,5 ml, Pipettenspitzen  
(*Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland*)
- accu-jet® pro Pipettierhelfer  
(*BRAND GmbH & Co.KG, Wertheim am Main, Deutschland*)
- Corning Costar Stripette®, 10ml, für Pipettierhelfer  
(*Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*)
- Mikroplatte 96-well, PP, V-Boden, natur  
(*Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland*)

### 3.8 Geräte

- Sicherheitswerkbank HeraSafe, Heraeus  
(*Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA*)
- Zentrifuge Heraeus Multifuge 3S+  
(*Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA*)

- Zentrifuge Hettich Universal 32R  
(*Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA*)
- Zentrifuge Hettich Rotina 420R  
(*Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Lab Technology, Tuttlingen, Deutschland*)
- Hämatologieanalysator, Symex-21N  
(*Symex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland*)
- Absaugsystem Vacusafe comfort  
(*INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland*)
- Vortexmischer VF2  
(*Janke & Kunkel/IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau, Deutschland*)
- Mikrotiterplattenschüttler  
(*Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA*)
- BD FACSCalibur™flow cytometer  
(*BD Biosciences, Becton Dickson GmbH Franklin Lakes, USA*)
- BD FACSLyric™  
(*BD Biosciences, Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA*)

### 3.9 Statistische Auswertung

Zur Auswertung der Daten wurden die Programme Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA), JMP13® (Statistical Discovery.™, SAS Corporation, Cary, North Carolina, USA) und SSPS Statistics 25 (IMB Corporation, Armonk, New York, USA) verwendet. Um Fehler durch Messungenauigkeiten und unpräzises Pipettieren zu vermindern, wurden die Anzahl der DCs und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des Multiplex-Assays für jeden Patienten jeweils in zwei verschiedenen Ansätzen gemessen. Für die Auswertung wurde der geometrische Mittelwert der zwei gemessenen Werte berechnet. Es wurde untersucht, ob es einen Unterschied in Anzahl und Phänotyp der DCs sowie den Chemokinkonzentrationen im Blut gibt, wenn die Werte der Patienten vor dem MitraClip® mit ihren Werten im Follow-up verglichen werden. Für den Vergleich zwischen den Werten vor und nach dem

Eingriff wurde ein t-Test für verbundene Stichproben durchgeführt. Um eine Normalverteilung der zu untersuchenden Größe zu erreichen, wurde die Differenz der natürlichen Logarithmen der zu vergleichenden Werte für die Auswertung verwendet. Es wurde im t-Test verglichen, ob die Wertequotienten der einzelnen Patienten von Follow-up zu Prä-MitraClip® eine signifikante Veränderung zeigen. Aus den so entstandenen Wertequotienten wurden der arithmetische Mittelwert und die Grenzen seines 95%-Konfidenzintervalls errechnet und diese anschließend mit  $e^x$  wieder zurück transformiert. Der so entstandene Mittelwert der Quotienten von Follow-up zu Prä-MitraClip® (im Folgenden  $M_Q$  bezeichnet) und dessen 95%-Konfidenzintervall (95% KI) werden nachfolgend jeweils für die dendritischen Zellen und die untersuchten Chemokine genannt. Zum Vergleich der DCs der Patientengruppe mit der Kontrollgruppe sowie der MFI der einzelnen Chemokine von vor und nach dem MitraClip® mit der entsprechenden MFI der Kontrollgruppe wurde der Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben verwendet. Verglichen wurde hier der Median der Absolutwerte der Gruppen für die untersuchten Größen. Sowohl beim t-Test als auch beim Wilcoxon-Test wurde ein p-Wert  $< 0.05$  als statistisch signifikant angesehen. Signifikante Ergebnisse sind nachfolgend mit einem \* markiert. Für die Korrelationen mit klinischen Parametern wurde die Korrelationsanalyse nach Spearman angewandt. Ein Korrelationskoeffizient ( $K$ ) von 0 gibt an, dass kein linearer Zusammenhang zwischen den untersuchten Parametern besteht. Positive und negative Zusammenhänge werden durch Korrelationskoeffizienten zwischen 0 und 1, beziehungsweise 0 und -1 angezeigt. Die Stärke des Zusammenhangs lässt sich anhand des p-Wertes beurteilen. Auch bei den Korrelationsanalysen wurde ein p-Wert  $< 0.05$  als statistisch signifikant angesehen.

## 4. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Analyse von mDCs und pDCs im Hinblick auf Anzahl und Phänotyp dargestellt. Außerdem die Ergebnisse des Multiplex-Chemokin-Assays für die einzelnen Chemokine.

Die grafische Darstellung erfolgt mittels Box-Whiskers-Plots. Die Box stellt den Interquartilsabstand dar. In diesem Bereich liegen die mittleren 50 % aller Daten. Die Enden der Box markieren also das 75. Perzentil und das 25. Perzentil der Daten. Der Median, als Lagemaß, ist durch eine Linie innerhalb der Box gekennzeichnet. 50 % der Daten sind kleiner als der Median und 50 % größer als dieser. Die Whisker haben die maximale Länge des 1,5-fachen Interquartilsabstandes. Ausreißer außerhalb dieses Bereiches sind nicht dargestellt.

Sowohl beim t-Test als auch beim Wilcoxon-Test wurde ein p-Wert  $< 0.05$  als statistisch signifikant angesehen. Signifikante Ergebnisse sind nachfolgend mit einem \* markiert.

### 4.1 Patientencharakteristika

Für die vorliegende Arbeit wurden die Ergebnisse des Chemokin-Immunoassays von 160 Patienten ausgewertet. Verglichen wurden jeweils die Werte der Blutentnahme vor der Intervention und im Follow-up. Die mittlere Dauer zwischen der Intervention und dem Follow-up betrug 7.9 Monate. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der MitraClip®-Implantation lag zwischen 42 und 90 Jahren, für das mittlere Alter ergab sich somit 77.1 Jahre. Der Anteil der Männer betrug 58.1 %. Außerdem wurde eine Kontrollgruppe, bestehend aus 40 Patienten, erstellt. Dies waren zufällig ausgewählte Patienten des Herzkatheterlabors der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen. Die Kontrollgruppe bestand zu 85.0 % aus männlichen Patienten und das mittlere Alter betrug 63.6 (zwischen 23 und 86) Jahre.

Die weitere Charakterisierung der untersuchten Gruppen ist in Tabelle 4 dargestellt. Die Analyse der dendritischen Zellen erfolgte an einer Subpopulation von 86 Patienten, deren Charakteristika nicht gesondert aufgeführt sind.

Tabelle 4: Patientencharakteristika

Charakteristika der in die Studie eingeschlossenen Patienten. Bei den Patienten, die einen MitraClip® erhielten, erfolgte die Erhebung der Daten präinterventionell.

N: Anzahl der in der Gruppe untersuchten Patienten, KHK: Koronare Herzkrankheit, NYHA: New York Heart Association, ACE: Angiotensin Converting Enzyme

	MitraClip®-Patienten (N=160)		Kontrollgruppe (N=40)	
Alter	77.7 (42-90) Jahre		63.6 (23-86) Jahre	
Geschlecht, männlich	93	58.1 %	34	85.0 %
KHK	117	73,1 %	31	77.5 %
Vorhofflimmern	106	66.3 %	9	22.5 %
Hypertension	110	68.8 %	30	75.0 %
Hyperlipoproteinämie	69	43.1 %	20	50.0 %
Diabetes	41	25.6 %	8	20.0 %
Niereninsuffizienz	69	43.2 %	6	15.0 %
Raucher	25	15.6 %	12	30.0 %
NYHA-Klasse				
- Klasse II	29	18.1 %		
- Klasse III	99	61.9 %		
- Klasse IV	30	18.8 %		
- Nicht klassifiziert	2	1.3 %		
Linksventrikuläre Funktion				
- ≤ 35 %	73	45.6 %		
- 36-50 %	46	28.8 %		
- > 50 %	41	25.6 %		
Ätiologie der Mitralklappeninsuffizienz				
- funktional	69	43.1 %		
- degenerativ	54	33.8 %		
- gemischt	28	17.5 %		
- nicht charakterisiert	9	5.6 %		
Betarezeptorblocker	135	84.4 %	29	72.5 %
Aldosteronrezeptorantagonisten	91	56.9 %	10	25.0 %
ACE-Inhibitoren/ Angiotensinrezeptorantagonisten	137	85.6 %	23	57.5 %
Diuretika	142	88.8 %	16	40.0 %
Digitalis	14	8.8 %	1	2.5 %
Kalziumantagonisten	28	17.5 %	10	25.0 %
Antikoagulation	110	68.8 %	11	27.5 %

## 4.2 Multiplex-Assay, Ergebnisse der Chemokine in Gruppen

### 4.2.1 MIP-1 $\alpha$ (CCL3)

Die MFI des Chemokins MIP-1 $\alpha$  lag vor dem MitraClip<sup>®</sup> zwischen 45.4 und 2273.6, in der Verlaufskontrolle nach der Intervention zwischen 42.3 und 3523.7. Der arithmetische Mittelwert des Quotienten aus den Werten von Follow-up zu Prä-MitraClip<sup>®</sup> ( $M_Q$ ) betrug 0.90. Im t-Test zeigte sich eine signifikante Reduktion der MFI zum Zeitpunkt des Follow-up im Vergleich zu vor der Intervention ( $M_Q = 0.90$ , 95% KI = 0.84 - 0.97,  $p = 0.0058$ ). Dies entspricht einer Reduktion um 10 % nach der Intervention im Vergleich zum Wert davor. In der Kontrollgruppe lag die MFI zwischen 51.9 und 180.2. Vergleicht man die MFI-Werte der Kontrollgruppe mit den entsprechenden Werten der Patienten vor dem MitraClip<sup>®</sup> und im Follow-up, so zeigten sich im Wilcoxon-Test keine signifikanten Unterschiede.

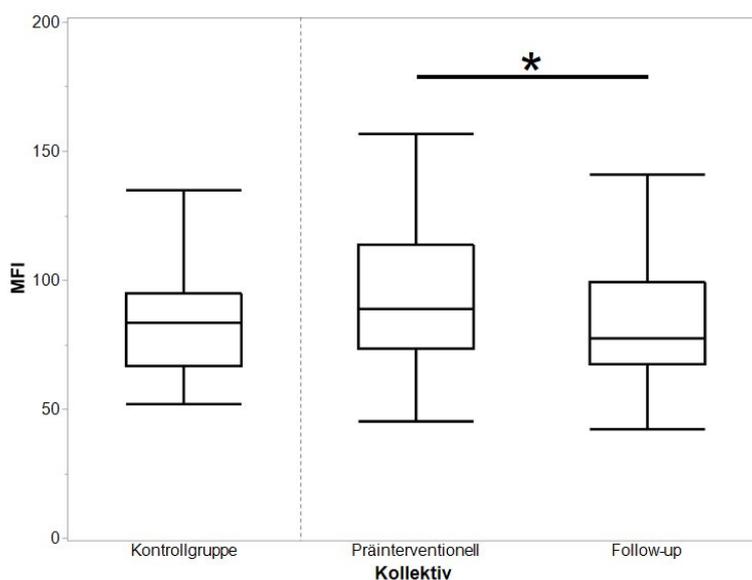


Abbildung 3: MFI von MIP-1 $\alpha$  aus dem Multiplex-Chemokine-Assay

Verglichen werden die Daten der Patienten präinterventionell und im Follow-up sowie die der Kontrollgruppe. Die MFI für MIP-1 $\alpha$  ist im Follow-up signifikant geringer im Vergleich zu vor der Intervention. Die MFI der Kontrollgruppe ist geringer als vor der Intervention, jedoch höher als im Follow-up.

Kontrollgruppe (N=40): Median= 83.5, Min= 51.9, Max= 180,0

Präinterventionell (N=160): Median= 89.1, Min= 45.4, Max= 2273.6

Follow-up (N=160): Median= 77.7, Min= 42.3, Max= 3523.7

Die Grafik zeigt den Median, das 1. und 3. Quartil sowie den 1,5-fachen Interquartilsabstand

\*  $p < 0.05$

MIP: macrophage inflammatory protein, MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität, N: Anzahl der in der Gruppe untersuchten Patienten

#### 4.2.2 MIP-1 $\beta$ (CCL4)

Für MIP-1 $\beta$  zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie für MIP-1 $\alpha$ . Bei einer MFI vor der Intervention zwischen 61.0 und 2791.6 sowie in der Verlaufskontrolle zwischen 56.5 und 1063.6 ergab sich mit  $M_Q = 0.93$  (95% KI = 0.88 – 0.97) im t-Test ein signifikanter Unterschied ( $p = 0.0025$ ). Im Vergleich zu vor der Intervention handelt es sich in der Verlaufskontrolle um eine Reduktion der MFI um 7 %. Außerdem ergab sich im Wilcoxon-Test mit  $p = 0.0483$  ein signifikanter Unterschied zwischen der MFI der Kontrollgruppe und der MFI der Untersuchung im Follow-up. Die MFI der Kontrollgruppe war signifikant höher als die MFI der Patientengruppe zum Zeitpunkt des Follow-up. Der Vergleich der MFI zwischen der Untersuchung vor der Intervention und der Kontrollgruppe zeigte keinen signifikanten Unterschied.

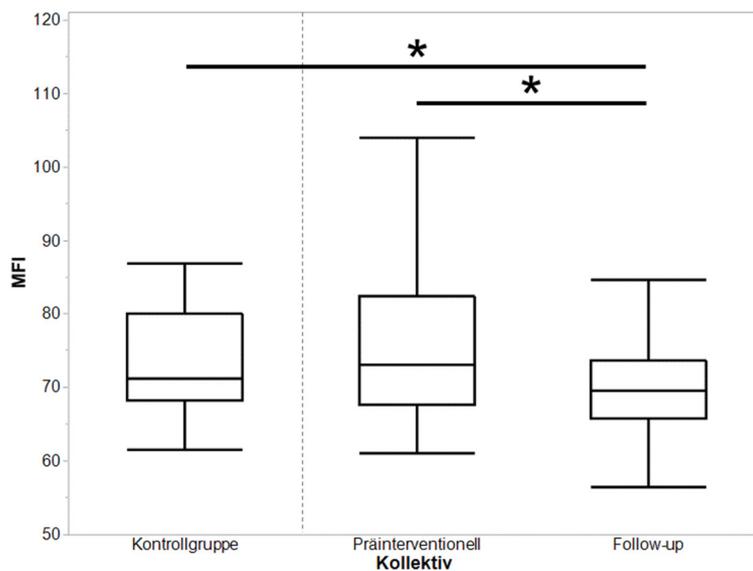


Abbildung 4: MFI von MIP-1 $\beta$  aus dem Multiplex-Chemokine-Assay.

Verglichen werden die Daten der Patienten präinterventionell und im Follow-up sowie die der Kontrollgruppe. Die MFI für MIP-1 $\beta$  ist im Follow-up signifikant niedriger im Vergleich zu vor der Intervention. Die MFI der Kontrollgruppe ist signifikant höher im Vergleich zum Follow-up.

Kontrollgruppe (N=40): Median = 71.2, Min = 61.4, Max = 523.0

Präinterventionell (N=160): Median = 73.0, Min = 61.0, Max = 2792.0

Follow-up (N=160): Median = 69.5, Min = 56.5, Max = 1063.6

Die Grafik zeigt den Median, das 1. und 3. Quartil sowie den 1,5-fachen Interquartilsabstand

\*  $p < 0.05$

MIP: macrophage inflammatory protein, MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität, N: Anzahl der in der Gruppe untersuchten Patienten

### 4.2.3 MCP-1 (CCL2)

Für MCP-1 lag die MFI nach der Intervention geringfügig höher als davor ( $M_Q = 1.06$ , 95% KI = 0.99 – 1.14). Im Wilcoxon-Test zeigte sich ein signifikant niedrigerer Wert der Kontrollgruppe ( $Med = 1806.6$ ,  $Min = 501.5$ ,  $Max = 8804.8$ ) im Vergleich zu vor dem MitraClip® ( $Med = 2050.4$ ,  $Min = 387.6$ ,  $Max = 8874.9$ ,  $p = 0,0066$ ) und im Vergleich zum Follow-up ( $Med = 2196.0$ ,  $Min = 404.8$ ,  $Max = 4809.4$ ,  $p = <0.0001$ ).

### 4.2.4 TARC (CCL17)

Für TARC zeigte sich eine minimal niedrigere MFI im Follow-up im Vergleich zu vor der Intervention ( $M_Q = 0.99$ , 95% KI = 0.94 – 1.04). Dieser Unterschied ist im t-Test nicht signifikant. Die Werte der Kontrollgruppe ( $Med = 132.5$ ,  $Min = 104.2$ ,  $Max = 364.2$ ) waren sowohl im Vergleich zu den Werten vor der Intervention ( $Med = 147.3$ ,  $Min = 94.7$ ,  $Max = 2240.9$ ,  $p = 0,0224$ ) signifikant niedriger als auch verglichen mit den Werten zum Zeitpunkt des Follow-up ( $Med = 144.4$ ,  $Min = 110.8$ ,  $Max = 828.3$ ,  $p = 0.0072$ ).

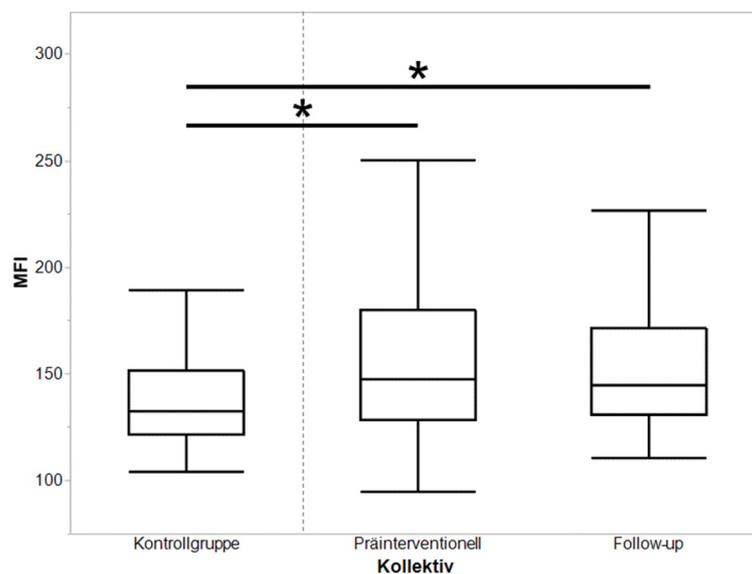


Abbildung 5: MFI von TARC aus dem Multiplex-Chemokine-Assay

Verglichen werden die Daten der Patienten präinterventionell und im Follow-up sowie die der Kontrollgruppe. Die MFI für TARC ist im Follow-up niedriger im Vergleich zu vor der Intervention. Die MFI der Kontrollgruppe ist signifikant niedriger als vor der Intervention und signifikant niedriger als im Follow-up.

Kontrollgruppe (N=40):  $Med = 132.5$ ,  $Min = 104.2$ ,  $Max = 364.2$

Präinterventionell (N=160):  $Med = 147.3$ ,  $Min = 94.7$ ,  $Max = 2240.89$

Follow-up (N=160):  $Med = 144.4$ ,  $Min = 110.8$ ,  $Max = 828.3$

Die Grafik zeigt den Median, das 1. und 3. Quartil sowie den 1,5-fachen Interquartilsabstand

\*  $p < 0.05$

TARC: thymus- and activation-related chemokine, MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität, N: Anzahl der in der Gruppe untersuchten Patienten

#### 4.2.5 RANTES (CCL5)

Bei der Auswertung der MFI für das Chemokin RANTES zeigte sich die höchste MFI im Follow-up. Die Werte zu diesem Zeitpunkt waren im t-Test signifikant höher als die Werte vor der Intervention ( $M_Q = 1.67$ ,  $95\% KI = 1.46 - 1.90$ ,  $p = <0.0001$ ). Die MFI der Patientengruppe war zu beiden Zeitpunkten höher als die MFI der Kontrollgruppe ( $Med = 269.2$ ,  $Min = 93.6$ ,  $Max = 28210.9$ ). Im Wilcoxon-Test war der Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Patientengruppe zum Zeitpunkt des Follow-up signifikant ( $Med = 525.5$ ,  $Min = 112.7$ ,  $Max = 6559.3$ ,  $p = <0.0001$ ).

#### 4.2.6 Interferon- $\gamma$ -induzierte Chemokine: MIG (CXCL9), IP-10 (CXCL10) und I-TAC (CXCL11)

Im Multiplex Chemokine-Assay wurden MIG (CXCL9), IP-10 (CXCL10) und I-TAC (CXCL11) als Interferon- $\gamma$ -induzierte Chemokine analysiert. Bei allen drei Chemokinen war ein Abfall der MFI nach der Intervention im Vergleich zu vor der Intervention zu beobachten. Die MFI für IP-10 vor dem Eingriff lag zwischen 233.9 und 18314.3 und in der Verlaufskontrolle zwischen 341.3 und 24127.0. Der Mittelwert des Quotienten der Werte aus Follow-up zu Prä-MitraClip<sup>®</sup>  $M_Q$  war 0.88 ( $95\% KI = 0.78 - 0.99$ ,  $p = 0.0391$ ), was einer Reduktion um 12 % entspricht. Für I-TAC ergab sich mit  $p = 0.0335$  im t-Test eine Reduktion um 8 % ( $M_Q = 0.92$ ,  $95\% KI = 0.85 - 0.99$ ). Für MIG zeigte sich eine Reduktion der MFI um 35 % in der Verlaufskontrolle im Vergleich zu vor der Intervention ( $M_Q = 0.65$ ,  $95\% KI = 0.55 - 0.77$ ) und ein signifikanter Unterschied im t-Test ( $p = <0.0001$ ). Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren die Ergebnisse der drei Chemokine sehr unterschiedlich. Für IP-10 lag die MFI der Kontrollgruppe ( $Med = 1776.1$ ,  $Min = 447.4$ ,  $Max = 14437.3$ ) unter der MFI der Patienten vor der Intervention ( $Med = 3414.4$ ,  $Min = 233.9$ ,  $Max = 18314.3$ ) sowie der Patienten im Follow-up ( $Med = 3009.4$ ,  $Min = 341.3$ ,  $Max = 24127.0$ ). Im Wilcoxon-Test war sowohl der Unterschied der MFI zwischen Kontrollgruppe und vor der Intervention signifikant ( $p = 0.0002$ ) als auch der zwischen Kontrollgruppe und Follow-up ( $p = 0.0037$ ). Auch für I-TAC lag der Median der MFI der Kontrollgruppe unter den entsprechenden Werten vor der Intervention und im Follow-up. Hier waren die Unterschiede jedoch nicht signifikant.

Bei der Auswertung des Assays für MIG zeigte sich eine sehr breite Streuung der MFI innerhalb der Kontrollgruppe ( $Med = 852.0$ ,  $Min = 76.9$ ,  $Max = 3901.5$ ). Die MFI der Kontrollgruppe war signifikant höher als die MFI für MIG vor dem MitraClip® ( $Med = 270.6$ ,  $Min = 66.5$ ,  $Max = 9984.9$ ,  $p = 0.0005$ ). Auch im Vergleich mit dem Follow-up der Patientengruppe waren die Werte der Kontrollgruppe höher. Es ergab sich im Wilcoxon-Test ein signifikanter Unterschied ( $Med = 205.6$ ,  $Min = 78.9$ ,  $Max = 2590.8$ ,  $p = <0.0001$ ).

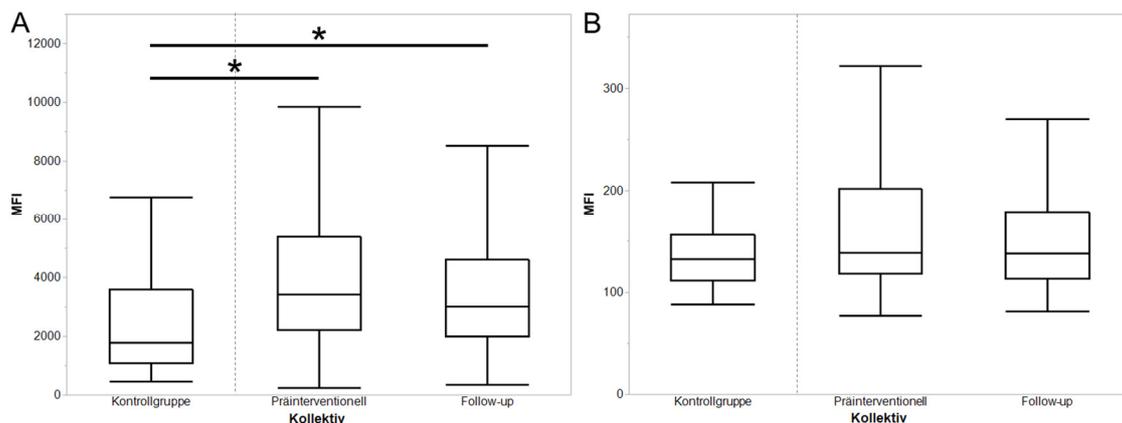


Abbildung 6: MFI von IP-10 und I-TAC aus dem Multiplex-Chemokine-Assay

Verglichen werden die Daten der Patienten präinterventionell und im Follow-up sowie die der Kontrollgruppe.

**A: MFI von IP-10 aus dem Multiplex-Chemokine-Assay.**

Die MFI für IP-10 der Kontrollgruppe liegt unter der MFI der Patienten vor der Intervention sowie unter der im Follow-up. Im Wilcoxon-Test sind beide Unterschiede signifikant.

Kontrollgruppe (N=40):  $Med = 1776.1$ ,  $Min = 447.4$ ,  $Max = 14437.4$

Präinterventionell (N=160):  $Med = 3414.4$ ,  $Min = 233.9$ ,  $Max = 18314.3$

Follow-up (N=160):  $Med = 3009.4$ ,  $Min = 341.3$ ,  $Max = 24127.0$

**B: MFI von I-TAC aus dem Multiplex-Chemokine-Assay.**

Die MFI für I-TAC ist im Follow-up niedriger als vor der Intervention. Der Median der MFI der Kontrollgruppe liegt unter den entsprechenden Werten vor der Intervention und im Follow-up

Kontrollgruppe (N=40):  $Med = 132.3$ ,  $Min = 88.3$ ,  $Max = 314.2$

Präinterventionell (N=160):  $Med = 132.6$ ,  $Min = 76.9$ ,  $Max = 1992.7$

Follow-up (N=160):  $Med = 132.3$ ,  $Min = 81.5$ ,  $Max = 314.2$

Die Grafik zeigt den Median, das 1. und 3. Quartil sowie den 1,5-fachen Interquartilsabstand

\*  $p < 0.05$

IP: interferon  $\gamma$ -induced protein, I-TAC: interferon-inducible T cell  $\alpha$ -chemoattractant, MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität, N: Anzahl der in der Gruppe untersuchten Patienten

#### 4.2.7 IL-8 (CXCL8)

Bei der Auswertung der MFI für IL-8 war diese vor der Intervention höher als im Follow-up ( $M_Q = 0.99$ ,  $95\% KI = 0.95 - 1.03$ ). Der Unterschied im t-Test war jedoch nicht signifikant. Die MFI der Kontrollgruppe ( $Med = 93.2$ ,  $Min = 80.8$ ,  $Max = 644.15$ ) war im Wilcoxon-Test signifikant niedriger als die der Patientengruppe vor der Intervention ( $Med = 100.8$ ,  $Min = 80.3$ ,  $Max = 2328.2$ ,  $p = 0.0034$ ) und im Follow-up ( $Med = 99.9$ ,  $Min = 78.2$ ,  $Max = 2013.2$ ,  $p = 0.0080$ ).

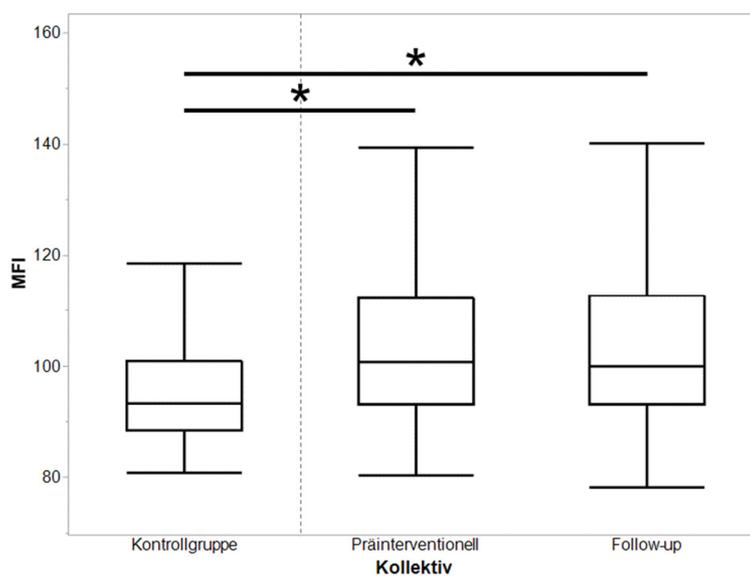


Abbildung 7: MFI von IL-8 aus dem Multiplex-Chemokine-Assay

Verglichen werden die Daten der Patienten präinterventionell und im Follow-up sowie die der Kontrollgruppe. Die MFI für IL-8 war im Follow-up niedriger im Vergleich zu vor der Intervention. Die MFI der Kontrollgruppe ist niedriger als vor der Intervention und niedriger als im Follow-up.

Kontrollgruppe (N=40):  $Med = 93.23$ ,  $Min = 80.81$ ,  $Max = 644.15$

Präinterventionell (N=160):  $Med = 100.77$ ,  $Min = 80.32$ ,  $Max = 2328.15$

Follow-up (N=160):  $Med = 99.86$ ,  $Min = 78.15$ ,  $Max = 2013.15$

Die Grafik zeigt den Median, das 1. und 3. Quartil sowie den 1,5-fachen Interquartilsabstand

\*  $p < 0.05$

IL: Interleukin, MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität, N: Anzahl der in der Gruppe untersuchten Patienten

#### 4.2.8 GRO $\alpha$ (CXCL1)

Für GRO $\alpha$  ergab sich im t-Test ein signifikanter Unterschied zwischen der MFI vor der Intervention im Vergleich zur MFI in der Verlaufskontrolle ( $M_Q = 0.93$ ,  $95\% KI = 0.88 - 0.97$ ,  $p = 0.0033$ ). Der Mittelwert war nach der Intervention um 7 % niedriger als davor. Die MFI der Kontrollgruppe ( $Med = 72.6$ ,  $Min = 62.0$ ,  $Max = 139.9$ ) war im Wilcoxon-Test signifikant höher als die MFI der

Patientengruppe vor der Intervention ( $Med = 68.4$ ,  $Min = 55.0$ ,  $Max = 2009.1$ ,  $p = 0.0139$ ) und signifikant höher als zum Zeitpunkt des Follow-up ( $Med = 65.2$ ,  $Min = 51.6$ ,  $Max = 751.4$ ,  $p = <0.0001$ ).

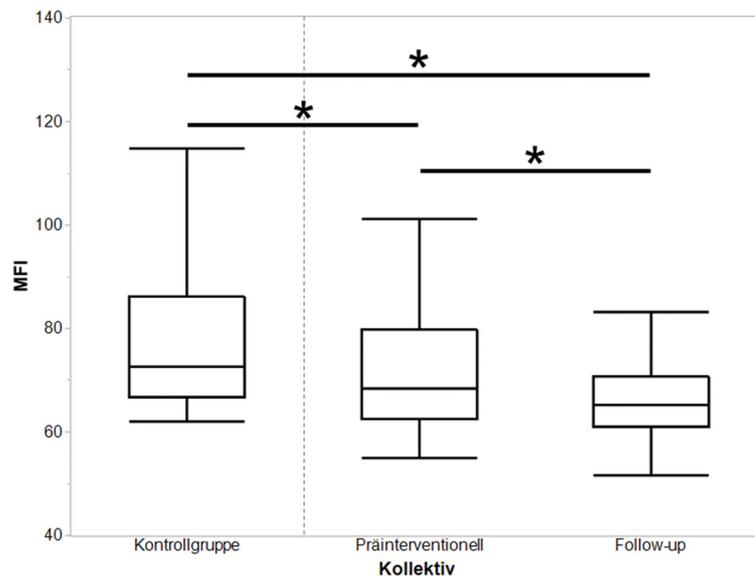


Abbildung 8: MFI von GRO $\alpha$  aus dem Multiplex-Chemokine-Assay.

Verglichen werden die Daten der Patienten präinterventionell und im Follow-up, sowie die der Kontrollgruppe. Die MFI für GRO $\alpha$  zeigt einen signifikanten Unterschied vor der Intervention im Vergleich zur Verlaufskontrolle. Die MFI der Kontrollgruppe ist signifikant höher als die der Patientengruppe vor der Intervention und zum Zeitpunkt des Follow-up.

Kontrollgruppe (N=40):  $Med = 72.6$ ,  $Min = 62.0$ ,  $Max = 139.9$

Präinterventionell (N=160):  $Med = 68.4$ ,  $Min = 55.0$ ,  $Max = 2009.1$

Follow-up (N=160):  $Med = 65.1$ ,  $Min = 51.6$ ,  $Max = 739.9$

Die Grafik zeigt den Median, das 1. und 3. Quartil sowie den 1,5-fachen Interquartilsabstand

\*  $p < 0.05$

GRO: growth-related oncogene, MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität, N: Anzahl der in der Gruppe untersuchten Patienten

#### 4.2.9 ENA-78 (CXCL5)

Für ENA-78 zeigte sich eine signifikante Erhöhung der MFI Werte der Patientengruppe zum Zeitpunkt des Follow-up im Vergleich zu vor der Intervention ( $Med = 230.5$ ,  $Min = 71.3$ ,  $Max = 3721.1$ ) und dem Wert zum Zeitpunkt des Follow-up ( $Med = 351.0$ ,  $Min = 56.2$ ,  $Max = 2336.3$ ). Der Unterschied zwischen der MFI der Kontrollgruppe und der MFI des Follow-up war im Wilcoxon-Test signifikant ( $p = 0.0355$ ).

#### 4.2.10 Eotaxin (CCL11)

Bei der MFI des Chemokins Eotaxin zeigten sich keinen bedeutenden Veränderungen zwischen vor und nach der Intervention ( $M_Q = 1.06$ ,  $95\% KI = 0.98 - 1.15$ ) und auch nicht im Vergleich zur Kontrollgruppe.

#### 4.2.11 MIP-3 $\alpha$ (CCL20)

Auch bei der Auswertung der MFI von MIP-3 $\alpha$  zeigte sich nur ein geringer Unterschied zwischen der Messung vor der Intervention und zum Zeitpunkt des Follow-up ( $M_Q = 0.89$ ,  $95\% KI = 0.94 - 1.02$ ). Die MFI der Kontrollgruppe war höher als die der Patientengruppe zu beiden untersuchten Zeitpunkten. Es zeigten sich sowohl zwischen Kontrollgruppe (Med = 73.3, Min = 59,0, Max = 142.6) und der gemessenen MFI vor dem Eingriff (Med = 68.1, Min = 54.1, Max = 1032.9,  $p = 0.0158$ ) als auch zwischen Kontrollgruppe und Follow-up (Med = 68.1, Min = 53.4, Max = 211.3,  $p = 0.0119$ ) signifikante Unterschiede.

### 4.3 Korrelationen mit klinischen Parametern

Bei der Korrelationsanalyse mit klinischen Parametern zeigten sich signifikante positive Korrelationen für die präinterventionellen Chemokinkonzentrationen von IL-8 ( $N = 152$ ,  $K = 0.193$ ,  $p = 0.017$ ) und MIP-1 $\alpha$  ( $N = 152$ ,  $K = 0.162$ ,  $p = 0.045$ ) mit der NYHA-Klasse.

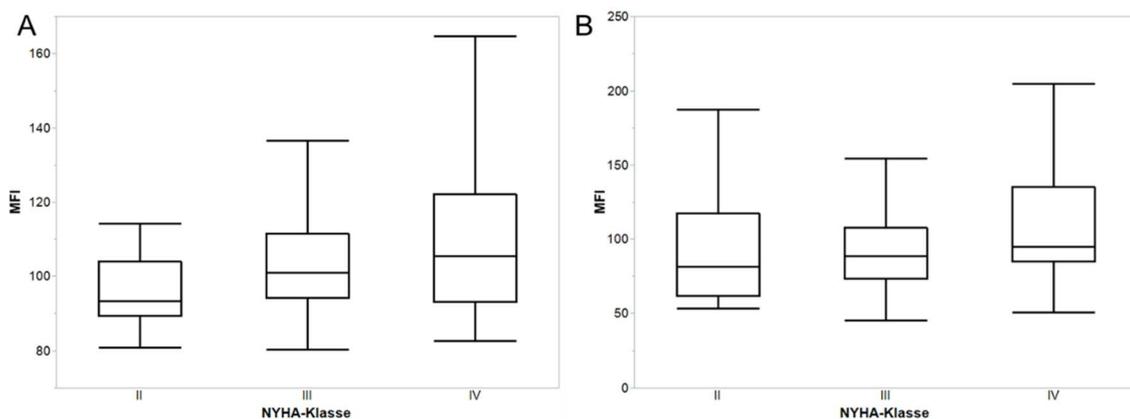


Abbildung 9: MFI von IL-8 und MIP-1 $\alpha$  vor der Intervention abhängig von der NYHA-Klasse

Dargestellt werden wird die MFI von IL-8 und MIP-1 $\alpha$  vor der Intervention abhängig von der NYHA-Klasse. Es zeigen sich signifikante positive Korrelationen für die präinterventionellen Chemokinkonzentrationen von IL-8 und MIP-1 $\alpha$  mit der NYHA-Klasse.

#### A IL-8

$N = 152$ ,  $K = 0.193$ ,  $p = 0.017$

NYHA-Klasse II (N=29):	Med = 93.3, Min = 80,8, Max = 429.0
NYHA-Klasse III (N=94):	Med = 100.8, Min = 80.3, Max = 266.6
NYHA-Klasse IV (N=29):	Med = 105.3, Min = 82.6, Max = 193.9

**B MIP-1 $\alpha$** 

$N = 152, K = 0.162, p = 0.045$

NYHA-Klasse II (N=29):  $Med = 81.3, Min = 53.1, Max = 252.3$

NYHA-Klasse III (N=94):  $Med = 88.4, Min = 45.4, Max = 2273.6$

NYHA-Klasse IV (N=29):  $Med = 94.7, Min = 50.7, Max = 322.2$

Die Grafik zeigt den Median, das 1. und 3. Quartil sowie den 1,5-fachen Interquartilsabstand

\*  $p < 0.05$

IL: Interleukin, MIP: Macrophage inflammatory protein, MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität, K: Korrelationskoeffizient, N: Anzahl der in der Gruppe untersuchten Patienten

Auch für ENA-78 konnte ein signifikanter Zusammenhang gefunden werden. So zeigte sich eine Korrelation zwischen der Änderung der Konzentration von ENA-78 und der Anzahl der herzinsuffizienzbedingten Krankenhausaufenthalte im Zeitraum von 19 Monaten nach der Intervention. Umso größer der Anstieg von ENA-78 nach dem Eingriff, desto seltener waren im Verlauf Hospitalisationen nötig ( $K = -0.275, p = 0.001, N = 141$ ).

Ein weiterer signifikanter positiver Zusammenhang ergab sich zwischen der Konzentrationsänderung von MIP-1 $\alpha$  und der Zeit bis zur erneuten Hospitalisierung nach der Intervention ( $K = -0.174, p = 0.035, N = 148$ ). Je größer die Differenz der Konzentration war, desto länger war keine Hospitalisation notwendig.

Für die anderen Chemokine und klinischen Parameter ergaben sich keine signifikanten Korrelationen.

#### **4.4 DC Analyse, Anzahl der mDCs, pDCs, Leukozyten, Reifemarker**

Beim Betrachten der Gesamtleukozytenzahlen der untersuchten Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede - weder in der Patientengruppe vor der Intervention ( $Med = 6.600/\mu\text{l}, Min = 1.900/\mu\text{l}, Max = 15.300/\mu\text{l}$ ), verglichen mit den Werten zum Zeitpunkt des Follow-up ( $Med = 5.950/\mu\text{l}, Min = 1.900/\mu\text{l}, Max = 12.600/\mu\text{l}$ ), noch im Vergleich mit den Leukozytenwerten der Kontrollgruppe ( $Med = 6.550/\mu\text{l}, Min = 3.300/\mu\text{l}, Max = 12.000/\mu\text{l}$ ).

#### 4.4.1 Myeloische dendritische Zellen

Der Anteil der im Blut zirkulierenden mDCs an den Gesamtleukozyten lag vor der Intervention zwischen 0.02 % und 0.31 %, in der Verlaufskontrolle zwischen 0.01 % und 0.37 %. Bei der Patientengruppe vor der Intervention waren anteilig mehr mDCs im Blut nachweisbar (*Med* = 0.110 %, *Min* = 0.022 %, *Max* = 0.306 %) als bei der gleichen Gruppe zum Zeitpunkt des Follow-up (*Med* = 0.095 %, *Min* = 0.011 %, *Max* = 0.369 %). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $M_Q = 0.88$ , 95% *KI* = 0.72 - 1.09).

Die Werte der Kontrollgruppe für mDCs lagen über den entsprechenden Werten der Patientengruppe zu beiden untersuchten Zeitpunkten (Kontrollgruppe *Med* = 0.116 %, *Min* = 0.015 %, *Max* = 0.340 %). Aber auch hier waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant.

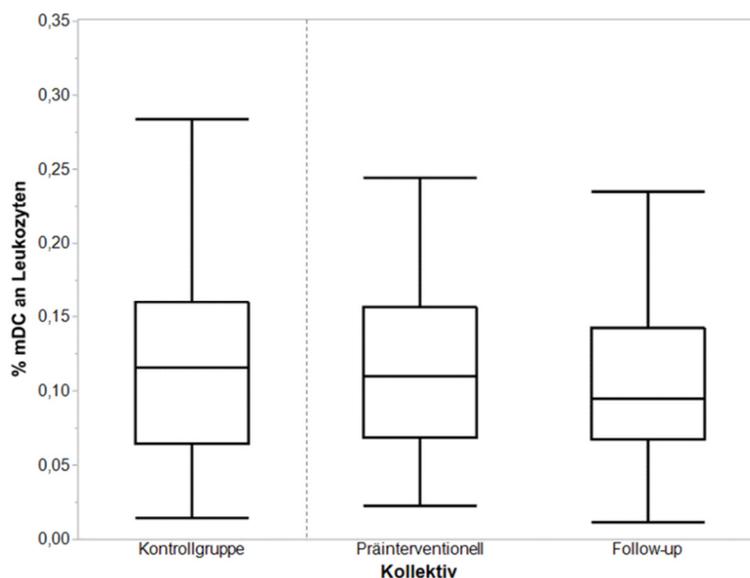


Abbildung 10: Prozentualer Anteil der mDCs an den Leukozyten im Blut

Verglichen werden die Daten der Patienten präinterventionell und im Follow-up, sowie die der Kontrollgruppe.

Kontrollgruppe (N=40): *Med* = 0.116 %, *Min* = 0.015 %, *Max* = 0.340 %

Präinterventionell (N=68): *Med* = 0.110 %, *Min* = 0.022 %, *Max* = 0.306 %

Follow-up (N=68): *Med* = 0.095 %, *Min* = 0.011 %, *Max* = 0.369 %

Die Grafik zeigt den Median, das 1. und 3. Quartil sowie den 1,5-fachen Interquartilsabstand

\*  $p < 0.05$

mDC: myeloische dendritische Zelle, N: Anzahl der in der Gruppe untersuchten Patienten

#### 4.4.2 Plasmazytoide dendritische Zellen

Der Anteil der im Blut zirkulierenden pDCs an den Gesamtleukozyten lag vor der Intervention zwischen 0.01 % und 0.16 %, in der Verlaufskontrolle zwischen 0.01 % und 0.31 %. Bei der Auswertung der Anzahl der pDCs zeigten sich die niedrigsten Werte in der Patientengruppe vor dem Eingriff (*Med* = 0.055 %, *Min* = 0.006 %, *Max* = 0.163 %). In der Verlaufskontrolle war die Anzahl der pDCs höher als vor der Intervention (*Med* = 0.090 %, *Min* = 0.011 %, *Max* = 0,310 %) Dies entspricht einem signifikanten Anstieg der pDCs in der Patientengruppe im Vergleich zu vor der Intervention um 59 % ( $M_Q = 1.59$ , 95% *KI* = 1.33 – 1.90,  $p = <0.0001$ ).

Die Werte für pDCs der Kontrollgruppe lagen gering unter den entsprechenden Werten der Patienten zum Zeitpunkt des Follow-up (*Med* = 0.0897 %, *Min* = 0.009 %, *Max* = 0.332 %). Es zeigte sich im Wilcoxon-Test eine signifikant niedrigere Anzahl der pDCs in der Gruppe der Patienten vor der Intervention im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p = 0.0002$ ).

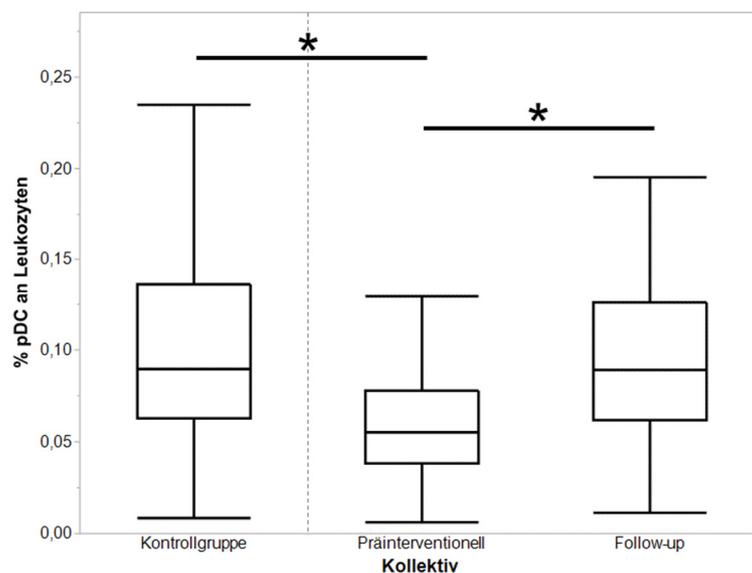


Abbildung 11: Prozentualer Anteil der pDCs an den Leukozyten im Blut

Verglichen werden die Daten der Patienten präinterventionell und im Follow-up, sowie die der Kontrollgruppe. Bei der Anzahl der pDCs zeigen sich die niedrigsten Werte in der Patientengruppe präinterventionell. Sowohl der Unterschied zur Patientengruppe im Follow-up als auch der Unterschied zur Kontrollgruppe sind signifikant.

Kontrollgruppe (N=40):

*Med* = 0.090 %, *Min* = 0.009 %, *Max* = 0.332 %

Präinterventionell (N=68):

*Med* = 0.055 %, *Min* = 0.006 %, *Max* = 0.163 %

Follow-up (N=68):

*Med* = 0.090 %, *Min* = 0.011 %, *Max* = 0,310 %

Die Grafik zeigt den Median, das 1. und 3. Quartil sowie den 1,5-fachen Interquartilsabstand

\*  $p < 0.05$

pDC: plasmazytoide dendritische Zelle, N: Anzahl der in der Gruppe untersuchten Patienten

Aus den Gesamtleukozyten und den prozentualen Anteilen der DC-Populationen, welche durch durchflusszytometrische Messung erhoben worden waren, wurden die absoluten Werte der DCs errechnet. Sowohl für die mDCs als auch für die pDCs ergaben sich hierbei vergleichbare Verteilungsmuster wie bei den relativen Werten, die voranstehend beschrieben wurden.

#### 4.4.3 Oberflächenmoleküle der DCs

Neben der Anzahl der zirkulierenden DC-Vorläuferzellen wurden außerdem einige ihrer exprimierten Oberflächenmoleküle untersucht.

##### CD86

Für CD86 war die MFI in der Patientengruppe vor der Intervention sowohl für die mDCs als auch für die pDCs am höchsten. Bei der Betrachtung der mDCs ( $M_Q = 0.82$ ,  $95\% KI = 0.71 - 0.92$ ,  $p = 0.0014$ ) war der Unterschied zur MFI im Follow-up signifikant, für die pDCs ( $M_Q = 0.78$ ,  $95\% KI = 0.60 - 1.03$ ) nicht. Außerdem ergaben sich bei den mDCs im Vergleich der Patientengruppe mit der Kontrollgruppe ( $Med = 15.3$ ,  $Min = 3.2$ ,  $Max = 27.0$ ) im Wilcoxon-Test signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Patienten vor der Intervention ( $Med = 20.1$ ,  $Min = 9.6$ ,  $Max = 206.0$ ,  $p < 0.0001$ ) und zwischen der Kontrollgruppe und der Patientengruppe im Follow-up ( $Med = 17.6$ ,  $Min = 4.4$ ,  $Max = 39.8$ ,  $p = 0.0129$ ). Bei den pDCs war die MFI der Patientengruppe vor der Intervention ( $Med = 10.6$ ,  $Min = 3.0$ ,  $Max = 183.0$ ) signifikant höher als die MFI der Kontrollgruppe ( $Med = 6.8$ ,  $Min = 3.9$ ,  $Max = 60.1$ ,  $p = 0.0008$ ).

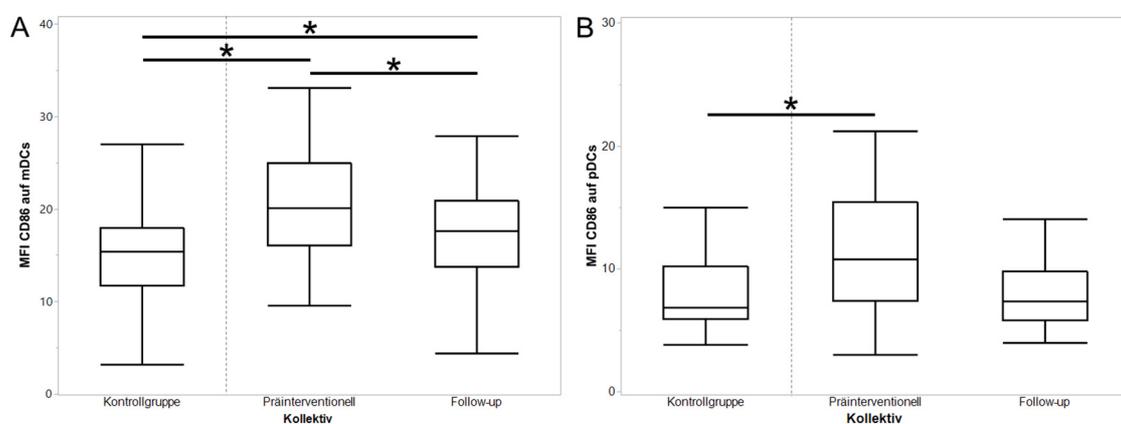


Abbildung 12: MFI der CD86-Rezeptoren auf mDCs (A) und pDCs (B)

Verglichen werden die Daten der Patienten präinterventionell und im Follow-up, sowie die der Kontrollgruppe. Für CD86 ist die MFI in der Patientengruppe vor der Intervention am höchsten. Für die mDCs ist der Unterschied zur MFI im Follow-up signifikant. Außerdem ergeben sich bei den mDCs signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Patienten vor der Intervention und im Follow-up. Bei den pDCs ist die MFI der Patientengruppe vor der Intervention signifikant höher als die MFI der Kontrollgruppe.

#### **A mDCs**

Kontrollgruppe (N=40):	Med = 15.3, Min = 3.2, Max = 27.0
Präinterventionell (N=68):	Med = 20.1, Min = 9.6, Max = 206.0
Follow-up (N=68):	Med = 17.6, Min = 4.7, Max = 39.8

#### **B pDCs**

Kontrollgruppe (N=40):	Med = 6.8, Min = 3.9, Max = 60.1
Präinterventionell (N=68):	Med = 10.8, Min = 3.0, Max = 183.0
Follow-up (N=68):	Med = 7.3, Min = 4.0, Max = 2027.0

Die Grafik zeigt den Median, das 1. und 3. Quartil sowie den 1,5-fachen Interquartilsabstand

\*  $p < 0.05$

CD: cluster of differentiation, mDC: myeloische dendritische Zelle, pDC: plasmazytoide dendritische Zelle, MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität, N: Anzahl der in der Gruppe untersuchten Patienten

### **CD11a**

Bei der Auswertung der CD11a-Expression auf mDCs zeigte sich eine niedrigere Expression im Follow-up (Med = 93.1, Min = 52.0, Max = 142.0), verglichen mit der Expression vor der Intervention (Med = 102.0, Min = 2.6, Max = 657.0). Die Werte der Kontrollgruppe (Med = 89.3, Min = 49.6, Max = 138.0) waren niedriger als die der Patientengruppe zu beiden Zeitpunkten. Im Wilcoxon-Test war die Expression von CD11a auf den mDCs der Kontrollgruppe signifikant niedriger als auf den mDCs der Patientengruppe vor der Intervention ( $p = 0,0051$ ). Bei der Betrachtung der CD11a Expression auf pDCs war der höchste Wert in der Patientengruppe vor der Intervention zu finden (Med = 78.3, Min = 2.9, Max = 130.0). In der Verlaufskontrolle (Med = 75.8, Min = 30.2, Max = 128.0) war die Expression von CD11a etwas geringer und die Werte der Kontrollgruppe (Med = 73.8, Min = 46.1, Max = 132.0) lagen weiterhin unter den Werten der Patientengruppe. Keiner der beschriebenen Unterschiede für pDCs ist signifikant.

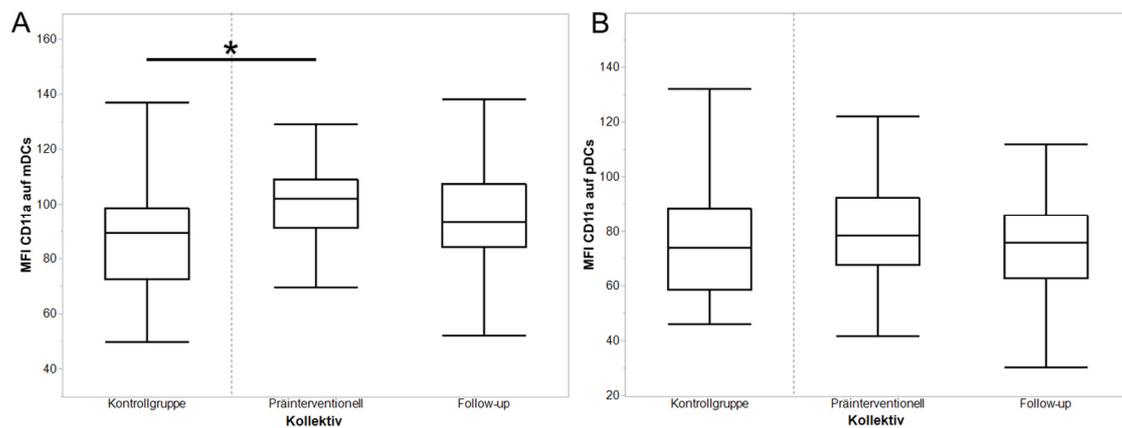


Abbildung 13: MFI der CD11a-Rezeptoren auf mDCs (A) und pDCs (B)

Verglichen werden die Daten der Patienten präinterventionell und im Follow-up sowie die der Kontrollgruppe. Bei den mDCs ist die Expression von CD11a auf den mDCs der Kontrollgruppe signifikant niedriger als auf den mDCs der Patientengruppe vor der Intervention. Keiner der Unterschiede für pDCs ist signifikant.

#### A mDCs

Kontrollgruppe (N=40): Med = 89.3, Min = 49.6, Max = 138.0

Präinterventionell (N=68): Med = 102.0, Min = 2.6, Max = 657.0

Follow-up (N=68): Med = 93.1, Min = 52.0, Max = 142.0

#### B pDCs

Kontrollgruppe (N=40): Med = 73.8, Min = 46.1, Max = 132.0

Präinterventionell (N=68): Med = 78.3, Min = 2.9, Max = 130.0

Follow-up (N=68): Med = 75.8, Min = 30.2, Max = 128.0

Die Grafik zeigt den Median, das 1. und 3. Quartil sowie den 1,5-fachen Interquartilsabstand

\*  $p < 0.05$

CD: cluster of differentiation, mDC: myeloische dendritische Zelle, pDC: plasmazytoide dendritische Zelle, MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität, N: Anzahl der in der Gruppe untersuchten Patienten

## HLA-DR

Für HLA-DR zeigte sich auf mDCs in der Patientengruppe nach der Intervention ( $Med = 618.5$ ,  $Min = 61.0$ ,  $Max = 1471.0$ ) eine verstärkte Expression im Vergleich zu vor der Intervention ( $Med = 550$ ,  $Min = 206$ ,  $Max = 1516$ ). Dieser Unterschied war nicht signifikant ( $M_Q = 1.11$ ,  $95\% KI = 0.96 - 1.29$ ). Auch für HLA-DR auf pDCs ließ sich eine vermehrte Expression nach der Intervention ( $Med = 404.5$ ,  $Min = 44.5$ ,  $Max = 1111$ ) im Vergleich zu davor ( $Med = 373$ ,  $Min = 82.5$ ,  $Max = 731$ ) nachweisen. Diese Steigerung war ebenso nicht signifikant ( $M_Q = 1.05$ ,  $95\% KI = 0.91 - 1.21$ ). Bei den mDCs lagen die Werte der Kontrollgruppe für HLA-DR zwischen den beiden Werten der Patientengruppe ( $Med = 586$ ,  $Min = 40.3$ ,  $Max = 1081$ ) und es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Bei der Auswertung der Expression von HLA-DR auf pDCs lagen die Werte der Kontrollgruppe ( $Med = 348$ ,  $Min = 12.6$ ,  $Max = 731$ ) unter den Werten der Patientengruppe zu beiden untersuchten Zeitpunkten. Zwischen der

Kontrollgruppe und der Patientengruppe zum Zeitpunkt des Follow-up ergab sich im Wilcoxon-Test ein signifikanter Unterschied ( $p = 0.0417$ ).

#### **CD40**

Für CD40 zeigte sich bei den mDCs in der Patientengruppe vor der Intervention (*Med* = 6.0, *Min* = 2.8, *Max* = 20.2) eine geringere Expression als im Follow-up (*Med* = 6.4, *Min* = 3.0, *Max* = 13.9) und bei der Kontrollgruppe (*Med* = 6.8, *Min* = 2.7, *Max* = 11.2). Bei der Auswertung für die pDCs war die Expression von CD40 in der Patientengruppe vor der Intervention (*Med* = 6.6, *Min* = 1.8, *Max* = 16.5) höher als nach der Intervention (*Med* = 6.3, *Min* = 2.6, *Max* = 17.9) und als in der Kontrollgruppe (*Med* = 5.9, *Min* = 2.5, *Max* = 12.9). Sowohl bei den mDCs als auch bei den pDCs waren die beschriebenen Unterschiede in der Expression von CD40 nicht signifikant.

## 5. Diskussion

### 5.1 Untersuchungskollektiv

Das Studienkollektiv umfasste 160 Patienten, welchen ein MitraClip® implantiert wurde. Die Patientengruppe hatte ein durchschnittliches Alter von 77.7 Jahren und der Anteil der männlichen Patienten betrug 58.1 %. Die Patienten waren zu 61.9 % in NYHA-Klasse III und zu 18.8 % in NYHA-Klasse IV eingestuft und sollten vor der Intervention mit einer konventionell medikamentösen Herzinsuffizienztherapie versorgt sein. Nach aktuellen Leitlinien beinhaltet diese in den NYHA-Klassen III und IV ACE-Hemmer (Angiotensin Converting Enzyme), Betarezeptorblocker, Mineralcorticoidrezeptorantagonisten und Diuretika, zusätzlich bei Bedarf Digitalisglykoside sowie Angiotensinrezeptorblocker (Sartane) oder Ivabradin bei Unverträglichkeiten der First-line-Therapie (5). Im Patientenkollektiv der Studie enthielt die Dauermedikation bei 85.6 % der Patienten ACE-Hemmer oder Sartane, bei 84.4 % Betarezeptorblocker, bei 56.9 % Aldosteronrezeptorantagonisten und bei 88.8 % Diuretika (vergleiche Tabelle 4). Die Patienten waren somit vor der Intervention größtenteils leitliniengerecht medikamentös versorgt.

In der vorliegenden Studie wurden nur die Daten der Patienten ausgewertet, bei denen eine Blutabnahme zum Zeitpunkt des Follow-up erfolgte. Alle Patienten, die im Zeitraum von 6 Monaten nach der Intervention verstorben oder aus anderen Gründen nicht zur Verlaufskontrolle erschienen sind, wurden nicht berücksichtigt.

Des Weiteren wurde für die Studie eine Kontrollgruppe aus 40 Personen untersucht. Das Durchschnittsalter der Kontrollgruppe lag bei 63.6 Jahren und damit deutlich unter dem Durchschnittsalter der Patientengruppe. Außerdem betrug der Anteil der männlichen Personen 85.0 %. Die Kontrollgruppe bestand aus 40 zufällig ausgewählten Patienten des Herzkatheterlabors der Universitätsklinik Tübingens, Abteilung MED III. Dadurch handelte es sich nicht um gesunde Probanden, sondern um Patienten, bei welchen eine medizinische Indikation zur Herzkatheteruntersuchung bestand. So war bei 77.5 % der

Patienten in der Kontrollgruppe die Diagnose einer KHK gestellt. Verglichen dazu betrug der Anteil der Personen mit KHK in der MitraClip®-Gruppe 73.1 %.

## **5.2 Chemokin-Assay und Korrelationen mit klinischen Parametern**

Die Untersuchung der 13 Chemokine mittels Bead-basiertem Immunoassay wurde bei 160 Patienten vor der Intervention und nach 6 Monaten im Follow-up durchgeführt. Außerdem erfolgte die Analyse für die 40 Personen der zuvor beschriebenen Kontrollgruppe. Insgesamt ist das System der Chemokine ein komplexes Zusammenspiel vieler einzelner Faktoren. Dies erschwert es, die einzelnen Chemokine unabhängig voneinander und ungeachtet anderer Einflussfaktoren zu analysieren und zu bewerten. Dennoch gibt es Hinweise auf bestimmte Zusammenhänge und Wirkweisen der jeweiligen Chemokine und Chemokinklassen, die im Folgenden dargestellt werden.

Für die CC-Chemokine MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  und RANTES zeigten Studien, dass sie eine Rolle in der Pathogenese von Atherosklerose sowie kardialer ischämischer Schädigung und nachfolgenden Reparaturprozessen spielen, insbesondere durch die Beteiligung an inflammatorischen Prozessen sowie der Rekrutierung von Leukozyten in das beschädigte Gewebe und deren Aktivierung (67–69). Häufig resultieren aus diesen Umbauprozessen am Myokard Komplikationen wie eine gestörte Pumpfunktion, Herzrhythmusstörungen und schließlich eine Herzinsuffizienz.

Parissis et al. untersuchten im Jahr 2002 die Konzentration verschiedener CC-Chemokine bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt. Hier zeigte sich während sieben Tagen nach dem Ereignis eine erhöhte Konzentration an MCP-1, MIP-1 $\alpha$  und RANTES im Serum der Patienten verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe. Zudem war die Konzentration aller drei Chemokine bei den Patienten mit einer zusätzlichen Herzinsuffizienz signifikant höher als in der Gruppe der Patienten ohne Komplikationen (70).

Auch in der vorliegenden Studie zeigte sich in der Patientengruppe vor der Intervention für die Chemokine MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  und RANTES eine erhöhte Konzentration im Serum verglichen mit der Kontrollgruppe. Für MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  war außerdem zum Zeitpunkt vor der Intervention eine signifikant

höhere MFI verglichen mit der Messung im Follow-up zu beobachten. Dies lässt annehmen, dass die CC-Chemokine nicht nur an Umbauprozessen nach einer ischämischen Myokardschädigung beteiligt sind und zur Entstehung einer Herzinsuffizienz beitragen, indem sie zu einem schlechteren linksventrikulären Remodelling führen. Möglicherweise spielen sie auch eine Rolle in der Pathogenese der nicht-ischämischen Herzinsuffizienz und bei ventrikulären Dysfunktionen.

Aukrust et al. untersuchten die CC-Chemokin-Level von Patienten mit symptomatischer chronischer Herzinsuffizienz im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe. Es fand sich hierbei in der Patientengruppe für MCP-1, MIP-1 $\alpha$  und RANTES eine signifikant erhöhte Konzentration im Serum, unabhängig von der Ätiologie der Herzinsuffizienz (71). Diese Untersuchungen bestätigen die Annahme, dass die Chemokine für MCP-1, MIP-1 $\alpha$  und RANTES eine Rolle bei der chronischen Herzinsuffizienz spielen, unabhängig davon ob diese ischämischer oder anderer Genese ist.

Die Auswirkungen von Druck- und Volumenbelastung auf Chemokin-konzentrationen wurden bisher nur für MCP-1 an Tiermodellen untersucht. So zeigten Shioi et al. im Tiermodell, dass eine durch Druckbelastung induzierte linksventrikuläre Hypertrophie und eine daraus entstehende Herzinsuffizienz mit einer erhöhten Expression von mRNA für MCP-1 im Myokard einhergeht (72). Behr et al. untersuchten die Volumenbelastung des Herzens ebenso am Tiermodell. Es zeigten sich erhöhte Level von MCP-1 im Myokard proportional zur Schwere der Erkrankung, insbesondere bei dekompensierter Herzinsuffizienz (73). MCP-1 könnte also zur Pathogenese und Progression von Herzinsuffizienz als Folge mechanischer Belastung des Myokards beitragen. Bei Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse wäre dies auch für MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  denkbar.

Die präinterventionell Chemokin-konzentration von MIP-1 $\alpha$  zeigte hier außerdem eine signifikante positive Korrelation mit der NYHA-Klasse. Für MCP-1 und MIP-1 $\alpha$  konnte ebenso von Aukrust et al. gezeigt werden, dass die Chemokinlevel mit zunehmender NYHA-Klasse ansteigen (71). Es fand sich zudem bei Parisi et al. und Damås et al. eine negative Korrelation der

Konzentration von MIP-1 $\alpha$  mit der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) (70,74). Es könnte demnach ein Zusammenhang zwischen der Chemokin-konzentration, insbesondere von MIP-1 $\alpha$ , und der Pumpleistung des Herzens und des damit verbundenen klinischen Zustandes der Patienten bestehen.

Die Konzentrationsänderung von MIP-1 $\alpha$  zeigte im Falle dieser Untersuchung zudem einen Zusammenhang mit dem Zeitraum bis zu einer erneuten Hospitalisation. Je größer die Differenz der Konzentration zwischen vor und nach dem Eingriff war, desto länger war keine Hospitalisation notwendig. Der Abfall der Konzentration von MIP-1 $\alpha$  kann daher möglicherweise mit einer guten Prognose in Verbindung gebracht werden.

Für TARC (CCL17) zeigte sich im Follow-up eine niedrigere MFI im Vergleich zu vor der Intervention. Die Werte der Kontrollgruppe waren sowohl im Vergleich zu den Werten vor der Intervention als auch verglichen mit den Werten zum Zeitpunkt des Follow-up signifikant niedriger. TARC wurde ursprünglich im Zusammenhang mit dermatologischen Erkrankungen wie Atopischer Dermatitis, Mycosis fungoides und Bullösem Pemphigoid gesehen (75). Erst in jüngerer Vergangenheit ist TARC in anderen Bereichen der Forschung in den Fokus gerückt, weshalb es bisher keine veröffentlichten Studien gibt, die den direkten Zusammenhang von TARC und Herzinsuffizienz untersuchen. Weber et al. erkannten, dass TARC in atherosklerotischen Läsionen akkumuliert und ein wichtiger Regulator der Atherosklerose darstellt (76). In einer Studie von Ye et al. wurden 2015 die TARC-Level von Patienten untersucht, die eine Herzkatheteruntersuchung erhielten. Es zeigte sich hierbei eine erhöhte TARC-Konzentration im Serum von Patienten mit einer KHK im Vergleich zu Patienten ohne KHK. Außerdem war eine positive Korrelation der Schwere der KHK mit dem Serum-Level nachweisbar (77). Da in der hier durchgeführten Studie in der Patientengruppe der Anteil an KHK erkrankten Patienten mit 73.1 % niedriger als in der Kontrollgruppe (77.5 %) lag, lässt sich dies als Effekt ausschließen. Es könnte also eine zusätzliche Beeinflussung der TARC-Konzentration im Serum, beispielsweise durch die Herzinsuffizienz, geben.

Die Chemokine MIG (CXCL9), IP-10 (CXCL10) und I-TAC (CXCL11) sind Interferon- $\gamma$ -induzierte Chemokine, die an den Rezeptor CXCR3 binden. Auch in vorangegangenen Studien wurde diese Gruppe von Chemokinen bereits im Zusammenhang mit Herzinsuffizienz untersucht.

Altara et al. untersuchten 2015 in einem Mausmodell für Druckbelastung des linken Ventrikels die Konzentration verschiedener Entzündungsmediatoren nach 6 und 8 Wochen mit einem Westernblot-Verfahren. Zu den entsprechenden Zeitpunkten war sowohl die Konzentration von MIG als auch von IP-10 mindestens zweifach erhöht nachweisbar. Außerdem wurde von Patienten mit Hypertension und asymptomatischer oder symptomatischer linksventrikulärer Dysfunktion sowie von gesunden Probanden mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) die Chemokinkonzentration im venösen Blut bestimmt. Hier zeigte sich mit zunehmender linksventrikulärer Dysfunktion eine erhöhte Konzentration von MIG, IP-10 und I-TAC (78). In einer Folgestudie untersuchten Altara et al. im Tiermodell die CXCR3-Liganden in Zusammenhang mit Herzinsuffizienz als Folge eines Herzinfarktes. Auch hier zeigten sich nach einer Woche im Serum deutlich erhöhte Werte für IP-10 und MIG (79). In einer ELISA-Untersuchung von Patienten mit Herzinsuffizienz und gesunden Probanden zeigte sich eine signifikante Erhöhung von IP-10 bei den Patienten mit Herzinsuffizienz im Vergleich zu den Gesunden (79).

In der hier zugrunde liegenden Untersuchung war für alle drei Interferon- $\gamma$ -induzierten Chemokine ein signifikanter Abfall der MFI nach der Intervention im Vergleich zu vor der Intervention zu beobachten. Der größte Unterschied zeigte sich hierbei für MIG mit einem Abfall der MFI um 35 %. Dieses Ergebnis entspricht den Beobachtungen von Altara et al.. In Zusammenschau der Ergebnisse könnten MIG, IP-10 und I-TAC Marker für Druckbelastung und linksventrikuläre Dysfunktion sowie Herzinsuffizienz sein.

Neben den Interferon- $\gamma$ -induzierten Chemokinen wurde in der vorliegenden Studie auch IL-8 als weiteres Chemokin der CXC-Chemokine im Zusammenhang mit Herzinsuffizienz untersucht. Damås et al. untersuchten die Konzentration von IL-8 im Serum von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz unterschiedlicher Ätiologie. Hierbei zeigte sich für IL-8 eine signifikant höhere Konzentration im

Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe (80). Bestätigt wurde diese Beobachtung durch eine Studie von Trominov et al.. Sie untersuchten 2014 die Plasmakonzentration von IL-8 bei Patienten mit Herzinsuffizienz im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe mittels ELISA. Die Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz zeigten hierbei signifikant höhere Level an IL-8 im Vergleich zur Kontrollgruppe (81). Während bei Trominov et al. die Ätiologie der Herzinsuffizienz der eingeschlossenen Patienten nicht definiert wurde, war die Ursache bei Damås et al. in den meisten Fällen eine KHK oder eine idiopathische dilatative Kardiomyopathie, wobei die erhöhten Level unabhängig von der Ätiologie zu beobachten waren. Bei drei Patienten war eine Herzklappenerkrankung die Ursache der Herzinsuffizienz.

In der vorliegenden Untersuchung zeigten sich für IL-8 vor der MitraClip®-Implantation höhere Level im Vergleich zur Verlaufskontrolle. Die Werte der Patientengruppe waren zu beiden untersuchten Zeitpunkten signifikant höher als die der Kontrollgruppe. Die Zusammenschau dieser Ergebnisse lässt annehmen, dass IL-8 auch bei einer Herzinsuffizienz valvulärer Genese beteiligt ist und die Konzentration im Serum bei Patienten mit Herzinsuffizienz unabhängig von deren Ätiologie erhöht ist.

Für IL-8 zeigte sich in dieser Studie zudem eine positive Korrelation mit der NYHA-Klasse. Auch Damås et al. und Nymo et al. beschrieben bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz eine Korrelation der Serumkonzentration von IL-8 mit der NYHA-Klasse sowie der Mortalität und eine negative Korrelation mit der LVEF der Patienten (80,82). Es scheint demnach einen Zusammenhang zwischen der Höhe der Chemokinkonzentration von IL-8 und der Schwere der Herzinsuffizienz und der damit verbundenen Belastbarkeit der Patienten zu geben. Dies wiederum könnte Rückschlüsse auf die Prognose der Patienten zulassen.

Neben IL-8 untersuchten Damås et al. im Serum von Patienten mit Herzinsuffizienz die Konzentration von ENA-78 und GRO $\alpha$ . Für diese beiden Chemokine konnten sie ebenfalls signifikant erhöhte Level im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe zeigen (80). In den hier zugrunde liegenden Analysen zeigte sich für ENA-78 eine signifikante Erhöhung der MFI Werte der

Patientengruppe zum Zeitpunkt des Follow-up im Vergleich zu vor der Intervention. Der Wert der MFI der Kontrollgruppe lag verglichen mit der Patientengruppe zwischen dem Wert vor der Intervention und dem Wert zum Zeitpunkt des Follow-up. Der Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse liegt möglicherweise in den verschiedenen Ätiologien der Herzinsuffizienz in den Studien. Um dies zu klären, sind weitere systematische Untersuchungen notwendig.

Für ENA-78 fand sich noch ein signifikanter klinischer Zusammenhang. So zeigte sich eine Korrelation der Änderung der Konzentration von ENA-78 mit der Anzahl der herzinsuffizienzbedingten Krankenhausaufenthalte im Zeitraum von 19 Monaten nach der Intervention. Je größer der Anstieg von ENA-78 nach dem Eingriff war, umso seltener war im Verlauf eine Hospitalisation nötig. Eine hohe Konzentration von ENA-78 stellt somit möglicherweise einen guten Prognosefaktor dar.

Für GRO $\alpha$  ergab sich in der hier vorliegenden Auswertung ein signifikanter Abfall der MFI um 7 % in der Verlaufskontrolle im Vergleich zur MFI vor der Intervention. Die MFI der Kontrollgruppe war signifikant höher als die MFI der Patientengruppe vor der Intervention und signifikant höher als zum Zeitpunkt des Follow-up. Breland et al. konnten erhöhte Plasmaspiegel von GRO $\alpha$  bei Patienten mit stabiler Angina pectoris und insbesondere bei instabiler Angina pectoris im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe feststellen (83). GRO $\alpha$  scheint unter anderem an der Entstehung und Destabilisierung von Atheroskleroseplaques beteiligt zu sein. Die geringere Konzentration von GRO $\alpha$  in der Patientengruppe im Follow-up verglichen mit vor der Intervention könnte für eine zusätzliche Beteiligung des Chemokins an der valvulär bedingten Herzinsuffizienz sprechen. Die erhöhte Konzentration in der Kontrollgruppe, verglichen mit der Patientengruppe, entstand möglicherweise durch einen etwas höheren Anteil an Patienten mit KHK oder an weiteren nicht erfasste Begleiterkrankungen und Einflussfaktoren.

Neben ihrer Aufgabe in der Immunabwehr des Körpers sind Chemokine auch an chronisch entzündlichen Prozessen und Erkrankungen beteiligt. Gezeigt werden konnten Zusammenhänge mit Chemokinen beispielsweise bei Atherosklerose,

entzündlichen Hauterkrankungen, Asthma bronchiale und Arthritis, welche alle eine chronisch entzündliche Komponente in der Pathogenese aufweisen (75,83–85). In Zusammenschau der Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchung und anderen Studien, die Chemokine im Zusammenhang mit Herzinsuffizienz untersuchten zeigt sich, dass auch die Herzinsuffizienz und die ventrikuläre Dysfunktion eine inflammatorische Komponente aufweisen, an der unter anderem Chemokine beteiligt sind.

Dies geschieht unter anderem indirekt durch die Rekrutierung der Leukozyten ins entzündliche Gewebe und deren dortige Aktivierung (26). Außerdem binden die in der vorliegenden Studie erhöht nachweisbaren Chemokine an die Rezeptoren CCR1 (MIP-1 $\alpha$ ), CCR5 (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ ) sowie CXCR1(IL-8) und CXCR8 (IL-8, GRO $\alpha$ ) (Vergleiche Tabelle 2) (30,32,36). In einer Untersuchung von explantierten Herzen von Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz sowie gesunden Organspendern konnte nachgewiesen werden, dass Kardiomyozyten die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2 und CXCR4 exprimieren und die Expression von CCR1, CCR2 und CXCR1 bei den Herzen mit Insuffizienz signifikant erhöht ist (26). Es wäre also möglich, dass die in unserer Studie im Serum erhöhten Level von Chemokinen über diese Rezeptoren auch direkten Einfluss auf die Kardiomyozyten und deren Funktion haben. Hinweise hierauf wurden auch in vorangehenden Studien beschrieben in denen gezeigt werden konnte, dass Chemokine Kardiomyozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen beeinflussen können und so zur Pathogenese der Herzinsuffizienz beitragen. Dies geschieht beispielsweise durch Modulation von Apoptose, Fibroseentstehung und Angiogenese (26,86). Nachdem in der hier vorliegenden Studie bei Patienten mit Herzinsuffizienz durch Volumenbelastung Veränderungen in der Konzentration verschiedener Chemokine gezeigt werden konnten gilt zu prüfen, ob diese eine Relevanz für den klinischen Alltag haben. Um als Biomarker genutzt werden zu können müssen die entsprechenden Analyten gewisse Voraussetzungen erfüllen. Zunächst stellt sich die Frage, ob es einen Zusatznutzen durch die Bestimmung des Markers gibt und ob die Information eine Relevanz für das weitere Vorgehen

hat (87). Zu unterscheiden sind hierbei Marker, die für die Diagnosestellung verwendet werden können und jene, die eine Prognoseabschätzung zulassen. Diagnostische Biomarker müssen ermöglichen, die zu untersuchende Erkrankung sicher von anderen, teilweise sehr ähnlichen Krankheitsbildern, abzugrenzen. Bei der Diagnose der Herzinsuffizienz ist insbesondere die Abgrenzung zur KHK wichtig. Für einige der untersuchten Chemokine sind bereits in anderen Studien erhöhte Level bei Patienten mit KHK oder Myokardinfarkt beschrieben (67–70,76,83). In der Patientengruppe, die in der vorliegenden Studie untersucht wurde, war der Anteil an KHK erkrankten Patienten eher niedriger als in der Kontrollgruppe. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Unterschiede der ChemokinKonzentration unabhängig von der KHK zu beobachten waren und möglicherweise mit der Herzinsuffizienz in Zusammenhang stehen.

Sollen biologische Marker für die Prognoseabschätzung verwendet werden, muss anhand der gemessenen Marker ein Rückschluss auf den Verlauf und die Schwere der Erkrankung möglich sein. Hierfür sind beispielsweise Korrelationen mit klinischen Parametern, wie der NYHA-Klasse, dem 6-Minuten-Gehtest, der linksventrikulären Ejektionsfraktion und dem Überleben der Patienten notwendig. Für MIP-1 $\alpha$  und IL-8 zeigte sich bei unseren Untersuchungen eine positive Korrelation mit der NYHA-Klasse. Zudem ergaben sich Korrelationen für die Konzentrationsänderung von MIP-1 $\alpha$  mit der Zeit bis zu einer erneuten Hospitalisation und für Änderung der Konzentration von ENA-78 mit der Anzahl der herzinsuffizienzbedingten Krankenhausaufenthalte. Diese Ergebnisse müssten vor der Anwendung als Biomarker an einem größeren Kollektiv validiert werden.

Um zu entscheiden, ob die untersuchten Marker als diagnostische Marker, zur Verlaufsvorhersage oder Therapieerfolgskontrolle geeignet sind, müssten diese außerdem mit bereits im klinischen Alltag etablierten Messmethoden verglichen werden. Bei der Diagnosestellung der Herzinsuffizienz ist bisher die Plasmakonzentration des brain natriuretic peptide (BNP bzw. NT-proBNP) als einziger Marker in den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie festgeschrieben (5). Eine Korrelation der Chemokinlevel mit der

Plasmakonzentration von BNP bzw. NT-proBNP wäre deshalb denkbar und zu überprüfen.

Für die Verwendung im klinischen Alltag sind des Weiteren eine praktikable Probeentnahme und eine technisch schnelle und unkomplizierte Analyse von Bedeutung. Da die Chemokine im Blutplasma der Patienten gemessen werden können, wäre dies im klinischen Alltag gut umsetzbar. Hierfür stehen jedoch bisher keine automatisierten Assays zur Analyse zur Verfügung. Außerdem gilt zu bedenken, dass unzählige Faktoren die Chemokinkonzentrationen im Blut beeinflussen und so zu unzuverlässigen Ergebnissen führen können, beispielsweise sind dies biologische Eigenschaften des Patienten und die Probenverarbeitung. Daraus resultiert auch, dass bisher keine Normwerte für die Konzentration der verschiedenen Chemokine im Blut festgelegt wurden (88).

Chemokine scheinen pathologische Mechanismen bei Herzinsuffizienz zu reflektieren. Insgesamt ist es anhand der hier erhobenen Daten jedoch nicht möglich, eine konkrete Aussage darüber zu machen, ob die Chemokine an der Entstehung und Progression der Herzinsuffizienz beteiligt sind oder ob die erhöhten Konzentrationen im Serum eine Folge der Funktionsstörung sind. Auch der Ursprung der Chemokine bei der Herzinsuffizienz ist bisher nicht geklärt. Dies wurde bisher nur für TNF- $\alpha$  untersucht. Es konnte vermehrt TNF- $\alpha$ , insbesondere in den intramyokardialen Gefäßen, aber auch in den Myozyten von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM), nachgewiesen werden, nicht aber bei Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie oder bei Gesunden (89). Auch in explantierten Herzen von Patienten der NYHA-Klasse IV konnte eine vermehrte Expression von TNF- $\alpha$  und mRNA für TNF- $\alpha$  gezeigt werden (90). Es wäre also möglich, dass das Zytokin TNF- $\alpha$  bei Herzinsuffizienz im Myokard gebildet wird. Möglicherweise werden demnach unter anderem die Chemokine von den Kardiomyozyten selbst produziert.

Auch eine Bildung der Chemokine in anderen Organen und Geweben wäre denkbar, beispielsweise ausgelöst durch die verminderte Gewebedurchblutung und Gewebehypoxie. Um dies für Chemokine genauer zu untersuchen könnte die RNA-Expression für Chemokine in verschiedenen Geweben verglichen werden.

### 5.3 Anzahl und Phänotyp dendritischer Zellen

In der durchgeführten Studie wurden bei einer Subpopulation, bestehend aus 68 Patienten des Gesamtkollektivs, Anzahl und Phänotyp der dendritischen Zellen untersucht. Die wichtigsten Aufgaben der dendritischen Zellen sind die Aufnahme und Prozessierung von Antigenen und die Initiierung der T-Zell-abhängigen Immunantwort (37). Sie sind als potente antigenpräsentierende Zellen ein wichtiges Bindeglied zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunabwehr. Da nach aktuellem Kenntnisstand immunologische und inflammatorische Prozesse eine Rolle in der Herzinsuffizienzentstehung und -progression zu spielen scheinen, sind auch die DCs in diesem Zusammenhang interessant. In der hier vorliegenden Studie erfolgte die Untersuchung der DCs mittels eines speziellen Gatings in der Durchflusszytometrie, wodurch zunächst andere Zellen anhand ihrer Granularität und Oberflächenmarker ausgeschlossen (Granulozyten, B-Lymphozyten, Monozyten) sowie die mDCs und pDCs durch CD1c beziehungsweise CD303 detektiert wurden.

Der Anteil der im Blut zirkulierenden mDCs an den Gesamtleukozyten lag vor der Intervention zwischen 0.02 % und 0.31 %, in der Verlaufskontrolle zwischen 0.01 und 0.37 %. Für die pDCs lag der Anteil vor der Intervention zwischen 0.01 % und 0.16 %, in der Verlaufskontrolle zwischen 0.01 % und 0.31 %. Dies entspricht der Größenordnung, die in vorangegangenen Studien beschrieben wurde (37,91). Bei der genauen Auswertung der DC-Zahlen der untersuchten Gruppen zeigten sich jedoch Unterschiede, die im Folgenden diskutiert werden. Während es bei den DCs Abweichungen in der Patientengruppe zwischen den untersuchten Zeitpunkten und zur Kontrollgruppe gibt, ist die Gesamtleukozytenzahl in allen Kollektiven annähernd identisch. Es scheint sich also um eine spezifische Änderung der Subpopulation der DCs innerhalb der Gruppe der Leukozyten zu handeln.

Yilmaz et al. untersuchten Anzahl und Phänotyp dendritischer Zellen bei Patienten mit stabiler Angina pectoris, instabiler Angina pectoris und akutem Myokardinfarkt sowie gesunden Probanden. Es zeigten sich bei allen Patientengruppen signifikant niedrigere Level an mDC-Vorläuferzellen im

Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch die Anzahl der pDC-Vorläuferzellen zeigte in den Patientengruppen geringfügig niedrigere Werte als in der Kontrolle (91). Sugi et al. untersuchten die Bedeutung von DCs bei Patienten mit dekompensierter Herzinsuffizienz im NYHA-Stadium III und IV. Hierbei zeigte sich bei den Patienten mit dekompensierter Herzinsuffizienz eine signifikant geringere Anzahl an mDCs und pDCs im Blut im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe (92). In der hier zugrunde liegenden Studie ergab sich vor der Intervention eine geringfügig erhöhte Anzahl an mDCs im Vergleich zur Verlaufskontrolle. Die Werte der Kontrollgruppe lagen zu beiden untersuchten Zeitpunkten über den Werten der Patientengruppe. Für die pDCs zeigte sich vor der Intervention eine signifikant niedrigere Anzahl in der Patientengruppe im Vergleich zur Verlaufskontrolle. Außerdem zeigte sich eine signifikant geringere Anzahl der pDCs in der Gruppe der Patienten vor der Intervention im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse bestätigen dementsprechend die oben beschriebenen Beobachtungen, dass Patienten mit Herzinsuffizienz niedrigere Werte an mDCs und pDCs aufweisen als Patienten ohne Herzinsuffizienz. Zusätzlich scheinen die Implantation des MitraClips® und die dadurch verringerte Mitralklappeninsuffizienz und Volumenbelastung des Vorhofes insbesondere auf die Anzahl der pDCs einen Einfluss zu haben. Insgesamt ist beim Vergleich der Studien zu beachten, dass es sich häufig um unterschiedliche Stadien der Herzinsuffizienz handelt sowie verschiedene Entstehungsätiologien betrachtet werden.

Als mögliche Ursache für eine verminderte Anzahl von DCs kommen grundsätzlich zwei Mechanismen in Frage: Eine reduzierte Produktion von DCs im Knochenmark oder eine vermehrte Rekrutierung von DCs in entzündliche und lymphatische Gewebe. Reduzierte Anzahlen von dendritischen Zellen sind bereits bei Autoimmunerkrankungen und infektiösen Erkrankungen beschrieben. So sind beispielsweise beim systemischen Lupus erythematodes die mDCs und pDCs im Blut reduziert (93). Gleichzeitig wurde in Hautläsionen bei diskoidem und systemischem Lupus erythematodes eine Akkumulation von pDCs beschrieben (94). Auch bei Patienten mit Sjögren-Syndrom wurde, verglichen mit gesunden Personen, eine verringerte Anzahl an DCs im peripheren Blut

beobachtet sowie eine gleichzeitige Infiltration der Speicheldrüsen mit reifen DCs (95). Bei Patienten mit Sarkoidose zeigte sich ebenfalls eine reduzierte Anzahl an mDCs und pDCs im Blut sowie eine Akkumulation von DCs in den Sarkoidose-Granulomen (96). Der gleiche Effekt findet sich bei Patienten mit Asthma bronchiale. Die Anzahl zirkulierender mDCs im Blut fällt drei Stunden nach Allergeninhalation signifikant ab (97). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass bei Patienten mit allergischer Rhinitis im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe vermehrt aktivierte DCs in der Nasenschleimhaut akkumulieren (98). Bei Patienten mit entzündlichen Lebererkrankungen zeigte sich eine signifikante Minderung der DCs im Blut, insbesondere der mDCs, wobei die Zellzahl mit dem Stadium der Erkrankung negativ korrelierte. Passend dazu fand sich intrahepatisch eine Anreicherung reifer DCs (99,100).

Alle diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die verminderte Anzahl dendritischer Zellen im Blut aus einer vermehrten Rekrutierung in das entzündliche Gewebe und die betroffenen Organe resultiert. Dort akkumulieren die aktivierten Zellen und lösen eine T-Zell-Immunreaktion aus.

An einem Mausexperiment zeigten Choi et al., dass reichlich dendritische Zellen in Geweben von Aorta und Herzklappen vorhanden sind, insbesondere in Bereichen mit Blutfluss-Turbulenzen (101). Auch beim Menschen konnten vermehrt DCs an den Herzklappen nachgewiesen werden. So fanden Skowasch et al. Infiltrationen von DCs in Aortenklappen mit einer degenerativen Aortenklappenstenose und vor allem auch in degenerativ veränderten Bioprothesen der Aortenklappe (102). Dies könnte auf eine inflammatorische Beteiligung an der Veränderung hinweisen.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch eine Untersuchung von Patienten mit Vorhofflimmern. Hier kommt es durch die Herzrhythmusstörung insbesondere im Vorhof zu einem gestörten Blutfluss, zu mechanischem Stress und einer Vorhofdilatation. Es zeigten sich hier erhöhte Zahlen an DCs in der Wand des linken Vorhofes verglichen mit Patienten mit einem Sinusrhythmus (103).

Wie auch beim Vorhofflimmern kommt es durch eine Mitralklappeninsuffizienz zu einem gestörten Blutfluss und einer Dilatation des Herzmuskelgewebes, besonders im Bereich des linken Vorhofs. Dies könnte zu einer Rekrutierung der

dendritischen Zellen ins Gewebe führen. Um dies zu bestätigen, wäre die Untersuchung von Herzgewebe und Herzklappen von Patienten mit einer Mitralklappeninsuffizienz nötig. Möglicherweise könnte mittels immunhistochemischer Verfahren eine vermehrte Rekrutierung dendritischer Zellen nachgewiesen werden.

Auch Athanassopoulos et al. untersuchten dendritische Zellen im Blut bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz, dilatativer Kardiomyopathie (DCM) oder hypertropher Kardiomyopathie (HCM) im NYHA-Stadium III und IV und bei gesunden Probanden. Durch die Untersuchung des Reifemarkers CD83 und des Chemokinrezeptors CCR7, der für das Homing in die Lymphknoten wichtig ist, konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit Herzinsuffizienz der Anteil der CD83<sup>+</sup> und CCR7<sup>+</sup> mDCs signifikant höher ist als in der Kontrollgruppe (104). Yusuke et al. untersuchten bei Patienten mit dekompensierter Herzinsuffizienz im NYHA-Stadium III und IV neben der Anzahl der DCs auch deren Oberflächenmarker CD40 und CCR7. Der Anteil der CD40<sup>+</sup> und CCR7<sup>+</sup> Zellen war hierbei bei den Patienten signifikant höher als in der gesunden Kontrollgruppe. Es konnte anhand der Oberflächenmarker also gezeigt werden, dass die zirkulierenden Zellen sich im aktivierten Zustand befinden. (92)

Um den Phänotyp der DCs genauer zu definieren, wurden in der hier vorliegenden Untersuchung die Oberflächenmoleküle CD40, HLA-DR, CD11a und CD86 auf mDCs und pDCs untersucht.

CD86 (B7-2) ist ein costimulatorischer Oberflächenrezeptor der DCs, der gemeinsam mit CD80 (B7-1) an der Aktivierung von T-Lymphozyten beteiligt ist. Während der Reifung werden die B7-Moleküle hochreguliert. CD80 und CD86 können an verschiedene Rezeptoren der T-Zellen binden. Im ruhenden Zustand exprimieren die T-Zellen vor allem CD28. In Folge der Bindung von CD80/86 an CD28 kommt es durch das costimulatorische Signal zu einer bis zu 100-fachen Signalverstärkung der Aktivierung am T-Zell-Rezeptor, wodurch es schon bei geringen Mengen an Antigenen zu einer Aktivierung der T-Zellen kommt (44). Die aktivierten T-Zellen exprimieren zusätzlich den Rezeptor CD152 (CTLA-4) an welchen CD80/86 mit höherer Affinität bindet als an CD28. Diese Bindung wirkt inhibitorisch. Das Signal des MHC-Antigen-Komplexes an den T-Zell-Rezeptor

wird vermindert, um eine überschießende Reaktion zu vermeiden (49). Die verschiedenen Rezeptorbindungen sind in Abbildung 1 dargestellt.

Bei der Auswertung der MFI für CD86 zeigten sich in der Patientengruppe der hier zugrunde liegenden Studie für die mDCs und die pDCs vor dem Eingriff die höchsten Werte. Bei der Betrachtung der mDCs ist der Unterschied zwischen vor der Intervention und dem Follow-up signifikant. Außerdem ergaben sich zu beiden untersuchten Zeitpunkten signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der Patientengruppe. Bei den pDCs ist die MFI der Patientengruppe vor der Intervention signifikant höher als die MFI der Kontrollgruppe. Betrachtet man die vorliegenden Ergebnisse scheint CD86 auf DCs auch bei Herzinsuffizienz vermehrt exprimiert zu werden.

CD11a bildet gemeinsam mit CD18 das Adhäsionsmolekül LFA-1, welches auf reifen DCs vermehrt exprimiert wird. LFA-1 hat vielfältige Aufgaben in der Aktivierung von T-Zellen, die noch nicht vollständig verstanden sind. Es bindet an ICAM-1, 2 und insbesondere ICAM-3 (Intercellular adhesion molecule) und ist sowohl an der transendothelialen Migration der DCs als auch an der direkten Interaktion mit T-Zellen beteiligt (105,106). Diese Bindung zwischen LFA-1 und ICAM- 1/ICAM-3 ist ein wichtiger Bestandteil der T-Zell-Aktivierung und möglicherweise für die Akkumulation von MHC II und anderen costimulatorischen Molekülen an der Zelloberfläche verantwortlich (106).

In der hier durchgeführten Studie zeigte sich sowohl bei den mDCs als auch bei den pDCs in der Patientengruppe vor der Intervention eine höhere MFI für CD11a als in der Patientengruppe zum Zeitpunkt des Follow-up und der Kontrollgruppe. Für die mDCs ist der Unterschied zur Kontrollgruppe signifikant.

HLA-DR ist ein Oberflächenmolekül der MHC II - Klasse und dient der Präsentation aufgenommener Antigene an andere Zellen, wie beispielsweise naive T-Zellen. Unreife DCs präsentieren nur wenige MHC I - und MHC II - Moleküle an der Zelloberfläche, da diese von den Lysosomen wieder aufgenommen werden. Bei der Reifung der Zellen wird der Umsatz der MHC-Moleküle herunterreguliert und die Moleküle werden somit vermehrt auf der Zelloberfläche exprimiert. Die DCs können so in kurzer Zeit große Mengen an MHC-Antigen-Komplexen bilden und auf ihrer Zelloberfläche präsentieren (41).

Für die Expression von HLA-DR zeigten sich sowohl bei der Betrachtung der mDCs als auch bei den pDCs keine signifikanten Unterschiede nach der Intervention im Vergleich zu davor. Bei den pDCs lag die MFI für HLA-DR in der Kontrollgruppe jedoch unter der MFI der Patientengruppe zu beiden Zeitpunkten. Auch bei akuter Myokarditis wurde bereits eine erhöhte Anzahl von HLA-DR-positiven DCs in Myokardbiopsien beschrieben, was die Annahme unterstützt, dass die aktivierten DCs in das Myokard rekrutiert werden und an der Inflammation beteiligt sind (107).

Die Bindung des CD40 Rezeptors der DCs an den CD40-Liganden der T-Zelle stellt den letzten Schritt der Aktivierung dar und löst die Produktion von Zytokinen aus. Auch dieser Rezeptor ist auf den reifen DCs hochreguliert (41). Bei der Auswertung für die pDCs in der hier vorliegenden Studie war in der Patientengruppe die Expression von CD40 vor der Intervention höher als nach der Intervention und in der Kontrollgruppe.

Yndestad et al. konnten im Jahr 2003 zeigen, dass die T-Lymphozyten bei Patienten mit einer chronischen Herzinsuffizienz, unabhängig von deren Ätiologie, im Vergleich zu gesunden Personen eine erhöhte Expression von Aktivierungsmarkern aufweisen (108). Die Aktivierung der T-Zellen kann als Zeichen für die Immunsystemaktivierung, beziehungsweise die systemische Entzündungsreaktion angesehen werden. Die Betrachtung der hier vorliegenden Ergebnisse zu den DCs legt nahe, dass es zu einer Aktivierung der T-Zellen durch DCs im Gewebe kommt. In einer Studie von Devaux et al. konnte gezeigt werden, dass im Myokard bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz unterschiedlicher Genese verschiedene Adhäsionsmoleküle für Immunzellen vermehrt exprimiert werden (109). Somit scheinen infiltrierende Zellen im Myokard eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Herzinsuffizienz zu spielen. Die Rekrutierung der inflammatorischen Zellen ins Myokard ist auch mit den hier vorliegenden Ergebnissen gut vereinbar. Dies ist ein möglicher Mechanismus, wie es in der Patientengruppe zu der verminderten Anzahl an zirkulierender DCs im Vergleich zur Kontrollgruppe kommt. Die aktivierten DCs akkumulieren im Myokard und lösen dort unter anderem eine T-Zell-Immunreaktion aus.

Insgesamt zeigt sich also bei den DCs der Patientengruppe eine erhöhte Expression von Oberflächenmarkern, die vermehrt auf aktivierten DCs zu finden sind. Es scheint demnach eine generalisierte Aktivierung des DC-/T-Zell-Systems zu geben. Da es außerdem für einige Rezeptoren eine vermehrte Expression vor dem Eingriff im Vergleich zum Follow-up gibt, könnte man daraus schließen, dass ein Zusammenhang zwischen den Auswirkungen der Mitralklappeninsuffizienz, wie der Volumenbelastung des Vorhofs, und der Aktivierung des Systems vorliegt. Möglicherweise werden die DCs ins Myokard rekrutiert. Um dies zu bestätigen, wäre eine Untersuchung von Myokardbiopsien notwendig, in der DCs im Gewebe nachgewiesen werden könnten.

## 5.4 Schlussfolgerung

In einer Vielzahl von Studien wurde deutlich, dass Entzündungsprozesse an der Entstehung und Progression der Herzinsuffizienz beteiligt sind. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten darauf hin, dass dies auch bei Herzinsuffizienz durch mechanische Belastung eine Rolle spielt. Die genauen Mechanismen, über welche das Immunsystem Einfluss auf die Erkrankung nimmt, und insbesondere die für die Entzündungsreaktionen ursächlichen Faktoren, sind bisher nicht abschließend geklärt. Auch die Rolle der Zytokine und Chemokine bedarf weiterer Untersuchungen.

Für die Chemokine MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-8, GRO $\alpha$ , TARC, MIG, IP-10 und I-TAC zeigte sich bei der hier durchgeführten Studie in der Patientengruppe vor der Intervention, im Vergleich zum Zeitpunkt des Follow-up, eine erhöhte Konzentration im Blut. Für MCP-1, RANTES, TARC, IP-10, I-TAC, IL-8 waren in der Patientengruppe höhere Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten. Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine Entzündungsreaktion auch in der Genese der valvulär bedingten Herzinsuffizienz eine Bedeutung hat.

Möglicherweise spielen auch die DCs in diesem Kontext eine entscheidende Rolle. Insbesondere für die pDCs ergaben sich vor der Intervention in der vorliegenden Untersuchung signifikant niedrigere Anteile im Vergleich zum Follow-up. In der Kontrollgruppe lag der Anteil signifikant über dem der Patientengruppe vor der Intervention. Wie zuvor beschrieben, wäre dieser Effekt

durch eine Migration in betroffenes Gewebe erklärbar. Dass es zu einer Aktivierung der DCs kommt, zeigte sich durch eine vermehrte Expression von Aktivierungsmarkern auf den DCs der Patientengruppe.

Eine wichtige Rolle in der Aktivierung von Zellen des Immunsystems spielen chemotaktisch wirkende Moleküle, zu welchen insbesondere auch die Chemokine zählen. Unter anderem DCs weisen bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz eine erhöhte Genexpression für inflammatorische Zytokine und Chemokine auf. Dies konnte beispielsweise für MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-8 gezeigt werden. Auch die zugehörigen Chemokinrezeptoren sind unter anderem auf DCs der Patienten in größerer Anzahl zu finden als bei den gesunden Probanden (74). Generell werden die Rezeptoren CCR1, CCR2, CCR5 und CCR6 sowie CXCR1, CXCR2 und CXCR4 auf der Oberfläche der unreifen dendritischen Zellen im Blut vermehrt exprimiert (50). An diese können einige der in der vorliegenden Untersuchung erhöht nachgewiesenen Chemokine binden (vergleiche Tabelle 2) (30,32,36). Es ist daher naheliegend, dass DCs bei Herzinsuffizienz aktiviert und durch Chemokine ins Herzmuskelgewebe rekrutiert werden. Zudem bilden diese Zellen selbst proinflammatorische und chemotaktische Chemokine, wodurch der Mechanismus sich selbst verstärkt. Über diesen Weg tragen Chemokine sehr wahrscheinlich zur Entzündungsreaktion und daraus folgender Schädigung des Myokards und somit zur Pathogenese der Herzinsuffizienz bei. Für den klinischen Alltag relevant wäre außerdem, ob die untersuchten Parameter für die Diagnosestellung oder eine Prognoseabschätzung verwendet werden können. In Zusammenschau der Ergebnisse der vorliegenden Studie sind insbesondere die Chemokine MIP-1 $\alpha$  und IL-8 als Marker interessant. Für MIP-1 $\alpha$  konnten hier ein signifikanter Abfall im Follow-up und niedrigere Werte in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Patientengruppe zu beiden Zeitpunkten beobachtet werden. Außerdem fand sich eine positive Korrelation mit der NYHA-Klasse. Für Konzentrationsänderung von MIP-1 $\alpha$  zeigte sich eine Korrelation mit der Zeit bis zu einer erneuten Hospitalisation. Für IL-8 ergaben sich ähnliche Ergebnisse. Die Werte vor der Intervention waren höher als diejenigen im Follow-up und die Konzentration in der Kontrollgruppe war signifikant niedriger als die der Patientengruppe zu beiden untersuchten Zeitpunkten. Es ließ sich ebenfalls

eine positive Korrelation mit der NYHA-Klasse aufzeigen. Es wäre also durchaus denkbar, dass diese Parameter auch als Prognosefaktoren etabliert werden könnten.

## **5.5 Limitation der Studie**

Bei der durchgeführten Untersuchung handelt es sich um eine prospektive Längsschnittstudie, bei der Patienten mit valvulär bedingter Herzinsuffizienz vor der Intervention mit einem MitraClip® und im Follow-up nach 6 Monaten untersucht wurden. Die Patientengruppe wurde zusätzlich mit einer Kontrollgruppe, bestehend aus 40 Patienten des Herzkatheterlabors, verglichen. Hierbei wurde bei einer begrenzten Patientenzahl eine Vielzahl von Parametern analysiert, um besonders relevante Einflussgrößen zu selektieren. Um die Ergebnisse zu konkretisieren, ist eine Studie mit einer größeren Patientenzahl, gegebenenfalls multizentrisch, mit dann weniger Parametern (beispielsweise MIP-1 $\alpha$  und IL-8), notwendig. Zur Erhöhung der Aussagekraft muss außerdem die Kontrollgruppe aus alters- und geschlechtsgematchten gesunden Probanden bestehen, insbesondere ohne kardiale und inflammatorische Vorerkrankungen. Die Aussagekraft der Ergebnisse ist zusätzlich begrenzt, da Patienten für die es keine Daten zum Zeitpunkt des Follow-up gibt (zum Beispiel verstorbene Patienten), in der Auswertung ausgeschlossen wurden.

Die einzelnen Komponenten des Immunsystems werden durch vielfältige Faktoren beeinflusst, beispielsweise durch das Alter, Begleiterkrankungen und den Gesundheitsstatus des Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung. Bei der Auswertung der Daten sind aus diesem Grund zudem die Rahmenbedingungen der Untersuchungen zu beachten. Ein möglicher Unsicherheitsfaktor ist auch, dass das Blut unmittelbar vor der Intervention im Herzkatheterlabor entnommen wurde. Somit ist die Stresssituation zu bedenken, in der sich die Patienten befanden. Darüber hinaus wurde das Blut vor dem Eingriff aus der Femoralisschleuse entnommen und im Follow-up aus einer peripheren Vene. Auch diese unterschiedlichen Entnahmestellen könnten Einfluss auf die Ergebnisse haben. Diese Faktoren sollten bei der Konzeption von möglichen Folgestudien mit beachtet werden, um aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten.

## 6. Zusammenfassung

Die Herzinsuffizienz ist eine Erkrankung mit wachsender Bedeutung in der Gesellschaft. Bei deren Pathogenese und Progression sind eine Vielzahl von Faktoren beteiligt, die bis heute nicht alle bekannt und untersucht sind. Dieser Umstand macht die Forschung in diesem Bereich notwendig, aber auch besonders interessant. In den vergangenen Jahren ist zunehmend eine mögliche Beteiligung des Immunsystems in den Fokus der aktuellen Forschung gerückt. Bisher wurde vor allem die Herzinsuffizienz nach ischämischer Herzmuskelschädigung untersucht. Wenig untersucht ist hingegen der Mechanismus, der zu einer Herzinsuffizienz als Folge von Volumenbelastung führt.

In der vorliegenden Studie wurden Patienten untersucht, die eine interventionelle Rekonstruktion der Mitralklappe erhielten. Die Intervention führte durch die Reduktion der Mitralklappeninsuffizienz insgesamt zu einer verbesserten Hämodynamik und scheint sich so positiv auf die Herzstruktur und demzufolge auf die Pumpleistung des Herzens auszuwirken. Untersucht wurden bei 160 Patienten vor der Intervention 13 Chemokine mittels Immunoassay sowie bei 68 Patienten die dendritischen Zellen im Blut und deren Oberflächenrezeptoren anhand eines spezialisierten FACS-Protokolls. Dieselben Untersuchungen wurden bei einem Follow-up nach 6 Monaten wiederholt und zudem an einer Kontrollgruppe mit 40 Personen durchgeführt.

Für die Chemokine MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-8, GRO $\alpha$ , TARC, MIG, IP-10 und I-TAC zeigte sich hier in der Patientengruppe vor der Intervention, im Vergleich zum Zeitpunkt des Follow-up, eine erhöhte Konzentration im Blut. Für MCP-1, RANTES, TARC, IP-10, I-TAC, IL-8 waren in der Patientengruppe höhere Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten.

Ausgewertet wurde außerdem, ob Korrelationen mit klinischen Parametern bestehen. Für MIP-1 $\alpha$  fand sich eine positive Korrelation mit der NYHA-Klasse, sowie für Konzentrationsänderung von MIP-1 $\alpha$  eine positive Korrelation mit der Zeit bis zu einer erneuten Hospitalisation. Für IL-8 ließ sich ebenfalls eine positive Korrelation mit der NYHA-Klasse aufzeigen.

Bei der Analyse der dendritischen Zellen ergaben sich insbesondere für die pDCs vor der Intervention signifikant niedrigere Anteile im Vergleich zum Follow-up. In der Kontrollgruppe lag der Anteil signifikant über dem der Patientengruppe vor der Intervention. Außerdem konnte eine erhöhte Expression von Oberflächenmarkern, welche vermehrt auf aktivierten Zellen zu finden sind, nachgewiesen werden.

Wie schon in vielen vorangegangenen Studien gezeigt, sind inflammatorische Prozesse an der Genese und Progression der Herzinsuffizienz beteiligt. Die Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchungen legen nahe, dass Entzündungsreaktionen auch bei valvulär bedingter Herzinsuffizienz eine besondere Bedeutung haben. Die inflammatorischen Prozesse entstehen durch ein komplexes Zusammenspiel von Zellen und Botenstoffen. Es ist also denkbar, dass auch DCs bei Herzinsuffizienz aktiviert und durch Chemokine ins Herzmuskelgewebe rekrutiert werden; hierdurch kommt es zu einer verminderten Anzahl der DCs im peripheren Blut. Zudem scheinen die erhöht nachweisbaren Chemokine direkte Effekte auf Myokardzellen zu haben und tragen dadurch sehr wahrscheinlich zur Entzündungsreaktion und Schädigung des Myokards und somit zur Pathogenese der Herzinsuffizienz bei.

Für den klinischen Alltag relevant ist außerdem, ob die untersuchten Parameter für die Diagnosestellung oder eine Prognoseabschätzung verwendet werden können. In Zusammenschau der präsentierten Ergebnisse kommen als mögliche prognostische Marker insbesondere die Chemokine MIP-1 $\alpha$  und IL-8 in Frage, da hier eine Korrelation mit der NYHA-Klasse beobachtet werden konnte. Um dies zu verifizieren sind weitere Studien notwendig.

## Literaturverzeichnis

1. Deutsche Herzstiftung. Deutscher Herzbericht. 2018;
2. Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, Beiser A, D'Agostino RB, Kannel WB, u. a. Lifetime risk for developing congestive heart failure: The Framingham Heart Study. *Circulation*. 2002;106(24):3068–72.
3. Bleumink GS, Knetsch AM, Sturkenboom MCJM, Straus SMJM, Hofman A, Deckers JW, u. a. Quantifying the heart failure epidemic: Prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure - The Rotterdam Study. *Eur Heart J*. 2004;25(18):1614–9.
4. Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland. *Wirtsch Stat*. 2017;Fachserie(Reihe 4):1–44.
5. Chronische Herzinsuffizienz - Nationale Versorgungsleitlinie, Langfassung. AWMF-Register-Nr: nvl-006. 2017;
6. Levine RA, Hagège AA, Judge DP, Muralidhar P, Dal-Bianco JP, Aikawa E, u. a. Mitral valve disease—morphology and mechanisms. *Nat Rev Cardiol*. 2015;12(3):689–710.
7. Pomerance A. Ageing Changes in Human Heart Valves. 1967;222–31.
8. Nickenig G, Mohr FW, Kelm M, Kuck KH, Boekstegers P, Hausleiter J, u. a. Konsensus der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung - und der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie zur Behandlung der Mitralklappeninsuffizienz. *Kardiologe*. 2013;7(2):76–90.
9. Trichon BH, Felker GM, Shaw LK, Cabell CH, O'Connor CM. Relation of frequency and severity of mitral regurgitation to survival among patients with left ventricular systolic dysfunction and heart failure. *Am J Cardiol*. 2003;91(5):538–43.
10. Mann DL, Young JB. Basic mechanisms in congestive heart failure. Recognizing the role of proinflammatory cytokines. *Chest*. 1994;105(3):897–904.
11. Mann DL. Stress-Activated Cytokines and The Heart: From Adaptation to Maladaptation. *Annu Rev Physiol*. 2003;65(1):81–101.

12. Mann DL. Innate Immunity and the failing Heart: The Cytokine Hypothesis revisited. *Circ Res.* 2015;(116):1254–68.
13. Ikeda U, Ohkawa F, Seino Y, Yamamoto K, Hidaka Y, Kasahara T, u. a. Serum interleukin 6 levels become elevated in acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 1992;24(6):579–84.
14. Basaran Y, Basaran MM, Babacan KF, Ener B, Okay T, Gök H, u. a. Serum tumor necrosis factor levels in acute myocardial infarction and unstable angina pectoris. *Angiology.* 1993;44(4):332–7.
15. Matsumori A, Yamada T, Suzuki H, Matoba Y, Sasayama S. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br Heart J.* 1994;72(6):561–6.
16. Levine B, Kalman J, Mayer L, Filit HM. Elevated Circulating Levels of Tumor Necrosis Factor in Severe Chronic Heart Failure. *N Engl J Med.* 1990;236–41.
17. Testa M, Yeh M, Lee P, Fanelli R, Loperfido F, Berman JW, u. a. Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 1996;28(4):964–71.
18. Bozkurt B, Mann DL, Deswal A. Biomarkers of inflammation in heart failure. *Heart Fail Rev.* 2010;15(4):331–41.
19. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: A report from the studies of left ventricular dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol.* 1996;27(5):1201–6.
20. Tsutamoto T, Hisanaga T, Wada A, Maeda K, Ohnishi M, Fukai D, u. a. Interleukin-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure, and the high plasma level of interleukin-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31(2):391–8.

21. Munger MA, Johnson B, Amber IJ, Callahan KS, Gilbert EM. Circulating concentrations of proinflammatory cytokines in mild or moderate heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 1996;77:723–7.
22. Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, Young JB, White BG, Mann DL. Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: An analysis of the cytokine database from the Vesnarinone Trial (VEST). *Circulation.* 2001;103(16):2055–9.
23. Dick SA, Epelman S. Chronic heart failure and inflammation. *Circ Res.* 2016;119(1):159–76.
24. Epelman S, Liu PP, Mann DL. Role of Innate and Adaptive Immunity in Cardiac Injury and Repair. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(2):117–29.
25. Naito K, Anzai T, Sugano Y, Maekawa Y, Kohno T, Yoshikawa T, u. a. Differential Effects of GM-CSF and G-CSF on Infiltration of Dendritic Cells during Early Left Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction. *J Immunol.* 2008;181(8):5691–701.
26. Damås JK, Eiken HG, Øie E, Bjerkeli V, Yndestad A, Ueland T, u. a. Myocardial expression of CC- and CXC-chemokines and their receptors in human end-stage heart failure. *Cardiovasc Res.* 2000;47(4):778–87.
27. Gullestad L, Kjekshus J, Damås JK, Ueland T, Yndestad A, Aukrust P. Agents targeting inflammation in heart failure. *Expert Opin Investig Drugs.* 2005;14(5):557–66.
28. Charo IF, Ransohoff RM. The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. *N Engl J Med.* 2006;354(6):610–21.
29. Rossi D, Zlotnik A. The biology of the chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol.* 2000;18(1):217–42.
30. Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med.* 2001;250(2):91–104.
31. Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: Basic Chemokines Grammar for Immune Cells. *Annu Rev Immunol.* 2004;22(1):891–928.

32. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000;12(2):121–7.
33. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, u. a. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*. 1997. S. 640–2.
34. Kennedy J, Kelner GS, Kleyensteuber S, Schall TJ, Weiss MC, Yssel H, u. a. Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. *J Immunol*. 1995;155(1):203–9.
35. Sokol CL, Luster AD. The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(5):1–20.
36. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert C a, Horuk R, Matsushima K, u. a. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*. 2000;52(1):145–76.
37. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*. 1991;203–8.
38. Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester G-R, Aicher A. *Taschenatlas der Immunologie*. 2. Auflage. 2007. 44–57 S.
39. Sozzani S, Luini W, Borsatti A, Polentarutti N, Zhou D, Piemonti L, u. a. Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines. *J Immunol*. 1997;159(4):1993–2000.
40. Liu Y-J. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell*. 2001;106(3):259–62.
41. Banchereau J, Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245–52.
42. Murphy K, Travers P, Walport M. *Janeway Immunologie T-Zell-Immunität*. 7. Aufl. 2009. 407–477 S.
43. Dzopalic T, Rajkovic I, Dragicevic A, Colic M. The response of human dendritic cells to co-ligation of pattern-recognition receptors. *Immunol Res*. 2012;52(1–2):20–33.
44. Sallusto F, Lanzavecchia A. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Res*. 2002;4 Suppl 3:S127-32.

45. Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2001;31(11):3388–93.
46. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, Bazan F, u. a. Subsets of Human Dendritic Cell Precursors Express Different Toll-like Receptors and Respond to Different Microbial Antigens. *J Exp Med.* 2001;194(6):863–70.
47. Steinman BRM, Swanson J. The Endocytic Activity of Dendritic Cells. *Commentary.* 1995;182(August).
48. Austyn JM. New Insights into The Mobilization and Phagocytic Activity of Dendritic Cells. *J Exp Med.* 1996;183(April):1287–92.
49. Collins M, Ling V, Carreno BM. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol.* 2005;6(6):1–7.
50. Randolph GJ, Ochando J, Partida-Sánchez S. Migration of Dendritic Cell Subsets and their Precursors. *Annu Rev Immunol.* 2008;26(1):293–316.
51. Sozzani S, Sallusto F, Luini W, Zhou D, Piemonti L, Allavena P, u. a. Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and a distinct set of chemokines. *J Immunol.* 1995;155:3292–5.
52. Xu LL, Warren MK, Rose WL, Gong W, Wang JM. Human recombinant monocyte chemotactic protein and other C-C chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells in vitro. *J Leukoc Biol.* 1996;60(3):365–71.
53. Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, u. a. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol.* 1998;161:1083–6.
54. Boekstegers P, Hausleiter J, Baldus S, von Bardeleben RS, Beucher H, Butter C, u. a. Interventionelle Behandlung der Mitralklappeninsuffizienz mit dem MitraClip®-Verfahren. *Der Kardiolog.* 2013;7(2):91–104.

55. Nashef SAM, Roques F, Michel P, Gauducheau E, Lemeshow S, Salamon R. European system for cardiac operative risk evaluation (EuroSCORE). *Eur J Cardio-Thoracic Surg.* 1999;16(1):9–13.
56. Patzelt J, Zhang Y, Magunia H, Ulrich M, Jorbenadze R, Droppa M, u. a. Improved mitral valve coaptation and reduced mitral valve annular size after percutaneous mitral valve repair (PMVR) using the MitraClip system. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2018;19(7):785–91.
57. Gaemperli O, Biaggi P, Gugelmann R, Osranek M, Schreuder JJ, Bühler I, u. a. Real-Time Left Ventricular Pressure-Volume Loops During Percutaneous Mitral Valve Repair With the MitraClip System. 2013;L:1018–27.
58. Patzelt J, Zhang Y, Magunia H, Jorbenadze R, Droppa M, Ulrich M, u. a. Immediate increase of cardiac output after percutaneous mitral valve repair (PMVR) determined by echocardiographic and invasive parameters: Patzelt: Increase of cardiac output after PMVR. *Int J Cardiol.* 2017;236:356–62.
59. Siegel RJ, Biner S, Rafique AM, Rinaldi M, Lim S, Fail P, u. a. The acute hemodynamic effects of mitralclip therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(16):1658–65.
60. Grayburn PA, Foster E, Sangli C, Weissman NJ, Massaro J, Glower DG, u. a. Relationship Between the Magnitude of Reduction in Mitral Regurgitation Severity and Left Ventricular and Left Atrial Reverse Remodeling After MitraClip Therapy. 2013;1667–74.
61. Feldman T, Foster E, Glower DD, Kar S, Rinaldi MJ, Fail PS, u. a. Percutaneous Repair or Surgery for Mitral Regurgitation. *New Engl J Med.* 2011;683–93.
62. Feldman T, Kar S, Rinaldi M, Fail P, Hermiller J, Smalling R, u. a. Percutaneous Mitral Repair With the MitraClip System. Safety and Midterm Durability in the Initial EVEREST (Endovascular Valve Edge-to-Edge REpair Study) Cohort. *J Am Coll Cardiol [Internet].* 2009;54(8):686–94. Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2009.03.077>

63. Feldman T, Kar S, Elmariah S, Smart SC, Trento A, Siegel RJ, u. a. Randomized Comparison of Percutaneous Repair and Surgery for Mitral Regurgitation 5-Year Results of EVEREST II. *J Am Coll Cardiol.* 2015;66(25):2844–54.
64. Mauri L, Garg P, Massaro JM, Foster E, Glower D, Mehoudar P, u. a. The EVEREST II Trial: Design and rationale for a randomized study of the Evalve mitraclip system compared with mitral valve surgery for mitral regurgitation. *Am Heart J.* 2010;160(1):23–9.
65. Murphy K, Travers P, Walport M. *Janeway Immunologie.* 7. Aufl. 2009. 952–954 S.
66. Manual for Human Proinflammatory Chemokine Panel (13-plex)-LEGENDplex™. BioLegend®;
67. Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Abou-Khamis T, u. a. CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res.* 2005;96(8):881–9.
68. Nossuli TO, Frangogiannis NG, Knuefermann P, Lakshminarayanan V, Dewald O, Evans a J, u. a. Brief murine myocardial I/R induces chemokines in a TNF-alpha-independent manner: role of oxygen radicals. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;281(6):H2549-58.
69. Montecucco F, Braunersreuther V, Lenglet S, Delattre BMA, Pelli G, Buatois V, u. a. CC chemokine CCL5 plays a central role impacting infarct size and post-infarction heart failure in mice. *Eur Heart J.* 2012;33(15):1964–74.
70. Parissis JT, Adamopoulos S, Venetsanou KF, Mentzikof DG, Karas SM, Kremastinos DT. Serum Profiles of C-C Chemokines in Acute Myocardial Infarction: Possible Implication in Postinfarction Left Ventricular Remodeling. *J Interf Cytokine Res.* 2002;22(2):223–9.
71. Aukrust P, Ueland T, Müller F, Andreassen AK, Nordøy I, Aas H, u. a. Elevated Circulating Levels of C-C Chemokines in Patients With Congestive Heart Failure. 2009;1136–43.

72. Shioi T, Matsumori A, Kihara Y, Inoko M, Ono K, Iwanaga Y, u. a. Increased Expression of Interleukin-1 $\beta$  and Monocyte Chemoattractant and Activating Factor/Monocyte Chemoattractant Protein-1 in the Hypertrophied and Failing Heart With Pressure Overload. *Circ Res.* 1971;XIII(2):437–45.
73. Behr TM, Wang X, Aiyar N, Coatney RW, Li X, Koster P, u. a. Monocyte chemoattractant protein-1 is upregulated in rats with volume- overload congestive heart failure. *Circulation.* 2000;102(11):1315-22.
74. Damås JK, Gullestad L, Aass H, Simonsen S, Fjeld JG, Wikeby L, u. a. Enhanced gene expression of chemokines and their corresponding receptors in mononuclear blood cells in chronic heart failure - Modulatory effect of intravenous immunoglobulin. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38(1):187–93.
75. Saeki H, Tamaki K. Thymus and activation regulated chemokine (TARC)/CCL17 and skin diseases. *J Dermatol Sci.* 2006;43(2):75–84.
76. Weber C, Meiler S, Döring Y, Koch M, Drechsler M, Megens RTA, u. a. CCL17-expressing dendritic cells drive atherosclerosis restraining regulatory T cell homeostasis in mice. 2011;121(7).
77. Ye Y, Yang X, Zhao X, Chen L, Xie H, Zeng Y, u. a. Serum chemokine CCL17/thymus activation and regulated chemokine is correlated with coronary artery diseases. *Atherosclerosis.* 2015;238(2):365–9.
78. Altara R, Gu YM, Struijker-Boudier HAJ, Thijs L, Staessen JA, Blankesteyn WM. Left ventricular dysfunction and CXCR3 ligands in hypertension: From animal experiments to a population-based pilot study. *PLoS One.* 2015;10(10):1–12.
79. Altara R, Manca M, Hessel MH, Gu Y, van Vark LC, Akkerhuis KM, u. a. CXCL10 Is a Circulating Inflammatory Marker in Patients with Advanced Heart Failure: a Pilot Study. *J Cardiovasc Transl Res.* 2016;9(4):302–14.
80. Damås JK, Gullestad L, Ueland T, Solum NO, Simonsen S, Frøland SS, u. a. CXC-chemokines, a new group of cytokines in congestive heart failure--possible role of platelets and monocytes. *Cardiovasc Res.* 2000;45(2):428–36.

81. Trofimov ES, Poskrebysheva AS. Study on Activity of Inflammatory Factors in Patients with Chronic Heart Failure Depending on the Stage of the Disease and NYHA Class. *Bull Exp Biol Med.* 2015;158(5):614–6.
82. Nymo SH, Hulthe J, Ueland T, McMurray J, Wikstrand J, Askevold ET, u. a. Inflammatory cytokines in chronic heart failure: Interleukin-8 is associated with adverse outcome. Results from CORONA. *Eur J Heart Fail.* 2014;16(1):68–75.
83. Breland UM, Halvorsen B, Hol J, Øie E, Paulsson-Berne G, Yndestad A, u. a. A potential role of the CXC chemokine GRO $\alpha$  in atherosclerosis and plaque destabilization: Downregulatory effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(5):1005–11.
84. Lamkhioued B, Renzi PM, Abi-Younes S, Garcia-Zepada EA, Allakhverdi Z, Ghaffar O, u. a. Increased expression of eotaxin in bronchoalveolar lavage and airways of asthmatics contributes to the chemotaxis of eosinophils to the site of inflammation. *J Immunol.* 1997;159(9):4593–601.
85. Barnes DA, Tse J, Kaufhold M, Owen M, Hesselgesser J, Strieter R, u. a. Polyclonal antibody directed against human RANTES ameliorates disease in the Lewis rat adjuvant-induced arthritis model. *J Clin Invest.* 1998;101(12):2910–9.
86. Sasayama S, Okada M, Matsumori A. Chemokines and cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res.* 2000;45(2):267–9.
87. Morrow DA, De Lemos JA. Benchmarks for the assessment of novel cardiovascular biomarkers. *Circulation.* 2007;115(8):949–52.
88. Ueland T, Gullestad L, Nymo SH, Yndestad A, Aukrust P, Askevold ET. Inflammatory cytokines as biomarkers in heart failure. *Clin Chim Acta.* 2015;443:71–7.
89. Habib FM, Springall DR, Davies GJ, Oakley CM, Yacoub MH, Polak JM. Tumour necrosis factor and inducible nitric oxide synthase in dilated cardiomyopathy. *Lancet.* 1996;347(9009):1151–5.
90. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young JB, u. a. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Bd. 93, Circulation.* 1996. S. 704–11.

91. Yilmaz A, Weber J, Cicha I, Stumpf C, Klein M, Raithel D, u. a. Decrease in Circulating Myeloid Dendritic Cell Precursors in Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(1):70–80.
92. Sugi Y, Yasukawa H, Kai H, Fukui D, Futamata N, Mawatari K, u. a. Reduction and activation of circulating dendritic cells in patients with decompensated heart failure. *Int J Cardiol.* 2011;147(2):258–64.
93. Gill MA, Blanco P, Arce E, Pascual V, Banchereau J, Palucka AK. Blood dendritic cells and DC-poietins in systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol.* 2002;63(12):1172–80.
94. Farkas L, Beiske K, Lund-Johansen F, Brandtzaeg P, Jahnsen FL. Plasmacytoid Dendritic Cells (Natural Interferon-  $\alpha/\beta$ -Producing Cells) Accumulate in Cutaneous Lupus Erythematosus Lesions. *Am J Pathol.* 2001;159(1):237–43.
95. Ozaki Y, Amakawa R, Ito T, Iwai H, Tajima K, Uehira K, u. a. Alteration of peripheral blood dendritic cells in patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2001;44(2):419–31.
96. Ota M, Amakawa R, Uehira K, Ito T, Yagi Y, Oshiro A, u. a. Involvement of dendritic cells in sarcoidosis. *Thorax.* 2004;59(5):408–13.
97. Upham JW, Denburg JA, O'Byrne PM. Rapid response of circulating myeloid dendritic cells to inhaled allergen in asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy.* 2002;32(6):818–23.
98. KleinJan A, Willart M, van Rijt LS, Braunstahl GJ, Leman K, Jung S, u. a. An essential role for dendritic cells in human and experimental allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118(5):1117–25.
99. Kunitani H, Shimizu Y, Murata H, Higuchi K, Watanabe A. Phenotypic analysis of circulating and intrahepatic dendritic cell subsets in patients with chronic liver diseases. *J Hepatol.* 2002;36(6):734–41.
100. Wertheimer AM, Bakke A, Rosen HR. Direct enumeration and functional assessment of circulating dendritic cells in patients with liver disease. *Hepatology.* 2004;40(2):335–45.

101. Choi J-H, Do Y, Cheong C, Koh H, Boscardin SB, Oh Y-S, u. a. Identification of antigen-presenting dendritic cells in mouse aorta and cardiac valves. *J Exp Med* [Internet]. 2009;206(3):497–505. Verfügbar unter: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20082129>
102. Skowasch D, Schrempf S, Wernert N, Steinmetz M, Jabs A, Tuleta I, u. a. Cells of primarily extravalvular origin in degenerative aortic valves and bioprostheses. *Eur Heart J*. 2005;26(23):2576–80.
103. Smorodinova N, Bláha M, Melenovský V, Rozsivalová K, Přidal J, Ďurišová M, u. a. Analysis of immune cell populations in atrial myocardium of patients with atrial fibrillation or sinus rhythm. *PLoS One*. 2017;12(2):1–13.
104. Athanassopoulos P, Vaessen LMB, Maat APWM, Balk AHMM, Weimar W, Bogers AJJC. Peripheral blood dendritic cells in human end-stage heart failure and the early post-transplant period: Evidence for systemic Th1 immune responses. *Eur J Cardio-thoracic Surg*. 2004;25(4):619–26.
105. Bleijs DA, Geijtenbeek TBH, Figdor CG, Van Kooyk Y. DC-SIGN and LFA-1: A battle for ligand. *Trends Immunol*. 2001;22(8):457–63.
106. de la Fuente H, Mittelbrunn M, Sánchez-Martín L, Vicente-Manzanares, Miguel Lamana A, Pardi R, Cabanas C, u. a. Synaptic Clusters of MHC Class II Molecules Induced on DCs by Adhesion Molecule-mediated Initial T-Cell Scanning. *Mol Biol Cell*. 2005;125:3314–22.
107. Yokoyama H, Kuwao S, Kohno K, Suzuki K, Kameya T, Izumi T. Cardiac dendritic cells and acute myocarditis in the human heart. Bd. 64, *Japanese Circulation Journal*. 2000. S. 57–64.
108. Yndestad A, Holm AM, Müller F, Simonsen S, Frøland SS, Gullestad L, u. a. Enhanced expression of inflammatory cytokines and activation markers in T-cells from patients with chronic heart failure. 2003;60(June):141–6.
109. Devaux B, Scholz D, Hirche A, Klovekorn WP, Schaper J. Upregulation of cell adhesion molecules and the presence of low grade inflammation in human chronic heart failure. *EurHeart J*. 1997;18:470–9.

## **Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, Abteilung Innere Medizin III, Kardiologie und Kreislaufkrankungen unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Harald F. Langer durchgeführt.

Daneben waren Herr Dr. Johannes Patzelt, Herr Frederic Emschermann und Frau Sarah Gekeler an der Betreuung beteiligt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Harald F. Langer.

Die Durchführung des Multiplex Chemokine-Assay wurde nach Einarbeitung durch Herrn Frederic Emschermann und Frau Dr. Anja Fröhlich der Firma BioLegend® von mir eigenständig durchgeführt. Die Analyse der dendritischen Zellen erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Elisabeth Habel, Frau Yingying Zhang und Frau Chaolan Lin.

Die klinischen Daten der Patienten und deren Korrelationen mit den von mir erhobenen Ergebnisse des Chemokine-Assays wurden von Herrn Dr. Johannes Patzelt zur Verfügung gestellt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Beratung durch Herrn Prof. Dr. Martin Eichner vom Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie in Tübingen.

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

Tübingen, den 24.07.2020

## Danksagung

Die Dissertation gab mir die Chance, Einblicke in die Welt des wissenschaftlichen Arbeitens zu erhalten. Sehr gerne möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die dies ermöglicht und zum Gelingen beigetragen haben.

Mein Dank gebührt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Harald F. Langer für die Bereitstellung des spannenden Themas und die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Herzlichen Dank für die sehr gute Betreuung als Doktorvater, die guten Gespräche und die konstruktive Unterstützung.

Mein großer Dank gilt Herrn Dr. Johannes Patzelt für die vielseitige Unterstützung in Tübingen und auch aus der Ferne. Vielen Dank insbesondere für die Bereitstellung der klinischen Daten und für das Erstellen der Korrelationen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Langer für die tatkräftige Unterstützung im Labor und die überaus angenehme Arbeitsatmosphäre. Dabei geht ein besonderer Dank an Frederic Emschermann und Sarah Gekeler, die mich in die Laborarbeit eingeführt und jederzeit bei allen Fragen und Hürden weitergeholfen haben. Ein großes Dankeschön auch Yinging Zhang und Chaloan Lin für die hervorragende und unkomplizierte Zusammenarbeit. Ohne sie wäre die zeitaufwändige Versuchsdurchführung nicht möglich gewesen.

Ein weiterer Dank gilt Frau Dr. Inka Montero vom Promotionsbüro der Universität Tübingen, die bei Problemen immer als Ansprechpartnerin zur Verfügung stand. Auch allen Freunden und Verwandten, die während der Zeit meines Studiums und der Dissertation auf vielfältige Weise immer für mich da waren, möchte ich herzlich danken. Besonders danken möchte ich meiner Freundin Elisabeth Habel, gemeinsam haben wir alle Höhen und Tiefen gemeistert und uns gegenseitig immer wieder ermutigt und unterstützt.

Zu guter Letzt gilt ein ganz großer Dank meinen Eltern, meinen Schwestern und meinem Freund Raphael Kohler. Nur mit ihrer verlässlichen Unterstützung und Begleitung in allen Lebenslagen waren mein Studium in Tübingen und die Dissertation in dieser Form möglich.