

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

**Bone Morphogenetic Proteins-2, -4 und -7 und ihre  
Bedeutung im Krankheitsprozess der kalzifizierten  
hochgradigen Aortenklappenstenose**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

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

**vorgelegt von  
Holik, Madeleine Caroline, geb. Ilg**

**2022**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

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

Tag der Disputation: 03.11.2022

Danke.

*Sei ohne Furcht, glaube nur!*

*Lukas 8,50*

## Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>7</b>
<b>II.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>14</b>
<b>III.</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>15</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>18</b>
1.1	Klinische Bedeutung der Aortenklappenstenose .....	18
1.2	Epidemiologie und Ätiologie .....	19
1.3	Klassifikation der hochgradigen Aortenklappenstenose .....	20
1.4	Therapie der hochgradigen, kalzifizierten Aortenklappenstenose .....	22
1.5	Pathophysiologie der kalzifizierten hochgradigen Aortenklappenstenose .....	25
1.5.1	Klinisches Erscheinungsbild .....	25
1.5.2	Molekularbiologische Grundlagen der hochgradigen, kalzifizierten Aortenklappenstenose .....	27
1.6	Zielsetzung und Forschungshypothese .....	33
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>35</b>
2.1	Geräte und Chemikalien.....	35
2.2	Hard- und Software .....	39
2.3	Studienbeschreibung .....	39
2.3.1	Patientendatenerhebung .....	41
2.3.2	Immun- und Histochemische Färbungen .....	43
2.3.2.1	Gewebeaufbereitung und Einbettung in Paraffin.....	43
2.3.2.2	Anfertigungen von Paraffinschnitten am Mikrotom.....	45
2.3.2.3	Entparaffinierung .....	46
2.3.2.4	Hämalaun-Eosin-Färbung .....	47

2.3.2.5	Immunhistochemische Färbungen.....	49
2.3.2.6	Immunhistochemische Analyse und Auswertung.....	52
2.3.3	Durchflusszytometrische Analysen .....	53
2.3.3.1	Aufbereitung und Färbung CD14-positiver Zellen .....	54
2.3.3.2	Aufbereitung und Färbung CD42b-positiver Zellen.....	55
2.3.3.3	Durchführung und Auswertung durchflusszytometrischer Analysen .....	56
2.3.4	Statistische Analyse.....	57
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>59</b>
3.1	Vergleich von rasch und langsam progredienten Aortenklappenstenosen .....	59
3.1.1	Patientencharakteristik rasch und langsam progredienter Aortenklappenstenosen .....	59
3.1.2	Valvuläre Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner von Patienten mit rasch und langsam progredienter Aortenklappenstenose ...	69
3.1.3	Monozytäre und thrombozytäre Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner von Patienten mit rasch und langsam progredienter Aortenklappenstenose .....	85
3.1.4	Korrelationen zwischen den klinischen und molekularbiologischen Erscheinungsbildern der Aortenklappenstenose. ....	92
3.2	Dynamische thrombozytäre und monozytäre Proteinexpressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner .....	98
3.3	Vergleich von high-gradient und low-gradient Aortenklappenstenose	105
3.3.1	Patientencharakteristik .....	105
3.3.2	Valvuläre Expressionsmuster der BMPs und ihrer Interaktionspartner von Patienten mit high-gradient und low-gradient Aortenklappenstenose .....	109

<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>114</b>
4.1	Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner im Herzklappengewebe von Patienten mit rasch und langsam progredienter Aortenklappenstenose .....	114
4.2	Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner im Blut von Patienten mit rasch langsam progredienter Aortenklappenstenose.....	124
4.3	Dynamische monozytäre und thrombozytäre Proteinexpressionen der BMPs und ihrer Interaktionpartner .....	127
4.4	Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner im Herzklappengewebe von Patienten mit high-gradient und low-gradient Aortenklappenstenose .....	131
4.5	Ausblick und Limitationen: BMPs und ihre Interaktionspartner als neues diagnostisches, prognostisches und therapeutisches Tool der hochgradigen kalzifizierten Aortenklappenstenose.....	133
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>137</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>138</b>
<b>7</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil</b> .....	<b>150</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>151</b>

## I. Abkürzungsverzeichnis

$\Delta p_{mean}$	- mittlerer Druckgradient über der Aortenklappe
$\mu\text{l}$	- Mikroliter
Abb.	- Abbildung
Abk.	- Abkürzung
ACC	- Amerikanisches Institut für Kardiologie <i>engl. American College of Cardiology</i>
ACE	- Angiotensin-Converting-Enzyme
ADP	- Adenosindiphosphat
AHA	- Amerikanischer Herzverband <i>engl. American Heart Association</i>
ALP	- alkaline Phosphatasen
AÖF	- Aortenklappenöffnungsfläche
APC	- Allophycocyanin (Fluorochrom der Durchflusszytometrie)
AS	- Aortenklappenstenose
ASP.	- Arachidonsäure
ASS	- Acetylsalicylsäure
ASIII	- hochgradige Aortenklappenstenose (= sAS)
ASTRONOMER	- Studie über Rosuvastatintherapie in der Aortenklappenstenose (publiziert 2010) <i>engl. the Aortic Stenosis Progression Observation: Measuring Effects of Rosuvastatin</i> ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00800800
AUC	- Fläche unter der Kurve <i>engl. Area Under the Curve</i>
AVA	- Aortenklappenöffnungsfläche <i>engl. aortic valve area</i>
AVATAR-Studie	- Studie, die eine konservative Therapie im Vergleich zum Aortenklappenersatz in der asymptotischen, hochgradigen

Aortenklappenstenose untersucht (derzeit in Bearbeitung)

*engl. Aortic Valve Replacement versus conservative treatment in asymptomatic severe aortic stenosis*

ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02436655

BMI	-	Body-Mass-Index
BMP-2	-	knochen-morphogenetisches Eiweiß Nummer 2 <i>engl. Bone Morphogenetic Protein 2</i>
BMP-4	-	knochen-morphogenetisches Eiweiß Nummer 4 <i>engl. Bone Morphogenetic Protein 4</i>
BMP-7	-	knochen-morphogenetisches Eiweiß Nummer 7 <i>engl. Bone Morphogenetic Protein 7</i>
bzgl.	-	bezüglich
AS	-	kalzifizierte Aortenklappenerkrankung <i>engl. calcific aortic valve disease</i>
CD3	-	Unterscheidungsfaktor 3 <i>engl. Cluster of Differentiation Nummer 3</i>
CD62p	-	Unterscheidungsfaktor 62p, auch P-Selektin <i>engl. Cluster of Differentiation Nummer 62p</i>
CD68	-	Unterscheidungsfaktor 68 <i>engl. Cluster of Differentiation Nummer 68</i>
CK	-	Creatin-Kinase
cm	-	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	-	Quadratzenimeter
CRP	-	C-reaktives Protein
CTSG	-	Gen des zugehörigen Proteins Cathepsin G
CXCL12	-	CXC - Motiv Chemokinligand 12, auch SDF-1 oder PBSF
CXCL14	-	CXC - Motiv Chemokinligand 14
CXCR4	-	CXC - Motiv Chemokinrezeptor 4
CXCR7	-	CXC - Motiv Chemokinrezeptor 7

DAPT	-	duale Thrombozytenaggregationshemmung <i>engl. Dual Antiplatelet Therapy</i>
dt.	-	deutsch
EACTS	-	europäischer Verband für Thoraxchirurgie <i>engl. European Association of Cardiothoracic Surgery</i>
engl.	-	englisch
ESC	-	europäische kardiologische Gesellschaft <i>engl. European Society of Cardiology</i>
FACS	-	Durchflusszytometrische Analyse <i>engl. fluorescence-activated cell sorting</i>
FITC	-	Fluorescein-5-isothiocyanat (Fluorochrom der Durchflusszytometrie)
FMO-Kontrolle	-	Fluoreszenz-Minus-Eins-Kontrolle <i>engl. Fluorescence-minus-one control</i>
FSC	-	vorwärts gestreutes Licht (Durchflusszytometrie) <i>engl. forward-scattered light</i>
GFR	-	glomeruläre Filtrationsrate
h	-	Stunde <i>engl. hour</i>
HbA1_c	-	Hämoglobin A1c
HDL	-	Lipoprotein mit hoher Dichte <i>engl. High-Density-Lipoprotein</i>
i.d.R.	-	in der Regel
IgG	-	Immunglobulin G
IL22RA2	-	Gen des zugehörigen Proteins Interleukin 22 Rezeptor, Untereinheit Alpha 2
IQA	-	Interquartilsabstand (1. - 3. Quartil)
KHK	-	Koronare Herzerkrankung
KLRB1	-	Gen des zugehörigen Proteins Killerzelllectin ähnlicher Rezeptor B1 <i>engl. Killer Cell Lectin Like Receptor B1</i>

LDL	- Lipoprotein mit geringer Dichte <i>engl. Low-Density-Lipoprotein</i>
LSAB	- Labelled (Strept-)Avidin-Biotin-Methode
IpAS	- langsam progrediente, kalzifizierte, hochgradige Aortenklappenstenose
LV	- linker Ventrikel
LVEF	- linksventrikuläre Ejektionsfraktion <i>engl. left ventricular ejection fraction</i>
m <sup>2</sup>	- Quadratmeter
MACE	- schwerwiegende kardiale Komplikation (Tod, Reoperation, Restenose, Rehospitalisierung, Myokardinfarkt und Schlaganfall) <i>engl. Major Adverse Cardiac Even(s)</i>
MCP-1	- monozytenchemotaktisch wirkendes Protein 1 <i>engl.: Monocyte Chemoattractant Protein -1</i>
MFI (pl. MFIs)	- Mittlere Fluoreszenzintensität (pl. Mittlere Fluoreszenzintensitäten)
MIF	- Makrophagen-Migrationsinhibierender Faktor <i>engl. Macrophage Migration Inhibitory Factor</i>
min	- Minute/n
ml	- Milliliter
mmHg	- Millimeter Quecksilbersäule
MSCT	- Mehrschicht Computertomographie <i>engl. Multislice computer tomography</i>
oxLDL	- oxidiertes Lipoprotein mit geringer Dichte <i>engl. oxidized low-density Lipoprotein</i>
PAC-1	- Eiweiß PAC-1
pAVK	- periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	- Phosphat gepufferte Salzlösung
PBSF	- Pro B-Zellen wachstumsstimulierender Faktor, auch CXCL12 oder SDF-1 <i>engl. pre- B cell growth-stimulating factor</i>

PE	- Phycoerythrin (Flouorchrom der Durchflusszytometrie)
Pl.	- Plural
pmean	- Mitteldruck über der Aortenklappe
POI	- untersuchte Eiweiße (hier: BMP-2, -4, -7; CD3; CD68; CXCL14; CXCR4; CXCR7; MIF; Gremlin-1, SDF-1; TGF- $\beta$ 1) <i>engl. Proteins of Interest</i>
RAAVE	- Studie über Rosuvastatintherapie in der Aortenklappenstenose (publiziert 2007) <i>engl. Rosuvastatin Affecting Aortic Valve Endothelium</i>
RANK	- Rezeptoraktivator des nukleären Faktors Kappa B <i>engl. Receptor Activator of Nuclear factor Kappa</i>
RANKL	- RANK-Ligand, Ligand des Rezeptoraktivators des nukleären Faktors Kappa B <i>engl. Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B Ligand</i>
RNA	- Ribonukleinsäure <i>engl. Ribonucleinacid</i>
rpAS	- rasch progrediente, kalzifizierte, hochgradige Aortenklappenstenose
s	- Sekunde/n
sAS	- hochgradige Aortenklappenstenose (= ASIII°) <i>engl. severe aortic valve stenosis</i>
SALTIRE	- Studie über Atorvastatintherapie der Aortenklappenstenose (publiziert 2005) <i>engl. Scottish Aortic Stenosis and Lipid Lowering Trial, Impact on Regression</i>
SALTIRE II	- Studie über die Therapie mit Bisphosphonaten und Denosumab in der Aortenklappenstenose

	(in Vorbereitung, Studie wird derzeit analysiert) <i>engl. Scottish Aortic Stenosis and Lipid Lowering Trial, Impact on Regression</i> ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02132026
sCAVS	- kalzifizierte, hochgradige Aortenklappenstenose <i>engl. severe calcific aortic valve stenosis</i>
SDF-1	- Stromazellfaktor 1, auch CXCL12 oder PBSF <i>engl. stroma cell-derived factor 1</i>
SEAS	- Studie über Simvastatin- und Ezetimibtherapie der Aortenklappenstenose (publiziert 2008) <i>engl. Simvastatin and Ezetimibe in Aortic Stenosis</i> ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00092677
SIRS	- Systemisches Inflammatorisches Response-Syndrom <i>engl. Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
spAS	- langsam progrediente Aortenklappenstenose <i>engl. slow progressive aortic valve stenosis</i>
SSC	- Seitenstreulicht (Durchflusszytometrie) <i>engl. sideward-scattered light</i>
STS	- Gesellschaft der Thoraxchirurgen <i>engl. The Society of Thoracic Surgeons</i>
$SV_i$	- Schlagvolumenindex
Tab.	- Tabelle
TAVI	- Herzkathetergestützter Aortenklappenersatz <i>engl. transcatheter aortic valve implantation</i>
TEE	- transösophageale Echokardiographie
TGF- $\beta$ 1	- transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ 1 <i>engl. Transforming Growth Factor <math>\beta</math>1</i>
TIA	- Transitorische ischämische Attacke
TNF- $\alpha$	- Tumornekrosefaktor $\alpha$

	<i>engl. tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>
u.a.	- unter anderem
$V_{max}$	- maximale transvalvuläre Flussgeschwindigkeit
VECs	- valvuläre Endothelzellen <i>engl. (Pl.) valvular endothelial cells</i>
VEGFR2	- Rezeptor 2 des vaskulären, endothelialen Wachstumsfaktors <i>engl. vascular endothelial growth factor receptor 2</i>
VICs	- valvuläre interstitielle Zellen <i>engl. (Pl.) valvular interstitial cells</i>
VSMCs	- valvuläre glatte Muskelzellen <i>engl. (Pl.) valvular smooth muscle cells</i>
Wg	- Gencode flügellos <i>engl. wingless</i>
Wnt-Signalweg	- Signaltransduktionsweg benannt nach seinem Liganden Wnt (Zusammensetzung aus den Gennamen Wg und Int-1)

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Relative Häufigkeiten erworbener Herzklappenfehler nach Giannitsis et al.(17).....	19
Abbildung 2: Verlauf der Aortenklappenstenose nach Ross und Braunwald et al. (modifiziert) (29).....	26
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Pathophysiologie des valvulären Remodelings der kalzifizierten Aortenklappenstenose (modifiziert nach Otto CM et al. und Lerman et al.) (12, 48). ....	29
Abbildung 4: Schneideebene des in Paraffin eingebetteten Gewebes zur Sicherung der anatomischen Zuordnung (modifiziert nach Otto CM et al.) (68).....	46
Abbildung 5: Gating-Schema durchflusszytometrischer Analysen.....	57
Abbildung 6: Makroskopische Unterschiede von inflammatorisch und degenerativ veränderten Aortenklappen.....	69
Abbildung 7: Hämalaun-Eosin-Übersichtsfärbungen explantierter rasch und langsam progredienter Aortenklappenstenosen zeigen regional heterogene Verteilungsmuster zellkernhaltiger Zellen.....	70
Abbildung 8: Immunhistochemisch zeigen sich geringe Anfärbungen Cluster of Differentiation 3-positiver Zellen in explantierten rasch und langsam progredienten Aortenklappenstenosen. ....	71
Abbildung 9: Immunhistochemisch zeigen sich geringe Anfärbungen Cluster of Differentiation 68-positiver Zellen in explantierten rasch und langsam progredienten Aortenklappenstenosen.. ....	72
Abbildung 10: Mikroskopisch zeigen sich regional signifikante Unterschiede der Expressionen von Bone Morphogenetic Protein 2 in explantierten rasch und langsam progredienten Aortenklappenstenosen.....	73
Abbildung 11: Langsam progrediente Aortenklappenstenosen zeigen im Vergleich zu rasch progredienter Aortenklappenstenosen eine	

signifikant verstärkte Expressionen von Bone Morphogenetic Protein 2 im aortalseitigen Aortenklappengewebe.....	74
Abbildung 12: Mikroskopisch zeigen sich regional signifikante Unterschiede der Expressionen von Bone Morphogenetic Protein 7 in explantierten rasch und langsam progredienten Aortenklappenstenosen.....	75
Abbildung 13: Rasch progrediente Aortenklappenstenosen zeigen im Vergleich zu langsam progredienten Aortenklappenstenosen eine signifikant verstärkte Expressionen von Bone Morphogenetic Protein 7 im ventrikulärseitigen Aortenklappengewebe. ....	76
Abbildung 14: Mikroskopisch zeigen sich regional signifikante Unterschiede der Expressionen von Transforming Growth Factor Beta 1 in explantierten rasch und langsam progredienten Aortenklappenstenosen...	77
Abbildung 15: Langsam progrediente Aortenklappenstenosen zeigen im Vergleich zu rasch progredienten Aortenklappenstenosen eine signifikant verstärkte Expression von Transforming Growth Factor Beta 1 im aortalseitigen Aortenklappengewebe.....	78
Abbildung 16: Mikroskopisch zeigt sich eine deutliche Anfärbung von Bone Morphogenetic Protein 4 in explantierten rasch und langsam progredienten Aortenklappenstenosen.....	79
Abbildung 17: Mikroskopische Präsentation der Expressionen von Macrophage Migration Inhibitory Factor in explantierten rasch und langsam progredienten Aortenklappenstenosen.. ....	80
Abbildung 18: Mikroskopische Präsentation der Expressionen von Gremlin-1 in explantierten rasch und langsam progredienten Aortenklappenstenosen. ....	81
Abbildung 19: Es besteht eine dynamische intrazelluläre thrombozytäre Expression von CXCR4 .....	98
Abbildung 20: Es besteht eine dynamische intrazelluläre thrombozytäre Expression von CXCR7 .....	99

Abbildung 21: Es besteht eine dynamische monozytäre Oberflächenexpression von Transforming Growth Factor $\beta$ 1. ....	100
Abbildung 22: High-gradient Aortenklappenstenosen zeigen im Vergleich zu low-gradient Aortenklappenstenosen eine signifikant verstärkte Expressionen von Bone Morphogenetic Protein 2 im Aortenklappengewebe .....	109

### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der hochgradigen Aortenklappenstenose in vier Kategorien anhand der transösophagealen Echokardiographie gemäß den ESC/EATC Leitlinien 2014, 2017 und 2021 (1, 5, 7).....	21
Tabelle 2: Verwendete Antikörper .....	35
Tabelle 3: Geräte, Materialien und Chemikalien .....	37
Tabelle 4: Protokoll zur Einbettung von Gewebeproben in Paraffin für (immun-) histochemische Färbungen .....	44
Tabelle 5: Entparaffinierung von Paraffinschnitten .....	46
Tabelle 6: Hämalaun-Eosin-Färbung in Anlehnung an Romeis-Mikroskopische Technik 2015 (123).....	48
Tabelle 7: Immunhistochemische Färbung in Anlehnung an Romeis-Mikroskopische Technik 2015 sowie die Anweisungen der zugehörigen Datenkontrollblätter (123).....	49
Tabelle 8: Patientencharakteristik der Patienten mit rasch und langsam progredienten Aortenklappenstenosen.....	60
Tabelle 9: Tabellarische Übersicht immunhistochemischer Färbungen valvulärer Zellen des Aortenklappengewebes von Patienten mit rasch und langsam progredienter hochgradiger Aortenklappenstenose.....	83
Tabelle 10: Tabellarische Übersicht der mittleren Fluoreszenzintensitäten monozytärer und thrombozytärer durchflusszytometrischer Färbungen.. ...	86

Tabelle 11: Kalkulierte Kohortengröße für monozytäre und thrombozytäre Expressionen von BMP-2,-4, -7 und Gremlin-1. ....	91
Tabelle 12: Korrelationen klinischer und immunhistochemischer Marker .....	93
Tabelle 13: Dynamische monozytäre und thrombozytäre Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner. ....	102
Tabelle 14: Patientencharakteristik der Patienten mit high-gradient und low-gradient Aortenklappenstenose.....	106
Tabelle 15: Tabellarische Übersicht immunhistochemischer Färbungen des Aortenklappengewebes von Patienten mit high-gradient und low-gradient Aortenklappenstenose.....	110

# 1 Einleitung

## 1.1 Klinische Bedeutung der Aortenklappenstenose

Die Aortenklappenstenose (AS) ist die häufigste erworbene primäre Herzklappenerkrankung in Industrieländern mit einer Zweijahresüberlebensrate symptomatischer Patienten von 50 % (1-5). Trotz intensiver Forschungen auf dem Gebiet der AS fehlen therapeutische und prognostische Angriffspunkte, um diese häufige Erkrankung kausal therapieren zu können, denn bis heute gibt es keine medikamentöse Therapie, die das Outcome der Patienten verbessern oder das Fortschreiten der Erkrankung aufhalten kann (1, 6). Die einzigen Grundpfeiler der langfristigen Therapie stellen der chirurgische oder interventionelle Herzklappenersatz dar (4, 6-10). Sowohl unter den chirurgischen, als auch den kathetergestützten Herzklappeneingriffen, stellt die AS die häufigste Interventionsindikation aller strukturellen Herzerkrankungen dar (6).

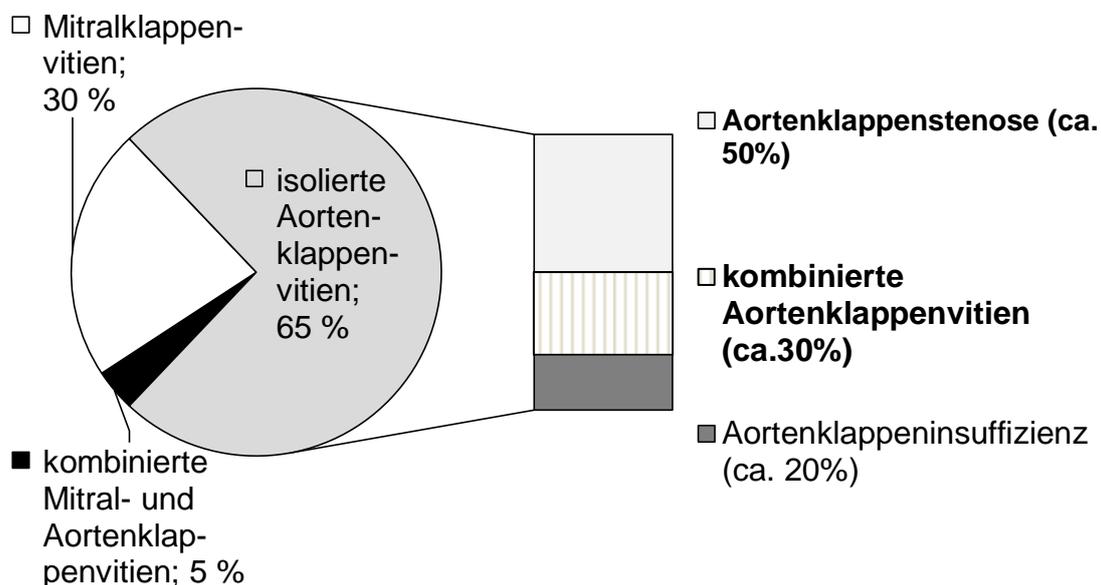
Die Prävalenz der AS hat in den letzten Jahren zugenommen (1, 6). Sie steigt mit dem Lebensalter, sodass circa 4 - 5 % der über 65-Jährigen an einer AS erkrankt sind (1, 8, 11, 12). Mit dem Auftreten von Symptomen wie beispielsweise Leistungsminderung, Prä- / Synkopen, Dyspnoe, Schwindel und Angina Pectoris sinkt die Prognose der AS deutlich (1, 4, 6). Patienten mit einer symptomatischen, hochgradigen AS und einem zu hohen Risiko für einen chirurgischen Herzklappenersatz haben ohne kathetergestützten Aortenklappenersatz (TAVI - *engl. transcatheter aortic valve implantation*) eine Einjahresüberlebensrate von 50 %, nach TAVI von 70 % (13).

Bisherige Forschungen auf dem Gebiet der AS deuten auf komplexe pathophysiologische Mechanismen hin, bei denen Inflammation, Fibrosierung, Kalzifikation, Ossifikation und Lipideinlagerungen in das Herzklappengewebe von Bedeutung sind (14, 15). Monozytäre als auch thrombozytäre Chemokine wie Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) und ihre Interaktionspartner, die Gegenstand vieler Forschungen sind, scheinen im Krankheitsprozess der AS eine bedeutende Rolle zu spielen (6). Es fehlt jedoch eine genaue Charakterisierung ihres Vorkommens im Herzklappengewebe und im Blut

betroffener Patienten, um therapeutische und prognostische Angriffspunkte dieser bisher nicht kausal therapierbaren Erkrankung finden zu können.

## 1.2 Epidemiologie und Ätiologie

Es werden kongenitale von erworbenen AS unterschieden (16). Circa 0,8 - 1 % aller Neugeborenen weisen eine Herz- und Gefäßfehlbildung auf, davon 6 % eine angeborene AS (17). Die häufigste Form der AS in Industrieländern stellt, mit deutlichem Unterschied, die erworbene, kalzifizierte AS dar, weshalb sich die vorliegende Arbeit ausschließlich mit dieser Form der AS befasst (16). Circa 70 % aller erworbenen Herzklappenvitien betreffen die Aortenklappe, 65 % stellen isolierte Vitien der Aortenklappe dar (Abbildung 1) (17). Circa vier Fünftel der isolierten Aortenklappenvitien äußern sich als AS (Abbildung 1) (17). Eine Übersicht über erworbene Herzklappenfehler und deren relative Häufigkeit zeigt Abbildung 1.



**Abbildung 1: Relative Häufigkeiten erworbener Herzklappenfehler nach Giannitsis et al. (17).** Circa 70 % aller erworbenen Herzklappenfehler betreffen die Aortenklappe. In 80 % der isolierten erworbenen Aortenklappenvitien liegt eine stenosierte Aortenklappe vor. Circa 30 % der isolierten Aortenklappenvitien präsentieren sich mit sowohl stenotischer als auch insuffizienter Komponente.

Neben den kardiovaskulären Risikofaktoren Dyslipoproteinämie, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie und familiäre Disposition stellt das Vorhandensein einer bikuspiden Aortenklappe, vor allem bei Patienten unter 60 Jahren, ein

Risikofaktor für die Entwicklung einer AS dar, denn circa die Hälfte der chirurgisch explantierten Aortenklappen sind bikuspide (6, 18-20). Ein weiterer Risikofaktor für die Entwicklung einer AS ist das männliche Geschlecht (21).

### 1.3 Klassifikation der hochgradigen Aortenklappenstenose

Die AS kann unter verschiedenen Gesichtspunkten eingeteilt werden. Hierzu zählen die Einteilungen nach Entstehung, Schweregrad oder klinischer Präsentation der AS (1, 4-6, 8, 16, 22, 23). Nach der Entstehung werden angeborene von erworbenen AS unterschieden. Die erworbene AS wird unterteilt in kalzifizierte, rheumatische, (post-)infektiöse oder sekundäre AS (4, 6, 17). Als Ursache einer sekundären AS kommen anuloaortale Ektasien, Aortenaneurysmen oder Mesoartitiden im Rahmen einer tertiären Syphilis in Betracht (17). Für die klinische Praxis ist die echokardiographische Einteilung nach Schweregrad sowohl prognostisch als auch therapeutisch von Bedeutung (1, 8, 16, 22). Es werden hochgradige AS, mit der schlechtesten Prognose, von moderaten und leichtgradigen AS unterschieden (1). Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur hochgradige, erworbene und kalzifizierte AS untersucht. Die hochgradige AS kann anhand der Aortenklappenöffnungsfläche, des in der transösophagealen Echokardiographie gemessenen mittleren Druckgradienten über der Aortenklappe sowie der maximalen Flussgeschwindigkeit im Bereich der Stenose, des Schlagvolumenindex, der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) und der klinischen Wahrscheinlichkeit für eine hochgradige AS in vier Kategorien aufgeteilt werden (1). Tabelle 1 zeigt vereinfacht die echokardiographische Einteilung der hochgradigen Aortenklappenstenose gemäß der aktuell als auch der zum Untersuchungszeitpunkt gültigen Leitlinie(n) der ESC/EATC (1, 5, 7, 22, 24). Eine AS mit einer Aortenklappenöffnungsfläche von unter einem Quadratzentimeter (cm<sup>2</sup>) und einem mittleren Druckgradienten über der Aortenklappe von mehr als 40 Millimeter Quecksilbersäule (mmHg) oder einer Flussgeschwindigkeit von mindestens 4 Metern pro Sekunde ( $\frac{m}{s}$ ) im Bereich der Stenose, wird als high-gradient AS bezeichnet (1). Gemäß der aktuell geltenden Leitlinie stellt eine

hochgradige high-gradient AS mit dem Auftreten von Symptomen eine Therapieindikation dar (1).

**Tabelle 1: Einteilung der hochgradigen Aortenklappenstenose in vier Kategorien anhand der transösophagealen Echokardiographie gemäß den ESC/EATC Leitlinien 2014, 2017 und 2021 (1, 5 ,7).**

<b>Vereinfachte Einteilung der erworbenen, kalzifizierten, hochgradigen Aortenklappenstenose (AS)</b>	<b>High-gradient AS</b>	<b>Low-gradient, low-flow AS mit reduzierter LVEF</b>	<b>Low-gradient, low-flow AS mit erhaltener LVEF</b>	<b>Low-gradient, normal-flow AS mit erhaltener LVEF</b>
Aortenklappenöffnungsfläche	< 1 cm <sup>2</sup>			
Mittlerer Druckgradient über der Aortenklappe	≥ 40 mmHg	< 40 mmHg		
Schlagvolumenindex	variabel	≤ 35 $\frac{ml}{m^2}$		> 35 $\frac{ml}{m^2}$
LVEF	variabel	< 50 %	> 50 %	
mögliche weitere diagnostische Verfahren		Stressechokardiographie	Calciumscore mittels MSCT	Leitlinien-gerechte Risikostratifizierung

AS - hochgradige Aortenklappenstenose; LVEF - linksventrikuläre Ejektionsfraktion; MSCT - mehrschicht Computertomographie (*engl. multislice computer tomography*).

Eine AS mit einem mittleren Druckgradienten von weniger als 40 mmHg beziehungsweise (bzw.) einer maximalen transvalvulären Flussgeschwindigkeit von unter  $4 \frac{m}{s}$  wird als low-gradient AS bezeichnet (1). Eine low-gradient AS wird anhand des auf die Körperoberfläche bezogenen Schlagvolumens, des Schlagvolumenindex, weiter in low-flow (Schlagvolumenindex maximal 35 Milliliter pro Quadratmeter ( $\frac{ml}{m^2}$ )) und normal-flow AS (Schlagvolumenindex über

$35 \frac{ml}{m^2}$  ) unterteilt (1, 5). Abhängig von der LVEF ist zur Überprüfung der Therapieindikation bei einer low-gradient, low-flow AS unterschiedliche Diagnostik notwendig, wie beispielsweise Stressechokardiographie oder computertomographische Bestimmung der Calciumscores (1, 5). Eine low-gradient, normal-flow AS mit erhaltener LVEF ist in der Regel (i.d.R.) eine moderate AS und wird nur bei klinischer Wahrscheinlichkeit für eine hochgradige AS als solche gewertet (1). Es ergeben sich vier Kategorien der hochgradigen AS: high-gradient AS, low-gradient, low-flow AS mit reduzierter LVEF, low-gradient, low-flow AS mit erhaltener LVEF und low-gradient, normal-flow AS mit erhaltener LVEF und klinischer Wahrscheinlichkeit einer hochgradigen AS (1, 5). Therapierelevant ist neben dieser echokardiographischen Klassifikation auch die Einteilung gemäß der klinischen Präsentation in asymptomatische und symptomatische AS (1, 5). Zu den typischen Symptomen einer AS zählen Schwindel, (Prä-) Synkopen, (Belastungs-) Dyspnoe, Leistungsminderung, angina pectorale Beschwerden, der plötzliche Herztod sowie Zeichen der Herzinsuffizienz (1, 4, 5, 16).

#### 1.4 Therapie der hochgradigen, kalzifizierten Aortenklappenstenose

Es gibt bisher keine kausale Therapie der hochgradigen, kalzifizierten AS (1, 5). Die einzigen Therapieoptionen stellen der Aortenklappenersatz, in seltenen Fällen die Ballonvalvuloplastie oder active Surveillance (1, 5). Zur langfristigen Therapie dieser Erkrankung kommt zum heutigen Zeitpunkt nur der offenchirurgische oder kathetergestützte Aortenklappenersatz (TAVI) in Betracht (1, 5, 9, 10). Eine symptomatische hochgradige AS stellt eine Interventionsindikation dar, es sei denn, dass keine weiteren Komorbiditäten, oder sehr schwere Komorbiditäten vorliegen, bei denen davon auszugehen ist, dass der Patient<sup>1</sup> nicht von einer Intervention profitiert (1, 5). Abhängig von der Dringlichkeit, des Operationsrisikos, den Komorbiditäten, der Konstitution und

---

<sup>1</sup> Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird in der gesamten Arbeit ausschließlich das generische Maskulinum verwendet, es sind jedoch alle Geschlechter gleichermaßen angesprochen.

dem Patientenwunsch, wird nach individueller Nutzen-Risikoabwägung durch ein in der Therapie der Aortenklappenstenose erfahrenes, interdisziplinäres Team zwischen TAVI oder chirurgischem Aortenklappenersatz entschieden (1, 5). Orientierend kann gesagt werden, dass für Patienten mit einem Alter ab 75 Jahren oder einem hohen operativen Risiko (EuroSCORE II > 8 %) eine transfemorale TAVI empfohlen wird, vorausgesetzt, dies ist durch anatomische, prozedurale oder klinische Faktoren möglich (5). Für Patienten unter 75 Jahren und einem geringen operativen Risiko (EuroSCORE II < 4 %), bzw. für operable Patienten, die sich aufgrund anatomischer, prozeduraler oder klinischer Faktoren nicht für eine transfemorale TAVI eignen, wird der chirurgische Herzklappenersatz empfohlen (5). Für asymptomatische Patienten mit hohem begleitendem Risiko und eingeschränkter linksventrikulärer Ejektionsfunktion wird eine Reevaluation nach sechs Monaten, bzw. beim Auftreten von Symptomen, empfohlen (5). Die Therapieentscheidung bleibt jedoch Entscheidung eines interdisziplinären Teams, das individuell abzuschätzen hat, ob von einem Benefit durch einen Aortenklappenersatz auszugehen ist (5). Ist dies nicht der Fall, wird eine medikamentöse Therapie der kardialen Begleiterkrankungen, z.B. eine Herzinsuffizienztherapie gemäß den aktuell gültigen Leitlinien bei Herzinsuffizienz, empfohlen (5). Die beste individuelle Therapie ist derzeit noch Gegenstand zahlreicher Forschungen; so ist die optimale Therapie einer asymptomatischen, hochgradigen AS derzeit Forschungsgegenstand der AVATAR-Studie (*engl. Aortic Valve Replacement versus conservative treatment in asymptomatic severe aortic stenosis*, dt. Aortenklappenersatz im Vergleich zu einem konservativen Therapieregime in der asymptomatischen, hochgradigen AS), die ein konservatives, nicht-interventionelles Therapieregime mit einem interventionellen Procedere vergleicht (25). Trotz intensiver Forschungen auf dem Gebiet der AS konnten bisher keine medikamentösen Therapien ausfindig gemacht werden, die das Outcome der Patienten verbessern oder das Fortschreiten der Erkrankung aufhalten können (1, 5, 9, 10). Dies wurde auch im Rahmen der PARTNER-Studie (*engl. Placement of Aortic Transcatheter Valve Trial*, dt. Platzierung aortaler, kathetergestützter Herzklappen), die das Outcome nach TAVI in

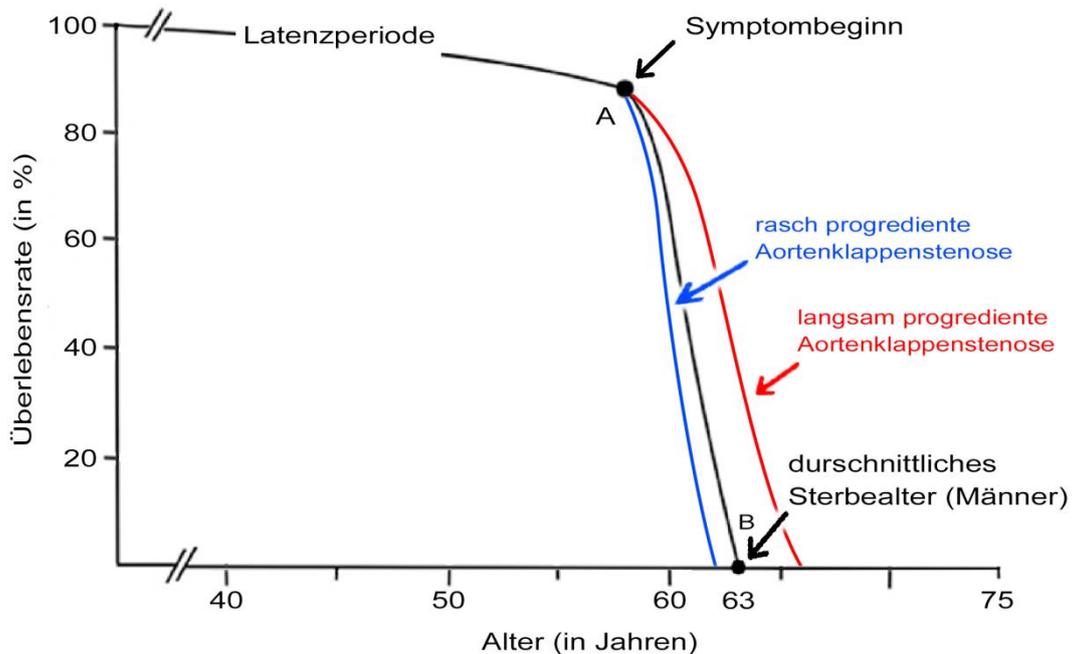
Hochrisikopatienten mit symptomatischer AS im Vergleich zum chirurgischen Herzklappenersatz oder medikamentöser Therapie bzw. Ballonvalvuloplastie in zwei Kohorten vergleicht, bestätigt (13). Selbst Patienten mit einem zu hohen Risiko für einen chirurgischen Herzklappenersatz, zeigten ein Jahr nach TAVI nicht nur eine geringere Sterblichkeit und eine geringere Rehospitalisierungsrate, sondern auch reduzierte kardiale Symptome, gemessen an der NYHA-Klassifikation, im Vergleich zu Patienten mit rein medikamentöser Therapie oder Ballonvalvuloplastie (13). Derzeit werden in mehreren randomisierten Studien optimale Therapieregimes und neue Therapiemöglichkeiten der AS untersucht (25). Im Rahmen der SALTIRE II – Studie (*engl. Bisphosphonates and RANKL inhibition in Aortic Stenosis*, dt. Bisphosphonate und RANKL-Inhibition in der Aortenklappenstenose; The Clinical Trials gov Nummer: NC02132026) werden derzeit Bisphosphonate und der RANKL-Inhibitor Denosumab, aufgrund ihres Einflusses auf die Knochenmineralisierung, als mögliche neue Therapieoptionen der AS untersucht (26, 27). Sollte sich zeigen, dass ein bestimmtes Patientenkontingent von einem abwartenden Procedere profitiert, könnten Biomarker helfen, Patienten zu identifizieren, die von einem Aortenklappenersatz profitieren. Könnte beispielsweise durch Biomarker ein langsamer Verlauf der AS abgeschätzt werden, hätte eine Herzoperation für Patienten mit zu Lebzeiten nur gering bis kaum die Lebensqualität beeinträchtigender Symptomatik keinen Mehrwert und würde das perioperative Risiko nicht rechtfertigen. Im Falle einer rasch progredienten AS würde man sich eher für einen früheren Operationszeitpunkt entscheiden, da eine gute Herzfunktion negativ mit dem Risiko korreliert, im Rahmen einer Herzklappenintervention zu versterben, und davon auszugehen ist, dass das Herz bei einem späteren Operationszeitpunkt bereits Schaden durch die AS genommen hat (28).

## 1.5 Pathophysiologie der kalzifizierten hochgradigen Aortenklappenstenose

### 1.5.1 Klinisches Erscheinungsbild

Die Pathogenese der AS ist in der Regel schleichend und wird aufgrund von spät auftretenden Symptomen meist entweder als Zufallsbefund oder relativ spät im Krankheitsverlauf diagnostiziert (29). Dem Symptombeginn, der im Mittel bei 60 Jahren liegt, geht meist eine Latenzperiode unbekannter Dauer voraus (29). Post mortem Daten ergaben, dass die Überlebensrate bei Symptombeginn circa 90 % beträgt, das durchschnittliche Überleben mit dem Auftreten von Symptomen aber deutlich sinkt, sodass das durchschnittliche Sterbealter für Männer mit einer symptomatischen, hochgradigen AS bei 63 Jahren liegt (Abbildung 2) (29). Klinische Beobachtungen zeigen jedoch, dass das klinische Erscheinungsbild der AS sich sehr heterogen präsentiert (1, 6). So werden schnell progrediente und eher langsam voranschreitende Verläufe beobachtet, die beispielhaft als rasch progrediente AS (rpAS) und langsam progrediente AS (lpAS) in Abbildung 2 dargestellt sind (6).

Mit einer Zweijahres-Überlebensrate von unter 50 % hat die symptomatische AS eine sehr schlechte Prognose (4, 6, 29). Die Risikofaktoren für die Entstehung einer AS entsprechen neben dem Vorhandensein einer bikuspiden Aortenklappe den kardivaskulären Risikofaktoren der Atherosklerose wie beispielsweise familiäre Disposition, fortgeschrittenes Alter oder das Vorhandensein einer arteriellen Hypertonie, eines Diabetes Mellitus oder einer Dyslipoproteinämie (1, 4, 6, 7, 30, 31). Nach heutigem Erkenntnisstand gilt die AS als eine der Artherosklerose ähnelnden, aber ihr nicht gleichenden Erkrankung (11, 12, 15, 19, 32). In der bisher größten multizentrischen, randomisierten und doppelverblindeten Studie, welche die Effekte einer lipidsenkenden Therapie bei Patienten mit AS untersuchte, konnte eine lipidsenkende Therapie mit Simvastatin und Ezetimib bei Patienten mit asymptomatischer, leicht- bis mittelgradiger AS das Outcome im Vergleich zur Placebokohorte nicht verbessern (SEAS-Studie, *engl. Simvastatin and Ezetimibe in Aortic Stenosis*, dt. Simvastatin und Ezetimib in der Aortenstenose) (9, 33).



**Abbildung 2: Verlauf der Aortenklappenstenose nach Ross und Braunwald et al. (modifiziert) (29).** Abbildung 2 zeigt das prozentuale Überleben in Bezug auf das Alter der Patienten mit Aortenklappenstenose in Jahren. Nach einer Latenzphase unklarer Dauer, zunehmender Stenosierung und myokardialer Überlastung sinkt mit Auftreten von Symptomen (A) das mittlere Überleben der Patienten deutlich (B). Das klinische Erscheinungsbild präsentiert sich im klinischen Alltag heterogen mit schnelleren (blaue Kurve, rasch progrediente Aortenklappenstenose) und langsameren Verläufen (rote Kurve, langsam progrediente Aortenklappenstenose).

Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen der ebenfalls doppelverblindeten SALTIRE-Studie (*engl. Scottish Aortic Stenosis and Lipid Lowering Trial, Impact on Regression*, dt. Schottische Studie zur Beobachtung der Auswirkungen einer lipidsenkenden Therapie auf die Aortenstenose) an 155 Patienten mit kalzifizierter AS, die darlegte, dass die Progression der AS nach Therapie mit Atorvastatin im Vergleich zur Placebokohorte weder verlangsamt noch reduziert werden konnte (34). Eine Verlangsamung der echokardiographisch bestimmten hämodynamischen Progression der AS, nicht aber der Prognose der AS, konnte an einer nicht verblindeten Studie mit 121 Patienten mit asymptomatischer und moderater bis hochgradiger AS und Rosuvastatintherapie (RAAVE-Studie, *engl. Rosuvastatin Affecting Aortic Valve Endothelium*, dt. Beeinflussung des Aortenklappenendothels durch Rosuvastatin) gezeigt werden (35). Diese Daten konnten aber von der

ASTRONOMER-Studie (*engl. the Aortic Stenosis Progression Observation: Measuring Effects of Rosuvastatin*, dt. Progression der Aortenklappenstenose unter Rosuvastatintherapie), einer doppelverblindeten Studie an 269 Patienten mit asymptomatischer, leichtgradiger bis moderater AS, die keine reduzierte Progression der AS unter Rosuvastatin zeigen konnte, nicht bestätigt werden (10, 36). Obwohl bei der Atherosklerose und der AS Assoziationen mit denselben klinischen Risikofaktoren bestehen, stellt das Nicht-Ansprechen der AS auf lipidsenkende Therapien einen erheblichen klinischen Unterschied im Gegensatz zur Atherosklerose der Gefäße dar (6, 9, 10, 21). Eine Nutzen-Risikoabwägung zur optimalen individuellen Therapie der AS gestaltet sich im klinischen Alltag oftmals schwierig, da interindividuell sehr heterogene Krankheitsverläufe beschrieben sind, die sich prospektiv nicht abschätzen lassen (1, 6, 16). Häufig sind in der Therapie der AS erfahrene Ärzteteams vor die Herausforderung gestellt, für jeden Patienten die individuell bestmögliche Therapie mit dem geringsten kardiovaskulären, interventionellen und anästhesiologischen Risiko zum bestmöglichen Zeitpunkt zu wählen. Es fehlen Bio- und Prognosemarker der AS, die helfen, jeden Patienten mit der individuell bestmöglichen Therapie zum optimalen Zeitpunkt behandeln zu können.

#### 1.5.2 Molekularbiologische Grundlagen der hochgradigen, kalzifizierten Aortenklappenstenose

Die zellulären und molekularen Entstehungsmechanismen der AS sind sehr komplex und äußerst vielfältig (37). Mechanische, metabolische und inflammatorische Trigger führen durch Kalzifikation, Fibrose, osteogene und chondrogene Differenzierung valvulärer Zellen zum Remodeling der Aortenklappe sowie zur Dysfunktion ihrer Endothel- (VECs - *engl. (Pl.) valvular endothelial cells*), interstitiellen (VICs - *engl. (Pl.) valvular interstitial cells*) und glatten Muskelzellen (VSMCs - *engl. (Pl.) valvular smooth muscle cells*) (14, 15, 32, 37-43). Diese Prozesse resultieren in einer strukturell veränderten und vor allem in ihrer Funktion deutlich beeinträchtigten Aortenklappe mit erheblichen Konsequenzen für den Organismus (11). Die zellulären und molekularbiologischen Pathomechanismen der Aortenklappenstenose sind bis heute nicht vollständig verstanden und nach wie vor Gegenstand zahlreicher

Forschungen. Nach heutigem Erkenntnisstand wird die AS als atherosklerose-ähnlich, aber nicht atherosklerose-gleich bezeichnet (11, 12, 15, 19, 32).

Im Folgenden wird vor allem auf den aktuellen Wissensstand zur Bedeutung thrombozytärer Chemokine wie *Transforming Growth Factor  $\beta$ 1* (TGF- $\beta$ 1), *Stroma cell-derived Factor 1* (SDF-1, auch CXCL12 oder PBSF genannt), CXC - Motiv Chemokinligand 14 (CXCL14) und *Macrophage Migration Inhibitory Factor* (MIF) eingegangen, sowie ihre Interaktionspartner, *Bone Morphogenetic Protein -2,- 4, -7* (BMP-2, -4, -7), CXC - Motiv Chemokinrezeptor 4 (CXCR4), CXC - Motiv Chemokinrezeptor 7 (CXCR7) und Gremlin-1 (Abbildung 3) (19, 44-47).

Im Blut zirkulierendes Low-Density-Lipoprotein (LDL, engl. für Lipoprotein mit geringer Dichte) kann extrazellulär durch spontane Oxidation zum proinflammatorischen oxidierten LDL (oxLDL, engl. für oxidiertes Lipoprotein mit geringer Dichte) reagieren (40). OxLDL führt nicht nur zur Freisetzung thrombozytärer Mediatoren wie MIF, TGF- $\beta$ 1, SDF-1 und CXCL14, sondern begünstigt durch Induktion von BMP-2 und alkalinen Phosphatasen (ALP) die Einlagerung von Kalziumphosphat ins Gewebe und damit die Biomineralisierung der Aortenklappe, wie im Mausmodell gezeigt werden konnte (Abbildung 3) (41-43). Die durch oxLDL freigesetzten thrombozytären Chemokine SDF-1 und CXCL14 haben antiinflammative Eigenschaften und gelten als antimikrobielle Botenstoffe (44-46). Für SDF-1 wurde gezeigt, dass es die Thrombusbildung begünstigt und, dass eine Assoziation mit dem Schweregrad der AS besteht (48, 49). Je schwerer die AS, desto höher die thrombozytäre Anfärbung von SDF-1 (48). Thrombozytäre Chemokine beeinflussen besonders CD14-positive Zellen, wie beispielsweise Monozyten und Makrophagen, deren Migration ins Gewebe und Adhäsion an VECs z.B. durch MIF getriggert wird (44, 50). Im Mausmodell wurde dargelegt, dass durch Hemmung von MIF die Makrophageninfiltration in die Intima reduziert wird und verstärkte Synthese von Kollagen und glatten Muskelzellen die Plaquestabilität erhöhen (51, 52). Des Weiteren wurden weniger

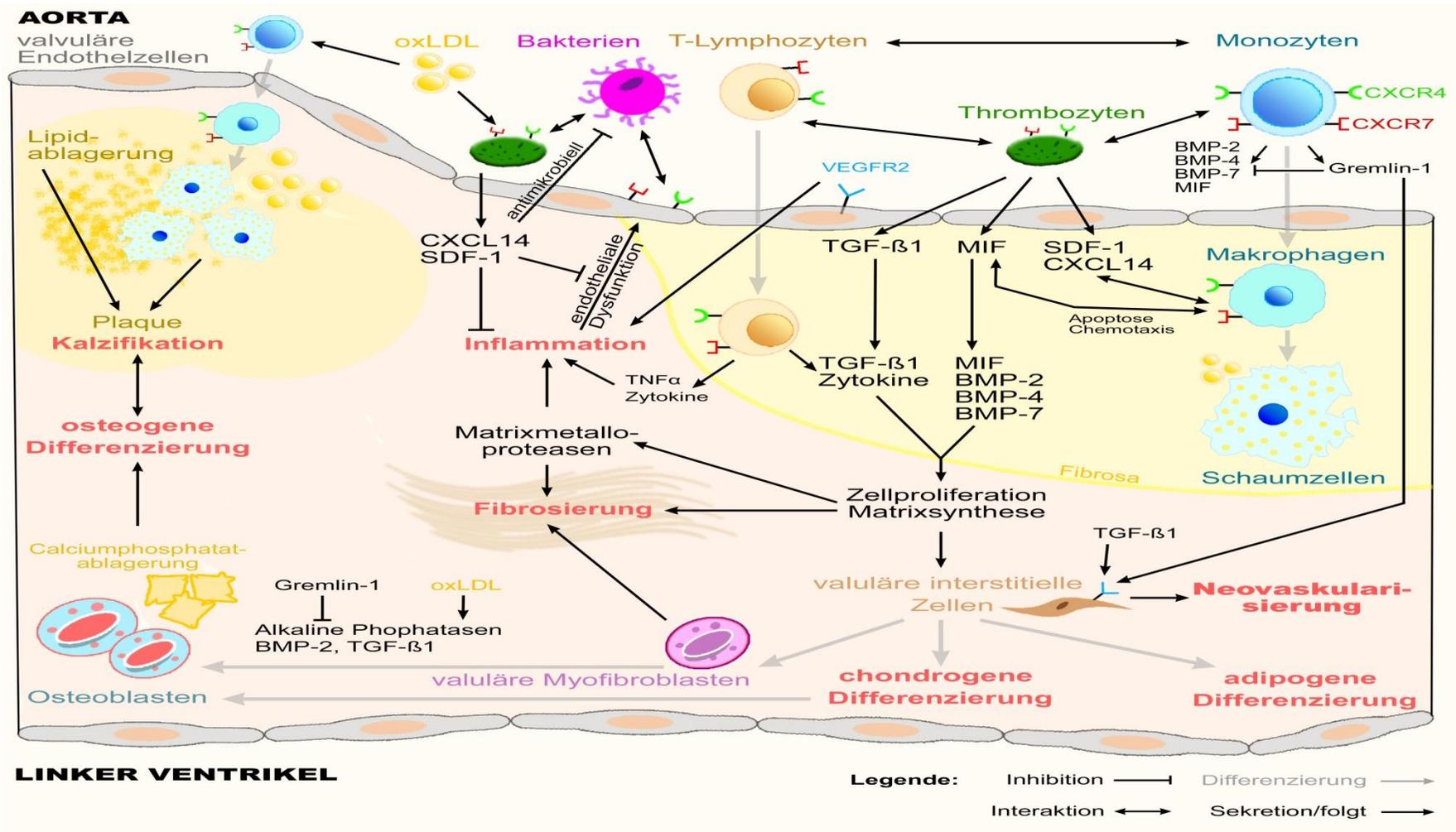


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Pathophysiologie des valvulären Remodelings der kalzifizierten Aortenklappenstenose (modifiziert nach Otto CM et al. und Lerman et al.) (12, 53).

Die Abbildung zeigt vereinfacht pathophysiologische Zusammenhänge der monozytären und thrombozytären Interaktionen in der Entstehung der kalzifizierten Aortenklappenstenose. Thrombozytäre Chemokine wie MIF, SDF-1, CXCL14 und TGF- $\beta$ 1 und monozytäre Botenstoffe wie BMP-2, -4 und -7 führen zu inflammatorischen Prozessen, endothelialer Dysfunktion, Kalzifikation, Fibrosierung, Neovasikularisierung sowie chondrogener, osteogener oder adipogener Differenzierung valvulärer Myofibroblasten. Viele dieser Prozesse sind über die Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 sowie VEGFR2 vermittelt. Gremlin-1 wirkt vielen dieser Prozesse entgegen.

BMP – *engl. Bone Morphogenetic Protein*, dt. Knochenmorphogenetisches Protein; CXCL14 - CXC - Motiv Chemokinligand 14; CXCR4-CXC - Motiv Chemokinrezeptor 4; CXCR7 - CXC – Motiv Chemokinrezeptor 7; MIF- *engl. Macrophage Migration Inhibitory Factor*, dt. Makrophagen-Migrationsinhibierender Faktor; SDF-1 - *engl. stroma cell- derived factor*, dt. Stromazellfaktor 1; TGF- $\beta$ 1 – *engl. Transforming Growth Factor  $\beta$ 1*, dt. transformierender Wachstumsfaktor  $\beta$ 1, VEGFR2 – Vascular epithelial Growth Factor Receptor 2.

Lipidbildung und Intimaverdickung, reduzierte Fibrinogen- und Interleukin 6 Produktion, sowie verringerte Expression von Transkriptionsfaktoren festgestellt (54). Ins Herzklappengewebe migrierte Monozyten, Makrophagen genannt, und T-Lymphozyten regen mittels Cytokinfreisetzung VICs zur vermehrten Produktion von Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) an, woraus Kalzifikation und lokale Inflammation resultiert (55-57). Diese Inflammation wird sowohl durch Bestandteile des erworbenen als auch des angeborenen Immunsystems aufrechterhalten (58, 59). Toll-Like-Rezeptoren, die eine besondere Schlüsselrolle in der angeborenen Immunantwort spielen, aber auch in Erkrankungen mit dysregulierter Immunantwort wie der Sepsis oder des Systemischen Inflammatorischen Response-Syndroms (SIRS; *engl. Systemic Inflammatory Response Syndrome*) von Bedeutung sind, können oxLDL-vermittelt die Produktion von BMP-2 in VICs induzieren (60-63). Zur weiteren Aufrechterhaltung der Inflammation und des damit einhergehenden aktiven Krankheitsprozesses, tragen an TNF- $\alpha$  gekoppelte BMP/WNT Signalwege sowie Interleukinfreisetzung bei (64, 65).

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass BMP-2 einige MMPs reguliert, sowie die in Osteoblasten vorkommende MMP13 induzieren kann (56, 66, 67). Einige MMPs führen zur Strukturveränderung der Herzklappe, vor allem durch ventrikelseitige Anreicherung subendothelialer Matrix sowie Fragmentierung dort physiologischerweise vorkommenden Kollagens und elastischer Fasern (68-71). Aortal hingegen resultiert eher eine Gewebeauflockerung des

eigentlich dichten Bindegewebes aufgrund Ausbildung plaqueähnlicher Strukturen mit Lipid- und Kalkablagerung in die dortige zellkernarme Fibrosa (44, 68-71). Auch TGF- $\beta$ 1 vermittelte Signaltransduktionswege haben eine verstärkte Fibrose und osteogene Differenzierung des Gewebes zur Folge, da TGF- $\beta$ 1 bei mechanischer Beanspruchung der VICs diese zur Umwandlung in Myofibroblasten anregen kann, welche die Fähigkeit der osteogenen Differenzierung besitzen (72-74). Als besonders potente osteogene Morphogene gelten BMP-2 und BMP-4, die bereits während der Embryogenese zusammen mit MMPs eine bedeutende Rolle in der Entwicklung des Achsenskeletts spielen (75-78). Im Knochenstoffwechsel führen ALPs zum Abbau von Pyrophosphat, das die Einlagerung von Kalziumphosphat ins Gewebe von arteriellen Gefäßen und Herzklappen hemmt und somit die Kalzifikation der Herzklappe zusätzlich zur passiven Einlagerung von Kalzium und Hydroxylapatit aktiv fördert (14, 79-85). Es konnte gezeigt werden, dass BMP-2, BMP-4 und BMP-7 die Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen zu Osteoblasten induzieren können, welche extrazelluläre Matrix und ALP produzieren (75, 77, 78, 86-88). Folglich entsteht eine gesteigerte Kalziumphosphateinlagerung in die extrazelluläre Matrix von Aortenklappe und atherosklerotischer Gefäße, die sich in ihrer Pathogenese der Biominalisierung sehr ähneln. Weitere Bausteine dieser Mineralisierung stellen die bereits erläuterte Bindegewebsproliferation, Neovaskularisierung sowie chondrogene und osteogene Differenzierung der VICs und VECs dar (14, 32, 89, 90). Nochmals sei betont, dass beiden Erkrankungen, der kalzifizierten AS und der Atherosklerose, keine rein degenerativen, sondern aktive, inflammatorische Kalzifikationsprozesse zugrunde liegen, deren Mechanismen des Geweberemodelings sich ähneln, aber nicht gleichen (6, 44, 91, 92). Die BMPs zählen ebenso wie ihre Interaktionspartner TGF- $\beta$ 1 und Gremlin-1 zu den Proteinen der Cystine Knot Superfamilie, die nicht nur im kardialen Remodelling, sondern auch in extrakardialen, chronisch-fibrotischen Erkrankungen von Bedeutung sind (93-98).

Gremlin-1 gilt als Antagonist der BMPs und von MIF (99, 100). *In-vitro* konnte die Bindung von Gremlin-1 an die BMPs und direkte Bindung an MIF gezeigt

werden (101). Für die Koronarsklerose wurde bereits dargelegt, dass Gremlin-1 die Freisetzung von MIF aus intrazellulären Speichern hemmt, was eine verringerte Monozytenmigration, eine Senkung der Schaumzellbildung und eine erhöhte Plaquestabilität zur Folge hat (102, 103). Für atherosklerotische Gefäße konnte bereits gezeigt werden, dass MIF die Adhäsion und Migration von Leukozyten an bzw. in die Gefäßwand fördert und somit eine Inflammation im Endothel aufrechterhält und zu einer endothelialen Dysfunktion führt (45, 51).

MIF ist wie SDF-1, TGF- $\beta$ 1 und CXCL14 ein thrombozytäres Protein, das nach Aufnahme von oxLDL freigesetzt wird und durch Bindung an seinen Rezeptor CXCR4 auf Monozyten und Makrophagen mit Leukozyten interagiert (15, 44-46, 104-110). SDF-1 bindet ebenfalls an CXCR4, hat aber noch einen weiteren Rezeptor, CXCR7 (110-112). So konnten im Mausmodell CXCR7 positive Makrophagen in atherosklerotischen Gefäßwänden nachgewiesen werden, nicht aber in gesunden Gefäßen (113). Durch Hemmung thrombozytärer Adhäsion an die Gefäßwand konnte eine signifikante Reduktion atherosklerotischer Läsionen in murinen Aortenklappen herbeigeführt werden, was die Bedeutung von Thrombozyten in der AS unterstreicht (114). Des Weiteren wird von einer Interaktion zwischen TGF- $\beta$ 1 und SDF-1 Pathways ausgegangen (115). Interessanterweise kommen SDF-1 und CXCL14 nicht nur eine bedeutende Rolle in der Atherosklerose zu, sondern ebenfalls in infektiösen, systemisch-inflammatorischen Erkrankungen, z.B. Sepsis und Endokarditis (116-118). Außerdem konnte sowohl für CXCR7, SDF-1 als auch für CXCL14 eine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden (118, 119).

In zahlreichen Forschungen konnte die bedeutende Rolle der BMPs und ihrer Interaktionspartner im Entstehungsmechanismus der Atherosklerose zwar bereits hervorgehoben, jedoch noch nicht vollständig verstanden werden. Insbesondere die Rolle dieser Proteine im Entstehungsmechanismus der, der Atherosklerose ähnelnden, aber nicht gleichenden AS wurde noch nicht vollständig geklärt (6, 44, 47). In der vorliegenden Arbeit wird aus diesem Grund ihre Bedeutung als Mediatoren im Krankheitsprozess der hochgradigen kalzifizierten AS genauer untersucht.

## 1.6 Zielsetzung und Forschungshypothese

Die klinische Praxis zeigt, dass die Geschwindigkeit des Krankheitsprogresses einer AS interindividuell großen Schwankungen unterliegt (6). In die Therapieplanung fließen nach aktuellem Algorithmus zwar viele Faktoren mit ein, jedoch bestehen keine Bio- und Prognosemarker, die helfen, den Progress einer AS abschätzen zu können, um den individuell optimalen Therapiezeitpunkt mit dem persönlich geringsten kardiovaskulären, periinterventionellen und anästhesiologischen Risiko wählen zu können (1). Des Weiteren steht bis heute keine kausal wirkende Medikation zur Therapie der häufigsten erworbenen, primären Herzerkrankung in Industrieländern zur Verfügung (1). Frühdiagnostische, prognostische und neue individuelle therapeutische Marker und Angriffspunkte dieser häufigen Herzerkrankung würden die Therapie der AS erneuern, indem individualisierte Therapieregimes aufgrund individueller Nutzen-Risiko-Abwägungen festgelegt werden könnten, um die individuell bestmögliche Therapieoption zum optimalen Therapiezeitpunkt durchführen zu können. Um diesem Ziel näher zu kommen, fehlen nicht nur tiefere pathophysiologische Erkenntnisse über monozytäre und thrombozytäre Botenstoffe im Krankheitsprozess der AS, sondern auch eine genauere Untersuchung der Proteinexpressionen im Aortenklappengewebe, die hilft, das heterogene Patientenkollektiv der AS besser charakterisieren zu können.

Daher ist Ziel dieser Dissertation, das Vorkommen von BMP-2, BMP-4 und BMP-7 sowie ihrer Interaktionspartner MIF, Gremlin-1 und TGF- $\beta$ 1 primär im Aortenklappengewebe und sekundär im Blut von Patienten mit hochgradiger, kalzifizierter AS abhängig vom klinischen Erscheinungsbild genauer zu untersuchen. Des Weiteren sollen die monozytären und thrombozytären Expression von CXCR4, CXCR7, SDF-1 und CXCL14 in diesen Patienten charakterisiert werden.

Die Primärhypothese ist, dass sich die Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner im Herzkklappengewebe signifikant zwischen rasch und langsam progredienten, hochgradigen AS unterscheiden.

Eine weitere Hypothese ist, dass sich die Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner im Herzklappengewebe dieser Gruppierungen regional signifikant unterscheiden. Ebenfalls wird von einem unterschiedlichen Expressionsmuster der BMPs und ihrer Interaktionspartner auf Thrombozyten und Monozyten von Patienten mit rpAS und lpAS ausgegangen.

Darüber hinaus wird ein dynamischer Prozess der Proteinexpression im Blut vermutet, weshalb eine weitere Hypothese ist, dass die Expressionen der BMPs und ihre Interaktionspartner auf CD14- und CD42b-positiven Zellen vor und nach Aortenklappenersatz signifikante Unterschiede zeigen.

Angelehnt an die Primärhypothese wird auch die Hypothese untersucht, dass sich die Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner im Herzklappengewebe von Patienten mit high-gradient und low-gradient AS signifikant unterscheiden.

Darüber hinaus sollen die pathophysiologischen Präsentationen mit den klinischen Erscheinungsbildern zueinander in Bezug gesetzt werden, um mögliche Zusammenhänge aufzuzeigen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Chemikalien

Die im Rahmen der Dissertation verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2 aufgelistet.

**Tabelle 2: Verwendete Antikörper**

<b>Antigen</b>	<b>Wirt Art</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Immunhistochemie Antikörper</b>		
CD3	Kaninchen IgG monoklonal	Abcam Ab16669
CD86	Maus IgG monoklonal	Santa Cruz: Sc-20060
BMP-2	Kaninchen IgG polyklonal	Bioss bs-1012R
BMP-4	Kaninchen IgG polyklonal	GeneTex GTX100874
BMP-7	Kaninchen IgG polyklonal	Bioss Bs-2242R
MIF	Maus monoklonal	Abcam Ab55445
Gremlin-1	Ziege IgG polyklonal	Santa Cruz Sc-18274
TGF- $\beta$ 1	Ziege polyklonal	Santa Cruz Sc-146-G
Isotypenkontrolle	Kaninchen polyklonal	Dako X0936
Isotypenkontrolle	Kaninchen IgG polyclonal	Abcam Ab6759
Isotypenkontrolle	Maus IgG polyklonal	Santa Cruz Sc-2025

Isotypenkontrolle	Ziege IgG polyklonal	<i>GeneTex</i> GTX35039
<b>FACS-Antikörper</b>		
CD42b PE	Maus IgG1k monoklonal	BD 555473
CD42b FITC	Maus IgG1 monoklonal	BeckmanCoulter IM0648U
CD14 PE	Maus IgG1 monoklonal	R&D FAB3832P
CD14 APC	Maus IgG1 monoklonal	R&D FAB3832A-100
BMP-2 FITC	Kaninchen IgG polyklonal	Bioss Bs-1012R-FITC
BMP-4 Alexa Fluor 488	Kaninchen IgG monoklonal	Abcam Ab200794
BMP-7 FITC	Maus IgG1k monoklonal	Milli-Mark FCMAB135F
MIF- FITC	Kaninchen IgG polyklonal	Biorbyt Orb15983
Gremlin-1 FITC	Ziege IgG1 polyklonal	SantaCruz Sc-18274FITC
CXCR4 PE	Maus IgG2B monoklonal	R&D MAB172
CXCR7 PE	Maus IgG2A monoklonal	R&D FAB42271P-100
CXCL14 FITC	Kaninchen IgG polyklonal	Biorbyt Orb15457
SDF-1 FITC	Maus IgG1 monoklonal	R&D IC350F
TGF- $\beta$ 1 PE	Maus IgG1 monoklonal	R&D IC240P

Isotypenkontrolle	Maus IgG1 APC monoklonal	R&D IC002A
Isotypenkontrolle	Maus IgG1 FITC monoklonal	R&D IC002F
Isotypenkontrolle	Maus IgG1 PE monoklonal	R&D IC002P
Isotypenkontrolle	Maus IgG1k FITC monoklonal	BD 555748
Isotypenkontrolle	Maus IgG1k PE monoklonal	BD 555749
Isotypenkontrolle	Maus IgG2A PE monoklonal	R&D IC003P
Isotypenkontrolle	Maus IgG2B PE monoklonal	R&D IC0041P

APC - Allophycocyanin, FITC - Fluorescein-5-isothiocyanat, IgG - Immunglobulin G, IgM – Immunglobulin M, PE - Phycoerythrin.

Tabelle 3 zeigt die im Rahmen der Forschungsarbeit verwendeten Materialien, Chemikalien sowie Geräte und deren Hersteller.

**Tabelle 3: Geräte, Materialien und Chemikalien**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Deckgläschen für Immunhistochemie	Langenbrinck, Deutschland
FACS-Gerät	BD FACSCalibur Flow Cytometer
Färbebehälter aus Glas	Rogo Sampaic, Frankreich
Färbekörbchen	Rogo Sampaic, Frankreich
Färbetröge aus Glas	Rogo Sampaic, Frankreich
Färbetröge Tissue-Tek 4456	Sakura Finetek, Deutschland
Färbekammer für Objektträger StainTray™ E71397-B	Science Services, Deutschland
Homogenisator	IKA Werke, Deutschland
Impedanzaggregometer	Rocher, Multiplate

Mikroskop	Nikon, Japan
Multipipette	Eppendorf, Deutschland
Objektträger SuperFrostPlus,	Langenbrinck, Deutschland
Objektträgerhalter Tissue-Tek 4465	Sakura Finetek, Deutschland
Objektträgermappe	Fisher Scientific, Deutschland
Paraffin-Einbettungsbank	Medax Nagel, Deutschland
Paraffin-Streckbad TYP	Medax GmbH, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Deutschland
pH-Meter	Wissenschaftlich-Technische Wertstätten, Deutschland
Vibrationsmischer	Fisher Scientific, Deutschland
Waage TR-4102	Denver Instrument, USA
Wasseraufbereitungssystem	
Zentrifuge 1	Thermo Multifuge 1S
Zentrifuge 2	Eppendorf, Deutschland
<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Blocking Solution	Zytomed Systems, Deutschland
Citratpuffer	Sigma-Adrich, USA
Eosin G	Carl Roth, Deutschland
Formaldehyd	OttoFischer, Deutschland
Hämalaun	Carl Roth, Deutschland
Liquid DAB+ Substrate Chromogen System	Dako, Deutschland
LysingSolution FACS	BD, USA
Paraffin	Tyson Group, USA
PBS	Life Technologies, Deutschland
Roti-Histokitt	Carl Roth, Deutschland
Roti-Histol	Carl Roth, Deutschland
Streptavidin/HPRV	Sigma-Adrich, USA
Wasserstoffperoxid	Merck, Deutschland

## 2.2 Hard- und Software

Zum Fotografieren der Gewebeproben am Mikroskop wurde die Nikon NIS-Elements Imaging Software in den Versionen 2.0 und 3.2 verwendet. Zur immunhistochemischen Auswertung wurde die Software ImageJ Version 1.50 benutzt. Die statistischen Auswertungen inklusive der Power-Analysen wurden mittels der Software IBM Corp. Released 2021. IBM SPSS Statistics für Windows, Versionen 24, 25 und 28.0. Armonk, NY: IBM Corp durchgeführt. Die Abbildungen 2 bis 4 wurden mit technischer Unterstützung von Herrn Jan Seichter mit Hilfe des Programms Adobe Photoshop CC 2017 erstellt. Weitere Grafiken wurden mit der Software GraphPad Prism 9 generiert. Zur Berechnung der Risikoscores Framingham Risk Score<sup>2</sup>, EuroScore I<sup>3</sup>, EuroScore II<sup>4</sup> und STS-Score<sup>5</sup> wurden im Internet zur Verfügung gestellte Kalkulatoren benutzt.

## 2.3 Studienbeschreibung

Die Studie wurde von der Ethikkommission zugelassen und trägt die Nummer 253/2009BO2. Die Richtlinien der Deklaration von Helsinki von 1946 wurden beachtet. Das dieser Forschungsarbeit zugrundeliegende Patientenkollektiv setzt sich aus 34 Patienten des Universitätsklinikums Tübingen im Zeitraum von März 2015 bis Juni 2017 zusammen. Es wurden ausschließlich Patienten in die Studien eingeschlossen, bei denen Symptombeginn, Erstsymptom und Erstdiagnose der Aortenklappenstenose eindeutig ersichtlich waren, weshalb von den im Untersuchungszeitraum am Klinikum Tübingen insgesamt 201 operierten Patienten mit hochgradiger AS nur 34 eingeschlossen werden konnten. Eine weitere Selektion der Patienten erfolgte nicht. Ausschlusskriterium war die Ablehnung der Studienteilnahme durch den Patienten sowie eine nicht hochgradige AS. Die Indikation zum

---

*verwendete Homapages:*

2: <https://www.framinghamheartstudy.org/risk-functions/cardiovascular-disease/10-year-risk.php>; Stand: 2016 - November 2017

3: <http://euroscore.org/calcold.html>; Stand: 2016- November 2017

4: <http://euroscore.org/calc.html>; Stand: 2016- November 2017

5: <http://riskcalc.sts.org/stswebriskcalc/#/calculate>; Stand: 2016- November 2017

Herzklappenersatz wurde bei allen Patienten durch die interdisziplinäre Herzkonferenz der Universität Tübingen, die aus Fachärzten für Kardiologie, Herzchirurgie und Radiologie besteht, gestellt. Für weitere Informationen bzgl. der Entscheidungsfindung sei hier auf Kapitel „1.4 Therapie der hochgradigen, kalzifizierten AS“, verweisen (23).

Es erfolgten (immun-)histologische Färbungen des Aortenklappengewebes bei  $n = 25$  Patienten mit Hämalun und Eosin sowie CD3, CD68, BMP-2, -4, -7, MIF, Gremlin-1 und TGF- $\beta$ 1. Bei der Auswertung wurde die Anzahl der positiven Zellen eines untersuchten Markers im gesamten Herzklappengewebe als auch regional ausgewertet. So wurde die Anzahl der positiven Zellen eines untersuchten Proteins auf der aortalen Seite seiner Anzahl auf der ventrikulären Seite der Herzklappe gegenübergestellt.

Blutabnahmen erfolgten bei einer kleineren Kohorte von  $n = 10$  Patienten vor und ein bis drei Tage nach chirurgischem Herzklappenersatz. Aus dem aufbereiteten Vollblut wurden FACS-Analysen CD14 bzw. CD42b positiver permeabilisierter und nicht permeabilisierter Zellen durchgeführt, um die Expressionen von BMP-2, -4, -7, MIF, Gremlin-1, TGF- $\beta$ 1, SDF-1, CXCR4, CXCR7 und CXCL14 auf und in den jeweiligen Zellen zu charakterisieren.

Um zu untersuchen, ob die pathophysiologische Präsentation der BMPs und ihrer Interaktionspartner in der Herzklappe und im Blut mit der klinischen Präsentation der AS zusammenhängt, erfolgte eine Kohortierung der Patienten anhand von zwei klinischen Parametern: der zeitlichen Progredienz und des mittleren Druckgradienten über der Aortenklappe. Aufgrund der geringen Patientenanzahl wurden die pathophysiologischen Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner in den beiden Kohorten getrennt analysiert und nicht weiter in die Kohorten rpAS/high-gradient AS, rpAS/low-gradient AS, lpAS/high-gradient AS und lpAS/low-gradient AS aufgeteilt.

Als Maß für die Progredienz der Aortenklappenstenose wurde die Zeitspanne zwischen Erstsymptom und Operationszeitpunkt verwendet, die anhand des Medians separiert wurden. Alle Patienten kleiner des Medians wurden als rasch progrediente AS (rpAS), alle Patienten größer des Medians als langsam progrediente AS (lpAS) definiert. Die Einteilung anhand des mittleren

Druckgradienten erfolgte gemäß der AHA/ACC Leitlinien von 2014, 2017 und 2021 in high-gradient AS mit einem mittleren Druckgradient von  $\geq 40$  mmHg und low gradient AS mit einem mittleren Druckgradienten von  $< 40$  mmHg über der AS (1, 5, 23). Die echokardiographische Bestimmung des mittleren Druckgradienten erfolgte durch in der Echokardiographie erfahrene Untersucher der Abteilung für Kardiologie des Universitätsklinikums Tübingen.

Im Rahmen der abschließenden Auswertung erfolgte eine Gegenüberstellung dieser Kohorten und Korrelationen mit klinischen Parametern. Ein FollowUp 30 Tage und ein Jahr nach Operation wurde für alle Patienten durchgeführt, um schwere kardiale Komplikationen (MACE - *engl. Major Adverse Cardiac Even(s)*) wie Tod, Reoperation, Restenose, Rehospitalisierung, Myokardinfarkt und Schlaganfall zu erfassen.

### 2.3.1 Patientendatenerhebung

Nach Einwilligung zur Studienteilnahme wurden bei allen Patienten im Zusammenhang mit der Erkrankung stehende Daten erhoben. Es erfolgte ein vertraulicher Umgang mit allen Patientendaten gemäß der ärztlichen Schweigepflicht und den Auflagen des Datenschutzgesetzes. Patientendaten und -gewebe wurden pseudonymisiert. Es erfolgte eine ausführliche Recherche patientenbezogener Parameter wie Alter, Geschlecht, echokardiographische Herzfunktion, Medikation, Vorerkrankungen, kardiovaskuläre Risikofaktoren, Laborwerte, Erst- und Folgesymptom(e), Symptombeginn, Erstdiagnose, Zeitpunkt der Operationsindikation, Operationszeitpunkt und Liegedauer. Eine wichtige Rolle zur Abschätzung der Operabilität und deren Dringlichkeit spielen nicht nur klinische Scores wie die EuroScores I und II, der FraminghamScore oder der STS-Score, die von allen Patienten erfasst wurden, sondern auch die klinische Erscheinungsform des Patienten, Komorbiditäten sowie Labor- und Echokardiographiebefunde, die ebenfalls von allen Patienten erhoben wurden (31, 120-122). Von allen Patienten wurde das Alter zum Operationszeitpunkt und bei Erstdiagnose, das biologische Geschlecht wie der Operationszeitpunkt erhoben. Die Echokardiographische Funktion wurde in Form der linksventrikulären Ejektionsfraktion, des mittleren Druckgradienten über der

Aortenklappe, des maximalen Druckgradienten über der Aortenklappe sowie der Klappenöffnungsfläche der Aortenklappe genauer charakterisiert. Das Vorhandensein eines Diabetes mellitus, Nikotinabusus, einer arteriellen Hypertonie, Dyslipoproteinämie, eines Vorhofflimmerns oder einer Niereninsuffizienz wurde ebenfalls dokumentiert. Weitere Vorerkrankungen, die erfasst wurden, waren das Vorhandensein eines Aortenaneurysmas oder einer pulmonalen Hypertonie, ein stattgehabter Myokardinfarkt, eine begleitende koronare Herzerkrankung (KHK; 1-,2-,3-Gefäßerkrankung) bzw. weitere arteriosklerotische Erkrankungen wie periphere Arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), Carotidplaques/-stenose, Schlaganfall oder Transischämische Attacke (TIA) in der Vergangenheit. Des Weiteren wurde der Body-Mass-Index (BMI) sowie Blutdruck und Herzfrequenz während der stationären Aufnahme erfasst. Es wurden das Datum der Erstdiagnose der hochgradigen Aortenklappenstenose, der Zeitpunkt der Operationsindikation und der Zeitpunkt des Erstsymptoms dokumentiert. Aus diesen Werten wurde die Zeitspanne zwischen Erstsymptom und Operation und die Zeitspanne zwischen Erstdiagnose und Operation berechnet. Die aufgetretenen Symptome Ruhedyspnoe, Belastungsdyspnoe, Synkope, Leistungsknick, Schwindel und Angina pectoris wurden erfragt. Die Anamnese wurde immer von derselben Person durchgeführt. Sofern bekannt, wurde ebenfalls das Datum der Erstdiagnose der mittelgradigen oder leichtgradigen Aortenklappenstenose dokumentiert. Laborchemisch wurden Cholesterin, Creatinkinase (CK), C-reaktives Protein (CRP), Glomeruläre Filtrationsrate (GFR), Harnstoff, HbA1c, High-Density-Lipoprotein (HDL), Kreatinin, Low-Density-Lipoprotein (LDL), Leukozytenzahl, NT-pro-BNP, Thrombozytenzahl, Triglyceride und Troponin erfasst, sofern diese bestimmt wurden. Die Medikation bei Aufnahme und Entlassung wurde überprüft. Dokumentiert wurden Statine, Acetylsalicylsäure, Clopidogrel, Prasugrel, Ticagrelor, Thrombin (IIa)-Hemmer, Phenprocoumon, Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer (ACE-Hemmer), Sartane, Calciumkanalblocker, Betablocker, Diuretika und Aldosteronantagonisten. Im Rahmen eines FollowUps nach 30 Tagen und einem Jahr wurden schwerwiegende kardiale Komplikationen wie Tod, Reoperation, Restenose,

Rehospitalisierung, Myokardinfarkt und Schlaganfall (MACE - engl. Major Adverse Cardiac Even(s)) erhoben.

### 2.3.2 Immun- und Histochemische Färbungen

Alle chirurgisch explantierten Herzklappen wurden pseudonymisiert asserviert und zur morphologischen Darstellung markanter Zellstrukturen wie des Zellkerns und des Zytoplasmas histologisch mittels Hämalaun-Eosin gefärbt. Im Anschluss an diese Übersichtsfärbungen erfolgten immunhistochemische Färbungen der fibrotischen bzw. inflammatorischen Marker BMP-2, BMP-4, BMP-7, MIF, Gremlin-1, CD3, CD68 und TGF- $\beta$ 1 auf valvulären Zellen und ein Vergleich deren Expression im aortal- und ventrikulärseitigen, stenosierten Aortenklappengewebe. Ein Vergleich der Expression der einzelnen Marker im Gewebe wurde für lpAS und rpAS sowie für high-gradient AS und low-gradient AS durchgeführt. Es wurden keine Hintergrundfärbungen untersucht.

#### 2.3.2.1 Gewebeaufbereitung und Einbettung in Paraffin

Alle im Rahmen der Herzoperation explantierten Aortenklappen wurden unmittelbar nach Exzision aus dem Operationssaal abgeholt und in 4%iger Formaldehydlösung bei 8 °C fixiert, um die ursprüngliche Gewebestruktur und -architektur zu erhalten. Nach einer mindestens 24-stündigen Inkubation in Formaldehydlösung konnte eine Einbettung des Gewebes in Paraffin vorgenommen werden (siehe Tabelle 4). Hierzu musste zunächst eine Auswaschung des Fixiermediums Formaldehyd erfolgen, weshalb die Aortenklappen zunächst in hierfür vorgesehenen, individualisierten Einbettkörbchen für eine Stunde in Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) inkubierten. Eine Entkalkung des Gewebes wurde nicht durchgeführt. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften des Paraffins wurde im Anschluss mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe eine Entwässerung des Gewebes vorgenommen. Dazu wurden die in PBS getränkten Einbettkörbchen für jeweils eine Stunde zunächst in 70%ige, dann 80%ige und schließlich 90%ige Ethanollösung (mit destilliertem Wasser) gegeben. Eine abschließende Inkubation zur weiteren Entwässerung des Gewebes erfolgte in reinem Ethanol für zwei Stunden. Im Anschluss wurde das Gewebe in den Einbettkörbchen mit 60 °C warmem,

flüssigem Paraffin für zwei Stunden durchtränkt. Daraufhin wurde das Gewebe aus den Einbettkörbchen entnommen und mit heißem, flüssigem Paraffin in Metallschalen zu Gewebe-Paraffinpflöcken gegossen.

**Tabelle 4: Protokoll zur Einbettung von Gewebeproben in Paraffin für (immun-) histochemische Färbungen**

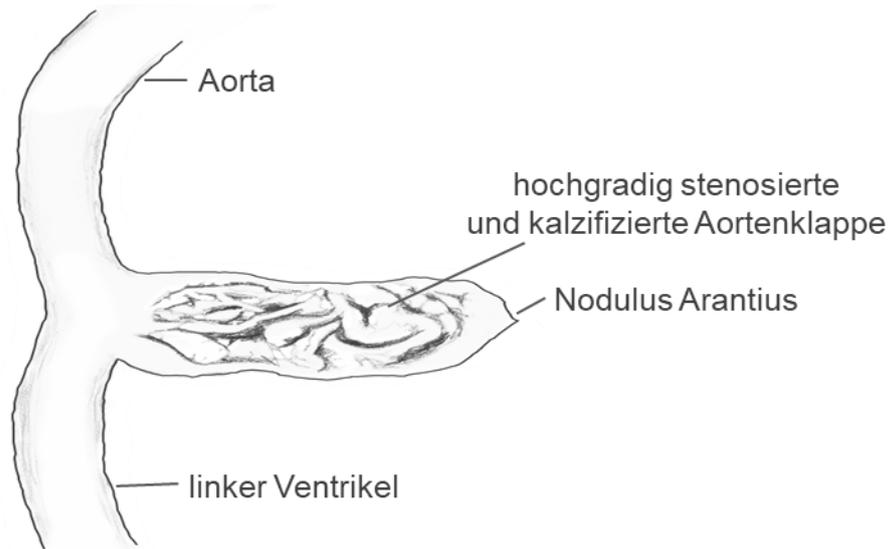
<b>Chemikalie</b>	<b>Inkubationszeit (in Stunden)</b>
Formaldehydlösung 4 %	24
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	1
Ethanol 70 % in destilliertem Wasser	1
Ethanol 80 % in destilliertem Wasser	1
Ethanol 90 % in destilliertem Wasser	1
Ethanol 100 %	2
flüssiges Paraffin, 60 °C	2
Einbettung in Paraffin und Abkühlung	

Solange die Aortenklappen in ihren individualisierten Einbettkörbchen in klarem, durchsichtigem und flüssigem Paraffin verweilen, war die anatomische Zuordbarkeit der aortalen und ventrikulären Herzklappenseite visuell problemlos möglich. Da erkaltetes, weißes Paraffin nicht mehr durchsichtig ist, kann die anatomische Unterscheidung der aortalen und ventrikulären Herzklappenseite in erkaltetem Paraffin nicht mehr rein visuell erfolgen. Aus diesem Grund wurden beim Gießen der Gewebe-Paraffinpflöcke auf der jeweiligen Einbettkassette die aortale und ventrikuläre Seite der Herzklappe vermerkt. Die pseudonymisierte Identität der Gewebe wurde ebenfalls durch die Beschriftung der Einbettkassetten, die im Anschluss nicht mehr vom individuellen Paraffinplock zu trennen sind, sichergestellt. Die Einbettung in Paraffin führt zu einer ausreichenden Stabilität des Gewebes, sodass diese Paraffin-Gewebe-Pflöcke nach Abkühlung aus ihren metallischen Einbettkörbchen gelöst und am Mikrotom zu 4 µm dünnen Schnitten weiterverarbeitet werden konnten. Die Einbettkassette verbleibt nach dem Erkalten am Paraffinplock und kann im Nachhinein weder abgelöst noch rotiert oder verschoben werden. Folglich

konnte von jedem Gewebe die Identität als auch die anatomische Ausrichtung klar nachvollzogen werden.

#### 2.3.2.2 Anfertigungen von Paraffinschnitten am Mikrotom

Beim Gießen und Erkalten des Gewebepflocks wurde auf eine spezielle Ausrichtung der Aortenklappe geachtet, sodass die Schnittrichtung am Mikrotom entlang der aorto-ventrikulären Ebene erfolgen kann, um die Anfärbung aortaler und ventrikulärer Strukturen bei jedem einzelnen Gewebeschnitt miteinander vergleichen zu können (siehe Abbildung 4). Während des gesamten Einbettungs-, Schneide- und Färbevorgangs wurde auf die eindeutige Zuordbarkeit von aortaler und ventrikulärer Seite der Herzklappen geachtet, wie bereits von Otto et al. 1994 beschrieben (63). Hierfür wurde jeder Gewebeschnitt einzeln mittels eines Pinsels vom Mikrotom genommen und für drei Sekunden in 21 °C kühles Wasser gelegt um ihn von Schneideabfallprodukten wie beispielsweise Paraffinspänen zu säubern. Danach wurde er für vier Sekunden in 50 °C warmem Wasser gestreckt und anschließend auf einem, wie in Kapitel „2.1 Geräte & Chemikalien“ beschrieben, Objektträger aufgeladen. Nach dem Aufladen auf den Objektträger erfolgte unmittelbar dessen Beschriftung mit der pseudonymisierten Identität des Gewebes und dessen anatomischer Ausrichtung. Dieses Vorgehen wurde für jeden Schnitt einzeln wiederholt, da nur so sichergestellt werden konnte, dass die aortalen und ventrikulären anatomischen Zuordnungen sichergestellt waren. Es wurden auf jeden Objektträger drei Gewebeschnitte derselben Aortenklappe in identischer Ausrichtung positioniert, um für jede einzelne Färbung jeder individuellen Herzklappe neben einer immunhistochemischen Färbung eine IgG-Kontrollfärbung und eine PBS-Kontrollfärbung durchführen zu können. Wenn die anatomische Ausrichtung einer Herzklappe nicht mehr sicher nachzuvollziehen war, wurden diese Schnitte auf gesonderte Objektträger aufgebracht und für mögliche zukünftige Forschungsvorhaben gesondert aufbewahrt. Im Anschluss an die Gewebeschnitte erfolgte eine mindestens 72-stündige Trocknungszeit der Objektträger bei 21 °C.



**Abbildung 4: Schneideebene des in Paraffin eingebetteten Gewebes zur Sicherung der anatomischen Zuordnung (modifiziert nach Otto CM et al.) (68).** Es ist schematisch ein Querschnitt des linksventrikulären Ausflusstraktes mit kalzifizierter Aortenklappe und angrenzender Aorta, entsprechend der Schnittebene des Mikrotoms, dargestellt.

### 2.3.2.3 Entparaffinierung

Vor jeder (immun-) histochemischen Färbung erfolgte nach der vorgeschriebenen Trocknungszeit der Paraffinschnitte eine Entparaffinierung, um das Gewebe für anschließende Färbungen wieder in ein wässriges Milieu zu überführen (siehe Tabelle 5).

**Tabelle 5: Entparaffinierung von Paraffinschnitten**

Chemikalie	Inkubationszeit (in Minuten)
Xylolersatz (RotiHistol)	2 x 10 min
Ethanol 100 %	2 x 5 min
Ethanol 96 % in destilliertem Wasser	5
Ethanol 80 % in destilliertem Wasser	5
Ethanol 70 % in destilliertem Wasser	5

Hierzu wurden die mit Gewebe beladenen Objektträger zunächst in Xylolersatzmittel (RotiHistol, siehe Kapitel „2.1 Geräte und Chemikalien“) für zweimal zehn Minuten und anschließend zweimal fünf Minuten in reines

Ethanol gegeben. Danach erfolgten jeweils fünfminütige Inkubationen in Ethanollösungen absteigender Konzentrationen begonnen mit 96%iger, dann 80%iger und schließlich 70%iger Ethanollösung mit destilliertem Wasser. Es wurden teilweise bewusst Inkubationsschritte desselben Mediums auf zwei separate Ansätze dieses Mediums aufgeteilt, um die Effektivität des Inkubationsschrittes zu optimieren und mögliche Verdünnungen oder Verunreinigungen von vorherigen Lösungen zu vermeiden. Im Anschluss an die Entparaffinierung konnte mit der jeweiligen (immun-) histochemischen Färbung begonnen werden.

#### 2.3.2.4 Hämalaun-Eosin-Färbung

Für jede Herzklappe wurde, wie in Tabelle 6 angegeben, eine Hämalaun-Eosin-Übersichtsfärbung angefertigt. Dabei kommt es durch zwischenmolekulare Wechselwirkungen des sauren Farbstoffes Eosin mit acidophilen Strukturen wie beispielsweise Proteinen des Zytoplasmas zur roten Anfärbung des Zytoplasmas. Die blaue Anfärbung basophiler Strukturen wie beispielsweise des Zellkerns bzw. der Desribonukleinsäure, wird durch oxidiertes, basisches bzw. acidophiles Hämatoxylin, Hämatein genannt, hervorgerufen. Im Rahmen dieser Studie wurde Hämalaun, ein Abkömmling des Hämatoxylins, verwendet. Zunächst badeten die wie in Tabelle 5 beschriebenen, entparaffinierten Objektträger fünf Minuten in destilliertem Wasser, bevor im Rahmen einer fünfminütigen Inkubation mit dem in Kapitel 2.1 beschriebenen Hämalaun von Mayer, in einer Verdünnung von 1:5 mit destilliertem Wasser, eine Anfärbung basophiler Strukturen erfolgte. Nach fünfsekündiger Spülung in destilliertem Wasser erfolgte durch pH-Wert-Änderung für 15 Minuten eine Bläuung in Leitungswasser. Im darauffolgenden Schritt konnten nach erneuter fünfsekündiger Spülung in destilliertem Wasser acidophile Strukturen, durch dreiminütige Inkubation in 1%iger Eosin G-Lösung, angefärbt werden. Überschüssige Farbe wurde durch nochmalige fünfsekündige Spülung in destilliertem Wasser entfernt.

**Tabelle 6: Hämalaun-Eosin-Färbung in Anlehnung an Romeis- Mikroskopische Technik 2015 (123)**

<b>Chemikalie</b>	<b>Inkubationszeit</b>
Destilliertes Wasser	5 Minuten
Färbung mit Hämalaunlösung nach Mayer 1:5 in destilliertem Wasser	5 Minuten
Spülung in destilliertem Wasser	5 Sekunden
Bläuung in fließendem Leitungswasser	15 Minuten
Spülung in destilliertem Wasser	5 Sekunden
Inkubation in Eosin G-Lösung 1%	3 Minuten
Spülung in destilliertem Wasser	5 Sekunden
Ethanol 70 % in destilliertem Wasser	10 Sekunden
Ethanol 80 % in destilliertem Wasser	10 Sekunden
Ethanol 96 % in destilliertem Wasser	10 Sekunden
Ethanol 100 %	2 x 5 Minuten
Xylolersatz (RotiHistol)	1 Minute
Xylolersatz (RotiHistol)	3 Minuten
Eindeckeln mit Einschlussmedium (Roti-Histokitt)	
Trocknung unter Abzugshaube	mindestens 5 Tage

Aufgrund einer daraufhin durchgeführten Entwässerung des Gewebes mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe und Inkubation in dem Xylolersatzintermedium RotiHistol konnte das gefärbte Gewebe nach Zugabe des Einschlussmediums Roti-Histokitt eingedeckelt und haltbar gemacht werden. Im Rahmen der aufsteigenden Alkoholreihe erfolgten jeweils zehnstündige Inkubationen in 70%iger, 80%iger sowie 96%iger Ethanollösung mit destilliertem Wasser und schließlich zweimal fünfminütige Inkubationen in reinem Ethanol. Nach einer einminütigen Inkubation in RotiHistol erfolgte nochmals eine dreiminütige Inkubation in separat angesetztem RotiHistol. Im darauffolgenden Schritt konnten nach Zugabe des Einschlussmediums Roti-Histokitt unter dem Abzug Deckgläser auf das gefärbte Gewebe aufgebracht werden. Eine Trocknung vor weiteren Analysen erfolgt für mindestens fünf Tage unter der Abzugshaube.

### 2.3.2.5 Immunhistochemische Färbungen

Es wurden ausschließlich indirekte Immunhistochemische Färbungen nach der „Labelled (Strept-)Avidin-Biotin-Methode“ (LSAB) durchgeführt. Das Prinzip einer indirekten immunhistochemischen Färbung beruht darauf, dass die zu untersuchenden Zielstrukturen durch Bindung an spezifische Epitope unkonjugierter Primärantikörper markiert und mittels Chromogen gelabelter Sekundärantikörper, die sich an die Primärantikörper anlagern, farblich dargestellt werden. Im Rahmen der LSAB wird dem Primärantikörper kein direkt mittels Chromogen gelabelter, sondern ein biotinylierter Sekundärantikörper hinzugefügt, an den sich Streptavidin durch seine hohe Affinität zu Biotin anlagert. Die Färbung wird durch Verwendung chromogener Substrate, die an Streptavidin binden, hervorgerufen. Streptavidin selbst dient im Rahmen dieser Färbemethode als Signalamplifikator um auch geringe Anfärbungen der zu untersuchenden Zielstruktur mikroskopisch sichtbar zu machen. Die immunhistochemischen Färbungen wurden in Anlehnung an Romeis - Mikroskopische Technik 2015 sowie die Anweisungen in den zugehörigen Datenkontrollblättern der jeweiligen Antikörper durchgeführt (siehe Tabelle 7) (138).

**Tabelle 7: Immunhistochemische Färbung in Anlehnung an Romeis-Mikroskopische Technik 2015 sowie die Anweisungen der zugehörigen Datenkontrollblätter (123)**

<b>Chemikalie</b>	<b>Inkubationszeit</b>
Citratpuffer mit pH = 6,0 in die Mikrowelle	15 Minuten
Abkühlung	
Waschen mit PBS	3 x 5 Minuten
Inkubation in 30%-iger Wasserstoffperoxidlösung mit destilliertem Wasser	10 Minuten
Waschen mit PBS	3 x 5 Minuten
Umkreisung der Gewebe mit Fettstift	
Dako Protein Block Serum Free	30 Minuten
Abwaschen mit PBS	5 Sekunden
Antikörperinkubation bei 4 °C	14 Stunden

Waschen in PBS + 0,05 % Tween	3 x 2 Minuten
Inkubation des biotinylierten Sekundärantikörpers	30 Minuten
Waschen in PBS + 0,05 % Tween	3 x 2 Minuten
Inkubation Streptavidin-HRP 1:300 in PBS	30 Minuten
Waschen in PBS + 0,05 % Tween	3 x 2 Minuten
Inkubation Dako DAB + Substrate Chromogen System	10 Minuten
Waschen in Leitungswasser	5 Sekunden
Färbung mit Hämalaunlösung nach Mayer 1:5 in destilliertem Wasser	3 Minuten
Bläuung in fließendem Leitungswasser	15 Minuten
Spülung in destilliertem Wasser	5 Sekunden
Ethanol 70 % in destilliertem Wasser	10 Sekunden
Ethanol 80 % in destilliertem Wasser	10 Sekunden
Ethanol 96 % in destilliertem Wasser	10 Sekunden
Ethanol 100 %	2 x 5 Minuten
Xylolersatz (RotiHistol)	1 Minute
Xylolersatz (RotiHistol)	3 Minuten
Eindeckeln mit Einschlussmedium (Roti Histokitt)	
Trocknung unter Abzugshaube	mindestens 5 Tage

Nach der wie in Tabelle 5 beschriebenen Entparaffinierung erfolgte zur Antigendemaskierung eine 15-minütige Inkubation in Citratpuffer mit pH = 6,0 in der Mikrowelle. Nach anschließender Abkühlung wurden die Objektträger in PBS dreimal fünf Minuten gewaschen. Es wurde bei jedem Schritt frisches PBS verwendet. Zur Hemmung der endogenen Peroxidase wurde für zehn Minuten 30%ige Wasserstoffperoxidlösung hinzugegeben. Damit das Wasserstoffperoxid nicht durch Lichteinwirkung zerfällt, wurde die Objektträgerkammer für diesen Inkubationsschritt abgedunkelt. Nach erneutem dreimal fünfminütigem Waschen in PBS konnten die Gewebe auf den

Objektträgern mit Fettstift umkreist werden, damit die später hinzugegebenen Antikörper sich nicht untereinander vermischen. Um unspezifische Hintergrundfärbungen zu vermeiden, wurde zur Blockierung von Proteinbindungsstellen für 30 Minuten Dako Protein Block Serum Free hinzugegeben. Nach fünfsekündigem Abwaschen in PBS erfolgte nun in der ausgetesteten Verdünnung unter Berücksichtigung der Herstellerangaben bei 4 °C für 14 Stunden im Dunkeln eine Antikörperinkubation. Vor jeder Färbung wurden die optimalen Antikörperkonzentrationen durch Anfertigung verschiedener Testreihen ermittelt. Es wurde für jeden Marker jene Antikörperkonzentrationen mit der besten Auflösung im mikroskopischen Bild bei gleichzeitig keiner Anfärbung in den Negativkontrollen gewählt. Die nach Austestung durch die Doktorandin verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2 ersichtlich. Bei jeder einzelnen Antikörperfärbung wurden entsprechende Immunglobulin- und PBS-Negativkontrollen mitgefärbt, um die Aussagekraft und Qualität der Färbung zu gewährleisten. Positivkontrollen, um die Funktion der Antikörper zu beurteilen, erfolgten durch Färbung von humanen Koronarthromben und Mitralklappen, die ebenfalls von der Doktorandin durchgeführt und für die Färbungen vorbereitet wurden. Nach der Inkubation für 14 Stunden im Dunkeln wurden die Antikörper dreimal zwei Minuten in PBS mit 0,05 % Tween gesäubert, bevor ein biotinylierter Sekundärantikörper für 30 Minuten hinzugegeben wurde, der im Anschluss ebenfalls dreimal zwei Minuten mit PBS und 0,05 % Tween abgewaschen wurde. Um das Färbesignal zu verstärken, erfolgte eine Signalamplifikation mittels Streptavidin-HRP, das 1:300 in PBS verdünnt und nach 30-minütiger Einwirkzeit mit PBS und 0,05 % Tween dreimal zwei Minuten abgewaschen wurde. Das eigentliche chromogene Substrat, Dako DAB + Substrate Chromogen System, wurde nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten für fünf Sekunden mit Leitungswasser abgewaschen. Zur zusätzlichen Darstellung zellkernhaltiger Zellen, wurden die Objektträger drei Minuten in Hämalaulösung nach Mayer gebadet, das im Verhältnis 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt war. Durch Überführung der Objektträger in eine Schale mit fließendem Leitungswasser erfolgte die Bläuung der Zellkerne durch pH-Wert-Änderung des Umgebungsmediums. Nach

fünfsekündigem Reinigen in destilliertem Wasser musste zunächst eine Entwässerung stattfinden, um das Eindeckmedium hinzugeben zu können. Für jeweils zehn Sekunden wurden die Objektträger in eine aufsteigende Alkoholreihe beginnend mit 70%iger, dann 80%iger und schließlich 96%iger Ethanollösung mit destilliertem Wasser gegeben, bevor sie zweimal fünf Minuten in reinem Ethanol inkubierten. Im Anschluss erfolgten ein- und dreiminütige Inkubationen in Roti-Histol bevor das Einschlussmedium Roti-Histokitt hinzugegeben wurde und das Gewebe mit Deckgläschen eingedeckelt werden konnte. Nach der Eindeckelung war eine Trocknung unter der Abzugshaube für mindestens fünf Tage notwendig, bevor mikroskopische Auswertungen durchgeführt werden konnten.

#### 2.3.2.6 Immunhistochemische Analyse und Auswertung

Nach ausreichender Trocknungszeit wurde die Qualität jeder immunhistochemischen Färbung mikroskopisch begutachtet. Färbungen, bei denen die Negativkontrollen eine Anfärbung zeigten, wurden verworfen und wiederholt. Ein weiterer Grund die Färbung zu verwerfen, war eine mangelnde Anfärbung im Rahmen der durchgeführten Positivkontrollen. Alle gefärbten Aortenklappen guter Qualität wurden weiter ausgewertet. Hierzu wurden Fotos in 20-facher Vergrößerung an sechs Stellen der Herzklappe, davon drei aortal und drei ventrikulär, jeweils zentral (in der Nähe des Nodulus Arantius), medial und lateral (nahe des Klappenhalteapparats) fotografiert und anschließend gezählt. Es wurde darauf geachtet, dass sich die Bilder nicht überschneiden. Im Anschluss wurden alle für den untersuchten Marker positive Zellen gezählt. In die statistische Auswertung flossen das arithmetische Mittel aller drei arteriellen Zählungen für die Anzahl aortaler positiver Zellen sowie der Mittelwert der drei ventrikulären Zählungen für die Anzahl ventrikulärer positiver Zellen des untersuchten Markers in der jeweiligen Herzklappe ein. Zur Ermittlung der Gesamtanzahl der positiven Zellen eines untersuchten Proteins in der individuellen Aortenklappe wurde der Mittelwert aller sechs Zählungen bestimmt. Wenn die arterio-ventrikuläre Zuordnung nach einer Färbung nicht mehr sicher möglich war, floss diese Färbung nicht in die Auswertung der aortalen bzw. ventrikulären Expressionen ein. In solch einem Fall wurde nur die

Gesamtanzahl der positiven Zellen des jeweiligen Markers in dieser Herzklappe, durch Bildung des Mittelwerts aus Zellzählungen von drei repräsentativen Bildausschnitten, bestimmt. Es wurden in jedem Bild sowohl die Anzahl durch Hämalaun angefärbter, zellkernhaltiger Zellen als auch die Anzahl positiver Zellen für den untersuchten Marker bestimmt. Es erfolgte keine Auswertung der nicht-zellulären Anfärbungen des untersuchten Markers.

### 2.3.3 Durchflusszytometrische Analysen

Durchflusszytometrische Untersuchungen (FACS-Analysen, engl. fluorescence-activated cell sorting) dienen der Analyse von relativer Größe und intrazellulärer Komplexität des zu untersuchenden Probenmaterials durch Messung der Lichtstreuung als auch des indirekten Nachweises von angefärbten Zielstrukturen im Probenmaterial mittels fluorochromgelabelter Antikörper, durch Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensitäten der zu untersuchenden Partikel, während sich diese in einer Flüssigkeit durch ein Laserlicht bewegen. Durch sorgfältige Analyse dieser Daten, die für jedes untersuchte Partikel bestimmt werden, können Rückschlüsse auf die Beschaffenheit und Proteinexpression des Untersuchungsmaterials gezogen werden. Im Rahmen dieser Arbeit erfolge eine Anfärbung der Proteine BMP-2, -4, -7, MIF, Gremlin-1, TGF- $\beta$ 1, SDF-1, CXCL14, CXCR4 und CXCR7 in und auf permeabilisierten und nicht permeabilisierten CD14 und CD42b positiver Zellen durch spezifische Aufbereitung des Probenmaterials und Inkubation mit photosensitiven, fluorochromgelabelten Antikörpern. Das Prinzip der FACS-Analysen beruht darauf, dass Licht abhängig von der Größe als auch Beschaffenheit der Struktur auf das es einfällt, unterschiedlich gestreut wird und kombiniert diese Analyse mit der Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensitäten von dabei verwendeten, zielgerichteten, fluoreszenzmarkierten Antikörpern, sodass aufgrund der Streuung des Lichtes als auch der Fluoreszenzintensitäten, Rückschlüsse auf die Größe, die intrazelluläre Komplexität, als auch auf die Expression der untersuchten Struktur gezogen werden können. Während sich das zu untersuchende Partikel in einer Flüssigkeit durch einen Laserstrahl bewegt, wird aufgrund der Vorwärtsstreuung des Lichtes (FSC, engl. forward-scattered light) auf die Größe

des jeweiligen Partikels und durch das seitliche Streulicht (SSC, engl. side-scattered light) auf die intrazelluläre Komplexizität, die in hohem Maße von der Granularität abhängig ist, geschlossen. Diese gemessenen Daten werden vom FACS-Gerät in verschiedenen Dot-Plots visualisiert und in verhältnismäßige elektrische Signale umgewandelt, um die Daten vergleichen zu können. Alle Blutproben wurden von der Doktorandin eigenständig abgenommen und innerhalb von maximal 30 Minuten nach Blutabnahme pipettiert.

#### 2.3.3.1 Aufbereitung und Färbung CD14-positiver Zellen

CD14 stellt ein Zellmarker für im Blut zirkulierende Monozyten dar (124). Zur Färbung CD14-positiver Zellen wurde zu 100 µl aus mit Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin (CPDA) versetztem Vollblut 1 ml von 1:50 mit destilliertem Wasser verdünnter BD lysing solution hinzugegeben, um Erythrozyten zu hämolysieren. Nach dem Vermischen erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 1000 µl kalziumfreien PBS wurden die Reagenzgläser fünf Minuten bei 1200 RPM und Raumtemperatur zentrifugiert. Um Zellaggregationen zu vermeiden, wurde im Rahmen aller FACS-Färbungen ausschließlich kalziumfreies PBS verwendet. Darüber hinaus kam immer dieselbe Zentrifuge zum Einsatz. Nach Abkippen des Überstands wurde das Zentrifugat in 100 µl kalziumfreien PBS gelöst.

Nicht permeabilisierte Zellen konnten nun mit jeweils 10 µl der jeweiligen fluorochromgelabelten Antikörper, gefärbt werden. Es kamen ausschließlich die in Kapitel „2.1 Geräte und Chemikalien“ angegebenen Antikörper zum Einsatz. Die Konzentrationen der verwendeten Antikörper wurden wie in ihren Datenkontrollblättern angegeben verwendet. Es wurden 10 µl eines fluorochromgelabelten anti-human-anti-CD14-Zellmarkers mit 10 µl eines anti-human-Proteinmarkers mit anderer Fluorochromlabelung kombiniert, um anschließend die Färbungen differenzieren zu können. Nach 30-minütiger Inkubation im Dunkeln wurde die Färbung mit 300 µl einer 0,5%-igen PFA-Lösung gestoppt und die Zellen fixiert. Es erfolgte eine Inkubation im Dunkeln, um die Aktivierung photosensibler Konjugate zu vermeiden.

Permeabilisierte Zellen wurden nach Auflösen des Zentrifugats in 100 µl kalziumfreien PBS mit 10 µl 0,1%-iger Triton X Lösung für zehn Minuten inkubiert und erneut fünf Minuten bei 1200 RPM bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation fachgerecht entsorgt. Das Zentrifugat wurde in 100 µl kalziumfreien PBS aufgelöst und konnte nun wie nicht permeabilisierte Zellen gefärbt und gestoppt werden.

### 2.3.3.2 Aufbereitung und Färbung CD42b-positiver Zellen

CD42b kommt als Marker für Thrombozyten zum Einsatz (125). Auch wenn Thrombozyten formal keine Zellen sondern Zellabschnürungen darstellen, hat es sich im wissenschaftlichen Jargon eingebürgert, dennoch von CD42b positiven Zellen zu sprechen, was im Rahmen dieser Arbeit übernommen wurde (126, 127). CD42b positive Zellen wurden aus 1:50 mit kalziumfreien PBS verdünntem CPDA Vollblut so schnell wie möglich, maximal jedoch 30 Minuten nach Blutabnahme, pipettiert und gefärbt. Auch für die FACS-Färbungen CD42b-positiver Zellen kam ausschließlich kalziumfreies PBS zum Einsatz, um die Zellaggregation und -aktivierung zu vermeiden. Zur Färbung nicht permeabilisierter Zellen wurden 40 µl der CPDA/PBS Verdünnung in jedes FACS-Tube gegeben und nach Zugabe der entsprechenden fluorchromgelabelten Antikörper, für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Es wurden jeweils 5 µl eines fluorchromgelabelten anti-human-anti-CD42b Antikörpers mit 5 µl eines anti-human-Proteinmarkers anderer Fluorchromlabelung kombiniert. Es kamen ausschließlich die in Kapitel 2.1 Geräte und Chemikalien angegebenen Antikörper zum Einsatz. Die Konzentrationen der verwendeten Antikörper wurden wie in ihren Datenkontrollblättern angegeben verwendet. Im Anschluss an die Inkubation im Dunkeln wurde die Färbung mit 300 µl einer 0,5%-igen PFA-Lösung gestoppt und die Zellen fixiert.

Zur Färbung permeabilisierter CD42b positiver Zellen wurden 90 µl der 1:50 CPDA/PBS Verdünnung mit 90 µl einer 2%-igen PFA-Lösung für 20 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 20 µl einer 3%-igen Triton X Lösung erfolgte eine erneute Inkubation für zehn Minuten. Vor einer fünfminütigen Zentrifugation bei

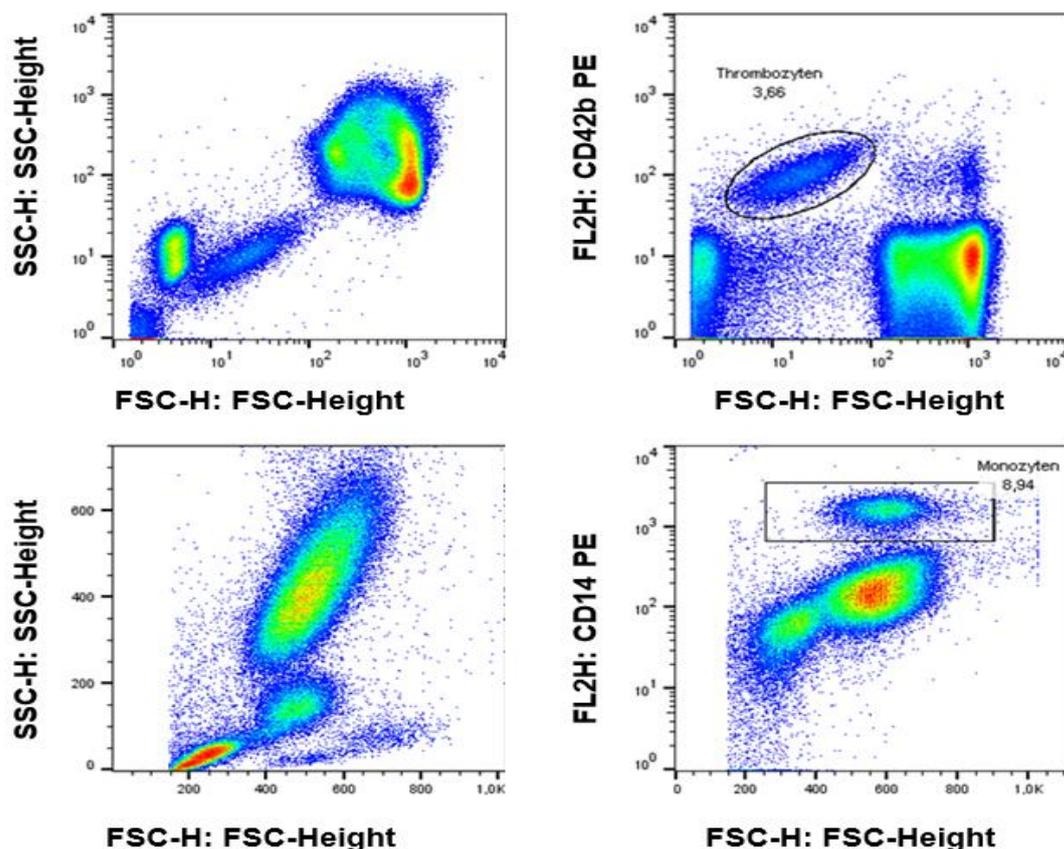
3000 RPM und bei Raumtemperatur wurden 3 ml kalziumfreies PBS hinzugefügt. Nach fachgerechtem Verwerfen des Überstands konnte, nach Zugabe von 40 µl kalziumfreien PBS, die Färbung wie bei nicht permeabilisierten Zellen fortgeführt werden. Es wurde immer dieselbe Zentrifuge verwendet.

#### 2.3.3.3 Durchführung und Auswertung durchflusszytometrischer Analysen

Die FACS-Messungen wurden von der Doktorandin so schnell wie möglich, maximal jedoch innerhalb von zwei Stunden nach Fixierung, durchgeführt.

Konnten die gefärbten Blutproben nicht direkt nach Zugabe der PFA-Lösung durchflusszytometrisch untersucht werden, wurden die Reagenzgläser bei 8 °C im Dunkeln für maximal zwei Stunden aufbewahrt und dann analysiert. Es wurden für jenen Zellmarker 10.000 positive Events durchflusszytometrisch, mit dem Fluss der so langsam wie möglich war, gemessen. Die Auswertung im Rahmen der Studie erfolgte anhand eines, von einem FACS-Gerät erstellten, Dot-Plots und durch die vom Gerät gemessenen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der untersuchten Marker. Zum Gating kamen sowohl entsprechende Immunglobulinkontrollen als auch Fluorescence-Minus-One (FMO)-Kontrollen zum Einsatz. Die FMO-Kontrollen wurden wie von Feher et al. und Lee et al. beschrieben, durchgeführt (128, 129). Abbildung 5 zeigt das Gating-Schema CD42b und CD14 positiver Zellen als Zellmarker für Thrombozyten (CD42b) und Monozyten (CD14) (124, 125).

Es erfolgte zunächst ein Zellgating, wie in Abbildung 5 aufgezeigt, um die zu untersuchende Population einzugrenzen. Im Anschluss wurden im jeweiligen Gate alle sowohl für den jeweiligen Zell- als auch den Proteinmarker positiven Events identifiziert. Als Ausmaß für die Stärke der Anfärbung wurden die MFIs des Proteinmarkers der CD14- oder CD42b-positiven Zellen im Gate dokumentiert.



**Abbildung 5: Gating-Schema durchflusszytometrischer Analysen.** Die Abbildung zeigt die verwendeten Gating-Schemata der thrombozytären (ovales Gate) und monozytären Zellfärbungen (rechteckiges Gate).

CD14 - Cluster of Differentiation 14; CD42b - Cluster of Differentiation 42; FSC - *engl. Forward Scatter* - vorwärts gestreutes Licht; PE - Phycoerythrin; SSC - *engl. Sideways Scatter* - Seitenstreulicht.

#### 2.3.4 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen wurden von der Doktorandin eigenständig nach Einarbeitung durch Frau PD Dr. Karin Müller, Innere Medizin III Kardiologie und Angiologie des Universitätsklinikums Tübingen, durchgeführt. Eine statistische Beratung und Begutachtung wurde von Frau You-Shan Feng, Ph.D., Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen/Institut für Community Medicine, Greifswald, durchgeführt.

Als Signifikanzniveau wurde  $\alpha = 0,05$  festgelegt, sodass bei einem p-Wert von  $< 0,05$  eine statistische Signifikanz angenommen wurde. Die Überprüfung auf Normalverteilung der Variablen erfolgte analytisch mittels Shapiro-Wilk-Test.

Normalverteilte, ordinale oder lineare Variablen wurden mittels t-Test für unabhängige Stichproben auf die Gleichheit ihrer Mittelwerte getestet. Die Nullhypothese lautet dabei, dass es keinen Unterschied der Mittelwerte der beiden Variablen gibt. Bei gleichzeitiger Varianzenheterogenität erfolgte ein t-Test mit Welch-Korrektur. Die Prüfung auf Homoskedastizität wurde mittels Levene-Test auf Varianzenhomogenität ermittelt. Nicht normalverteilte Variablen wurden mittels des nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Tests analysiert. Der Mann-Whitney-U-Test ist ein Verfahren, bei dem ordinal oder metrisch skalierten Variablen verschiedene Ränge innerhalb einer Gesamtkohorte zugeteilt und miteinander verglichen werden. Die Nullhypothese ist hierbei, dass sich die zentralen Tendenzen zwischen den beiden zu untersuchenden Testgruppen nicht unterscheiden. Kontinuierliche Variablen wurden als Median und Interquartilsabstand (IQA) zwischen dem ersten und dem dritten Quartil angegeben. Häufigkeiten wurden sowohl absolut als auch relativ im Vergleich zur jeweiligen Kohortenanzahl angegeben. Eine Korrelationsanalyse nach Pearson wurde durchgeführt, wenn zwischen zwei normalverteilten, metrischen Variablen ein linearer Zusammenhang vermutet wurde. Konnte dies nicht sichergestellt werden, erfolgte eine Korrelation nach Spearman. Bei allen Korrelationen wurde neben dem p-Wert der Korrelationskoeffizient (R-Wert) mit angegeben. Bei einem Betrag des R-Wertes von größer als 0,5 wurde eine starke, bei einem Betrag von 0,1 bis 0,3 eine schwache und bei einem Betrag zwischen 0,3 und 0,5 eine mittlere Stärke der Korrelation angenommen. Für den Vergleich der oberflächlichen und intrazellulären Expression auf Monozyten und Thrombozyten vor und nach Aortenklappenoperation wurde für normalverteilte Variablen ein t-test für verbundene Stichproben, bei nicht normalverteilten Variablen, der Wilcoxon-Test angewandt. Aufgrund der kleinen Patientenzahl wurde für fehlende Werte keine Imputation durchgeführt. Ausreißer wurden ebenfalls nicht excludiert. Mittels Power-Analysen wurde für wegweisende Messungen bestimmt, ob ausreichende Stichprobenumfänge vorliegen. Falls dies nicht der Fall war, wurden für ausgewählte Marker die notwendigen Stichprobengrößen für ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  und einer Power von  $\geq 80\%$  ermittelt.

### 3 Ergebnisse

Die Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner wurden im Herzklappengewebe und Blut untersucht. Ihre Auswertung erfolgte unter verschiedenen Gesichtspunkten. Zum einen wurden ihre Expressionen zwischen low-gradient AS und high-gradient AS verglichen sowie zwischen rpAS und lpAS. Eine kombinierte Auswertung von high-gradient und low-gradient AS sowie rpAS und lpAS konnte aufgrund der Verteilungen und Kohortengrößen nicht erfolgen.

#### 3.1 Vergleich von rasch und langsam progredienten Aortenklappenstenosen

##### 3.1.1 Patientencharakteristik rasch und langsam progredienter Aortenklappenstenosen

Im Zeitraum März 2015 bis Juli 2017 wurden insgesamt 201 Patienten mit hochgradiger Aortenklappenstenose am Universitätsklinikum Tübingen operiert. In diese Studie sind jedoch nur Patienten eingeschlossen worden, bei denen der Symptombeginn eindeutig nachvollziehbar war, was auf 34 Patienten zutraf. Die Probanden wurden anhand des Medians der Zeitspanne Symptombeginn bis Operation in zwei Kohorten eingeteilt. Es resultierten eine lpAS-Kohorte mit einer Zeitspanne größer und eine rasch rpAS-Gruppe mit einer Zeitspanne kleiner des Medians. Im Rahmen dieser Studie wurden 34 Patienten (100 %), davon 17 (50 %) mit rasch progredienter und 17 (50 %) mit langsam progredienter AS untersucht. Die zugrundeliegenden Patientencharakteristika sind Tabelle 8 zu entnehmen.

Die Zeitintervalle zwischen Erstsymptom und Herzklappenersatz der untersuchten Kohorten unterschieden sich hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). So betrug bei Patienten mit rpAS dieses Zeitintervall im Median 70,0 Tage (IQA: 26,5 – 101,0 Tage)<sup>6</sup> und lag deutlich unter jenem der lpAS-Kohorte, welches sich im Median auf 800,0 Tage (IQA: 476,5 – 1106,5 Tage) belief. Keine signifikanten Unterschiede waren bzgl. des Alters (Median rpAS: 72 Jahre (IQA:

---

<sup>6</sup> Wenn nicht anders erläutert, ist im gesamten Ergebnisteil der Median mit Interquartilsabstand (1.-3.Quartil) angegeben.

**Tabelle 8: Patientencharakteristik der Patienten mit rasch und langsam progredienten Aortenklappenstenosen.** Angaben in n (%) oder Median und Interquartilsabstand 1. - 3. Quartil.

<b>Alle Patienten</b>	<b>Rasch progrediente Aortenklappen- stenose</b>	<b>Langsam progrediente Aortenklappen- stenose</b>	<b>p-Wert</b>
<b>N = 34 (100 %)</b>	<b>n = 17 (50 %)</b>	<b>n = 17 (50 %)</b>	
Alter (in Jahren)	72,00 (68,50 – 76,00)	69,00 (57,00 – 75,00)	n.s.
Geschlecht (weiblich / männlich)	9 (52,94 %) / 8 (47,06 %)	6 (35,29 %) / 11 (64,71 %)	n.s.
<b>Zeitintervalle (in Tagen)</b>			
Erstsymptom bis Operation	70,0 (26,5 – 101,0)	800,0 (476,5 – 1106,5)	<b>&lt; 0,001</b>
Erstsymptom bis Diagnosestellung	1,0 (0,0 – 52,0)	90,0 (0,0 – 334,0)	<b>0,047</b>
Liegedauer	8,0 (7,0 – 11,0)	8,0 (8,0 – 11,0)	n.s.
<b>Kardiovaskuläre Risikofaktoren</b>			
Bikuspide Aortenklappe	3 (17,65 %)	4 (23,53 %)	n.s.
Arterielle Hypertonie	12 (70,59 %)	10 (58,82 %)	n.s.
Dislipoproteinämie	7 (41,18 %)	5 (29,41 %)	n.s.
Diabetes mellitus	2 (11,76 %)	4 (23,53 %)	n.s.
Nikotinabusus	5 (29,41 %)	5 (29,41 %)	n.s.
Body Mass Index (kg/m <sup>2</sup> )	27,04 (25,04 – 31,64)	27,51 (22,27 – 29,91)	n.s.
<b>Komorbiditäten</b>			
Koronare Herzerkrankung	8 (47,06 %)	9 (52,94 %)	n.s.
Niereninsuffizienz	2 (11,76 %)	1 (5,88 %)	n.s.
Vorhofflimmern	1 (5,88 %)	1 (5,88 %)	n.s.
Pulmonale Hypertonie	3 (17,65 %)	0 (0,00 %)	n.s.

<b>Alle Patienten</b>	<b>Rasch progrediente Aortenklappen- stenose</b>	<b>Langsam progrediente Aortenklappen- sterose</b>	<b>p-Wert</b>
<b>N = 34 (100 %)</b>	<b>n = 17 (50 %)</b>	<b>n = 17 (50 %)</b>	

#### **Risikoscores**

Framingham Risk Score (FRS) (%)	33,70 (22,80 – 52,00)	35,90 (17,00 – 61,05)	n.s.
EuroScore I (%) logistisch	8,40 (4,50 – 11,86)	5,46 (3,49 – 10,87)	n.s.
EuroScore II (%)	1,49 (1,27 – 2,57)	1,65 (1,19 – 2,33)	n.s.
STS-Score (%)	1,38 (0,91 – 2,10)	1,11 (0,74 – 1,45)	n.s.

#### **Transösophageale Echokardiographie**

Aortenklappen- öffnungsfläche (cm <sup>2</sup> )	0,71 (0,53 – 0,80)	0,73 (0,59 – 0,90)	n.s.
Mittlerer Druckgradient über der Aortenklappe (mmHG)	37,00 (24,00 – 43,50)	36,00 (20,00 – 48,00)	n.s.
Maximaler Druckgradient über der Aortenklappe (mmHg)	64,00 (40,00 – 73,50)	60,00 (35,25 – 79,50)	n.s.
Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (%)	60,00 (47,50 – 69,00)	55,00 (37,50 – 61,00)	n.s.
Kombiniertes Aortenklappenvitium (begleitende Insuffizienz)	9 (52,94 %)	12 (70,59 %)	n.s.

<b>Alle Patienten</b>	<b>Rasch progrediente Aortenklappen- stenose</b>	<b>Langsam progrediente Aortenklappen- sterose</b>	<b>p-Wert</b>
<b>N = 34 (100 %)</b>	<b>n = 17 (50 %)</b>	<b>n = 17 (50 %)</b>	
<b>Laborwerte bei Aufnahme</b>			
Ceratin kinase (U/l)	81,00 (58,50 – 156,50)	76,00 (51,25 – 111,00)	n.s.
Kreatinin im Serum (mg/dl)	0,70 (0,65 – 0,95)	0,75 (0,63 – 0,80)	n.s.
Glomeruläre Filtrationsrate (MDRD + ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	81,40 (70,70 – 105,45)	95,85 (74,63 – 102,93)	n.s.
Harnstoff i.S. (mg/dl)	32,00 (27,50 – 35,00)	34,00 (27,25 – 44,75)	n.s.
HbA <sub>1c</sub> (%)	5,80 (5,55 – 14,45)	5,50 (5,15 – 18,50)	n.s.
Triacylglyceride (mg/dl)	80,00 62,75 – 98,00)	185,50 (159,00 – 201,00)	n.s.
Cholesterin (mg/dl)	197,00 (153,75 – 242,25)	177,00 (163,00 – 243,50)	n.s.
High Density Lipoprotein (mg/dl)	78,00 (47,75 – 101,75)	51,00 (44,00 – 67,50)	n.s.
Low Density Lipoprotein (mg/dl)	103,00 (71,50 – 142,00)	131,50 (91,20 – 159,40)	n.s.
C-reaktives Protein (mg/dl)	0,27 (0,06 – 0,73)	0,17 (0,03 – 0,28)	n.s.
Leukozyten (pro µl)	7160,0 (5820,0 – 9930,0)	6534,0 (682,5 – 7832,5)	n.s.
Thrombozyten (x1000 pro µl)	215,0 (152,0 – 268,0)	240,5 (212,7 – 264,5)	n.s.

<b>Alle Patienten</b>	<b>Rasch progrediente Aortenklappen- stenose</b>	<b>Langsam progrediente Aortenklappen- sterose</b>	<b>p-Wert</b>
<b>N = 34 (100 %)</b>	<b>n = 17 (50 %)</b>	<b>n = 17 (50 %)</b>	

#### **Medikation bei Aufnahme**

Acetylsalicylsäure	12 (70,59 %)	8 (47,06 %)	n.s.
Clopidogrel	1 (5,88 %)	0 (0,00 %)	n.s.
Prasugrel	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)	-
Ticagrelor	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)	-
Dabigatran	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)	-
Rivaroxaban	0 (0,00 %)	1 (5,88 %)	n.s.
Apixaban	0 (0,00 %)	1 (5,88 %)	n.s.
Phenprocoumon	1 (5,88 %)	1 (5,88 %)	n.s.
Statin	7 (41,18%)	9 (52,94 %)	n.s.
Angiotensin-Converting- Enzym-Hemmer	5 (29,41 %)	8 (47,06 %)	n.s.
Sartan	7 (41,18 %)	1 (5,88 %)	n.s.
Betablocker	8 (47,06 %)	7 (41,18 %)	n.s.
Calciumantagonist	6 (35,29 %)	3 (17,65 %)	n.s.
Diuretikatherapie	9 (52,94 %)	7 (41,18 %)	n.s.
Aldosteronantagonist	0 (0,00 %)	1 (5,88 %)	n.s.

#### **Medikation bei Entlassung**

Acetylsalicylsäure	16 (94,12 %)	16 (94,12 %)	n.s.
Clopidogrel	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)	-
Prasugrel	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)	-
Ticagrelor	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)	-
Dabigatran	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)	-
Rivaroxaban	1 (5,88 %)	1 (5,88 %)	n.s.
Apixaban	0 (0,00 %)	1 (5,88 %)	n.s.

<b>Alle Patienten</b>	<b>Rasch progrediente Aortenklappen- stenose</b>	<b>Langsam progrediente Aortenklappen- sterose</b>	<b>p-Wert</b>
<b>N = 34 (100 %)</b>	<b>n = 17 (50 %)</b>	<b>n = 17 (50 %)</b>	
Phenprocoumon	1 (5,88 %)	2 (11,76 %)	n.s.
Statin	11 (64,71 %)	12 (70,59 %)	n.s.
Angiotensin-Converting- Enzym-Hemmer	10 (58,82 %)	12 (70,59 %)	n.s.
Sartan	5 (29,41 %)	0 (0,00 %)	n.s.
Betablocker	14 (82,35 %)	14 (82,35 %)	n.s.
Calciumantagonist	2 (11,76 %)	4 (23,53 %)	n.s.
Diuretikatherapie	12 (70,59 %)	14 (82,35 %)	n.s.
Aldosteronantagonist	4 (23,53 %)	1 (5,88 %)	n.s.
<b>Follow Up (30 Tage)</b>			
Tod	1 (5,88 %)	0 (0,00 %)	n.s.
Restenose / Reoperation	0 (0,00 %)	2 (11,76 %)	n.s.
Myokardinfarkt	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)	-
Schlaganfall	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)	-
Rehospitalisierung	1 (5,88 %)	0 (0,00 %)	n.s.
<b>Follow Up (1 Jahr) Angaben bezogen auf die Ausgangspopulation</b>			
Tod	1 (5,88 %)	1 (5,88 %)	n.s.
Restenose/ Reoperation	1 (5,88 %)	2 (11,76 %)	n.s.
Myokardinfarkt	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)	-
Schlaganfall	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)	-
Rehospitalisierung	2 (11,76 %)	4 (23,54 %)	n.s.
Kombinierte MACE	2 (11,76 %)	1 (5,88 %)	n.s.

MACE - *engl. Major Adverse Cardiac Even(s)*, dt. schwerwiegende kardiale Komplikation wie Tod, Reoperation, Restenose, Rehospitalisierung, Myokardinfarkt und Schlaganfall; STS - *engl. The Society of Thoracic Surgeons*, dt. Gesellschaft der Thoraxchirurgen.

68,50 – 76,00); Median IpAS: 69 Jahre (IQA: 57,00 – 75,00) und der biologischen Geschlechterverteilung (weiblich / männlich: rpAS 9 (52,94 %) / 8 (47,06 %); IpAS 6 (35,29 % / 11 (64,71 %) der beiden Kohorten zu verzeichnen. Die Mediane der Aortenklappenöffnungsflächen waren in beiden Kohorten vergleichbar (rpAS: 0,71cm<sup>2</sup> (IQA: 0,53 - 0,80); IpAS 0,73 cm<sup>2</sup> (IQA: 0,59 - 0,90)). Ebenso ähnelte der Median des mittleren Druckgradienten über der Aortenklappe von Patienten mit rpAS mit 37,00 mmHg (IQA: 24,00 – 43,50) jenem in der IpAS Kohorte, der sich auf 36,00 mmHg (IQA: 20, 00 – 48,00) belief. Auch die maximalen Druckgradienten über der Aortenklappe zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kohorten mit im Median 64 mmHg (IQA: 40,00 – 73,50) bei Patienten mit rpAS und 60,00 mmHg (IQA: 35,25 – 79,50) bei Patienten mit IpAS. Beide Kohorten zeigten im Median eine normwertige linksventrikuläre Ejektionsfraktion (rpAS: 60,00 % (IQA: 47,50 - 69,00); IpAS: 55,00 % (IQA: 37,50 – 61,00)). Bis auf fünf Personen (29,41 %) zeigten alle restlichen zwölf (70,59 %) Probanden in der IpAS-Kohorte eine begleitende Aortenklappeninsuffizienz. In der rpAS-Kohorte wiesen neun Patienten (52,94 %) eine begleitende Insuffizienz der Aortenklappe auf. Beide Gruppen unterschieden sich nicht signifikant was kardiale Risikoscores wie den Framingham Risk Score (FRS) oder peroperative Risikoscores wie EuroScores I und II sowie den STS-Score angeht. Der FRS betrug im Median 33,70 % (IQA: 22,80 – 52,00) bei Patienten mit rpAS, in der IpAS-Kohorte war das Risiko im Median mit 35,90 % (IQA: 17,00 – 61,05) vergleichbar. Mit im Median 8,40 % (IQA: 4,50 – 11,86) fiel der Euroscore von Patienten mit rpAS etwas höher als bei Patienten mit IpAS aus, für welche ein Median von 5,46 % (IQA: 3,49 – 10,87) ermittelt wurde. Etwas höher hingegen war der Median des EuroScores II von Patienten mit IpAS (1,65 %; IQA: 1,19 – 2,33) im Vergleich zu Patienten mit rpAS (1,40 %; IQA: 1,27 – 2,57). Der STS-Score in der schnell voranschreitenden Kohorte belief sich im Median auf 1,38 % (IQA: 0,91 – 2,10), in der langsam voranschreitenden Kohorte auf 1,11 % (IQA: 0,74 – 1,45). Kardiovaskuläre Risikofaktoren und Begleiterkrankungen wie Veranlagung einer bikuspiden Aortenklappe, Nikotinabusus, (grenzwertig) erhöhter Body-Mass-Index (BMI) sowie das Vorhandensein einer arteriellen Hypertonie, einer

Dyslipoproteinämie, eines Diabetes mellitus, einer pulmonalen Hypertonie, eines Vorhofflimmerns oder einer koronaren Herzerkrankung zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kohorten (Tabelle 8). In beiden Kohorten befanden sich Patienten mit einer bikuspiden veranlagten AS. In der rpAS-Kohorte war dies bei drei (17,65 %) Patienten der Fall, in der lpAS-Kohorte bei vier (23,53 %). Eine ausgeglichene Verteilung war für Tabakraucher zu verzeichnen mit jeweils fünf (29,41 %) Patienten. Mehr als die Hälfte aller Patienten litten an einer arteriellen Hypertonie. So waren es zwölf (70,59 %) der schnell voranschreitenden und zehn (58,82 %) der langsam progredienten Kohorte. Eher selten war hingegen ein Diabetes mellitus als Begleiterkrankung zu verzeichnen, so waren es zwei (11,76 %) der schnell progredienten und vier (23,53 %) in der langsam progredienten AS. Etwas mehr Patienten dieser Kohorte litten an einer Dyslipoproteinämie ( $n = 5$  (29,41 %)), was in der rasch progredienten Kohorte bei sieben Patienten (41,18 %) der Fall war. Die Mediane des BMI waren in beiden Gruppen mit 27,04 kg/m<sup>2</sup> (IQA: 25,04 – 31,64) bei Patienten mit rpAS und 27,51 kg/m<sup>2</sup> (IQA: 22,27 – 29,91) in der anderen Kohorte leicht erhöht. Als häufigste Komorbidität war eine koronare Herzerkrankung mit acht Fällen (47,06 %) in der rpAS-Kohorte und neun (52,94 %) Betroffenen der lpAS Patienten zu verzeichnen. Insgesamt waren drei Patienten mit einer Niereninsuffizienz in die Studie eingeschlossen, davon zwei (11,76 %) in der schnell progredienten Kohorte und ein (5,88 %) Fall in der langsam progredienten Kohorte. An Vorhofflimmern litt jeweils ein (5,88 %) Patient beider Kohorten. Kein Patient mit lpAS war an einer pulmonalen Hypertonie erkrankt (0 %), in der rpAS-Kohorte war dies bei drei (17,65 %) Probanden der Fall.

Die erhobenen Laborwerte bei Aufnahme wiesen zwischen den beiden Kohorten keine Unterschiede auf (Tabelle 8). Die Leukozytenzahlen lagen im Median bei 7160 pro  $\mu\text{l}$  (IAQ: 5820,0 – 9930,0, rpAS), bzw. 6534,0 pro  $\mu\text{l}$  (IAQ: 682,5 – 7832,4, lpAS), die Thrombozyten bei 215,0 x 1000 pro  $\mu\text{l}$  (IAQ: 152,0 – 268,0, rpAS) und 240,5 x 1000 pro  $\mu\text{l}$  (IAQ: 212,7 – 264,5, lpAS). Das CRP betrug in der rasch progredienten Kohorte 0,27 mg/dl (IAQ: 0,06 – 0,73) und in der langsam progredienten 0,17 mg/dl (IAQ: 0,03 – 0,28). Im Median ähnlich

präsentierte sich der HbA1c mit 5,80 % (IQA: 5,55 – 14,45) bei Patienten mit rpAS und 5,50 % (IQA: 5,15 – 18,50) in der lpAS Gruppierung. Der Cholesterinwert der schnell voranschreitenden Kohorte lag im Median bei 197,00 mg/dl (IQA: 153,75 - 242,25) und bei 177,00 mg/dl (IQA: 163,00 – 243,50) in der Anderen. Das High Density Lipoprotein betrug im Median 78,00 mg/dl (IQA: 47,75 – 101,75) bei Patienten mit rpAS, bei Patienten mit lpAS hingegen 51,00 mg/dl (IQA: 44,00 – 67,50). Für das Low Density Lipoprotein war ein Median von 103 mg/dl (IQA: 71,50 - 142,00) bei rpAS-Patienten und 131,50 mg/dl (IQA: 91,20 – 159,40) bei Probanden mit lpAS zu verzeichnen. Die Mediane der Triacylglyceride beliefen sich auf 80 mg/dl (IQA: 62,75 – 98,00) für schnell progrediente und 185,50 mg/dl (IQA: 159,00 – 201,00) für langsam voranschreitende AS. Die Mediane der Kreatininkonzentrationen im Serum waren in beiden Kohorten ähnlich (rpAS: 0,70 mg/dl (IQA: 0,65 – 0,95); lpAS: 0,75 mg/dl (IQA: 0,63 – 0,80)). Dasselbe galt für die Harnstoffkonzentrationen im Serum (rpAS: 32,00 mg/dl (IQA: 27,50 – 35,00); lpAS: 34,00 mg/dl (IQA: 27,25 – 44,75)). Ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen rpAS und lpAS zeigte die Glomeruläre Filtrationsrate (MDRD), die im Median bei 81,40 ml/min/1,73m<sup>2</sup> (IQA: 70,70 – 105,45) in der schnell progredienten und bei 95,85 ml/min/1,73m<sup>2</sup> (IQA: 74,63 – 102,93) in der rpAS-Kohorte lag. Die Creatinkinase betrug im Median 81,00 U/l (IQA: 58,50 – 156,50) bei rpAS-Patienten und 76,00 U/l (IQA: 51,25 – 111,00) bei Probanden mit lpAS.

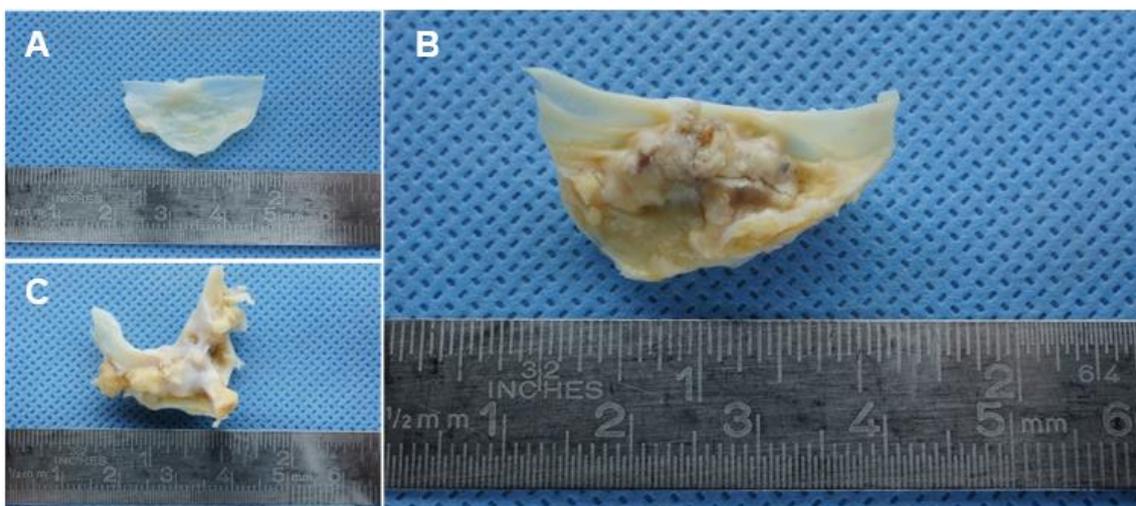
Weder bei der Medikation bei Aufnahme, noch bei der Medikation bei Entlassung bestanden signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kohorten. Die absoluten und relativen Häufigkeiten einzelner Medikamente sind Tabelle 8 zu entnehmen. Sowohl bei Aufnahme als auch bei Entlassung wurde als häufigstes Medikament Acetylsalicylsäure eingenommen. Bei Aufnahme war dies bei 12 Patienten (70,59 %) der rasch progredienten und bei 8 (47,06 %) der langsam voranschreitenden Kohorte der Fall. Bei Entlassung war dieses Medikament in beiden Kohorten zu 94,12 % (n = 16) verschrieben. In beiden Kohorten fällt ansonsten, abgesehen von Acetylsalicylsäure, eine geringe Anzahl thrombozytenaggregationshemmender oder antikoagulatorischer

Medikamente auf, die auch bei Entlassung einen geringen Anteil der Medikationen ausmachte. Die Hälfte (52,94 %, n = 9) der Patienten mit lpAS nahm bereits präoperativ ein Statin ein, in der lpAS-Kohorte waren es sieben (41,18%). Während des stationären Aufenthalts am Universitätsklinikum Tübingen wurden zwei weiteren Probanden pro Kohorte Statine verschrieben, sodass bei Entlassung elf Patienten (64,71 %) mit rpAS und 12 (70,59 %) der langsam progredienten Patientengruppe Statine einnahmen. Im Allgemeinen fallen vor allem blutdrucksenkende Substanzen und Medikamente der Herzinsuffizienztherapie wie Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer, Sartane, Betablocker, Calciumantagonisten und Diuretika in der Medikation auf, die sich nicht signifikant zwischen den Kohorten rpAS und lpAS unterscheiden (Tabelle 8). Postoperativ fällt vor allem eine Intensivierung der Antihypertensiva als auch eine Zunahme der Betablocker- und Diuretikatherapien auf.

Im Rahmen eines FollowUps nach 30 Tagen verstarb ein Patient (5,88 %) in der rpAS-Kohorte nachdem er rehospitalisiert werden musste. Zwei Patienten (11,76 %) der lpAS-Kohorte mussten am Herzen reoperiert werden. Ansonsten trat kein MACE wie Restenose, Reoperation, Myokardinfarkt, Schlaganfall und Rehospitalisierung auf. Ein Jahr nach OP musste ein weiterer Proband der rpAS-Kohorte rehospitalisiert und reoperiert werden. Bezogen auf die Ausgangspopulation entspricht das zwei (11,76 %) Rehospitalisierungen und einer (5,88 %) Reoperation in der rpAS-Kohorte nach einem Jahr. Dieser Patient musste ebenfalls rehospitalisiert werden, weshalb es sich um ein weiteres kombiniertes MACE handelte. Bezogen auf die Ausgangspopulation entspricht das zwei (11,76 %) kombinierten MACE nach einem Jahr in der rpAS-Kohorte. In der langsam progredienten Kohorte mussten nach einem Jahr insgesamt vier (23,54 %) Probanden rehospitalisiert werden, einer von ihnen (5,88 %) verstarb. Nach einem Jahr trat in der lpAS-Kohorte ein (5,88 %) kombiniertes MACE auf. Es bestand kein signifikanter Unterschied bzgl. MACE zwischen den beiden Kohorten rpAS und lpAS.

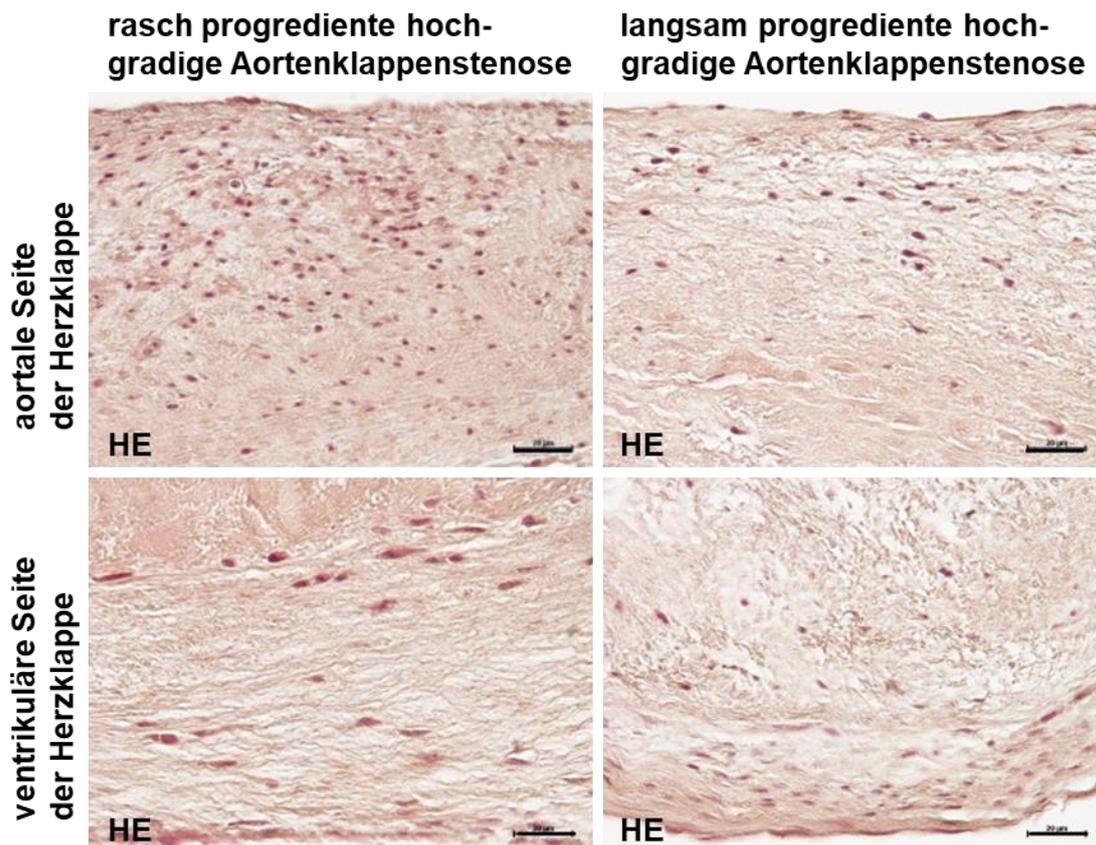
### 3.1.2 Valvuläre Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner von Patienten mit rasch und langsam progredienter Aortenklappenstenose

Es wurden von insgesamt N = 25 Patienten (immun-)histochemische Färbungen aus chirurgisch exzidierten Aortenklappen angefertigt, davon bei n = 13 Patienten (52 %) mit rpAS und n = 12 Patienten (48 %) mit lpAS. Bereits makroskopisch zeigen explantierte degenerativ und inflammatorisch veränderte Aortenklappen unterschiedliche Morphologien, die in Abbildung 6 dargestellt werden.



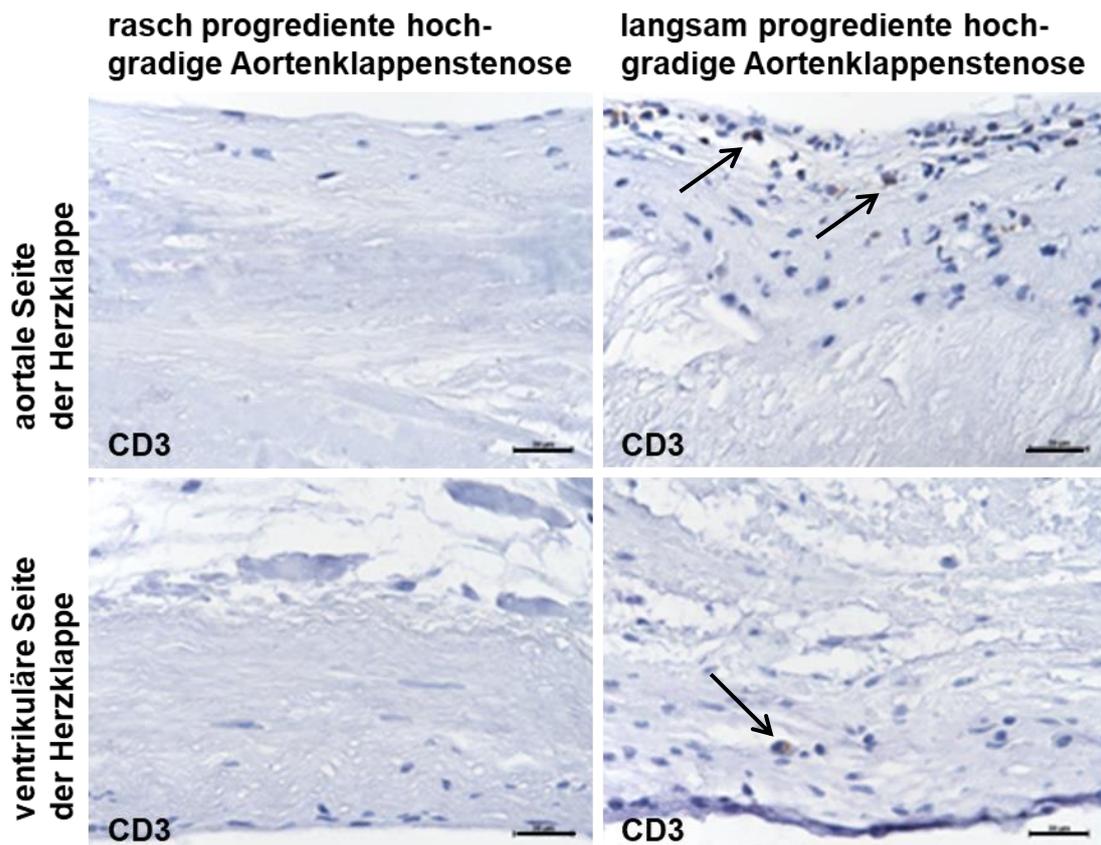
**Abbildung 6: Makroskopische Unterschiede von inflammatorisch und degenerativ veränderten Aortenklappen.** Es zeigen sich deutliche Unterschiede der explantierten Taschen. Abbildung A zeigt eine inflammatorisch veränderte Aortenklappe eines Patienten mit Endokarditis, mit nur geringer, makroskopisch sichtbarer Verkalkung der explantierten Herzklappe. In Abbildung B ist eine fortschreitende Kalzifikation der Aortenklappe, insbesondere an den Rändern, eines Patienten mit langsam progredienter Aortenklappenstenose zu sehen. Abbildung C stellt eine überregionale Kalzifikation der gesamten Tasche eines Patienten mit rasch progredienter Aortenklappenstenose dar.

In Abbildung 6 ist ersichtlich, dass kalzifizierte Aortenklappen strukturell deutlich verändert sind und bereits makroskopisch betrachtet deutliche Unterschiede aufweisen. Exzidierte Aortenklappen von Patienten mit hochgradiger AS wurden (immun-) histochemisch gefärbt und ausgewertet. Für jede Herzklappe wurde eine Hämalaun-Eosin-Übersichtsfärbung zur Anfärbung zellkernhaltiger Strukturen und des Zytoplasmas durchgeführt. Repräsentative Abbildungen sind in Abbildung 7 dargestellt.



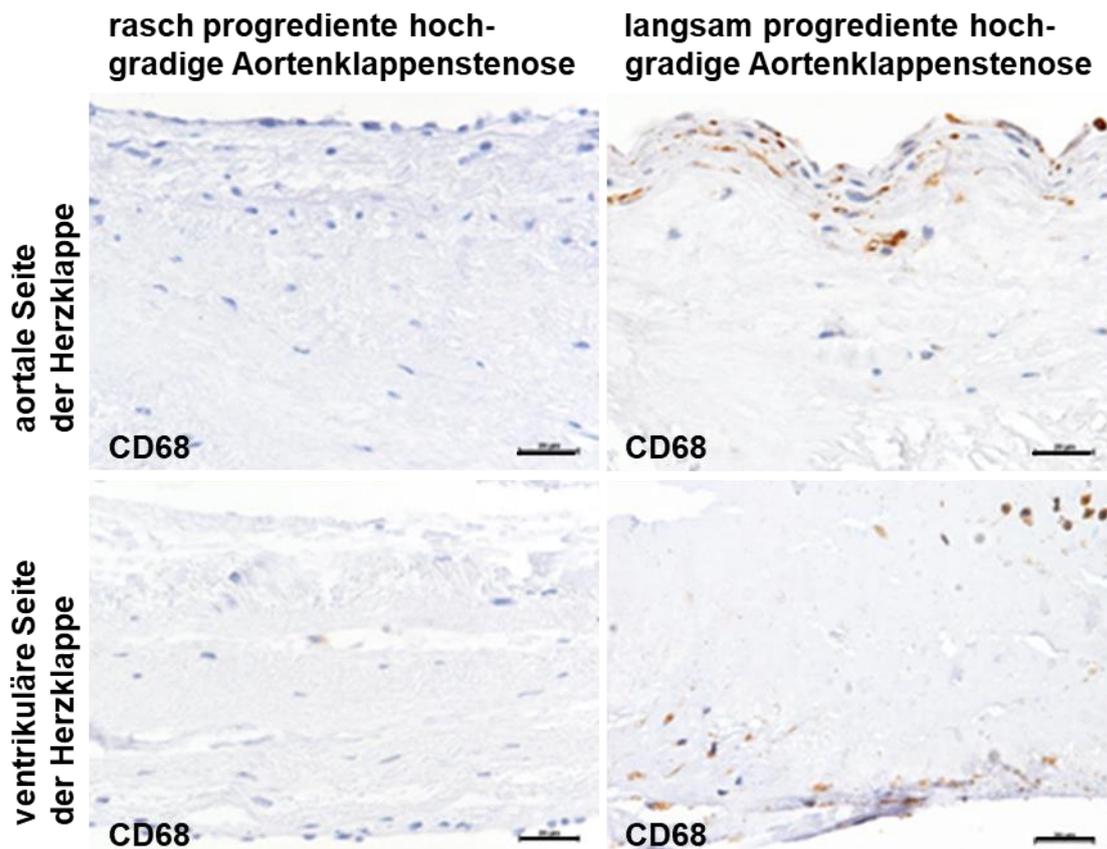
**Abbildung 7: Hämalaun-Eosin-Übersichtsfärbungen explantierter rasch und langsam progredienter Aortenklappenstenosen zeigen regional heterogene Verteilungsmuster zellkernhaltiger Zellen.** Die Abbildung zeigt regionale Unterschiede der aortalen und ventrikulären Verteilung zellkernhaltiger Zellen im Gewebe rasch und langsam progredienter Aortenklappenstenosen in der Hämalaun-Eosin-Färbung (HE). Referenzbalken entspricht 20 µm (40-fache Vergrößerung).

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bzgl. der Anzahl zellkernhaltiger Zellen im Aortenklappengewebe zwischen den Kohorten rpAS und lpAS. Die Gesamtzellzahl lag im Median bei 81,58 positiven Zellen (IQA: 62,31 – 148,46) in Patienten mit rpAS und 108,79 positiven Zellen (IQA: 85,12 – 154,57) in der lpAS-Kohorte. Auch wenn sich mikroskopisch regional heterogene Verteilungsmuster vermuten lassen, zeigen sich im explantierten Aortenklappengewebe statistisch keine signifikanten Unterschiede zwischen der aortalen und der ventrikulären Anzahl zellkernhaltiger Zellen. Eine Anfärbungen inflammatorischer, CD3-positiver Zellen im Aortenklappengewebe konnte ebenfalls regional keine signifikant unterschiedlichen Verteilungsmuster darlegen, wie in Abbildung 8 dargestellt.



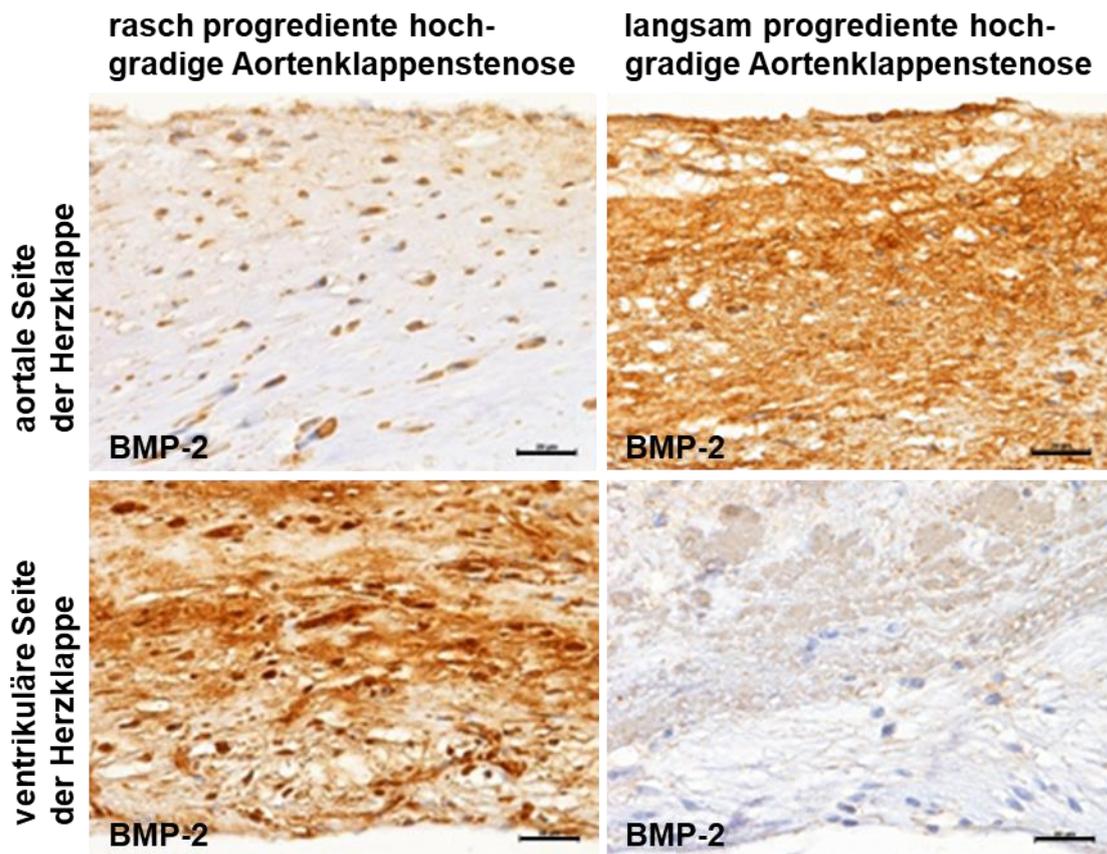
**Abbildung 8: Immunhistochemisch zeigen sich geringe Anfärbungen Cluster of Differentiation 3-positiver Zellen in explantierten rasch und langsam progredienten Aortenklappenstenosen.** Die Abbildung zeigt die geringe Expression von Cluster of Differentiation 3 (CD3) in explantierten rasch und langsam progredienten Aortenklappenstenosen. Referenzbalken entspricht 20 µm (40-fache Vergrößerung).

Abbildung 8 zeigt, dass inflammatorische Zellen im Herzklappengewebe – wenn auch nur in geringer Anzahl – vor allem an den aortalen und ventrikulären Rändern der Aortenklappe vorkommen. Die Gesamtzellzahlen CD3 positiver Zellen lagen im Median bei 2,83 (IQA: 0,75 – 6,59) in der rpAS-Kohorte und bei 4,84 (IQA: 1,17 – 10,83) bei Patienten mit lpAS. Aortal waren im Median 1,50 CD3-positive Zellen (IQA: 0,25 – 4,00), ventrikulär 1,17 positive Zellen (IQA: 0 – 4,58) im Gewebe von Patienten mit rpAS zu verzeichnen. In der lpAS-Kohorte lag der Median bei 3,00 CD3-positiven Zellen (IQA: 1,5 – 18,67) aortal und 2,67 (IQA: 0,50 -10,34) ventrikulär. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der CD-3-Expressionen zwischen Patienten mit rpAS und lpAS (Power = 8 %). Vor allem an den Seitenrändern der Aortenklappe präsentieren sich CD68 positive Zellen, wie in Abbildung 9 zusammengestellt. Die mikroskopisch in lpAS



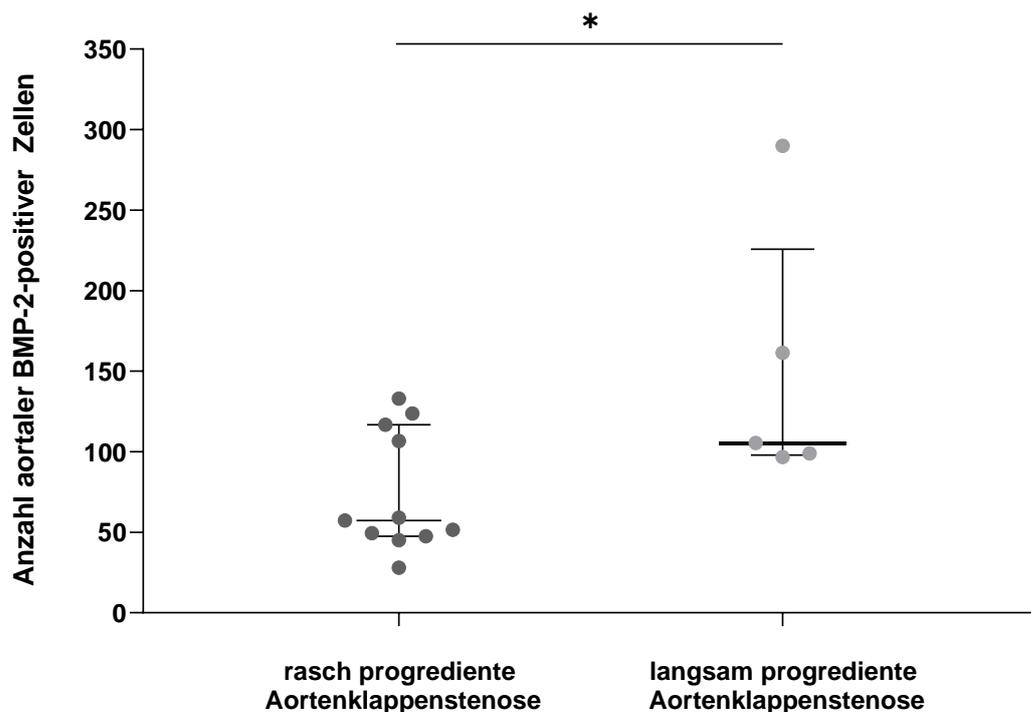
**Abbildung 9: Immunhistochemisch zeigen sich geringe Anfärbungen Cluster of Differentiation 68-positiver Zellen in explantierten rasch und langsam progredienten Aortenklappenstenosen.** Die Abbildung zeigt die unterschiedlichen Expressionen von Cluster of Differentiation 68 (CD68) im Herzklappengewebe rasch und langsam progredienter Aortenklappenstenosen. Referenzbalken entspricht 20  $\mu$ m (40-fache Vergrößerung).

verstärkt wirkenden Expressionen von CD68 im Vergleich zu rpAS zeigten sich statistisch nicht signifikant. Es wurden aortal im Median sieben CD68-positive Zellen (IQA: 4 – 10,17) in Patienten mit rpAS und 9,17 (IQA: 2,67 – 25,42) in Patienten mit lpAS nachgewiesen. Ventrikulär waren die Verteilungen mit 6,67 CD68-positiven Zellen (IQA: 1,17 – 14,00) in der rpAS-Kohorte und 8,34 (IQA: 4,5 – 32,17) im Gewebe von Patienten mit lpAS vergleichbar. Für die Gesamtheit der Herzklappe wurden im Median sechs CD68-positive Zellen (IQA: 3,00 – 16,67) in der rasch progredienten und 4,17 (IQA: 1,09 – 18,25) in der langsam progredienten Kohorte gezählt. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede (Power = 7,5 %). Im Gegensatz zu den im Verhältnis geringen Anfärbungen von CD3 und CD68 zeigten sich verstärkte Anfärbungen von BMP-2 (Abbildung 10).



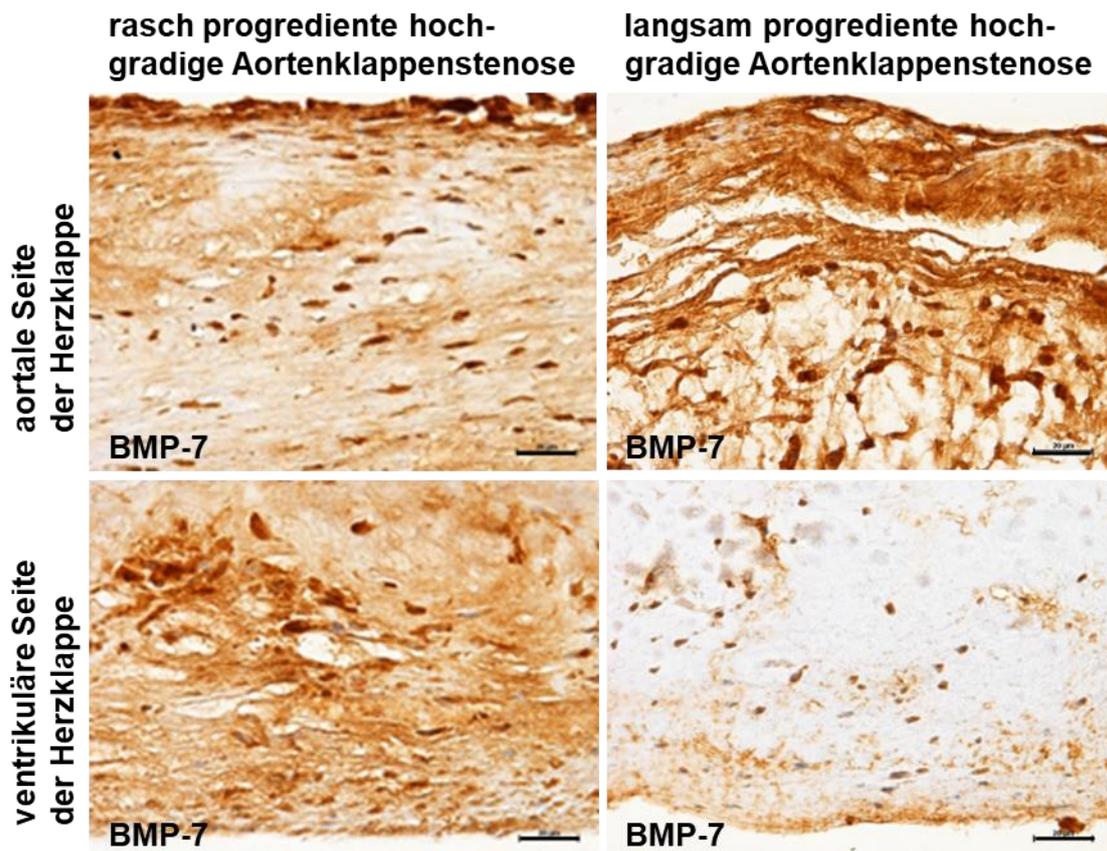
**Abbildung 10: Mikroskopisch zeigen sich regional signifikante Unterschiede der Expressionen von Bone Morphogenetic Protein 2 in explantierten rasch und langsam progredienten Aortenklappenstenosen.** Die Abbildung zeigt eine deutliche Anfärbung von Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) im Gewebe explantierter hochgradig stenosierter Aortenklappen. Es sind regional deutliche Unterschiede der Anfärbungen zu sehen. Referenzbalken entspricht 20 µm (40-fache Vergrößerung).

Abbildung 10 präsentiert eine deutliche Anfärbung von BMP-2 im stenosierten Herzklappengewebe. Es zeigten sich sowohl BMP-2 positive Zellen als auch eine BMP-2 Hintergrundfärbung, wie auf der aortalen Herzklappenseite von Patienten mit lpAS oder der ventrikulären Seite von Patienten mit rpAS zu verzeichnen ist. Die Hintergrundfärbungen wurden im Rahmen dieser Studie nicht ausgewertet. Des Weiteren fällt auf, dass sich die Anfärbung BMP-2 positiver Zellen nicht nur auf die distalen Ränder der Herzklappe beschränkt, sondern über das Gewebe der kompletten Herzklappe ausdehnt. Die regional unterschiedlichen Expressionen BMP-2 positiver, zellkernhaltiger Zellen zeigen sich statistisch signifikant, wie Abbildung 11 zu entnehmen ist.



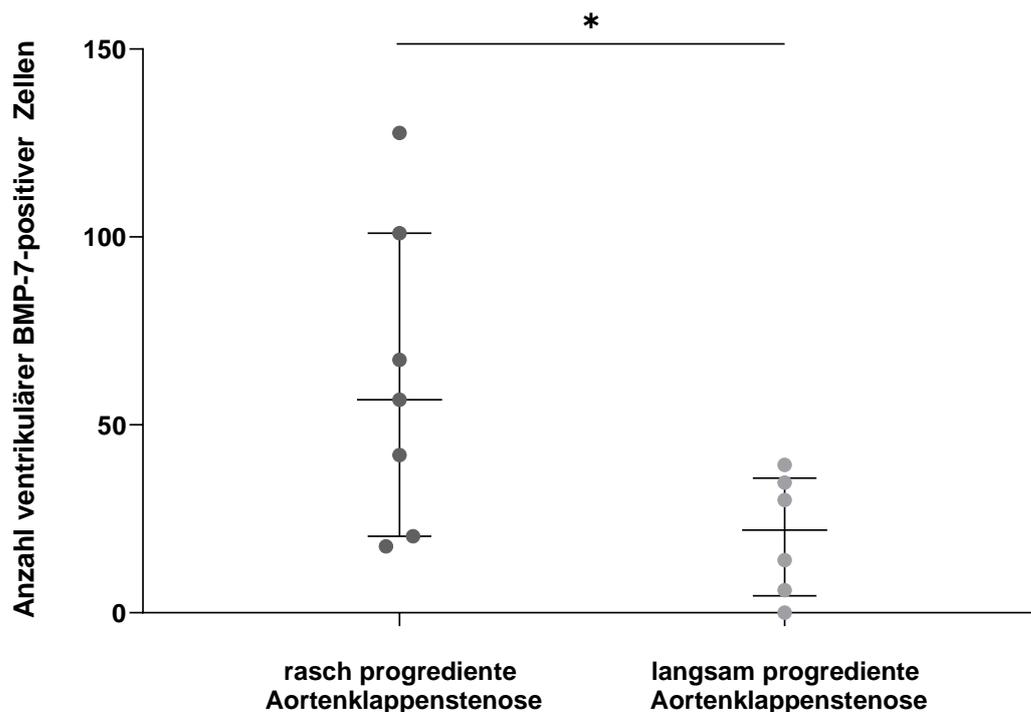
**Abbildung 11: Langsam progrediente Aortenklappenstenosen zeigen im Vergleich zu rasch progredienter Aortenklappenstenosen eine signifikant verstärkte Expressionen von Bone Morphogenetic Protein 2 im aortalseitigen Aortenklappengewebe.** Die Abbildung zeigt Ergebnisse immunhistochemischer Auswertungen. Es ist im aortalseitigen Herzklappengewebe eine signifikant reduzierte Expression von Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) positiven Zellen in rasch progredienten Aortenklappenstenosen im Vergleich zu langsam progredienten Aortenklappenstenosen sichtbar ( $p = 0,021$ ). Abgebildet sind die einzelnen Zählungen sowie der Median und Interquartilsabstände (1. – 3. Quartil).

Es konnte aortalseitig eine signifikant erhöhte Anzahl BMP-2 positiver Zellen in Patienten mit lpAS nachgewiesen werden mit im Median 130,00 BMP-2-positiven Zellen (IQA: 97,84 – 178,00) im Vergleich zur rpAS-Kohorte mit einem Median von 57,33 BMP-2-positiven Zellen (47,50 – 116,67) ( $p = 0,021$ ). Ventrikulärseitig zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Anzahl BMP-2-positiver Zellen zwischen den untersuchten Kohorten (rpAS: 77,50 (IQA: 55,33 – 135,00) / lpAS: 83,17 (33,67- 93,00)). Die Gesamtanzahl im Herzklappengewebe belief sich auf 67,75 (IQA: 54,65 – 90,69) in der rpAS-Kohorte und auf 92,50 (IQA: 65,79 – 154,58) BMP-2-positive Zellen in Patienten mit lpAS. Neben BMP-2 sind auch deutliche Anfärbungen von BMP-7 im Herzklappengewebe zu verzeichnen, das ebenfalls eine deutliche Hintergrundfärbung aufweist, wie Abbildung 12 zu entnehmen ist. Abbildung 12



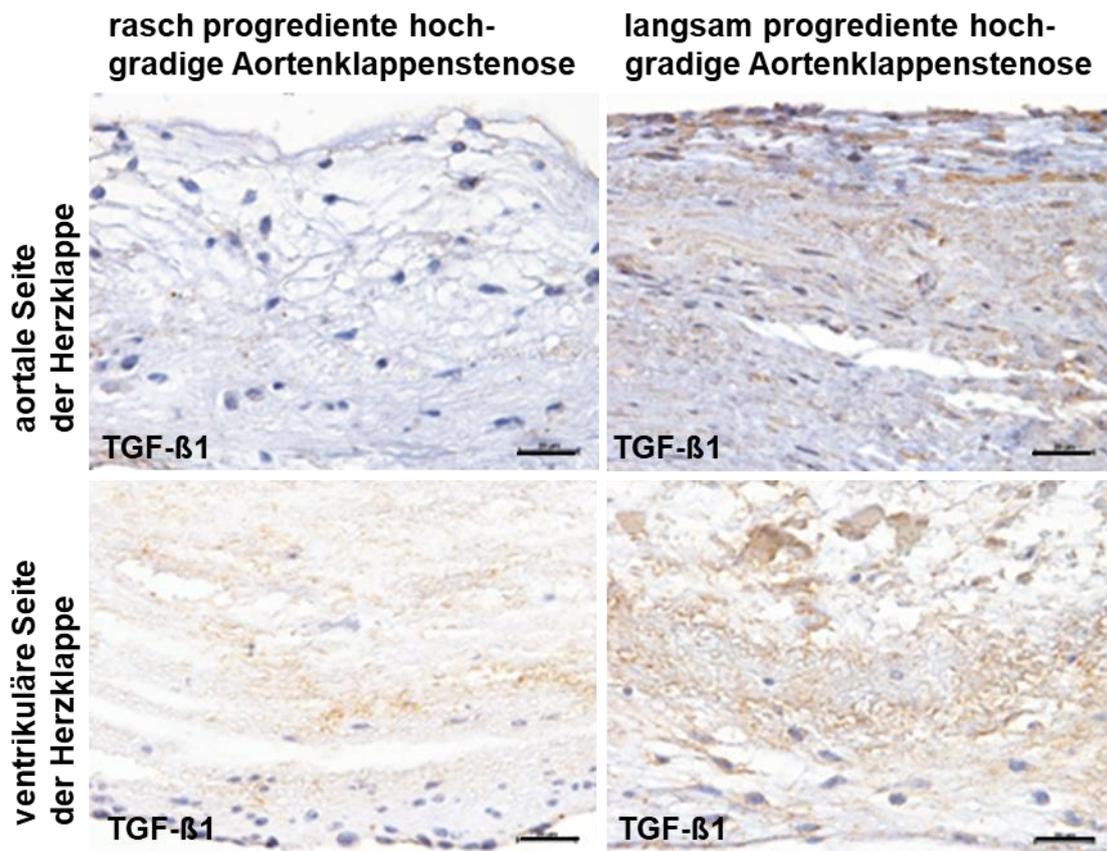
**Abbildung 12: Mikroskopisch zeigen sich regional signifikante Unterschiede der Expressionen von Bone Morphogenetic Protein 7 in explantierten rasch und langsam progredienten Aortenklappenstenosen.** Die Abbildung zeigt eine deutliche Anfärbung von Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP-7) im Gewebe explantierter hochgradig stenosierter Aortenklappen. Es sind regional, vor allem ventrikulär, deutliche Unterschiede der Anfärbungen zu sehen. Referenzbalken entspricht 20 µm (40-fache Vergrößerung).

charakterisiert repräsentativ die Anfärbungen von BMP-7 im Herzgewebe und zeigt ein deutliches Vorkommen von BMP-7 im Gewebe kalzifizierter und stenosierter Herzklappen. Es fallen nicht nur deutliche Anfärbungen an den Klappenrändern, sondern im Bereich der gesamten Herzklappe auf. Die aortalen und ventrikulären Expressionen von BMP-7 imponieren zunächst unterschiedlich, es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den aortalen und ventrikulären Expressionen von BMP-7 aufgezeigt werden. Statistisch signifikante Unterschiede sind jedoch zwischen den ventrikulären Expressionen von BMP-7 in lpAS und rpAS zu verzeichnen, wie Abbildung 13 genauer darlegt. Abbildung 13 zeigt die ventrikulärseitig signifikant erhöhte Expression von BMP-7-positiven Zellen im Gewebe von Patienten mit rpAS



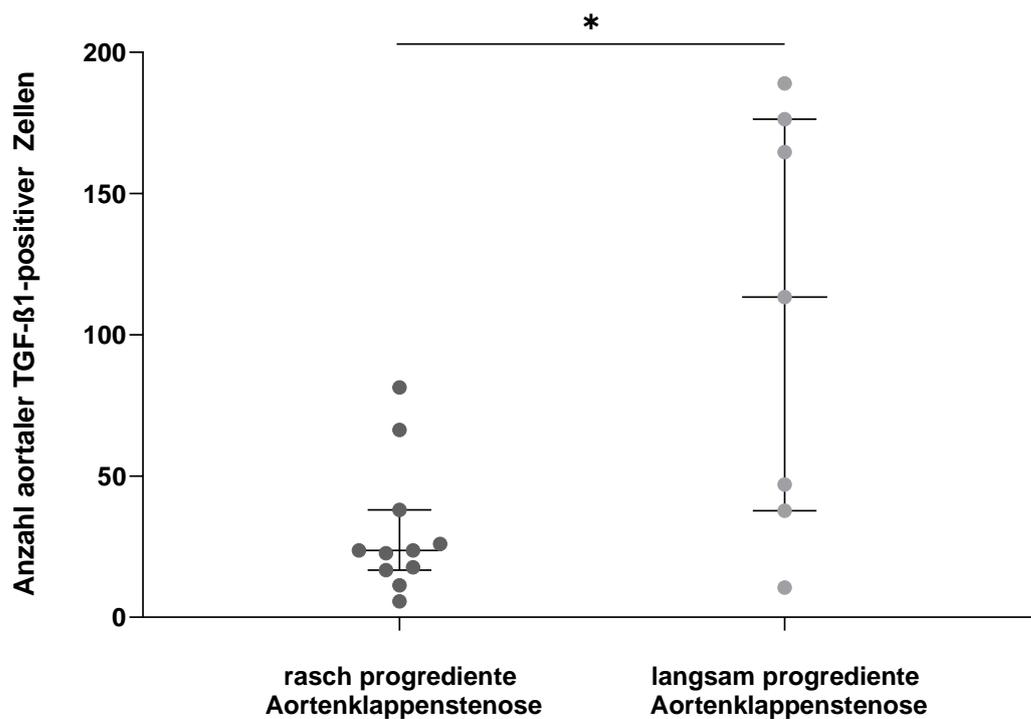
**Abbildung 13: Rasch progrediente Aortenklappenstenosen zeigen im Vergleich zu langsam progredienten Aortenklappenstenosen eine signifikant verstärkte Expression von Bone Morphogenetic Protein 7 im ventrikulärseitigen Aortenklappengewebe.** Die Abbildung zeigt Ergebnisse immunhistochemischer Auswertungen. Es ist ventrikulär eine signifikant vermehrte Expression von Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP-7) positiven Zellen in rasch progredienten Aortenklappenstenosen (AS) im Vergleich zu langsam progredienten AS erkennbar ( $p = 0,042$ ). Abgebildet sind die einzelnen Zählungen sowie der Median und Interquartilsabstände (1. – 3. Quartil).

im Vergleich zu lpAS ( $p = 0,042$ ). In der rpAS-Kohorte waren im Median 61,00 BMP-7-positive Zellen (IQA: 31,17 – 101,00), in der lpAS-Kohorte 23,00 (IQA: 16,50 – 37,00) zu verzeichnen. Es zeigen sich weder signifikante Unterschiede der aortalen, noch der gesamten Expressionen von BMP-7 für die beiden Kohorten. Der Median der BMP-7-positiven Zellen in der gesamten Herzklappe lag bei 48,17 (IQA; 13,67 – 61,96) in der rpAS-Kohorte und bei 47,83 (IQA: 20,63 – 67,17) in Patienten mit lpAS. Aortal präsentierte sich der Median mit 28,67 BMP-7-positiven Zellen (IQA: 8,00 – 38,67) in Patienten mit rpAS und 71,33 (IQA: 6,50 – 107,08) in lpAS. Ebenfalls nicht signifikant unterschieden sich die aortalen und ventrikulären Expressionen von BMP-7 in den Kohorten rpAS und lpAS. Neben BMP-7 gelangen auch immunhistochemische Anfärbungen von TGF- $\beta$ 1 im Aortenklappengewebe, wie Abbildung 14 zeigt.



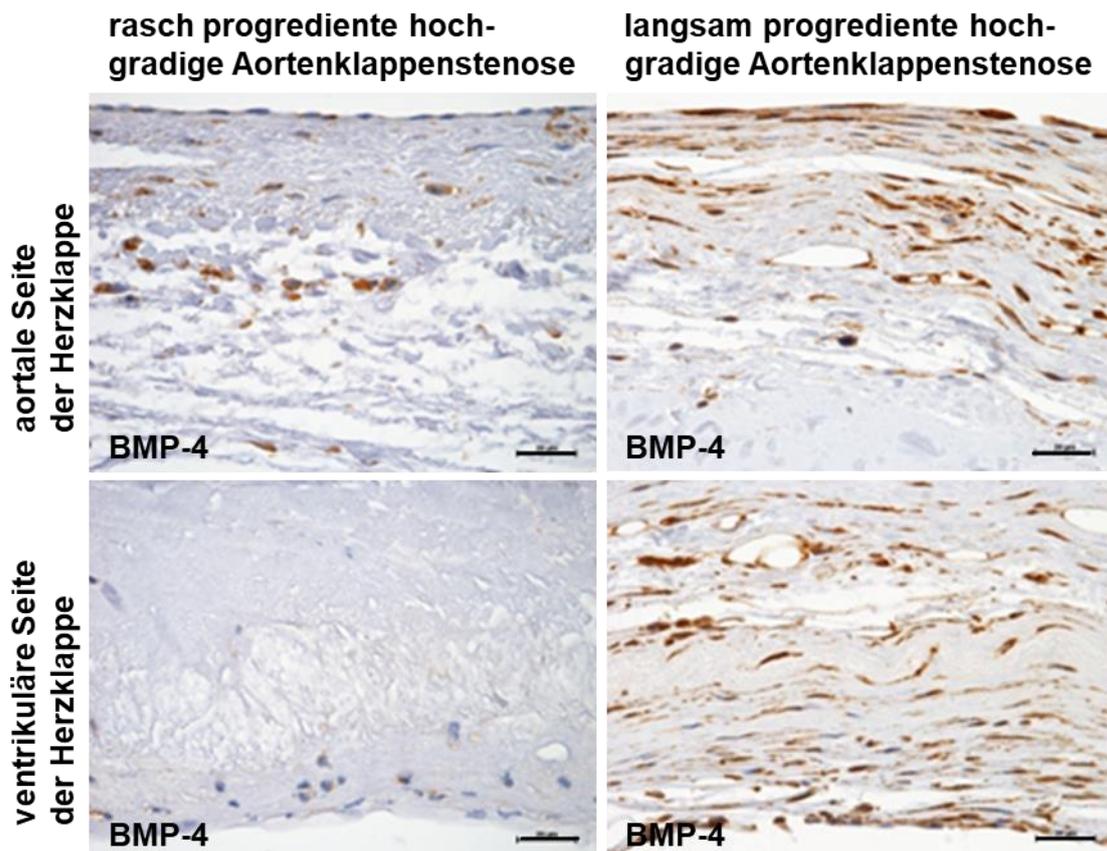
**Abbildung 14: Mikroskopisch zeigen sich regional signifikante Unterschiede der Expressionen von Transforming Growth Factor Beta 1 in explantierten rasch und langsam progredienten Aortenklappenstenosen.** Die Abbildung zeigt eine deutliche Anfärbung von Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF- $\beta$ 1) im Gewebe explantierter, hochgradig stenosierter Aortenklappen. Es sind regional, vor allem aortal, deutliche Unterschiede der Anfärbungen zu sehen. Referenzbalken entspricht 20  $\mu$ m (40-fache Vergrößerung).

Es besteht sowohl eine zelluläre Anfärbung von TGF- $\beta$ 1 als auch Hintergrundfärbungen von TGF- $\beta$ 1 im stenosierten Aortenklappengewebe. Es zeigte sich eine aortal signifikant erhöhte Expression von TGF- $\beta$ 1-positiven Zellen in Patienten mit lpAS im Vergleich zu Patienten mit rpAS, wie Abbildung 15 genauer darlegt. Die Gesamtanzahl der TGF- $\beta$ 1-positiven Zellen lag im Median bei 31,67 (IQA: 24,34 – 37,34) in der rasch progredienten sowie 90,00 (IQA: 30,34 – 133,50) in der langsameren Kohorte und unterschieden sich nicht signifikant. Ebenfalls wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den aortalen und ventrikulären Anfärbungen von TGF- $\beta$ 1 festgestellt. Die ventrikulären Expressionen von TGF- $\beta$ 1 von Patienten mit lpAS und rpAS zeigen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.



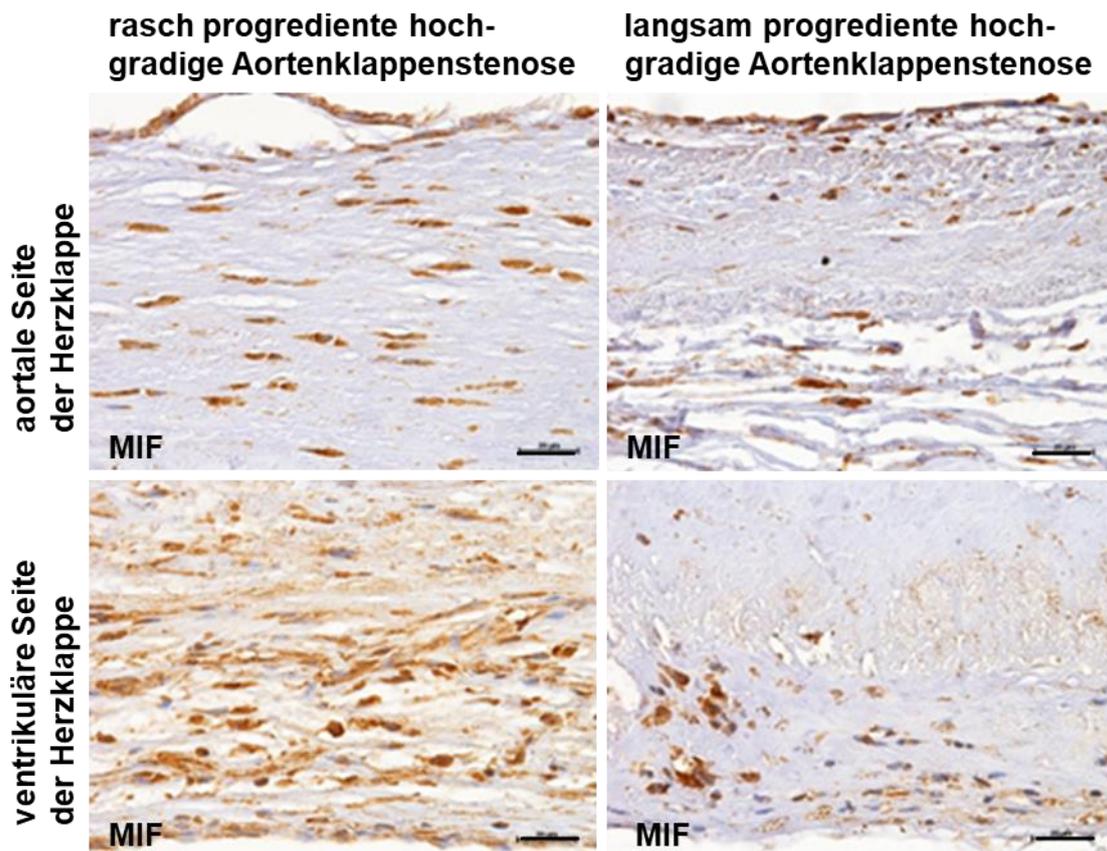
**Abbildung 15: Langsam progrediente Aortenklappenstenosen zeigen im Vergleich zu rasch progredienten Aortenklappenstenosen eine signifikant verstärkte Expression von Transforming Growth Factor Beta 1 im aortalseitigen Aortenklappengewebe.** Die Abbildung zeigt Ergebnisse immunhistochemischer Auswertungen. Es ist aortal eine vermehrte Expression von Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF- $\beta$ 1) im Gewebe von Patienten mit langsam progredienter Aortenklappenstenose (AS) im Vergleich zu Patienten mit rasch progredienter AS erkennbar ( $p = 0,035$ ). Abgebildet sind die einzelnen Zählungen sowie der Median und Interquartilsabstände (1. – 3. Quartil).

In Patienten mit rpAS traten ventrikulär im Median 61,00 TGF- $\beta$ 1-positive Zellen (IQA: 31,17 – 101,00) auf, in der langsam progredienten 23,00 (IQA: 16,50 – 37,00). Abbildung 15 zeigt die signifikanten Unterschiede der aortalen Expressionen von TGF- $\beta$ 1-positiven Zellen zwischen lpAS und rpAS. Die aortale Expression von TGF- $\beta$ 1 lag im Median bei 23,67 (IQA: 16,67 – 38,00) in Patienten mit rpAS und bei 113,33 (IQA: 36,84 – 170,50) in Patienten mit lpAS ( $p = 0,035$ ). Folglich zeigten sich aortal signifikant vermehrte Anfärbungen TGF- $\beta$ 1-positiver Zellen in Patienten mit lpAS im Vergleich zu Probanden mit rpAS. Es konnten keine signifikanten Unterschiede der regionalen und gesamten Expressionen von BMP-4-, MIF- und Gremlin-1-positiven Zellen verzeichnet werden. Abbildung 16 zeigt repräsentativ die immunhistochemischen Anfärbungen von BMP-4 in explantierten Aortenklappen.



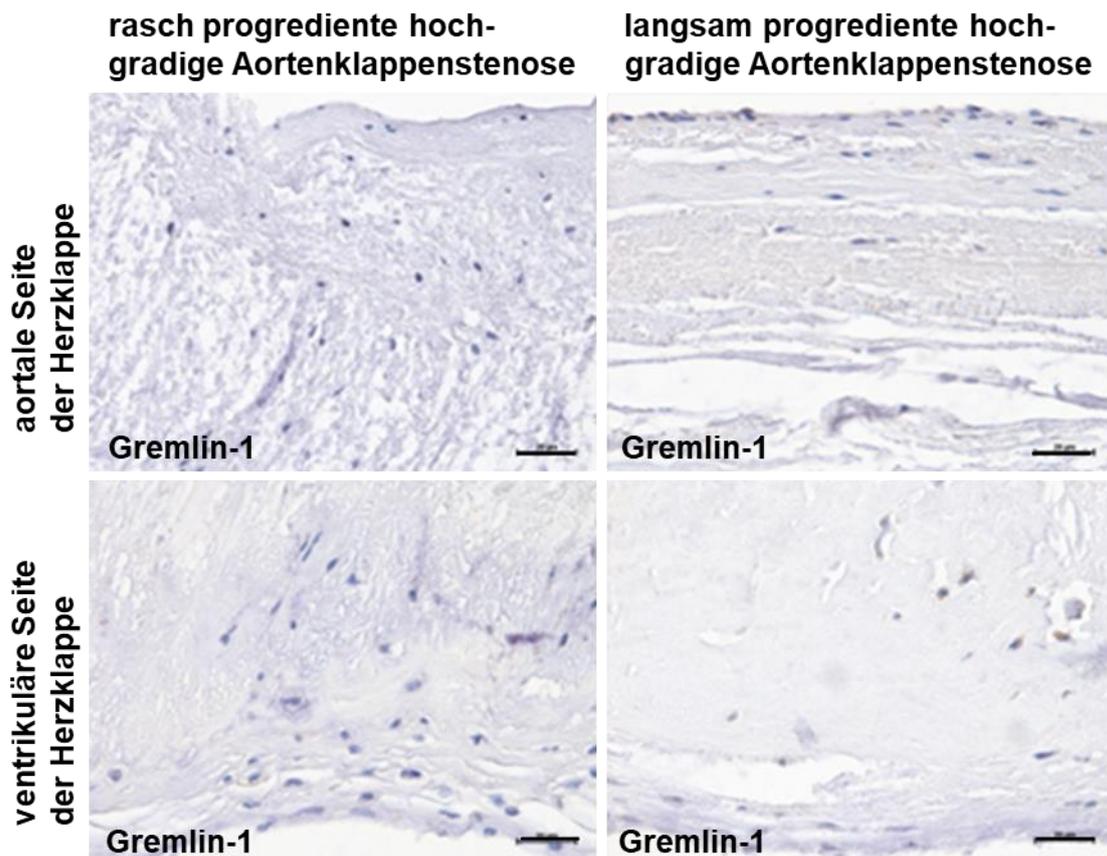
**Abbildung 16: Mikroskopisch zeigt sich eine deutliche Anfärbung von Bone Morphogenetic Protein 4 in explantierten rasch und langsam progredienten Aortenklappenstenosen.** Die Abbildung zeigt deutliche Anfärbungen von Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP-4) im Gewebe explantierter hochgradig stenosierter Aortenklappen. Referenzbalken entspricht 20 µm (40-fache Vergrößerung).

Es fällt ein ubiquitäres Vorkommen von BMP-4 im Gewebe von Patienten mit IpAS auf. Im Vergleich zu BMP-2 und BMP-7 ist eine weniger starke Hintergrundfärbung, sondern vor allem eine Anfärbung von Zellen bemerkbar. Im Gewebe von Patienten mit rpAS sind die Expressionen vor allem an den Klappenrändern zu verzeichnen. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede der aortalen bzw. ventrikulären Expressionen zwischen den Kohorten rpAS und IpAS. Auch unterschied sich die Gesamtanzahl BMP-4-positiver Zellen nicht zwischen den beiden Kohorten (rpAS / IpAS: 40,50 (IQA: 32,58 – 64,67) / 87,33(28,84 – 160,00) (Power = 28,5 %). Aortal lag die Expression von BMP-4 im Median bei 39,84 positiven Zellen (IQA: 27,00 – 84,25) in rpAS und bei 105,17 (IQA: 57,5 – 165,58) in IpAS. Abbildung 17 zeigt immunhistochemische Färbungen von MIF-positiven Zellen im Herzgewebe.



**Abbildung 17: Mikroskopische Präsentation der Expression von Macrophage Migration Inhibitory Factor in explantierten rasch und langsam progredienten Aortenklappenstenosen.** Die Abbildung zeigt deutliche Anfärbungen von Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) im Gewebe explantierter hochgradig stenosierter Aortenklappen. Referenzbalken entspricht 20 µm (40-fache Vergrößerung).

Es fallen ubiquitäre Anfärbungen von MIF im Gewebe auf. Insbesondere bei Patienten mit rpAS scheint sich ventrikulärseitig eine verstärkte Anfärbung im Vergleich zu aortalseitig zu präsentieren. Statistisch konnte jedoch kein signifikanter Unterschied dargelegt werden. Weder die regionalen noch die Gesamtexpressionen von MIF unterschieden sich zwischen Patienten mit rpAS und lpAS (Power 5,6 %). So waren aortalseitig im Median 42,67 MIF-positive Zellen (IQA: 27,34 – 90,83) und ventrikulärseitig 78,00 (IQA: 58,00 – 161,00) in rpAS sowie in lpAS aortal 68,00 (IQA: 54,50 -128,67) und ventrikulär 51,33 (IQA: 43,67 – 84,33) MIF-positive Zellen festzustellen. Die Gesamtanzahl MIF-positiver Zellen lag in der rpAS-Kohorte bei 47,50 (IQA: 25,50 – 94,08) und in Patienten mit lpAS bei 59,33 (IQA: 33,67 – 76,67) Abbildung 18 repräsentiert die Anfärbungen von Gremlin-1-positiven Zellen.



**Abbildung 18: Mikroskopische Präsentation der Expression von Gremlin-1 in explantierten rasch und langsam progredienten Aortenklappenstenosen.** Die Abbildung zeigt die geringe Expression von Gremlin-1 in explantierten rasch und langsam progredienten Aortenklappenstenosen. Referenzbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$  (40-fache Vergrößerung).

Die Abbildung zeigt eine im Verhältnis zu den BMPs geringe Anfärbung von Gremlin-1 im Herzklappengewebe. Sehr eindrücklich sind die vor allem an den Rändern der Herzklappe vorkommenden Expressionen von Gremlin-1. Wenn auch nur in geringem Ausmaß, legt Abbildung 18 dar, dass vereinzelt Gremlin-1-positive Zellen im Herzklappengewebe von Patienten mit AS vorkommen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede der regionalen als auch der Gesamtexpression von Gremlin-1 zwischen den Kohorten rpAS und lpAS aufgezeigt werden (Power = 28,1 %). Die Gesamtanzahl Gremlin-1 positiver Zellen belief sich im Median auf 4,34 (IQA: 0,08 – 41,34) in der lpAS-Kohorte und 0 (0-1) in Patienten mit rpAS. Der Unterschied präsentierte sich signifikant for trend ( $p = 0,054$ ). Die regionalen Expressionen von Gremlin-1 zeigten sich ebenfalls sehr gering, mit im Median aortal 0 Gremlin-1-positiven Zellen (IQA: 0

- 0,42) in rasch progredienten und 0,17 (IQA: 0 – 13,08) in langsam progredienten AS sowie ventrikulär mit 0 (IQA: 0 - 0,75) in der rpAS-Kohorte und 0,50 Gremlin-1-positiven Zellen (IQA: 0 – 14,08) im Gewebe von Patienten mit lpAS. Aufgrund von methodischen Vorfällen konnten nicht bei allen Patienten die aortalen und ventrikulären Expressionen angegeben werden. Die genauen Anzahlen der ausgewerteten Herzklappen pro Marker und Region sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass im Gewebe explantierter, kalzifizierter und hochgradiger AS eine vergleichsweise hohe Anzahl BMP-2-, BMP-4-, BMP-7-, MIF- und TGF- $\beta$ 1-positiver Zellen und eine geringe Anzahl CD3-, CD68- und Gremlin-1-positiver Zellen zu verzeichnen ist (Tabelle 9). Es konnte gezeigt werden, dass lpAS aortal eine signifikant erhöhte Anzahl BMP-2- und TGF- $\beta$ 1-positiver Zellen im Vergleich zu rpAS aufweisen (Abbildungen 10 ,11, 14 und 15;  $p = 0,021$  bzw.  $p = 0,035$ ). Im Gewebe von Patienten mit rpAS fallen ventrikulär eine gehäufte Anzahl BMP-7-positiver Zellen auf (Abbildungen 12 und 13;  $p = 0,042$ ). Für die anderen untersuchten Marker konnten keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden, wobei hierzu jedoch keine klare Aussage möglich ist, da die Power zu gering ist.

Es konnte im Rahmen immunhistochemischer Färbungen gezeigt werden, dass einige inflammatorische und fibrotischen Marker im Herzklappengewebe von Patienten mit rpAS und lpAS unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen.

**Tabelle 9: Tabellarische Übersicht immunhistochemischer Färbungen valvulärer Zellen des Aortenklappengewebes von Patienten mit rasch und langsam progredienter hochgradiger Aortenklappenstenose.** Angaben gerundet in n (%) oder Median und Interquartilsabstand (1.- 3.Quartil).

Parameter	n (rpAS)	n (lpAS)	Rasch progrediente Aortenklappenstenose (rpAS)	Langsam progrediente Aortenklappenstenose (lpAS)	p-Wert
<b>N = 25</b>	<b>= 13 (52%)</b>	<b>= 12 (48 %)</b>			
<b>Positive Zellen im Aortenklappengewebe</b>					
Gesamtzellzahl	13 (100 %)	12 (100 %)	81,58 (62,31 – 148,46)	108,79 (85,12 – 154,57)	n.s.
CD3	13 (100 %)	12 (100 %)	2,83 (0,75 – 6,59)	4,84 (1,17 – 10,83)	n.s.
CD68	13 (100 %)	12 (100 %)	6,00 (3,00 – 16,67)	4,17 (1,09 – 18,25)	n.s.
BMP-2	13 (100 %)	11 (91,67 %)	67,75 (54,65 – 90,69)	92,50 (65,79 – 154,58)	n.s.
BMP-4	12 (92,31 %)	9 (75,00 %)	40,50 (32,58 – 64,67)	87,33 (28,84 – 160,00)	n.s.
BMP-7	13 (100 %)	11 (91,67 %)	48,17 (13,67 – 61,96)	47,83 (20,63 – 67,17)	n.s.
MIF	12 (92,31 %)	11 (91,67 %)	47,50 (25,50 – 94,08)	59,33 (33,67 – 76,67)	n.s.
Gremlin-1	13 (100 %)	12 (100 %)	0 (0 – 1)	4,34 (0,08 – 41,34)	n.s.
TGF-β1	13 (100 %)	11 (91,67 %)	31,67 (24,34 – 37,34)	90,00 (30,34 – 133,50)	n.s.
<b>Positive Zellen im aortalseitigen Aortenklappengewebe</b>					
Gesamtzellzahl	13 (100 %)	12 (100 %)	63,99 (40,68 – 94,43)	124,76 (84,76 – 143,59)	n.s.
CD3	10 (76,92 %)	5 (41,67 %)	1,50 (0,25 – 4,00)	3,00 (1,5 – 18,67)	n.s.
CD68	9 (69,23 %)	4 (33,33 %)	7,00 (4,00 – 10,17)	9,17 (2,67 – 25,42)	n.s.
BMP-2	11 (84,61 %)	5 (41,67 %)	57,33 (47,50 – 116,67)	134,00 (97,84 – 178,00)	<b>0,021</b>

Parameter	n (rpAS)	n (lpAS)	Rasch progrediente Aortenklappenstenose (rpAS)	Langsam progrediente Aortenklappenstenose (lpAS)	p-Wert
<b>N = 25</b>	<b>= 13 (52%)</b>	<b>= 12 (48 %)</b>			
BMP-4	10 (76,92 %)	6 (50,00 %)	39,84 (27,00 – 84,25)	105,17 (57,5 – 165,58)	n.s.
BMP-7	7 (53,84 %)	6 (50,00 %)	28,67 (8,00 – 38,67)	71,33 (6,50 – 107,08)	n.s.
MIF	9 (69,23 %)	5 (41,67 %)	42,67 (27,34 – 90,83)	68,00 (54,50 – 128,67)	n.s.
Gremlin-1	10 (76,92 %)	6 (50,00 %)	0 (0 – 0,42)	0,17 (0 – 13,08)	n.s.
TGF-β1	11 (84,61 %)	7 (58,33 %)	23,67 (16,67 – 38,00)	113,33 (36,84 – 170,50)	<b>0,035</b>
<b>Positive Zellen im ventrikulärseitigen Aortenklappengewebe</b>					
Gesamtzellzahl	13 (100 %)	12 (100 %)	109,48 (74,26 – 202,48)	92,83 (85,47 – 181,93)	n.s.
CD3	10 (76,92 %)	5 (41,67 %)	1,17 (0 – 4,58)	2,67 (0,50 -10,34)	n.s.
CD68	9 (69,23 %)	4 (33,33 %)	6,67 (1,17 - 14,00)	8,34 (4,5 – 32,17)	n.s.
BMP-2	11 (84,61 %)	6 (50,00 %)	77,50 (55,33 - 135,00)	83,17 (33,67 – 93,00)	n.s.
BMP-4	10 (76,92 %)	6 (50,00 %)	41,17 (22,92 – 104,5)	81,67 (43,50 – 133,99)	n.s.
BMP-7	7 (53,84 %)	6 (50,00 %)	61,00 (31,17 – 101,00)	23,00 (16,50 – 37,00)	<b>0,042</b>
MIF	9 (69,23 %)	5 (41,67 %)	78,00 (58,00 – 161,00)	51,33 (43,67 – 84,33)	n.s.
Gremlin-1	10 (76,92 %)	6 (50,00 %)	0 (0 - 0,75)	0,50 (0 – 14,08)	n.s.
TGF-β1	11 (84,61 %)	7 (58,33 %)	46,67 (20,67 – 63,33)	57,33 (16,33 – 78,00)	n.s.

*BMP* – engl. *Bone Morphogenetic Protein*, dt. Knochenmorphogenetisches Protein; *CD* – engl. *Cluster of Differentiation*, dt. Cluster der Differenzierung; *CXCL14* - CXC - Motiv Chemokinligand 14; *CXCR4*-CXC - Motiv Chemokinrezeptor 4; *CXCR7* - CXC – Motiv Chemokinrezeptor 7; *lpAS* – langsam progrediente Aortenklappenstenose; *MIF*- engl. *Macrophage Migration Inhibitory Factor*, dt. Makrophagen-Migrationsinhibierender Faktor; n.s. – nicht signifikant, *rpAS*- rasch progrediente Aortenklappenstenose, *SDF-1* - engl. *stroma cell- derived factor*, dt. Stromazellfaktor 1, *TGF-β1* – engl. *Transforming Growth Factor β1*, dt. transformierender Wachstumsfaktor β1.

### 3.1.3 Monozytäre und thrombozytäre Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner von Patienten mit rasch und langsam progredienter Aortenklappenstenose

In einer Kohorte von zehn Patienten wurden die Expressionen von BMP-2, BMP-4, BMP-7, Gremlin-1, MIF, CXCL14, SDF-1, CXCR-4, CXCR-7 und TGF-β1 auf der Oberfläche und intrazellulär von CD14- und CD42b-positiven Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Es wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFIs) zwischen Patienten mit rpAS und lpAS verglichen. Da einzelne Proben aufgrund labortechnischer Vorfälle nicht auswertbar waren, besteht eine sehr geringe Fallzahl. In diesem Teil wird die deskriptive Statistik beschrieben. Des Weiteren erfolgte eine Power-Analyse zur Fallzahlkalkulation für weitere Studien.

Im Rahmen von durchflusszytometrischen Analysen konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Marker in jeder untersuchten Kohorte in und auf Monozyten und Thrombozyten nachweisbar sind. Es fielen keine signifikanten Unterschiede der thrombozytären und monozytären intrazellulären und oberflächlichen Expressionen von BMP-2, BMP-7, MIF, Gremlin-1, TGF-β1, SDF-1, CXCR4, CXCR7 und CXCL14 zwischen Patienten mit rpAS und lpAS auf, wie Tabelle 10 darlegt. Trotz der geringen Fallzahl konnte eine signifikant geringe intrazelluläre Expression von BMP-4 in Monozyten in Patienten mit rpAS im Vergleich zu lpAS aufgezeigt werden ( $p = 0,038$ ) (Tabelle 10). Der Median der MFI nicht permeabilisierter CD14/BMP-4-positiver Zellen von 216,00 (IQA: 52,00 – 974,00) in der rpAS-Kohorte bzw. 193,43 (23,35 – 735,00) in der lpAS-Kohorte spricht für eine deutliche Anfärbung von BMP-4. Auch intrazelluläre Anfärbungen von BMP-4 in Monozyten deuten mit einem Median der MFI 177,00 (44,00 -559,00) in Patienten mit rpAS

**Tabelle 10: Tabellarische Übersicht der mittleren Fluoreszenzintensitäten monozytärer und thrombozytärer durchflusszytometrischer Färbungen.** Angaben in n (%) oder Median und Interquartilsabstand (1.-3.Quartil) der MFIs.

Parameter	n (rpAS)	n (lpAS)	Rasch progrediente	Langsam progrediente	p-Wert
<b>N = 10 (100 %)</b>	<b>= 5 (50 %)</b>	<b>= 5 (50 %)</b>	<b>Aortenklappenstenose (rpAS)</b>	<b>Aortenklappenstenose (lpAS)</b>	
<b>Monozytäre Oberflächenfärbungen (nicht permeabilisierte CD14-positive Zellen)</b>					
CD14/BMP-2	4 (80 %)	4 (80 %)	345,10 (49,70 – 897,75)	47,80 (32,40 – 366,00)	n.s.
CD14 /BMP-4	3 (60 %)	3 (60 %)	216,00 (52,00 – 974,00)	193,43 (23,35 – 735,00)	n.s.
CD14/BMP-7	4 (80 %)	3 (60 %)	376,40 (27,60 – 883,00)	31,00 (14,18 – 398,69)	n.s.
CD14/MIF	2 (40 %)	4 (80 %)	113,50 (109,00 – 115,75)	103,00 (8,80 – 447,50)	n.s.
CD14/Gremlin-1	4 (80 %)	4 (80 %)	202,50 (66,80 – 268,75)	48,57 (16,90 – 220,50)	n.s.
CD14/SDF-1	2 (40 %)	4 (80 %)	117,70 (35,40 – 158,85)	342,50 (137,68 – 2449,00)	n.s.
CD14/CXCR4	2 (40 %)	4 (80 %)	551,50 (171,00 – 741,75)	214,00 (76,18 – 817,50)	n.s.
CD14/CXCR7	2 (40 %)	4 (80 %)	193,90 (89,80 – 245,95)	95,40 (47,28 – 230,00)	n.s.
CD14/CXCL14	2 (40 %)	4 (80 %)	844,00 (732,38 – 899,81)	830 (645,00 – 1438,50)	n.s.
CD14/TGF-β1	2 (40 %)	4 (80 %)	221,50 (130,00 – 267,25)	36,70 (18,95 – 100,55)	n.s.
<b>Intrazelluläre Monozytenfärbungen (permeabilisierte CD14-positive Zellen)</b>					
CD14/BMP-2	4 (80 %)	3 (60 %)	273,60 (37,98 – 532,25)	61,00 (28,35 – 364,00)	n.s.
CD14/BMP-4	3 (60 %)	4 (80 %)	177,00 (44,00 – 559,00)	623,00 (591,75 – 775,00)	<b>0,038</b>
CD14/BMP-7	3 (60 %)	3 (60 %)	17,80 (17,80 – 907,00)	29,00 (15,65 – 802,76)	n.s.
CD14/MIF	2 (40 %)	4 (80 %)	99,30 (93,60 – 102,15)	78,80 (46,05 – 120,39)	n.s.

<b>Parameter</b> <b>N = 10</b>	<b>n (rpAS)</b> <b>= 5 (50 %)</b>	<b>n (lpAS)</b> <b>= 5 (50 %)</b>	<b>Rasch progrediente</b> <b>Aortenklappenstenose (rpAS)</b>	<b>Langsam progrediente</b> <b>Aortenklappenstenose (lpAS)</b>	<b>p-Wert</b>
CD14/Gremlin-1	4 (80 %)	4 (80 %)	178,50 (47,25 – 246,75)	53,00 (23,63 – 208,04)	n.s.
CD14/SDF-1	2 (40 %)	4 (80 %)	137,25 (36,50 – 187,63)	362,50 (182,00 – 496,50)	n.s.
CD14/CXCR4	2 (40 %)	4 (80 %)	126,00 (89,30 – 144,35)	173,00 (103,40 – 700,50)	n.s.
CD14/CXCR7	2 (40 %)	4 (80 %)	218,00 (125,00 – 264,50)	96,45 (32,30 – 341,50)	n.s.
CD14/CXCL14	2 (40 %)	3 (60 %)	563,50 (405,00 – 642,75)	849,00 (708,00 – 1204,00)	n.s.
CD14/TGF-β1	3 (60 %)	3 (60 %)	99,00 (31,00 – 123,40)	55,00 (21,50 – 141,00)	n.s.
<b>Thrombozytäre Oberflächenfärbungen (nicht permeabilisierte CD42b-positive Zellen)</b>					
CD42b/BMP-2	4 (80 %)	5 (100 %)	35,05 (14,50 – 55,38)	58,25 (17,75 – 72,65)	n.s.
CD42b/BMP-4	4 (80 %)	5 (100 %)	33,35 (8,75 – 66,40)	39,32 (16,60 – 69,85)	n.s.
CD42b/BMP-7	4 (80 %)	3 (60 %)	19,05 (16,18 – 24,55)	16,35 (2,71 – 19,90)	n.s.
CD42b/MIF	2 (40 %)	4 (80 %)	23,25 (15,00 – 27,38)	19,30 (8,28 – 28,29)	n.s.
CD42b/Gremlin-1	4 (80 %)	3 (60 %)	39,30 (23,63 – 132,30)	28,95 (17,90 – 47,20)	n.s.
CD42b/SDF-1	3 (60 %)	4 (80 %)	9,16 (8,91 – 9,41)	14,50 (10,10 – 18,40)	n.s.
CD42b/CXCR4	2 (40 %)	4 (80 %)	172,55 (48,10 – 234,78)	136,00 (71,00 – 346,00)	n.s.
CD42b/CXCR7	2 (40 %)	4 (80 %)	37,25 (32,50 – 103,00)	40,10 (36,20 – 112,50)	n.s.
CD42b/CXCL14	2 (40 %)	4 (80 %)	147,00 (120,00 – 160,50)	173,00 (158,00 – 198,50)	n.s.
CD42b/TGF-β1	3 (60 %)	4 (80 %)	33,50 (30,50 – 36,50)	134,00 (64,20 – 173,50)	n.s.

Parameter N = 10	n (rpAS) = 5 (50 %)	n (lpAS) = 5 (50 %)	Rasch progrediente Aortenklappenstenose (rpAS)	Langsam progrediente Aortenklappenstenose (lpAS)	p-Wert
<b>Intrazelluläre Thrombozytenfärbungen (permeabilisierte CD42b-positive Zellen)</b>					
CD42b/BMP-2	4 (80 %)	5 (100 %)	39,60 (22,00 – 91,18)	47,00 (17,80 – 247,50)	n.s.
CD42b/BMP-4	4 (80 %)	5 (100 %)	80,60 (39,38 – 89,13)	163,00 (56,19 – 208,73)	n.s.
CD42b/BMP-7	4 (80 %)	3 (60 %)	39,80 (13,60 – 89,85)	22,20 (3,76 – 217,05)	n.s.
CD42b/MIF	2 (40 %)	4 (80 %)	25,99 (7,58 – 35,19)	14,70 (8,65 – 150,50)	n.s.
CD42b/Gremlin-1	4 (80 %)	3 (60 %)	43,95 (33,38 – 245,63)	54,63 (34,70 – 190,00)	n.s.
CD42b/SDF-1	2 (40 %)	4 (80 %)	6,87 (3,96 – 8,33)	20,40 (16,70 – 24,34)	n.s.
CD42b/CXCR4	3 (60 %)	4 (80 %)	133,00 (42,00 – 202,00)	162,00 (85,10 – 3941,00)	n.s.
CD42b/CXCR7	3 (60 %)	4 (80 %)	127,00 (37,00 – 704,00)	252,00 (120,00 – 2634,00)	n.s.
CD42b/CXCL14	2 (40 %)	4 (80 %)	185,00 (157,00 – 199,00)	149,90 (127,00 – 154,25)	n.s.
CD42b/TGF-β1	2 (40 %)	4 (80 %)	103,75 (86,50 – 112,38)	58,00 (48,80 – 76,25)	n.s.

BMP – *engl. Bone Morphogenetic Protein*, dt. Knochenmorphogenetisches Protein; CD – *engl. Cluster of Differentiation*, dt. Cluster der Differenzierung; CXCL14 - CXC - Motiv Chemokinligand 14; CXCR4-CXC - Motiv Chemokinrezeptor 4; CXCR7 - CXC – Motiv Chemokinrezeptor 7; lpAS – langsam progrediente Aortenklappenstenose; MIF- *engl. Macrophage Migration Inhibitory Factor*, dt. Makrophagen-Migrationsinhibierender Faktor; MFIs – Mittlere Fluoreszenzintensitäten (pl.); n.s. – nicht signifikant; rpAS- rasch progrediente Aortenklappenstenose; SDF-1 - *engl. stroma cell- derived factor*, dt. Stromazellfaktor 1; TGF-β1 – *engl. Transforming Growth Factor β1*, dt. transformierender Wachstumsfaktor β1.

bzw. 623,00 (IQA: 591,75 – 775,00) in der IpAS-Kohorte auf ein hohes Vorkommen von BMP-4 hin. Die intrazelluläre Expression von BMP-4 in Monozyten unterschied sich signifikant zwischen den beiden Kohorten rpAS und IpAS ( $p = 0,038$ ). In den Färbungen der Thrombozyten zeigten sich vergleichsweise geringere Anfärbungen von BMP-4 mit einem Median nicht permeabilisierter Zellen der rpAS-Gruppe von 33,35 (IQA: 8,75 – 66,40) bzw. 39,32 (IQA: 16,60 – 69,85) in der IpAS-Kohorte. Intrazellulär zeigte sich in Patienten mit IpAS eine vergleichsweise stärkere thrombozytäre Anfärbung von BMP-4 mit einem Median bei 163,00 (IQA: 56,19 – 208,73) im Vergleich zu 80,60 (IQA: 39,38 – 89,13) in Patienten mit rpAS. Der Unterschied zeigte sich nicht signifikant. Signifikant for trend zeigt sich die reduzierte intrazelluläre Anfärbung von BMP-7 in Monozyten von Patienten mit rpAS im Vergleich zu IpAS ( $p = 0,054$ ). Im Vergleich zu BMP-2 und BMP-4 waren für BMP-7 sehr geringe Expressionen auf Monozyten und Thrombozyten nachweisbar. Insbesondere sind für die thrombozytären Oberflächenexpressionen von BMP-7 vergleichsweise geringe MFIs nachweisbar (CD42b/BMP-7: rpAS: 19,05 (IQA: 16,18 - 24,55), IpAS: 16,35 (IQA: 2,71 – 19,90)). Es zeigten sich deutliche Anfärbungen von BMP-4, SDF-1, CXCR4 und CXCL14 in und auf Monozyten, wie die vergleichsweise hohen MFIs darlegen (Tabelle 10). Eine Anfärbung in Monozyten und Thrombozyten war für Gremlin-1 zu beobachten, mit einem vergleichsweise hohen Median von 202,50 (IQA: 66,80 – 268,75) in CD14/Gremlin-1-positiven Zellen von Patienten mit rpAS im Vergleich zu 48,57 (IQA: 16,90 – 220,50) bei Patienten mit IpAS. Intrazellulär zeigten sich die Mediane ähnlich: in der rpAS-Kohorte mit 178,50 (IQA: 47,25 -246,75), in der IpAS-Kohorte mit 53,00 (IQA: 23,63 – 208,04). Deutlich geringer waren die Anfärbungen auf der thrombozytären Oberfläche mit 39,30 (IQA: 23,63 – 132,30) für rpAS-Patienten und 28,95 (IQA: 17,90 – 47,20) in der IpAS-Kohorte. Im Vergleich hierzu präsentierten sich die intrazellulären thrombozytären Anfärbungen mit 43,95 (IQA: 33,38 – 245,63) in der rpAS-Kohorte bzw. 54,63 (IQA: 34,70 – 190,00) in Patienten mit IpAS etwas stärker. In allen Zellreihen fiel eine starke Anfärbung von CXCR4 auf, beispielsweise der Median nicht permeabilisierter CD14/CXCR4-positiver Zellen von 551,50 (IQA: 171,00 –

741,75) für rpAS-Patienten und 214,00 (IQA: 76,18 – 817,50) in der lpAS-Kohorte. Auch auf Thrombozyten zeigte CXCR4 eine deutliche Anfärbung: mit einem Median von 172,55 (48,10 – 234,78) in der rpAS-Kohorte, bzw. 136,00 (71,00 – 346,00) in der lpAS-Kohorte. Der Unterschied zwischen den beiden Kohorten war nicht signifikant. Ebenfalls deuteten die Messwerte auf eine deutliche Expression von CXCR7 hin. Der Median der Expression von CXCR7 in Thrombozyten liegt in der rasch progredienten Kohorte bei 127,00 (IQA: 37,00 – 704,00), in der langsam progredienten bei 252,00 (IQA: 120,00 – 2634,00). Es bestand kein signifikanter Unterschied. Vor allem monozytär, aber auch thrombozytär waren deutliche oberflächliche Anfärbungen von CXCL14 zu verzeichnen, die sich jedoch nicht zwischen den beiden Kohorten rpAS und lpAS unterschieden (CD14/CXCL14: rpAS: 844,00 (IQA: 732,38 – 899,81); lpAS: 830 (IQA: 645,00 – 1438,50); CD42b/CXCL14: rpAS: 147,00 (IQA: 120,00 – 160,50); lpAS: 173,00 (IQA: 158,00 – 198,50)). Im Vergleich hierzu waren sehr geringe Anfärbungen für MIF und TGF- $\beta$ 1 in permeabilisierten und nicht permeabilisierten Monozyten und Thrombozyten zu verzeichnen, wie Tabelle 10 darlegt. SDF-1 zeigte eine deutliche oberflächliche Anfärbung auf Monozyten in der lpAS-Kohorte (342,50 (IQA: 137,68 – 2449,00)), war jedoch auch in der rpAS-Kohorte vertreten (117,70 (IQA: 35,40 – 158,85)). Im Vergleich zu Monozytenfärbungen präsentierten sich die Expressionen von SDF-1 in thrombozytären Anfärbungen sehr gering. Vor allem auf der thrombozytären Oberfläche sind sehr geringe Expressionen im Vergleich zu intrazellulär aufgetreten (CD42b/SDF-1: rpAS: 9,16 (IQA: 8,91 – 9,41); lpAS: 14,50 (IQA: 10,10 – 18,40); CD42b/SDF-1 permeabilisiert: rpAS: 6,87 (IQA: 3,96 – 8,33), lpAS: 58,00 (IQA: 48,80 – 76,25)).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass kaum Unterschiede der monozytären und thrombozytären Expressionen inflammatorischer und fibrotischer Marker zwischen Patienten mit rpAS und lpAS aufgezeigt werden konnten, was auf die geringen Fallzahlen zurückzuführen ist, da die Power bei < 80 % lag. Aus diesem Grund wurden Power-Analysen für ausgewählte Marker durchgeführt, um die notwendige Fallzahlgröße pro Kohorte zu berechnen. Die notwendigen Kohortengrößen sind in Tabelle 11 dargestellt.

**Tabelle 11: Kalkulierte Kohortengröße für monozytäre und thrombozytäre Expressionen von BMP-2,-4, -7 und Gremlin-1.** Werte kalkuliert für eine Power von über 80 % bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$ . Absolute Angaben.

<b>Parameter</b>	<b>kalkulierte Kohortengröße rasch progredienter Aortenklappenstenosen</b>	<b>kalkulierte Kohortengröße langsam progredienter Aortenklappenstenosen</b>	<b>Power</b>
<b>CD14 nicht permeabilisiert</b>			
BMP-2	5	5	> 80 %
BMP-4	13	13	> 80 %
BMP-7	11	11	> 80 %
Gremlin-1	28	28	> 80 %
<b>CD42b nicht permeabilisiert</b>			
BMP-2	21	21	> 80 %
BMP-4	34	34	> 80 %
BMP-7	97	97	> 80 %
Gremlin-1	307	307	> 80 %

BMP – engl. *Bone Morphogenetic Protein*, dt. Knochentmorphogenetisches Protein, CD – engl. *Cluster of Differentiation*, dt. Cluster der Differenzierung.

Es ist ersichtlich, dass für thrombozytäre Färbungen höhere Fallzahlen als für monozytäre Messungen notwendig sind. Um BMP-2 auf Thrombozyten ausreichend charakterisieren zu können, ist eine Fallzahl von jeweils  $n = 21$  Probanden notwendig, auf Monozyten nur von  $n = 5$ . Für oberflächliche Expressionen von BMP-4 auf Monozyten ist eine Kohortengröße von jeweils  $n = 13$  notwendig, für thrombozytäre Messungen von jeweils  $n = 34$ . Für BMP-7 werden jeweils elf Probanden benötigt, um aus monozytären Messungen hinreichende Schlüsse ziehen zu können. Bei CD42b-positiven Zellen sind es jeweils  $n = 97$ . Um eine Power von 80 % bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  zu erreichen, ist für Gremlin-1 eine Kohortengröße von jeweils  $n = 28$  für CD14, nicht permeabilisierte Zellen bzw.  $n = 307$  für CD42b, nicht permeabilisierte Zellen notwendig.

### 3.1.4 Korrelationen zwischen den klinischen und molekularbiologischen Erscheinungsbildern der Aortenklappenstenose.

Es wurden Korrelationsanalysen zwischen den klinischen und molekularbiologischen Erscheinungsbildern der hochgradigen, kalzifizierten AS durchgeführt. Die graphische Darstellung für ausgewählte Korrelationen ist Tabelle 12 zu entnehmen. Es konnten sowohl signifikante Korrelationen zwischen klinischen und immunhistochemischen Parametern gezeigt werden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden an dieser Stelle nicht alle, sondern ausgewählte Korrelationen tabellarisch abgebildet.

Es konnte eine negative Korrelation zwischen der Anzahl BMP-2 positiver Zellen im Herzklappengewebe und der Höhe des Framingham Risk Scores aufgezeigt werden ( $r = -0,442$ ,  $p = 0,030$ ). Die aortale Expression von BMP-2 zeigte eine positive Korrelation mit dem mittleren Druckgradienten über der Aortenklappe ( $r = 0,537$ ,  $p = 0,039$ ), was ebenfalls für MIF gezeigt werden konnte ( $r = 0,492$ ,  $p = 0,023$ ). Die Anzahl Gremlin-1-positiver Zellen im Herzklappengewebe korrelierte negativ mit dem mittleren Druckgradienten über der Aortenklappe ( $r = -0,453$ ,  $p = 0,030$ ). Eine weitere Korrelation zwischen immunhistochemischen Daten und echokardiographischen Beschreibungen der Herzklappe zeigte die positive Korrelation der ventrikulären Expression von BMP-2 mit der Aortenklappenöffnungsfläche ( $r = 0,631$ ,  $p = 0,009$ ). Neben den Korrelationen mit echokardiographischen Daten konnten für die BMPs auch multiple Korrelationen mit klinischen Parametern dargelegt werden. Eine positive Korrelation zeigte sich für die Anzahl BMP-7-positiver Zellen im Herzklappengewebe und der Höhe des STS-Scores ( $r = 0,531$ ,  $p = 0,008$ ). Des Weiteren zeigten sich Korrelationen zwischen der Anzahl BMP-7 positiver Zellen im Herzklappengewebe und den systolischen Blutdruckwerten ( $r = 0,414$ ,  $p = 0,044$ ) sowie dem Vorhandensein einer Dyslipoproteinämie ( $r = 0,432$ ,  $p = 0,035$ ). Eine positive Korrelation bestand zwischen der Anzahl ventrikulärer BMP-7-positiver Zellen und einer Synkope als Erstsymptom ( $r = 0,732$ ,  $p = 0,004$ ).

Tabelle 12: Korrelationen klinischer und immunohistochemischer Marker

R-Wert p-Wert	rasch prog- redient	Euro II Score	Aorten- klappen- öffnungs- fläche	mittlerer Druck- gradient	Linksven- trikuläre Ejektions- fraktion
rasch progredient	---	0,046 n.s.	0,147 n.s.	-0,109 n.s.	-0,184 n.s.
Tage seit Symptom- beginn	<b>-0,837</b> <b>p &lt; 0,001</b>	0,087 n.s.	-0,176 n.s.	-0,098 n.s.	0,151 n.s.
Framingham Score	0,005 n.s.	<b>0,440</b> <b>p = 0,024</b>	-0,145 n.s.	-0,099 n.s.	0,207 n.s.
STS Score	-0,210 n.s.	0,021 n.s.	-0,063 n.s.	0,000 n.s.	0,017 n.s.
plötzlicher Symptom- beginn	<b>0,507</b> <b>p = 0,011</b>	0,250 n.s.	0,173 n.s.	-0,086 n.s.	-0,080 n.s.
Erstsymptom Synkope	<b>-0,355</b> <b>for trend</b>	-0,102 n.s.	-0,012 n.s.	-0,273 n.s.	-0,037 n.s.
Erstsymptom Belastungs- dyspnoe	0,316 n.s.	<b>0,422</b> <b>p = 0,032</b>	-0,071 n.s.	0,000 n.s.	-0,256 n.s.
MIF total	0,072 n.s.	-0,102 n.s.	-0,241 n.s.	<b>0,492</b> <b>p = 0,023</b>	0,151 n.s.
BMP-2 aortal	<b>0,453</b> <b>for trend</b>	-0,298 n.s.	-0,288 n.s.	<b>0,537</b> <b>p = 0,039</b>	0,173 n.s.
BMP-2 ventrikulär	0,000 n.s.	-0,050 n.s.	<b>0,631</b> <b>p = 0,009</b>	0,117 n.s.	0,121 n.s.
BMP-7 total	0,140 n.s.	-0,062 n.s.	0,180 n.s.	0,181 n.s.	-0,018 n.s.
BMP-7 aortal	0,206 n.s.	-0,127 n.s.	0,052 n.s.	0,506 n.s.	0,398 n.s.
Gremlin1 total	<b>0,396</b> <b>for trend</b>	-0,080 n.s.	-0,099 n.s.	<b>-0,453</b> <b>p = 0,030</b>	<b>-0,368</b> <b>for trend</b>
Gremlin1 ventrikulär	0,232 n.s.	-0,070 n.s.	-0,375 n.s.	-0,092 n.s.	-0,368 n.s.

R-Wert p-Wert	Dyslipo- proteinämie	systolische Blutdruckwerte	Leukozyten- anzahl	CD3 ven- trikulär
rasch progredient	-0,167 n.s.	0,097 n.s.	-0,272 n.s.	0,250 n.s.
Tage seit Symptom- beginn	0,067 n.s.	-0,187 n.s.	0,239 n.s.	<b>-0,531</b> <b>p = 0,042</b>
Framingham Score	<b>0,489</b> <b>p = 0,011</b>	<b>0,614</b> <b>p = 0,001</b>	0,151 n.s.	0,313 n.s.
Euro II Score	0,150 n.s.	0,018 n.s.	<b>-0,420</b> <b>p = 0,034</b>	-0,149 n.s.
plötzlicher Symptom- beginn	-0,293 n.s.	0,079 n.s.	<b>-0,502</b> <b>p = 0,015</b>	0,241 n.s.
Erstsymptom Synkope	<b>0,592</b> <b>p = 0,002</b>	0,154 n.s.	0,155 n.s.	-0,216 n.s.
Erstsymptom Belastungs- dyspnoe	-0,329 n.s.	<b>-0,453</b> <b>p = 0,020</b>	<b>-0,498</b> <b>p = 0,011</b>	<b>0,517</b> <b>p = 0,048</b>
CD3 aortal	-0,056 n.s.	0,202 n.s.	0,090 n.s.	<b>0,666</b> <b>p = 0,007</b>
MIF total	0,328 n.s.	0,211 n.s.	0,316 n.s.	<b>0,466</b> <b>for trend</b>
BMP-2 aortal	-0,270 n.s.	0,055 n.s.	-0,051 n.s.	0,512 <b>for trend</b>
BMP-7 total	<b>0,432</b> <b>p = 0,035</b>	<b>0,414</b> <b>p = 0,044</b>	0,149 n.s.	0,117 n.s.
BMP-7 aortal	<b>0,492</b> <b>for trend</b>	0,262 n.s.	-0,112 n.s.	0,047 n.s.
Gremlin1 total	0,198 n.s.	<b>0,390</b> <b>for trend</b>	0,008 n.s.	-0,039 n.s.

R-Wert p-Wert	Gremlin 1 aortal	Gremlin 1 total	BMP-2 total	BMP-4 total
rasch	0,258	<b>0,396</b>	0,115	0,302
progredient	n.s.	<b>for trend</b>	n.s.	n.s.
Framingham Score	-0,258 n.s.	0,242 n.s.	<b>-0,442</b> <b>p = 0,030</b>	-0,156 n.s.
STS Score	-0,334 n.s.	0,249 n.s.	0,118 n.s.	0,213 n.s.
plötzlicher Symptom- beginn	<b>0,580</b> <b>p = 0,019</b>	0,381 n.s.	0,026 n.s.	-0,124 n.s.
Erstsymptom Synkope	-0,360 n.s.	<b>-0,397</b> <b>p = 0,049</b>	-0,046 n.s.	0,000 n.s.
Erstsymptom Belastungs- dyspnoe	0,303 n.s.	0,059 n.s.	<b>0,348</b> <b>for trend</b>	0,238 n.s.
CD3 aortal	0,070 n.s.	0,070 n.s.	0,470 n.s.	0,204 n.s.
CD68 aortal	-0,021 n.s.	-0,021 n.s.	0,412 n.s.	<b>0,556</b> <b>p = 0,094</b>
MIF total	0,111 n.s.	-0,059 n.s.	<b>0,425</b> <b>p = 0,049</b>	<b>0,556</b> <b>p = 0,011</b>
BMP-2 aortal	<b>0,738</b> <b>p = 0,003</b>	-0,059 n.s.	<b>0,736</b> <b>p = 0,001</b>	<b>0,507</b> <b>for trend</b>
BMP-2 ventrikulär	0,024 n.s.	-0,387 n.s.	<b>0,737</b> <b>p = 0,001</b>	0,044 n.s.
BMP-7 total	-0,097 n.s.	0,267 n.s.	0,327 n.s.	<b>0,565</b> <b>p = 0,009</b>
BMP-7 aortal	-0,168 n.s.	0,204 n.s.	<b>0,713</b> <b>p = 0,009</b>	0,562 n.s.
Gremlin1 total	<b>1,000</b> <b>p &lt; 0,001</b>	---	-0,105 n.s.	0,033 n.s.
Gremlin1 ventrikulär	<b>0,969</b> <b>p &lt; 0,001</b>	<b>0,969</b> <b>p &lt; 0,001</b>	<b>0,624</b> <b>p = 0,013</b>	-0,214 n.s.

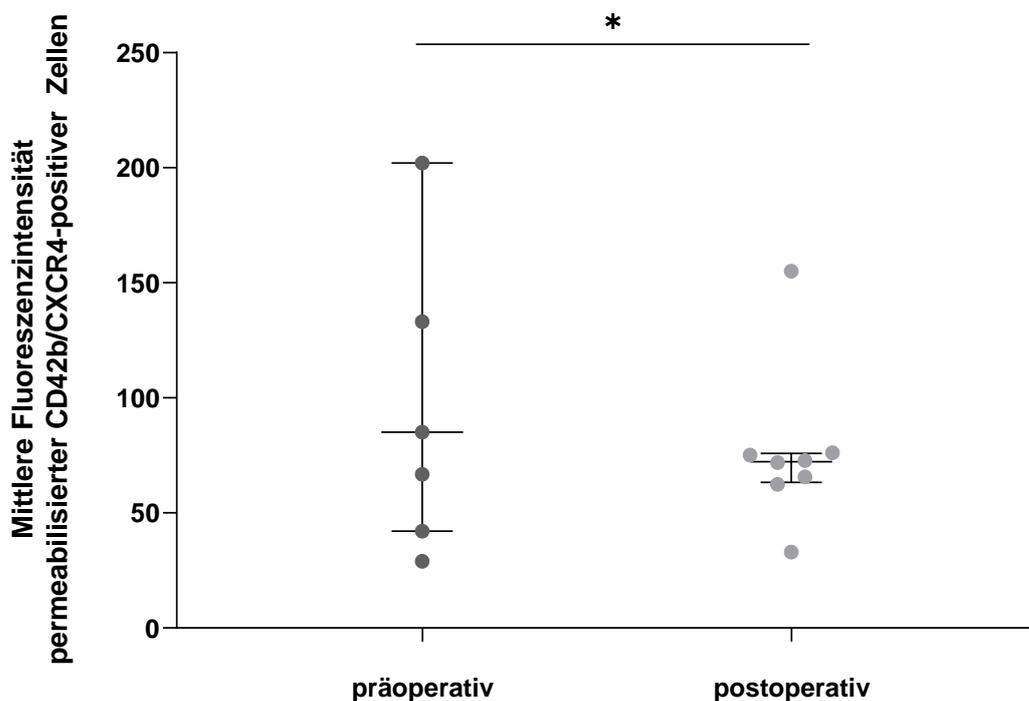
R-Wert p-Wert	BMP-4 ortal	BMP-4 ventri- kulär	BMP-7 total	BMP-7 ventri- kulär-	TGF-β1 aortal
rasch progredient	0,420 n.s.	0,336 n.s.	0,140 n.s.	<b>-0,619</b> <b>p = 0,024</b>	<b>0,516</b> <b>p = 0,028</b>
STS Score	-0,104 n.s.	0,091 n.s.	<b>0,531</b> <b>p = 0,008</b>	-0,250 n.s.	0,073 n.s.
plötzlicher Symptom- beginn	-0,168 n.s.	0,028 n.s.	0,186 n.s.	<b>-0,732</b> <b>p = 0,004</b>	0,063 n.s.
Erstsymptom Synkope	-0,017 n.s.	-0,156 n.s.	0,210 n.s.	<b>0,732</b> <b>p = 0,004</b>	-0,086 n.s.
Erstsymptom Belastungs- dyspnoe	0,424 n.s.	<b>0,512</b> <b>p = 0,043</b>	0,147 n.s.	<b>-0,592</b> <b>p = 0,033</b>	0,318 n.s.
CD3 aortal	0,204 n.s.	-0,023 n.s.	0,237 n.s.	-0,149 n.s.	<b>0,639</b> <b>p = 0,010</b>
CD68 aortal	0,556 n.s.	<b>0,781</b> <b>p = 0,002</b>	0,336 n.s.	-0,009 n.s.	<b>0,841</b> <b>p &lt; 0,001</b>
MIF total	<b>0,715</b> <b>p = 0,002</b>	-0,031 n.s.	<b>0,503</b> <b>p = 0,017</b>	0,072 n.s.	<b>0,717</b> <b>p = 0,001</b>
BMP-2 aortal	<b>0,732</b> <b>p = 0,003</b>	0,335 n.s.	0,417 n.s.	-0,143 n.s.	<b>0,729</b> <b>p = 0,001</b>
BMP-2 ventrikulär	0,009 n.s.	0,413 n.s.	<b>0,512</b> <b>p = 0,035</b>	<b>0,631</b> <b>p = 0,021</b>	-0,013 n.s.
BMP-7 total	<b>0,445</b> <i>for trend</i>	<b>0,580</b> <b>p = 0,018</b>	---	<b>0,486</b> <i>for trend</i>	<b>0,560</b> <b>p = 0,016</b>
BMP-7 aortal	<b>0,562</b> <i>for trend</i>	<b>0,649</b> <b>p = 0,023</b>	<b>1,000</b> <b>p &lt; 0,001</b>	<b>0,486</b> <i>for trend</i>	<b>0,497</b> <i>for trend</i>

n.s. - nicht signifikant, total - Gesamtanzahl aller positiven Zellen des jeweiligen Markers im Herzklappengewebe.

Darüber hinaus korrelierte die ventrikuläre Anzahl BMP-7-positiver Zellen im Aortenklappengewebe negativ mit einem plötzlichen Beginn des Erstsymptoms ( $r = -0,732$ ,  $p = 0,004$ ) sowie mit dem Erstsymptom Belastungsdyspnoe ( $r = -0,592$ ,  $p = 0,033$ ). Eine Korrelation mit dem Erstsymptom Belastungsdyspnoe wurde auch für die ventrikuläre Expression von BMP-4 verzeichnet, jedoch war diese im Vergleich zur Korrelation mit BMP-7 positiv ( $r = 0,512$ ,  $p = 0,043$ ). Die Anzahl Gremlin-1-positiver Zellen korrelierten signifikant for trend positiv mit den Tagen von Diagnose mit Operationszeitpunkt bei Patienten mit rpAS ( $r = 0,396$ ,  $p = 0,050$ ). Neben diesen klinischen Korrelationen bestanden auch multiple immunhistochemische Korrelationen. Die Anzahl aortaler BMP-2-positiver Zellen korrelierte nicht nur positiv mit der Anzahl TGF- $\beta$ 1-positiver Zellen ( $r = 0,729$ ,  $p = 0,001$ ), sondern auch mit der Anzahl aortaler Gremlin-1- ( $r = 0,738$ ,  $p = 0,003$ ) und aortaler BMP-4-positiver Zellen ( $r = 0,732$ ,  $p = 0,003$ ). Die Anzahl aller BMP-2-positiver Zellen im Herzklappengewebe korrelierte zum einen positiv mit der Anzahl aller MIF-positiven Zellen ( $r = 0,425$ ,  $p = 0,049$ ) als auch mit der aortalen Anzahl BMP-7- ( $r = 0,713$ ,  $p = 0,009$ ) bzw. ventrikulärer Gremlin-1-positiver Zellen ( $r = 0,624$ ,  $p = 0,013$ ). Für die Anzahl aller BMP-7-positiver Zellen bestanden multiple positive Korrelationen, z.B. zur Anzahl aller BMP-4-positiven Zellen ( $r = 0,565$ ,  $p = 0,009$ ) und der aortalen Expression TGF- $\beta$ 1-positiver Zellen im Herzklappengewebe ( $r = 0,560$ ,  $p = 0,016$ ). Die aortale Expression TGF- $\beta$ 1-positiver Zellen korrelierte ebenfalls positiv mit der Anzahl MIF-positiver Zellen ( $r = 0,717$ ,  $p = 0,001$ ) bzw. CD3-positiver Zellen ( $r = 0,639$ ,  $p = 0,010$ ). Für die aortale Expression CD68 positiver Zellen bestanden Korrelationen mit der Anzahl ventrikulärer BMP-4-positiver Zellen ( $r = 0,781$ ,  $p = 0,002$ ). Eine sehr starke Korrelation konnte zwischen der aortalen Expression von CD68- und TGF- $\beta$ 1-positiver Zellen ( $r = 0,841$ ,  $p < 0,001$ ) aufgezeigt werden.

### 3.2 Dynamische thrombozytäre und monozytäre Proteinexpressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner

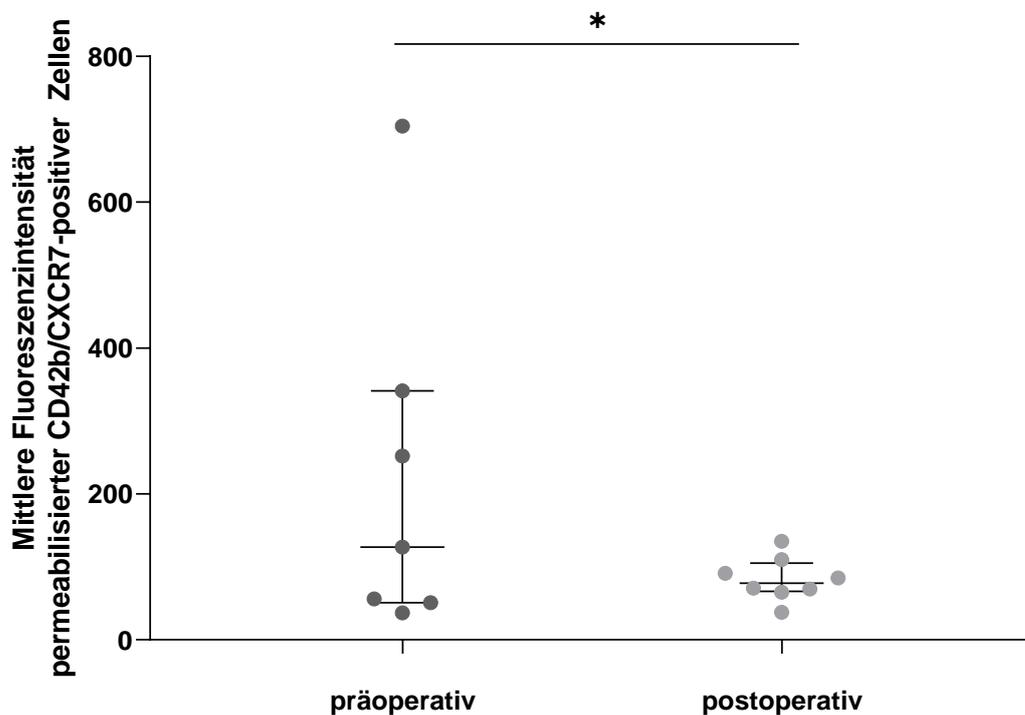
Die Interaktionspartner der BMPs zeigten ein dynamisches Expressionmuster. Die intrazelluläre thrombozytäre Expression von CXCR4 war postoperativ im Vergleich zu präoperativ signifikant reduziert ( $p = 0,025$ ), wie Abbildung 19 zeigt. Der Median der MFIs permeabilisierter CD4b/CXCR4-positiver Zellen lag bei 85,10 (IQA: 42,00 – 202,00) und unterschied sich signifikant vom postoperativen Median, der sich auf 72,25 (IQA: 63,20 – 75,85) belief ( $p = 0,025$ ).



**Abbildung 19: Es besteht eine dynamische intrazelluläre thrombozytäre Expression von CXCR4.** Die Abbildung zeigt Ergebnisse durchflusszytometrischer Analysen. Intrazelluläre Anfärbungen von CXC - Motiv Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) zeigen bei Patienten mit Aortenklappenstenose postoperativ im Vergleich zu präoperativ signifikant reduzierte Expressionen ( $p = 0,025$ ). Abgebildet sind die einzelnen Messungen sowie der Median und Interquartilsabstände (1. – 3. Quartil).

Die Oberflächenexpressionen von CXCR4 auf Thrombozyten waren mit präoperativ 48,45 (IQA: 22,28 – 68,40) und postoperativ 44,35 (IQA: 34,88 – 66,40) etwas geringer und unterschieden sich nicht signifikant untereinander. Die monozytären Oberflächenexpressionen von CXCR4 waren mit präoperativ

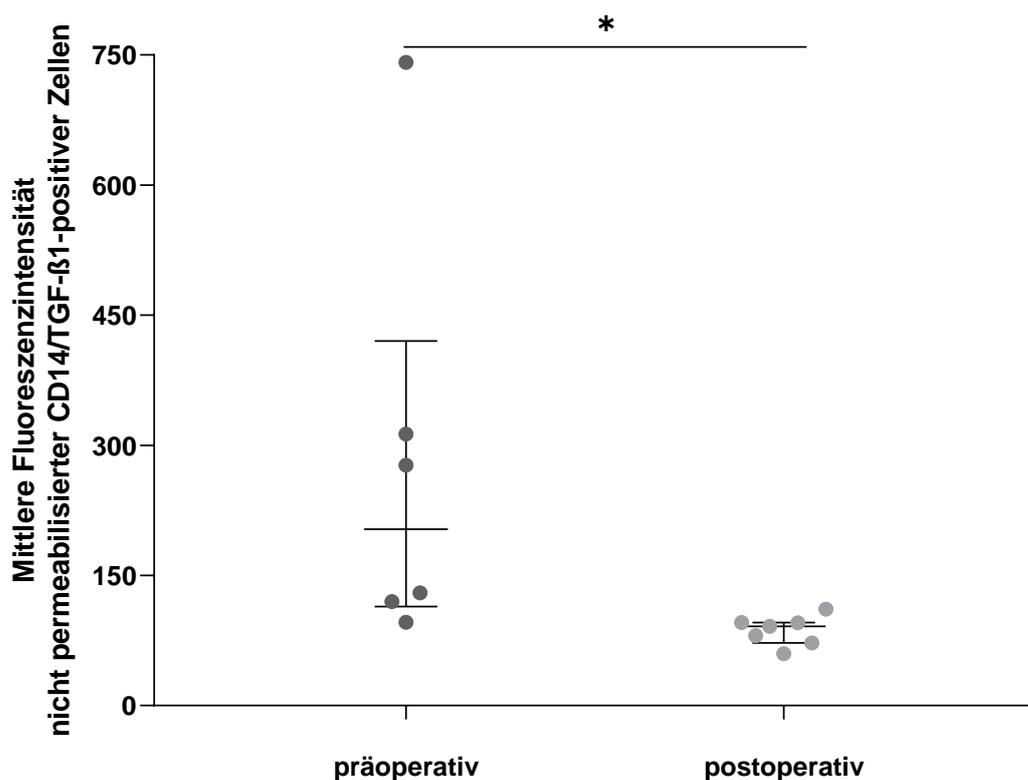
788,50 (IQA: 465,00 – 908,00) und postoperativ 528,00 (IQA: 164,00 – 856,00) im Vergleich deutlich stärker ausgeprägt. Ebenfalls zeigte sich in Monozyten eine deutliche Anfärbung. Sie lag präoperativ bei 444,00 (IQA: 267,00 – 738,00) und postoperativ bei 713,00 (IQA: 148,00 – 763,00). Die monozytären Expressionen von CXCR4 unterschieden sich nicht signifikant präoperativ und postoperativ. Wie intrazelluläre Anfärbungen von CXCR4 zeigten sich die intrazellulären thrombozytären Expressionen von CXCR7 postoperativ mit einem Median der MFIs von 77,65 (IQA: 66,23 – 105,25) signifikant reduziert im Vergleich zu präoperativ ( $p = 0,028$ ). Der Median lag präoperativ bei 127,00 (IQA: 50,80 – 341,00), wie Abbildung 20 zu entnehmen ist.



**Abbildung 20: Es besteht eine dynamische intrazelluläre thrombozytäre Expression von CXCR7.** Die Abbildung zeigt Ergebnisse durchflusszytometrischer Analysen Intrazelluläre Anfärbungen von CXC - Motiv Chemokinrezeptor 7 (CXCR7) zeigen bei Patienten mit Aortenklappenstenose postoperativ im Vergleich zu präoperativ signifikant reduzierte Expressionen ( $p = 0,028$ ). Abgebildet sind die einzelnen Messungen sowie der Median und Interquartilsabstände (1. – 3. Quartil).

Die thrombozytären Oberflächenexpressionen von CXCR7 zeigten präoperativ keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur postoperativen Expression (präoperativ: 89,50 (IQA: 53,50 – 167,25); postoperativ 81,65 (IQA: 59,20 – 235,00)). Mit einem Median von 262,00 (IQA: 180,50 – 341,50) präoperativ und

284,00 (IQA: 137,00 – 355,00) postoperativ unterscheiden sich die intrazellulären Expressionen von CXCR7 in Monozyten ebenfalls nicht signifikant. Die Oberflächenexpression von CXCR7 auf Monozyten war hierzu im Vergleich etwas geringer und lag präoperativ bei 227,00 (IQA: 150,70 – 302,00) bzw. postoperativ bei 213,00 (IQA: 125,00 – 254,00). Im Vergleich zu CXCR7 zeigte die monozytäre Oberflächenexpression von TGF- $\beta$ 1 signifikante Unterschiede zwischen präoperativen und postoperativen Messungen, wie Abbildung 21 zu entnehmen ist.



**Abbildung 21: Es besteht eine dynamische monozytäre Oberflächenexpression von Transforming Growth Factor  $\beta$ 1.** Die Abbildung zeigt Ergebnisse durchflusszytometrischer Analysen Oberflächenfärbungen von Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) zeigen bei Patienten mit Aortenklappenstenose postoperativ im Vergleich zu präoperativ signifikant reduzierte Expressionen ( $p = 0,043$ ). Abgebildet sind die einzelnen Messungen sowie der Median und Interquartilsabstände (1. – 3. Quartil).

Der Median der CD14/TGF- $\beta$ 1-positiven Zellen lag präoperativ bei 203,50 (IQA: 114,03 – 166,25) und postoperativ bei 91,40 (IQA: 72,10 – 95,60) ( $p = 0,043$ ). Es war präoperativ eine deutliche Anfärbung von TGF- $\beta$ 1 auf Monozyten zu verzeichnen. Intrazelluläre Anfärbungen von TGF- $\beta$ 1 in Monozyten lagen

präoperativ bei 140,50 (IQA: 108,75 – 166,25) und postoperativ bei 118,00 (IQA: 86,70 – 141,00) und somit etwas geringer als Oberflächenfärbungen. Im Vergleich hierzu zeigten sich die thrombozytären Expressionen sehr gering, die auf der Oberfläche im Median bei 48,90 (IQA: 33,50 – 60,20) präoperativ und 45,80 (IQA: 29,90 – 63,65) postoperativ bzw. intrazellulär bei 81,05 (IQA: 56,83 – 445,50) präoperativ und 68,10 (IQA: 51,80 – 106,00) postoperativ lagen. Ebenfalls waren keine signifikanten Unterschiede der prä- und postoperativen thrombozytären Expressionen von BMP-2, BMP-4, BMP-7, MIF, Gremlin-1, SDF-1 und CXCL14 zu verzeichnen, wie Tabelle 13 darlegt. Die intrazellulären und oberflächlichen monozytären Expressionen von BMP-2, BMP-4, BMP-7, MIF, Gremlin-1, SDF-1 und CXCL14 zeigten sich ebenfalls nicht signifikant. Auf der Monozytenoberfläche fielen deutliche Anfärbungen von BMP-2, BMP-4, BMP-7, MIF, CXCR4 und CXCL14 sowohl präoperativ als auch postoperativ auf. Auch intrazellulär sind diese Marker deutlich vertreten.

Vergleichsweise eher schwächere Anfärbungen sind für Gremlin-1, SDF-1, CXCR7 und TGF- $\beta$ 1 zu verzeichnen. In und auf Thrombozyten fallen hingegen vergleichsweise eher geringe Expressionen von BMP-2, BMP-4, BMP-7, Gremlin-1 und SDF-1 auf. Für den Großteil der Marker deutet sich postoperativ eine abnehmende Expression der Marker an; eine Ausnahme stellen monozytäre Oberflächenexpressionen von BMP-4 und BMP-7 dar, die postoperativ einer stärkere Anfärbung aufwiesen. Für intrazelluläre Monozytenfärbungen deutete sich für CXCR4 eine vermehrte postoperative Expression an, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Auch in thrombozytären Anfärbungen schien sich postoperativ im Vergleich zu präoperativ ein Abfall der MFIs aufzuzeigen; mit der Ausnahme von MIF und Gremlin-1 in und auf Thrombozyten, die postoperativ vergleichsweise höhere MFIs aufwiesen. Die Unterschiede zeigten sich jedoch nicht signifikant. Intrazelluläre Anfärbungen von CXCL14 deuteten ebenfalls auf eine vermehrte postoperative Expression von CXCL14 in Thrombozyten hin, sind aber postoperativ im Vergleich zu präoperativ derzeit nicht signifikant erhöht.

**Tabelle 13: Dynamische monozytäre und thrombozytäre Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner.** Angaben in n (%) oder Median der Mittleren Fluoreszenzintensitäten und Interquartilsabstand (1.-3. Quartil).

Parameter	n (präOP) = 10 (100 %)	n (postOP) = 10 (100 %)	präoperative mittlere Fluoreszenzintensitäten (präOP)	postoperative mittlere Fluoreszenzintensitäten (postOP)	p-Wert
<b>Monozytäre Oberflächenfärbungen (nicht permeabilisierte CD14-positive Zellen)</b>					
CD14/BMP-2	8 (80 %)	8 (80 %)	641,00 (202,65 – 786,75)	613,00 (234,75 – 728,00)	n.s.
CD14 /BMP-4	6 (60 %)	8 (80 %)	754,50 (175,00 – 1061,50)	965,50 (300,50–1328,50)	n.s.
CD14/BMP-7	7 (70 %)	8 (80 %)	676,00 (76,80 – 1061,00)	711,00 (116,58 – 1021,50)	n.s.
CD14/MIF	6 (60 %)	8 (80 %)	440,50 (103,55 – 1563,00)	271,50 (22,10 – 913,00)	n.s.
CD14/Gremlin-1	8 (80 %)	8 (80 %)	221,50 (195,25 – 274,00)	211,50 (80,10 – 249,25)	n.s.
CD14/SDF-1	6 (60 %)	7 (70 %)	246,50 (95,85 – 419,00)	295,00 (91,20 – 334,00)	n.s.
CD14/CXCR4	6 (60 %)	7 (70 %)	788,50 (465,00 – 908,00)	528,00 (164,00 – 856,00)	n.s.
CD14/CXCR7	7 (70 %)	7 (70 %)	227,00 (150,70 – 302,00)	213,00 (125,00 – 254,00)	n.s.
CD14/CXCL14	5 (50 %)	7 (70 %)	830,00 (619,00 – 893,50)	830 (371,00 – 979,00)	n.s.
CD14/TGF-β1	6 (60 %)	7 (70 %)	203,50 (114,03 – 166,25)	91,40 (72,10 – 95,60)	<b>0,043</b>
<b>Intrazelluläre Monozytenfärbungen (permeabilisierte CD14-positive Zellen)</b>					
CD14/BMP-2	7 (70 %)	8 (80 %)	531,00 (59,20 – 605,00)	533,50 (224,75 – 821,00)	n.s.
CD14/BMP-4	7 (70 %)	8 (80 %)	589,00 (177,00 – 646,00)	558,50 (222,50 – 802,25)	n.s.
CD14/BMP-7	6 (60 %)	8 (80 %)	921,00 (17,80 – 1326,00)	783,50 (131,95 – 1657,00)	n.s.

<b>Parameter</b>	<b>n (präOP) = 10 (100 %)</b>	<b>n (postOP) = 10 (100 %)</b>	<b>präoperative mittlere Fluoreszenzintensitäten (präOP)</b>	<b>postoperative mittlere Fluoreszenzintensitäten (postOP)</b>	<b>p-Wert</b>
<b>N = 10 (100 %)</b>					
CD14/MIF	6 (60 %)	8 (80 %)	593,00 (92,98 – 2198,50)	112,00 (26,65 – 1661,00)	n.s.
CD14/Gremlin-1	7 (70 %)	8 (80 %)	242,50 (147,50 – 303,50)	242,50 (93,70 – 329,00)	n.s.
CD14/SDF-1	6 (60 %)	7 (70 %)	348,50 (101,38 – 473,00)	367,00 (130,00 – 760,00)	n.s.
CD14/CXCR4	5 (50 %)	7 (70 %)	444,00 (267,00 – 738,00)	713,00 (148,00 – 763,00)	n.s.
CD14/CXCR7	7 (70 %)	7 (70 %)	262,00 (180,50 – 341,50)	284,00 (137,00 – 355,00)	n.s.
CD14/CXCL14	5 (50 %)	7 (70 %)	708,00 (431,00 – 785,50)	571,00 (359,00 – 1126,00)	n.s.
CD14/TGF-β1	4 (40 %)	7 (70 %)	140,50 (108,75 – 166,25)	118,00 (86,70 – 141,00)	n.s.
<b>Thrombozytäre Oberflächenfärbungen (nicht permeabilisierte CD42b-positive Zellen)</b>					
CD42b/BMP-2	8 (80 %)	6 (60 %)	48,45 (22,28 – 68,40)	44,35 (34,88 – 66,40)	n.s.
CD42b/BMP-4	8 (80 %)	6 (60 %)	49,35 (18,95 – 66,70)	37,45 (19,18 – 99,88)	n.s.
CD42b/BMP-7	7 (70 %)	8 (80 %)	21,70 (16,10 – 25,50)	22,90 (14,98 – 43,18)	n.s.
CD42b/MIF	6 (60 %)	7 (70 %)	64,55 (13,39 – 273,00)	125,00 (8,95 – 904,00)	n.s.
CD42b/Gremlin-1	8 (80 %)	8 (80 %)	33,10 (9,03 – 131,55)	50,55 (37,45 – 103,03)	n.s.
CD42b/SDF-1	6 (60 %)	5 (50 %)	9,81 (7,16 – 15,23)	17,90 (11,75 – 38,60)	n.s.
CD42b/CXCR4	2 (40 %)	7 (70 %)	89,50 (53,50 – 167,25)	81,65 (59,20 – 235,00)	n.s.
CD42b/CXCR7	6 (60 %)	6 (60 %)	36,20 (30,75 – 43,80)	41,10 (30,90 – 61,50)	n.s.
CD42b/CXCL14	6 (60 %)	6 (60 %)	166,50 (120,00 – 175,25)	155,00 (81,75 – 275,75)	n.s.

Parameter	n (präOP) = 10 (100 %)	n (postOP) = 10 (100 %)	präoperative mittlere Fluoreszenzintensitäten (präOP)	postoperative mittlere Fluoreszenzintensitäten (postOP)	p-Wert
N = 10 (100 %)					
CD42b/TGF- $\beta$ 1	5 (50 %)	6 (60 %)	48,90 (33,50 – 60,20)	45,80 (29,90 – 63,65)	n.s.
<b>Intrazelluläre Thrombozytenfärbungen (permeabilisierte CD42b-positive Zellen)</b>					
CD42b/BMP-2	8 (80 %)	8 (80 %)	72,30 (27,65 – 106,00)	50,55 (36,60 – 76,98)	n.s.
CD42b/BMP-4	8 (80 %)	8 (80 %)	69,85 (39,95 – 89,13)	54,30 (26,18 – 86,78)	n.s.
CD42b/BMP-7	7 (70 %)	8 (80 %)	67,80 (20,80 – 94,20)	85,20 (18,20 – 159,75)	n.s.
CD42b/MIF	6 (60 %)	8 (80 %)	160,70 (6,81 – 1647,50)	181,10 (10,17 – 467,50)	n.s.
CD42b/Gremlin-1	7 (70 %)	8 (80 %)	49,50 (31,70 – 306,00)	122,50 (28,23 – 177,25)	n.s.
CD42b/SDF-1	6 (60 %)	6 (60 %)	10,29 (7,17 – 60,80)	33,10 (7,25 – 66,40)	n.s.
CD42b/CXCR4	7 (70 %)	7 (70 %)	85,10 (42,00 – 202,00)	72,25 (63,20 – 75,85)	<b>0,025</b>
CD42b/CXCR7	7 (70 %)	7 (70 %)	127,00 (50,80 – 341,00)	77,65 (66,23 – 105,25)	<b>0,028</b>
CD42b/CXCL14	6 (60 %)	7 (70 %)	153,00 (126,03 – 1148,50)	191,00 (114,00 – 347,00)	n.s.
CD42b/TGF- $\beta$ 1	6 (60 %)	7 (70 %)	81,05 (56,83 – 445,50)	68,10 (51,80 – 106,00)	n.s.

BMP – *engl. Bone Morphogenetic Protein*, dt. Knochenmorphogenetisches Protein; CD – *engl. Cluster of Differentiation*, dt. Cluster der Differenzierung; CXCL14 - CXC - Motiv Chemokinligand 14; CXCR4-CXC - Motiv Chemokinrezeptor 4; CXCR7 - CXC – Motiv Chemokinrezeptor 7; MIF- *engl. Macrophage Migration Inhibitory Factor*, dt. Makrophagen-Migrationsinhibierender Faktor; n.s. – nicht signifikant; präOP – präoperativ; postOP – postoperativ; SDF-1 - *engl. stroma cell- derived factor*, dt. Stromazellfaktor 1; TGF- $\beta$ 1 – *engl. Transforming Growth Factor  $\beta$ 1*, dt. transformierender Wachstumsfaktor  $\beta$ 1.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass nicht permeabilisierte CD14/TGF- $\beta$ 1-positive Zellen postoperativ eine signifikant geringere Expression aufweisen als präoperativ. Darüber hinaus konnten in permeabilisierten CD42b-positiven Zellen postoperativ signifikant reduzierte Expressionen von CXCR4 und CXCR7 gezeigt werden. Für die anderen untersuchten Marker BMP-2, BMP-4, BMP-7, MIF, Gremlin-1, SDF-1 und CXCL14 konnten keine signifikant unterschiedlichen Expressionen vor und nach der Operation aufgezeigt werden.

### 3.3 Vergleich von high-gradient und low-gradient Aortenklappenstenosen

#### 3.3.1 Patientencharakteristik

Es wurden an N = 32 (100 %) Patienten die Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner zwischen n = 18 (56,25 %) Patienten mit high-gradient AS und n = 14 (43,75 %) Probanden mit low-gradient AS verglichen. Die zugehörige Patientencharakteristik ist Tabelle 14 zu entnehmen. Die Kohorten wurden anhand des mittleren Druckgradienten über der Aortenklappe separiert, der sich folglich hochsignifikant zwischen beiden Klientelen unterschied ( $p < 0,001$ ). Der Median des mittleren Druckgradienten lag bei Patienten mit high-gradient AS bei 46,50 mmHg (IQA: 41,75 – 61,25), bei Patienten mit low-gradient AS bei 23,00 mmHg (IQA: 16,75 – 27,50). Bzgl. des Alters bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kohorten, da sich die Mediane und Interquartilsabstände sehr ähneln (high-gradient AS: 69,00 Jahre (IQA: 58,75 – 74,00); low-gradient AS: 69,50 Jahre (IQA: 60,50 – 73,25)). Die relative biologische Geschlechterverteilung war in beiden Kohorten ebenfalls ähnlich, mit etwas mehr weiblichem Geschlechteranteil in beiden Kohorten als männlichem (weiblich / männlich: high-gradient AS: 10 (55,56 %) / 8 (44,44 %); low-gradient AS: 8 (57,14 %) / 6 (42,86 %)). Mit einer Aortenklappenöffnungsfläche von  $< 1\text{cm}^2$  war ein Diagnosekriterium für eine hochgradige AS erfüllt, weshalb diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede

**Tabelle 14: Patientencharakteristik der Patienten mit high-gradient und low-gradient Aortenklappenstenose.** Angaben in n (%) oder Median und Interquartilsabstand (1. - 3. Quartil).

<b>Alle Patienten</b>	<b>High-gradient Aortenklappen- stenose</b>	<b>Low-gradient Aortenklappen- sterose</b>	<b>p-Wert</b>
<b>N = 32 (100 %)</b>	<b>n = 18 (56,25 %)</b>	<b>n = 14 (43,75 %)</b>	
Alter (in Jahren)	69,00 (58,75 – 74,00)	69,50 (60,50 – 73,25)	n.s.
Geschlecht (weiblich / männlich)	10 (55,56 %) / 8 (44,44 %)	8 (57,14 %) / 6 (42,86 %)	n.s.
<b>Transösophageale Echokardiographie</b>			
Mittlerer Druckgradient über der Aortenklappe (mmHG)	46,50 (41,75 – 61,25)	23,00 (16,75 – 27,50)	<b>&lt; 0,001</b>
Aortenklappen- öffnungsfläche (cm <sup>2</sup> )	0,73 (0,59 – 0,90)	0,75 (0,58 – 0,85)	n.s.
Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (%)	60,00 (60,00 – 71,00)	55,00 (29,50 – 60,00)	<b>0,004</b>
<b>Kardiovaskuläre Risikofaktoren</b>			
Arterielle Hypertonie	8 (44,44 %)	12 (85,71%)	<b>0,049</b>
Dislipoproteinämie	6 (33,33 %)	5 (35,71 %)	n.s.
Diabetes mellitus	3 (16,67 %)	2 (14,29%)	n.s.
Nikotinabusus	6 (33,33 %)	4 (28,57 %)	n.s.
Body Mass Index (kg/m <sup>2</sup> )	26,28 (22,63 – 30,83)	27,59 (23,51 – 31,49)	n.s.
<b>Komorbiditäten</b>			
Koronare Herzerkrankung	5 (27,78 %)	12 (85,71%)	<b>0,014.</b>
Niereninsuffizienz	2 (11,11 %)	1 (7,14 %)	n.s.
Vorhofflimmern	1 (5,56 %)	1 (7,14 %)	n.s.

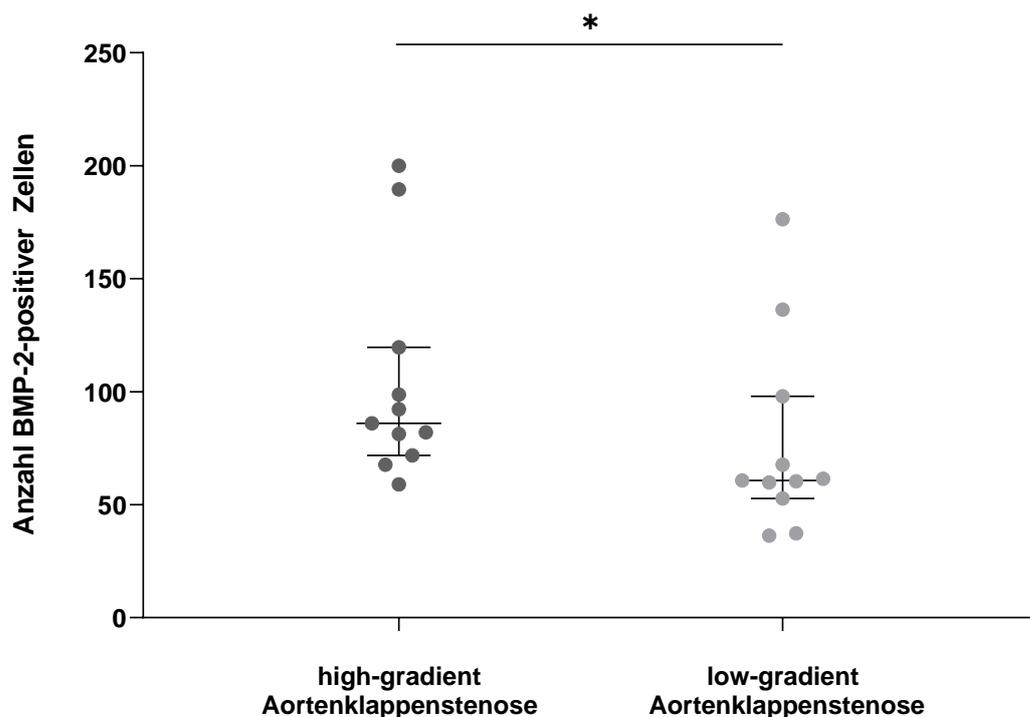
Alle Patienten	High-gradient Aortenklappen- stenose	Low-gradient Aortenklappen- sterose	p-Wert
<b>N=32</b>	<b>n = 18 (56,25 %)</b>	<b>n = 14 (43,75 %)</b>	
<b>Risikoscores</b>			
Framingham Risk Score (FRS) (%)	31,75 (22,60 – 48,88)	35,55 (19,50 – 65,85)	n.s.
EuroScore I (%), logistisch	5,12 (3,41 – 9,01)	7,03 (3,49 – 10,87)	n.s.
EuroScore II (%)	1,23 (1,03 – 1,81)	2,11(1,45 – 3,84)	<b>0,007</b>
STS-Score (%)	1,14 (0,70 – 1,72)	1,21 (0,87 – 1,56)	n.s.
<b>Zeitintervalle (in Tagen)</b>			
Erstsymptom bis Operation	374,00 (100,50 – 1298,25)	153,00 (36,50 – 777,50)	<b>&lt; 0,001</b>
Liegedauer	8,50 (8,00 – 11,25)	8,00 (7,00 – 9,25)	n.s.
<b>Follow Up (30 Tage)</b>			
Tod	1 (5,56 %)	0 (0,00 %)	n.s.
Restenose / Reoperation	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)	-
Myokardinfarkt	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)	-
Schlaganfall	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)	-
Rehospitalisierung	2 (11,11 %)	0 (0,00 %)	n.s.
<b>Follow Up (1 Jahr) Angaben bezogen auf die Ausgangspopulation</b>			
Tod	2 (11,11 %)	0 (0,00 %)	n.s.
Restenose/ Reoperation	2 (11,11 %)	0 (0,00 %)	n.s.
Myokardinfarkt	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)	-
Schlaganfall	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)	-
Rehospitalisierung	5 (27,78 %)	0 (0,00 %)	n.s.
Kombinierte MACE	3 (16,67 %)	0 (0,00 %)	n.s.

MACE - *engl. Major Adverse Cardiac Even(s)*, dt. schwerwiegende kardiale Komplikation wie Tod, Reoperation, Restenose, Rehospitalisierung, Myokardinfarkt und Schlaganfall; STS - *engl. The Society of Thoracic Surgeons*, dt. Gesellschaft der Thoraxchirurgen.

zwischen den Gruppen zu beobachten waren (high-gradient AS: 0,73 cm<sup>2</sup> (IQA: 0,59 – 0,90); low-gradient AS: 0,75 cm<sup>2</sup> (IQA: 0,58 – 0,85)). Ein deutlicher signifikanter Unterschied zeichnete sich für die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) beider Kohorten ab; mit einer LVEF in Patienten mit low-gradient AS von 55 % (IQA: 29,50 – 60,00) und 60,00 % (IQA: 60,00 – 71,00) bei Patienten mit high-gradient AS ( $p = 0,004$ ). Die kardialen Risikofaktoren Dyslipoproteinämie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus und erhöhter Body Mass Index waren in beiden Kohorten ausgewogen vertreten, mit Ausnahme der arteriellen Hypertonie, die in high-gradient AS mit einer relativen Häufigkeit von 44,44 % ( $n = 8$ ) signifikant geringer vorkam, als in low-gradient Patienten mit einer fast doppelt so hohen relativen Häufigkeit von 85,71 % ( $n = 12$ ) ( $p = 0,049$ ). Auch eine koronare Herzerkrankung war in low-gradient AS mit 85,71 % ( $n = 12$ ) deutlich häufiger vertreten als in der high-gradient AS mit 27,78 % ( $n = 5$ ) ( $p = 0,014$ ). Dies führte auch konsekutiv zu einem signifikant erhöhten EuroScore II in der low-gradient Kohorte mit 2,11 % (IQA: 1,45 – 3,84) im Vergleich zu high-gradient AS mit 1,23 % (IQA: 1,03 – 1,81) ( $p = 0,007$ ). In den weitem bestimmten Risikoscores EuroScore I, STS-Score und Framingham-Risk-Score zeichneten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen ab. Deutlich verlängert war das Zeitintervall Erstsymptom bis Operation in der high-gradient Kohorte mit 374,00 Tagen (IQA: 100,50 – 1298,25) im Vergleich zu 153,00 Tagen (IQA: 36,50 – 777,50) in Patienten mit low-gradient AS ( $p < 0,001$ ). Im Vergleich zu high-gradient Patienten trat nach 30 Tagen und einem Jahr kein MACE in der low-gradient Kohorte auf. Die Unterschiede sind jedoch nicht statistisch signifikant. In der high-gradient Kohorte mussten zwei Patienten (11,11 %) innerhalb von 30 Tagen nach Operation rehospitalisiert werden, einer (5,56 %) verstarb. Innerhalb eines Jahres nach Operation mussten drei weitere, also insgesamt 5 Patienten (27,78 %) mit ursprünglicher high-gradient AS rehospitalisiert werden, zwei (11,11 %) dieser Patienten mussten nochmals operiert werden, ein weiterer (5,56 %) verstarb. Bei drei Patienten (16,67 %) mit präoperativer high-gradient AS traten kombinierte MACE auf.

### 3.3.2 Valväre Expressionsmuster der BMPs und ihrer Interaktionspartner von Patienten mit high-gradient und low-gradient Aortenklappenstenose

Es wurden die Expressionen von BMP-2, -4, -7, MIF, Gremlin-1, TGF- $\beta$ 1, CD3 und CD68 im Herzklappengewebe untersucht. Im Rahmen des Vergleichs fiel eine signifikant vermehrte Expression von BMP-2-positiven Zellen im Herzklappengewebe von Patienten mit high-gradient AS im Vergleich zu Patienten mit low-gradient AS auf, wie in Abbildung 22 ersichtlich ( $p = 0,047$ ).



**Abbildung 22: High-gradient Aortenklappenstenosen zeigen im Vergleich zu low-gradient Aortenklappenstenosen eine signifikant verstärkte Expressionen von Bone Morphogenetic Protein 2 im Aortenklappengewebe.** Die Abbildung zeigt Ergebnisse immunhistochemischer Auswertungen. Es zeigt sich eine signifikant reduzierte Expression von Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) positiven Zellen in low-gradient Aortenklappenstenosen (AS) im Vergleich zu high-gradient AS ( $p = 0,047$ ). Abgebildet sind die einzelnen Zählungen sowie der Median und Interquartilsabstände (1. – 3. Quartil).

Es sind deutliche Anfärbungen von BMP-2-positiven Zellen im Herzklappengewebe zu verzeichnen. Neben BMP-2 konnten auch BMP-4-, BMP-7-, MIF-, TGF- $\beta$ 1- und Gremlin-1-positive Zellen im Herzklappengewebe von Patienten mit high-gradient und low-gradient AS nachgewiesen werden. Ihre Expressionsmuster sind in Tabelle 15 aufgelistet.

**Tabelle 15: Tabellarische Übersicht immunhistochemischer Färbungen des Aortenklappengewebes von Patienten mit high-gradient und low-gradient Aortenklappenstenose. Angaben in n (%) oder Median und Interquartilsabstand (1.- 3.Quartil).**

Parameter	n (HG-AS)	n (LG-AS)	High-gradient Aortenklappenstenose (HG-AS)	Low-gradient Aortenklappenstenose (LG-AS)	p-Wert
<b>N = 24 (100 %)</b>	<b>= 11 (100 %)</b>	<b>= 13 (100 %)</b>			
<b>Positive Zellen im Aortenklappengewebe</b>					
CD3	11 (100 %)	12 (92,31 %)	2,67 (0,67 – 11,33)	3,25 (1,75 – 6,63)	n.s.
CD68	11 (100 %)	12 (92,31 %)	3,67 (2,33 – 20,33)	5,17 (1,58 – 12,50)	n.s.
BMP-2	11 (100 %)	11 (84,62 %)	86,00 (71,75 – 119,67)	60,67 (57,75 – 98,00)	<b>0,047</b>
BMP-4	9 (81,82 %)	10 (76,92 %)	87,33 (25,34 – 161,50)	35,67 (28,75 – 53,75)	n.s.
BMP-7	11 (100 %)	11 (84,62 %)	39,33 (3,67 – 101,00)	8,67 (0 – 38,67)	n.s.
MIF	11 (100 %)	10 (76,92 %)	63,67 (23,33 – 124,67)	46,17 (31,17 – 56,59)	n.s.
Gremlin-1	11 (100 %)	12 (92,31 %)	0,33 (0 – 1,67)	1 (0 – 41,34)	n.s.
TGF- $\beta$ 1	10 (90,91 %)	12 (92,31 %)	49,83 (24,50 – 118,42)	31,57 (17,84 – 41,34)	n.s.
<b>Positive Zellen im aortalseitigen Aortenklappengewebe</b>					
CD3	7 (63,64 %)	7 (53,85 %)	1,33 (0 – 7,33)	3,00 (1,00 – 4,00)	n.s.
CD68	7 (63,64 %)	5 (38,46 %)	5,33 (1,67 – 12,33)	7,00 (4,84 – 9,34)	n.s.
BMP-2	8 (72,73 %)	7 (53,85 %)	120,17 (63,50 – 154,25)	57,33 (45,00 – 99,00)	n.s.
BMP-4	8 (72,73 %)	7 (53,85 %)	108,67 (21,92 – 172,75)	35,00 (32,00 – 69,00)	n.s.
BMP-7	6 (54,55 %)	6 (46,15 %)	71,33 (20,92 – 135,25)	29,34 (8,50 – 60,34)	n.s.

Parameter	n (HG-AS)	n (LG-AS)	High-gradient Aortenklappenstenose (HG-AS)	Low-gradient Aortenklappenstenose (LG-AS)	p-Wert
<b>N = 24</b>	<b>= 11 (100 %)</b>	<b>= 13 (100 %)</b>			
MIF	6 (54,55 %)	7 (53,85 %)	87,00 (27,75 – 141,92)	49,67 (33,67 – 59,33)	n.s.
Gremlin-1	8 (72,73 %)	7 (53,85 %)	0 (0 – 0,33)	0 (0 – 1,33)	n.s.
TGF- $\beta$ 1	8 (72,73 %)	9 (69,23 %)	52,00 (19,17 – 152,58)	23,67 (14,00 – 42,50)	n.s.
<b>Positive Zellen im ventrikulärseitigen Aortenklappengewebe</b>					
CD3	7 (63,64 %)	7 (53,85 %)	1,33 (0 – 2,67)	1,00 (0 – 6,33)	n.s.
CD68	7 (63,64 %)	5 (38,46 %)	6,67 (1,33 – 12,33)	8,34 (4,5 – 32,17)	n.s.
BMP-2	8 (72,73 %)	8 (61,54 %)	83,00 (42,33 – 123,50)	76,59 (31,50 – 99,75)	n.s.
BMP-4	8 (72,73 %)	7 (53,85 %)	54,34 (28,67 – 157,33)	37,00 (32,00 – 103,67)	n.s.
BMP-7	6 (54,55 %)	6 (46,15 %)	32,34 (16,75 – 63,42)	48,00 (16,75 – 75,75)	n.s.
MIF	6 (54,55 %)	7 (53,85 %)	69,83 (46,75 – 158,92)	68,67 (51,33 – 79,33)	n.s.
Gremlin-1	8 (72,73 %)	7 (53,85 %)	0 (0 – 0,75)	0,33 (0 – 1,33)	n.s.
TGF- $\beta$ 1	8 (72,73 %)	9 (69,23 %)	60,33 (25,33 – 74,50)	25,00 (18,17 – 48,00)	n.s.

BMP – *engl. Bone Morphogenetic Protein*, dt. Knochenmorphogenetisches Protein; CD – *engl. Cluster of Differentiation*, dt. Cluster der Differenzierung; HG-AS – high-gradient Aortenklappenstenose (mittlerer Druckgradient über der Aortenklappe  $\geq$  40 mmHg); LG-AS – low-gradient Aortenklappenstenose (mittlerer Druckgradient über der Aortenklappen  $<$  40 mmHg); MIF- *engl. Macrophage Migration Inhibitory Factor*, dt. Makrophagen-Migrationsinhibierender Faktor; n.s. – nicht signifikant; TGF- $\beta$ 1 – *engl. Transforming Growth Factor  $\beta$ 1*, dt. transformierender Wachstumsfaktor  $\beta$ 1.

Außer der Expression von BMP-2 zeigten sich keine signifikant unterschiedlichen Expressionen der beschriebenen Marker im Herzklappengewebe zwischen high-gradient und low-gradient AS. Darüber hinaus zeigten sich die regionalen Expressionen aortal und ventrikulär nicht signifikant unterschiedlich zwischen der high-gradient und der low-gradient Kohorte. Im Herzklappengewebe waren deutliche Anfärbungen von BMP-2 und BMP-4 als auch von MIF, und moderate Anfärbungen von BMP-7 und TGF- $\beta$ 1 zu verzeichnen (Tabelle 15). Mit einem Median von 87,33 BMP-4-positiven Zellen (IQA: 25,34 – 161,50) und 86,00 BMP-2-positiven Zellen (IQA: 71,75 – 119,67) in der high-gradient Kohorte bzw. 35,67 BMP-4-positiven Zellen (IQA: 28,75 – 53,75) und 60,67 BMP-2-positiven Zellen (IQA: 57,75 – 98,00) im Gewebe von Patienten mit low-gradient AS, waren für BMP-4 und BMP-2 die stärksten Anfärbungen zu verzeichnen. Die Expressionen von BMP-4 unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Kohorten high-gradient und low-gradient AS (Power = 38,3 %). Ebenfalls deutliche Anfärbungen zeigte MIF mit einem Median von 63,67 positiven Zellen (IQA: 23,33 – 124,67) in high-gradient AS und 46,17 positiven Zellen (IQA: 31,17 – 56,59) in der low-gradient Kohorte, die sich aber nicht signifikant zwischen den beiden Kohorten unterschieden (Power = 36,5 %). Sehr geringe Anfärbungen waren für Gremlin-1 mit im Median 0,33 positiven Zellen (IQA: 0 – 1,67) im Gewebe von Patienten mit high-gradient AS bzw. einer positiven Zelle (IQA: 0 – 41,34) in low-gradient AS zu verzeichnen, dessen Anfärbungen sich nicht signifikant zwischen den beiden Kohorten unterschieden (Power > 80 %). Ebenfalls waren nur wenige CD3- und CD68-positive Zellen im Aortenklappengewebe nachweisbar (Median CD3-positive Zellen: high-gradient AS: 2,67 (IQA: 0,67 – 11,33) / low gradient-AS: 3,25 (IQA: 1,75 – 6,63); Median CD68-positive Zellen: high-gradient AS: 3,67 (IQA: 2,33 – 20,33) / low-gradient AS: 5,17 (IQA: 1,58 – 12,50)). Die Anfärbungen von BMP-7 und TGF- $\beta$ 1 präsentierten sich im Vergleich zu den valvulären Expressionen von BMP-2 und BMP-4 in high-gradient AS moderat, mit im Median 39,33 BMP-7-positiven Zellen (IQA: 3,67 – 101,00) und 49,83 TGF- $\beta$ 1-positiven Zellen (IQA: 24,50 – 118,42). Die Expression im Gewebe von Patienten mit low-gradient AS war von TGF $\beta$ -1 mit im Median 31,57 positiven

Zellen (IQA: 17,84 – 41,34) ebenfalls moderat, wohingegen sich die Expression von BMP-7 im Gewebe dieser Patienten sich mit im Median 8,67 BMP-7-positiven Zellen (IQA: 0 – 38,67) sehr gering zeigte. Vergleiche ihrer aortalen und ventrikulären Expressionsmuster zwischen Patienten mit high-gradient und low-gradient AS waren nicht signifikant (Power TGF- $\beta$ 1 = 19 %, Power BMP-7 = 27,4 %). Die regionalen aortalen und ventrikulären Verteilungsmuster der untersuchten Marker zeigten sich vergleichbar mit Ausnahme von BMP-7, das aortalseitig in der high-gradient Kohorte mit im Median 71,33 positiven Zellen (IQA: 20,92 – 135,25) im Verhältnis zur Expression ventrikulär (high-gradient AS: 32,34 (IQA: 16,75 – 63,42)) bzw. der gesamten Herzklappe (high-gradient AS: 39,33 (IQA: 3,67 – 101,00)), deutlich stärkere Anfärbungen aufwies. In der low-gradient Kohorte lag die Anfärbung mit im Median 29,34 BMP-7-positiven Zellen (IQA: 8,50 – 60,34) vergleichbar zu den anderen Expressionen im Herzklappengewebe (Median BMP-7-positiver Zellen in Patienten mit low-gradient AS: ventrikulär: 48,00 (IQA: 16,75 – 75,75) / gesamte Herzklappe: 8,67 (0 – 38,67)). Die Expressionen der CD3- und CD68-positiven Zellen im Herzklappengewebe waren sehr gering (Tabelle 15) und unterscheiden sich nicht signifikant zwischen den Kohorten high-gradient und low-gradient AS (Power CD3 = 5,5 %, Power CD68 = 9,4 %).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die valvuläre Expression von BMP-2 im Patienten mit high-gradient AS im Vergleich zu low-gradient AS signifikant erhöht ist ( $p = 0,047$ ). Für BMP-4, BMP-7, MIF, Gremlin-1, CD3, CD68 und TGF- $\beta$ 1 zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kohorten. Des Weiteren zeigen sich weder aortal noch ventrikulär signifikant unterschiedliche Expressionen der untersuchten Marker zwischen high-gradient AS und low-gradient AS, es muss jedoch die geringe Power beachtet werden.

## 4 Diskussion

Das Ziel dieser Dissertation ist, das Vorkommen der BMPs und ihrer Interaktionspartner im Aortenklappengewebe und Blut von Patienten mit hochgradiger, kalzifizierter AS genauer zu charakterisieren. Die Primärhypothese ist dabei, dass sich die Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner im Herzklappengewebe und Blut von Patienten mit high-gradient und low-gradient AS als auch zwischen rpAS und lpAS signifikant unterscheiden. Um diese Hypothese genauer zu untersuchen, erfolgten immunhistochemische Färbungen des operativ explantierten, hochgradig stenosierten Aortenklappengewebes sowie durchflusszytometrische Blutanalysen erkrankter Patienten.

### 4.1 Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner im Herzklappengewebe von Patienten mit rasch und langsam progredienter Aortenklappenstenose

Im Rahmen der immunhistochemischen Färbungen konnten regional unterscheidliche Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner im Herzklappengewebe von Patienten mit rpAS und lpAS dargelegt werden (Abbildungen 10 - 15). So zeigte sich, dass TGF- $\beta$ 1 im aortalen Herzklappengewebe von Patienten mit rpAS signifikant erniedrigt exprimiert ist im Vergleich zu Patienten mit lpAS ( $p = 0,035$ , Abbildungen 14 und 15). Ebenso wurde sowohl festgestellt, dass BMP-2 im aortalen Herzklappengewebe von Patienten mit rpAS im Vergleich zu Patienten mit lpAS signifikant erniedrigt exprimiert ist ( $p = 0,021$ , Abbildungen 10 und 11), als auch, dass BMP-7 im ventrikulären Herzklappengewebe von Patienten mit rpAS im Vergleich zu Patienten mit lpAS signifikant verstärkt exprimiert ist ( $p = 0,042$ , Abbildungen 12 und 13). Signifikant for trend zeigte sich die verstärkte Expression von Gremlin-1 im Herzklappengewebe von Patienten mit lpAS im Vergleich zu Patienten mit rpAS ( $p = 0,052$ , Abbildung 18). Wurde die Gesamtheit der Herzklappe betrachtet, konnten keine signifikanten Unterschiede der Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner im Herzklappengewebe zwischen Patienten mit rpAS und lpAS aufgezeigt werden. Dies ist auf die statistische Power von

unter 80 % zurückzuführen. Es konnten jedoch regional signifikant unterschiedliche Expressionen von BMP-2, BMP-7 und TGF- $\beta$ 1 im Herzklappengewebe von Patienten mit rpAS und lpAS gezeigt werden (Abbildungen 10 - 15). Für BMP-2 und TGF- $\beta$ 1 ist die Induktion von Fibrose und osteogener Differenzierung auf Gen- und Zellebene, teilweise im Herzklappengewebe, teilweise in Mausmodellen und Zelllinien, vorbeschrieben (32, 73, 75, 77, 78). Mohler et al. konnten in humanen, chirurgisch explantierten Aorten- und Mitralklappen die Expression von BMP-2 und BMP-4, vorrangig in Bereichen mit lamellären Knochenformationen, nachweisen (32). Da die BMPs potente osteogene Morphogene sind, ist die beschriebene Kolo-kalisation besonders hervorzuheben und legt ein durch die BMPs induziertes lokales, osteogenes Remodelling nahe (32, 87). Jedoch unterscheidet diese Studie nicht zwischen der Expression im Aorten- und Mitralklappengewebe oder der Expression in stenotischen und insuffizienten Herzklappen. Sie erlaubt somit keine hinreichenden Schlüsse auf das Vorkommen der BMPs im hochgradig stenotisierten, kalzifizierten Aortenklappengewebe, wie in der vorliegenden Arbeit. Bereits Thubrikar et al. beschrieben die Kalzifikation in exzidierten Aortenklappen nicht als homogenen Vorgang der gesamten Herzklappe, sondern als inhomogenen Prozess mit regional unterschiedlichen Ausprägungen (130). Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht, ob sich die aortalen und ventrikulären Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner im Herzklappengewebe signifikant unterscheiden. Mikroskopisch entsteht der Eindruck, dass sich die aortal- und ventrikulärseitigen Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner im Aortenklappengewebe unterscheiden; statistische Signifikanz war jedoch nicht gegeben (Abbildungen 10 - 18, Tabelle 9). Hierbei ist jedoch die Power von unter 80 % dieser Daten zu beachten, die noch keine Interpretation dieser Daten erlaubt und eine Untersuchung an einer größeren Patientenkohorte notwendig macht. Es erfolgte trotzdem ein Vergleich der aortalseitigen und ventrikulärseitigen Expressionen der untersuchten Marker in rpAS und lpAS, da neben dem von Thubrikar et al. beschriebenen regional unterschiedlichen Kalzifikationsprozessen auch in Mausmodellen ein regional unterschiedliches

Remodelling aufgezeigt werden konnte (44, 68-71). Dasselbe gilt für atherosklerotische Gefäße (51, 52). Darüber hinaus ist bekannt, dass aortale und ventrikuläre valvuläre endotheliale Zellen unterschiedlichen mechanischen Beanspruchungen ausgesetzt sind, was eine Auswertung der regionalen Expressionen der BMPs und Ihrer Interaktionspartner im Herzklappengewebe interessant macht, da bereits Sato et al. im Tiermodell eine Beeinflussung der Expression von BMP-2 und BMP-4, nicht aber von BMP-7, durch valvulären Scherstress beschreiben (131, 132). Das regional heterogene Remodelling ist folglich mehrfach vorbeschrieben, weshalb untersucht wurde, ob unterschiedliche regionale Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner mit einem unterschiedlichen klinischen Erscheinungsbild wie einer rpAS oder einer lpAS einhergehen. Es wurde die Unterteilung in aortal und ventrikulär gewählt, da sie einen pathophysiologischen Bezug hat. Zum einen durch die dort unterschiedlich wirkenden Scherkräfte, zum anderen durch sich ähnelnde aortale Prozesse des kardialen arteriosklerose-ähnlichen Remodellings mit den regional unterschiedlichen, in der Intima der Gefäße ablaufenden, arteriosklerotischen Veränderungen im Rahmen des Krankheitsprogresses der Gefäßarteriosklerose (15, 51, 52, 131). Darüber hinaus stellt die Differenzierung zwischen aortal und ventrikulär eine objektive und reproduzierbare anatomische Zuordnung dar. Die vorliegende Forschungsarbeit ist die erste, welche die aortalseitigen und ventrikulärseitigen Expressionen von BMP-2, BMP-4, BMP-7, CD3, CD68, Gremlin-1, MIF und TGF- $\beta$ 1 im humanen, kalzifizierten, hochgradig stenosierte Aortenklappengewebe verglichen hat. In Zusammenschau der Befunde von Mohler et al., die BMP-2 und BMP-4 in Kollokalisierung zu kalzifizierten Umbauprozessen der Herzklappe nachwiesen, Thubrikar et al., die einen heterogenen Kalzifikationsprozess der Aortenklappe beschrieben und der mittels vorliegender Arbeit nachgewiesenen verstärkten Expression von BMP-2 im aortalseitigen Herzklappengewebe von Patienten mit lpAS im Vergleich zu rpAS, ist davon auszugehen, dass das sich vor allem aortal abspielende Remodelling des kalzifizierten Aortenklappengewebes auf BMPs zurückzuführen ist (Abbildungen 10 – 12 und 16) (130). Bestärkt wird diese

Schlussfolgerung dadurch, dass im Rahmen dieser Arbeit neben BMP-2 auch hohe Expressionen von BMP-4 und BMP-7 im kalzifizierten Herzklappengewebe nachgewiesen wurden (Abbildungen 12, 13 und 16). Die von Mohler et al. gezeigte benachbarte Expression von BMP-2 und BMP-4 in zu Lymphozyten infiltrierten Bereichen der Herzklappe, legt eine Wechselwirkung, insbesondere eine inflammatorisch getriggerte Expression der BMPs, nahe (32, 133). Dies deckt sich mit Voruntersuchungen von Kercheva et al., die bereits Korrelationen zwischen BMP-2 Serumexpressionen und inflammatorischen Markern bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt beschrieben, als auch mit den im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Korrelationen der aortalen Expressionen inflammatorischer Zellmarker mit Markern der osteogenen Differenzierung und Fibrose (134). So besteht beispielsweise eine positive Korrelation zwischen CD3- und TGF- $\beta$ 1- sowie eine sehr stark positive Korrelation zwischen CD68- und TGF- $\beta$ 1-positiven Zellen im aortalseitigen Herzklappengewebe (Tabelle 12). Werden jedoch die absoluten Zahlen betrachtet, fällt die geringe Anfärbung CD3- und CD68-positiver Zellen im Vergleich zu TGF- $\beta$ 1-positiven Zellen im Herzgewebe von Patienten mit AS auf (Abbildungen 8, 9, 14 und 15, Tabelle 9). Vor dem Hintergrund der Voruntersuchungen von Kim et al., die *in-vitro* durch Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 eine anfänglich verstärkte Migration von Makrophagen und nach langanhaltender Stimulation eine reduzierte Zellmigration dieser CD68-positiven Zellen nachweisen konnten, ist die geringe Anzahl CD68-positiver Zellen bei gleichzeitig vermehrter Expression TGF- $\beta$ 1-positiver Zellen im Herzklappengewebe erklärt, da davon auszugehen ist, dass die verringerte Expression CD68-positiver Zellen Ausdruck einer langanhaltenden Stimulation durch TGF- $\beta$ 1 ist (135, 136). Ein vergleichbares Phänomen wurde durch El-Sherbiny et al. beobachtet, die an Untersuchungen multipotenter Stromazellen nach CD3-vermittelter Stimulation inflammatorischer Zellen *in-vitro* nicht nur eine verringerte T-Zell Proliferation, sondern auch eine vermehrte TGF- $\beta$ 1 Sekretion nachweisen konnten (137). Es ist folglich anzunehmen, dass die geringe Anzahl CD3-positiver Zellen im Herzklappengewebe bei gleichzeitig verstärkter TGF- $\beta$ 1 Expression Ausdruck der durch El-Sherbiny et al. beschriebenen immunmodulatorischen Fähigkeit von TGF- $\beta$ 1 ist (137). Dies

erklärt des Weiteren die positiven Korrelationen zwischen TGF- $\beta$ 1- und CD3-positiven Zellen im Herzklappengewebe (137). In Zelllinien konnten ebenfalls eine Interaktion zwischen TGF- $\beta$ 1 und Monocyte Chemoattractant Protein -1 (MCP-1), eines der am stärksten auf Monozyten chemotaktisch wirkenden Chemokine, nachgewiesen werden, was den immunmodulatorischen Effekt von TGF- $\beta$ 1 unterstreicht (138-140). Es ist davon auszugehen, dass die Korrelationen aortaler TGF- $\beta$ 1 positiver Zellen mit CD3- bzw. CD68-positiven Zellen Ausdruck dieses in Zelllinien nachgewiesenen Pathomechanismus sind, bzw. der TGF- $\beta$ 1 vermittelten Interaktion CD3- und CD68-positiver Zellen mit resultierender Inflammation und Infiltration des Aortenklappengewebes. Die in dieser Arbeit dargelegte aortale Expression von TGF- $\beta$ 1 deckt sich mit den Daten von Akat et al., die im Mausmodell eine verstärkte aortale TGF- $\beta$ 1-vermittelte Kalzifikation zeigen konnten, was nicht nur darauf schließen lässt, dass TGF- $\beta$ 1 als inflammatorischer Modulator im Entstehungsprozess der AS beteiligt ist, sondern auch als Therapieangriffspunkt sinnvoll erscheint (37). Der Nachweis inflammatorischer Marker im Gewebe humaner, stenosierter, bi- und trikuspidaler Aortenklappen wurde auch von Steiner et al. an einer kleinen Kohorte von 15 Patienten erbracht (133). Im Gegensatz zu Steiner et al., konnten im Rahmen dieser Arbeit jedoch interindividuell unterschiedliche Expressionen inflammatorischer Marker im Herzklappengewebe aufgezeigt werden. Dies ist nicht nur Ausdruck des heterogenen Krankheitsprozesses der AS, sondern deutet vielmehr darauf hin, dass unterschiedliche pathophysiologische Mechanismen im Entstehungsprozess der AS zugrunde liegen, da abhängig von deren klinischen Präsentationen signifikant unterschiedliche pathophysiologische Expression der BMPs und ihrer Interaktionspartner im Herzklappengewebe nachweisbar sind (Tabelle 9). So unterscheiden sich beispielsweise die Expressionen von TGF- $\beta$ 1, BMP-2 und BMP-7 abhängig vom Krankheitsprogress der AS (Abbildungen 10 - 15). Die Voruntersuchungen deuten vor allem auf eine Beeinflussung valvulärer Zellen hin, was eine Erklärung dafür ist, warum im aortalen Herzklappengewebe signifikant erhöhte Anfärbungen von TGF- $\beta$ 1 bei Patienten mit lpAS im Vergleich zu rpAS aufgezeigt werden konnten (Abbildungen 14 und 15) (118,

141). So konnten Wang et al. beispielsweise eine erhöhte thrombozytäre Ausschüttung von TGF- $\beta$ 1 durch valvulären Scherstress im Mausmodell darlegen, was die regional unterschiedliche Anfärbung von TGF- $\beta$ 1 im aortalen Herzklappengewebe, aufgrund der dort wirkenden Scherkräfte, erklärt (131, 142). Äußerst interessant in diesem Zusammenhang ist, dass sowohl eine positive Korrelation zwischen aortaler TGF- $\beta$ 1- und BMP-2-Expression im Herzklappengewebe gezeigt werden konnte, als auch eine erniedrigte aortale Expression sowohl von TGF- $\beta$ 1 als auch BMP-2 im Herzklappengewebe von Patienten mit rpAS im Vergleich zu lpAS (Abbildungen 10, 11, 14 und 15, Tabelle 9). Eine pathophysiologische Erklärung für die Korrelation zwischen der BMP-2-Expression und der TGF- $\beta$ 1-Expression ist, dass proinflammatorisches oxLDL *in-vitro* und im Mausmodell nicht nur TGF- $\beta$ 1 Signalling, sondern auch BMP-2 Signalling induzieren kann, wie Yan et al., Tayler et al. und Miller et al. zeigen konnten (73, 143, 144). Des Weiteren ist bereits vorbeschrieben, dass es durch BMP-2 vermittelt, ventrikulärseitig zu einer verstärkten Anreicherung subendothelialer Matrix, aortalseitig jedoch zu einer Gewebeauflockerung mit Lipid- und Kalkablagerungen kommt (44, 53, 56, 66-68, 70). Für TGF- $\beta$ 1 sind sowohl anti- als auch proinflammatorische Eigenschaften vorbeschrieben (145). Der wahrscheinlichste Zusammenhang, warum erhöhte Expressionen von BMP-2 als auch TGF- $\beta$ 1 im aortalen Herzklappengewebe mit einem verlangsamten Krankheitsprogress einhergehen, besteht in deren Interaktion mit MIF und Gremlin-1 (93-101, 146).

Für Gremlin-1 konnte *in-vitro* eine direkte Bindung an die BMPs gezeigt werden sowie die Regulation von MIF im Mausmodell, was zu einer erhöhten Plaquestabilität führt (101, 102). Eine Hemmung von MIF in Modellen atherosklerotischer Mäuse führte zu einer reduzierten Makrophageninfiltration und einer geringeren Lipidablagerung in die Gefäßwand, einer verstärkten Synthese von Kollagen und glatten Muskelzellen sowie einer verringerten Expression von inflammatorischen Transkriptionsfaktoren (51, 52, 54). Dies zeigt, dass MIF atherosklerotische Krankheitsprozesse negativ beeinflusst und sich seine Hemmung in atherosklerotischen Gefäßen prognostisch günstig auswirkt (51). Die deutliche Anfärbung MIF-positiver Zellen im

Herzklappengewebe deutet vor dem Hintergrund der Voruntersuchungen auf einem vergleichbaren Effekt von MIF in der Pathogenese der AS hin, also eine durch MIF getriggerte Kalzifikation und konsekutive Stenosierung humaner Aortenklappen (Abbildung 17) (50-52, 54). Eine vermehrte Expression von Gremlin-1 im Herzklappengewebe mit konsekutiv verstärkter Hemmung von MIF erklärt somit aufgrund der *in-vitro* und *in-vivo* dargelegten Zusammenhänge ein verzögertes Voranschreiten der AS. Folglich ist auch, trotz signifikant erhöhter Anzahl BMP-2-positiver Zellen ein prognostisch günstiger Aspekt von BMP-2 denkbar, da ebenfalls sein Antagonist Gremlin-1 erhöht ist. Der prognostisch günstige Aspekt wird unterstrichen, da eine positive Korrelation zwischen der Anzahl BMP-2-positiver Zellen und der Aortenklappenöffnungsfläche sowie eine negative Korrelation zwischen der Anzahl BMP-2 positiver Zellen der Herzklappe und dem Framingham Risk Score dargelegt werden konnte (Tabelle 12). Der Framingham Risk Score gilt als Prediktor der 10-Jahres-Mortalität aufgrund kardialer Ereignisse (30). Eine negative Korrelation mit der Anzahl BMP-2 positiver Zellen im Herzklappengewebe deutet folglich auf einen prognostisch günstigen Effekt von BMP-2 im Rahmen aortaler Kalzifikationsprozesse hin. Die deutliche Anfärbung von BMP-2 im Herzklappengewebe von Patienten mit AS zeigt an, dass BMP-2 im Pathomechanismus der AS involviert ist. Die aortal signifikant unterschiedliche Expression zwischen Patienten mit rpAS und lpAS deuten zwar auf einen prognostisch günstigen, nicht aber einen rein prophylaktischen Effekt von BMP-2 hin, da es die Entstehung einer AS nicht verhindert, aber die Zeitspanne von Symptombeginn bis zur Notwendigkeit einer Operation verlängert. BMP-2 scheint folglich die AS zu induzieren, aber dennoch einen prognostisch günstigen Verlauf anzuzeigen (132, 147).

Eine positive Korrelation zwischen BMP-2- und MIF-positiver Zellen explantierter Herzklappen, was bisher in humanem Gewebe noch nicht vorbeschrieben ist, deutet auf eine im Aortenklappengewebe stattfindende Induktion von BMP-2 und MIF durch oxLDL hin, wie sie von Yan et al, Tayler et al. und Miller et al. *in-vitro* und im Mausmodell vorbeschrieben sind (73, 143, 144). Auf einen kausalen Zusammenhang kann aufgrund des Studiendesigns im Rahmen

dieser Arbeit nicht geschlossen werden; es ist jedoch anzunehmen, dass die genannten Korrelationen im menschlichen Gewebe der stenosierten Aortenklappen Ausdruck der *in-vitro* bzw. in Mausmodellen gezeigten Vorgänge sind.

Im ventrikelseitigen Herzklappengewebe konnte eine erhöhte Expression BMP-7-positiver Zellen in rpAS, im Vergleich zu lpAS, nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass eine erhöhte Expression von BMP-7 im Herzklappengewebe ein schnelles Voranschreiten der Erkrankung mit zeitnaher Notwendigkeit einer Operation anzeigt. Es ist davon auszugehen, dass der Nachweis von BMP-7 im kalzifizierten Aortenklappengewebe Ausdruck des Geweberemodelings ist, wie es bereits in atherosklerotischen Gefäßen beschrieben wurde (77). In humanen proximalen Tubuluszellen ist bereits vorbeschrieben, dass BMP-7 das TGF- $\beta$ 1-Signalling inhibieren kann (148). Im Mausmodell führte BMP-7 eher zu einer Reduktion von Inflammation und atherosklerotischen Plaques und zeigte antifibrotische Eigenschaften mit einer funktionellen Wiederherstellung des Gewebes (149). Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse ist signifikant erhöhte ventrikuläre Expression BMP-7-positiver Zellen im Herzklappengewebe von Patienten mit rpAS im Vergleich zu Patienten mit lpAS weniger ein BMP-7-induziertes Voranschreiten der Erkrankung, sondern eher eine reaktiv erhöhte Ausschüttung von BMP-7 mit dem Ziel einer Gewebereparatur. Diese These wird durch Untersuchungen von Davies et al. an niereninsuffizienten Mäusen unterstützt, die eine reduzierte atherosklerotische Differenzierung der Gefäße nach Therapie mit BMP-7 nahelegen (150). Das Vorkommen von BMP-7 im ventrikulären Herzklappengewebe stellt folglich eine Erklärung dar, warum ventrikelseitig keine Kalkablagerung stattfindet (Abbildungen 12 und 13)(53). Im Widerspruch zum scheinbar prognostisch günstigen Effekt von BMP-7 stehen die positiven Korrelationen mit kardiovaskulären als auch perioperativen Risikomarkern, was Ausdruck einer Beteiligung von BMP-7 am kardialen Remodelling sein kann. So sprechen die positiven Korrelationen der Anzahl BMP-7-positiver Zellen im Herzklappengewebe mit der Höhe der systolischen Blutdruckwerte, dem Vorhandensein einer Dyslipoproteinämie als auch mit der Höhe des STS-

Scores für eine ungünstige Prognose der AS sowie für ein erhöhtes perioperatives Risiko (Tabelle 12). Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Nachweis von BMP-7 im Herzklappengewebe abhängig von der klinischen Präsentation der AS erbracht werden. So zeigen Patienten mit rpAS im ventrikulären Aortenklappengewebe signifikant verstärkte Expressionen von BMP-7 im Vergleich zu Patienten mit lpAS (Abbildungen 12 und 13, Tabelle 9). Aus den bisher dargelegten Einflüssen von BMP-7 im Krankheitsprozess der AS kann schlussgefolgert werden, dass der Einfluss von BMP-7 im Entstehungsprozess der AS noch nicht vollständig verstanden ist und ambivalent zu sein scheint. Im Vergleich zu BMP-2 und BMP-4 nimmt BMP-7 eine Sonderstellung im aortalen Remodelling ein. So beschrieben Sato et al. im Tiermodell eine Induktion von BMP-2 und BMP-4, nicht aber von BMP-7 durch mechanischen Scherstress (132). Dies unterstreicht die Sonderrolle von BMP-7 im Pathomechanismus der kalzifizierten AS. Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurde erstmalig beschrieben, dass die Expressionen von BMP-2, BMP-7 und TGF- $\beta$ 1 im kalzifizierten Aortenklappengewebe abhängig vom klinischen Erscheinungsbild sind (Abbildungen 10 – 15, Tabelle 9). Da die aortalen Expressionen von BMP-2 und TGF- $\beta$ 1 sowie die ventrikuläre Expression von BMP-7 mit dem zeitlichen Verlauf der Aortenklappenstenose zusammenhängen, sich also das heterogene klinische Erscheinungsbild in pathophysiologischen signifikanten Unterschieden widerspiegelt, ist von unterschiedlichen, der AS zugrundeliegenden Pathomechanismen auszugehen (Abbildungen 10 – 15, Tabelle 9). Da sich die klinischen Präsentationen in Abhängigkeit von ihren pathophysiologischen Darstellungen deutlich unterscheiden, kann es sich bei den unterschiedlichen Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner somit nicht um ein frühes und ein spätes Stadium einer Erkrankung handeln, die auf einem homogenen Pathomechanismus basiert. Es muss vielmehr von unterschiedlichen zugrundeliegenden Krankheitsprozessen ausgegangen werden, da sonst jedem Stadium der lpAS ein akutes Stadium der rpAS vorangehen müsste, was klinisch nicht der Fall ist (1, 6, 68). Klinisch erscheinen vielmehr zwei verschiedene Verläufe: ein schleichender, langsam progredienter Verlauf, dem

kein akuter Verlauf vorangeht und ein akuter, schnell progredienter Verlauf (6, 16, 68). Aufgrund der aortalen, vermehrten Expressionen von BMP-2 als auch TGF- $\beta$ 1 als Marker des osteogenen Remodelings, der Fibrose und der chronischen Inflammation lässt sich schlussfolgern, dass die lpAS auf dem Boden fibrotischer und chronisch-inflammatorischer Prozesse entsteht, die bei der rpAS eher im Hintergrund stehen (32, 145, 151, 152). Da für TGF- $\beta$ 1 bei chronischer Stimulation anti-inflammatorische, bei akuter Stimulation inflammatorische Eigenschaften vorbeschrieben sind, deutet die reduzierte aortale Expression von TGF- $\beta$ 1 im Gewebe von Patienten mit rpAS im Vergleich zu Patienten mit lpAS auf das Vorherrschen akuter inflammatorischer Prozesse im Herzklappengewebe hin (74, 145). Die klinische Einteilung der AS in rpAS und lpAS, die aufgrund des heterogenen klinischen Erscheinungsbildes der AS mit einerseits schnell voranschreitenden, akuten und andererseits langsamen, schleichenden Verläufen vorgenommen wurde, hat somit einen pathophysiologischen Bezug. Diese Erkenntnis ist deshalb von Bedeutung, da folglich BMP-2, BMP-7 und TGF- $\beta$ 1 als valvuläre therapeutische Angriffspunkte infrage kommen. Dies sollte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich anhand der immunhistochemischen Auswertungen erkennen, dass BMPs und ihre Interaktionspartner im Herzklappengewebe hochgradig stenosierter und kalzifizierter AS nachweisbar sind. Dies gilt für die untersuchten Marker BMP-2, BMP-4, BMP-7, MIF und TGF- $\beta$ 1 als auch für Gremlin-1 (Abbildungen 10 - 18). Um zu untersuchen, ob sich die Gesamtanzahlen aller positiven Zellen der BMPs und ihrer untersuchten Interaktionspartner im Herzklappengewebe zwischen Patienten mit rpAS und lpAS unterscheiden, sind Studien mit größeren Fallzahlen notwendig. Es wurden regional unterschiedliche Expressionen von BMP-2, BMP-7 und TGF- $\beta$ 1 positiven Zellen im Herzklappengewebe nachgewiesen (Abbildungen 10 – 15, Tabelle 9). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass BMPs und ihre Interaktionspartner am Pathomechanismus der AS beteiligt sind, als auch, dass es sich dabei um regional unterschiedliche Krankheitsvorgänge der Herzklappe handelt. Aufgrund des Zusammenhangs der klinischen mit der pathophysiologischen Präsentation ist von unterschiedlichen

zugrundeliegenden Pathomechanismen auszugehen, was BMP-2, BMP-7 und TGF- $\beta$ 1 als mögliche valvuläre Therapieangriffspunkte der AS infrage kommen lässt (Abbildungen 10 – 15, Tabelle 9).

#### 4.2 Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner im Blut von Patienten mit rasch und langsam progredienter Aortenklappenstenose

Neben einer Untersuchung der Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner im Herzkklappengewebe von Patienten mit rpAS und lpAS, wurden ebenfalls ihre Expressionen im Blut bestimmt. Hierzu erfolgten Vergleiche der intrazellulären und oberflächlichen Anfärbungen von BMP-2, BMP-4, BMP-7, MIF, Gremlin-1, TGF- $\beta$ 1, CXCL14, SDF-1, CXCR4 und CXCR7 in und auf Monozyten bzw. Thrombozyten von Patienten mit rpAS und lpAS, um zu untersuchen, ob sich diese Marker in den beiden Kohorten signifikant unterscheiden. Diese durchflusszytometrischen Analysen legten dar, dass die intrazelluläre Expression von BMP-4 in Monozyten von Patienten mit rpAS im Vergleich zu Patienten mit lpAS signifikant reduziert ist (Tabelle 10;  $p = 0,038$ ). Die monozytäre intrazelluläre Expression von BMP-7 zeigt sich in Patienten mit rpAS im Vergleich zu Patienten mit lpAS signifikant for trend reduziert ( $p = 0,054$ ). Es bestehen somit unterschiedliche Expressionen einiger BMPs und ihrer Interaktionspartner im Blut von Patienten mit rpAS und lpAS. Es ist jedoch anzumerken, dass es sich hierbei aufgrund methodischer und laborchemischer Vorfälle um geringe Fallzahlen handelt. Folglich sind weitere Studien notwendig, um diese Ergebnisse zu verifizieren. Im Folgenden werden die Ergebnisse dennoch diskutiert und in den aktuellen Forschungshintergrund eingeordnet, um zu unterstreichen, dass weitere Studien sinnvoll sind, die Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner im Blut von Patienten mit rpAS und lpAS weiter zu untersuchen und zu vergleichen.

Bereits Sorescu et al. postulierten BMP-4 als Trigger von inflammatorischen Prozessen, als sie die Induktion von BMP-4 in endothelialen Zellen durch Scherstress und eine daraus folgende Bildung reaktiver Sauerstoffspezies mit konsekutiver Inflammation beschrieben (132, 153). Obwohl bereits gezeigt werden konnte, dass aortale und ventrikuläre valvuläre endotheliale Zellen

unterschiedlicher mechanischer Beanspruchung ausgesetzt sind, konnte für das Vorkommen von BMP-4 im Herzklappengewebe kein signifikanter Unterschied zwischen aortaler und ventrikulärer Expression dargelegt werden (Abbildung 16, Tabelle 9) (131). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die intrazelluläre Expression von BMP-4 in Monozyten in Patienten mit lpAS signifikant vermehrt sind, im Vergleich zu Patienten mit rpAS (Tabelle 10). Dies deutet darauf hin, dass BMP-4 sowohl im stenotischen Remodeling der Aortenklappe von Bedeutung ist, als auch, dass seine Expression im Blut mit der klinischen Präsentation der AS bzw. deren Krankheitsprogress zusammenhängt. Folglich deuten die signifikanten Unterschiede der monozytären BMP-4 Expressionen zwischen Patienten mit rpAS und lpAS auf eine potentielle Eignung von BMP-4 als Bio- bzw. Prognosemarker der AS hin, da es zwischen einem langsamen und einem schnellen Krankheitsprogress signifikant diskriminieren kann, wie in den Blutanalysen ersichtlich ist (Tabelle 10). Betonenswert sind ebenfalls die dargelegten, signifikant unterschiedlichen Expressionen von BMP-4 auf Immunzellen von Patienten mit rpAS im Vergleich zu Patienten mit lpAS, was Ausdruck des bereits in der Gefäßatheriosklerose vorbeschriebenen, aktiven, inflammatorischen und nicht rein degenerativen atherosklerotischen Prozesses ist (6, 44, 91). Vorarbeiten zeigen, dass BMP-4 sowohl an akuten als auch an chronischen Umbauprozessen beteiligt ist (32, 39, 152, 154, 155). Bereits Mohler et al. zeigten das Vorkommen von BMP-4 als potentes osteogenes Morphogen im Aortenklappengewebe (32). Sun et al. beschrieben BMP-4 als Vermittler von Fibrose, Apoptose und Hypertrophie *in-vitro* und *in-vivo* (155). Die Bedeutung von BMP-4 als inflammatorischer Modulator wurde anhand von Studien in rheumatoiden Erkrankungen aufgezeigt (152, 154). Somit ist BMP-4 sowohl in akuten als auch chronischen inflammatorischen, fibrotischen und osteogenen pathologischen Prozessen beteiligt, die in Remodelling und Pathogenese nicht nur der Gefäßatheriosklerose, sondern auch der AS, von zentraler Bedeutung sind (14, 15, 32, 37-43). Folglich deutet die Beteiligung an genau diesen Prozessen auf eine bedeutende Rolle von BMP-4 in der Pathogenese der AS hin und macht BMP-4 als zukünftigen Therapieangriffspunkt dieser durch Monozyten

vermittelten Erkrankung vielversprechend. BMP-4 als Therapieangriffspunkt bei Herzinsuffizienz oder kardialer Hypertrophie wurde bereits von Guo et al. diskutiert (156). Bisher noch nicht untersucht ist BMP-4 als Therapieangriffspunkt der AS, was aufgrund der dargelegten Zusammenhänge in weiteren Studien genauer untersucht werden sollte. Eine signifikant for trend reduzierte intrazelluläre Monozytenexpression von BMP-7 in Patienten mit rpAS im Vergleich zu Patienten mit lpAS deutet vor dem Hintergrund, dass sich die valvuläre BMP-7 Expression regional signifikant zwischen Patienten mit rpAS und lpAS unterscheidet, auf einen krankheitsmodulierenden Einfluss von BMP-7 im Krankheitsprozess der AS hin (Tabelle 10).

Unerwartet war die Feststellung, dass sich die Expressionen der untersuchten Proteine in und auf Monozyten signifikant zwischen Patienten mit rpAS und lpAS unterscheiden, ihre Expressionen in und auf Thrombozyten jedoch nicht. Am wahrscheinlichsten ist dies auf die Power von unter 80 % dieser Marker zurückzuführen und sollte im Rahmen von größeren Studien nochmals untersucht werden, denn die bedeutende Rolle der Thrombozyten für die Arteriosklerose wurde bereits mehrfach beschrieben (118, 157). So konnte beispielsweise in murinen Aortenklappen eine signifikante Reduktion atherosklerotischer Läsionen durch Hemmung thrombozytärer Adhäsion herbeigeführt werden, was die Bedeutung der Thrombozyten im Krankheitsprozess der AS unterstreicht (114). Ghafoory et al. beschrieben im Rahmen der Leberzirrhose eine geringere Fibrosierung durch Hemmung von thrombozytär vorkommendem TGF- $\beta$ 1 im Mausmodell, Varshney et al. demonstrierten, dass in Thrombozyten vorkommendes TGF- $\beta$ 1 die Progression einer murinen AS, durch dessen Interaktion mit valvulären endothelialen Zellen, beeinflusst (141, 151). Des Weiteren wurde bereits gezeigt, dass die Aufnahme von oxLDL zur Degranulation und Freisetzung thrombozytärer Mediatoren wie TGF- $\beta$ 1, SDF-1 und MIF führt, die zur Verstärkung des chronischen Entzündungsprozesses der interstitiellen und endothelialen Zellen der Aortenklappe beitragen (44-46, 49).

Zusammenfassend lässt sich anhand der durchflusszytometrischen Analysen erkennen, dass BMP-2, BMP-4, BMP-7, MIF, Gremlin-1, TGF- $\beta$ 1, CXCL14,

SDF-1 sowie seine Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 sowohl intrazellulär als auch auf der Oberfläche von Monozyten und Thrombozyten von Patienten mit AS nachweisbar sind (Tabelle 10). Es konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Expression von BMP-4 in Monozyten von Patienten mit rpAS im Vergleich zu Patienten mit lpAS signifikant reduziert ist ( $p=0,038$ ). Signifikant for trend zeigte sich die reduzierte intrazelluläre Expression von BMP-7 in Monozyten von Patienten mit rpAS im Vergleich zu Patienten mit lpAS ( $p=0,054$ ). Es zeigen sich somit signifikant unterschiedliche Expressionen von BMP-4 in Monozyten von Patienten mit rpAS und lpAS vor Aortenklappenersatz, was auf eine Eignung von BMP-4 als Bio-/bzw. Prognosemarker der AS hindeutet. Darüber hinaus sind weitere Studien notwendig, um die Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner im Blut von Patienten mit rpAS und lpAS genauer zu charakterisieren. Da BMPs und ihre Interaktionspartner bereits als Trigger von Inflammation und kardialem Remodeling vorbeschrieben sind, sind weitere Untersuchungen sinnvoll, da sie als potentielle Prognosemarker der AS in Frage kommen. Bio- bzw. Prognosemarkers der lpAS oder rpAS sind klinisch notwendig, um die Behandlung der AS nach bestmöglicher, individueller Nutzen-Risiko-Abwägung gestalten zu können (1, 5).

#### 4.3 Dynamische monozytäre und thrombozytäre Proteinexpressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner

Die monozytären und thrombozytären Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner zeigen vor und nach Aortenklappenersatz signifikante Unterschiede. Da in der Pathogenese der AS inflammatorische Prozesse von Bedeutung sind, wurde eine dynamische Proteinexpression der BMPs und ihrer Interaktionspartner auf inflammatorischen Zellen vermutet. Aus diesem Grund erfolgten Vergleiche der monozytären und thrombozytären Expressionen von BMP-2, BMP-4, BMP-7, MIF, Gremlin-1, TGF- $\beta$ 1, CXCL14, SDF-1, CXCR4 und CXCR7 vor und nach Aortenklappenoperation (Tabelle 13). Dabei konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Expression von CXCR4 in Thrombozyten postoperativ im Vergleich zu präoperativ signifikant reduziert ist

( $p = 0,025$ ; Abbildung 19). Ebenfalls wurde für CXCR7 postoperativ im Vergleich zu präoperativ eine signifikant reduzierte intrazelluläre Expression in Thrombozyten festgestellt ( $p = 0,028$ ; Abbildung 20). Eine postoperativ im Vergleich zur präoperativ signifikant reduzierte monozytäre Oberflächenexpression war für TGF- $\beta$ 1 zu verzeichnen ( $p = 0,043$ ; Abbildung 21). Zunächst ist zu erwähnen, dass die postoperativen Expressionen von CXCR4, CXCR7 und TGF- $\beta$ 1 im Vergleich zu präoperativen signifikant reduziert sind. Diese Ergebnisse deuten unter Berücksichtigung von Voruntersuchungen darauf hin, dass CXCR4, CXCR7 und TGF- $\beta$ 1 im Rahmen der valvulären Pathogenese reaktiv erhöht sind und nach Explantation der Aortenklappe, also nach Entfernung des pathologischen Stimulus, konsekutiv abfallen. Da die Funktion von CXCR4 und CXCR7 in der Pathogenese der Atherosklerose noch nicht vollständig verstanden ist, sind grundlegende Forschungen notwendig, um ihre Funktionen genauer zu charakterisieren. Dorfmueller et al. beschrieben nach Untersuchungen an vier explantierten Herzklappen von Patienten mit kalzifizierter AS die verstärkte Expression von CXCR4 im Herzklappengewebe und vermuteten eine konsekutive, durch inflammatorische Marker getriggerte, Neovaskularisierung der erkrankten Herzklappe (158). Im Widerspruch dazu stehen Forschungen von Döring et al. welche die Expression von CXCR4 im Rahmen der Atherosklerose aufgrund dessen vorteilhaften Eigenschaften auf die vaskuläre Integrität als prognostisch vorteilhaft beschreiben (159). Ebenfalls Noels et al. beschreiben im Modell atherosklerotischer Mäuse vorteilhafte Eigenschaften von endotheliale CXCR4, da CXCR4 nach Gefäßverletzung Wundheilung, Neointimaproliferation und Reendothelialisierung begünstigte (160). Die Vorarbeiten von Döring et al. und Noels et al. bekräftigen die Hypothese, dass CXCR4 im Rahmen der AS reflektorisch als dem pathologischen Remodeling der Aortenklappe entgegenwirkendes Protein erhöht ist und nach Entfernung der Ursache abfällt (159, 160). Ebenfalls deuten Voruntersuchungen an Patienten mit akutem ST-Hebungs-Myokardinfarkt auf einen protektiven Effekt von CXCR4 und CXCR7 hin, denn es konnte dargelegt werden, dass die thrombozytären Expressionen von CXCR7 und CXCR4 mit der Regenerierung der myokardialen Funktion

korrelieren, da sie zu einer absoluten Verbesserung der Ejektionsfraktion führten (111, 161). Auch wenn die thrombozytären Oberflächenexpressionen von CXCR7 in Patienten mit akutem Koronarsyndrom im Vergleich zu Patienten mit stabiler koronarer Herzerkrankung vermehrt ist, korreliert auch in diesen Untersuchungen seine Expression mit der Regenerierung der myokardialen Funktion (111). Auch wenn die Funktionen von CXCR4 und CXCR7 im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden konnten, deuten die vorliegenden Ergebnisse vor dem Hintergrund der Vorarbeiten darauf hin, dass sowohl CXCR4 als auch CXCR7 eine Schutzfunktion der Herzklappe vor inflammatorischen bzw. atherosklerotischen Veränderungen zukommt, die sich durch die präoperativ im Vergleich zu postoperativ erhöhten thrombozytären Anfärbungen bemerkbar machen (Abbildungen 19 und 20, Tabelle 13). Des Weiteren sind die vorliegenden Ergebnisse vor dem Hintergrund, dass Rath et al. bereits Interaktionen zwischen TGF- $\beta$ 1 und SDF-1/CXCR4/CXCR7 Signaling von Thrombozyten vorbeschrieben haben, sehr interessant und deuten an, dass auch im Pathomechanismus der AS Interaktionen zwischen TGF- $\beta$ 1 und CXCR4 bzw. CXCR7 stattfinden, was bisher nicht vorbeschrieben wurde (115). Des Weiteren ist dieses Ergebnis interessant, da CXCR4 und CXCR7 eigentlich Rezeptoren von SDF-1 sind, für das sowohl prophylaktische als auch pathogene Funktionen im Entstehungsprozess der AS beschrieben sind (162). Vorarbeiten konnten bereits zeigen, dass SDF-1 sowohl die Monozytenfunktion als auch die Schaumzellbildung beeinflusst und im Mausmodell atherosklerotischer Mäuse eine Plaquestabilisierung begünstigt, was für einen eher prognostisch günstigen Einfluss von SDF-1 spricht (163, 164). Wurster et al. beschrieben einen Einfluss von SDF-1 auf die Entstehung der AS, da gezeigt werden konnte, dass die thrombozytäre Expression von SDF-1 mit dem Stenosierungsgrad der AS korrelieren (48). Aufgrund ihres Studiendesigns lassen sich jedoch keine Rückschlüsse ziehen, ob die thrombozytären Expressionen von SDF-1 kausal oder reflektorisch erhöht sind, ob es sich also um den Krankheitsprogress fordernde oder ihm entgegenwirkende Eigenschaften von SDF-1 handelt (48). Aufgrund der Vorarbeiten ist von einer bedeutenden Rolle von SDF-1 im Krankheitsprozess der AS auszugehen,

weshalb das Ergebnis, dass keine unterschiedlichen Expressionen von SDF-1 im Blut vor und nach Operation zu verzeichnen sind, der Erwartung entgegenstand. Die Expression von SDF-1 im Herzklappengewebe wurde nicht untersucht. Es ist bekannt, dass SDF-1 seine Effekte teilweise einzeln über seine Rezeptoren CXCR4 oder CXCR7 sowie teilweise durch Rezeptordimerisierung von CXCR4/CXCR7 bewirkt (165). Folglich ist davon auszugehen, dass sich die Expressionen von SDF-1 vor und nach Operation nicht unterscheiden, da es sich um rezeptorvermittelte Pathways handelt und lediglich deren Expressionsprofile signifikanten Unterschieden vor und nach Operation unterliegen. Darüber hinaus sind nicht nur Interaktionen zwischen SDF-1 und CXCR4/CXCR7 vorbeschrieben, sondern auch Wechselwirkungen zwischen CXCR4 bzw. CXCR7 mit MIF, TGF- $\beta$ 1, CXCL14 und den BMPs, die auf diesen Prozess Einfluss nehmen (115, 157, 166, 167). So ist beschrieben, dass Interaktionen zwischen MIF und CXCR7 Einfluss auf die kardiale Regeneration haben (157, 168). Witte et al. zeigten eine direkte Interaktion zwischen CXCL14 als Mediator thrombozytärer Migration durch direkte Interaktion mit CXCR4 auf (117, 166). Die dynamische Expression dieser thrombozytären Rezeptoren ist somit Resultat komplexer Interaktionen der BMPs und inflammatorischer Chemokine, die bis heute noch nicht vollständig verstanden sind. In vorliegender Untersuchung machen sich diese als dynamische Expressionsprofile ihrer gemeinsamen Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 bemerkbar, die im Rahmen dieser Arbeit erstmalig im Blut von Patienten mit AS beschrieben wurden.

Darüber hinaus ist zu erwähnen, dass in Vorarbeiten thrombozytäre Chemokine wie SDF-1, MIF, TGF- $\beta$ 1 und CXCL14 nicht nur eine bedeutende Rolle in der Atherosklerose, Apoptose und Thrombusformation spielen, sondern auch in infektiösen Prozessen relevant sind (106, 114, 118, 119, 167, 169). Ebenfalls wie SDF-1 und MIF ist ihr Rezeptor CXCR7 ein Protein mit antimikrobieller Aktivität (111, 118, 119, 168, 170, 171). Vor den Hintergrund, dass MIF als thrombozytärer Botenstoff chemotaktisch auf Monozyten wirkt und via CXCR7 thrombozytäre Apoptose reduziert, bzw. Inflammation und Thrombusformation beeinflusst, deutet die postoperativ reduzierte Expression von CXCR7 auf einen

krankheitsprotektiven Einfluss von CXCR7 im Entstehungsprozess der AS hin (167, 172, 173). Infektiös getriggerte Prozesse sind in der Pathogenese der AS rar untersucht, obwohl ihnen aufgrund der komplexen Interaktionen zwischen Proteinen der chronischen und akuten Inflammation eine weitaus bedeutendere Rolle zuzukommen scheint, als bisher angenommen (174-176). Darüber hinaus beeinflussen sie, wie bereits erläutert, die dynamische Proteinexpression (174-176).

Es lässt sich somit feststellen, dass die thrombozytären Expressionen von CXCR4 und CXCR7 sowie die monozytäre Expression von TGF- $\beta$ 1 dynamischen Prozessen unterliegen. Auch wenn im Rahmen dieser Arbeit die dynamische Proteinexpression der BMPs und ihrer Interaktionspartner vor und nach Aortenklappenersatz erstmalig untersucht wurde, ist die Hypothese, dass dem Pathomechanismus der AS dynamische Prozesse zugrundeliegen, nicht neu. So beschrieben bereits Di Vito et al. nicht nur dynamische Prozesse im Entstehungsprozess der AS, sondern gehen auch davon aus, dass diese eine Ursache sind, warum medikamentöse Therapieversuche der AS bisher ohne Erfolg bleiben (177). Ein tieferes Verständnis über die dynamische Proteinexpression der BMPs und ihrer Interaktionspartner im Blut von Patienten mit AS stellt somit eine Grundlage dar, um potentielle, neue medikamentöse Angriffspunkte der AS zu identifizieren (1).

#### 4.4 Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner im Herzklappengewebe von Patienten mit high-gradient und low-gradient Aortenklappenstenose

High-gradient AS zeigen signifikant erhöhte Expressionen BMP-2-positiver Zellen im explantierten Herzklappengewebe im Vergleich zu Patienten mit low-gradient AS ( $p = 0,047$ ) (Abbildung 22). Dies deutet darauf hin, dass die Expression von BMP-2 im humanen Aortenklappengewebe durch valvulären Scherstress getriggert wird, da davon auszugehen ist, dass ein erhöhter Druckgradient mit einer verstärkten valvulären Beanspruchung im Sinne eines Scherstresses einhergeht (1, 6, 131). Dieser Befund deckt sich mit den Untersuchungen von Sato et al, die im Tiermodell durch mechanischen

Scherstress eine Induktion von BMP-2 und BMP-4, nicht aber von BMP-7 aufzeigten (132). Diese Untersuchungen bekräftigen folglich die Hypothese, dass ein erhöhter Druckgradient mit einem vermehrten valvulären Scherstress und konsekutiv vermehrter Expression von BMP-2 einhergehen. Auch weitere Vorarbeiten gehen von einer Beeinflussung der BMP-Expression durch valvulären Scherstress aus (178, 179). Für die Expression von BMP-4 beschrieben beispielsweise Sorescu et al. die Induktion von BMP-4 in endothelialen Zellen durch Scherstress und eine daraus folgende Bildung reaktiver Sauerstoffspezies mit konsekutiver Inflammation (132, 153). Die erstmalig in explantierten, humanen, kalzifizierten Aortenklappen beschriebene signifikant unterschiedliche Expression von BMP-2 im Herzklappengewebe von Patienten mit high-gradient und low-gradient AS ist von großer Relevanz, da sie auf die Eignung von BMP-2 als Therapieangriffspunkt der high-gradient AS hindeutet. Für die anderen Marker konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Kohorten verzeichnet werden (Tabelle 15). Dies ist jedoch mit Ausnahme von Gremlin-1 am wahrscheinlichsten auf die geringe Power zurückzuführen und sollte in weiteren Studien mit größeren Fallzahlen genauer analysiert werden. Für die Expressionen von Gremlin-1 konnte gezeigt werden, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten high-gradient und low-gradient AS bestehen und kaum Gremlin-1-positive Zellen im Herzgewebe nachweisbar sind (Tabelle 15). Dies ist vor dem Hintergrund, dass Gremlin-1 BMP-2-Signaltransduktion inhibieren kann, sehr interessant (180). Die supprimierte Expression von Gremlin-1 im Herzklappengewebe bei gleichzeitig deutlicher Expression von BMP-2 ist sehr wahrscheinlich Ausdruck der reduzierten Inhibition von BMP-2 durch Gremlin-1, die vorher beschrieben ist (152, 180). Die Suppression von Gremlin-1 führt somit zu erhöhten Expressionen von BMP-2 in high-gradient und low-gradient AS. Da sich die Expressionen von BMP-2 zwischen den Kohorten high-gradient AS und low-gradient AS signifikant unterscheiden, die Suppression von Gremlin-1 jedoch gleichermaßen besteht, zeigen die Ergebnisse, dass die Expression von BMP-2 im Herzklappengewebe nicht nur durch Gremlin-1, sondern auch durch weitere Faktoren beeinflusst wird.

Es konnten signifikant erhöhte Expressionen von BMP-2 im Herzklappengewebe von Patienten mit high-gradient AS im Vergleich zu Patienten mit low-gradient AS nachgewiesen werden ( $p = 0,047$ ). High-grade und low-grade AS weisen somit unterschiedliche valvuläre Expressionsmuster auf, was ebenfalls wie die unterschiedlichen valvulären Proteinexpressionen von Patienten mit rpAS und lpAS darauf hindeutet, dass die AS aufgrund unterschiedlicher zugrundeliegender Pathomechanismen, ein heterogenes Krankheitsbild darstellt.

#### 4.5 Ausblick und Limitationen: BMPs und ihre Interaktionspartner als neues diagnostisches, prognostisches und therapeutisches Tool der hochgradigen kalzifizierten Aortenklappenstenose

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner im Gewebe und Blut teilweise signifikant unterscheiden. Bzgl. der nicht signifikanten Unterschiede sind weitere Studien mit größeren Fallzahlen notwendig, um die Einflüsse dieser Proteine genauer zu untersuchen. Für die thrombozytäre Expression von Gremlin-1 der Patienten mit rpAS und lpAS wurde beispielsweise eine Gesamtanzahl von  $N = 614$  Patienten, für BMP-4 eine Kohortengröße von jeweils  $n = 34$  Probanden ermittelt um ausreichende Unterschiede charakterisieren zu können, wie Tabelle 11 zeigt. Eine weitere Limitierung dieser Arbeit stellt das retrospektive Studiendesign dar. Um den Verlauf der hochgradigen AS besser charakterisieren und die Eignung der BMPs und ihrer Interaktionspartner als Bio- bzw. Prognosemarker der AS besser beschreiben zu können, sind prospektive Studien mit Charakterisierung der monozytären und thrombozytären Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner im Blut mit gleichzeitiger Erhebung klinischer Parameter wie Belastbarkeit oder echokardiographischer Funktion zu mehreren Zeitpunkten ab Diagnosestellung der AS sinnvoll. Insbesondere sind diese Untersuchungen in regelmäßigen Abschnitten ab Diagnosestellung einer leichtgradigen AS wünschenswert um pathophysiologische Vorgänge während des „latenten Verlaufs der AS“ besser verstehen zu können (5, 29). Die Eignung der BMPs und ihrer

Interaktionspartner als Therapieangriffspunkte der AS kann im Rahmen dieser Arbeit nur vermutet, nicht aber belegt werden. Hierzu sind weitere Untersuchungen am Tiermodell notwendig.

Gezeigt werden konnte im Rahmen dieser Arbeit, dass BMPs und ihre Interaktionspartner im kalzifizierten Aortenklappengewebe exprimiert sind. BMPs und ihre Interaktionspartner sind folglich am Krankheitsprozess der AS beteiligt (Abbildungen 8 – 18, Tabelle 9) (77, 150). Des Weiteren wurden zwischen Patienten mit rpAS und lpAS immunhistochemisch regional signifikant unterschiedliche Expressionen von BMP-2, BMP-7 und TGF- $\beta$ 1 nachgewiesen, was sowohl zeigt, dass es sich um regional unterschiedliche Krankheitsvorgänge als Ausdruck eines diskontinuierlichen Vorgangs der Herzklappe handelt, als auch, dass die Expressionen von BMP-2, BMP-7 und TGF- $\beta$ 1 mit dem klinischen Erscheinungsbild der AS zusammenhängen, wie vorangehend ausführlich erläutert (Abbildungen 10 – 15, Tabelle 9). Dies bestätigt sich ebenfalls durch den klinisch-pathophysiologischen Zusammenhang der signifikant erhöhten Expression von BMP-2 im Herzklappengewebe von Patienten mit high-gradient AS im Vergleich zu Patienten mit low-gradient AS, der erstmals im Rahmen dieser Forschungsarbeit beschrieben wurde (Abbildung 22, Tabelle 15). Die Einteilung der AS in high-gradient und low-gradient AS basiert auf aktuellen Leitlinien und findet derzeit breite klinische Anwendung (1, 5, 181). Ein Vergleich der Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner im Herzklappengewebe von Patienten dieser beiden Kohorten wurde erstmalig durchgeführt.

Durchflusszytometrisch konnte aufgezeigt werden, dass BMP-2, BMP-4, BMP-7, MIF, Gremlin-1, TGF- $\beta$ 1, CXCL14, SDF-1 sowie CXCR4 und CXCR7 sowohl intrazellulär als auch auf der Oberfläche von Monozyten und Thrombozyten von Patienten mit AS nachweisbar sind (Tabelle 10). Eine signifikant reduzierte Expression von BMP-4 in Monozyten von Patienten mit rpAS im Vergleich zu Patienten mit lpAS deutet auf eine Eignung von monozytär exprimiertem BMP-4 als Bio- bzw. Prognosemarker der AS hin, wie ebenfalls vorangehend diskutiert. Für BMP-7 zeigten sich dieselben Unterschiede signifikant for trend und sollten weiter untersucht werden. Darüber hinaus konnte eine dynamische Expression

der Interaktionspartner der BMPs, auf Monozyten bzw. Thrombozyten nachgewiesen werden, wie die postoperativ im Vergleich zu präoperativ reduzierten Expressionen von CXCR4, CXCR7 und TGF- $\beta$ 1 aufzeigen. Dynamische Krankheitsprozesse stellen, wie bereits von Di Vito et al. angenommen, einen weiteren Grund dar, warum medikamentöse Therapien der AS bisher ohne Erfolg blieben (177). Die unterschiedlichen Anfärbungen der BMPs und ihrer Interaktionspartner im Herzklappengewebe und Blut zeigen, dass der AS kein homogener Pathomechanismus zugrunde liegt, sondern sich das heterogene klinische Krankheitsbild in heterogenen Pathomechanismen widerspiegelt. Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass dies ein weiterer Grund ist, warum bisherige medikamentöse Therapien der AS nicht ansprechen. Diesem Bezug kommt insbesondere vor dem Hintergrund, dass der optimale Therapiezeitpunkt und die individuell beste Therapiestrategie der AS nach wie vor Gegenstand zahlreicher Forschungen sind, große Bedeutung zu (1, 182). Therapeutische Konsequenzen können anhand der vorliegenden Arbeit noch nicht gezogen werden, ein tieferes Verständnis dieser heterogenen Pathomechanismen hilft folglich, individuelle Therapiemöglichkeiten der AS zu schaffen. Wegen ihrer unterschiedlichen monozytären Expression von BMP-4 und wegen einer signifikant for trend unterschiedlichen Expression von BMP-7 zwischen Patienten mit rpAS und lpAS stellen diese beiden Proteine potentielle Biomarker der AS dar, die im Rahmen weiterer Studien untersucht werden sollten. Bio- bzw. Prognosemarker der AS sind dringend notwendig, um die individuell bestmögliche Therapie zum optimale Therapiezeitpunkt mit der besten Nutz-Risiko-Abwägung durchführen zu können (1, 6).

In Zusammenschau bestehender Studien, die BMPs und ihre Interaktionspartner als Modulatoren atherosklerotischer Prozesse identifizieren konnten und ihrer, im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen unterschiedlichen Expressionsmustern im Herzklappengewebe und Blut in Abhängigkeit von der klinischen Präsentation, was auf unterschiedliche zugrundeliegende Pathomechanismen der AS hindeutet, sind weitere Studien in jedem Falle sinnvoll, um die Rolle der BMPs und ihrer Interaktionspartner im Pathomechanismus der AS genauer zu verstehen und ihren Stellenwert als Bio-

bzw. Prognosemarker oder Therapieangriffspunkte der AS zu klären (32, 68, 82, 132, 150, 183).

Aufgrund der Zusammenhänge zwischen den klinischen Erscheinungsbildern der AS und ihren regional unterschiedlichen Expressionsmustern im Herzklappengewebe und Blut von Patienten mit AS zeigt die vorliegende Arbeit, dass die AS ein sowohl klinisch als auch pathophysiologisch heterogenes Krankheitsbild ist, bei dessen Pathogenese BMP-2, BMP-4, BMP-7 und ihre Interaktionspartner CXCR4, CXCR7 und TGF- $\beta$ 1 involviert sind. Sie sind folglich sowohl potentielle prognostische, diagnostische als auch therapeutische Tools für neuartige Therapien der AS.

## 5 Zusammenfassung

Die kalzifizierte Aortenklappenstenose (AS) ist die häufigste, erworbene Herzklappenerkrankung in Industrieländern, die mit einer Zweijahresüberlebensrate symptomatischer Patienten von 50 % eine sehr schlechte Prognose hat (1-4, 6-10). Trotz intensiver Forschungen auf diesem Gebiet, kann die AS medikamentös nicht beeinflusst werden, weshalb der Herzklappenersatz bis dato die einzige, kausale Therapiemöglichkeit darstellt (1-4, 6-10). Im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit wurden die Expressionen der BMPs und ihrer Interaktionspartner im Herzklappengewebe und Blut von Patienten mit AS genauer charakterisiert, um ihre Bedeutung in der Pathogenese der AS besser verstehen zu können. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die BMPs und ihre Interaktionspartner im Krankheitsprozess der AS beteiligt sind. Darüber hinaus wurden regional unterschiedliche pathophysiologische Präsentationen von BMP-2, BMP-7 und TGF- $\beta$ 1 im Herzklappengewebe abhängig vom klinischen Erscheinungsbild aufgezeigt. So zeigten Patienten mit einer rpAS aortalseitig reduzierte Expressionen von BMP-2 und TGF- $\beta$ 1, im ventrikulärseitigen Herzklappengewebe ist ihre Expression von BMP-7 jedoch verstärkt. Diese Ergebnisse lassen sowohl auf regional unterschiedliche Krankheitsprozesse im Sinne einer diskontinuierlichen Herzklappenerkrankung, als auch auf unterschiedliche zugrundeliegende Pathomechanismen, schließen. Dafür spricht ebenfalls die erhöhte Expression von BMP-2 im Herzklappengewebe von Patienten mit high-gradient AS im Vergleich zu Patienten mit low-gradient AS. Eine verstärkte Anfärbung von BMP-4 in Monozyten von Patienten mit lpAS im Vergleich zur rpAS-Kohorte deutet auf eine Eignung von BMP-4 als Biomarker der AS hin. Diese wissenschaftliche Arbeit zeigt, dass die BMPs und ihre Interaktionspartner im Krankheitsprozess der AS involviert sind, als auch, dass die AS klinisch und pathophysiologisch eine inhomogene Erkrankung darstellt. Weitere Forschungen sind folglich sinnvoll, um die Rolle der BMPs und ihrer Interaktionspartner im Pathomechanismus der AS zu verstehen sowie auch ihre Rolle als Biomarker bzw. Therapieangriffspunkte der AS zu klären, um in Zukunft eine individualisierte Therapie der AS zu ermöglichen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Baumgartner H, Falk V, Bax JJ, et al. 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease: The Task Force for the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur Heart J*. 2017;38: 2739-2791.
2. Iung B, Baron, G, Butchart, E. et al. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *European Heart Journal*. 2003;24(13):1231-43.
3. Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN, et al. Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *The Lancet*. 2006;368(9540):1005-11.
4. Baldus S, Rudolph V: Erworbene Herzklappenfehler, In: Herold G. (Hrsg.): *Innere Medizin*, 1. Auflage, Köln 2019:175 - 178.
5. Vahanian A, Beyersdorf F, Praz F, et al. 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur Heart J*. 2022;43(7):561-632.
6. Baumgartner H, Walther T. Aortic stenosis. 2018:1641-58.
7. Vahanian A, Alfieri O, Andreotti F, et al. Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012): the Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2012;42(4):S1-44.
8. Ngo DT, Sverdlov AL, Horowitz JD. Prevention of aortic valve stenosis: a realistic therapeutic target? *Pharmacol Ther*. 2012;135(1):78-93.
9. Rossebø AB, Pedersen TR, Boman K, et al. Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis. *N Engl J Med*. 2008;359(13):1343-56.
10. Chan KL, Teo K, Dumesnil JG, et al. Effect of Lipid Lowering With Rosuvastatin on Progression of Aortic Stenosis. *Circulation*. 2010;121(2):306-14.
11. Otto CM, Lind BK, Kitzman DW, et al. Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly. *N Engl J Med*. 1999;341(3):142-7.
12. Otto CM. Calcific aortic stenosis--time to look more closely at the valve. *N Engl J Med*. 2008;359(13):1395-8.
13. Leon MB, Smith CR, Mack M, et al. Transcatheter aortic-valve implantation for aortic stenosis in patients who cannot undergo surgery. *N Engl J Med*. 2010;363(17):1597-607.
14. Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, et al. Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation*. 2003;107:2181-4.
15. Rajamannan NM. Low-density lipoprotein and aortic stenosis. *Heart*. 2008;94(9):1111-2.
16. Daniel WG, Baumgartner H, Gohlke-Barwolf C, et al. Aortic stenosis. *Clin Res Cardiol*. 2006;95(11):620-41.
17. Giannitsis E, Krautzig S, Renz-Polster H, et al. In: Renz-Polster H, Krautzig S (Hrsg.): *Basislehrbuch Innere Medizin*, 5.Auflage, Urban & Fischer Verlag, München 2013:146 -153.

18. Roberts WC, Ko JM. Frequency by decades of unicuspid, bicuspid, and tricuspid aortic valves in adults having isolated aortic valve replacement for aortic stenosis, with or without associated aortic regurgitation. *Circulation*. 2005;111(7):920-5.
19. Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, et al. Clinical Factors Associated With Calcific Aortic Valve Disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 1997;29(3):630-4.
20. Nielsen OW, Sajadieh A, Sabbah M, et al. Assessing Optimal Blood Pressure in Patients With Asymptomatic Aortic Valve Stenosis: The Simvastatin Ezetimibe in Aortic Stenosis Study (SEAS). *Circulation*. 2016;134(6):455-68.
21. Messika-Zeitoun D, Bielak LF, Peyser PA, et al. Aortic valve calcification: determinants and progression in the population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(3):642-8.
22. Baumgartner H, Hung J, Bermejo J, et al. Echocardiographic assessment of valve stenosis: EAE/ASE recommendations for clinical practice. *J Am Soc Echocardiogr*. 2009;22(1):1-23.
23. Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO, et al. 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014;129(23):e521-643.
24. Doucet KM, Burwash IG. Low gradient aortic stenosis. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2015;17(5):378
25. Banovic M, Iung B, Bartunek J, et al. Rationale and design of the Aortic Valve replAcementT versus conservative treatment in Asymptomatic severe aortic stenosis (AVATAR trial): A randomized multicenter controlled event-driven trial. *Am Heart J*. 2016;174:147-53.
26. Young RN, Grynpas MD. Targeting therapeutics to bone by conjugation with bisphosphonates. *Curr Opin Pharmacol*. 2018;40:87-94.
27. Ono T, Nakashima T. Recent advances in osteoclast biology. *Histochem Cell Biol*. 2018;149(4):325-41.
28. Barbash IM, Finkelstein A, Barsheshet A, et al. Outcomes of Patients at Estimated Low, Intermediate, and High Risk Undergoing Transcatheter Aortic Valve Implantation for Aortic Stenosis. *The American journal of cardiology*. 2015;116(12):1916-22.
29. Ross J, Jr., Braunwald E. Aortic stenosis. *Circulation*. 1968;38(1 Suppl):61-79.
30. D'Agostino RB, Vasan RS, Pencina MJ, et al. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2008;117(6):743-53.
31. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, et al. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. 1998;97(18):1837-47.
32. Mohler ER, Gannon F, Reynolds C, et al. Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation*. 2001;103(11):1522-8.
33. Rossebo AB, Pedersen TR, Allen C, et al. Design and baseline characteristics of the simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis (SEAS) study. *The American journal of cardiology*. 2007;99(7):970-3.

34. Cowell SJ, Newby DE, Prescott RJ, et al. A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis. *N Engl J Med.* 2005;352(23):2389-97.
35. Moura LM, Ramos SF, Zamorano JL, et al. Rosuvastatin affecting aortic valve endothelium to slow the progression of aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(5):554-61.
36. Chan KL, Teo K, Tam J, et al. Astronomer I. Rationale, design, and baseline characteristics of a randomized trial to assess the effect of cholesterol lowering on the progression of aortic stenosis: the Aortic Stenosis Progression Observation: Measuring Effects of Rosuvastatin (ASTRONOMER) trial. *Am Heart J.* 2007;153(6):925-31.
37. Akat K, Borggrefe M, Kaden JJ. Aortic valve calcification: basic science to clinical practice. *Heart.* 2009;95(8):616-23.
38. Gonzalez Rodriguez A, Schroeder ME, Walker CJ, et al. FGF-2 inhibits contractile properties of valvular interstitial cell myofibroblasts encapsulated in 3D MMP-degradable hydrogels. *APL Bioeng.* 2018;2(4):046104.
39. Poggianti E, Venneri L, Chubuchny V, et al. Aortic valve sclerosis is associated with systemic endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:136-41.
40. Balachandran K, Alford PW, Wylie-Sears J, et al. Cyclic strain induces dual-mode endothelial-mesenchymal transformation of the cardiac valve. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(50):19943-8.
41. Wylie-Sears J, Aikawa E, Levine RA, et al. Mitral valve endothelial cells with osteogenic differentiation potential. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(3):598-607.
42. Paruchuri S, Yang JH, Aikawa E, et al. Human pulmonary valve progenitor cells exhibit endothelial/mesenchymal plasticity in response to vascular endothelial growth factor-A and transforming growth factor-beta2. *Circ Res.* 2006;99(8):861-9.
43. Gulino S, Di Landro A, Indelicato A. Aortic Stenosis: Epidemiology and Pathogenesis. 2018:245-52.
44. Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, et al. Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation.* 2011;124(16):1783-91.
45. Massberg S, Konrad I, Schurzinger K, et al. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med.* 2006;203(5):1221-33.
46. Massberg S, Brand K, Gruner S, et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med.* 2002;196(7):887-96.
47. Wang D, Wang Z, Zhang L, et al. Roles of Cells from the Arterial Vessel Wall in Atherosclerosis. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:8135934.
48. Wurster T, Tegtmeier R, Borst O, et al. Platelet expression of stromal cell-derived factor-1 is associated with the degree of valvular aortic stenosis. *PLoS One.* 2014;9(5):e97405.

49. Muller, II, Muller KA, Schonleber H, et al. Macrophage migration inhibitory factor is enhanced in acute coronary syndromes and is associated with the inflammatory response. *PLoS One*. 2012;7(6):e38376.
50. Muller KA, Rath D, Schmid M, et al. High Plasma Levels of Gremlin-1 and Macrophage Migration Inhibitory Factor, but Not Their Ratio, Indicate an Increased Risk for Acute Coronary Syndrome in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *Clin Cardiol*. 2016;39(4):201-6.
51. Burger-Kentischer A, Gobel H, Kleemann R, et al. Reduction of the aortic inflammatory response in spontaneous atherosclerosis by blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Atherosclerosis*. 2006;184(1):28-38.
52. Schober A, Bernhagen J, Thiele M, et al. Stabilization of atherosclerotic plaques by blockade of macrophage migration inhibitory factor after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2004;109(3):380-5.
53. Lerman DA, Prasad S, Alotti N. Calcific Aortic Valve Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Eur Cardiol*. 2015;10(2):108-12.
54. Pan JH, Sukhova GK, Yang JT, et al. Macrophage migration inhibitory factor deficiency impairs atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*. 2004;109(25):3149-53.
55. Wallby L, Janerot-Sjoberg B, Steffensen T, et al. T lymphocyte infiltration in non-rheumatic aortic stenosis: a comparative descriptive study between tricuspid and bicuspid aortic valves. *Heart*. 2002;88:348-51.
56. Nakashima A, Tamura M. Regulation of matrix metalloproteinase-13 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 gene expression by WNT3A and bone morphogenetic protein-2 in osteoblastic differentiation. *Front Biosci*. 2006;11:1667-78.
57. Takebe J, Champagne CM, Offenbacher S, et al. Titanium surface topography alters cell shape and modulates bone morphogenetic protein 2 expression in the J774A.1 macrophage cell line. *J Biomed Mater Res A*. 2003;64(2):207-16.
58. Winchester R, Wiesendanger M, O'Brien W, et al. Circulating activated and effector memory T cells are associated with calcification and clonal expansions in bicuspid and tricuspid valves of calcific aortic stenosis. *J Immunol*. 2011;187(2):1006-14.
59. Erridge C. The roles of pathogen-associated molecular patterns in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2008;18(2):52-6.
60. Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol*. 2010;11:155-61.
61. Song R, Zeng Q, Ao L, et al. Biglycan induces the expression of osteogenic factors in human aortic valve interstitial cells via Toll-like receptor-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(11):2711-20.
62. Zeng Q, Jin C, Ao L, et al. Cross-talk between the Toll-like receptor 4 and Notch1 pathways augments the inflammatory response in the interstitial cells of stenotic human aortic valves. *Circulation*. 2012;126:222-30.
63. Derbali H, Bosse Y, Cote N, et al. Increased biglycan in aortic valve stenosis leads to the overexpression of phospholipid transfer protein via Toll-like receptor 2. *Am J Pathol*. 2010;176(6):2638-45.

64. Isoda K, Sawada S, Ishigami N, et al. Lack of interleukin-1 receptor antagonist modulates plaque composition in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(6):1068-73.
65. Al-Aly Z, Shao JS, Lai CF, et al. Aortic Msx2-Wnt calcification cascade is regulated by TNF-alpha-dependent signals in diabetic Ldlr-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:2589-96.
66. Takiguchi T, Kobayashi M, Suzuki R, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblast differentiation and suppresses matrix metalloproteinase-1 production in human bone cells isolated from mandibulae. *J Periodontal Res.* 1998;33(8):476-85.
67. Kumagai T, Shimizu T, Takeda K. Bone morphogenetic protein-2 suppresses invasiveness of TSU-Pr1 cells with the inhibition of MMP-9 secretion. *Anticancer Res.* 2006;26(1A):293-8.
68. Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, et al. Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation.* 1994;90(2):844-53.
69. Laird DF, Mucalo MR, Yokogawa Y. Growth of calcium hydroxyapatite (Ca-HAp) on cholesterol and cholestanol crystals from a simulated body fluid: A possible insight into the pathological calcifications associated with atherosclerosis. *J Colloid Interface Sci.* 2006;295:348-63.
70. Wang HP, Feng XJ, Gou BD, et al. Effects of LDL, cholesterol, and their oxidized forms on the precipitation kinetics of calcium phosphates. *Clin Chem* 2003;49:2027-36.
71. Schoen FJ, Levy RJ. Founder's Award, 25th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, perspectives. Providence, RI, April 28-May 2, 1999. Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives. *J Biomed Mater Res.* 1999;47(4):439-65.
72. Quinlan AM, Billiar KL. Investigating the role of substrate stiffness in the persistence of valvular interstitial cell activation. *J Biomed Mater Res A.* 2012;100(9):2474-82.
73. Miller JD, Weiss RM, Serrano KM, et al. Lowering plasma cholesterol levels halts progression of aortic valve disease in mice. *Circulation.* 2009;119(20):2693-701.
74. Jian B, Narula N, Li QY, et al. Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. *Ann Thorac Surg* 2003;75:457-65; discussion 65-6.
75. Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D, et al. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *N Engl J Med* 2005;352:1959-66.
76. Eghbali-Fatourehchi, GZ, Modder, UI, Charatcharoenwitthaya, N. et al. Characterization of circulating osteoblast lineage cells in humans. *Bone.* 2007;40(5):1370-7.
77. Hruska KA, Mathew S, Saab G. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circ Res* 2005;97:105-14.
78. Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res.* 2006;99(10):1044-59.

79. Schnitzler JG, Ali L, Groenen AG, et al. Lipoprotein(a) as Orchestrator of Calcific Aortic Valve Stenosis. *Biomolecules*. 2019;9(12).
80. Narisawa S, Yadav MC, Millan JL. In vivo overexpression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase increases skeletal mineralization and affects the phosphorylation status of osteopontin. *J Bone Miner Res*. 2013;28(7):1587-98.
81. Tanimura A, McGregor DH, Anderson HC. Calcification in atherosclerosis. I. Human studies. *J Exp Pathol*. 1986;2(4):261-73.
82. Kim KM. Calcification of matrix vesicles in human aortic valve and aortic media. *Fed Proc*. 1976;35(2):156-62.
83. Levy RJ, Vyavahare N, Ogle M, et al. Inhibition of cusp and aortic wall calcification in ethanol- and aluminum-treated bioprosthetic heart valves in sheep: background, mechanisms, and synergism. *J Heart Valve Dis*. 2003;12(2):209-16.
84. Maranto AR and Schoen FJ. Alkaline phosphatase activity of glutaraldehyde-treated bovine pericardium used in bioprosthetic cardiac valves. *Circ Res* 1988;63:844-8.
85. Kiffer-Moreira T, Yadav MC, Zhu D, et al. Pharmacological inhibition of PHOSPHO1 suppresses vascular smooth muscle cell calcification. *J Bone Miner Res*. 2013;28(1):81-91.
86. Bostrom K, Watson KE, Horn S, et al. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1993;91(4):1800-9.
87. Deng ZL, Sharff KA, Tang N, et al. Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development. *Front Biosci*. 2008;13:2001-21.
88. Bostrom KI, Rajamannan NM, Towler DA. The regulation of valvular and vascular sclerosis by osteogenic morphogens. *Circ Res*. 2011;109(5):564-77.
89. Egan KP, Kim JH, Mohler ER, et al. Role for circulating osteogenic precursor cells in aortic valvular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(12):2965-71.
90. Srivatsa SS, Harrity PJ, Maercklein PB, et al. Increased cellular expression of matrix proteins that regulate mineralization is associated with calcification of native human and porcine xenograft bioprosthetic heart valves. *J Clin Invest* 1999;99:996-1009.
91. Ghingina C, Florian A, Beladan C, et al. Calcific aortic valve disease and aortic atherosclerosis--two faces of the same disease? *Rom J Intern Med*. 2009;47(4):319-29.
92. Thanassoulis G, Campbell CY, Owens DS, et al. Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis. *N Engl J Med*. 2013;368(6):503-12.
93. Topol LZ, Bardot B, Zhang Q, et al. Biosynthesis, post-translation modification, and functional characterization of Drm/Gremlin. *J Biol Chem*. 2000;275(12):8785-93.
94. Hsu DR, Economides AN, Wang X, et al. The Xenopus dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol Cell* 1998;1:673-83.
95. Mueller KA, Tavlaki E, Schneider M, et al. Gremlin-1 identifies fibrosis and predicts adverse outcome in patients with heart failure undergoing endomyocardial biopsy. *J Card Fail*. 2013;19(10):678-84.

96. Mezzano S, Droguett A, Burgos ME, et al. Expression of gremlin, a bone morphogenetic protein antagonist, in glomerular crescents of pauci-immune glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22(7):1882-90.
97. Roxburgh SA, Murphy M, Pollock CA, et al. Recapitulation of embryological programmes in renal fibrosis--the importance of epithelial cell plasticity and developmental genes. *Nephron Physiol*. 2006;103(3):139-148.
98. Boers W, Aarrass S, Linthorst C, et al. Transcriptional profiling reveals novel markers of liver fibrogenesis: gremlin and insulin-like growth factor-binding proteins. *J Biol Chem*. 2006;281(24):16289-95.
99. Avsian-Kretchmer O, Hsueh AJ. Comparative genomic analysis of the eight-membered ring cystine knot-containing bone morphogenetic protein antagonists. *Mol Endocrinol*. 2004;18(1):1-12.
100. Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev* 2003;24:218-35.
101. Rider CC, Mulloy B. Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists. *Biochem J* 2010;429:1-12.
102. Muller I, Schonberger T, Schneider M, et al. Gremlin-1 is an inhibitor of macrophage migration inhibitory factor and attenuates atherosclerotic plaque growth in ApoE<sup>-/-</sup> Mice. *J Biol Chem*. 2013;288(44):31635-45.
103. Morand EF, Leech M, Bernhagen J. MIF: a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(5):399-410.
104. Ni CW, Qiu H, Rezvan A, et al. Discovery of novel mechanosensitive genes in vivo using mouse carotid artery endothelium exposed to disturbed flow. *Blood*. 2010;116(15):e66-73.
105. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*. 2009;23(4):177-89.
106. Karshovska E, Weber C, von Hundelshausen P. Platelet chemokines in health and disease. *Thromb Haemost*. 2013;110(5):894-902.
107. Heijnen H, van der Sluijs P. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? *J Thromb Haemost*. 2015;13(12):2141-51.
108. Gremmel T, Frelinger AL, Michelson AD. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost*. 2016;42(3):191-204.
109. Singh A, Bisht P, Bhattacharya S, et al. Role of Platelet Cytokines in Dengue Virus Infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:561366.
110. Konrad FM, Meichssner N, Bury A, et al. Inhibition of SDF-1 receptors CXCR4 and CXCR7 attenuates acute pulmonary inflammation via the adenosine A2B-receptor on blood cells. *Cell Death Dis*. 2017;8(5):e2832.
111. Rath D, Chatterjee M, Borst O, et al. Expression of stromal cell-derived factor-1 receptors CXCR4 and CXCR7 on circulating platelets of patients with acute coronary syndrome and association with left ventricular functional recovery. *Eur Heart J*. 2014;35(6):386-94.
112. Chatterjee M, Seizer P, Borst O, et al. SDF-1alpha induces differential trafficking of CXCR4-CXCR7 involving cyclophilin A, CXCR7 ubiquitination and promotes platelet survival. *FASEB J*. 2014;28(7):2864-78.
113. Ma W, Liu Y, Ellison N, et al. Induction of C-X-C chemokine receptor type 7 (CXCR7) switches stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling and

- phagocytic activity in macrophages linked to atherosclerosis. *J Biol Chem*. 2013;288(22):15481-94.
114. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest*. 2005;115(12):3378-84.
115. Rath D, Chatterjee M, Holtkamp A, et al. Evidence of an interaction between TGF-beta1 and the SDF-1/CXCR4/CXCR7 axis in human platelets. *Thromb Res*. 2016;144:79-84.
116. Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, Thayer TC, et al. Neutrophil Mobilization from the Bone Marrow During Polymicrobial Sepsis Is Dependent On CXCL12 Signaling. *J Immunol* 2011;185:911-8.
117. Lu J, Chatterjee M, Schmid H, et al. CXCL14 as an emerging immune and inflammatory modulator. *J Inflamm (Lond)*. 2016;13:1.
118. Chatterjee M, Manke M, Cebo M, et al. Platelet Chemokine Receptor CXCR7 Mediates an Anti-thrombotic and Anti-thromboinflammatory Effect. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. 2018;2:1-368.
119. Valdivia-Silva J, Medina-Tamayo J, Garcia-Zepeda EA. Chemokine-Derived Peptides: Novel Antimicrobial and Antineoplastic Agents. *Int J Mol Sci*. 2015;16(6):12958-85.
120. Nashef SA, Roques F, Michel P, et al. European system for cardiac operative risk evaluation (EuroSCORE). *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 1999;16(1):9-13.
121. Nashef SA, Roques F, Sharples LD, et al. EuroSCORE II. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2012;41(4):734-44; discussion 44-5.
122. Balan P, Zhao Y, Johnson S, et al. The Society of Thoracic Surgery Risk Score as a Predictor of 30-Day Mortality in Transcatheter vs Surgical Aortic Valve Replacement: A Single-Center Experience and its Implications for the Development of a TAVR Risk-Prediction Model. *The Journal of invasive cardiology*. 2017;29(3):109-14.
123. Riedelsheimer B., Bückl-Zimmermann S.: Färbungen, In: Mulisch M., Welch U. (Hrsg): *Romeis Mikroskopische Technik*, 19. Auflage, Berlin Heidelberg 2015:171 - 282.
124. Ziegler-Heitbrock HWL, Ulevitch RJ. CD14: Cell surface receptor and differentiation marker. *Immunology Today*. 1993;14(3):121-5.
125. Blair TA, Frelinger AL. Platelet surface marker analysis by mass cytometry. *Platelets*. 2020;31(5):633-40.
126. Thon JN, Italiano JE. Platelets: production, morphology and ultrastructure. *Handb Exp Pharmacol*. 2012(210):3-22.
127. Oberleithner H, In: Schmidt R, Lang F, Heckmann M (Hrsg.): *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*, 31., überarbeitete Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2010: 4 - 10.
128. Feher K, Kirsch J, Radbruch A, et al. Cell population identification using fluorescence-minus-one controls with a one-class classifying algorithm. *Bioinformatics*. 2014;30(23):3372-8.
129. Lee H, Sun Y, Patti-Diaz L, et al. High-Throughput Analysis of Clinical Flow Cytometry Data by Automated Gating. *Bioinform Biol Insights*. 2019;13:1177932219838851.

130. Thubrikar MJ, Aouad J, Nolan SP. Patterns of calcific deposits in operatively excised stenotic or purely regurgitant aortic valves and their relation to mechanical stress. *The American journal of cardiology*. 1986;58(3):304-8.
131. Mongkoldhumrongkul N, Latif N, Yacoub M, et al. Effect of Side-Specific Valvular Shear Stress on the Content of Extracellular Matrix in Aortic Valves. *Cardiovasc Eng Technol*. 2018;9(2):151-7.
132. Sato M, Ochi T, Nakase T, et al. Mechanical tension-stress induces expression of bone morphogenetic protein (BMP)-2 and BMP-4, but not BMP-6, BMP-7, and GDF-5 mRNA, during distraction osteogenesis. *J Bone Miner Res*. 1999;14(7):1084-95.
133. Steiner I, Krbal L, Rozkos T, et al. Calcific aortic valve stenosis: Immunohistochemical analysis of inflammatory infiltrate. *Pathol Res Pract*. 2012;208(4):231-4.
134. Kercheva M, Gusakova AM, Ryabova TR, et al. Serum Levels of Bone Morphogenetic Proteins 2 and 4 in Patients with Acute Myocardial Infarction. *Cells*. 2020;9(10).
135. Kim JS, Kim JG, Moon MY, et al. Transforming growth factor-beta1 regulates macrophage migration via RhoA. *Blood*. 2006;108(6):1821-9.
136. Eiro N, Pidal I, Fernandez-Garcia B, et al. Impact of CD68/(CD3+CD20) ratio at the invasive front of primary tumors on distant metastasis development in breast cancer. *PLoS One*. 2012;7(12):e52796.
137. El-Sherbiny YM, El-Jawhari JJ, Moseley TA, et al. T cell immunomodulation by clinically used allogeneic human cancellous bone fragments: a potential novel immunotherapy tool. *Sci Rep*. 2018;8(1):13535.
138. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*. 2009;29(6):313-26.
139. D'Aversa TG, Eugenin EA, Lopez L, et al. Myelin basic protein induces inflammatory mediators from primary human endothelial cells and blood-brain barrier disruption: implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2013;39(3):270-83.
140. Pappritz K, Savvatis K, Koschel A, et al. Cardiac (myo)fibroblasts modulate the migration of monocyte subsets. *Sci Rep*. 2018;8(1):5575.
141. Varshney R, Murphy B, Woolington S, et al. Inactivation of platelet-derived TGF-beta1 attenuates aortic stenosis progression in a robust murine model. *Blood Adv*. 2019;3(5):777-88.
142. Wang W, Vootukuri S, Meyer A, et al. Association between shear stress and platelet-derived transforming growth factor-beta1 release and activation in animal models of aortic valve stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(9):1924-32.
143. Yan J, Stringer SE, Hamilton A, et al. Decorin GAG synthesis and TGF-beta signaling mediate Ox-LDL-induced mineralization of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(3):608-15.
144. Taylor J, Butcher M, Zeadin M, et al. Oxidized low-density lipoprotein promotes osteoblast differentiation in primary cultures of vascular smooth muscle cells by up-regulating Osterix expression in an Msx2-dependent manner. *J Cell Biochem*. 2011;112(2):581-8.

145. Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, et al. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol*. 2009;9(4):447-53.
146. Muller I, Schonberger T, Schneider M, et al. Gremlin-1 is an inhibitor of macrophage migration inhibitory factor and attenuates atherosclerotic plaque growth in ApoE<sup>-/-</sup> Mice. *J Biol Chem* 2013;288:31635-45.
147. Simoes Sato AY, Bub GL, Campos AH. BMP-2 and -4 produced by vascular smooth muscle cells from atherosclerotic lesions induce monocyte chemotaxis through direct BMPRII activation. *Atherosclerosis*. 2014;235(1):45-55.
148. Zhang XL, Selbi W, de la Motte C, et al. Bone morphogenetic protein-7 inhibits monocyte-stimulated TGF-beta1 generation in renal proximal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(1):79-89.
149. Merino D, Villar AV, Garcia R, et al. BMP-7 attenuates left ventricular remodelling under pressure overload and facilitates reverse remodelling and functional recovery. *Cardiovasc Res*. 2016;110(3):331-45.
150. Davies MR, Lund RJ, Hruska KA. BMP-7 is an efficacious treatment of vascular calcification in a murine model of atherosclerosis and chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(6):1559-67.
151. Ghafoory S, Varshney R, Robison T, et al. Platelet TGF-beta1 deficiency decreases liver fibrosis in a mouse model of liver injury. *Blood Adv*. 2018;2(5):470-80.
152. Wu DH, Hatzopoulos AK. Bone morphogenetic protein signaling in inflammation. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2019;244(2):147-56.
153. Sorescu GP, Song H, Tressel SL, et al. Bone morphogenetic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress induces monocyte adhesion by stimulating reactive oxygen species production from a nox1-based NADPH oxidase. *Circ Res*. 2004;95(8):773-9.
154. Bramlage CP, Haupl T, Kaps C, et al. Decrease in expression of bone morphogenetic proteins 4 and 5 in synovial tissue of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(3):R58.
155. Sun B, Huo R, Sheng Y, et al. Bone morphogenetic protein-4 mediates cardiac hypertrophy, apoptosis, and fibrosis in experimentally pathological cardiac hypertrophy. *Hypertension*. 2013;61(2):352-60.
156. Guo WT, Dong DL. Bone morphogenetic protein-4: a novel therapeutic target for pathological cardiac hypertrophy/heart failure. *Heart Fail Rev*. 2014;19(6):781-8.
157. Yu S, Crawford D, Tsuchihashi T, et al. The chemokine receptor CXCR7 functions to regulate cardiac valve remodeling. *Dev Dyn*. 2011;240(2):384-93.
158. Dorfmueller P, Bazin D, Aubert S, et al. Crystalline ultrastructures, inflammatory elements, and neoangiogenesis are present in inconspicuous aortic valve tissue. *Cardiol Res Pract*. 2010;2010:685926.
159. Doring Y, Noels H, van der Vorst EPC, et al. Vascular CXCR4 Limits Atherosclerosis by Maintaining Arterial Integrity: Evidence From Mouse and Human Studies. *Circulation*. 2017;136(4):388-403.
160. Noels H, Zhou B, Tilstam PV, et al. Deficiency of endothelial CXCR4 reduces reendothelialization and enhances neointimal hyperplasia after

- vascular injury in atherosclerosis-prone mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(6):1209-20.
161. Rath D, Chatterjee M, Meyer L, et al. Relative survival potential of platelets is associated with platelet CXCR4/CXCR7 surface exposure and functional recovery following STEMI. *Atherosclerosis.* 2018;278:269-77.
162. Doring Y, Pawig L, Weber C, et al. The CXCL12/CXCR4 chemokine ligand/receptor axis in cardiovascular disease. *Front Physiol.* 2014;5:212.
163. Chatterjee M, von Ungern-Sternberg SN, Seizer P, et al. Platelet-derived CXCL12 regulates monocyte function, survival, differentiation into macrophages and foam cells through differential involvement of CXCR4-CXCR7. *Cell Death Dis.* 2015;6:e1989.
164. Akhtar S, Gremse F, Kiessling F, et al. CXCL12 promotes the stabilization of atherosclerotic lesions mediated by smooth muscle progenitor cells in Apoe-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(4):679-86.
165. Puchert M, Engele J. The peculiarities of the SDF-1/CXCL12 system: in some cells, CXCR4 and CXCR7 sing solos, in others, they sing duets. *Cell Tissue Res.* 2014;355(2):239-53.
166. Witte A, Rohlfing AK, Dannenmann B, et al. The chemokine CXCL14 mediates platelet function and migration via direct interaction with CXCR4. *Cardiovasc Res.* 2021;117(3):903-17.
167. Chatterjee M, Borst O, Walker B, et al. Macrophage migration inhibitory factor limits activation-induced apoptosis of platelets via CXCR7-dependent Akt signaling. *Circ Res.* 2014;115(11):939-49.
168. Alampour-Rajabi S, El Bounkari O, Rot A, et al. MIF interacts with CXCR7 to promote receptor internalization, ERK1/2 and ZAP-70 signaling, and lymphocyte chemotaxis. *FASEB J.* 2015;29(11):4497-511.
169. Dankert J, Krijgsveld J, van Der Werff J, et al. Platelet microbicidal activity is an important defense factor against viridans streptococcal endocarditis. *J Infect Dis.* 2001;184(5):597-605.
170. Chatterjee M, Rath D, Gawaz M. Role of chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 for platelet function. *Biochem Soc Trans.* 2015;43(4):720-6.
171. Rajasekaran G, Dinesh Kumar S, Nam J, et al. Antimicrobial and anti-inflammatory activities of chemokine CXCL14-derived antimicrobial peptide and its analogs. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2019;1861(1):256-67.
172. Wirtz TH, Tillmann S, Strussmann T, et al. Platelet-derived MIF: a novel platelet chemokine with distinct recruitment properties. *Atherosclerosis.* 2015;239(1):1-10.
173. Strussmann T, Tillmann S, Wirtz T, et al. Platelets are a previously unrecognized source of MIF. *Thromb Haemost.* 2013;110(5):1004-13.
174. Sacks PV, Lakier JB, Barlow JB. Severe aortic stenosis produced by bacterial endocarditis. *Br Med J.* 1969;3(5662):97-8.
175. Davies MK, Ireland MA, Clarke DB. Infective endocarditis from group C streptococci causing stenosis of both the aortic and mitral valves. *Thorax.* 1981;36(1):69-71.
176. Contreras Rodriguez R, Rodriguez Velasco A, Flores Miranda JR, et al. Calcified aortic stenosis due to healed experimental bacterial endocarditis. *Archivos del Instituto de Cardiologia de Mexico.* 1993;63(6):485-91.

177. Di Vito A, Donato A, Presta I, et al. Extracellular Matrix in Calcific Aortic Valve Disease: Architecture, Dynamic and Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2).
178. Jo H, Song H, Mowbray A. Role of NADPH oxidases in disturbed flow- and BMP4- induced inflammation and atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(9-10):1609-19.
179. Fernandez Esmerats J, Heath J, Jo H. Shear-Sensitive Genes in Aortic Valve Endothelium. *Antioxid Redox Signal.* 2016;25(7):401-14.
180. Kisonaite M, Wang X, Hyvonen M. Structure of Gremlin-1 and analysis of its interaction with BMP-2. *Biochem J.* 2016;473(11):1593-604.
181. Habib G, Lancellotti P, Antunes MJ, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: The Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). *Eur Heart J.* 2015;36(44):3075-128.
182. Taniguchi T, Morimoto T, Shiomi H, et al. High- Versus Low-Gradient Severe Aortic Stenosis: Demographics, Clinical Outcomes, and Effects of the Initial Aortic Valve Replacement Strategy on Long-Term Prognosis. *Circ Cardiovasc Interv.* 2017;10(5).
183. Joseph J, Naqvi SY, Giri J, et al. Aortic Stenosis: Pathophysiology, Diagnosis, and Therapy. *The American journal of medicine.* 2017;130(3):253-63.

## **7 Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde am Universitätsklinikum Tübingen in der Abteilung Innere Medizin III, Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie unter Betreuung von Frau PD Dr. med. Karin Müller, Geschäftsführende Oberärztin des Universitätsklinikums Tübingen und Herrn Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz, Chefarzt und Ordinarius für Innere Medizin und Kardiologie der Universität Tübingen, durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte mit Hilfe von Frau PD Dr. med. Karin Müller. Nach Einarbeitung durch Labormitglieder wurde die gesamte Laborarbeit, mit Ausnahme der hier erwähnten Punkte, ausschließlich und eigenständig von mir durchgeführt. Die Erhebung der Patientencharakteristik der gesamten Arbeit erfolgte ausschließlich durch mich. Die statistischen Auswertungen wurden ebenfalls nach Einarbeitung durch Frau PD Dr. med. Karin Müller und Frau Dr. You-Shan Feng von mir eigenständig durchgeführt. Die statistische Begutachtung erfolgte durch Frau You-Shan Feng, Ph.D. des Instituts für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen, Deutschland bzw. des Instituts für Community Medicine, Greifswald, Deutschland. Die Aufbereitung des Gewebes zur immunhistochemischen Färbung, die Färbungen an sich und auch das Fotografieren und Auswerten erfolgte ebenso durch mich, wie die Austestung der notwendigen Antikörperkonzentrationen. Bei der Erstellung der Abbildung 2 bis 4 wurde ich technisch von Herrn Jan Seichter unterstützt. Die Verwendung im Rahmen dieser Dissertatin erfolgt mit seiner Zustimmung. Die Gewinnung des Blutes von Patienten mit chirurgischem Aortenklappenersatz und Aortenklappenendokarditis erfolgte ausschließlich durch mich, ebenso die Aufbereitung, Färbung, Messung, Analyse und Auswertung der durchflusszytometrischen Färbungen. Ich versichere, das Manuskript nach Anleitung durch Frau PD Dr. med. Karin Müller, Herrn Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz, Frau Dr. sc. hum. Tatsiana Castor und Frau Dr. You-Shan Feng selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 08. März 2022

## 8 Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich all den vielen widmen, ohne die diese Promotion so nicht möglich geworden wäre:

Ich bedanke mich bei der medizinischen Fakultät der Universität Tübingen für die Möglichkeit dieser Promotion. Ich bedanke mich herzlich bei meiner Betreuerin Frau PD. Dr. med. Karin Müller für Ihre Unterstützung während der gesamter Dauer meiner Promotion. Ebenfalls bedanke ich mich bei meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz für die Möglichkeit in seiner kardiologischen Abteilung promovieren zu dürfen, als auch für seine Unterstützung. Mein großer Dank gilt allen Mitarbeitern des kardiologischen Forschungslabors der Universität Tübingen im Zeitraum 2016 bis 2021. Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern der kardiologischen, anästhesiologischen und herzchirurgischen Abteilungen des Universitätsklinikums Tübingen für die Unterstützung während dieser Promotion. Mein Dank gilt auch Frau Dr. You-Shan Feng und Frau Dr. sc. hum. Tatsiana Castor für Ihre wissenschaftliche Begeleitung.

Danke.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung während dieser Zeit. Mein tiefer Dank gilt meinen wunderbaren Eltern, die mich nicht nur während dieser Arbeit, sondern mein Leben lang unterstützten so gut sie können und nicht müde wurden, mich aufzubauen – Danke! Einen besonderen Dank möchte ich meinem geliebten Mann widmen, der scheinbar selbstverständlich diesen Weg mit all seinen Sonnenseiten und Steinen mit mir gemeinsam gegangen ist und mir, wie so oft, eine große Stütze war. Merci <3. Ich danke meinen Freunden und Verwandten die mich in jeder Form unterstützt und auf diesem Weg treu begleitet haben - ihr seid ein wahrer Schatz.

Danke.

Ich danke für jedes einzelne Gebet. Vergelt's Gott.

Danke, Gospa.

Mein größter Dank gebührt Gott.

Danke!