Aus der Klinik für Herzchirurgie der Universitätsklinik Düsseldorf Direktor: Univ.-Prof. Dr. Artur Lichtenberg

Einfluss des *Fto*-Gens (*fat mass and obesity-associated gene*) auf degenerative Prozesse in bovinem Glutaraldehyd-fixiertem Herzklappen-Bioprothesenmaterial in einem Knockout-Mausmodell

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

> vorgelegt von Michael Josef Sarter

> > 2020

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Payam Akhyari

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Thomas Höhn

Für meine Eltern.

Meín Dank íst größer, als díese Seíte jemals fassen könnte.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Jessica I. Selig, Michael Sarter, Mareike Barth, Antje Schomakers, Stefanie Seehaus, Ulrich Rüther, Artur Lichtenberg, Payam Akhyari (2017). Influence of the fat mass and obesity-associated (*Fto*) gene on the degeneration of heart valve prosthesis material. Deutsche Gesellschaft fur Kardiologie- Herz- und, Kreislaufforschung. [83th Annual Meeting of the German Cardiac Society - Cardiac and Circulation Research, April 19.- 22. 2017, Mannheim]. *Clin Res Cardiol, 106*(Suppl 1), 1. doi:10.1007/s00392-017-1105-2

Zusammenfassung

Beim Herzklappenersatz handelt es sich aufgrund der alternden Bevölkerung und den in den letzten Jahren stetig angestiegenen Operationszahlen um einen gesellschaftlich bedeutenden und ökonomisch relevanten Eingriff. Die zur Verfügung stehenden Prothesen erbringen bis heute keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Entweder ist eine lebenslange Antikoagulation von Nöten oder es besteht, bedingt durch Degeneration der Extrazellulärmatrix, die Gefahr eines frühzeitigen Funktionsverlustes mit erneuter Operation. Erstrebenswert wäre daher die Vorstellung, die Lebenszeit von Herzklappenbioprothesen verlängern zu können. Die Pathogenese der Degeneration von Herzklappenbioprothesen zeigt Übereinstimmungen zu derjenigen von Arteriosklerose. Einer viele der Hauptrisikofaktoren beider Erkrankungen ist das metabolische Syndrom. Zahlreiche epidemiologische Studien konnten belegen, dass bestimmte Polymorphismen des sogenannten Fat mass and obesity-associated (Fto) Gens das Risiko für die Entwicklung von Übergewicht deutlich erhöhen. Außerdem wurde eine Assoziation von einem Fto-Risikoallel mit Aortenklappenstenosen männlicher Patienten nachgewiesen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten Aufschluss darüber geben, ob das Gen auch eine kritische Rolle in der Degeneration von Herzklappenbioprothesen spielen könnte. Dazu nutzten wir ein etabliertes Modell der ektopen Kalzifizierung, bei dem Glutaraldehyd-fixierte Perikardtransplantate (GAPT) subkutan auf den Rücken von 20 ApoE-KO-Mäusen implantiert und nach acht Wochen wieder explantiert wurden. Bei der Hälfte von ihnen war Fto im Gegensatz zu ihren WT-Wurfgeschwistern inaktiviert (n=10). Wir stellten die Arbeitshypothese auf, dass die Degeneration und Kalzifizierung der GAPT in der KO-Gruppe geringer ausfällt als in der WT-Gruppe. Die Explantate nutzten wir für verschiedene Fragestellungen. Eine Darstellung der Morphologie erfolgte mittels immunhistochemischen Färbungen von Proteinen, die an inflammatorischen und proliferativen Prozessen beteiligt sind. Diese zeigten die Bildung einer neuen Kapsel und Invasion von Zellen in die GAPT. In der KO-Gruppe fand sich eine signifikant geringere Zellzahl und ebenso eine geringere Eindringtiefe von Makrophagen. Eine Assoziation des Gens mit einem Kollagenumbau und einer Angiogenese konnte nicht nachgewiesen werden. Ebenfalls stellte sich keine Assoziation des Genotyps mit der Menge des eingelagerten Kalziums und der Genexpression proinflammatorischer und chondro-osteogener Transkriptionsfaktoren dar. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit kann zunächst geschlossen werden, dass in dem Modell eine Reaktion der Empfänger auf die GAPT stattgefunden hat. Des Weiteren führt die Defizienz von Fto in Mäusen über den Einfluss auf die Zellinvasion und Eindringtiefe der Makrophagen in die GAPT zu einer Verringerung der Immunantwort des Empfängerorganismus. Diese Beobachtungen stützen die Hypothese, dass ein Zusammenhang zwischen *Fto* und der Degeneration von biologischen Herzklappenprothesen bestehen könnte, in dem Sinne, dass die Inaktivierung von Fto protektiv gegen die Degeneration von Herzklappenbioprothesen wirken könnte. Ob diese Erkenntnisse direkt auf den Verlust des Gens oder sekundär auf den veränderten Phänotypen der Maus mit einem allgemein erhöhten Energieumsatz zurückzuführen ist, muss durch weitere Versuche verifiziert werden.

Abstract

The aging population and the continuously increasing rate of cardiovascular operations and interventions targeting the heart valves underline the importance of these therapy modalities for the society and make it economically relevant. Until today, the results of implanted heart valve prostheses are not ideal. Mechanic heart valve prostheses require a life-long strong anticoagulation on the one hand, biological heart valve prostheses lose their function because of degeneration of the extracellular matrix on the other. This leads to the idea of prolonging the durability of biological heart valves. The signaling pathways involved in arteriosclerosis are similar to those suspected for the process of degeneration of biological heart valve prostheses. Metabolic syndrome is one of the main risk factors of both diseases. Several studies had shown that certain single-nucleotide-polymorphisms of the fat mass and obesity-associated (Fto) gene correlate with increased body weight in humans. In addition, a recent study has demonstrated an association between Fto and aortic valve stenosis in male patients. This thesis is intended to examine the influence of *Fto* in degeneration of biological heart valve prosthesis material (BHVP). Therefore we used a wellestablished ectopic degeneration model in mice. We implanted BHVP subcutaneously in ten recipients with deficiency for Fto (knockout group) and of ten *Fto* wildtype littermates (wildtype group) for eight weeks. All recipient had an apolipoprotein-E knockout. The hypothesis was that degeneration and calcification of BHVP in the knockout group isn't as strong as in the wildtype group. Morphological characteristics were evaluated by immunhistochemical stainings of proteins involved in proliferative and inflammatory processes. The BHPV was surrounded by a foreign body capsule and was interspersed with cells. Macrophages showed a significantly decreased migration capacity inside the BHPV in the knockout group. An association of *Fto* with collagen remodeling and angiogenesis could not been proved. Furthermore the expression of inflammatory and chondro-osteogenic marker genes were similar in both analyzed genotypes. There were no differences in tissue calcium accumulation. In conclusion, ectopically implanted BHVP provoke recipient's immune response and the formation of a fibrous capsule. Fto deficiency causes a reduced cell number inside the BHVP as well as a decreased infiltration rate of macrophages. This could be a first hint that *Fto* may be related to heart valve degeneration and that inactivation of *Fto* may be protective for biological heart valve prostheses. Whether these findings are directly caused by the loss of *Fto* or secondary to the phenotypically elevated energy expenditure of the *Fto*-knockout mice remains to be investigated.

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung	
ALPL	Alkaline Phosphatase	
АроЕ	Apolipoprotein E	
BMI	Körpermassindex (body-mass-index)	
Ca ²⁺	Kalziumionen	
cDNS	Zyklische Desoxyribonukleinsäure	
DAB	Diaminobenzidin	
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	
DNS	Desoxyribonukleinsäure	
EZM	Extrazellulärmatrix	
FA	Formaldehyd	
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)	
GAG	Gylkosaminoglykane	
GAPT	Glutaraldehyd-fixiertes Perikardtransplantat	
HE	Hämatoxylin-Eosin	
Hif1α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 alpha	
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)	
LDL	Lipoprotein niederer Dichte (low-density lipoprotein)	
MMP-2	Matrix-Metalloproteinase-2	
MW	Mittelwert	
NFkB	Kernfaktor Kappa-Leichtketten-Verstärker von aktivierten B-Zellen	
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)	
RNS	Ribonukleinsäure	
rpm	Runden pro Minute (<i>rounds per minute</i>)	
RS	Rückwärtssequenz	
RT	Raumtemperatur	
RT-PCR	Semi-quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion	
SEM	Standardfehler (standard error of means)	
SNPs	Einzelnukleotid-Polymorphismen (single-nucleotide-polymorphisms)	
ΤΑΥΙ	Transkatheter-Aortenklappen-Implantation (<i>trans-catheter aortic valve implantation</i>)	
TLR2	Toll-ähnlicher Rezeptor 2 (toll-like receptor 2)	

- **TLR4** Toll-ähnlicher Rezeptor 4 (*toll-like receptor 4*)
- **TNF**α Tumornekrosefaktor alpha
- VS Vorwärtssequenz
- **vWF** Von Willebrand Faktor
- **αSMA** Alpha Glattmuskelaktin (*alpha smooth muscle actin*)

Inhaltsverzeichnis

1.	Ein	leit	ung	1
1.	.1	Epi	demiologie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen	1
1.	.2	Her	zklappenvitien – Ätiologie und Klinik	2
1.	.3	Die	Therapie der Aortenklappenstenose	3
1.	.4	Der	Herzklappenersatz	4
	1.4	.1	Mechanische Prothesen	4
	1.4	.2	Biologische Prothesen	5
1.	.5	Deg	generation biologischer Herzklappenprothesen	6
1.	.6	Das	s Fto- (fat mass and obesity-associated) Gen	8
	1.6	.1	Die Funktion von <i>Fto</i>	8
	1.6	.2	Der Einfluss von Fto auf Adipositas	9
	1.6	.3	Fto und kardiovaskuläre Erkrankungen	10
1.	.7	Zus	ammenfassung der aktuellen Erkenntnisse	10
1.	.8	Fra	gestellung und Ziele dieser Arbeit	11
2.	Ma	teri	al	12
2.	.1	Ger	räte und Gebrauchswaren	12
2.	.2	Che	emikalien	13
2.	.3	Lös	ungen	15
2.	.4	Ant	ikörper	17
	2.4	.1	Primärantikörper:	17
	2.4	.2	Sekundärantikörper:	17
2.	.5	Prir	nersequenzen	18
2.	.6	Org	janismen	18
3.	Me	tho	den	20
3.	.1	Aus	sstanzen der Perikardtransplantate	20
3.	.2	Imp	lantation	20
3.	.3	Exp	plantation	21
3.	.4	His	tologie	21
	3.4	.1	Herstellung der Kryostat-Schnitte	21
	3.4	.2	HE-Färbung	21
	3.4	.3	Von Kossa-Färbung	22
	3.4	.4	Movat-Pentachrom-Färbung	22
	3.4	.5	Direktrot-Färbung/ Direktrot- und Echtgrün (FCF)-Färbung	23
	3.4	.6	DAB-Färbungen	24
	3.4	.7	DAB-Färbung mit Mac 2	26

3.4.8	MMP-2 Fluoreszenzfärbung	27
3.4.9	DAPI-Färbung	28
3.4.10	Deskriptive Auswertung	29
3.5 Ca	a ²⁺ -Assay	29
3.6 An	alyse der mRNS	30
3.6.1	RNS-Isolation	30
3.6.2	RNS-Konzentrationsbestimmung	31
3.6.3	cDNS-Synthese	31
3.6.4	Durchführung der RT-PCR	31
3.6.5	Analyse der RT-PCR	32
3.7 Sta	atistische Analysen	32
4. Ergek	onisse	33
4.1 Inf	ammation und Proliferation	33
4.1.1	Kapselbildung und Zellinvasion	33
4.1.2	Klassifizierung des Bindegewebes	34
4.1.3	Zellproliferation	34
4.1.4	Anzahl und Tiefe migrierter Zellen	36
4.1.5	Makrophagen-Invasion	37
4.1.6	Analyse der mRNS von Entzündungsmarkern	38
4.2 Ur	nbau der Kollagenstruktur	40
4.2.1	Klassifizierung der Kollagenfasern	40
4.2.2	Aufspaltung der Kollagenbindungen	40
4.2.3	Expression von MMP-2	41
4.3 An	igiogenese	42
4.4 Ka	Izifizierung	43
4.4.1	Morphologie und Übersicht	43
4.4.2	Genexpression osteo-chondrogener Marker	44
4.4.3	Ca ²⁺ -Ablagerung im Gewebe	45
5. Disku	ission	46
5.1 <i>Ft</i>	o und Degeneration von Herzklappenbioprothesen	46
5.2 Au	iswahl der Versuchstiere	46
5.3 Ma	ausmodell der ektopen Kalzifizierung	47
5.4 De	er Einfluss von <i>Fto</i> auf Degeneration von Herzklappenbioprothesen	48
5.4.1	Proliferation und Inflammation	48
5.4.2	Angiogenese	50
5.4.3	Kollagenumbau	51
5.4.4	Kalzifizierung	52

5.5 Kli	nische Relevanz und Ausblick	. 52
5.5.1	Nachsorge	. 52
5.5.2	Patienten mit <i>Fto</i> -Risikoallelen	. 53
5.6 Lin	nitationen	. 53
5.6.1	Modell der ektopen Kalzifizierung	. 53
5.6.2	Implantation in Mäuse	. 54
5.6.3	Lagerungszeit	. 54
5.6.4	Glutaraldehyd-Fixierung	. 54
5.7 Sc	hlussfolgerungen	. 55
6. Quelle	en- und Literaturverzeichnis	. 57

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Herz-Kreislauf-Erkrankungen repräsentieren die häufigste Todesursache in westlichen Industriestaaten. Eine Veröffentlichung des statistischen Bundesamtes aus dem Jahr 2015 macht deutlich, dass Herz-Kreislauf-Erkrankungen auch in Deutschland mit 38,5 % für die meisten Sterbefälle verantwortlich sind (Statistisches Bundesamt, 2017). Herzklappenvitien gewinnen aufgrund des ansteigenden Durchschnittsalters der Gesellschaft zunehmend an Bedeutung (Erdmann, 2011). So verstarben im Jahr 2015 in Deutschland allein 9.580 Menschen an nichtrheumatischen Aortenklappenerkrankungen (Statistisches Bundesamt, 2017).

Der Herzklappenersatz ist hinter Bypass-Operationen der zweithäufigste kardiovaskuläre Eingriff. Wie die Leistungsstatistik der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie aus dem Jahr 2017 belegt, erhöhte sich die Anzahl aus dem Vorjahr um circa 3 % von 32.346 auf 34.394 (siehe Abb. 1). Nicht zu verachten ist aber auch eine rasant ansteigende Anzahl an interventionellen Eingriffen an der Aortenklappe (engl.: *trans-catheter aortic valve implantation*, TAVI). Die ansteigenden Operationszahlen veranschaulichen die sowohl gesellschaftliche als auch ökonomische Relevanz der Thematik (Beckmann et al., 2018).



Abb. 1: Verteilung der kardiovaskulären Eingriffe in Deutschland

Leistungsstatistik der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Berlin über die kardiovaskulären Eingriffe in Deutschland aus dem Jahr 2017. Der Herzklappenersatz ist mit circa 34 % der zweithäufigste kardiovaskuläre Eingriff hinter Bypass-Operationen (Beckmann et al., 2018).

1.2 Herzklappenvitien – Ätiologie und Klinik

Der Entstehungsmechanismus von Herzklappenvitien beruht auf pathologischen Veränderungen der Herzklappen. Eine Insuffizienz zeichnet sich durch einen unvollständigen Klappenschluss mit retrogradem Blutfluss aus, während bei einer Stenose die Klappenöffnungsfläche, beispielsweise aufgrund geringerer Beweglichkeit, verkleinert ist. Der erschwerte anterograde Blutfluss führt zu einem pathologischen Druckgradienten zwischen prä- und poststenotischem Abschnitt. Bei Progredienz ist die Entwicklung einer dauerhaften Herzinsuffizienz möglich (Herold, 2017).

Resultierend aus der Anatomie und Physiologie entstehen Herzklappenfehler hauptsächlich im linken Herzen, welches den systemischen Kreislauf aufrecht hält. Das hier vorherrschende Hochdrucksystem bewirkt eine hohe Beanspruchung sowie stärkere Abnutzung (Schmidt, Lang, & Heckmann, 2010). Die stärkste klinische Relevanz besitzen Aortenklappenstenosen, die mit 43 % den größten Anteil aller Vitien ausmachen. Hinzukommend handelt es sich laut der Deutschen Gesellschaft für Thorax- Herz- und Gefäßchirurgie um die häufigste invasiv therapierte Herzklappenerkrankung (Beckmann et al., 2018).

Bei der Pathogenese von Vitien besitzen degenerative Veränderungen im hohen Alter eine besondere Bedeutung. Als Endstufe führen sie zu einer Kalzifizierung der Klappen. Entsprechend erhöht sich das Entstehungsrisiko mit jeder Lebensdekade um das Zweifache (Daniel et al., 2006). Darüber hinaus wurden wichtige Hauptrisikofaktoren wie Nikotinabusus, Bluthochdruck, männliches Geschlecht, Hyperkalziämie und erhöhter BMI herausgestellt, die sich direkt mit dem Krankheitsbild der Arteriosklerose überschneiden (Agmon et al., 2001; Lindroos et al., 1994; Stewart et al., 1997). Weitere Formen sind die meist bei jüngeren Patienten symptomatische, kongenitale Aortenklappenstenose oder die Verengung der Klappenöffnungsfläche als Spätfolge einer rheumatischen Infektion mit Streptokokken vom Typ A. Diese Erkrankungen sind sehr selten und spielen im klinischen Alltag in Zentraleuropa eine untergeordnete Rolle (Herold, 2017; Kaplan, Bolande, Rakita, & Blair, 1964).

Patienten mit Aortenklappenstenosen ohne oder mit nur milden klinischen Symptomen zeigen ein geringes Risiko für einen plötzlichen Herztod sowie hohe 10-Jahres-Überlebensraten. Eine invasive Therapie muss nicht unmittelbar erfolgen (Turina, Hess, Sepulcri, & Krayenbuehl, 1987). Meist werden Patienten allerdings bereits mit Symptomen wie belastungsabhängige Synkopen, Dyspnoe und Angina pectoris vorstellig. Dann wird die Stenose als hochgradig eingestuft und bedarf mit einer durchschnittlichen Überlebensdauer von nur circa zwei bis drei Jahren einer schnellstmöglichen operativen Therapie (J. Ross, Jr. & Braunwald, 1968).

1.3 Die Therapie der Aortenklappenstenose

Die operative Therapie ist der konservativen Behandlung in sehr frühen Stadien der Aortenklappenstenose nicht überlegen. Allein krankheitsbegünstigende Risikofaktoren sollten minimiert werden (Rosenhek et al., 2000). Die Ausbildung von klassischen Symptomen rechtfertigt hingegen den unmittelbaren Start einer kausalen Therapie. Weitere Indikationen bilden eine linksventrikuläre Ejektionsfraktion von < 50 %, ein mittlerer Druckgradient von > 40 mmHg oder eine Symptomentwicklung unter Belastung bei einer Öffnungsfläche von < 1 cm bei ansonsten klinisch asymptomatischen Patienten (Baumgartner et al., 2017).

Neben dem offen chirurgischen Aortenklappenersatz besteht die Möglichkeit der geltenden Behandlung mittels TAVI. Nach heute Empfehlungen der Fachgesellschaften ist dieser minimal-invasive Eingriff bei Patienten mit einem hohen Operationsrisiko oder bei Patienten mit einem intermediären Operationsrisiko und zusätzlichen, für den operativen Eingriff ungünstigen Faktoren indiziert (Baumgartner et al., 2017). Eine Ersatzklappe wird transvaskulär, in der Regel transfemoral oder aber auch mittels einer kleinen Thorakotomie über die Herzspitze (transapikal) auf die Position der verkalkten Klappe gesetzt. Seltener wird ein transaortaler oder transaxillärer Zugang gewählt. Abhängig von der Morphologie der verkalkten Klappe und der angewandten Prothesenart kann zunächst eine Sprengung der nativen Herzklappe mithilfe einer sogenannten Ballon-Valvuloplastie erfolgen, bevor die Implantation der neuen Klappe durchgeführt wird (Cribier et al., 2002).

Laut den ESC/EACTS Richtlinien ist der konventionelle Aortenklappenersatz bei allen behandlungsbedürftigen Patienten mit niedrigem oder mittlerem Operationsrisiko indiziert (Baumgartner et al., 2017). Dabei wird das Herz nach Sternotomie beziehungweise Thorakotomie und Anschluss des Patienten an die Herz-Lungen-Maschine mit einer kardioplegen Lösung zum Stillstand gebracht. Es erfolgt die Explantation der verkalkten Aortenklappe mit anschließender Implantation des Herzklappenersatzes über einen direkten transaortalen Zugang (Siewert, 2006).

Die degenerierte Klappe kann durch eine mechanische oder eine biologische Prothese ersetzt werden. Die Wahl der Ersatzklappe bedarf einer exakten Patienten-spezifischen Abwägung der Vor- und Nachteile.

1.4 Der Herzklappenersatz

1.4.1 Mechanische Prothesen

Nachdem die ersten Herzklappen in Form von Kugelprothesen ersetzt wurden (Harken et al., 1960), erfolgt seit 1977 der erfolgreiche Einsatz sogenannter Doppelflügelprothesen der Firma St. Jude Medical (Nicoloff et al., 1981). Eine Alternative stellen Monokippscheiben der Firma Medtronic dar. Beide Prothesentypen bestehen aus einem metallenen Korpus und einer Polyestermanschette, die bei der Implantation vernäht wird.

Mechanische Prothesen besitzen eine lange Haltbarkeit und müssen nur in Ausnahmefällen neu implantiert werden (Baudet et al., 1995; Smith, Westlake, Mullerworth, Skillington, & Tatoulis, 1993). Die Re-Operationsrate eines Klappenersatzes dieser Art beträgt auch 15 Jahre nach der Implantation noch weniger als 10 % (Ruel et al., 2004). An dem eingesetzten Fremdkörper kommt es zu einer verstärkten Blutgerinnung, welche das Risiko für die Entstehung von Thromben deutlich erhöht. Die Entscheidung für eine mechanische Prothese führt daher zu einer strengen und lebenslangen Antikoagulation (Rahimtoola, 2003). Indiziert sind diese Klappentypen eher bei jungen Patienten ohne eine Kontraindikation für eine Blutverdünnung oder bei bereits antikoagulierten Patienten (Pibarot & Dumesnil, 2009).

Einhergehend mit der Einnahme von blutverdünnenden Medikamenten erhöht sich das Risiko für thrombo-embolische Ereignisse und Blutungen. Die Blutungsgefahr kann insbesondere bei nachfolgenden großen Operationen problematisch werden. Eine Studie hat nachgewiesen, dass trotz angemessener Antikoagulation nur bei 23,3 % der Patienten keine der oben beschrieben Komplikationen zustande kamen (Casselman et al., 2001). Nachteilig sind auch die Herzklappengeräusche, die bei dem Klappenschluss erzeugt werden. Sie können zu einer Reduktion der Lebensqualität von Patienten mit mechanischem Herzklappenersatz führen (Golczyk, Kompis, Englberger, Carrel, & Stalder, 2010).

Die Risiken einer lebenslangen strikten Antikoagulation führen zu einer immer stärkeren Präferenz von anderen Prothesentypen, bei denen auf eine Blutverdünnung verzichtet werden kann. Eine solche Alternative stellt der biologische Herzklappenersatz dar.

1.4.2 Biologische Prothesen

Die ersten Implantationen biologischer Herzklappenprothesen erfolgten in Form sogenannter *Allografts*. Diese Klappen menschlicher Spender wurden im Jahr 1955 in die Aorta descendens und im Jahr 1968 erstmalig als Aortenklappenersatz in die Aorta ascendens eingesetzt (Bentall & De Bono, 1968; Murray, 1956). Gute Langzeitergebnisse haben zur Folge, dass *Allografts* als Goldstandard für den biologischen Klappenersatz gelten (O'Brien et al., 1995). Da die hohe Nachfrage über das vorhandene Angebot nicht gedeckt werden kann, werden sie vorzugsweise bei jungen Patienten ausgewählt (Chambers, Somerville, Stone, & Ross, 1997).

Bei der Ross-Operation werden Herzklappen desselben Individuums genutzt. Die Pulmonalklappe, dann als *Autograft* bezeichnet, wird an die Position der Aortenklappe transferiert und anstelle der entnommenen Pulmonalklappe wird eine Spenderklappe eingesetzt. Dieser Eingriff ist demnach deutlich komplexer als der Ersatz einer einzigen erkrankten Herzklappe. Langzeituntersuchungen gibt es noch nicht, jedoch zeigen erste klinische Erfahrungen niedrige Thrombose-, Endokarditis- und Degenerationsraten (Sievers et al., 2005).

Als Alternative werden heutzutage mit ansteigender Häufigkeit sogenannte *Xenografts* aus tierischem Gewebe verwendet. Bei den meisten dieser Implantate handelt es sich um Herzklappenprothesen aus Rinderperikard oder um Schweine-Nativklappen. Auch sie sind von einer Polyestermanschette umgeben, die zur besseren chirurgischen Implantierbarkeit dienen und in der Regel einen unterstützenden Stent beinhalten. Zur Verbesserung ihrer Haltbarkeit sowie hämodynamischer Eigenschaften wurden jedoch auch stentlose Prothesen entwickelt (Pibarot & Dumesnil, 2009), die allerdings in der klinischen Praxis eine eher untergeordnete Rolle spielen. Eine chemische Fixierung aller *Xenografts* verleiht der Klappe zusätzlich Stabilität und wirkt immunologischen Angriffen des Empfängerorganismus auf das körperfremde Gewebe entgegen. Erste Versuche mit Formalin zeigten aufgrund von Instabilität der Methode keine guten Ergebnisse (Buch, Kosek, Angell, & Shumway, 1970; Carpentier, Lemaigre, Robert,

Carpentier, & Dubost, 1969). Fixierungen mit Glutaraldehyd erzielten deutliche Verbesserungen der Resultate (Carpentier et al., 1974). Moderne Herzklappenprothesen werden zusätzlichen antikalzifizierenden Verfahren unterzogen, um die Haltbarkeit zu erhöhen.

Im Gegensatz zu dem mechanischen Herzklappenersatz müssen Patienten mit biologischen Prothesen nicht antikoaguliert werden. Das Risiko für Blutungen und thrombo-embolische Ereignisse ist deutlich gesenkt. Jedoch unterliegen alle Formen der Herzklappenbioprothesen einer degenerativen Veränderung. Sie können bereits nach 10-15 Jahren ihre Funktionsfähigkeit verlieren, was einen erneuten operativen Eingriff nach sich zieht (D. N. Ross, 1995; Yacoub et al., 1995). Bei sehr jungen Patienten (Alter < 50 Jahre) kann diese durchschnittliche Haltbarkeit auch noch deutlich kürzer ausfallen (s.u.). Um die Erforderlichkeit einer Re-Operation zu senken, wird der biologische Ersatz einer stenosierten Aortenklappe ab dem 60.-65. Lebensjahr empfohlen (Rahimtoola, 2003). Nach aktuellen Empfehlungen besitzt der Patientenwunsch zusätzlich einen sehr hohen Stellenwert (Baumgartner et al., 2017).

1.5 Degeneration biologischer Herzklappenprothesen

Aufgrund einer erhöhten hämodynamischen Belastung laufen degenerative Prozesse bei jungen Patienten verstärkt ab. Eingesetzte Herzklappenbioprothesen verlieren früher ihre Funktion. Weitere Hauptrisikofaktoren sind chronische Niereninsuffizienz sowie Hyperparathyreoidismus (Jamieson et al., 2004). Schoen und Levy zeigten in diesem Zusammenhang, dass die Wahrscheinlichkeit des Klappenversagens innerhalb von 10 Jahren bei über 70-Jährigen unter 10 % liegt. Bei unter 40-Jährigen steigt sie jedoch auf 20-30 % an (Schoen & Levy, 2005). Linksventrikuläre Hypertrophie, eine schlechte Funktion des linken Ventrikels und eine falsch gewählte Größe der Prothese sind untergeordnete Risikofaktoren (Ruel et al., 2004). An dieser Stelle wird ohne eindeutiges Ergebnis diskutiert, ob der Einsatz von bovinen gegenüber porzinen Bioprothesen überlegen ist (Le Tourneau et al., 2002).

Der molekulare Prozess der Degeneration von Herzklappenbioprothesen besteht im Wesentlichen aus der passiven Ablagerung von Mineralien, ferner aus zellulären und humoralen Immunreaktionen des Empfängers, und schließlich auch aus arteriosklerotischen Prozessen (Pibarot & Dumesnil, 2009). Mineralien wie Kalzium und Phosphat dringen, resultierend aus der Zerstörung der Doppellipidschicht der ursprünglichen Spenderzellen durch Glutaraldehyd, in die Prothese ein (Schoen & Levy, 2005). Im weiteren Verlauf fördern sie die Entstehung von Hydroxyapatitkristallen und führen so zu einer Verkalkung des Implantats (Pibarot & Dumesnil, 2009).

Trotz Antigen-maskierender Wirkung der chemischen Fixierung bekämpft der Empfängerorganismus das prothetische Material aktiv (Okamura et al., 1980). Wesentliche Bestandteile sind Immunreaktionen wie beispielsweise die Implantat-Invasion von T-Zellen und Makrophagen (Legare, Lee, Creaser, & Ross, 2000; Manji et al., 2006). Da junge Patienten über ein stärker ausgeprägtes Immunsystem verfügen, könnte es sich dabei um einen der Gründe für die kürzere Überlebensdauer der Prothesen handeln.

Die Degeneration von Herzklappenbioprothesen und das Krankheitsbild der Arteriosklerose besitzen gemeinsame Risikofaktoren wie Nikotinabusus, Adipositas, Hypercholesterinämie und das metabolische Syndrom (Briand et al., 2006; Farivar & Cohn, 2003; Pibarot & Dumesnil, 2009; Ruel et al., 2004). Auch eine verzögerte Klappendegeneration unter Statin-Therapie verdeutlicht das Bestehen einer engen Verbindung (Antonini-Canterin et al., 2003). Fette wie das Lipoprotein niederer Dichte (LDL), welches bei der Arteriosklerose ebenfalls von großer Bedeutung ist, migrieren in das bioprothetische Material. Die Vermutung, dass LDL über oxidative Reaktionen mit inflammatorischen Zytokinen zu einer Osteoblastendifferenzierung führen könnte (Pibarot & Dumesnil, 2009), wird auch von jüngeren Publikationen aufgegriffen (Mosier, Nguyen, Parker, & Simpson, 2018). Sie muss mithilfe weiterführender randomisierter Studien geprüft werden.



Abb. 2: Mögliches Modell der Degeneration von Herzklappenbioprothesen Die Degeneration besteht wesentlich aus den drei Teilbereichen Immunreaktion, arteriosklerotische Prozesse und Kalzifizierung. Dabei kommt es zur Invasion von Entzündungszellen, LDL und Ca²⁺ (Pibarot & Dumesnil, 2009).

Die Problematik des Funktionsverlustes von Herzklappenbioprothesen aufgrund degenerativer Prozesse gewinnt gerade in der heutigen immer älter werdenden Gesellschaft zunehmend an Bedeutung. So ist eine Re-Operation in vielen Fällen unumgänglich (Aupart et al., 2006). Damit einhergehend erhöht sich die Mortalität und die Kosten für die Gesundheitssysteme steigen. Es wäre daher sinnvoll, degenerative Prozesse, die in einem erneuten invasiven Eingriff enden können, präventiv hinauszuzögern oder gar ganz zu unterbinden.

1.6 Das Fto- (fat mass and obesity-associated) Gen

1.6.1 Die Funktion von Fto

Der Name *Fto* fand zum ersten Mal im Jahr 1999 Verwendung. Eine Arbeitsgruppe klonte eine Genregion von mehreren hundert Kilobasen in *fused toes* mutanten Mäusen und nannte diesen Abschnitt aufgrund seiner Größe *Fatso*, kurz *Fto* (Peters, Ausmeier, & Ruther, 1999).

Heutzutage wird der Genabschnitt als *fat mass and obesity-associated gene* bezeichnet und liegt auf Chromosom 16 des menschlichen Genoms (Dina et al., 2007). Das codierte Enzym ist der Superfamilie der Fe(II) – und 2-Oxoglutarat – abhängigen Dioxygenasen zugehörig (Sanchez-Pulido & Andrade-Navarro, 2007). Es handelt sich um eine oxidative DNS-Demethylase mit dem physiologischen Hauptsubstrat N6-Methyladenosin (Jia et al., 2011). Trotz des ubiquitären Vorkommens von *Fto* (Dina et al., 2007) zeigt sich eine auffällig hohe Expression in den Bereichen des Hypothalamus, die für die Steuerung des Energiehaushaltes zuständig sind. Dies gilt insbesondere für die Zeit nach der Nahrungsaufnahme (Gerken et al., 2007). Der exakte Funktionsmechanismus von *Fto* ist bis heute unbekannt.

1.6.2 Der Einfluss von Fto auf Adipositas

Die naheliegende Hypothese, dass eine enge Verbindung der Funktion von *Fto* mit dem Energieumsatz des Menschen besteht, konnte in verschiedensten Studien bewiesen werden. Unterschiedliche Varianten des Genabschnitts werden als Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) bezeichnet. Einzelne Risikoformen der SNPs verleihen dem Genträger ein stärkeres Risiko für erhöhtes Körpergewicht bis hin zu Adipositas (Dina et al., 2007; Scuteri et al., 2007). Die Rate an Diabetes mellitus Typ II ist ebenfalls erhöht (Frayling et al., 2007).

Wie eine Arbeitsgruppe um U. Rüther des Instituts für Entwicklungs- und Mokekularbiologie der Tiere der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf darstellte, haben nicht nur bestimmte SNPs Einfluss auf den Fettstoffwechsel. Es gelang ihnen, Fto in Mäusen durch den Einsatz einer Neomycin-Resistenz-Kassette auf den Exons zwei und drei zu inaktivieren. Im Vergleich zu mit intaktem Gen wiesen Wurfgeschwistern *Fto*-defiziente Tiere eine Erhöhung des Energieumsatzes und der Sympathikus-Aktivität sowie Wachstumsverzögerungen und Reduktionen des weißen Fettgewebes auf. Von besonderem Interesse war die Erkenntnis, dass auch die Defizienz von Fto Auswirkungen auf den Phänotypen eines Organismus hat und vor Adipositas schützen kann. So besaßen Mäuse mit ausgeschaltetem Gen unter fettreicher Diät ein signifikant geringeres Gewicht als Wildtyp-Wurfgeschwister (Fischer et al., 2009). Ein inaktives Gen könnte ebenso bei Menschen zu einer Veränderung des Phänotyps führen.

1.6.3 Fto und kardiovaskuläre Erkrankungen

Ein pathologisch erhöhter Körpermassindex (BMI) ist einer der Hauptrisikofaktoren für eine Vielzahl kardiovaskulärer Erkrankungen. Darunter fällt die Arteriosklerose, welche eine bedeutende Rolle in der Degeneration von Herzklappen und deren biologischem Ersatz zu spielen scheint. Fto kann bei Menschen zu der Entwicklung von Adipositas beitragen. Die resultierende Vermutung, dass bestimmte SNPs auch mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert sind, konnte bestätigt werden. Eine Veröffentlichung bewies eine positive Korrelation, die BMI-vermittelt und abhängig von der körperlichen Aktivität besteht (Ahmad et al., 2010). Eine Variante von Fto steht in Zusammenhang mit Aortenklappenstenosen. In der zu diesem Zweck durchgeführten Fall-Kontroll-Studie besaßen homozygote Männer mit dem Risikoallel rs9939609 ein signifikant höheres Risiko für die Entwicklung einer Aortenklappenstenose (Thron et al., 2015).

1.7 Zusammenfassung der aktuellen Erkenntnisse

Bei der (chirurgischen oder transkatherterbasierten) Implantation von Herzklappenbioprothesen nach Vitien handelt es sich um eine gesellschaftlich und ökonomisch bedeutende Operation (Statistisches Bundesamt, 2017). Der perfekte Herzklappenersatz sollte keine Thrombogenität aufweisen und lebenslang haltbar sein. Dadurch könnten strenge Antikoagulation und erneute operative Eingriffe verhindert werden. Trotz Verbesserungen, gerade der biologischen Prothesen, ist die heutige Wissenschaft von diesem Ziel noch weit entfernt.

Die Degeneration von Herzklappenbioprothesen ist der Hauptgrund für das Versagen eines biologischen Implantats mit resultierender Re-Operation. Die zugrunde liegenden Mechanismen der Prothesendegeneration sind nicht im Detail geklärt (Pibarot & Dumesnil, 2009). Gerade in der heutigen immer älter werdenden Gesellschaft stellt das Implantatversagen eine in höchstem Maße relevante klinische Problematik dar.

Fto hat einen großen Einfluss auf den Energiestoffwechsel. Einige SNPs können beim Menschen für Übergewicht mitverantwortlich sein (Church et al., 2010; Dina et al., 2007; Frayling et al., 2007). Wie Versuche mit Mäusen zeigten, kann die Defizienz von *Fto* das Risiko für Adipositas, die in enger Verbindung mit Arteriosklerose steht, senken (Fischer et al., 2009). Laut Studien verlaufen

arteriosklerotische Stadien ähnlich wie degenerative Prozesse in Herzklappen (Rajamannan, Edwards, & Spelsberg, 2003) und Herzklappenbioprothesen (Pibarot & Dumesnil, 2009).

1.8 Fragestellung und Ziele dieser Arbeit

Auf Grundlage der aktuellen Erkenntnisse der Wissenschaft lautet die Fragestellung dieser Arbeit, ob die Defizienz von *Fto* zu einer verringerten Degeneration von Bioimplantaten führen könnte. Dazu soll die Hypothese, dass die Degeneration der Extrazellulärmatrix (EZM) boviner Glutaraldehyd-fixierter Perikardtransplantate (GAPT) von Mäusen mit ausgeschaltetem *Fto*-Risikoallel im Vergleich zu Wildtyp-Wurfgeschwistern weniger stark ausgeprägt ist, verifiziert werden. Das verwendete Material ist identisch mit klinisch eingesetzten Herzklappenbioprothesen. Als Modell dient die ektope, subkutane Implantation des Herzklappenprothesenmaterials mit definierter und standardisierter Größe. Nach einem Zeitraum von acht Wochen werden die Implantate explantiert und in dem Herzklappenprothesenmaterial degenerative Prozesse mit Kalzifizierung als Endstufe untersucht (Giachelli, 2001; Speer et al., 2002; Steitz et al., 2002).

2. Material

2.1 Geräte und Gebrauchswaren

Calcium Assay Kit	Abnova, Taipeh, Taiwan
Cellstar Tubes	Greiner bio-one
Cryoröhrchen	VWR North America, Radnar PA, USA
Dako Pen	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Deckgläser	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland
Durchlichtmikroskop Leica DM 2000	Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland
Einbettschälchen Kunststoff	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Esketaminhydrochlorid	Pfizer Inc., New York, New York, USA
Filterpapier	Macherey- Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Glutaraldehyd-fixiertes Perikardtransplantat	Edwards Life Science, Irwine, CA, USA
GoTaq qPCR Master Mix	Promega, Medison, Wisconsin, USA
GraphPad Software	La Jolla, CA, USA
ImageJ	National Institutes of Health, Maryland, USA
Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
KryoCompound	Klinipath, Duiven, Niederlande
Laser Scanning Mikroskop 710	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Leica CM 1950 Kyrostat	Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland
Mausfutter	Ssniff Spezialitäten GmbH, Soest, Deutschland
NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg Deutschland
Pipettenspitzen	Starlab Group, Hamburg, Deutschland
QuantiTect Reserve Transkription	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Reaktionsgefäße

Schwingmühle MM400

StepOnePlus[™] Real-Time PCR System

Sterile Zellkultur Multiwell Platten (96 Wells)

SuperFrost Plus Objektträger

T3000 Thermocycler

Tecan Infinite M1000 Pro Waage

Zentrifuge 5804R

Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

RETSCH GmbH, Haan, Deutschland

Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland

R. Langenbrinck Labor- & Medizintechnik, Emmerdingen, Deutschland

Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland

Tecan Group, Männedorf, Schweiz

Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.2 Chemikalien

2-Methylbutan/Isopentan 3927.2, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland 5025.5, Carl Roth GmbH & Co KG, Aceton Karlsruhe, Deutschland Albumin Fraction V 8076.3, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe. Deutschland Ammoniaklösung, 30 % CP17.1, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland Brilliant Crocein R 1B-109, Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland Diaminobenzidin (DAB) Substrate Kit DAB530, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat 4984.3, Carl Roth GmbH & Co KG, (Na_2HPO_4) Karlsruhe, Deutschland Direct Red 80/Sirius Red 365548-5G, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland 236489-100G, Sigma-Aldrich Chemie Eisen-Chlorid-Hexahydrat GmbH, Taufkirchen, Deutschland Eosin B 861006-100G, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Essigsäure, 100 %	6755.2, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol (EtOH), 50 %, 70 %, 80 %, 96 %, 100 %	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Fast Green FCF	1.04022.0025, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd (FA), 37 %	4979.2, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
FA, 4 %	P087.3, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Gill 3 Hämatoxylin	6765009, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Hämatoxylin	H3136-25G, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Salzsäure (HCI), 37 %	2601.1, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Jod	7935.1, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCI)	HN02.3, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	3904.1, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumjodid	8491.3, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Kernechtrot-Aluminiumsulfat	N069.1, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Mayers Hämalaunlösung	1.09249.0500, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland,
Natriumchlorid (NaCl)	HN00.3, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumkarbonat	1.06392.1000, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland,
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	P4417-50TAB, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Phosphorwolframsäure	P4006-250G, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Pikrinsäure	84512.260, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

RotiHisto Kit II

Safran du Gatinais

Säurefuchsin

Tris (hydroxymethyl)-aminomethan

Triton[™] X-100

Tween 20 Detergent

Vectashield mit 4',6-Diamidino-2phenylindol (DAPI) Wasserstoffperoxid (H₂O₂), 30%

Xylol

T160.1, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland

5A-394, Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland

T128.1, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland

1.08382.2500, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland,

T9284-500ML, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

655205, Calbiochem Novabiochem, Sandhausen, Deutschland

Vector Laboratories Burlingham, CA, USA

9681.1, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland,

28975.325, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.3 Lösungen

Alcianblau-Lösung, 1 %	2 g Alcianblau 200 mL destilliertes Wasser (dH ₂ O)
Alkalischer Alkohol	40 mL Ammoniumhydroxid, 30 % 360 mL EtOH, 96 %
Alkoholischer Safran	12 g Safran du Gatinais 200 mL EtOH, 100 %
Alkoholisches Hämatoxylin, 2 %	10 g Hämatoxylin 500 mL EtOH, 96 %
Bouin's Lösung	300 mL Pikrinsäure 100 mL FA, 37 % 20 mL Essigsäure, 100 %
Brilliant Crocein R Stock	4 g Brilliant Crocein R 398 mL dH ₂ O
BSA-Lösung, 1%	1 g Albumin Fraction V 100 mL PBS
BSA, 5 % - + Tween, 0,1 % - Lösung	5 g Albumin Fraction V 100 µL Tween 20 Detergent 99,9 mL PBS
Crocein-Säurefuchsin	20 mL Säurefuchsin Stock

	80 mL Brilliant Crocein R
DAB	50 µL DAB Chromogen (DAB Substrate Kit)
	1 mL DAB Substrate Buffer (DAB Substrate Kit)
Echtgrün FCF-Lösung, 0,03 %	0,03 g Fast Green FCF 100 mL Picrinsäure
Eisenchlorid-Lösung	12,4 g Eisen-Chlorid-Hexahydrat 5 mL HCl, 37 % 500 mL dH₂O
Eosin-Lösung	1 g Eosin 100 mL EtOH, 100 % 200 µL Eisessig 100 mL dH ₂ O
Essigsäure, 1 %	5 mL Essigsäure, 100 % 495 mL dH ₂ O
Essigsäure, 5 %	10 mL Essigsäure, 100 % 190 mL dH2O
H ₂ O ₂ - Lösung, 3 %	8 mL H ₂ O ₂ , 30 % 72 mL PBS
HCI- Lösung, 1 %	2,7 mL HCI, 37 % 97,3 mL dH ₂ O
Jodlösung	10 g Jod 20 g Kaliumjodid 500 mL dH ₂ O
Natriumkarbonat-Formaldehydlösung	50 mL FA, 37 % 10 g Natriumkarbonat 150 mL dH ₂ O
Natriumthiosulfatlösung, 5 %	10 g Natriumthiosulfat 200 mL dH ₂ O
PBS	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,78 g Na ₂ HPO ₄ 0,24 g KH ₂ PO ₄ 1000 mL dH ₂ O
Phosphorwolframsäure, 5 %	25 g Phosphorwolframsäure 500 mL dH ₂ O
Pikro-Siriusrot-Lösung, 0,1 %	0,1 g Direct Red 80/Sirius Red 100 mL Pikrinsäure
Säurefuchsin Stock	0,5 g Säurefuchsin 497,5 mL dH ₂ O 2,5 ml Essigsäure, 100 %

Silbernitratlösung, 5 %	10 g Silbernitrat 200 mL dH₂O
TB- Puffer, 10-fach	60,57 g Tris(hydroxymethyl)- aminomethan 1 L dH ₂ O
TBS-Lösung, 10-fach	24,2 g Tris (hydroxymethyl)- aminomethan 80 g NaCl 1 L dH ₂ O
Triton X- Lösung, 0,25 %	250 μL Triton X 99,75 mL PBS
Weigert's Eisenhämatoxylin	40 mL Eisenchloridlösung 20 mL Jodlösung 60 mL Alkoholisches Hämatoxylin

2.4 Antikörper

2.4.1 Primärantikörper:

Anti-Ki-67 AK, anti rabbit Anti-αSMA antibody, anti rabbit Mac 2, anti mouse/human

MMP-2 AK, anti rabbit Vim alpha bovine, anti guinea pig

vWF, anti rabbit

ab16667, Abcam, Cambridge, England

ab5694, Abcam, Cambridge, England

CL8942AP, Cedarlane, Burlington, Kanada

ab37150, Abcam, Cambridge, England

GP53, PROGEN Biotechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland

A0082, Dako, Hamburg, Deutschland

2.4.2 Sekundärantikörper:

Sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
2438, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
NB7126, Novus Biologicals, Wiesbaden Nordenstadt, Deutschland
A-31576, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

2.5 Primersequenzen

Ager	VS: 5'-GGGTGCTGGTTCTTGCTCTA-3' RS: 5'-AGCACAAGTGGCTCTCCAAT-3'
ALPL	VS: 5'-CCTTGAAAAATGCCCTGAAA-3' RS: 5'-TTACTGTGGAGACGCCCATA-3'
BMP-2	VS: 5'-TGGAAGTGGCCCATTTAGAG-3' RS: 5'-TGACGCTTTTCTCGTTTGTG-3'
Hif1a	VS: 5'-GATCAGCCAGCAAGTCCTTC-3' RS: 5'-GGCTGGGAAAAGTTAGGAGTG-3'
MMP-2	VS: 5'-TTGCTCGGGCCTTAAAAGTA-3' RS: 5'-AGTCCATCCTTGCCATCAAA-3'
NFkB	VS: 5'-CTGCTCAGGTCCACTGTCTG-3' RS: 5'-GAGTTTGCGGAAGGATGTCT-3'
Nt5e	VS: 5'-CACCCTGAAGAAGGCTTTTG-3' RS: 5'-TCCAGGGCTTTCGGTTAATA-3'
Runx2	VS: 5'-GAAATGCCTCCGCTGTTATG-3' RS: 5'-TGGCTCAGATAGGAGGGGTA-3'
Osteopontin	VS: 5'-ATTTGCTTTTGCCTGTTTGG-3' RS: 5'-TCTGCTTCTGAGATGGGTCA-3'
TLR2	VS: 5'-TAGGGGCTTCACTTCTCTGC-3' RS: 5'-CCAAAGAGCTCGTAGCATCC-3'
TLR4	VS: 5'-TCAGAACTTCAGTGGCTGGAT-3' RS: 5'-CCTGGGGAAAAACTCTGGAT-3'
β-Aktin	VS: 5'-CTTCTTGGGTATGGAATCCTGTGG-3' RS: 5'-TTTACGGATGTCAACGTCACAC-3'

2.6 Organismen

Die insgesamt 20 Wurfgeschwister zählende Versuchsgruppe bestand aus zehn hinsichtlich des *Fto* Gens Wildtyp-Mäusen, im Folgenden mit WT abgekürzt, und zehn *Fto-Knockout*-Mäusen, im Folgenden mit KO abgekürzt. Alle Versuchstiere waren außerdem Apolipoprotein E (*ApoE*)-defizient (*Knockouts*). Es handelte sich also bei der experimentellen Gruppe um Doppelmutanten mit einem Verlust von *ApoE* und *Fto*, bei der Kontrollgruppe um Mutanten mit einem Verlust des *ApoE* Gens.

Die Mäuse wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Ulrich Rüther des Instituts für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland, zur Verfügung gestellt. Eine Tierversuchsgenehmigung des *Landesamts für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen* lag vor (Aktenzeichen: 84-02.04.2012.A160).

3. Methoden

3.1 Ausstanzen der Perikardtransplantate

Vor der Implantation wurden die GAPT in Kreise mit einem Durchmesser von 5 mm ausgestanzt. Das Material wurde freundlicherweise von der Firma *Edwards Life Science*, die einer der großen Hersteller von Herzklappenprothesen ist, zur Verfügung gestellt.

3.2 Implantation

Die GAPT wurden nach dem Modell der ektopen Kalzifizierung von Giachelli et al. implantiert (Giachelli, 2001). Zur Analgesie und Narkose erhielten die Mäuse 5 mg/kg Carprofen subkutan, 100 mg/kg Ketamin sowie 5 mg/kg Xylazin intraperitoneal. Nach circa 3 cm langem Hautschnitt in der dorsalen Medianebene, wurden jeweils zwei Implantate pro Seite in die Subkutis paramedian eingenäht. Die Versuchstiere wurden in den folgenden acht Wochen mit einer prokalzifizierenden Diät gefüttert, welche neben den normalen Futterinhaltsstoffen 1,5 % Dikalziumphosphat, 2 % Cholesterol und 300.000 IU/kg Vitamin D3 enthält. Die Operationen und Weiterbehandlung der Mäuse wurden freundlicherweise von Frau Dr. Jessica Isabel Selig und Frau Antje Schomakers aus der Forschungsgruppe Experimentelle Chirurgie der Klinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf, Deutschland, durchgeführt. An einem Versuchstierkundekurs wurde erfolgreich teilgenommen (siehe Abb. 3).



Abb. 3: Implantation

Aufgenommenes Bild von einem der Versuchstiere mit zwei bereits implantierten GAPT (blauer Pfeil) während der Operation.

3.3 Explantation

Nach acht Wochen wurden die Mäuse mit Kohlenstoffdioxid (CO₂) getötet. Die Explantation der GAPT fand in folgender Reihenfolge statt:

- 1. Herzentnahme
- 2. Einbettung des Herzens in KryoCompound nach Abtrennung des Apex
- Entnahme des GAPT f
 ür die sp
 ätere Genanalyse, Zerkleinerung mit dem Skalpell und Schockgefrieren in fl
 üssigem Stickstoff (N2)
- 4. Entnahme des GAPT für die Proteinanalyse und Schockgefrieren in N2
- 5. Entnahme des GAPT für die Histologie und Zweiteilung in der Mitte
- 6. Fixierung der einen Hälfte in 4 % FA und Einbettung in Paraffin
- 7. Einbettung der anderen Hälfte in KryoCompound und Schockgefrieren in N₂
- 8. Entnahme des GAPT für den Ca²⁺-Assay und Schockgefrieren in N₂ statt
- 9. Einfrieren aller entnommenen Proben bei -80 °C

3.4 Histologie

3.4.1 Herstellung der Kryostat-Schnitte

Die histologischen Proben wurden mit einem Kryostat in 7 mm dünne Gewebeschnitte geschnitten. Der Block wurde im 90°-Winkel zur Schnittrichtung des Messers eingespannt. Auf jeden Objektträger wurden zwei Schnitte aufgenommen. Jede Färbung wurde mit einem Objektträger pro Versuchstier durchgeführt.

3.4.2 HE-Färbung

Die Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) zeigt die saure Desoxyribonukleinsäure (DNS) der Zellkerne violett und die EZM aufgrund ihres basischen pH-Wertes rötlich.

Färbeprotokoll:

- 1. Filterung der Hämatoxylin- und der Eosin-Lösung
- 2. 1 min Färbung in Hämatoxylin-Lösung
- 3. 1 min in dH_2O
- 4. 1 min in 5 % Essigsäure
- 5. 1 min in dH₂O
- 6. 2 min unter fließendes Leitungswasser

- 7. 1 min in 70 % EtOH
- 8. 12 min Färbung in Eosin-Lösung
- 9. Jeweils 1 min Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe
- 10. Objektträger trocknen lassen
- 11. Eindecken mit RotiHisto Kit II

3.4.3 Von Kossa-Färbung

Die Von Kossa-Färbung dient dem Nachweis von Phosphatablagerungen. Schnitte einer verkalkten Aortenwand wurden als Positivkontrolle mitgeführt. Über eine Reduktion von Silbernitrat werden schwarze Ablagerungen sichtbar.

Färbeprotokoll:

- 1. 8 min Fixierung in Aceton
- 2. Schnitte lufttrocknen lassen
- 3. Kurzes Eintauchen in dH₂O
- 20 min Inkubation in 5 % Silbernitratlösung unter einer Neonröhre im 90°-Winkel zum Licht
- 5. 2 min Reduktion in Natriumkarbonat-Formaldehydlösung
- 6. 10 min unter fließendes Leitungswasser
- 7. 5 min Inkubation in 5 % Natriumthiosulfatlösung
- 8. 15 min unter fließendes Leitungswasser
- 9. 3 min in dH₂O
- 10. 10 min Kernfärbung in Kernechtrot-Aluminiumsulfat
- 11. 3 min in dH_2O
- 12. Jeweils 2 min in aufsteigender Alkoholreihe
- 13. 2x 5 min in Xylol
- 14. Objektträger trocknen lassen
- 15. Eindecken mit RotiHisto Kit II

3.4.4 Movat-Pentachrom-Färbung

Mit der Movat-Pentachrom-Färbung können verschiedene Komponenten der EZM differenziert werden. Sie zeigt Zellkerne und elastische Fasern schwarz, den Hintergrund blau, Muskulatur rot, Kollagen und retikuläres Bindegewebe gelb, Glykosaminoglykane (GAG) grün sowie Fibrin und Fibrinoide in intensivem Rot.

Färbeprotokoll:

- 1. Schnitte über Nacht bei 37 °C erwärmen
- 2. 5 min in dH_2O
- 3. 10 min Fixierung in 4 % FA
- 4. 5 min in dH₂O
- 5. 10 min Färbung in 50 °C Bouin's Lösung
- 6. 10 min unter fließendes Leitungswasser
- 7. 5 min Inkubation in 5 % Natriumthiosulfatlösung
- 8. $3x 2 \min in dH_2O$
- 9. 20 min Färbung in 1 % Alcianblau
- 10. 3:30 min unter fließendes Leitungswasser
- 11. 10 min Stabilisierung in 60 °C alkalischem Alkohol
- 12. 3:30 min unter fließendes Leitungswasser
- 13. 9 min Färbung in Weigert's Eisenhämatoxylin
- 14. 1 min unter fließendes Leitungswasser
- 15. $3x 2 \min \operatorname{in} dH_2O$
- 16. 1 min Färbung in Crocein-Säurefuchsin-Lösung
- 17. $3x 2 \min \operatorname{in} dH_2O$
- 18. 5 min Differenzierung in 5 % Phosphorwolframsäure
- 19. 5 min in 5 % Essigsäure
- 20. 5 min in dH_2O
- 21. 1 min in 96 % EtOH
- 22. 2x 1 min in 100 % EtOH
- 23. 8 min Färbung in alkoholischem Safran
- 24. 2x 1 min Entwässerung in 100 % EtOH
- 25. 3x 5 min Entwässerung in Xylol
- 26. Objektträger trocknen lassen
- 27. Eindecken mit RotiHisto Kit II

3.4.5 Direktrot-Färbung/ Direktrot- und Echtgrün (FCF)-Färbung

In der Direktrot-Färbung stellen sich Kollagene rot und Muskelzellen, Zytoplasma sowie der Hintergrund gelb dar. Echtgrün zeigt zusätzlich Zellen grün.

Färbeprotokoll:

- 1. 5 min Entwässerung in 70 % EtOH
- 2. $2x 2 \min in dH_2O$
- 3. 40 min Färbung in 0,03 % Echtgrün-Lösung (nur bei Pikro-Siriusrot und Echtgrün FCF-Färbung)
- 4. 2x Eintauchen in dH₂O (nur bei Pikro-Siriusrot und Echtgrün FCF-Färbung)
- 5. 10 min Färbung in 0,1 % Pikro-Siriusrot-Lösung
- 6. 2x Eintauchen in dH₂O
- 7. 2x 5 min Entwässerung in 100 % EtOH
- 8. 3x 5 min Entwässerung in Xylol
- 9. Eindecken mit RotiHisto Kit II

Neben Bildern mit einem Durchlichtmikroskop wurden von der Pikro-Siriusrot Färbung auch Aufnahmen unter polarisiertem Licht angefertigt. Dort zeigen sich dicke Kollagenfasern vom Typ I in gelboranger Farbe, während dünne Fasern vom Typ III aufgrund von Doppellichtbrechung eine grüne Farbe aufweisen. Die Farbverteilung kann Aufschluss über einen möglichen Kollagenabbau liefern.

3.4.6 DAB-Färbungen

Bei der Diaminobenzidin (DAB)-Färbung handelt es sich um eine indirekte, immunhistochemische Färbung. Ein spezifischer und unkonjugierter Primärantikörper bindet an das bestimmte Epitop eines Proteins. Anschließend wird ein mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelter Sekundärantikörper hinzugegeben. Die HRP reagiert mit H₂O₂ und Protonen werden frei. Die Oxidation des DAB bewirkt die Ausfällung eines braunen Farbstoffs. Der Hintergrund und die Zellkerne werden mittels einer Hämalaun-Lösung blau-violett dargestellt. Negativkontrollen ohne Primärantikörper-Lösung auf jedem Objektträger und eine Positivkontrolle pro Färbung wurden mitgeführt.

Färbeprotokoll:

- 1. Umrandung der Schnitte mit dem DakoPen
- 2. 10 min Fixierung mit 4 % FA oder Aceton (siehe Tabelle 1)
- 3. 3x 1 min in PBS
- 4. 10 min Inkubation in 0,25 % Triton X
- 5. 3x 1 min in PBS
- 6. 60 min Blockade in 5 % BSA- + 0,1 % Tween-Lösung

- 7. 60 min Primärantikörper-Inkubation in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur (RT), Verdünnung siehe Tabelle 1
- 8. 10 min Blockade in H₂O₂-Lösung
- 9. 3x 5 min in PBS
- 10. 45 min Inkubation Sekundärantikörper-Inkubation in einer Feuchtkammer bei RT, Verdünnung siehe Tabelle 1
- 11. 3x 5min in PBS
- 12. 10 min in 1:10 verdünnten TB-Puffer
- 13. Färbung in DAB, Dauer siehe Tabelle 1
- 14. 5 min in 1:10 verdünnten TB-Puffer
- 15. 1 min in dH_2O
- 16. 1 min Kernfärbung in Hämalaun-Lösung
- 17. Eintauchen in Leitungswasser
- 18. Eintauchen in 1 % HCI-Lösung
- 19. 5 min unter fließendes Leitungswasser
- 20. 1 min in dH₂O
- 21. 1 min Entwässerung in EtOH
- 22. Eindecken mit RotiHisto Kit II

Nach diesem Färbeprotokoll wurden die DAB-Färbungen mit Vimentin, Ki-67, Von Willebrand Faktor (vWF) und Alpha Glattmuskelaktion (αSMA) durchgeführt. Die DAB-Färbung mit Ki-67 wurde quantitativ ausgewertet. Dazu wurde die Menge der DAB-positiven Zellkerne innerhalb jedes GAPT bestimmt. Die am weitesten außen gelegenen Kollagenstränge wurden unter dem Durchlichtmikroskop in 400-facher Vergrößerung erfasst. Sie wurden als Außengrenzen der GAPT festgelegt. Alle innerhalb dieser Grenze liegenden, DAB-positiven Zellkerne wurden als mitotischaktiv und invasiv gewertet.
Protein	Primärantikörper	Sekundärantikörper	Fixierung	Inkubation
Ki-67	Anti-Ki-67 AK, anti rabbit; 1:100	Goat anti rabbit IgG; 1:200	4% FA	10 min
Mac 2	Mac 2, anti mouse/human; 1:600	Anti rat IgG2a HRP; 1:600	4% FA	3 min
MMP-2	MMP-2 AK, anti rabbit; 1:200	Goat anti rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor ® 635; 1:200	Aceton	-
Vimentin	Vim GP 53 alpha bovine, anti guinea pig; 1:100	Goat anti guinea pig; 1:200	4% FA	4:30 min
vWF	vWF, anti rabbit; 1:300	Goat anti rabbit IgG; 1:200	Aceton	2 min
αSMA	Anti-αSMA antibody, anti rabbit; 1:300	Goat anti rabbit IgG; 1:200	Aceton	5 min

Tabelle 1: Antikörperliste

Für die DAB-Färbungen verwendete Primär- und Sekundärantikörper mit jeweiliger Verdünnung, Fixierungsart und Inkubationszeit.

3.4.7 DAB-Färbung mit Mac 2

Die DAB-Färbung mit dem Antikörper Mac 2 diente dem Nachweis Makrophagenspezifischer Proteine. Sie erfolgte mit Ausnahme von wenigen Veränderungen äquivalent zu den anderen DAB-Färbungen. Nach der Fixierung wurden die Proben 1 h bei RT in einer 10 % TBS-/ 10 % FKS-/ 1 % BSA-Lösung blockiert. Außerdem fand die Primärantikörper-Inkubation (Verdünnung siehe Tabelle 1) über Nacht in einer Feuchtkammer bei 4 °C statt. Die Sekundärantikörper-Inkubation (Verdünnung siehe Tabelle 1) erfolgte 1 h bei RT in einer Feuchtkammer.

Bei der DAB-Färbung mit dem Mac 2 Antikörper wurde die relativen Invasionstiefen der positiven Zellen in das Innere der GAPT bestimmt. Drei Bilder pro Schnitt wurden mit dem Durchlichtmikroskop der Firma Leica in 100-facher Vergrößerung so aufgenommen, dass jede Aufnahme ein Drittel des Gewebeschnittes zeigte. Nach Verblindung des Untersuchers wurde mithilfe des Programms ImageJ die obere (a) und untere (b) Invasionstiefe der positiven Zellen sowie der Querdurchmesser (c) in µm ausgemessen (siehe Abb. 4). Die relative Invasionstiefe positiver Zellen wurde wie folgt berechnet:

Invasionsgrad (in %) =
$$\frac{a+b}{c} \times 100$$



Abb. 4: Schema zur Berechnung der relativen Invasionstiefe Mac 2-positver Zellen

Die relative Invasionstiefe eingewanderter Mac 2-positiverZellen in das Innere der GAPT (hellgrau) wurde berechnet, indem ohne Berücksichtigung der Kapsel (dunkelgrau) die obere und untere Eindringtiefe DAPI-positiver Zellen in μ m gemessen (a und b) und durch den Querdurchmesser in μ m (c) geteilt wurde. Anschließend Multiplikation mit 100.

3.4.8 MMP-2 Fluoreszenzfärbung

Der Nachweis der Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2) erfolgte über eine Fluoreszenzfärbung mit Antikörpern, die spezifisch an Epitope dieses Proteins binden.

Färbeprotokoll:

- 1. 10 min Fixierung in Aceton
- 2. 3x 1 min in PBS
- 3. 10 min Permeabilisierung in 0,25 % Triton X-Lösung
- 4. 3x 1 min in PBS
- 5. 60 min Inkubation in 5 % BSA- + 0,1 % Tween-Lösung
- 6. 60 min Primärantikörper-Inkubation in einer Feuchtkammer bei RT
- 7. 3x 5 min in PBS
- 8. 45 min Sekundärantikörper-Inkubation in einer Feuchtkammer bei RT
- 9. 3x 5 min in PBS
- 10. 1 min dH₂O
- 11. 1 min Entwässerung in 100 % EtOH
- 12. Objektträger trocknen lassen
- 13. Eindecken mit DAPI-Vectashield

Die Emission des Sekundärantikörpers liegt bei 633/647 nm (Goat anti rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor ® 635). Mithilfe des Laser-Scanning-Mikroskops 710 (Zeiss) wurden jeweils drei Bilder jedes Schnitts in 100-facher Vergrößerung aufgenommen, die nur Lichtsignale dieser Wellenlänge anzeigen.

3.4.9 DAPI-Färbung

4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der DNS markiert. Bei ultraviolettem Licht fluoresziert es in sichtbarem Bereich und zeigt Zellkerne in blauer Farbe.

Färbeprotokoll:

- 1. 10 min Fixierung in 4 % FA
- 2. 3x 5 min in PBS
- 3. 1 min in dH₂O
- 4. 1 min Entwässerung in 100 % EtOH
- 5. Objektträger trocknen lassen
- 6. Eindecken mit DAPI-Vectashield

Neben der Bestimmung der relativen Invasionstiefe der Zellen (siehe Abb. 4) wurde mit der DAPI-Färbung auch die Anzahl positiver Zellen pro Schnitt im gesamten GAPT bestimmt. Dazu wurden die drei Teilaufnahmen mit ImageJ zusammengesetzt. Dann wurden die genauen Grenzen der GAPT umfahren, um die Zellen in der umliegenden Kapsel nicht mitzuzählen. Nach Verringern der Hintergrundfärbung konnte die Anzahl positiver Zellen mit dem Programm bestimmt werden (Makro siehe Abb. 5).



Abb. 5: Makro zur Bestimmung der Anzahl DAPI-positiver Zellen Mithilfe dieses Makros wurde die Hintergrundfärbung der DAPI-gefärbten Schnitte verringert und die Anzahl positiver Zellen innerhalb der GAPT konnte mit dem Programm ImageJ bestimmt werden.

3.4.10 Deskriptive Auswertung

Die Färbungen HE, Von Kossa, Movat-Pentachrom, Direktrot, Direktrot- und Echtgrün (FCF) sowie die DAB-Färbungen mit Vimentin, vWF und αSMA wurden deskriptiv ausgewertet. Dazu wurden die gefärbten Schnitte auf Auffälligkeiten untersucht und Bilder mit einem Durchlichtmikroskop der Firma Leica in 50-, 100-, 200-, und 400-facher Vergrößerung aufgenommen.

3.5 Ca²⁺-Assay

Der Kalziumionen (Ca²⁺)-Assay dient dazu, die Konzentration von Ca²⁺ in Gewebe zu quantifizieren. Dabei reagiert vorhandenes Ca²⁺ mit Phenolsulphonephthalein zu einem stabilen, blaufarbigen Komplex. Die Ca²⁺-Konzentration kann über die Intensität der Blaufärbung unter Zuhilfenahme einer Standardreihe errechnet werden. Die Durchführung erfolgte nach Herstellervorgaben.

Vorbereitend wurden die GAPT von -80 °C in N₂ überführt. Nach der Gewichtsbestimmung erfolgte die Zerkleinerung der GAPT mit einem Metall-Mörser und das zerkleinerte Gewebe wurde in 70 μ L Tris-HCI-Puffer gelöst. Das Lysat wurde 15 min bei 4 °C und 11.000 Runden pro Minute (rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde für den Ca²⁺-Assay verwendet.

Gleiche Volumina von den in dem Assay enthaltenen Reagenzien A und B wurden zu einem Arbeitsreagenz zusammengemischt. Eine Standardreihe mit bestimmten Ca²⁺-Mengen wurde erstellt, indem eine Standard-Lösung mit Tris-HCI auf ein Volumen von 50 µL verdünnt wurde (siehe Tabelle 2).

Menge Standard Lösung (µL)	Menge Tris HCI (µL)	Kalzium-Menge (mg/dL)
50	0	20
40	10	16
30	20	12
20	30	8
15	35	6
10	40	4
5	45	2
0	50	0

Tabelle 2: Standardreihe Ca²⁺-Assay

Vorgegebene Mengen der Standard Lösung und Tris HCl in µL, sowie zugehörige Kalzium-Menge in mg/dL.

Jeweils 5 µL der verdünnten Standard-Lösung wurden zusammen mit 15 µL Tris HCI als Tripletts in eine 96-Loch Platte pipettiert. Dupletts à 20 µL von aufbereiteten GAPT und 200 µL Arbeitsreagenz wurden hinzugegeben. Nach 3 min Inkubation bei Raumtemperatur fand die Intensitätsbestimmung der entstandenen Blaufärbung mit Hilfe des Tecan Infinite M1000 Pro statt.

Für die Analyse wurde ein Graph der Standardreihe mit der Ca²⁺-Konzentration und zugehöriger Absorption der Blaufärbung erstellt. Die entstandene Gerade hatte eine Steigung von y=0,03. Von den Dupletts der GAPT wurde der Mittelwert (MW) gebildet. Um die Ca²⁺-Konzentrationen (c[Ca]) zu errechnen wurde von diesem die Ca²⁺-Konzentration von 0 mg/dL der Standardreihe (STD0) subtrahiert und anschließend durch die Steigung y geteilt:

$$c(Ca) = \frac{MW - STD0}{y}$$

3.6 Analyse der mRNS

3.6.1 RNS-Isolation

Die in den GAPT enthaltene Gesamt-Ribonukleinsäure (RNS) wurde isoliert. Dazu wurden sie in einer Kugelmühle für 30 s mit einer Frequenz von 30 x/s geschüttelt und dadurch homogenisiert. Um die Zellstrukturen aufzulösen, wurde 1 mL Trizol in jedes Reaktionsgefäß pipettiert und durchmischt. Nach 15 min Erwärmung bei 37 °C wurden 200 µL Chloroform hinzugegeben und erneut durchmischt. Dann

wurden die GAPT 15 min bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert. Die entstandene obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Hinzugabe von 500 μ L Isopropanol wurden die GAPT über Nacht bei 4 °C gelagert. Sie wurden 30 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das Isopropanol wurde abgesaugt. Die pelletierte RNS wurde mit 500 μ L 70 % EtOH gewaschen und 15 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Dann wurde sie nach Abnahme des EtOH für 30 min getrocknet. Im letzten Schritt wurde die isolierte RNS in 15 μ L RNAse freiem dH₂O gelöst.

3.6.2 RNS-Konzentrationsbestimmung

Die RNS-Konzentration wurde spektralphotometrisch mithilfe des NanoDrops gemessen. Hierzu wurde das Computer-Programm ND-1000 genutzt.

3.6.3 cDNS-Synthese

Die cDNS-Synthese wurde mit dem QuantiTect Reserve Transcription Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Dazu wurde die RNS in dH₂O gelöst. 12 μ L Flüssigkeit enthielten 1.000 ng RNS. Bei zwei GAPT wurden in 12 μ L Flüssigkeit 200 ng RNS gelöst, da die Menge der isolierten RNS für 1000 ng nicht ausreichte. Die genomische DNS wurde vor dem Umschreiben zerstört. Dazu wurde jeder Lösung 2 μ L Puffer zum Abbau der genomischen DNS (*gDNA Wipeout Buffer*) hinzugegeben und im T3000 Thermocycler 2 min bei 42 °C erhitzt. Es erfolgte die Hinzugabe des MasterMixes bestehend aus 4 μ L Puffer, 1 μ L Primer und 1 μ L Reverser Transkriptase pro Probe. Die cDNS wurde bei -20 °C gelagert.

3.6.4 Durchführung der RT-PCR

Mit der Semi-quantitativen Echtzeit Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) werden bestimmte Genabschnitte amplifiziert. Hierzu binden zunächst spezifische Primer an Genabschnitte. Diese werden mithilfe spezieller reverser Transkriptasen verdoppelt. Durch Erhitzen wird die neu entstandene DNS voneinander getrennt. Der Zyklus wird mehrere Male wiederholt. Die RT-PCR erlaubt darüber hinaus eine sofortige Quantifizierung. Dazu wird der zunächst inaktive Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green beigemischt. Dieser wird durch die Vervielfältigung der DNS aktiviert und die Menge der amplifizierten DNS wird errechnet.

Vor der Durchführung der RT-PCR mit dem StepOnePlusTM RT-PCR System wurden spezifische Primersequenzen für die Gene erstellt (siehe 2.5). Insgesamt

wurden zehn Gene untersucht. Als sogenanntes *housekeeping*-Gen wurde β -Aktin verwendet. Die cDNS von jedem GAPT wurde für jedes Gen in Dupletts pipettiert. Jedes Loch der 96-Loch Platte bestand aus 7,4 µL Nuklease-freiem dH₂O, 10 µL reverse Transkriptase, 0,3 µL Vorwärtsprimer, 0,3 µL Rückwärtsprimer und 2 µL der jeweiligen cDNS. Vor Hinzugabe der cDNS wurde sie mit 80 µL dH₂O verdünnt. Die cDNS-Ausgangsmenge in einem Loch betrug 20 ng. Von jedem Gen wurden zwei Wasserproben getestet, bei denen die 2 µL cDNS durch dH₂O ersetzt wurde. Bei einem Amplifizierungszyklus wurden die Proben zunächst 15 s auf 95 °C erhitzt und anschließend 1 min auf 60 °C herunter gekühlt.

3.6.5 Analyse der RT-PCR

Die RT-PCR wurde mit der StepOne Software v2.3 analysiert. Die Auswertung der Genexpression erfolgte mit der $\Delta\Delta$ CT-Methode. Dabei wurde die Expression sowohl auf die endogene Kontrolle (β -Aktin) des jeweiligen GAPT, als auch auf ein GAPT der WT bezogen.

3.7 Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism 6 der Firma GraphPad Software durchgeführt. Die Daten sind als MW ± Standardfehler (SEM) dargestellt. Der Vergleich zwischen den Versuchsgruppen erfolgte mit einem Mann-Whitney Test. p-Werte < 0,05 wurden als signifikant unterschiedlich erachtet. In den statistischen Diagrammen entspricht jeder Datenpunkt einem Versuchstier.

4. Ergebnisse

4.1 Inflammation und Proliferation

4.1.1 Kapselbildung und Zellinvasion

HE diente als Übersichtsfärbung. Die hauptsächlich aus Kollagensträngen bestehende EZM der GAPT war von einer neu gebildeten und Zellkern-reichen Kapsel um die gesamte Zirkumferenz umgeben. Außerdem ließen sich migrierte Zellkerne identifizieren. Sie unterschieden sich von flachen, am Rand der Kollagenstränge befindlichen, bovinen, Glutaraldehyd-fixierten Zellkernen (siehe Abb. 6).



Abb. 5: Explantierte GAPT in der HE-Färbung

A: Übersichtsaufnahme eines Gewebeschnittes eines explantierten GAPT in niedriger Vergrößerung. Unten rechts im Bild zeigt sich der Anschnitt eines chirurgischen Fadens, der für die Implantation verwendet wurde (blau; Pfeile). Vergrößerung 50x, Maßstabsbalken = 500 μm.

B: In höherer Auflösung im Bereich der äußeren Areale des GAPT sind die eosinophilen Kollagenstränge von einer Zellkern-reichen Kapsel umgeben. Im GAPT lassen sich bovine und fixierte Zellkerne von eingewanderten Zellkernen (Pfeile) abgrenzen. Vergrößerung 200x, Maßstabsbalken = 100 µm.

C: Kontrollaufnahmen eines GAPT, das nicht implantiert wurde. Es zeigen sich Kollagenstränge ohne migrierte Zellkerne, die nicht von einer Zellkern-reichen Kapsel umgeben sind. Bovine und Glutaraldehyd-fixierte Zellkerne sind vorhanden. Vergrößerung 200x, Maßstabsbalken = 100 μm.

4.1.2 Klassifizierung des Bindegewebes

Die Movat-Pentachrom-Färbung wurde angefertigt, um die Bestandteile des Bindegewebes differenzieren zu können. Die GAPT bestehen hauptsächlich aus Kollagen mit teils kapsulären und teils eingewanderten Zellen. Die umliegende Kapsel enthält GAG (siehe Abb. 7).



Abb. 7: Explantierte GAPT in der Movat-Pentachrom-Färbung

A: Übersichtsaufnahme eines Gewebeschnittes eines explantierten GAPT in niedriger Vergrößerung. Das, GAPT besteht hauptsächlich aus Kollagen (gelb). Oben rechts im Bild ist der Anschnitt eines chirurgischen Fadens erkennbar, der für die Implantation verwendet wurde (blau). Klar zu erkennen ist unten rechts im Bild außerhalb des eigentlichen GAPT ein zellreiches Areal (rote punktförmige Strukturen entsprechen Zellkernen) mit einer anderen Qualität von EZM, die von GAG und Grundsubstanz (türkisblau) geprägt ist (Pfeile). Vergrößerung 50x, Maßstabsbalken = 500 µm.

B: In höherer Vergrößerung erkennt man Glutaraldehyd-fixierte, bovine Kollagenstränge (gelb; Sternchen im Bild), die von einer GAG-enthaltenden Kapsel umgeben sind (grün; Pfeile). In der Transition befindet sich eine Schicht von mehreren Lagen dichter Zellen (hohle Pfeile). Im GAPT und in der Kapsel befinden sich fixierte sowie nicht-fixierte Zellkerne (rot bis violett). Vergrößerung 200x, Maßstabsbalken = 100 μm.

4.1.3 Zellproliferation

Die DAB-Färbung mit dem Ki-67-spezifischen Antikörper weist mitotisch aktive Zellkerne nach. Die Braunfärbung war sowohl in der Kapsel, als auch innerhalb der GAPT vorhanden (siehe Abb. 8). Wie in 3.4.6 beschrieben, wurde die Anzahl der innerhalb der GAPT liegenden, Ki-67-positiven Zellkerne bestimmt und zwischen den Versuchsgruppen verglichen. Nach statistischer Auswertung besaßen die WT im Vergleich zu den KO eine im Mittel höhere Anzahl an Ki-67-positiven Zellkernen innerhalb der GAPT. Nur die GAPT mit kurzer Lagerungszeit zeigten positive Zellkerne (siehe Abb. 9).



Abb. 8: DAB-Färbung mit Ki-67

A und B: Übersichtsaufnahme eines Gewebeschnittes eines explantierten GAPT in niedriger Vergrößerung mit einem Bildausschnitt. In der Kapsel sind Ki-67 positive Zellkerne sichtbar (braun). Der Großteil des GAPT ist jedoch frei von positiven Zellkernen, insbesondere die zentrale Areale des Biomaterials (Sternchen). Vergrößerung 100x, Maßstabsbalken = 200 µm (A).

C: Ausschnitt aus GAPT. Zu sehen sind in das GAPT (oben im Bild) migrierte, Ki-67 positive Zellkerne (braun; Pfeile). Vergrößerung 400x, Maßstabsbalken = 50 µm.





A: Anzahl der Zellkerne in GAPT aller Versuchstiere. Die GAPT mit langer Lagerungszeit (siehe 5.6) enthalten keine DAB-Färbung. In kurz gelagerten GAPT sind Ki-67-positive Zellkerne vorhanden. Die WT besitzen eine nicht-signifikant erhöhte Anzahl mitotisch aktiver Zellen (WT: $4,10 \pm 2,22$, KO: $1,10 \pm 0,58$, p-Wert = 0,67).

B: Anzahl der Zellkerne in GAPT mit kurzer Lagerungszeit (siehe 5.6). Die WT zeigt eine nahezu signifikant erhöhte Anzahl mitotisch aktiver Zellen (WT: 13,67 \pm 2,96, KO: 2,75 \pm 1,03, p-Wert = 0,0571).

4.1.4 Anzahl und Tiefe migrierter Zellen

Die Anzahl und Migrationstiefe der in die GAPT eingewanderten Zellen wurde mit einer DAPI-Färbung wie in 3.4.7 beschrieben bestimmt (siehe Abb. 4 und Abb. 10). Die statistische Auswertung der Versuchsgruppen kam zu dem Ergebnis, dass die Proben der WT signifikant mehr Zellen enthielten und diese auch signifikant tiefer in die GAPT hinein migriert sind (siehe Abb. 10).





A: Schema zur Bestimmung der relativen Invasionstiefe. Nach Bestimmung der GAPT-Grenzen (rote Linien) wurde die obere und untere Eindringtiefe DAPI-positiver Zellen in μ m gemessen (a und b) und durch den Querdurchmesser in μ m (c) geteilt. Anschließend Multiplikation mit 100. Vergrößerung 100x, Maßstabsbalken = 200 μ m.

B: Die relative Invasionstiefe DAPI-positiver Zellen in den GAPT der WT ist signifikant erhöht (WT: $61,46 \pm 4,34$, KO: $44,11 \pm 2,7$, p-Wert = 0,0039).

C: Die Anzahl DAPI-positiver Zellen in den GAPT der WT ist signifikant erhöht (WT: 586,7 \pm 41,04, KO: 439,5 \pm 54,39, p-Wert = 0,0431).

4.1.5 Makrophagen-Invasion

Die DAB-Färbung von Makrophagen diente dem Nachweis eines entzündlichen Prozesses. Dazu wurde der Antikörper Mac 2 verwendet. Die Braunfärbung zeigte sich in der Kapsel besonders stark. Auch in den äußeren Bereichen innerhalb der GAPT waren angefärbte Zellen zu erkennen, die sich in ihrer Tiefe in den verschiedenen Schnitten unterschieden. Die statistische Analyse ergab eine signifikant größere relative Invasionstiefe der Makrophagen in die GAPT der WT (siehe Abb. 11).



Abb. 11: Relative Invasionstiefe von Makrophagen in den GAPT

A: Repräsentatives Bild zur Demonstration des Schemas der Bestimmung der relativen Invasionstiefe. In der Kapsel und in dem GAPT befinden sich Mac 2-positive Zellen (braun). Nach Bestimmung der GAPT-Grenzen (rote Linien) wurde die obere und untere Eindringtiefe Mac 2-positiver Zellen in μ m gemessen (a und b) und durch den Querdurchmesser in μ m (c) geteilt. Anschließend wird der so ermittelte Wert mit 100 multipliziert, um zum Prozentwert zu gelangen. Vergrößerung 100x, Maßstabsbalken = 200 µm.

B: Die relative Invasionstiefe Mac 2-positiver Zellen ist in den WT signifikant gegenüber den *Fto*-KO erhöht. Makrophagen migrieren im Mittel tiefer in die GAPT der WT hinein (WT: $28,24 \pm 3,91$, KO: $16,35 \pm 1,85$, p-Wert = 0,0431).

4.1.6 Analyse der mRNS von Entzündungsmarkern

Um Unterschiede in der Genexpression von Entzündungsmarkern zu ermitteln, wurde eine RT-PCR durchgeführt. NFkB, CD73, Hif1 α , TLR2 und TLR4 spielen eine wichtige Rolle bei entzündlichen Prozessen sowie der zellulären Immunantwort. Keiner der untersuchten Marker wies einen signifikanten Unterschied auf der Ebene der Genexpression auf (p-Werte: 0,6723, 0,7791, 0,843, 0,3124, >0,9999; siehe Abb. 12)



Abb. 12: Expression entzündlicher Gene

A-E: Die relative mRNS-Expression entzündlicher Gene zu den WT zeigt keine Signifikanzen zwischen den beiden Gruppen.

A: Relative Genexpression des *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NFkB), einem zentralen Transkriptionsfaktor mit ubiquitärer Präsenz (WT: $0,65 \pm 0,11$, KO: $0,67 \pm 0,13$).

B: Relative Genexpression des *cluster of differentiation* (CD73), einem Marker für Lymphozyten-Differenzierung (WT: $1,09 \pm 0,48$, KO: $0,88 \pm 0,2$).

C: Relative Genexpression des *hypoxia-inducible factor 1-alpha* (Hif1 α), einem zentralen Transkriptionsfaktor bei Hypoxie (WT: 0,83 ± 0,12, KO: 0,81 ± 0,08).

D: Relative Genexpression des *toll-like receptor* 2 (TLR2), einem wichtigen Bestandteil des angeborenen Immunsystems zum Erkennen von Antigenen (WT: 1,61 \pm 0,43, KO: 2,74 \pm 0,71).

E: Relative Genexpression des *toll-like receptor* 4 (TLR4), einem wichtigen Bestandteil des angeborenen Immunsystems zum Erkennen von Antigenen (WT: $1,62 \pm 0,59$, KO: $1,04 \pm 0,13$).

4.2 Umbau der Kollagenstruktur

4.2.1 Klassifizierung der Kollagenfasern

Für die Darstellung von Kollagenfasern in verschiedenen Qualitäten wurde eine Direktrot-Färbung und eine Kombinationsfärbung aus Direktrot- und Echtgrün (FCF) durchgeführt. Die Aufnahmen unter dem Durchlichtmikroskop zeigten, dass die GAPT zum größten Teil aus fixiertem Kollagen bestehen (nahezu ausschließliche Rotfärbung in Abb. 13 A). In den Aufnahmen unter polarisiertem Licht waren in unregelmäßiger Anordnung sowohl dicke Kollagenfasern vom Typ I als auch dünne Fasern vom Typ III zu erkennen (siehe Abb. 13 B).



Abb. 13: Pikro-Siriusrot-Färbungen eines GAPT

A: Aufnahme unter dem Durchlichtmikroskop. Das GAPT besteht zum größten Teil aus Kollagen. Vergrößerung 50x, Maßstabsbalken = 500 µm.

B: Aufnahme unter polarisiertem Licht. Das GAPT zeigt eine unregelmäßige Anordnung der Kollagenfasertypen I (gelborange) und III (grün). Es ist kein spezifisches Verteilungsmuster feststellbar. Vergrößerung 50x, Maßstabsbalken = 500 μm.

4.2.2 Aufspaltung der Kollagenbindungen

Werden Kollagenfasern um- oder abgebaut, entstehen Abfallprodukte, die von dem Enzym MMP-2 gespalten werden (Visse & Nagase, 2003). Anhand der Präsenz und Aktivität von MMPs (insbesondere von MMP-2) lässt sich daher auf die Ausprägung des Kollagenumbaus, und im weiteren Sinne auch auf das Niveau des Matrixumbaus, schließen. Dazu wurde eine Fluoreszenzfärbung von MMP-2 angefertigt, welche positive Signale am Rand der GAPT zeigte. Proben mit kurzer Lagerungszeit (siehe 5.6.3) waren teilweise komplett mit positiven Signalen durchsetzt. Auch nach Auftrennung in lang und kurz gelagerte GAPT konnte kein Unterschied zwischen den KO und WT in der Menge und Signaltiefe an MMP-2 festgestellt werden (siehe Abb. 14).



Abb. 14: MMP-2-Fluoreszenzfärbung mit DAPI

A: Ausschnitt eines GAPT mit langer Lagerungsdauer (siehe 5.6). Die MMP-2-positiven Signale (rot) treten vor allem am Rand der GAPT im Bereich der zellreichen Kapsel (blau) auf (Hohle Pfeile). Teilweise sind Glutaraldehyd-fixierte, bovine Blutgefäße mit positiven Signalen ausgekleidet (Pfeil). Vergrößerung 100x, Maßstabsbalken = 200 µm. Rot: MMP-2; blau: DAPI/Zellkerne.

B: Ausschnitt eines GAPT mit kurzer Lagerungsdauer (siehe 5.6). Die MMP-2-positiven Signale (rot) befinden sich über dem gesamten Durchmesser der GAPT, und so auch im Inneren des Biomaterials (Sternchen). Vergrößerung 100x, Maßstabsbalken = 200 µm.

4.2.3 Expression von MMP-2

Die Genexpression von MMP-2 wurde in Proben beider Gruppen mittels RT-PCR analysiert. Sie ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (WT: 4,58 \pm 2,09, KO: 3,64 \pm 2,31, p-Wert = 0,8354; siehe Abb. 15).



Abb. 15: Genexpression von MMP-2

Kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen bei der mRNS-Expression von MMP-2, einem wichtiger Transkriptionsfaktor für den Kollagenumbau (WT: 4,58 \pm 2,09, KO: 3,64 \pm 2,31, p-Wert = 0,8354).

4.3 Angiogenese

Die Neubildung von Blutgefäßen wurde über die immunhistochemische Färbung mit vWF nachgewiesen. vWF wird an der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert. In der Färbung mit DAB zeigten sich vWF-positive Zellen nur in dem mitexplantierten Empfängergewebe. Weder die GAPT, noch die neu gebildete Kapsel zeigten vWF-positive Zellen. Innerhalb der GAPT waren fixierte, bovine Blutgefäße zu erkennen, die keine vWF-positive Färbung zeigten (siehe Abb. 16). Die DAB-Färbung mit αSMA zeigte äquivalente Ergebnisse.



Abb. 16: DAB-Färbung mit vWF

A: Teilanschnitt eines explantierten GAPT (unten links; Grenze durch rote Linie markiert) mit umgebender Kapsel (Grenze durch orange Linie markiert). In der Kapsel sind keine vWF-positiven Zellen vorhanden. Es befinden sich vWF-positive Zellen (braun; Pfeile) in dem explantierten Empfängergewebe (Areal außerhalb der orangen Linie). Vergrößerung 200x, Maßstabsbalken = 100 µm.

B: Ausschnitt eines explantierten GAPT. In der Mitte des Bildes sind drei vWF-negative, gefäßähnliche Strukturen zu beobachten (Pfeile). Es handelt sich um bovine, Glutaraldehyd-fixierte Blutgefäße des Spendergewebes, die nicht während der späteren Implantationsphase im Empfängerorganismus neu entstanden sind. Das GAPT ist frei von vWF-positiven Zellen. Vergrößerung 200x, Maßstabsbalken = 100 μm.

4.4 Kalzifizierung

4.4.1 Morphologie und Übersicht

Zur histologischen Darstellung von Phosphatablagerungen wurde eine Von Kossa-Färbung durchgeführt. Zellkerne sowie die Kapsel zeigten sich rötlich, Kollagene bräunlich. An wenigen Stellen waren punktuell schwarze Ausfällungen zu erkennen. Diese waren besonders ausgeprägt an Bereichen mit eingenähtem Fadenmaterial. Einige GAPT wiesen keine Schwarzfärbung auf (siehe Abb. 17).



Abb. 17: Von Kossa-Färbung eines GAPT

Die Kollagenstränge (braun) sind von einer zellreichen Kapsel umgeben. Es lassen sich keine schwarzen Phosphatablagerungen nachweisen. Vergrößerung 200x, Maßstabsbalken = 100 μm.

4.4.2 Genexpression osteo-chondrogener Marker

Für den Vergleich der Expression osteo-chondrogener Gene beider Genotypen, erfolgte eine RT-PCR mit spezifischen Primern für Osteopontin und Runx2. Diese spielen eine wichtige Rolle bei Prozessen des Knochenstoffwechsels. Beide Marker zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den WT und den KO, wobei im Falle des Transkriptionsmarkers Runx2 ein Trend vermutet werden könnte (p-Werte: 0,6707, 0,0635; siehe Abb. 18).





Die statistische Analyse der Genexpression von den osteo-chongrogenen Proteinen Osteopontin (A) und Runx2 (B) ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den WT und den KO. A: Relative Genexpression von Osteopontin, einem wichtigen Protein für die Knochenmineralisation, das Hydroxyapatit bindet und an Immunprozessen beteiligt ist (WT: 1,11 ± 0,45, KO: 1,02 ± 0,25, p-Wert = 0,6707).

B: Relative Genexpression von *runt-related transcription factor* 2 (Runx2) einem bedeutenden Transkriptionsfaktor, der mit der Differenzierung von Osteoblasten assoziiert ist (WT: 1,19 \pm 0,29, KO: 3,56 \pm 1,1, p-Wert = 0,0635).

4.4.3 Ca²⁺-Ablagerung im Gewebe

Die Quantifizierung der Ca2+-Menge im explantierten GAPT wurde mit einem Ca2+-Assays durchgeführt. Sie ergab keine signifikante Differenz des mittleren Kalziumgehalts zwischen den Versuchsgruppen (WT: 8,74 ± 0,81 mg/dL, KO: 10,28 ± 0,7 mg/dL, p-Wert = 0,215; siehe Abb. 19).



Abb. 19: Ca^{2+} -Gehalt in den GAPT Die Menge an Ca^{2+} (in mg/dL) in den GAPT weist keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen auf (WT: 8,74 ± 0,81, KO: 10,28 ± 0,7, p-Wert = 0,215).

5. Diskussion

5.1 *Fto* und Degeneration von Herzklappenbioprothesen

Trotz des Wissens über die Demethylierungsaktivität des von *Fto* kodierten Enzyms (Jia et al., 2011) und besonders hoher Expression in Energiehaushaltsteuernden Teilen des Hypothalamus (Gerken et al., 2007), ist der genaue Wirkmechanismus von *Fto* unklar. Zahlreiche klinische Studien legen einen positiven Zusammenhang zwischen spezifischen Polymorphismen von *Fto* und der Entwicklung von Adipositas sowie Diabetes mellitus Typ II nahe (Dina et al., 2007; Frayling et al., 2007; Scuteri et al., 2007).

Adipositas ist ein anerkannter Hauptrisikofaktor für Arteriosklerose, die sowohl in der Kalzifizierung von Aortenklappen (Agmon et al., 2001), als auch in der Degeneration von Herzklappenbioprothesen einen bedeutsamen Faktor darstellt (Pibarot & Dumesnil, 2009). Die aufgestellte Hypothese, dass bestimmte SNPs von *Fto* eine Rolle bei der Aortenklappendegeneration spielen, konnte in einer Kooperationsstudie zwischen dem *Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere* der *Heinrich-Heine-Universität* in Düsseldorf und der *Klinik für Herzchirurgie* der Medizinischen Fakultät der *Heinrich-Heine-Universität* in Düsseldorf bestätigt werden (Thron et al., 2015). Sie fand heraus, dass das Risikoallel rs9939609 bei Männern mit einer erhöhten Neigung zur Entwicklung der Aortenklappenstenose assoziiert ist. Ungeklärt blieb bislang jedoch die Frage, ob *Fto* auch einen Einfluss auf die Degeneration von Herzklappenbioprothesen haben könnte. Mit dieser Studie wurde nun erstmals dieser Frage nachgegangen. Hier konnte gezeigt werden, dass die Defizienz von *Fto* protektiv gegen bestimmte Teilprozesse der Degeneration von Herzklappenbioprothesen wirken könnte.

5.2 Auswahl der Versuchstiere

Bis heute wurde ein erhöhtes Risiko für Adipositas beim Menschen nur in Verbindung mit speziellen *Fto*-Risikovarianten gezeigt (Hubacek et al., 2010; Lappalainen et al., 2011; Olszewski et al., 2011). Untersuchungen zur Inaktivierung eines menschlichen Genabschnitts, dessen exakter Wirkmechanismus nicht vollständig erforscht ist, sind offensichtlich aus ethischen Bedenken nicht durchzuführen. Ferner bedarf es bei dieser Fragestellung eines intakten Organismus, um die Auswirkungen eines funktionslosen *Fto* zu ermitteln.

Daher wurde für diese Arbeit ein Mausmodell der Doppeldefizienz (*ApoE* und *Fto*) verwendet.

In Mausversuchen konnte zuvor gezeigt werden, dass die Defizienz von *Fto* vor der Entwicklung von Adipositas schützen kann. Neben erhöhter Sympathikus-Aktivität sowie gesteigertem Energieumsatz, wogen Versuchstiere mit inaktiviertem Gen unter hoch-kalorischer Diät signifikant weniger als ihre Wildtyp-Wurfgeschwister. Der veränderte Phänotyp beweist eine starke Wirkung dieser Genmanipulation auf die Organismen (Fischer et al., 2009).

Auf Grundlage der Arbeit von Fischer et al. führten wir die Versuche mit Fto-defizienten Mäusen und deren Wurfgeschwistern mit intaktem Fto durch, wobei jedoch alle Tiere eine Verlustmutation des ApoE aufwiesen. Auch unsere Ergebnisse verdeutlichen veränderte molekulare Prozesse vor dem Hintergrund eines funktionslosen Fto. Ob sie sich eins zu eins auf den humanen Organismus übertragen lassen, bleibt noch zukünftigen Untersuchungen vorbehalten. Jedoch laufen grundlegende immunologische Prozesse von Menschen und Mäusen in gleicher Weise ab. Die Erkenntnisse dieser Arbeit erlauben somit auch Rückschlüsse auf die Reaktion des Menschen auf implantierte Herzklappenprothesen, deren Material den hier verwendeten GAPT identisch ist.

5.3 Mausmodell der ektopen Kalzifizierung

Das etablierte Modell der ektopen Kalzifizierung sieht vor, GAPT bei den Versuchstieren subkutan auf den Rücken zu implantieren (Giachelli, 2001). Dies unterscheidet sich deutlich von der üblichen Position eines orthotopen Aortenklappenersatzes unmittelbar am Abgang der Aorta aus dem Herzen. Als wichtige Limitation des Modells ist daher aufzuführen, dass Hämodynamikassoziierte Faktoren, die eine Degeneration beeinflussen könnten, hier keine Rolle spielen. Dazu zählen die hämodynamische Beanspruchung durch den hohen systolischen Druck und die schnelle Ausflussgeschwindigkeit des Blutes aus dem Herzen (Schmidt et al., 2010). Wir entschieden uns für die subkutane Implantation auf dem Rücken, da bedeutsame Prozesse für die Prothesengeneration wie Entzündung und Kalzifizierung ubiquitär ablaufen (Giachelli, 2001; Pibarot & Dumesnil. 2009). Zusammenfassend zeigt das Modell zwar nicht die pathophysiologischen Gegebenheiten der Degeneration exakten von Herzklappenbioprothesen, jedoch erlaubt es die Analyse einiger wichtiger

Faktoren, die nur *in vivo* abzubilden sind. Die Reaktion eines lebenden Organismus und die damit verbundenen Auswirkungen auf den implantierten Fremdkörper ermöglichen Erkenntnisse, die beispielsweise in einer Zellkultur nicht erfassbar wären.

Die Überlebensdauer einer implantierten Herzklappenbioprothese als konventioneller Aortenklappenersatz beträgt ungefähr 10-15 Jahre (D. N. Ross, 1995; Yacoub et al., 1995). Um die Vergleichbarkeit zwischen dem hier verwendeten experimentellen Versuchsaufbau und der Situation in der Klinik zu steigern, wäre es daher ideal, die GAPT ebenfalls über einen solchen Zeitraum einem fremden Organismus auszusetzen. Da die Lebenserwartung von Mäusen nur ungefähr 2-3 Jahre beträgt, ist dies im Mausmodell nicht umsetzbar. Selbst dieser Implantationszeitraum ist für einen Versuch mit lebenden Tieren unrealistisch und kann nur mit großem Auswand durchgeführt werden.

Wir beließen die ausgestanzten GAPT über einen Zeitraum von acht Wochen in den Versuchstieren. Die exakte Reproduktion des Zustandes von implantierten Herzklappenbioprothesen nach 10-15 Jahren in einem Empfängerorganismus ist innerhalb von acht Wochen nicht möglich. Mithilfe der prokalzifizierenden Diät sollte der Degenerationsprozess beschleunigt werden, um die Vergleichbarkeit zu klinischen Verhältnissen zu steigern. Ziel war es einerseits, die akute Immunreaktion des Empfängers zu detektieren und andererseits auch nach dieser kurzen Zeit schon kalzifizierende Prozesse nachzuweisen.

5.4 Der Einfluss von *Fto* auf Degeneration von Herzklappenbioprothesen

5.4.1 Proliferation und Inflammation

Ein zentraler Faktor bei der Degeneration von Herzklappenbioprothesen ist die Immunreaktion des Empfängerorganismus auf die GAPT mit Invasion von Zellen des Immunsystems. Makrophagen und T-Zellen induzieren nach dem Eindringen in die Prothese in bislang unbekannten Signalkaskaden sekundär eine Kalzifizierung des Prothesenmaterials. Daraus resultiert der Funktionsverlust (Legare et al., 2000; Manji et al., 2006). Wir überprüften über die Analyse der Genexpression und immunhistochemische Färbungen proentzündlicher Proteine, ob die Abwesenheit von *Fto* Unterschiede auf der Ebene der Proliferation und Inflammation nach sich zieht. Die HE- und Movat-Pentachrom-Färbungen zeigten die Bildung einer zellreichen und zum größten Teil aus GAG bestehenden Kapsel. Sie stellten Zellen dar, die eine unterschiedliche Migrationstiefe innerhalb der GAPT aufwiesen. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass eine Immunreaktion des Empfängers gegen das subkutan implantierte GAPT in dem Modell der ektopen Kalzifizierung stattgefunden hat.

Um die Immunreaktion zwischen den beiden Versuchsgruppen vergleichen zu können, bestimmten wir mithilfe der DAPI-Färbung die Anzahl invasiver Zellen in die GAPT. Das dazu genutzte Programm ImageJ kann zwei Punkte nur ab einem bestimmten Abstand voneinander trennen, wodurch nicht alle positiven Signale einzeln erfasst werden können. Bei den errechneten Werten handelt es sich nicht um die absolute Anzahl der invasiven Zellen. Da dieser Umstand jedoch bei der Auswertung von allen DAPI-gefärbten Schnitten identisch war, können über das relative Verteilungsmuster dennoch Rückschlüsse auf die Immunreaktion gezogen werden. Die in den KO im Vergleich zu den WT signifikant verringerte Anzahl invasiver Zellen spiegelt mit hoher Wahrscheinlichkeit eine niedrigere Immunreaktion wieder.

Die DAB-Färbung mit Ki-67 demaskiert proliferative Zellkerne. Positive Signale in den Kapseln sowie in den GAPT verdeutlichen eine hohe mitotische Aktivität in den Implantaten und deren unmittelbarer Umgebung (siehe Abb. 8). Die Quantifizierung der innerhalb der GAPT befindlichen Ki-67-positiven Zellen ergab eine nahezu signifikant erhöhte Anzahl in den WT. Dies deutet darauf hin, dass die *Fto*-Defizienz zu einer geringeren Proliferation in den GAPT führen könnte. Da nur in den frisch explantierten GAPT mit DAB gefärbte Zellen erschienen (siehe 5.6.3), konnte mit insgesamt sieben ausgewerteten Proben keine ausreichend hohe n-Zahl für eine aussagekräftige Statistik erreicht werden. Die quantitativen Auswertungsergebnisse der DAB-Färbungen mit Ki-67 müssen kritisch betrachtet werden und bedürfen weiterer Untersuchungen mit frisch explantierten GAPT.

Auch die Migrationstiefe von Zellen des Immunsystems in die GAPT gibt Aufschluss über entzündliche Prozesse. Je weiter sie eindringen, desto stärker findet eine Immunreaktion des Empfängers auf das Material statt (Pibarot & Dumesnil, 2009). Die DAPI- und Mac 2-Färbungen wurden genutzt, um die Eindringtiefe von Wirtszellen zu bestimmen (siehe Abb. 10 und 11). Sie zeigten, dass unspezifische DAPI- sowie Mac 2-positive Zellen in den WT im Vergleich zu den KO signifikant tiefer in die GAPT hinein migrierten. Schlussfolgernd führt das Fehlen von *Fto* zu einer schwächeren Zellinvasion, sowohl von unspezifischen Zellen als auch von Makrophagen. Dies könnte eine abgemilderte Wirtsantwort und damit verbunden eine geringere degenerative Tendenz in der Folge nahelegen.

Die Analyse der Genexpression von entzündungs-spezifischen Markern in der RT-PCR zeigte in keinem der untersuchten Gene signifikante Unterschiede. Die Menge der isolierten RNS reichte nicht aus, um bei jedem GAPT alle fraglichen Gene zu untersuchen. Ein Grund dafür könnte eine nicht ausreichende Menge an RNS gewesen sein. Die Aufbereitung einiger Proben erwies sich aufgrund der vorliegenden Glutaraldehyd-Fixierung als Herausforderung. In einigen Dupletts in der RT-PCR lagen die $\Delta\Delta$ CT-Werte außerdem so weit auseinander, dass sie nicht für eine statistische Analyse herangezogen werden konnten. Diese Limitationen führten dazu, dass nicht von jedem Tier alle entzündungs-spezifischen Marker untersucht werden konnten. *Fto* scheint keinen Einfluss auf die Genexpression pro-entzündlicher Gene wie NFkB, CD73, Hif1 α , TLR2 und TLR4 zu haben. Es muss hierbei jedoch erwähnt werden, dass die Genexpressionsanalysen der Entzündungsparameter einer Momentaufnahme zum Zeitpunkt von acht Wochen nach Implantation entsprechen, sodass früher abgelaufene Reaktionen hier maskiert geblieben sein könnten.

Zusammenfassend hat die Inaktivierung von *Fto* eine hemmende Wirkung auf proliferative und entzündliche Prozesse bei implantierten GAPT. Sie stellt sich besonders durch eine verringerte Zellzahl und Invasionstiefe proinflammativer Zellen in histologischen Färbungen dar. Auf Grundlage dessen könnte die *Fto*-Defizienz protektiv auf die Degeneration von Herzklappenbioprothesen wirken. Ob der Effekt direkt auf *Fto* oder auf den veränderten Phänotyp der Mäuse zurückzuführen ist, muss mithilfe weiterer Studien überprüft werden.

5.4.2 Angiogenese

Induziert durch Makrophagen, die das Zytokin TNF α freisetzen, kommt es in entzündlich veränderten Geweben zu einer Neubildung von Blutgefäßen (Leibovich et al., 1987). Wie die Mac 2-Färbung darstellen konnte, ist die Zellinvasionstiefe von Makrophagen unter funktionslosem *Fto* verringert. Wir stellten uns die Frage, ob dieser Effekt auch Auswirkungen auf die Angiogenese haben könnte. Die DAB-Färbungen mit αSMA und vWF wiesen keine neu gebildeten Gefäße innerhalb der GAPT oder in der unmittelbar umgebenden Kapsel nach. Bei den angefärbten vWF- und αSMA-positiven Zellen handelt es sich höchst wahrscheinlich um Gefäße von mit explantiertem Fettgewebe des Empfängers. Zwischen den WT und den KO konnten keine morphologischen Unterschiede erkannt werden. *Fto* scheint keinen Einfluss auf die Angiogenese in der Kapsel zu haben.

Innerhalb der GAPT waren αSMA- und vWF-negative Gefäße zu erkennen (siehe Abb. 16). Es handelt es sich um Glutaraldehyd-fixierte Gefäße des Rinderperikards, die bereits vor der Implantation in den GAPT vorhanden waren. Aus den beiden DAB-Färbungen kann geschlossen werden, dass es in dem Modell der ektopen Kalzifizerung nach acht Wochen nicht zu einer Angiogenese in die GAPT kommt. Eventuell müssten sie dazu länger in den Empfängern implantiert bleiben.

5.4.3 Kollagenumbau

Wie die Movat-Pentachrom- und Pirko-Siriusrot-Färbungen dargestellten, bestehen die GAPT zum großen Teil aus unterschiedlichen Kollagentypen. Darauf aufbauend stellte sich die Frage, ob das Kollagen enzymatisch umgebaut wird. Laut Pibarot und Dumesnil spricht ein solch überstürzter Umbau der EZM für eine verstärkte Degeneration (Pibarot & Dumesnil, 2009). Denaturierte Kollagene werden von der Gelatinase MMP-2 gespalten. Fehlregulierungen des Enzyms konnten bei Prozessen wie Arteriosklerose und Osteogenese, die auch für die Degeneration von Herzklappenbioprothesen bedeutsam sind, nachgewiesen werden (Visse & Nagase, 2003). Die Aktivität von MMP-2 wurde mithilfe einer Fluoreszenzfärbung bestimmt.

Einige GAPT weisen MMP-2-positive Signale in den peripheren Regionen auf. Die frisch explantierten Proben (siehe 5.6.3) sind teilweise vollständig mit positiven Signalen durchsetzt. Schlussfolgernd findet ein Kollagenumbau an den implantierten GAPT statt. Die in der Fluoreszenzfärbung darstellbare Menge an MMP-2 scheint von der Lagerungszeit abhängig zu sein. Auch nach Auftrennung in frisch explantierte und lang gelagerte Proben, war eine Differenz in der Eindringtiefe von MMP-2 positiven Signalen zwischen den WT und den KO nicht festzustellen. *Fto* scheint den Kollagenumbau nicht zu beeinflussen. Zur

Verifizierung müssten weitere Versuche mit Proben einheitlicher Lagerungszeit durchgeführt werden.

5.4.4 Kalzifizierung

Die Kalzifizierung der Herzklappenbioprothese ist vor allem als Endprodukt der Degeneration bedeutsam. Aufgrund der zerstörten Lipiddoppelschicht lagern sich nach und nach Hydroxyapatitkristalle in die Prothese ein (Schoen & Levy, 2005). Daneben enden auch arteriosklerotische und entzündliche Vorgänge in einer Mineralisierung (Pibarot & Dumesnil, 2009). Die *Fto*-abhängige Risikoerhöhung für kalzifizierte Aortenklappen, die in einer Patientenkohorte festgestellt wurde (Thron et al., 2015), legt nahe, dass *Fto* auch bei der Kalzifizierung von Herzklappenbioprothesen Wichtigkeit besitzt.

Der Ca²⁺-Assay wurde durchgeführt, um die Quantifizierung des Kalziums innerhalb der GAPT zu ermöglichen. Die Ergebnisse zeigen keine signifikante Differenz zwischen den beiden Versuchsgruppen. *Fto* scheint keine Wirkung auf die Kalzifizierung der GAPT zu haben.

Dafür sprechen die bereits beschriebenen Erkenntnisse über die Pathogenese der Kalzifizierung von Bioprothesen. Die Einlagerung von Hydroxyapatitkristallen liegt zu großen Teilen der Zerstörung der Lipiddoppelschicht durch die Fixierung mit Glutaraldehyd zugrunde, bei der die Bedeutung von *Fto* gering ausfallen könnte (siehe Abb. 2). Zwar enden auch die möglicherweise Fto-abhänigen Reaktionen der Arteriosklerose und Entzündung in Kalzifizierungen, jedoch könnten diese Veränderungen und deren Folgen mehr Zeit in Anspruch nehmen. Trotz prokalzifizierender Diät könnte die achtwöchige Implantationsdauer nicht ausgereicht haben, um Mineralisierungen als Endstufe der Degeneration auszulösen. In weiterführenden Experimenten zur Quantifizierung von Kalzifizierungen sollten die Proben dem Empfängerorganismus über längere Zeiträume ausgesetzt sein.

5.5 Klinische Relevanz und Ausblick

5.5.1 Nachsorge

Die Leitlinien der *Deutschen Gesellschaft für Kardiologie und Herz-Kreislaufforschung (DGK)* sehen als medikamentöse Nachsorge eines biologischen Aortenklappenersatzes bislang die Einnahme niedrigdosierter Acetylsalicylsäure für drei Monate und bei Bedarf eine orale Antikoagulation über denselben Zeitraum vor (Vahanian et al., 2012). Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten zukünftig eine der Grundlagen dafür sein, das Medikationsschema zu erweitern.

Die *Fto*-Defizienz scheint bei Mäusen protektiv auf die entzündliche und proliferative Zellinvasion in Herzklappenbioprothesenmaterial zu wirken. Welche Mechanismen im Detail dazu führen, bleibt jedoch ungeklärt. Auch die fehlende direkte Übertragbarkeit von Versuchsergebnissen aus Mausmodellen auf die Verhältnisse im Menschen lässt keine unmittelbaren Schlussfolgerungen für die Situation in der Klinik zu. Dazu ist ein deutlich umfassenderes Wissen über die Signalwege und Wirkung der *Fto*-Wirkmechanismen im Menschen von Nöten. Weiterführende Erkenntnisse könnten klinische Konsequenzen nach sich ziehen. Beispielsweise könnte ein Versuch gestartet werden, bestimmte Angriffspunkte von *Fto* auf die Prothese mit Medikamenten zu hemmen und auf diese Weise die Lebensdauer der Herzklappenbioprothesen zu verlängern.

5.5.2 Patienten mit Fto-Risikoallelen

Bei männlichen Patienten mit einem bestimmten SNP ist ein signifikant höheres Risiko für die Ausbildung einer Aortenklappenstenose gezeigt worden (Thron et al., 2015). Unsere Versuche verdeutlichen einen Effekt auf die GAPT bei fehlendem *Fto* in Mäusen. Ob darüber hinaus Auswirkungen auf Patienten mit Herzklappenbioprothesen vorhanden sind, könnte durch klinische Studien überprüft werden. Beispielsweise wäre eine genetische Analyse von Patienten sinnvoll, deren biologischer Herzklappenersatz bereits neu implantiert wurde. Wird der Einfluss bestimmter *Fto*-Risikoallele auf die Lebensdauer der Prothesen bestätigt, könnte Patienten mit solchen Risikovarianten von einem biologischen Herzklappenersatz abgeraten werden.

5.6 Limitationen

5.6.1 Modell der ektopen Kalzifizierung

Trotz des großen Vorteils der Implantation *in vivo* und den daraus resultierenden Analysemöglichkeiten, birgt das Modell der ektopen Kalzifizierung wichtige Limitationen. Dazu gehört der Ort der Implantation. Anders als bei einer Herzklappenersatz-Operation, werden die GAPT in das subkutane Fettgewebe auf den Rücken der Maus implantiert. Resultierend gehen wichtige prodegenerative Einflussfaktoren wie die mechanische Belastung der Klappe durch den hohen systolischen Druck und schnellen Blutfluss am ventrikoloaortalen Übergang verloren (Manji et al., 2006). Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist das GAPT-umgebende Gewebe. Subkutanes Fettgewebe könnte grundlegend anders auf die GAPT reagieren, als mediastinales Milieu.

5.6.2 Implantation in Mäuse

Trantina-Yates et al. haben dargestellt, dass sich Entzündungsreaktionen von Schafen und Primaten in ihrer Intensität unterscheiden (Trantina-Yates, Weissenstein, Human, & Zilla, 2001). Auch der Organismus der Maus verhält sich gegenüber implantierten GAPT mit hoher Wahrscheinlichkeit anders, als der des Menschen. Unsere Ergebnisse lassen keine direkten Rückschlüsse auf die Vorgänge in der Klinik zu. Unwahrscheinlich, aber möglich ist, dass das Immunsystem von humanen Empfängern grundlegend anders auf die GAPT reagiert hätte.

5.6.3 Lagerungszeit

Die explantierten GAPT wurden unterschiedlich lang gelagert. Während die Verwertung einiger Explantate bereits nach Tagen bis Wochen erfolgte, wurden andere über 2-3 Jahre bis zur Vollständigkeit der Gruppen aufbewahrt. Ursache war die spärliche Verfügbarkeit geeigneter Tiere bei einem sehr ungünstigen Zuchtverhalten der untersuchten Stämme. Trotz der Lagerungstemperatur von -80 °C, scheint es während dieser Zeit zu ungewollten Reaktionen innerhalb der GAPT gekommen zu sein. Die histologischen Färbungen mit Ki-67 und MMP-2 weisen Unterschiede in Abhängigkeit der Lagerungszeit auf. Ein Erklärungsansatz ist die tägliche Benutzung der Gefrierschränke, deren Öffnung mit einer Temperaturerhöhung einhergeht. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu verbessern, sollte die Lagerungszeit der GAPT in weiterführenden Experimenten möglichst identisch gehalten werden.

5.6.4 Glutaraldehyd-Fixierung

Zwecks seiner stabilisierenden und Antigen-maskierenden Wirkung werden Herzklappenbioprothesen mit Glutaraldehyd fixiert (Carpentier et al., 1974). Das Glutaraldehyd erschwert die Verarbeitung der GAPT. Teilweise konnte trotz mehrfacher Wiederholung der Schritte nicht genügend RNS isoliert werden. Folglich musste auf Analyse der Transkription einiger weiterer Zielgene verzichtet werden. Das Glutaraldehyd-fixierte Material zeigte in histologischen Profärbungen eine hohe Eigenfluoreszenz. Nur bei der Darstellung von MMP-2 gelang eine Fluoreszenzfärbung, da der Sekundärantikörper einzig bei Licht mit hoher Wellenlänge sichtbar wird. Der Versuch einer *in-situ-*Zymographie zur Darstellung der MMP-2-Aktivität misslang trotz mehrfacher Anläufe, da innerhalb der starken Eigenfluoreszenz die spezifischen Signale der MMP-Aktivität nicht hinreichend sicher abgrenzbar waren.

Für weitere Versuche sollte eine Verbesserung der Methodik angestrebt werden. Auf diese Weise könnte es gelingen weitere Erkenntnisse aus den histologischen Färbungen herauszuziehen und die Expression einer größeren Anzahl von Genen zu untersuchen.

5.7 Schlussfolgerungen

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit kann zunächst geschlossen werden, dass in dem Modell der ektopen Kalzifizierung (Giachelli, 2001) eine Reaktion der Empfängers auf die implantierten GAPT stattgefunden hat. Diese äußerten sich in der Bildung einer neuen Kapsel, sowie einer Invasion von Entzündungszellen. Des Weiteren hat die Defizienz von *Fto* einen Einfluss auf proliferative und entzündliche Prozesse, da sie zu einer Verringerung der Zellzahl, der relativen Invasionstiefe und der Proliferationsrate führt (siehe Abb. 20). Die damit verbundene geringere Immunantwort der Empfängerorganismen stützt die Hypothese, dass die Inaktivierung von *Fto* protektiv gegen die Degeneration von Herzklappenbioprothesen wirken könnte. Mithilfe weiterer Versuche muss verifiziert werden, ob dies direkt auf den Verlust des Gens oder sekundär auf den veränderten Phänotypen der Maus mit einem allgemein erhöhten Energieumsatz zurückzuführen ist.

Darüber hinaus kommt diese Arbeit zu dem Ergebnis, dass die Defizienz von *Fto* keinen Einfluss auf kalzifizierende Prozesse, die Bildung neuer Blutgefäße und den Umbau von Kollagen zu haben scheint (siehe Abb. 20). Ob diese Erkenntnisse sekundär der uneinheitlichen Lagerungszeit oder der kurzen Implantationsdauer von acht Wochen geschuldet sind, muss ebenfalls durch weiterführende Versuche überprüft werden.



Abb. 20: Schematische Darstellung: Einfluss des *Fto*-Gens auf die Degeneration von Herzklappenbioprothesen

Die Defizienz von *Fto* (Fto^{-/-}) hat einen hemmenden Einfluss auf proliferative und entzündliche Prozesse (grüner Pfeil) und bewirkt eine Verringerung der Zellzahl, der relativen Invasionstiefe und der Proliferationsrate innerhalb der GAPT. Die Defizienz hat keinen Einfluss (grauer Pfeil) auf die Kalzifizerung, die Angiogenese und den Kollagenumbau der GAPT.

6. Quellen- und Literaturverzeichnis

- Agmon, Y., Khandheria, B. K., Meissner, I., Sicks, J. R., O'Fallon, W. M., Wiebers, D. O., . . . Tajik, A. J. (2001). Aortic valve sclerosis and aortic atherosclerosis: different manifestations of the same disease? Insights from a population-based study. J Am Coll Cardiol, 38(3), 827-834.
- Ahmad, T., Chasman, D. I., Mora, S., Pare, G., Cook, N. R., Buring, J. E., . . . Lee, I. M. (2010). The fat-mass and obesity-associated (FTO) gene, physical activity, and risk of incident cardiovascular events in white women. *Am Heart J*, 160(6), 1163-1169. doi:10.1016/j.ahj.2010.08.002
- Antonini-Canterin, F., Zuppiroli, A., Popescu, B. A., Granata, G., Cervesato, E., Piazza, R., . .
 Nicolosi, G. L. (2003). Effect of statins on the progression of bioprosthetic aortic valve degeneration. *Am J Cardiol, 92*(12), 1479-1482.
- Aupart, M. R., Mirza, A., Meurisse, Y. A., Sirinelli, A. L., Neville, P. H., & Marchand, M. A. (2006). Perimount pericardial bioprosthesis for aortic calcified stenosis: 18-year experience with 1133 patients. J Heart Valve Dis, 15(6), 768-775; discussion 775-766.
- Baudet, E. M., Puel, V., McBride, J. T., Grimaud, J. P., Roques, F., Clerc, F., . . . Laborde, N. (1995). Long-term results of valve replacement with the St. Jude Medical prosthesis. J Thorac Cardiovasc Surg, 109(5), 858-870. doi:10.1016/S0022-5223(95)70309-8
- Baumgartner, H., Falk, V., Bax, J. J., De Bonis, M., Hamm, C., Holm, P. J., . . . Group, E. S. C.
 S. D. (2017). 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur Heart J*, 38(36), 2739-2791. doi:10.1093/eurheartj/ehx391
- Beckmann, A., Meyer, R., Lewandowski, J., Frie, M., Markewitz, A., & Harringer, W. (2018). German Heart Surgery Report 2017: The Annual Updated Registry of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. *Thorac Cardiovasc Surg*, 66(8), 608-621. doi:10.1055/s-0038-1676131
- Bentall, H., & De Bono, A. (1968). A technique for complete replacement of the ascending aorta. *Thorax*, 23(4), 338-339.
- Briand, M., Pibarot, P., Despres, J. P., Voisine, P., Dumesnil, J. G., Dagenais, F., & Mathieu,
 P. (2006). Metabolic syndrome is associated with faster degeneration of bioprosthetic valves. *Circulation*, 114(1 Suppl), I512-517. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.000422
- Buch, W. S., Kosek, J. C., Angell, W. W., & Shumway, S. E. (1970). Deterioration of formalin-treated aortic valve heterografts. J Thorac Cardiovasc Surg, 60(5), 673-682.
- Carpentier, A., Deloche, A., Relland, J., Fabiani, J. N., Forman, J., Camilleri, J. P., . . . Dubost, C. (1974). Six-year follow-up of glutaraldehyde-preserved heterografts. With particular reference to the treatment of congenital valve malformations. J Thorac Cardiovasc Surg, 68(5), 771-782.
- Carpentier, A., Lemaigre, G., Robert, L., Carpentier, S., & Dubost, C. (1969). Biological factors affecting long-term results of valvular heterografts. *J Thorac Cardiovasc Surg*, *58*(4), 467-483.

- Casselman, F. P., Bots, M. L., Van Lommel, W., Knaepen, P. J., Lensen, R., & Vermeulen, F.
 E. (2001). Repeated thromboembolic and bleeding events after mechanical aortic valve replacement. *Ann Thorac Surg*, *71*(4), 1172-1180.
- Chambers, J. C., Somerville, J., Stone, S., & Ross, D. N. (1997). Pulmonary autograft procedure for aortic valve disease: long-term results of the pioneer series. *Circulation*, *96*(7), 2206-2214.
- Church, C., Moir, L., McMurray, F., Girard, C., Banks, G. T., Teboul, L., . . . Cox, R. D. (2010). Overexpression of Fto leads to increased food intake and results in obesity. *Nat Genet*, *42*(12), 1086-1092. doi:10.1038/ng.713
- Cribier, A., Eltchaninoff, H., Bash, A., Borenstein, N., Tron, C., Bauer, F., . . . Leon, M. B. (2002). Percutaneous transcatheter implantation of an aortic valve prosthesis for calcific aortic stenosis: first human case description. *Circulation*, 106(24), 3006-3008.
- Daniel, W. G., Baumgartner, H., Gohlke-Barwolf, C., Hanrath, P., Horstkotte, D., Koch, K. C., . . Flachskampf, F. A. (2006). Klappenvitien im Erwachsenenalter. *Clin Res Cardiol*, 95(11), 620-641. doi:10.1007/s00392-006-0458-8
- Dina, C., Meyre, D., Gallina, S., Durand, E., Korner, A., Jacobson, P., . . . Froguel, P. (2007). Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet*, *39*(6), 724-726. doi:10.1038/ng2048
- Erdmann, E. (2011). Erworbene Herzklappenfehler. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Farivar, R. S., & Cohn, L. H. (2003). Hypercholesterolemia is a risk factor for bioprosthetic valve calcification and explantation. J Thorac Cardiovasc Surg, 126(4), 969-975. doi:10.1016/S0022
- Fischer, J., Koch, L., Emmerling, C., Vierkotten, J., Peters, T., Bruning, J. C., & Ruther, U. (2009). Inactivation of the Fto gene protects from obesity. *Nature*, 458(7240), 894-898. doi:10.1038/nature07848
- Frayling, T. M., Timpson, N. J., Weedon, M. N., Zeggini, E., Freathy, R. M., Lindgren, C. M., ... McCarthy, M. I. (2007). A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*, *316*(5826), 889-894. doi:10.1126/science.1141634
- Gerken, T., Girard, C. A., Tung, Y. C., Webby, C. J., Saudek, V., Hewitson, K. S., . . . Schofield, C. J. (2007). The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutaratedependent nucleic acid demethylase. *Science*, 318(5855), 1469-1472. doi:10.1126/science.1151710
- Giachelli, C. M. (2001). Ectopic calcification: new concepts in cellular regulation. *Z Kardiol,* 90 Suppl 3, 31-37.
- Golczyk, K., Kompis, M., Englberger, L., Carrel, T. P., & Stalder, M. (2010). Heart valve sound of various mechanical composite grafts, and the impact on patients' quality of life. *J Heart Valve Dis*, 19(2), 228-232.
- Harken, D. E., Soroff, H. S., Taylor, W. J., Lefemine, A. A., Gupta, S. K., & Lunzer, S. (1960). Partial and complete prostheses in aortic insufficiency. J Thorac Cardiovasc Surg, 40, 744-762.

Herold. (2017). Innere Medizin.

- Hubacek, J. A., Stanek, V., Gebauerova, M., Pilipcincova, A., Dlouha, D., Poledne, R., . . . Pitha, J. (2010). A FTO variant and risk of acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta*, 411(15-16), 1069-1072. doi:10.1016/j.cca.2010.03.037
- Jamieson, W. R., Cartier, P. C., Allard, M., Boutin, C., Burwash, I. G., Butany, J., . . . Yacoub, M. H. (2004). Surgical management of valvular heart disease 2004. *Can J Cardiol*, 20 Suppl E, 7E-120E.
- Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y., . . . He, C. (2011). N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol*, 7(12), 885-887. doi:10.1038/nchembio.687
- Kaplan, M. H., Bolande, R., Rakita, L., & Blair, J. (1964). Presence of Bound Immunoglobulins and Complement in the Myocardium in Acute Rheumatic Fever. Association with Cardiac Failure. N Engl J Med, 271, 637-645. doi:10.1056/NEJM196409242711301
- Lappalainen, T., Kolehmainen, M., Schwab, U. S., Tolppanen, A. M., Stancakova, A., Lindstrom, J., . . . Finnish Diabetes Prevention Study, G. (2011). Association of the FTO gene variant (rs9939609) with cardiovascular disease in men with abnormal glucose metabolism--the Finnish Diabetes Prevention Study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis, 21*(9), 691-698. doi:10.1016/j.numecd.2010.01.006
- Le Tourneau, T., Vincentelli, A., Fayad, G., Savoye, C., Fabre, O. H., Prat, A., & Warembourg, H. (2002). Ten-year echocardiographic and clinical follow-up of aortic Carpentier-Edwards pericardial and supraannular prosthesis: a case-match study. Ann Thorac Surg, 74(6), 2010-2015.
- Legare, J. F., Lee, T. D., Creaser, K., & Ross, D. B. (2000). T lymphocytes mediate leaflet destruction and allograft aortic valve failure in rats. *Ann Thorac Surg*, *70*(4), 1238-1245.
- Leibovich, S. J., Polverini, P. J., Shepard, H. M., Wiseman, D. M., Shively, V., & Nuseir, N. (1987). Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factoralpha. *Nature*, 329(6140), 630-632. doi:10.1038/329630a0
- Lindroos, M., Kupari, M., Valvanne, J., Strandberg, T., Heikkila, J., & Tilvis, R. (1994). Factors associated with calcific aortic valve degeneration in the elderly. *Eur Heart J*, *15*(7), 865-870.
- Manji, R. A., Zhu, L. F., Nijjar, N. K., Rayner, D. C., Korbutt, G. S., Churchill, T. A., . . . Ross, D. B. (2006). Glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve conduits calcify and fail from xenograft rejection. *Circulation*, 114(4), 318-327. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.549311
- Mosier, J., Nguyen, N., Parker, K., & Simpson, C. L. (2018). Calcification of Biomaterials and Diseased States. doi:10.5772/intechopen.71594
- Murray, G. (1956). Homologous aortic-valve-segment transplants as surgical treatment for aortic and mitral insufficiency. *Angiology*, 7(5), 466-471. doi:10.1177/000331975600700509
- Nicoloff, D. M., Emery, R. W., Arom, K. V., Northrup, W. F., 3rd, Jorgensen, C. R., Wang, Y., & Lindsay, W. G. (1981). Clinical and hemodynamic results with the St. Jude Medical cardiac valve prosthesis. A three-year experience. J Thorac Cardiovasc Surg, 82(5), 674-683.

- O'Brien, M. F., Stafford, E. G., Gardner, M. A., Pohlner, P. G., Tesar, P. J., Cochrane, A. D., . . . Smith, S. E. (1995). Allograft aortic valve replacement: long-term follow-up. *Ann Thorac Surg, 60*(2 Suppl), S65-70.
- Okamura, K., Chiba, C., Iriyama, T., Itoh, T., Maeta, H., Ijima, H., . . . Hori, M. (1980). Antigen depressant effect of glutaraldehyde for aortic heterografts with a valve, with special reference to a concentration right fit for the preservation of grafts. *Surgery*, 87(2), 170-176.
- Olszewski, P. K., Radomska, K. J., Ghimire, K., Klockars, A., Ingman, C., Olszewska, A. M., . . . Schioth, H. B. (2011). Fto immunoreactivity is widespread in the rodent brain and abundant in feeding-related sites, but the number of Fto-positive cells is not affected by changes in energy balance. *Physiology & Behavior*, 103(2), 248-253. doi:10.1016/j.physbeh.2011.01.022
- Peters, T., Ausmeier, K., & Ruther, U. (1999). Cloning of Fatso (Fto), a novel gene deleted by the Fused toes (Ft) mouse mutation. *Mamm Genome*, *10*(10), 983-986.
- Pibarot, P., & Dumesnil, J. G. (2009). Prosthetic heart valves: selection of the optimal prosthesis and long-term management. *Circulation, 119*(7), 1034-1048. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.778886
- Rahimtoola, S. H. (2003). Choice of prosthetic heart valve for adult patients. J Am Coll Cardiol, 41(6), 893-904.
- Rajamannan, N. M., Edwards, W. D., & Spelsberg, T. C. (2003). Hypercholesterolemic aortic-valve disease. *N Engl J Med*, *349*(7), 717-718. doi:10.1056/NEJMc031360
- Rosenhek, R., Binder, T., Porenta, G., Lang, I., Christ, G., Schemper, M., . . . Baumgartner, H. (2000). Predictors of outcome in severe, asymptomatic aortic stenosis. *N Engl J Med*, 343(9), 611-617. doi:10.1056/NEJM200008313430903
- Ross, D. N. (1995). Evolution of the homograft valve. *Ann Thorac Surg*, *59*(3), 565-567. doi:10.1016/0003-4975(94)01046-3
- Ross, J., Jr., & Braunwald, E. (1968). Aortic stenosis. Circulation, 38(1 Suppl), 61-67.
- Ruel, M., Kulik, A., Rubens, F. D., Bedard, P., Masters, R. G., Pipe, A. L., & Mesana, T. G. (2004). Late incidence and determinants of reoperation in patients with prosthetic heart valves. *Eur J Cardiothorac Surg, 25*(3), 364-370. doi:10.1016/j.ejcts.2003.12.013
- Sanchez-Pulido, L., & Andrade-Navarro, M. A. (2007). The FTO (fat mass and obesity associated) gene codes for a novel member of the non-heme dioxygenase superfamily. *BMC Biochem*, *8*, 23. doi:10.1186/1471-2091-8-23
- Schmidt, R. F., Lang, F., & Heckmann, M. (2010). *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Schoen, F. J., & Levy, R. J. (2005). Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. *Ann Thorac Surg*, 79(3), 1072-1080. doi:10.1016/j.athoracsur.2004.06.033
- Scuteri, A., Sanna, S., Chen, W. M., Uda, M., Albai, G., Strait, J., . . . Abecasis, G. R. (2007). Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet, 3*(7), e115. doi:10.1371/journal.pgen.0030115

- Sievers, H.-H., Stierle, U., Hanke, T., Bechtel, M., Graf, B., Rein, J.-G., . . . Böhm, J. O. (2005). Die Ross-Operation eine Therapieoption bei Aortenklappenerkrankungen: Ergebnisse des Deutschen Ross-Registers. *Dtsch Arztebl*(30), 102: A2090-2097.
- Siewert, J. R. (2006). Chirurgie. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Smith, J. A., Westlake, G. W., Mullerworth, M. H., Skillington, P. D., & Tatoulis, J. (1993). Excellent long-term results of cardiac valve replacement with the St Jude Medical valve prosthesis. *Circulation*, 88(5 Pt 2), II49-54.
- Speer, M. Y., McKee, M. D., Guldberg, R. E., Liaw, L., Yang, H. Y., Tung, E., . . . Giachelli, C. M. (2002). Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. J Exp Med, 196(8), 1047-1055.
- Statistisches Bundesamt. (2017). Todesursachen in Deutschland Fachserie 12 Reihe 4 2015.
- Steitz, S. A., Speer, M. Y., McKee, M. D., Liaw, L., Almeida, M., Yang, H., & Giachelli, C. M. (2002). Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol, 161*(6), 2035-2046. doi:10.1016/S0002-9440(10)64482-3
- Stewart, B. F., Siscovick, D., Lind, B. K., Gardin, J. M., Gottdiener, J. S., Smith, V. E., . . . Otto, C. M. (1997). Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. J Am Coll Cardiol, 29(3), 630-634.
- Thron, C., Akhyari, P., Godehardt, E., Lichtenberg, A., Ruther, U., & Seehaus, S. (2015). FTO Is Associated with Aortic Valve Stenosis in a Gender Specific Manner of Heterozygote Advantage: A Population-Based Case-Control Study. *Plos One*, 10(10). doi:10.1371/journal.pone.0139419
- Trantina-Yates, A., Weissenstein, C., Human, P., & Zilla, P. (2001). Stentless bioprosthetic heart valve research: sheep versus primate model. *Ann Thorac Surg*, *71*(5 Suppl), S422-427.
- Turina, J., Hess, O., Sepulcri, F., & Krayenbuehl, H. P. (1987). Spontaneous course of aortic valve disease. *Eur Heart J, 8*(5), 471-483.
- Vahanian, A., Alfieri, O., Andreotti, F., Antunes, M. J., Baron-Esquivias, G., Baumgartner, H., . . . Zembala, M. (2012). Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012). *Eur Heart J, 33*(19), 2451-2496. doi:10.1093/eurheartj/ehs109
- Visse, R., & Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res, 92*(8), 827-839. doi:10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D
- Yacoub, M., Rasmi, N. R., Sundt, T. M., Lund, O., Boyland, E., Radley-Smith, R., . . . Mitchell, A. (1995). Fourteen-year experience with homovital homografts for aortic valve replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg*, *110*(1), 186-193; discussion 193-184. doi:10.1016/S0022-5223(05)80025-X
Danksagung

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater und Leiter der Forschungsgruppe *Experimentelle Chirurgie*, Herrn Prof. Dr. Payam Akhyari, für die Gewährung dieses interessanten Dissertationsthemas, für die Betreuung meiner Arbeit, für die freundliche Hilfe und für die Bereitstellung ideeller wie materieller Experimentalgrundlagen. Ich habe unsere Gespräche auf fachlicher und persönlicher Ebene stets als motivierend und ermutigend empfunden.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Projektbetreuerin und Freundin Frau Dr. Jessica Isabel Selig. Ohne ihre tatkräftige Unterstützung in Form ihres umfangreichen Fachwissens, ihrer Expertise innerhalb des Labors und ihrer kreativen Ideen in jeder Phase dieser Arbeit wäre die Anfertigung dieser Dissertation nicht möglich gewesen. An dieser Stelle möchte ich mich auch für die Durchführung der Im- und Explantationen der Transplantate ausdrücklich bedanken.

Ebenfalls danke ich Frau Dr. Mareike Barth, der Leiterin der Arbeitsgruppe *Metabolicaly Induced Cardiovascular Degeneration*, für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft innerhalb des Labors sowie der Korrektur der Dissertation.

Ein großes Dankeschön gilt auch Herrn Prof. Dr. Artur Lichtenberg, dem Direktor der *Klinik für Herzchirurgie* der Universitätsklinik Düsseldorf, für die Möglichkeit, meine Dissertation an seiner Klinik durchführen zu dürfen.

Des Weiteren bedanke ich mich sehr bei allen wissenschaftlichen Mitarbeitern der experimentellen Chirurgie für die professionelle Einführung in die histologische und molekulargenetische Methodik dieser Arbeit. Insbesondere standen mir Herr Felix Burghard und Frau Gisela Müller bei Fragen und Problemen zur Seite. Auch danke ich Frau Antje Schomakers für die Im- und Explantation einiger Transplantate.

Ich danke ebenfalls der Arbeitsgruppe des *Instituts für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere* der *Heinrich-Heine-Universität* in Düsseldorf und deren Leiter, Herrn Prof. Dr. Ulrich Rüther, für die Bereitstellung der Mäuse.

Der Dank an meine Familie ist nicht in Worte zu fassen. Ihr ward und seid mein Halt in jeder Lebenslage. Ohne euch wäre ich nichts.