

Aus der Klinik für Herzchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg

**Veränderungen der Extrazellulärmatrix in humanen
fibrotischen und kalzifizierten stenotischen
Aortenklappen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Svenja Klose

2020

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

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg

Zweitgutachter: PD Dr. med. Sebastian Braun

In tiefer Liebe meinen Großeltern.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Degenerative aortic valve disease and diabetes: Implications for a link between proteoglycans and diabetic disorders in the aortic valve.

Barth M, Selig JI, Klose S, Schomakers A, Kiene LS, Raschke S, Boeken U, Akhyari P, Fischer JW, Lichtenberg A.

Diab Vasc Dis Res. 2019 May;16(3):254-269. doi: 10.1177/1479164118817922

Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen und insbesondere valvuläre Herzerkrankungen sind Krankheiten des höheren Lebensalters und enden oft letal. Die Aortenklappe unterliegt hierbei im Rahmen der Degeneration komplexen Kalzifizierungsprozessen, die zu einer zunehmenden Verdickung der Klappentaschen und letztlich einer funktionseinschränkenden Stenose führen. Man vermutet der Atherosklerose ähnliche, aktive zugrundeliegende Prozesse, die mit einem Umbau der extrazellulären Matrix (ECM) der Taschen verbunden sind. Bestimmte Bestandteile der ECM wie die Proteoglykane Biglykan (BGN), Decorin (DCN), Versican (VER) und Lumican (LUM) sowie Hyaluronsäure (HA) und die chondroosteogenen Proteine Alkalische Phosphatase (ALPL) und Osteopontin (SPP1) zeigten in vorangegangenen Studien an kalzifizierten Aortenklappen bereits unterschiedliche Ausprägungen. Weitgehend unerforscht ist bislang die Zusammensetzung der ECM im Vergleich von frühen, fibrotischen und späten, kalzifizierten Degenerationsstadien insbesondere unter dem Einfluss von Diabetes.

Das Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Genexpression wichtiger ECM-Bestandteile an fibrotischen und kalzifizierten humanen Aortenklappen von Patienten mit und ohne Diabetes zu untersuchen. Dazu wurde mittels RT-PCR die Genexpression von verschiedenen chondroosteogenen Markern sowie BGN, DCN, LUM und VER und von den HA-Synthasen (HAS) 1-3 analysiert.

Die HAS1-3-Expression wurde zudem durch die Messung des HA-Gehalts durch einen HA-ELISA verifiziert. Im Rahmen von weiterführenden *in vitro*-Modellen an ovinen valvulären Interstitialzellen wurden zum einen die Rolle der HA im Kalzifizierungsprozess näher ergründet und zum anderen der Einfluss einer Hyperglykämie auf die Genexpression von BGN und HAS1-3 untersucht. Auch hier wurde zusätzlich der HA-Gehalt ermittelt.

Die vorliegende Arbeit konnte in humanen Aortenklappen eine signifikante Hochregulation der Genexpression mutmaßlich pro-kalzifizierender ECM-Bestandteile in frühen Degenerationsstadien zeigen, zu denen die Proteoglykane BGN und VER zählen. Auch DCN demonstrierte diese signifikante Überexpression in fibrotischen Stadien. Die LUM- und ALPL-Expression blieben in den verschiedenen Stadien unverändert, wohingegen SPP1 in kalzifizierten Stadien signifikant mehr exprimiert wurde. Die HAS2- und 3-Expressionen waren in fibrotischen Klappentaschen signifikant hochreguliert, was sich durch einen ebenfalls erhöhten HA-Gehalt verifizieren ließ. Ein Diabetes hingegen schien auf die Zusammensetzung der ECM keinen Einfluss zu haben. *In vitro* führte eine Hyperglykämie jedoch zu einer höheren Expression der HAS2-3 und zu einem höheren HA-Gehalt. Aktiv die Kalzifizierung induzierende oder inhibierende Effekte konnten der HA *in vitro* nicht zugesprochen werden.

Insgesamt könnten die vorliegenden Ergebnisse durch ein zunehmendes Verständnis der komplexen Mechanismen der Aortenklappendegeneration dabei helfen, zukünftig präventive Maßnahmen zu entwickeln, die Progression der Erkrankung aufzuhalten und bestehende Behandlungsmethoden zu verbessern.

Abstract

Cardiovascular diseases and especially those of the heart valves are diseases of the older age and often lead to death. As part of the degeneration process, the aortic valve is subject to complex calcification processes that lead to an increasing thickening of the cusps and finally to a function-restricting stenosis. Active processes, similar to those of atherosclerosis, are associated with a remodeling of the extracellular matrix (ECM) of the cusps. Certain components of the ECM such as the proteoglycans biglycan (BGN), decorin (DCN), versican (VER) and lumican (LUM) as well as hyaluronic acid (HA) and the chondro-osteogenic proteins alkaline phosphatase (ALPL) and osteopontin (SPP1) showed in previous studies on calcified aortic valves different expressions. To date, the composition of ECM in early fibrotic and late calcified stages of degeneration has been largely unexplored, especially under the influence of diabetes.

The aim of this work is therefore to investigate the gene expression of important ECM components in fibrotic and calcified human aortic valves of patients with and without diabetes. For this purpose, the gene expression of various chondro-osteogenic markers as well as BGN, DCN, LUM and VER and of the HA synthases (HAS) 1-3 was analyzed using RT-PCR.

HAS1-3 expression was also verified by measuring the HA content with an HA-ELISA. In the context of further *in vitro* models on ovine valvular interstitial cells, the role of HA in the calcification process and the influence of hyperglycemia on the gene expression of BGN and HAS1-3 was investigated. The HA content was also determined.

In the present work human aortic valves have shown a significant upregulation of gene expression of ECM components in early stages of disease including the proteoglycans BGN and VER, which are supposed to have calcifying effects. DCN also demonstrated this significant higher expression in fibrotic stages. LUM and ALPL expression remained unchanged in the different stages, whereas SPP1 expression was significantly higher in the calcified stages. The HAS2 and 3 expressions were significantly upregulated in fibrotic cusps, which could also be verified by an increased HA content. Diabetes did not appear to have any influence on the composition of the ECM. *In vitro*, however, hyperglycemia led to a higher expression of HAS2-3 and to a higher HA content. HA did not contribute to active calcification-inducing or -inhibiting effects *in vitro*.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALP	Alkalische Phosphatase
ALPL	Gen der Alkalischen Phosphatase
Aqua bidest.	<i>Aqua bidestillata</i> , zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i> , destilliertes Wasser
ASS	Acetylsalicylsäure
AVR	<i>aortic valve replacement</i> , Aortenklappenersatz
β-GP	beta-Glycerophosphat
β-ME	beta-Mercaptoethanol
BGN	Biglycan
BMI	<i>body mass index</i>
BMP-2	<i>bone morphogenetic protein-2</i> , knochenmorphologisches Protein
BSA	Bovines Serum Albumin
CaCl₂	Calciumdichlorid dihydrat
cAVK	zerebrale arterielle Verschlusskrankheit
cDNA	<i>complementary</i> Desoxyribonukleinsäure
CD44	Oberflächenrezeptor für Hyaluronsäure
cm	Zentimeter
d	<i>day</i> , Tag
DCN	Decorin
dl	Deziliter
DM	Diabetes mellitus
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	DNA-spaltendes Enzym
dp_{max}	maximaler Druckgradient

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ECM	<i>extracellular matrix</i> , Extrazellulärmatrix
EF	Ejektionsfraktion
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
Eppi	Mikroreaktionsgefäß der Firma Eppendorf
et al.	<i>et alii, et aliae</i> , und andere
EtOH	Ethanol
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , fetales Kälberserum
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykan
h	<i>hours</i> , Stunden
HA	Hyaluronsäure
HAS	Hyaluronsäuresynthase
HbA1c	Glykohämoglobin
HCl	Gelöster Chlorwasserstoff, Salzsäure
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
Hg	Quecksilber
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSBP	Hyaluronsäure-bindendes Protein
H₂O	Wasser
IDDM	<i>insulin dependent</i> Diabetes mellitus, Insulin-abhängiger Diabetes mellitus
IgG	Immunglobulin G
KHK	Koronare Herzkrankheit
KOF	Körperoberfläche
KÖF	Klappenöffnungsfläche
KP	Kontrollpeptid
l	Liter
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LUM	Lumican

LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
mA	Milliampere
mbar	Millibar
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MP	Meerrettich-Peroxidase
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
n	Anzahl
NaOH	Natriumhydroxid
N₂	Stickstoff
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
o.g.	oben genannt
OP	Operation
OPN	Osteopontin
oxLDL	oxidiertes <i>low density lipoprotein</i>
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PG	Proteoglykan
pH	Maß für Säuregehalt einer wässrigen Lösung, dimensionslos
PLTP	Phospholipidtransferprotein
pmol	pikomolar
rcf	<i>relative centrifugal force</i> (relative Zentrifugalkraft)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>real time</i> Polymerasekettenreaktion
s.	siehe
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumlaurylsulfat
sec	Sekunden
SLRP	<i>small leucin-rich repeat proteoglycans</i>
SPP1	<i>secreted phosphoprotein 1</i> , Gen des Osteopontins
sog.	so genannt
T1DM	Diabetes mellitus Typ 1
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
TAVR	<i>transcatheter aortic valve replacement</i> , kathetergestützter Aortenklappenersatz
TGF-β	<i>transforming growth factor</i> – beta
TLR	<i>toll like</i> -Rezeptor
TTE	transthorakale Echokardiographie
VEC	<i>valvular endothelial cell</i> , valvuläre Endothelzelle
VER	Versican
VHD	<i>valvular heart disease</i> , valvuläre Herzerkrankung
VIC	<i>valvular interstitial cell</i> , valvuläre Interstitialzelle
V_{max}	maximale Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe
x	Mal
z.B.	zum Beispiel
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
°C	Grad Celcius

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Kardiovaskuläre Erkrankungen: Ein Überblick.....	1
1.2	Die Aortenklappe und die Aortenklappenstenose	1
1.2.1	Allgemeines zur Pathogenese und Therapie	1
1.2.2	Der anatomische Aufbau der Aortenklappe	4
1.2.3	Die einzelnen Bestandteile der ECM und ihre Rolle im Kalzifizierungsprozess	5
1.3	Diabetes mellitus	10
1.4	Einfluss eines T2DM auf die Zusammensetzung der ECM im Rahmen der Aortenklappenkalzifizierung	11
1.5	Ziele dieser Arbeit	13
2	Material und Methodik	14
2.1	Material	14
2.1.1	Technische Geräte und Software	14
2.1.2	Verbrauchsmaterial	15
2.1.3	Gewinnung von RNA, Herstellung von <i>complementary</i> Desoxyribonukleinsäure (cDNA) und PCR	16
2.1.4	HA-ELISA	17
2.1.5	Zellkultur oviner VICs	19
2.1.6	Herstellerverzeichnis	23
2.2	Methodik	24
2.2.1	Ethikvotum	24
2.2.2	Patientenklientel und Ausschlusskriterien	24
2.2.3	Einwilligung, präoperative Blutentnahme, Anamnese und Aortenklappengewinnung	25
2.2.4	Datenbank	26
2.2.5	Einteilung der Gruppen	28
2.2.6	RNA-Isolation aus humanen Aortenklappen	28
2.2.7	Herstellung von cDNA	31
2.2.8	Semiquantitative RT-PCR humaner Aortenklappen	32
2.2.9	Bestimmung des HA-Gehalts humaner Aortenklappen mittels HA-ELISA	33
2.2.10	Zellkulturexperimente	35
2.2.11	<i>In vitro</i> -Kultivierung oviner VICs auf normo- und hyperglykämischem Medium	37
2.2.12	Inhibition der HA durch das HA-hemmende Peptid Pep1 in einem <i>in vitro</i> -Modell an ovinen VICs	40

2.2.13	Statistische Auswertung.....	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Die Genexpression in der ECM degenerierter humaner Aortenklappentaschen.....	45
3.1.1	Die Genexpression von SLRPs	45
3.1.2	Die Genexpression des Proteoglykans VER	48
3.1.3	Die Genexpression von chondro-osteogenen Markern.....	49
3.1.4	Die Genexpression der HAS1-3	51
3.2	Der quantitative HA-Gehalt in humanen Aortenklappentaschen	54
3.3	Auswertung der Patientendaten	57
3.4	<i>In vitro</i> -Kultivierung oviner VICs auf normo- und hyperglykämischem Medium	61
3.4.1	Die Genexpression von BGN und HAS 1-3	61
3.4.2	Der HA-Gehalt der ovinen VICs an d 12.....	75
3.5	Inhibition der HA durch das HA-hemmende Peptid Pep1 in einem <i>in vitro</i> - Modell an ovinen VICs	77
4	Diskussion.....	79
4.1	Diskussion der Ergebnisse	79
4.2	Diskussion der Methoden und Studienlimitierung	93
4.3	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	94
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	96
6	Danksagung	

1 Einleitung

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen: Ein Überblick

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems sind die führende Todesursache weltweit [1]. Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes starben im Jahr 2017 allein in Deutschland ca. 345.000 Menschen an den Folgen kardiovaskulärer Erkrankungen. Dies macht einen Anteil von 37 % bezogen auf alle Todesursachen aus [2]. Über 90 % der Todesfälle ereigneten sich 2015 nach dem 65. Lebensjahr [3].

Die hohe Prävalenz ist von großer sozioökonomischer Bedeutung. Die in Deutschland getätigten Ausgaben nur für Herz-Kreislauf-Erkrankungen betrugen 2015 über 46 Milliarden Euro. Bezogen auf alle Krankheitskosten, die sich auf knapp 340 Milliarden Euro beliefen, ist dies ein Anteil von nahezu 14 % [4].

Neben atherosklerotischen Erkrankungen wie der koronaren Herzkrankheit (KHK), peripherer und zerebraler arterieller Verschlusskrankheit (pAVK und cAVK) mit ischämischen Endorganschäden wie Myokardinfarkt, Schlaganfall, Nieren- und Herzinsuffizienz gehören auch die arterielle Hypertonie und insbesondere Herzklappenvitien zu diesem Formenkreis.

In den Vereinigten Staaten liegt die Prävalenz von valvulären Herzerkrankungen (*valvular heart diseases*, VHD) bei Patienten über 75 Jahren bei 13,3 %, wohingegen sie in der Altersgruppe der 18 bis 44-Jährigen nur 0,7 % beträgt. Es handelt sich also um eine vor allem das höhere Alter betreffende Erkrankung [5].

Von den vier Herzklappen (Trikuspidal-, Pulmonal-, Mitral- und Aortenklappe) ist die Aortenklappe am häufigsten betroffen. Unterschieden werden eine Stenose und eine Insuffizienz, wobei die Aortenklappenstenose die VHD mit der höchsten Prävalenz in der westlichen Welt darstellt [6].

1.2 Die Aortenklappe und die Aortenklappenstenose

1.2.1 Allgemeines zur Pathogenese und Therapie

Die Aortenklappe fungiert als Ventil zwischen dem linken Ventrikel des Herzens und der Aorta. In der Regel ist sie trikuspid, bestehend aus drei Klappentaschen, angelegt, es existieren jedoch seltener auch bikuspid und unikuspid Aortenklappen als anatomische Anlagevarianten. Pro Tag (d) öffnet und schließt sie sich etwa 100.000 Mal und ist dabei stetig hohen Scherkräften ausgesetzt [7, 8]. Sie hat bei gesunden Patienten eine durchschnittliche Öffnungsfläche von 3-4 cm².

Bei der Aortenklappenstenose handelt es sich um eine fortschreitende Erkrankung, die beim Einsetzen von Symptomen mit einer hohen Morbidität und Mortalität einhergeht. Ursächlich am häufigsten führt eine Kalzifizierung der Klappentaschen zu einer Reduktion der Klappenöffnungsfläche (KÖF). Dies bedingt einen reduzierten Auswurf des linken Ventrikels. Die Patienten werden in ihrer körperlichen Leistungsfähigkeit limitiert, es kommt zu Symptomen wie pectanginösen Beschwerden, Dyspnoe und Schwindel. Im Endstadium resultiert durch die dauerhafte Mehrbelastung des Herzens eine Herzinsuffizienz, die oft letal endet [9, 10].

Die aus degenerativen Veränderungen resultierenden Stenosen treten sehr häufig auf, weshalb in dieser Arbeit auch auf diese das Hauptaugenmerk gelegt wurde. Faktoren wie beispielsweise männliches Geschlecht, fortgeschrittenes Alter, ein hoher *body mass index* (BMI), eine positive Raucheranamnese, erhöhte Triglyzerid- und *low density lipoprotein* (LDL)-Werte, eine arterielle Hypertonie aber auch Nierenfunktionsstörungen und Diabetes mellitus (DM) scheinen die Entstehung bzw. Progression von degenerativen Veränderungen zu begünstigen [11-14].

Zu den eine Stenose begünstigenden, jedoch selteneren Risikofaktoren, gehören neben einer angeboren bikuspiden Aortenklappe [15] auch rheumatische Erkrankungen der Herzklappen durch A-Streptokokken [16].

Diagnostik

Die transthorakale Echokardiographie (TTE) als sonographisches Verfahren ist die Methode der Wahl. Sie ist weit verfügbar, sicher, nicht invasiv und ermöglicht neben einer sehr frühen Diagnosestellung die Beurteilung der Klappenmorphologie sowie des Schweregrads der Stenose. Zur Stenosegradbeurteilung können hämodynamische Parameter wie die KÖF der Aortenklappe, die maximale Geschwindigkeit ($V_{\max}$) über der Aortenklappe sowie der mittlere Druckgradient ($dp_{\max}$) erfasst werden.

Weitere, jedoch nicht standardmäßig genutzte diagnostische Methoden stellen die kardiale Magnetresonanztomographie sowie die Computertomographie dar [17].

Therapiemöglichkeiten

Derzeit stehen nur zwei Behandlungsmethoden zur Verfügung: der chirurgische Aortenklappenersatz (*aortic valve replacement*, AVR) durch biologische oder mechanische Herzklappen und kathetergestützte Verfahren (*transcatheter aortic valve replacement*, TAVR). Die Leitlinien der *American Heart Association* (AHA) und des *American College of Cardiology* (ACC) von 2017 raten bei einer schweren symptomatischen Aortenklappenstenose mit niedrigem bis intermediärem perioperativem Risiko primär zum AVR [18].

In Deutschland wurden im Jahr 2017 über 21.000 offen chirurgische Herzklappeneingriffe vorgenommen [19]. Der chirurgische Aortenklappenersatz ist in der Regel ein mehrstündiger operativer Eingriff mit prozedural bedingtem gesteigertem peri- und postoperativem Risiko. Die Tatsache, dass die Prävalenz der Aortenklappenstenose mit höherem Alter zunimmt [20], und die Lebenserwartung der Menschen stetig steigt, führt daher nicht selten zu einer Limitierung dieser Art der Behandlung.

Begrenzend sind des Weiteren bestehende Komorbiditäten, eine schlechte linksventrikuläre Pumpfunktion, Fettleibigkeit, ein vorausgegangener Myokardinfarkt sowie ein schlechter Allgemeinzustand [21]. Untersuchungen aus den Vereinigten Staaten ergaben, dass lediglich etwa die Hälfte der an einer schweren Aortenklappenstenose leidenden Patienten überhaupt für einen operativen Eingriff geeignet sind. Tatsächlich unterziehen sich insgesamt nur schätzungsweise 40 % dann auch tatsächlich der Operation (OP) [22].

Gemäß den Leitlinien ist eine TAVR nur im Falle von Kontraindikationen für ein AVR indiziert und wenn postinterventionell ein Überleben von mehr als zwölf Monaten erwartet wird. Auch als Alternative bei mittlerem und insbesondere hohem Operationsrisiko ist eine TAVR zu erwägen [9, 18]. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate in den jeweiligen indikationsgerecht therapierten Kollektiven liegt für die AVR bei ca. 68 % [23] und für die TAVR bei 48 % [24].

Eine wirksame medikamentöse Therapie zur Heilung oder Verhinderung der Progression existiert aktuell nicht [25].

Degeneration der Aortenklappe

Die Kalzifizierung spielt die zentrale Rolle bei der Degeneration der Aortenklappe. Während ältere Hypothesen zur Pathogenese von passiven Kalzifizierungsprozessen ausgingen, weisen neuere Erkenntnisse auf einen aktiv regulierten Vorgang hin. Bisherige Studien lassen hierbei große Ähnlichkeiten von Pathophysiologie und Risikofaktoren mit der Atherosklerose erkennen [11, 26-28].

Neben prädisponierenden Faktoren wie einer begünstigenden Anatomie (Anlage einer bikuspiden Aortenklappe) und Komorbiditäten wie zum Beispiel (z.B.) einer Niereninsuffizienz und dem metabolischen Syndrom wird insbesondere dem durch Scherkräfte verursachten, mechanischen Stress eine besondere Bedeutung bei der Initiierung des Kalzifizierungsprozesses beigemessen. Hierdurch entstandene Läsionen der Endothelschicht begünstigen, analog zu atherosklerotischen Prozessen, die Einlagerung von LDL. Dieses unterliegt einer oxidativen Modifikation und wird unter anderem von Proteoglykanen (PG) als Bestandteil der extrazellulären Matrix (ECM) gebunden. Auch wird die Einwanderung von Entzündungszellen wie T-Lymphozyten,

Monozyten und Makrophagen angeregt, die wiederum in der Lage sind, oxidiertes LDL (oxLDL) aufzunehmen und über die Expression von Oberflächenmolekülen sowie die Ausschüttung von Zytokinen Entzündungs- und Umbauprozesse der ECM zu vermitteln. Zu diesen Oberflächenmolekülen zählen bestimmte Rezeptoren, wie *toll like*-Rezeptoren (TLR). Die Familie der TLR tragen über die Bindung und Erkennung von Liganden zur Stimulation der angeborenen Immunantwort bei [29].

Durch Immunzellen freigesetzte Zytokine und Mediatoren wie der *transforming growth factor*- β (TGF- β) haben eine Stimulation von valvulären Interstitialzellen (VIC) zur Folge. Stimulierte VICs sezernieren diverse Proteine und Stoffe, die folgend den komplexen Umbau der valvulären ECM bewirken. Angeregt wird auch die Differenzierung und Proliferation von Myofibroblasten, von denen eine Subpopulation wiederum vermutlich einen Osteoblasten-ähnlichen Phänotyp annehmen kann [30]. Diese sind fähig, extrazelluläre Knochenmatrix-Proteine zu sezernieren. Über eine anfängliche Fibrose endet dieser Prozess schließlich in einer ektopen Kalzifizierung mit zunehmender Zellapoptose und Verdickung der Aortenklappentaschen. Sehr stark kalzifizierte Klappentaschen weisen histologisch sogar Knochenlamellen auf [31-35].

Fibrosierung und Kalzifizierung bedingen funktionelle Einschränkungen der Aortenklappe, die zu einer verminderten Flexibilität der Klappentaschen und einer Reduktion der Öffnungsfläche führen. Der erhöhte Flusswiderstand durch die Aortenklappenstenose resultiert in kardialen und hämodynamischen Veränderungen, deren Konsequenz die vorangehenden benannten Symptome des Patienten sind. Im Folgenden soll der Aufbau der Aortenklappe und insbesondere die Rolle der ECM näher beleuchtet werden. Der ECM wird eine zentrale und auch bis heute nicht gänzlich verstandene Rolle im Kalzifizierungsprozess zugeschrieben.

1.2.2 Der anatomische Aufbau der Aortenklappe

Die Aortenklappe besteht aus drei Aortenklappentaschen: den *Valvulae semilunares sinistra*, *dextra* und *posterior*, die an einem Faserring, dem *Anulus fibrosus*, im Bereich der Aortenwurzel befestigt sind. Ihre Aufgabe ist die Freigabe der linksventrikulären Ausflussbahn während der Systole und ein sicherer Verschluss der Aortenklappe in der Diastole, um einen retrograden Blutfluss in Richtung des Herzens zu verhindern.

Der sichere Klappenschluss in der Diastole wird gewährleistet durch jeweils einen kleinen Knoten an jeder Tasche, dem sog. *Nodus valvulae semilunaris*. Dieser befindet sich, genau wie ein seitlich davon liegender Saum, die *Lunula valvulae semilunaris*, am freien Rand einer jeden Klappentasche. Beide Strukturen gewährleisten beim Kontakt der *Valvulae* in der Diastole eine sichere Abdichtung der

Aortenklappe. Zu Beginn der ascendierenden Aorta, direkt hinter den Taschen der Aortenklappe, befinden sich die Abgänge der Koronararterien *Aa. coronariae sinistra* und *dextra* [36].

Eine Aortenklappentasche weist eine typische Dreischichtung auf. In der Mitte liegt die *Lamina spongiosa*, gegen linken Ventrikel schließt sich die *Lamina ventricularis* an, in Richtung Aorta die *Lamina fibrosa*. Die *Laminae fibrosa* und *ventricularis* werden jeweils von einer Lage valvulärer Endothelzellen (VEC) bedeckt.

Allen drei Schichten ist das Vorkommen von VICs gemeinsam. In der *Lamina ventricularis* findet sich zusätzlich reichlich Elastin, dessen Fasern sich während der Systole entspannen und so ein Öffnen ermöglichen, der Herzklappe jedoch durch Verlängerung und Verhärtung während der Diastole Widerstandsfähigkeit verleihen. Die *Lamina spongiosa* im inneren Teil ist eine lockere Bindschicht und enthält überwiegend Glykosaminoglykane (GAG) sowie PG, während die *Lamina fibrosa* dichtes, strukturverleihendes Kollagen beinhaltet. Sowohl Elastin, als auch GAGs wie Hyaluronsäure (HA), Kollagen, PG, Glykoproteine und weitere, neben den VECs und VICs vorkommende Bestandteile, werden unter dem Oberbegriff der valvulären ECM zusammengefasst [31, 37, 38]. Sie bildet ein dreidimensionales, gewebespezifisches Strukturgerüst um die Zellen und sorgt so für eine hohe Viskoelastizität. Ihr Hauptproduzent sind kardiale Fibroblasten [39, 40].

Zwischen den Zellen und der ECM besteht eine komplexe Interaktion, die Zellmigration, -adhäsion, -proliferation und -überleben steuert. Die Zusammensetzung der Matrix wird regelmäßig im Rahmen von Reparaturprozessen erneuert und den Anforderungen entsprechend modifiziert [7, 38].

1.2.3 Die einzelnen Bestandteile der ECM und ihre Rolle im Kalzifizierungsprozess

Proteoglykane

Ein wichtiger Bestandteil der ECM sind PG. Sie gehören zur Familie der Glykoproteine und zeichnen sich neben einem Kernprotein durch einen individuellen GAG-Anhang aus. Anhand der Zusammensetzung der GAG-Ketten können sie in Subgruppen unterteilt werden [41, 42]. Eine dieser Subgruppen stellen die *small leucin-rich proteoglycans* (SLRP) dar, zu denen unter anderem Biglykan (BGN), Lumican (LUM) und Decorin (DCN) gehören [43, 44]. Die Hyalactane sind eine Gruppe von PG, die sowohl Hyaluronan als auch Lectin binden. Versican (VER) besitzt, wie auch

beispielsweise Aggrecan, Neurocan und Brevican, diese Eigenschaft und wird ihnen zugeordnet [45].

Das zu den SLRPs gehörende BGN besteht aus einem Kernprotein und einer Chondroitin- oder Dermatansulfat-GAG-Kette und ist nicht nur an der Kollagen-Fibrillogenese beteiligt, sondern inhibiert auch die Thrombin- und Plättchenaktivität und wirkt proliferierend auf verschiedene Zelltypen [46-49]. Es kommt in der ECM vieler Gewebe des Körpers vor, so beispielsweise auch in Arterienwänden. Produziert wird BGN dort von Glattmuskelzellen. In atherosklerotischen Läsionen der Gefäßwand findet sich eine Überexpression von BGN, was auf eine Beteiligung an den pathologischen Prozessen schließen lässt [50-52]. Des Weiteren ist BGN ebenfalls gehäuft in der zentralen Schicht von Aortenklappentaschen lokalisiert [53, 54]. In stenotischen Aortenklappen zeigte sich in vorangegangenen Studien eine Hochregulation des PGs, das unter anderem über die Signalkaskade der TLR-2 und 4 die Bildung des sog. Phospholipidtransferproteins (PLTP) anzuregen scheint, was letztlich eine Lipidretention und damit auch eine Kalzifizierung der Herzklappen begünstigt [35, 55]. VICs mit erhöhter BGN-Expression triggerten *in vitro* über den TLR-2-Signalweg und einer damit verbundenen *bone morphogenic protein-2*-(BMP-2)- und Alkalische Phosphatase-(ALP-) Expression die Osteogenese [56], was dem SLRP ebenfalls pro-kalzifizierende Eigenschaften zuspricht.

Mit 57% genetischer Übereinstimmung haben BGN und DCN die größte strukturelle Ähnlichkeit in der Familie der SLRPs [43]. DCN besteht neben einem Kernprotein ebenfalls aus einem Dermatan- oder Chondroitinsulfatanhang [45] und wird hauptsächlich von Fibroblasten der ECM synthetisiert. Die Aufgaben und Funktionen sind vielseitig. Es spielt nicht nur eine Rolle in der Wundheilung, Angiogenese oder Bildung bzw. Formation von Kollagenfibrillen, vielmehr ist es in der Lage, bestimmte Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise den im Kalzifizierungsprozess vorkommenden und ihn fördernden TGF- β , zu internalisieren und somit die von ihm ausgelöste Kaskade zu unterbrechen [57, 58].

Ein Rattenmodell zu Prozessen der Kalzifizierung der Knochenmatrix aus dem Jahr 1999 zeigte bereits, dass frühe Stadien der Kalzifizierung durch ein vermindertes Vorkommen von DCN und einen Zusammenschluss von Kollagenfibrillen gekennzeichnet sind. Dies kann im Umkehrschluss als eine anti-kalzifizierende Wirkung DCNs gedeutet werden [59-62].

DCN zeigte in einer *in vitro*-Studie an nicht valvulärem Gewebe eine pro-fibrotische Wirkung und scheint ferner in aortalen Muskelzellen als Induktor der Kalzifizierung zu fungieren [63, 64]. Auch in humanen Aortenklappen ist das PG vorzufinden. Eine

Proteomanalyse der ECM kalzifizierter Aortenklappen ergab in von Kalzifizierung betroffenen Aortenklappen eine erhöhte Expression von DCN [65]. Örtlich war DCN dort in unmittelbarer Nähe zu Kalkknötchen, jedoch nicht in deren Zentren auffindbar [66].

Welche Rolle DCN im Degenerationsprozess humaner Aortenklappen spielt, ist ebenso wenig wie seine Wirkungsweise geklärt.

LUM, ebenfalls ein Mitglied der SLRPs, ist ein Keratansulfat-haltiges PG, dessen Kernprotein eine ähnliche Größe wie die seiner Verwandten BGN und DCN aufweist [67]. Es wird in zahlreichen Geweben exprimiert, so unter anderem in Gefäßwänden [68-70] und der Knochenmatrix [71] und ist in der Lage, durch die Interaktion seines Kernproteins mit Kollagen den Durchmesser von Kollagenfibrillen einzuschränken [67] und somit für eine gewisse Stabilität des Gewebes zu sorgen.

Die veränderte LUM-Expression in Osteosarkomen, malignen Melanomen, Mamma- und Pankreaskarzinomen sowie kolorektalen Karzinomen deutet zudem auf eine Rolle in der Pathogenese maligner Tumore hin [72-78].

Auch in Gefäßwandbereichen atherosklerotischer Läsionen konnte ein erhöhtes Vorkommen des leucinreichen PGs beschrieben werden [79]. Die Datenlage zu LUM in kalzifizierten Aortenklappen hingegen ist inkonsistent. Martin-Rojas et al. fanden in kalzifizierten Aortenklappen ein gesteigertes Vorkommen von LUM [65]. Eine Proteomanalyse von Suzuki et al. konnte in einem Kollektiv von n=6 Patienten mit degenerierten Aortenklappen keine Unterschiede in der LUM-Kernproteinmenge im Vergleich kalzifizierter und nicht kalzifizierter Areale nachweisen. Kalzifizierte Klappenbereiche wiesen allerdings eine insuffiziente LUM-Glykosylierung auf [80]. Diese Datenlage erschwert die Einordnung der Bedeutung von LUM für den Kalzifizierungsprozess humaner Aortenklappen.

PG aus der Gruppe der Hyalactane sind ebenfalls in vielen Geweben vorzufinden. Knorpelspezifisch ist beispielsweise Aggrecan, wohingegen Neurocan und Brevican vorzugsweise im zentralen Nervensystem zu finden sind.

In Weichteilgeweben findet sich ein gesteigerter Anteil des PGs VER, das entweder einen Chondroitin- oder einen Dermatansulfatanhang aufweist [45, 81]. Seine Aufgaben sind vielfältig und reichen von der Regulation der Zellmigration, -adhäsion und -proliferation bis hin zur Beteiligung an inflammatorischen Prozessen [82]. Letztere werden vermutlich über die Bindung von VER an TLR und CD44 vermittelt [83-85].

VER kommt unter anderem in der menschlichen Aortenwand vor [86]. Es ist bekannt, dass das PG im Rahmen der Atherosklerose, aber auch der Restenosierung von Gefäßen eine relevante Rolle spielt. So konnte bereits gezeigt werden, dass es nach

einer Verletzung der Gefäßwand zu einer höheren VER-Expression kommt. Auch in der Umgebung von Kalkknötchen in kalzifizierten Aortenklappen konnte ein gesteigertes Vorkommen von VER nachgewiesen werden. Studien deuten darauf hin, dass prokalzifizierendes TGF- β für die gesteigerte Expression dieses PGs verantwortlich sein könnte [66, 85, 87-90].

Glykosaminoglykane: Hyaluronsäure

GAG zeichnen sich durch das Vorkommen vieler Disaccharideinheiten aus. Ein bekannter Vertreter der GAG-Gruppe ist die HA. Im Gegensatz zu anderen GAGs wird HA nicht im Golgi-Apparat synthetisiert, sondern durch membranständige Enzyme [91]. Von diesen Enzymen, den sog. HA-Synthasen (HAS), sind bei den Säugetieren drei Isoformen, HAS1-3, bekannt. Sie besitzen unterschiedliche Enzymaktivitäten, wobei HAS2 die aktivste Isoform zu sein scheint. Zudem sind die von ihr produzierten HA-Moleküle deutlich länger als die der HAS1 und 3 [92-95].

HA hat die Eigenschaft, Wasser zu binden und Gewebe auf diese Art Viskoelastizität zu verleihen [41]. Sie wird häufig von anderen PG gebunden und reguliert auf komplexe Art und Weise nicht nur die Gewebearchitektur, sondern auch Zellmigration und -proliferation.

In Gefäßwänden findet sich HA in der endothelialen Glykokalyx und in der Adventitia. Bei atherosklerotischen Prozessen, die Ähnlichkeiten mit der Kalzifikation von Aortenklappen aufweisen, scheint die HA divergente Rollen zu spielen. Neben vasoprotektiven Eigenschaften wird dem GAG auch eine pathogenetische Bedeutung zugeschrieben [96]. Inflammatorische Prozesse wie Leukozyten-, Monozyten- und Makrophagenrekrutierung sowie die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren werden großenteils über die Bindung an den HA-Rezeptor CD44 reguliert [97-99]. Hierbei scheint das Molekulargewicht der HA eine nicht unerhebliche Rolle zu spielen: Die Moleküle mit hohem Gewicht wirken eher anti-inflammatorisch, anti-angiogenetisch und immunsuppressiv, wohingegen die leichteren inflammatorisch, angiogenetisch und immunstimulierend agieren [100].

In kalzifizierten Aortenklappen bzw. in kalzifizierten Bereichen der Herzklappe wurde HA bislang als vermindert vorkommend beschrieben [66, 101]. Rodriguez et al. konnten zeigen, dass eine Störung von HA oder die Blockade seines Rezeptors CD44 zu einer erhöhten Kalzifizierung führt. Hieraus leiteten die Autoren der Studie eine protektive Wirkung gegenüber Kalzifizierungsprozessen ab [102].

Krishnamurty et al. fanden 2017 heraus, dass in kalzifizierten Aortenklappen neben der Bildung von pathologischen Schwere-Ketten-HA ein gestörtes Gleichgewicht zwischen HAS und HA-abbauenden Enzymen vorliegt, was wiederum zu einer abnormen regionalen HA-Expression führt [103]. Zur komplexen Regulation und den vielfältigen,

teils konträren Wirkungen der HA in den verschiedenen Stadien der kalzifizierenden Aortenklappendegeneration liegen nur rudimentäre Daten vor.

Chondroosteogene Proteine

Osteopontin (OPN), codiert durch das Gen *secreted phosphoprotein 1* (SPP1), ist hauptsächlich ein in Knochen vorkommendes, pro-inflammatorisches Matrixprotein. Es wird von zahlreichen Zellentitäten produziert und kann Myofibroblasten stimulieren sowie die Aktivität von Osteoblasten regulieren. Somit ist es ein wichtiger Baustein im Rahmen der Mineralisation [104, 105]. Aus vorangegangenen Studien ist eine Hochregulierung des Proteins in Prozessen der Wundheilung, Autoimmunerkrankungen, Fibrose und Atherosklerose bekannt [106-109].

Über die Rolle von OPN im Kalzifizierungsprozess von Aortenklappen ist zum aktuellen Zeitpunkt nur wenig bekannt. Hohe Plasma-OPN-Spiegel scheinen mit dem Vorliegen einer kalzifizierten Klappe in Verbindung zu stehen und korrelieren mit der Höhe des gemessenen valvulären Kalziumgehalts [110]. Mehrere Studien haben nachgewiesen, dass der OPN-Plasmaspiegel auch bei asymptomatischen Patienten mit einer Aortenklappenstenose im Vergleich zu Gesunden erhöht ist, sodass dieser Parameter Potenzial als diagnostischer Biomarker besitzen könnte [105, 110-112]. Zudem weist kalzifizierender biologischer Herzklappenersatz in pathologisch veränderten Bereichen im Vergleich zu nicht verkalkten Arealen OPN auf, was ebenfalls auf einen relevanten Einfluss des Proteins auf die Kalzifizierung schließen lässt [113].

Interessanterweise diskutieren einige Studien über OPN eine eher den Kalzifizierungsprozess modifizierende, denn initiiierende Wirkung: Grases et al. beobachteten in diesem Kontext eine Kontrolle der Mineralisation durch OPN [114], Steitz et al. gar die Induktion des Mineralablagerungs-Abbaus [115].

Die ALP, codiert durch das Gen *ALPL*, ist ein membranständiges Metalloenzym und umfasst eine Gruppe diverser gewebespezifischer Isoenzyme.

Ihr werden zahlreiche Aufgaben und Funktionen zugesprochen, unter anderem in der Embryonalentwicklung und Zelldifferenzierung, im Lipidtransport, in der Regulation des intestinalen und renalen Phosphattransports, im Transport von Immunglobulin G- (IgG)-Molekülen während der Schwangerschaft, in der Regulation von pankreatischen Chloridkanälen aber auch im Mineralisierungsprozess der Knochen. Dort scheint es den lokalen Gehalt von Phosphationen zu steigern und somit die Kalzifizierung zu initiieren [116].

Eine Studie an humanen VICs von Mathieu et al. wies einen Zusammenhang von ALP-Aktivität und Kalzifizierung nach [117]. Auch im Rahmen der Mineralisation bioprothetischer Klappen wurde ein erhöhter ALP-Gehalt nachgewiesen [118].

Detaillierte Informationen über die Wirkmechanismen, Regulation und Rolle im Kalzifizierungsprozess humaner Aortenklappen fehlen zum aktuellen Zeitpunkt jedoch.

1.3 Diabetes mellitus

Neben kardiovaskulären Erkrankungen nimmt auch die Stoffwechselerkrankung DM einen immer höheren Stellenwert gerade in der modernen Gesellschaft ein.

Schätzungen der *International Diabetes Federation* (IDF) zufolge litten im Jahr 2017 etwa 8,4 % der adulten Weltbevölkerung an einem DM, bis zum Jahre 2045 vermutet sie einen Anstieg auf knapp 10 %. Auch der Anteil von Patienten mit einer gestörten Glukosetoleranz, einem sog. Prädiabetes, wird schätzungsweise von 7,7 % im Jahr 2017 auf 8,4 % im Jahr 2045 steigen.

Wirft man einen Blick auf die globalen krankheitsbedingten Kosten, so nehmen diese in dem zuvor genannten Zeitraum voraussichtlich um 108 Milliarden US-Dollar zu [119]. Neben den dramatischen Folgen für die betroffenen Patienten bedeutet dies also auch eine immense Kostenbelastung für die Gesundheitssysteme.

Gekennzeichnet ist die Erkrankung durch eine Hyperglykämie, definiert über einen Nüchtern-Blutzucker ≥ 126 mg/dl, eine Plasmaglukose ≥ 200 mg/dl zwei Stunden (h) nach einem oralen Glukosetoleranztest [120] oder einen HbA1c-Wert $> 6,5$ % [121]. Diese wird entweder durch eine gestörte Insulinsekretion, eine Insulinresistenz oder eine Kombination aus beidem hervorgerufen. Diabetische Langzeitschäden sind vielfach Folge von Störungen der Mikrozirkulation und bedingen irreversible Endorganschäden unter anderem an Augen, Nieren und peripherem Nervensystem.

Unter Berücksichtigung pathogenetischer und klinischer Aspekte lassen sich in einem vereinfachten Klassifikationssystem vier Typen unterscheiden:

Der Typ 1-Diabetes (T1DM) entsteht durch eine, häufig immunmodulierte, Zerstörung der β -Zellen des Pankreas, was zu einem absoluten Insulinmangel führt. Er macht ca. 5-10 % der Diabetestypen aus und manifestiert sich kumuliert im juvenilen Alter. Eine idiopathische Genese ist eher selten.

Der Typ 2-Diabetes (T2DM) ist mit 90-95 % die häufigste vorkommende Form der Stoffwechselerkrankung, tritt vorwiegend in höherem Lebensalter auf und ist mit dem metabolischen Syndrom assoziiert. Vor allem übergewichtige Erwachsene oder jene mit erhöhtem abdominellem Fettgehalt erkranken an dieser Form, die durch eine Insulinresistenz bzw. einen relativen Insulinmangel gekennzeichnet ist.

Die dritte Gruppe umfasst eine Reihe von seltenen genetischen Defekten der β -Zell-Funktion, wie beispielsweise den MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*), aber

auch Erkrankungen des exokrinen Pankreas, endokrinologische Erkrankungen, medikamenteninduzierte Formen, Infektionskrankheiten oder verschiedene genetische Krankheiten, die mit der Entstehung eines Diabetes assoziiert sind.

Zu der vierten Gruppe zählt der Gestationsdiabetes, der sich in den meisten Fällen nach der Entbindung selbst limitiert, jedoch mit einem erhöhten Schwangerschaftsrisiko und gesteigerten Risiko für die Entwicklung eines T2DM übergeht [122].

1.4 Einfluss eines T2DM auf die Zusammensetzung der ECM im Rahmen der Aortenklappenkalzifizierung

In dieser Arbeit wurde der Fokus auf Patienten mit Aortenklappenstenose und komorbidem T2DM gelegt. Sowohl für den T2DM als höchstprävalenteste Diabetesform als auch für die kalzifizierende Aortenklappenstenose sind die gleichen Risikofaktoren vorbeschrieben [123], sodass sich ein gehäuftes Auftreten beider Erkrankungen vermuten lässt.

Zugleich gilt der T2DM selber als unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung kalzifizierender Aortenklappenstenosen [11]. Erwartungsgemäß zeigten Untersuchungen von Deutscher et al. eine Assoziation von DM und kalzifizierenden Aortenklappenstenosen [124]. Korrespondierend hiermit ging in einer Untersuchung von Lorusso et al. das Vorliegen eines DM mit einer schnelleren Degeneration von biologischen Herzklappenersätzen einher [125].

Die diese Assoziation erklärenden pathophysiologischen Prozesse sind bislang noch unzureichend verstanden. Ein beteiligter Faktor könnte eine DM-assoziierte erhöhte systemische Entzündungsaktivität sein. So weisen Diabetiker im Vergleich zu Nicht-Diabetikern eine signifikant höhere TLR-2 und TLR-4-Ausprägung auf ihren Immunzellen auf [126]. Studien liefern zudem Hinweise auf einen relevanten Einfluss des DM auf die Zusammensetzung der ECM. So sind für die Atherosklerose [127-129], die Adipositas [130, 131] und die Nephropathien [132-134] mit DM assoziierte Veränderungen der Expression von BGN und DCN beschrieben.

Chondroosteo gene Marker wie die ALP zeigten sich in einem Tiermodell in Leber und Darm hyperglykämischer Tiere deutlich erhöht [135, 136], ferner wurden erhöhte ALP-Spiegel als Risikofaktor für die Entstehung einer Leberfibrose bei Diabetikern vermutet [137].

Auch die Regulation von OPN scheint durch eine Hyperglykämie beeinflusst zu werden. Die pankreatische OPN-Expression bei T1DM-Patienten konnte

dosisabhängig durch Glukose verstärkt werden, eine dauerhafte Glukoseexposition führte jedoch wieder zu einer reduzierten OPN-Expression [138].

Interessanterweise scheinen die OPN-Plasmaspiegel bei T2DM-Patienten im Vergleich zu Nicht-Diabetikern in frühen, asymptomatischen Stadien der koronaren Atherosklerose erhöht zu sein [139].

Für GAGs, insbesondere für die HAS, stellt die Glukose einen der wichtigsten Bausteine dar. Untersuchungen von Roseman et al. an Streptokokken zeigten eine Korrelation von Glukosegehalt und HA-Synthese [140]. Gleiches konnte von anderen Arbeitsgruppen auch an einem T1DM-Rattenmodell [141] und letztendlich bei an T1DM erkrankten Patienten bestätigt werden [142].

Heickendorff et al. untersuchten die aortale *Tunica media* von Diabetikern und Nicht-Diabetikern und sahen in nicht atherosklerotisch betroffenen Gefäßwandabschnitten bei Diabetespatienten deutlich mehr HA. In pathologisch veränderten Bereichen war der HA-Gehalt sowohl bei Zuckerkranken als auch bei Gesunden deutlich geringer, was auf einen Einfluss des Diabetes auf den HA-Gehalt und damit auf die ECM von Gefäßwänden hinweist [143]. In einem Tiermodell demonstrierten McDonald et al. eine höhere HA-Akkumulation in den Koronararterien diabetischer hyperlipidämischer Tiere, die wiederum mit einer erhöhten Atherogenese vergesellschaftet war [127]. Mesangialzellen zeigten *in vitro* unter hyperglykämischen Bedingungen eine gesteigerte Produktion von HA mit hohem Molekulargewicht durch die HAS2, deren Expression im Gegensatz zu der HAS3-Expression, ebenfalls hochreguliert war. HA mit hohem Molekulargewicht wird eine anti-inflammatorische und anti-proliferative Wirkung zugeschrieben. HA mit mittlerem bis niedrigem Molekulargewicht hingegen, wie von der HAS3 synthetisiert, weist die dazu konträren Eigenschaften auf [144].

Welchen Einfluss ein DM auf die Expression der HAS1-3, die HA-Bildung und die Wirkungsweise der HA in humanen Aortenklappen besitzt, ist bislang nicht bekannt.

1.5 Ziele dieser Arbeit

HA, HAS1-3, PG und chondroosteogene Proteine wurden bereits in der Pathogenese der degenerativen Aortenklappenstenose beschrieben. Zahlreiche Aspekte zu diesen ECM-Bestandteilen sind jedoch noch unklar und sollen im Folgenden Gegenstand der Fragestellungen sein:

1. Gibt es Unterschiede in der Genexpression verschiedener Bestandteile der ECM humaner Aortenklappen in frühen (fibrotischen) und fortgeschrittenen (kalzifizierten) Stadien der Degeneration? Auf *messenger ribonucleic acid*-(mRNA)-Ebene wird hierzu die Expression von BGN, DCN, VER, LUM, OPN, ALPL und der HAS 1-3 untersucht.
2. Unterscheidet sich die o.g. Genexpression bei Diabetikern im Vergleich zu Nicht-Diabetikern?
3. Korrelieren die Ergebnisse der Untersuchungen für HAS1-3 mRNA-Expression mit dem quantitativen HA-Gehalt humaner Aortenklappen in den unterschiedlichen Krankheitsstadien? Hierzu wird der quantitative HA-Gehalt mittels *HA-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ermittelt.
4. Gibt es Unterschiede in den für die Polymerasekettenreaktion (PCR) und den HA-ELISA herangezogenen Patientenkollektiven von Diabetikern und Nicht-Diabetikern bezüglich Vorerkrankungen, Risikofaktoren oder sonstigen Merkmalen?
5. a) Gibt es *in vitro* in ovinen VICs unter Zugabe von kalzifizierendem Medium und gleichzeitiger Inhibition des HA-Rezeptors CD44 eine Änderung des Kalziumgehalts der Zellen?
b) Ändert sich *in vitro* in ovinen VICs die Genexpression von BGN und HAS 1-3 unter verschiedenen Glukosespiegeln im Zeitverlauf?
c) Lässt sich die mRNA-Expression von HAS 1-3 in Form eines korrelierenden HA-Gehalts mittels ELISA verifizieren?

Die hieraus resultierenden Ergebnisse könnten durch einen tieferen Einblick in das komplexe Zusammenspiel der ECM, ihre Regulationsmechanismen und ihre Beeinflussung durch hohe Glukosespiegel zu neuen Ansatzpunkten für Behandlungs- und Präventionsansätzen, insbesondere bei T2DM-Patienten, beitragen.

2 Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Technische Geräte und Software

Technische Geräte

Autoklav	Systec VX95
Destilliergerät	GFL, Art.-Bez.: Typ 2102, No. 10278501I
Gefriertrocknungsanlage	Martin Christ Alpha 2-4 LSC
Gefriertrocknungsvakuumpumpe	Vacuubrand Typ RC 6
Homogenisator	Art Labortechnik, Art-Miccra D-8, Art.-Nr. 10291
Inkubator	Thermo Scientific HERAcell 240
Kamera	Canon PowerShot SX20IS
Mikroskope	Leica DM IL LED und DM 2000
Mikroskop-Kamera	Leica DFC 425 C
Milli-Q®-Wassersystem	Millipore, Art.-Nr. ZMQS50F01
Milli-Q®-Wasserfilter 0,22µm	Millipore, Art.-Nr. F5NN09961
NanoDrop Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, NanoDrop 1000
PCR-Gerät	Applied Biosystems, 7300 RealTime PCR System
pH-Elektrode	WTW, SenTix21®
pH-Meter	WTW, inoLab®
Photometer	Eppendorf, BioPhotometer plus V.1.04 und Thermo Scientific, Multiskan FC
Plattformschüttler	Heidolph, Polymax 2040
Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific HERAsafe KS
<i>Thermocycler</i>	Peqlab Biotechnologie GmbH, advanced Primus 96
Thermomixer	Eppendorf, Modell 5436
Ultraschall-Homogenisator	Braun-Sonic 125
Vortexmischer	Heidolph, REAX top und Scientific Industries, Vortex Genie 2
Waagen	Sartorius, BP110S / 2001 MP2 / MC1 LC 2200 P
Wasserbad	GFL, Typ 1092, No. 10204201C

Zentrifugen

Eppendorf Centrifuge 5804R, 5424B und
5415R, Heraeus Labofuge 300, Hettich
Universal 16

Software

Datenverwaltung: Microsoft Office Excel 2003

Mikroskop: Leica Application Suite, Version 3.8.0

NanoDrop: ND-1000 V.3.7.0

PCR: Applied Biosystems 7300 System SDS Software Version 1.4.0.25

PCR: Applied Biosystems ABI PRISM™ PrimerExpress™ Version 2.2.0

Statistik: GraphPad Prism 6

2.1.2 Verbrauchsmaterial

6-Mikrovertiefung Platte

Starlab, Art.-Nr. CC7672-7506

96-Mikrovertiefung Platte

Greiner bio-one, Art.-Nr. 655201

Falcons 15 ml

Greiner bio-one, Art.-Nr. 188271

Falcons 50 ml

Sarstedt, Art.-Nr. 62.559.001

Gewebekulturflasche T-75

Greiner bio-one, Art.-Nr. 658175

Kosmetiktücher, 2-lagig

Tapira, Art.-Nr. 07730012

Kryoröhrchen

VWR, Art.-Nr. 479-1262

Küvetten

Carl Roth, Art.-Nr. 759210

Mikrozentrifugationsgefäße 1,5 ml

Kisker Biotech, Art.-Nr. G052BP

Parafilm

Sigma, Art.-Nr. P7793-1EA

PCR SoftTubes 0,2 ml

Biozym Scientific, Art.-Nr. 711087

Pipettenspitzen

Starlab, Art.-Nr. S1110-3800, S1111-
6800, S1111-1800, S1120-3810, S1123-
1840, S1120-8810, S1126-7810

Pipettenspitzen Stripette® Zellkultur

Corning Inc., Art.-Nr. 4487, 4488, 4489

Plastikbeutel

Carl Roth, Art.-Nr. E706.1

QIAShredder

Qiagen, Art.-Nr. 1011711

Reaktionsgefäße 2 ml

Biozym Scientific, Art.-Nr. 710320

Stericup & Steritop

Millipore, Art.-Nr. SCGPU05RE

Zellschaber 16 cm

Sarstedt Inc., Art.-Nr.: 83.1832

2.1.3 Gewinnung von RNA, Herstellung von *complementary* Desoxyribonukleinsäure (cDNA) und PCR

Chemikalien

2-Mercaptoethanol, ≥98 % (β-ME)	Sigma, Art.-Nr. M7154-100ML
2-Propanol ≥99% (Isopropanol)	Sigma, Art.-Nr. I9516-500ML
Aqua destillata (Aqua dest.)	
Chloroform, min. 99 %	Sigma, Art.-Nr. C2432-500ML
Ethanol absolute CHROMASOLV®	Sigma, Art.-Nr. 34.852
Platinum®SYBR®Green	Invitrogen, Art.-Nr. 11733-046
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen, Art.-Nr. 205313
- gDNA Wipeout Buffer, 7x - OmniScript™ RT (4 units/μl) - <i>Primer</i> Mix - Quantiscript® RT Buffer, 5x - RNase-free Water	
RNase Away	Thermo Scientific, Art.-Nr. 7003
RNase-free DNase Set	Qiagen, Art.-Nr. 79254
- RNase-free DNase - RNase-free Buffer RDD - RNase-free Water	
RNase-freies Wasser	Merck, Art.-Nr. 1.15333.2500
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Art.-Nr. 74106
- RLT Lysis Buffer - RPE Wash Buffer - RW1 Wash Buffer - RNase-free Water - RNeasy Mini Spin Column - Collection tubes 1,5 ml und 2 ml	
Stickstoff, flüssig	Zentralapotheke Uniklinik Düsseldorf
Trizol Reagent	Invitrogen, Art.-Nr. 15596026

Ethanol 70 %

70 ml Ethanol absolute CHROMASOLV® ad
30 ml RNase-freies Wasser

Ethanol 75 %

75 ml Ethanol absolute CHROMASOLV® ad

25 ml RNase-freies Wasser

Humane Primer

Gen	Forward Sequence (5'-3')	Reverse Sequence (3'-5')
18S	GCAATTATTCCCCATGAACG	GGCCTCACTAAACCATCCAA
HAS1	TACAACCAGAAGTTCCTGGG	CTGGAGGTGTACTTGGTAGC
HAS2	GTGGATTATGTACAGGTTTGTGA	TCCAACCATGGGATCTTCTT
HAS3	GAGATGTCCAGATCCTCAACAA	CCCACTAATACACTGCACAC
BGN	GGACTCTGTACACCCACCT	CTCTTTGGGCACAGACTTCA
DCN	TCTTCCCCCTGACACAACTC	TGCTCCAGGACTAACTTTGCT
LUM	CTTCAATCAGATAGCCAGACTGC	AGCCAGTTCGTTGTGAGATAAAC
VER	AGACTGTCAGATATCCCATCC	AATCCATAAGTCCTGACTCCT
ALPL	CTACCTGTGTGGGGTGAAGG	GGTCACAATGCCACAGATT
SPP1	TTGCAGTGATTTGCTTTTGC	GCCACAGCATCTGGGTATTT

Tabelle 1: Humane Primer. 18S = strukturelle RNA eukaryotischer Ribosomen, HAS1 = Hyaluronsäuresynthase 1, HAS2 = Hyaluronsäuresynthase 2, HAS3 = Hyaluronsäuresynthase 3, BGN = Biglykan, DCN = Decorin, LUM = Lumican, VER = Versican, ALPL = Gen der alkalischen Phosphatase, SPP1 = Gen des Osteopontins, *Forward Sequence* = Vorwärtssequenz, *Reverse Sequence* = Rückwärtssequenz

2.1.4 HA-ELISA

Chemikalien

Aqua dest.

Calciumchlorid dihydrat

Merck, Art.-Nr. 1.02382.1000

Ethanol absolute

Merck, Art.-Nr. 107017

HA-Quantitative Test Kit (HA-ELISA)

Corgenix, Art.-Nr. 029-001

- 12 Mikrotiterstreifen zu je 8 Vertiefungen (beschichtet mit stabilisiertem HSBP)
- Reaktionspuffer (57 ml)
- 50 ng/ml Standard (0,5 ml)
- 100 ng/ml Standard (0,5 ml)
- 200 ng/ml Standard (0,5 ml)
- 500 ng/ml Standard (0,5 ml)
- 800 ng/ml Standard (0,5 ml)

- Meerrettich-Peroxidase-(MP-)konjugierte
Hyaluronsäure-bindendes Protein (HSBP)-Lösung (13 ml)
- Einkomponenten-Substratlösung (13 ml)
- Stopplösung (15 ml)
- *phosphate buffered saline* (PBS)-Waschkonzentrat (30 ml)
für 1 L 0,01 M PBS-Lösung (pH 7,35 ± 0,1)
- HS Hoher Kontrollwert (0,5 ml)
- HS Mittlerer Kontrollwert (0,5 ml)
- HS Niedriger Kontrollwert (0,5 ml)

Pronase

Sigma, Art.-Nr. P9611-1G

Tris-HCl

VWR, Art.-Nr. 9090.03

Pronase-Puffer

100 mM Tris HCl

1 mM CaCl₂

in Aqua dest. auf pH 8 einstellen

mit 6 mg/ml Pronase versetzen

Ethanol 90 %

90 ml Ethanol absolute ad 10 ml Aqua dest.

2.1.5 Zellkultur oviner VICs

Chemikalien

β-Glycerophosphat	Sigma, Art.-Nr. G9422
β-ME, ≥98 %	Sigma, Art.-Nr. M7154-100ML
Amphotericin B AmBisone	Zentralapotheke Uniklinik Düsseldorf
Aqua dest./bidest.	
Bicinchoninic Acid Solution	Sigma, Art.-Nr. B9643-1L
Bio-Rad Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad, Art.-Nr. 500-0006
Bovines Serum Albumin (BSA)-Standard	Invitrogen, Art.-Nr. 55213
Calciumchlorid	Carl Roth, Art.-Nr. CN93.1
Deoxycholic Acid Sodium Salt	Amresco, Art.-Nr. 0613-100G
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Sigma, Art.-Nr. D-5879
Ethanol absolute CHROMASOLV®	Sigma, Art.-Nr. 34.852
FCS	Sigma, Art.-Nr. F7524
Gelatine	Sigma, Art.-Nr. G9391-100G
Glutamin 200 mM	gibco by LifeTechnologies, Art.-Nr. 25030-024

HA-ELISA Kit

Corgenix, Art.-Nr. 029-001

- 12 Mikrotiterstreifen zu je 8 Vertiefungen (beschichtet mit stabilisiertem HSBP)
- Reaktionspuffer (57 ml)
- 50 ng/ml Standard (0,5 ml)
- 100 ng/ml Standard (0,5 ml)
- 200 ng/ml Standard (0,5 ml)
- 500 ng/ml Standard (0,5 ml)
- 800 ng/ml Standard (0,5 ml)
- MP-konjugierte HSBP-Lösung (13 ml)
- Einkomponenten-Substratlösung (13 ml)
- Stopplösung (15 ml)
- PBS-Waschkonzentrat (30 ml) für 1 L 0,01 M PBS-Lösung (pH 7,35 ± 0,1)
- HS Hoher Kontrollwert (0,5 ml)

- HS Mittlerer Kontrollwert (0,5 ml)	
- HS Niedriger Kontrollwert (0,5 ml)	
Igepal C630	Sigma, Art.-Nr. I7771-25ML
Incidur® Spray	Ecolab, Art.-Nr. 3186407
Kalziumassay-Kit	Cayman, Art.-Nr. CAY700550-192
- Tris HCl Buffer (5 ml, auf 45 ml RNase-freies Wasser)	
- Calcium Standard (2 ml)	
- Calcium Detector R1 (15 ml)	
- Calcium Detector R2 (15 ml)	
Kontrollpeptid	GeneCust, 12-mer SATPASAPYPLA
Kupfersulfatlösung	Sigma, Art.-Nr. C2284-25ML
Medium <i>low glucose</i> (1g Glukose / l)	gibco by LifeTechnologies, Art.-Nr.
DMEM (1x) GlutaMAX™-I	21885-025
Medium <i>high glucose</i> (4,5 g Glukose / l)	Sigma, Art.-Nr. D6546
<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>	
Natriumchlorid	Merck, Art.-Nr. 1.06404.1000
nicht-essentielle Aminosäuren	Sigma, Art.-Nr. M7145
PBS	gibco by LifeTechnologies, Art.-Nr.
	14190-94
Penicillin / Streptomycin	gibco by LifeTechnologies, Art.-Nr.
	15140-122
Pep 1	GeneCust, 12-mer GAHWQFNALTVR
<i>Platinum®SYBR®Green</i>	Invitrogen, Art.-Nr. 11733-046
<i>QuantiTect® Reverse Transcription Kit</i>	Qiagen, Art.-Nr. 205313
- <i>gDNA Wipeout Buffer, 7x</i>	
- OmniScript™ RT (4 units/µl)	
- <i>Primer Mix</i>	
- Quantiscript® RT Buffer, 5x	
- <i>RNase-free Water</i>	
RNase-freies Wasser	Merck, Art.-Nr. 1.15333.2500
<i>RNeasy® Mini Kit</i>	Qiagen, Art.-Nr. 74106
- <i>RLT Lysis Buffer</i>	
- <i>RPE Wash Buffer</i>	
- <i>RW1 Wash Buffer</i>	
- <i>RNase-free Water</i>	
- <i>RNeasy Mini Spin Column</i>	
- <i>Collection tubes 1,5 ml und 2 ml</i>	

<i>Sodium dodecyl sulfate (SDS) Pellets</i>	Carl Roth, Art.-Nr. CN30.4
TGF- β	R&D Systems, Art.-Nr. 240-B-002/CF
Trizma <i>base</i>	Sigma, Art.-Nr. T1503-1KG
Trypsin-EDTA 0,25 %	gibco by LifeTechnologies, Art.-Nr. 25200-056

1 % Gelatinelösung

5 g Gelatine ad 500 ml PBS, anschließend autoklaviert

β -Glycerophosphat-(β -GP-)Medium

- Grundmedium
- β -GP (10 mM)

Einfriermedium

bestehend aus 20 % DMSO in FCS

Grundmedium

- *Dulbecco's modified eagle medium* von Sigma (bestehend aus 4,5 g Glukose/l, 110 mg Natriumpyruvat / l, Pyridoxin-HCl, NaHCO_3)
- 1 % FCS
- 1 % Glutamin
- 1 % Penicillin/Streptomycin
- 1 % Amphotericin B
- 1 % nicht-essentielle Aminosäuren

anschließend mit Stericup® & Steritop™ –System filtriert, Lagerung bei 4 °C

Hyperglykämisches Medium

siehe Zusammensetzung des Grundmediums

Normoglykämisches Medium

- DMEM (1x) + GlutaMAX™-I Medium von gibco (bestehend aus 1g Glukose / l, Pyruvat)
- 1 % FCS
- 1 % Glutamin
- 1 % Penicillin/Streptomycin
- 1 % Amphotericin B
- 1 % nicht-essentielle Aminosäuren

anschließend mit Stericup® & Steritop™ –System filtriert, Lagerung bei 4 °C

Ovine Primer

Gen	Forward Sequence (5'-3')	Reverse Sequence (3'-5')
18S	GCAATTATTCCCCATGAACG	GGCCTCACTAAACCATCCAA
HAS1	GTCATGTACACGGCCTTCAA	GGTCCAGCCTCGTATCTGAGT
HAS2	TCACCCAGTTGGTCTTGTCC	GGTCAAGCATGGTGTCTGAA
HAS3	TGGAGGAGGACCCTCAAGTA	CCAAAGTAGGACTGGCAAGC
BGN	TCTGCTCCGCTACTCCAAGT	TTGTTGTCCAAGTGCAGCTC
DCN	ATGCAGCTAGCCTGAAAGGA	GAGGAGTGTTGGCCAAAGAG
LUM	TGTTGGAGCTGGATCTCTCC	TAGGATAGGGGTCCCAGGAT
VER	CTTGGGGTGAGAACCCTGTA	TCGATGGTTGTAGCCTCTGA
ALPL	GACATCGCCTACCAGCTCAT	CACATCGGTTCTGTTCTTGG
SPP1	AATACCCAGATGCTGTAGCCA	TAGATCGTCTGTTTGCTCAGG

Tabelle 2: Ovine Primer. 18S = strukturelle RNA eukaryotischer Ribosomen, HAS1 = Hyaluronsäuresynthase 1, HAS2 = Hyaluronsäuresynthase 2, HAS3 = Hyaluronsäuresynthase 3, BGN = Biglykan, DCN = Decorin, LUM = Lumican, VER = Versican, ALPL = Gen der alkalischen Phosphatase, SPP1 = Gen des Osteopontins, *Forward Sequence* = Vorwärtssequenz, *Reverse Sequence* = Rückwärtssequenz

RIPA-Puffer

- 10 x TBS (5 ml), bestehend aus
 - o Trizma® base (12,11 g)
 - o Natriumchlorid (87,66 g)ad 1000 ml Aqua bidestillata (Aqua bidest.), pH auf 7,6 einstellen
- Igepal (0,5 g)
- Deoxycholic Acid Sodium Salt (0,25 g)
- 10 % SDS-Lösung (0,5 g), bestehend aus
 - o SDS-Pellets (10 g)ad 100 ml Aqua bidest.

alle Chemikalien ad 50 ml Aqua bidest.

TGF-β-Medium

- Grundmedium
- TGF-β (5 ng/ml Grundmedium)
- Calciumchlorid (1,5 mM)
- β-GP (10 mM)

2.1.6 Herstellerverzeichnis

Hersteller

Amresco Inc.
Andreas Hettich GmbH & Co.KG
Applied Biosystems
Art Prozess- und Labortechnik
Bio-Rad Laboratories
Biozym Scientific GmbH
B. Braun
Canon
Carl Roth GmbH
Cayman Chemical
Corgenix Medical Corporation
Corning Inc.
Ecolab
Eppendorf
GeneCust
GFL Ges. f. Labortechnik
GraphPad Software
Greiner bio-one
Heidolph Instruments
Heraeus
Invitrogen
Kisker Biotech GmbH & Co.KG
Leica Camera
LifeTechnologies
Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen
Merck KGaA
Microsoft
Millipore
Peqlab
Qiagen
R&D Systems Inc.
Sarstedt AG & Co.
Sartorius
Scientific Industries Inc.
Sigma-Aldrich
Starlab

Hauptsitz

Solon, Ohio, USA
Tuttlingen, Deutschland
Foster City, Kalifornien, USA
Müllheim, Deutschland
Hercules, Kalifornien, USA
Hessisch Oldendorf, Deutschland
Melsungen, Deutschland
Tokio, Japan
Karlsruhe, Deutschland
Ann Arbor, Michigan, USA
Broomfield, Colorado, USA
Corning, New York, USA
Saint Paul, Minnesota, USA
Hamburg, Deutschland
Ellange, Luxemburg
Burgwedel, Deutschland
La Jolla, Kalifornien, USA
Kremsmünster, Österreich
Schwabach, Deutschland
Hanau, Deutschland
Carlsbad, Kalifornien, USA
Steinfurt, Deutschland
Wetzlar, Deutschland
Carlsbad, Kalifornien, USA
Osterode am Harz, Deutschland
Darmstadt, Deutschland
Redmond, Washington, USA
Billerica, Massachusetts, USA
Erlangen, Deutschland
Hilden, Deutschland
Minneapolis, Minnesota, USA
Nümbrecht, Deutschland
Göttingen, Deutschland
Bohemia, New York, USA
St. Louis, Missouri, USA
Hamburg, Deutschland

Systec	Linden, Deutschland
Tapira	Friedewald, Deutschland
Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Vacuubrand GmbH & Co.KG	Wertheim, Deutschland
VWR International	Radnor, Pennsylvania, USA
WTW	Weilheim, Deutschland

2.2 Methodik

Die verwendeten Materialien mitsamt ihren Artikelbezeichnungen und Herstellerfirmen sind in Kapitel 2.1 zu finden, ebenso technische Geräte sowie Verbrauchsmaterialien.

2.2.1 Ethikvotum

Für die vorliegende Arbeit an humanen Aortenklappen liegt ein Ethikvotum der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit der Studiennummer 3428 vom 24.08.2010 sowie ein Ethikvotum mit der Studiennummer 4412R vom 12.12.2013 vor.

2.2.2 Patientenklientel und Ausschlusskriterien

Alle Spender einer humanen Aortenklappe erhielten in der Klinik für Herzchirurgie der Universität Düsseldorf, Direktor Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg, einen Aortenklappenersatz bzw. eine Herztransplantation.

Die Auswahl der Patienten erfolgte unabhängig des Alters und des Geschlechts. Nur Patienten mit trikuspiden Aortenklappen wurden eingeschlossen.

Als Ausschlusskriterien wurde das Vorliegen folgender Komorbiditäten definiert:

- T1DM
- erworbene humane Immundefizienz (HIV)
- virale und Autoimmun-Hepatitis
- Endokarditiden
- chronische Niereninsuffizienz, definiert über einen Kreatinwert > 1,2 mg/dl bei Männern und > 0,9 mg/dl bei Frauen

2.2.3 Einwilligung, präoperative Blutentnahme, Anamnese und Aortenklappengewinnung

Die an der Studie teilnehmenden Patienten wurden rechtzeitig und schriftlich und mündlich über das geplante Vorhaben aufgeklärt. Darüber hinaus gaben sie die schriftliche Zustimmung zu einer präoperativen Blutentnahme.

Präoperative Blutentnahme

Sofern die Zustimmung vorlag, wurden die Patienten einer präoperativen Blutentnahme unterzogen. Diese erfolgte nüchtern unmittelbar vor dem Eingriff in der Anästhesie-Einleitung. Ermittelt worden sind Werte des Gesamtcholesterins, *high density lipoprotein* (HDL), LDL, die Triglyzeride sowie das Kreatinin.

Anamnese

Zu jedem Patienten entnahmen wir aus der digitalen Patientenakte Informationen zu Medikamenten und Vorerkrankungen. Besonders Arzneistoffe mit Auswirkungen auf die Hämostase wurden erfasst. Insbesondere wurde die Anwendung von Thrombozytenaggregationshemmern (Acetylsalicylsäure (ASS), Clopidogrel, Prasugrel, Ticagrelor etc.) sowie Hemmstoffe der plasmatischen Gerinnung (Phenprocoumon, direkte Faktor Xa-Inhibitoren wie Rivaroxaban, Apixaban etc.) dokumentiert. Auch die Einnahme von Statinen wurde nachgehalten.

Von besonderem Interesse für die statistische Auswertung war, bezogen auf Vorerkrankungen und Risikofaktoren, die Ausprägung

- eines T2DM sowie einer eventuellen Insulinpflichtigkeit,
- einer Dyslipoproteinämie,
- einer arteriellen Hypertonie,
- einer KHK,
- extrakardialen Gefäßerkrankungen (pAVK und cAVK) und
- einer positiven Nikotinanamnese.

Außerdem wurden zu jedem Patienten allgemeine Daten wie Alter zum Zeitpunkt der OP, die Größe, das Körpergewicht, der BMI, die Körperoberfläche (KOF) und das Geschlecht erhoben.

Ebenso wurden, sofern vorliegend, Daten aus präoperativen Echokardiographiebefunden zusammengetragen. Zu den für die Arbeit relevanten Daten gehörten die KÖF der Aortenklappe (cm²), die Ejektionsfraktion (EF) (%) sowie der dp_{max} (mmHg).

Festgehalten wurde auch die primäre OP-Indikation, bei der nach Aortenklappenstenose, Aortenklappeninsuffizienz und terminaler Herzinsuffizienz mit Herztransplantation differenziert wurde.

Aortenklappengewinnung und -konservierung

Die Gewinnung der Aortenklappen fand in der kardiochirurgischen Abteilung der Uniklinik Düsseldorf statt. Hierzu wurde ein geschulter Mitarbeiter des Forschungslabors zum entsprechenden intraoperativen Zeitpunkt durch das OP-Personal informiert.

Die während der OP angefallenen Proben wurden umgehend in flüssigem Stickstoff (N_2) konserviert, um der Degeneration des Gewebes vorzubeugen.

Vor der Kryokonservierung erfolgte die fotografische Dokumentation und makroskopische Beurteilung des Fibrosierungs- bzw. Kalzifizierungsgrades. Jeder Tasche einer Klappe wurde entsprechend der Ausprägung von Fibrose/Kalzifikation eine Rangzahl zugeteilt. Die Zahl „1“ wurde für die am geringsten, die Zahl „3“ für die am stärksten degenerativ veränderte Tasche einer jeweiligen Aortenklappe vergeben (s. Abb. 1). Schließlich erfolgte das Einfrieren der Klappentaschen in je einem Kryoröhrchen in flüssigem N_2 bei -196°C .

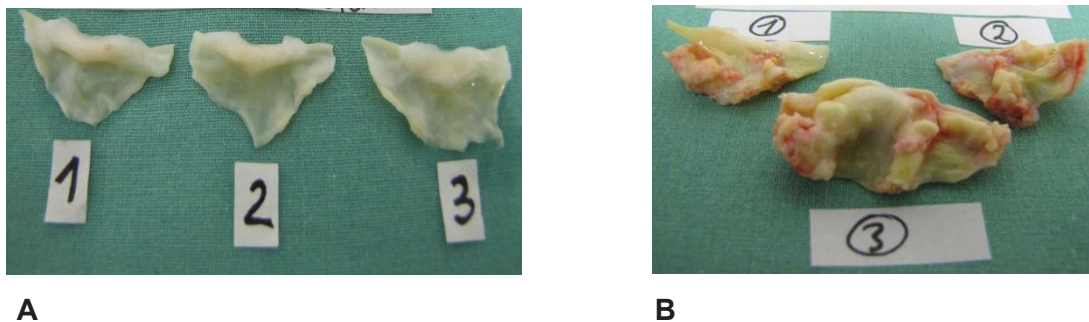


Abb. 1: Humane Aortenklappen. A = drei fibrotische Aortenklappentaschen, B = drei kalzifizierte Aortenklappentaschen in aufsteigender Reihenfolge nummeriert

2.2.4 Datenbank

Die Datenbankverwaltung erfolgte mit dem Programm Excel, Version 2003, Microsoft. Die Patienten wurden durch die Zuordnung zu einer Zahl pseudonymisiert. Daten wie Alter, Gewicht, Echokardiographiewerte etc. wurden in Form von absoluten Werten vermerkt.

Bei den Vorerkrankungen wurde unterschieden zwischen Vorhandensein und Nicht-Vorhandensein, ebenso bezüglich der Raucheranamnese und der Einnahme der in Kapitel 2.2.3 genannten Medikamente.

Bei Diabetikern wurde zwischen einem nicht-insulinpflichtigem und insulinpflichtigen T2DM unterschieden.

Für die Einteilung des Schweregrads der Aortenklappenstenose wurden die Kriterien der europäischen Gesellschaft für Kardiologie leicht modifiziert [145]. Diese sind Tabelle 3 zu entnehmen:

Grad	KÖF (cm ²)	V _{max} (m/s)	dp _{max} (mmHg)
I (gering)	> 1	< 3	< 30
II (mäßig)	0,8 – 1	3 – 4	30 – 50
III (schwer)	< 0,8	> 4	> 50

Tabelle 3: Einteilung der Schweregrade der Aortenklappenstenose. KÖF = Klappenöffnungsfläche, V_{max} = maximale Geschwindigkeit über der Aortenklappe in Metern pro Sekunde, dp_{max} = maximaler Druckgradient über der Aortenklappe in Millimetern Quecksilbersäule

In einem zweiten Schritt erfolgte die Indizierung der Werte, das bedeutet für V_{max(i)} = V_{max}/EF und für die KÖF_(i) = KÖF/KOF. Für die KOF wurde der Mittelwert aller in der Datenbank ermittelten KOF verwendet, der bei 1,9 m² lag.

Aus der Berechnung dieser Werte ergab sich ein neuer Score, der Tabelle 4 zu entnehmen ist und die Grundlage der Zuordnung der Patienten zu einem der drei Schweregrade der Aortenklappenstenose darstellte. Der am stärksten pathologisch veränderte Wert legte den Grad der Stenose fest.

Grad _(i)	KÖF _(i) (cm ²)	V _{max(i)} (m/s)	dp _{max} (mmHg)
I (gering)	> 0,53	< 4,6	< 30
II (mäßig)	0,42 – 0,53	4,6 – 6,2	30 – 50
III (schwer)	< 0,42	> 6,2	> 50

Tabelle 4: Einteilung der indizierten Schweregrade der Aortenklappenstenose. KÖF_(i) = indizierte Klappenöffnungsfläche, V_{max(i)} = indizierte maximale Geschwindigkeit über der Aortenklappe in Metern pro Sekunde, dp_{max} = maximaler Druckgradient über der Aortenklappe in Millimetern Quecksilbersäule

Die Graduierung der linksventrikulären Pumpfunktionseinschränkung wurde anhand der echokardiographisch ermittelten linksventrikulären EF (LVEF) vorgenommen. Eine LVEF von 30-50 % wurde als leicht- bis mittelgradig, eine LVEF < 30 % als schwergradig eingestuft, angelehnt an die *Recommendations for Cardiac Chamber Quantification* der American Society of Echocardiography (ASE) [146].

Die Referenzbereiche der Blutwerte sind in Tabelle 5 einzusehen und wurden durch das Zentrallabor der Uniklinik Düsseldorf vorgegeben.

Laborwert	Einheit	Referenzbereich ♂	Referenzbereich ♀
Kreatinin	mg/dl	< 1,2	< 0,9
Gesamtcholesterin	mg/dl	< 200	
HDL	mg/dl	> 35	
LDL	mg/dl	< 160	
Triglyzeride	mg/dl	< 150	

Tabelle 5: Referenzbereiche von Laborwerten des Zentrallabors des Uniklinikums Düsseldorf. mg = Milligramm, dl = Deziliter, HDL = *high density lipoprotein*, LDL = *low density lipoprotein*

2.2.5 Einteilung der Gruppen

Anhand der Klappentaschenmorphologie (s. Kapitel 2.2.3) wurde zwischen Patienten mit fibrotischen Veränderungen (n=65) und Kalzifikationen (n=72) unterschieden. Innerhalb dieser beiden Gruppen wurde das Patientenkollekt auf das Vorliegen der Diagnose T2DM überprüft und so je nach Vorhandensein weiter unterteilt. Es resultierten vier Gruppen (s. Tabelle 6), die mittels Genexpressionsanalyse und quantitativer HA-Analyse weiter untersucht wurden. Die bei beiden Untersuchungsverfahren variierenden Gruppengrößen sind der Tatsache geschuldet, dass nicht von jedem Patienten eine jeweils geeignete Tasche für beide Verfahren zur Verfügung stand.

Gruppe	PCR	HA-ELISA
fibrotisch ohne T2DM	n=38	n=26
fibrotisch mit T2DM	n=27	n=15
kalzifiziert ohne T2DM	n=39	n=30
kalzifiziert mit T2DM	n=33	n=23

Tabelle 6: Anzahl der jeweils untersuchten Patiententaschen in der PCR und dem HA-ELISA. T2DM = Typ 2-Diabetes, n = Anzahl

2.2.6 RNA-Isolation aus humanen Aortenklappen

Zur Quantifizierung der Genexpression von BGN, DCN, LUM, VER, SPP1, ALPL und der HAS1-3 in den vorangehend benannten Gruppen musste zunächst die RNA aus den Aortenklappentaschen isoliert werden.

Vorbereitung

In einem ersten Schritt wurden die gefrorenen Aortenklappentaschen gewogen und anschließend unverzüglich wieder in flüssigem N₂ verbracht.

Vor dem Starten des Protokolls wurde das Messer des Homogenisators mit 70 % EtOH, dann eine Minute (min) mit RNase AWAY und im Anschluss daran zwei Mal (x) mit RNase-freiem Wasser gewaschen. Der Mörser, die Pinzette und der Spatel wurden ebenfalls mit RNase-freiem Wasser gereinigt.

Pro Probe wurde ein 15 ml fassendes *Falcon* mit jeweils 1 ml TRIzol bereitgestellt.

Homogenisierung der Proben

Um ein Auftauen der Proben zu verhindern, wurde der Mörser in flüssigem N₂ gekühlt. Im Anschluss wurde das tiefgefrorene Gewebe vorsichtig mit einer Pinzette in den Mörser überführt und mit einem Hammer zerkleinert. Mit einem ebenfalls in flüssigem N₂ gekühlten Spatel wurden die Gewebeteile in die zuvor bereitgestellten TRIzol-*Falcons* gegeben.

Das Gemisch wurde mit dem Homogenisator so lange zerkleinert, bis keine makroskopisch zu erkennenden Gewebestruktur mehr sichtbar war. Danach ruhte der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur (RT).

Anschließend wurde der Homogenisator mit einem Papiertuch von größeren Resten befreit und den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Waschschritten unterzogen.

Phasentrennung

Nach 5 min Einwirkzeit bei RT wurde das Gewebe-TRIzol-Gemisch in ein 1 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach der Zugabe von 0,2 ml Chloroform wurde die Probe so lange kräftig geschüttelt, bis keine Phase mehr zu erkennen war. Dieser Ansatz wurde im Anschluss daran 15 min bei 6°C und 11.000 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert.

Durch die Zentrifugation kam es zur Phasenbildung. Die wässrige obere Phase wurde vorsichtig mit der Pipette entnommen und in ein frisches Röhrchen gegeben. Die das TRIzol mit den darin befindlichen Proteinen enthaltende untere Phase wurde bei - 80°C eingefroren.

Präzipitieren der RNA

Die RNA enthaltende wässrige Phase wurde mit 0,5 ml Isopropanol versetzt. Nach starkem Schütteln und 10 min Ruhezeit bei RT wurde die Lösung erneut für 10 min bei 6°C mit 11.000 rpm zentrifugiert. Der durch den Vorgang entstandene Überstand wurde verworfen und Flüssigkeitsreste vom Rand mittels Pipette entfernt.

Das Pellet, das sich am Boden gebildet hatte, wurde mit 1 ml 75 % EtOH gewaschen. Auf- und Abpipettieren des EtOHs sorgte für eine ausreichende Umspülung von allen Seiten.

Im Anschluss daran erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt von 5 min bei 6°C und 8600 rpm. Der Überstand wurde erneut abgegossen, Flüssigkeitsreste vom Rand entfernt und das Pellet für ca. 2-3 min an der Luft angetrocknet. Es folgte das Lösen des angetrockneten Pellets in 100 µl RNase-freiem Wasser.

RNeasy®Mini-Kit von QIAGEN

Für die folgenden Schritte wurde das RNeasy® Mini-Kit mit den entsprechenden in ihm enthaltenen Reagenzien der Firma Qiagen verwendet. Das dazugehörige Protokoll „RNA-Cleanup“ wurde bei RT durchgeführt. Zur zusätzlichen Aufreinigung kam das RNase-free DNase Kit zum Einsatz.

Zunächst wurde vorbereitend je nach Probenmenge 1 ml RLT-Puffer mit 10 µl β-ME versetzt.

350 µl dieser Lösung wurden zur RNA-Lösung gegeben und mit einem Vortexmischer gründlich durchgemischt. Darauffolgend wurden 250 µl 100 % EtOH zugegeben und die Probe durch Auf- und Abpipettieren erneut gut gemischt.

Diese Lösung wurde dann auf die im Kit enthaltene Säule pipettiert und 15 Sekunden (sec) bei 22°C und 15.000 relativer Zentrifugalkraft (rcf) zentrifugiert. Der entstandene Durchfluss wurde verworfen.

Im nächsten Arbeitsschritt wurden nach Auftauen des RDD-Puffers pro Probe 70 µl RDD-Puffer mit 10 µl DNase aus dem RNase-free DNase-Set versetzt. Zum Vermengen wurde das Röhrchen zum Schutz der Enzyme unter großer Vorsicht invertiert. Dieser Ansatz wurde umgehend auf Eis gelagert.

Auf die Säule wurden als nächstes 350 µl RW1-Puffer pipettiert, es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 15 sec bei 22°C und 15.000 rcf. Der Durchfluss wurde verworfen.

Darauffolgend wurde jede Probe mit 80 µl des DNase-RDD-Mixes versehen. Dieser wurde vorsichtig auf die Membran pipettiert, ohne diese mit der Pipettenspitze zu berühren. Es schloss sich eine Inkubationszeit von 15 min bei RT an.

Im Anschluss daran wurde der vorletzte Schritt wiederholt: Pipettieren von 350 µl RW1-Puffer auf die Säule und anschließende Zentrifugation für 15 sec bei 22°C und 15.000 rcf. Der Durchfluss wurde verworfen.

Auf die Säule wurden nun 500 µl RPE-Puffer pipettiert. Dieser musste vor der ersten Benutzung, wie im Handbuch des Kits beschrieben, mit EtOH versetzt werden. Es folgte eine Zentrifugation für 2 min bei RT und 15.000 rcf, der Durchfluss wurde verworfen.

Nach einer gründlichen Benetzung der Arbeitshandschuhe mit RNase-AWAY wurden die Säulen vorsichtig in frische Auffangröhrchen überführt. Diese wurden 1 min bei RT und 15.000 rcf zentrifugiert, um EtOH-Reste zu entfernen und eine Interferenz während der PCR zu verhindern.

Nach dem Entfernen des restlichen EtOHs wurden die Säulen in RNase-freie Röhrchen gegeben und 50 µl RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert.

Um die gewonnene Ribonukleinsäure (RNA) in das RNase-freie Gefäß zu überführen, folgte ein letzter Zentrifugationsschritt bei RT und 15.000 rcf für 1 min.

Die extrahierte RNA wurde sofort auf Trockeneis gelagert und bei - 80°C eingefroren. Die benutzte Säule wurde entsorgt.

Messung der RNA-Konzentration

Zur Messung der in den Proben enthaltenen RNA wurde das Gerät NanoDrop mit der entsprechenden Software ND-1000V3 benutzt.

Die Kalibrierung erfolgte mit 2 µl Wasser. Unter Auswählen von „RNA-40“ innerhalb des Programms schloss sich die Leerwert-Messung mit ebenfalls 2 µl Wasser an. Der ermittelte Leerwert wurde von dem Programm automatisch von den Messwerten der Proben abgezogen.

Die nach Entnahme aus der Kühlung auf Trockeneis gelagerten Proben wurden einzeln bei RT aufgetaut. Nachdem 2 µl der Probe entnommen und auf die Messstelle pipettiert wurden, kam das Röhrchen unverzüglich zurück auf das Trockeneis, um eine Degeneration der RNA zu verhindern.

Nach jeder Messung wurde die Messplatte mit einem Papiertuch sorgfältig gereinigt.

Die weitere Verarbeitung der Rohdaten und die Umrechnung der Messwerte in Konzentrationen der Einheit ng/µl erfolgte mit dem Programm Excel, Version 2003, Microsoft.

2.2.7 Herstellung von cDNA

Im Hinblick auf die Durchführung einer *real time*-(RT)-PCR musste die gewonnene RNA (s. Kapitel 2.2.6) in cDNA umgeschrieben werden.

Dazu wurde das *QuantiTect® Reverse Transcription* Kit der Firma Qiagen verwendet. Die im Folgenden hier beschriebenen Chemikalien sind Bestandteile des Kits.

Um ein Gesamtvolumen von 12 µl zu erhalten, wurde die in Kapitel 2.2.6 errechnete Menge Probe mit der entsprechenden Menge RNase-freiem Wasser versetzt. Dazu wurden die Proben vorsichtig bei RT aufgetaut und nach Abpipettieren der benötigten Menge umgehend wieder bei - 80°C eingefroren.

Es folgte die Herstellung eines „*Mastermixes*“ aus folgenden Bestandteilen:

- 4 µl *QuantiScript® RT-Buffer* pro Probe
- 1 µl *RT Primer Mix* pro Probe
- 1 µl *OmniScript™ Reverse Transcriptase* pro Probe

Durch Auf- und Abpipettieren erfolgte die Durchmischung. Bis zur Benutzung wurde der *Mastermix* auf Trockeneis gelagert.

Zu jeder der Proben wurde 2 µl *gDNA Wipeout Buffer* gegeben. Eine erste Inkubation erfolgte im *Thermocycler* für 2 min bei 42°C.

Danach wurden die Proben auf Eis gelagert, während jede Probe 6 µl des *Mastermixes* erhielt. Die Proben wurden erneut in den *Thermocycler* gestellt und das Programm für 30 min bei 42°C und 3 min bei 95°C fortgesetzt. Danach erfolgte ein Herunterkühlen auf 4°C.

Nach der Transkription wurden zu jeder Probe 100 µl gefiltertes Milli-Q-Wasser gegeben (Gesamtvolumen von 120 µl) und diese bei - 20°C eingefroren.

2.2.8 Semiquantitative RT-PCR humaner Aortenklappen

Da die Bestimmung eines jeden Gens in Doppelbestimmung stattfand, wurden 10 µl cDNA benötigt, d.h. pro Duplikat 5 µl entsprechend einer Menge von 41,67 ng pro Mikrovertiefung. Zu den jeweils 5 µl cDNA wurden 10 µl *Platinum®SYBR®Green qPCR SuperMix* sowie 5 µl *Primerlösung* mit einer Endkonzentration von 0,625 pmol pro *Primer* bzw. 1,25 pmol pro *Primerpaar* gegeben. So erhielt man ein Endvolumen von 20 µl.

Die verwendeten *Primer* sind Kapitel 2.1.3 zu entnehmen.

Es folgte die PCR mit dem in Tabelle 7 dargestellten Programm:

Zeit	Temperatur (°C)	Wiederholungen
2 min	50	1 x
2 min	95	1 x
15 sec 95°C / 30 sec 60°C 40 x		
15 sec	95	1 x
1 min	60	1 x
15 sec	95	1 x
15 sec	60	1 x

Tabelle 7: PCR-Programm. min = Minuten, sec = Sekunden, x = Mal

Die Erfassung der Messungen erfolgte mit den Programmen *7300 System SDS Software* und dem *PRISM™ Primer Express*. Genaue Angaben finden sich in Kapitel 2.1.1.

Die Daten wurden nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode weiter ausgewertet [147]. Ausgeschlossen wurden Ct-Werte > 34. Dieser Tatsache ist geschuldet, dass die Gruppengrößen in der Analyse der einzelnen Gene variieren.

2.2.9 Bestimmung des HA-Gehalts humaner Aortenklappen mittels HA-ELISA

HA-Extraktion aus Aortenklappen

Um nicht nur auf mRNA-Ebene die Expression der HAS zu untersuchen, sondern auch auf Proteinebene den tatsächlichen HA-Gehalt zu quantifizieren, wurde mit Hilfe eines ELISA HA aus den Aortenklappentaschen extrahiert.

Dazu wurden die in flüssigem N₂ gefrorenen Klappentaschen für ca. 12-16 h in einer Gefriertrocknungsanlage bei einem Vakuum von 1,03 mbar beim Haupttrocknen und 0,001 mbar beim Nachtrocknen sowie einer Eiskondensatortemperatur von - 85°C lyophilisiert.

Nach der Gefriertrocknung wurde ein Teil des Gewebes abgenommen und dessen Trockengewicht bestimmt. Zu jeder dieser Probe wurden 450 µl Pronase-Puffer (s. Kapitel 2.1.4) hinzugegeben und es folgte eine 24-stündige enzymatische Zersetzung bei 60°C auf einem Heizschüttler. Um einen zusätzlichen Kondensationsschutz zu erhalten, wurden die Röhrchen mit Parafilm verschlossen.

Im Anschluss erfolgte für 5 min bei 95°C eine Hitzeinaktivierung der Pronase. Um das Kondenswasser aus dem Deckel zurück in das Gefäß zu führen, wurden die Proben wenige sec zentrifugiert.

Für die spätere Proteinbestimmung wurden 20 µl der Lösung in ein frisches Röhrchen pipettiert und beiseitegestellt.

Der Rest der Probe kam erneut für 15 min bei RT und 10.000 rpm in die Zentrifuge. Von dem entstandenen Überstand wurden 400 µl in ein 15 ml *Falcon* pipettiert und mit 3,2 ml 90 % EtOH versetzt. Bei - 20°C trat so über Nacht eine Fällungsreaktion ein.

Die Probe wurde wie im Protokoll in Tabelle 8 beschrieben weiterverarbeitet:

Schritt	Zeit	Vorgang
1		Überführen von 1,2 ml der Probe in ein 1,5 ml Eppi
2	20 min	Zentrifugieren bei 4°C und 10.000 rpm
3		Abnehmen des Überstands und erneut Hinzufügen von 1,2 ml der Probe
4	20 min	Zentrifugieren bei 4°C und 10.000 rpm
5		Abnehmen des Überstands und Hinzufügen der restlichen 1,2 ml der Probe
6	20 min	Zentrifugieren bei 4°C und 10.000 rpm
7		Abnehmen des Überstands und Hinzufügen von 1 ml EtOH absolute
8	20 min	Zentrifugieren bei 4°C und 10.000 rpm
9		Überstand abnehmen und diesen bei -80°C einfrieren

Tabelle 8: Probenvorbereitung der humanen Aortenklappen für den HA-ELISA. ml = Milliliter, rpm = Umdrehungen pro Minute, °C = Grad Celsius

Das nach Schritt 9 in Tabelle 6 entstandene Pellet wurde über Nacht lyophilisiert und am nächsten Tag in 1 µl Aqua dest./mg Trockengewicht gelöst.

HA-ELISA

Der HA-ELISA wurde mit dem *Hyaluronic Acid Quantitative Test Kit* der Firma Corgenix durchgeführt.

Vor Beginn wurden alle Reagenzien und Lösungen auf RT erwärmt und die lyophilisierten und in Aqua dest. gelösten Proben aufgetaut sowie gründlich durchmischt. Es folgte eine Verdünnung der Proben mit dem im Kit mitgelieferten Reaktionspuffer. Die Verdünnung wurde später aus der HA-Konzentration wieder entsprechend herausgerechnet.

Die schon fertigen Standards wurden vor ihrer Benutzung noch einmal mit dem Vortexmischer gemischt.

Alle Proben und Standards wurden in doppelter Ausführung bestimmt. Zusätzlich erfolgte die Messung eines Blindversuchs, der lediglich aus Reaktionspuffer bestand und den 0 ng/ml Standard darstellte. Dieser wurde im weiteren Verlauf wie die Proben behandelt. Als Substratleerwert wurde 200 µl Wasser verwendet, das dem mit dem Spektrometer durchgeführten Nullabgleich diente.

Die nachfolgend genannten Schritte erfolgten der Reihe nach:

1. Verdünnen von je 20 µl der Standards, der drei HA-Kontrolltests und den bereits verdünnten Patientenproben mit 200 µl Reaktionspuffer
2. Auftragen von 100 µl/Mikrovertiefung der Standards, der HA-Kontrolltests und der Patientenproben in Doppelbestimmung mit einer 8-Kanal-Pipette

3. Inkubationszeit von 60 min bei RT
4. Entfernen der Lösung durch Umdrehen der Mikrotiterplatte
5. 4x Waschen mit PBS mit gründlichem Ausschlagen der Flüssigkeit auf ein Papiertuch
6. Zugabe von 100 µl/Mikrovertiefung MP-konjugiertem HSBP
7. Inkubation von 30 min bei RT
8. Entfernen der Lösung durch Umdrehen der Mikrotiterplatte
9. 4x Waschen mit PBS mit gründlichem Ausschlagen der Flüssigkeit auf ein Papiertuch
10. Zugabe von 100 µl/Mikrovertiefung Einkomponentensubstratlösung
11. Inkubation von 30 min bei RT
12. Beenden der Reaktion durch Zugabe von 100 µl Stopplösung
13. Pipettieren von 200 µl Wasser in eine leere Mikrovertiefung für den Substratleerwert, der als Nullpunkt des Spektrometers gesetzt wird
14. Messung der optischen Dichte bei 450 nm im Spektrometer

Datenauswertung

Die Verarbeitung der Daten erfolgte mit dem Programm Excel, Version 2003, Microsoft. Zunächst wurden aus allen jeweils doppelt bestimmten Proben, Kontrollen und dem Blindversuch die Mittelwerte gebildet. Anhand der Mittelwerte der optischen Dichten des Blindversuchs und der Standardreihe wurde ein Graph erstellt, mit dem die HA-Konzentration der Patientenproben berechnet und in ng/ml angegeben werden konnte.

2.2.10 Zellkulturexperimente

In *in vitro*-Modellen mit VICs aus Schafsherzklappen sollte der Einfluss einer Hyperglykämie auf die Genexpression von BGN und HAS1-3 untersucht werden. Weitere Untersuchungsziele waren die Bestimmung des quantitativen HA-Gehalts unter hyperglykämischen Bedingungen sowie die Beleuchtung der HA-Rolle im Kalzifizierungsprozess.

Die für die Versuche verwendeten Zellen entstammten Schafsherzklappen, die nach der Schlachtung der Tiere in einem nahegelegenen Schlachthof umgehend gewonnen und bei - 196°C kryokonserviert wurden. Es wurde ausschließlich mit Zelllinien der Passage 3 und 4 gearbeitet.

Herstellung des Kulturmediums

Als Grundmedium diente das *Dulbecco's modified eagle*-Medium (Sigma).

Hinzugefügt wurden FCS, Glutamin, Penicillin/Streptomycin, Amphotericin B und nicht-essenzielle Aminosäuren. Die genaue Zusammensetzung ist Kapitel 2.1.5 zu entnehmen.

Vor Benutzung des Mediums erfolgte eine Erwärmung im Wasserbad auf 37°C.

Vorbereitung der Zellkulturflaschen

Für jede Zelllinie erfolgte die Vorbereitung einer Zellkulturflasche T-75. Dazu wurde der Boden der Flasche mit ca. 5 ml 1 % Gelatine in PBS für etwa 10 min benetzt. Vor dem Einbringen der Zellen wurde die Flüssigkeit entfernt.

Vorbereitung der Falcons

Pro aufzutauender Zelllinie wurde ein 15 ml fassendes *Falcon* bereitgestellt und der Deckel mit Incidur-Spray desinfiziert.

In jedes *Falcon* wurden 10 ml 37°C warmes Medium pipettiert.

Auftauen und Kultivierung der Zellen

Die bei - 196°C kryokonservierten Zellen wurden in das 37°C warme Wasserbad getaucht, bis sie gerade angetaut waren. Schrittweise wurde ein Teil des vorgelegten Mediums in das Kryoröhrchen pipettiert, die Zellen auf diesem Weg langsam aufgetaut und in das 15 ml *Falcon* mit dem restlichen Medium überführt.

Durch Zentrifugation bei 1,5 x 1000 rpm für 5 min bildete sich ein Bodensatz mit den darin enthaltenen Zellen. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das *Falcon* mit 12 ml frischem, 37°C warmen Medium befüllt. Nach vorsichtigem Durchmischen erfolgte der Transfer der Zellsuspension in die zuvor benetzte T-75 Zellkulturflasche. Die Kultivierung fand im Wärmeschrank bei 37°C mit 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ für 2 d statt. Die Konfluenz der Zellen wurde mikroskopisch überprüft, sodass bei gutem Wachstum vor Erreichen einer vollständigen Bedeckung des Flaschenbodens mit einem Zellrasen das Passagieren der Zellen begonnen werden konnte.

Passagieren der Zellen

Zum Passagieren der Zellen wurde das sich in der T-75 Zellkulturflasche befindliche Medium abgesaugt und die Flasche 2 x mit 12 ml PBS gewaschen. Danach wurden 5 ml Trypsin auf die Zellen gegeben und die Flasche vorsichtig geschwenkt. Die Kontrolle des Ablösungsprozesses der Zellen erfolgte unter dem Mikroskop. Nach erfolgreicher Lösung des Zellrasens erfolgte das Aufteilen der Probe mit entsprechender Zugabe von vorgewärmtem Medium, um die enzymatische Trypsin-

Reaktion mit dem im Medium enthaltenen FCS zu stoppen. Das Teilungsverhältnis war abhängig von der Konfluenz der Zellen und lag immer zwischen 1:10 bis 1:20. Um möglichst viele Zellen vom Flaschenboden zu lösen, erwies sich ein Schaben über den Boden mit der Pipettenspitze als hilfreich.

Je nach Teilungsverhältnis wurde dann die entsprechende Menge an Zell-Medium-Gemisch in jeweils ein 15 ml *Falcon* gegeben und dieses dann für 5 min bei $1,5 \times 1000$ rpm zentrifugiert.

Nach dem Entfernen des überschüssigen Mediums wurde das Zellpellet in frischer Nährlösung gelöst und auf Zellkulturschalen verteilt. Diese kamen zur Kultivierung erneut in den Wärmeschrank.

2.2.11 *In vitro*-Kultivierung oviner VICs auf normo- und hyperglykämischem Medium

Mit dem *in vitro*-Modell mit normo- und hyperglykämischem Medium sollte der Einfluss einer Hyperglykämie auf die Genexpression von BGN und HAS1-3 sowie auf den HA-Gehalt auf Proteinebene untersucht werden.

Die Grundlage des *in vitro*-Modells mit normo- und hyperglykämischem Medium stellten zwei verschiedene Zellkulturmedien dar, in denen ovine VICs (n=7) über 12 d kultiviert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet wurden. Die Erntetage waren an d 3, d 6, d 9 und d 12.

Jede Versuchseinheit bestand jeweils aus einem Ansatz Zellen, die auf normoglykämischem Medium und welchen, die auf hyperglykämischem Medium kultiviert wurden.

Als Nährlösungen dienten dazu als hyperglykämisches Medium das in 2.2.10 beschriebene Medium (4,5 g Glukose/l) mit den entsprechenden Zusätzen. Das für den normoglykämischen Ansatz verwendete Medium enthielt 1 g Glukose/l.

Nach erfolgreicher Kultivierung wurden die Zellen je nach Konfluenz im Verhältnis 1:10 oder 1:15 geteilt und in die Zellkulturschalen überführt. Für den Ansatz der auf hyperglykämischem Medium gewachsenen Zellen wurden 4 Zellkulturschalen befüllt (pro Erntetag eine Zellkulturschale). Ebenso wurde mit dem Ansatz der normoglykämischen Zellen verfahren. Die 8 Platten pro n kamen über Nacht in den Wärmeschrank bei 37°C.

Mediumwechsel

Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 24 h. Dazu wurden die in Abb. 2 mit Kontrolle bezeichneten Kalotten mit 2 ml des jeweiligen Kultivierungsmediums versehen.

Die auf hyperglykämischem Medium gewachsenen Zellen erhielten in ihrer Kontrollgruppe weiterhin hyperglykämische Nährlösung, die Kontrollgruppe der auf normoglykämischem Medium kultivierten Zellen weiterhin normoglykämisches Medium. Proben, die mit hyperglykämischem Medium behandelt wurden, wurden auf normoglykämisches Medium umgestellt (s. Abb. 2A). Umgekehrt wurden Proben, die mit normoglykämischem Medium behandelt wurden, auf hyperglykämische Nährlösung umgestellt (s. Abb. 2B).

Diese Vorgehensweise wurde bei den darauffolgenden Mediumwechseln beibehalten, die jeden dritten Tag erfolgten.

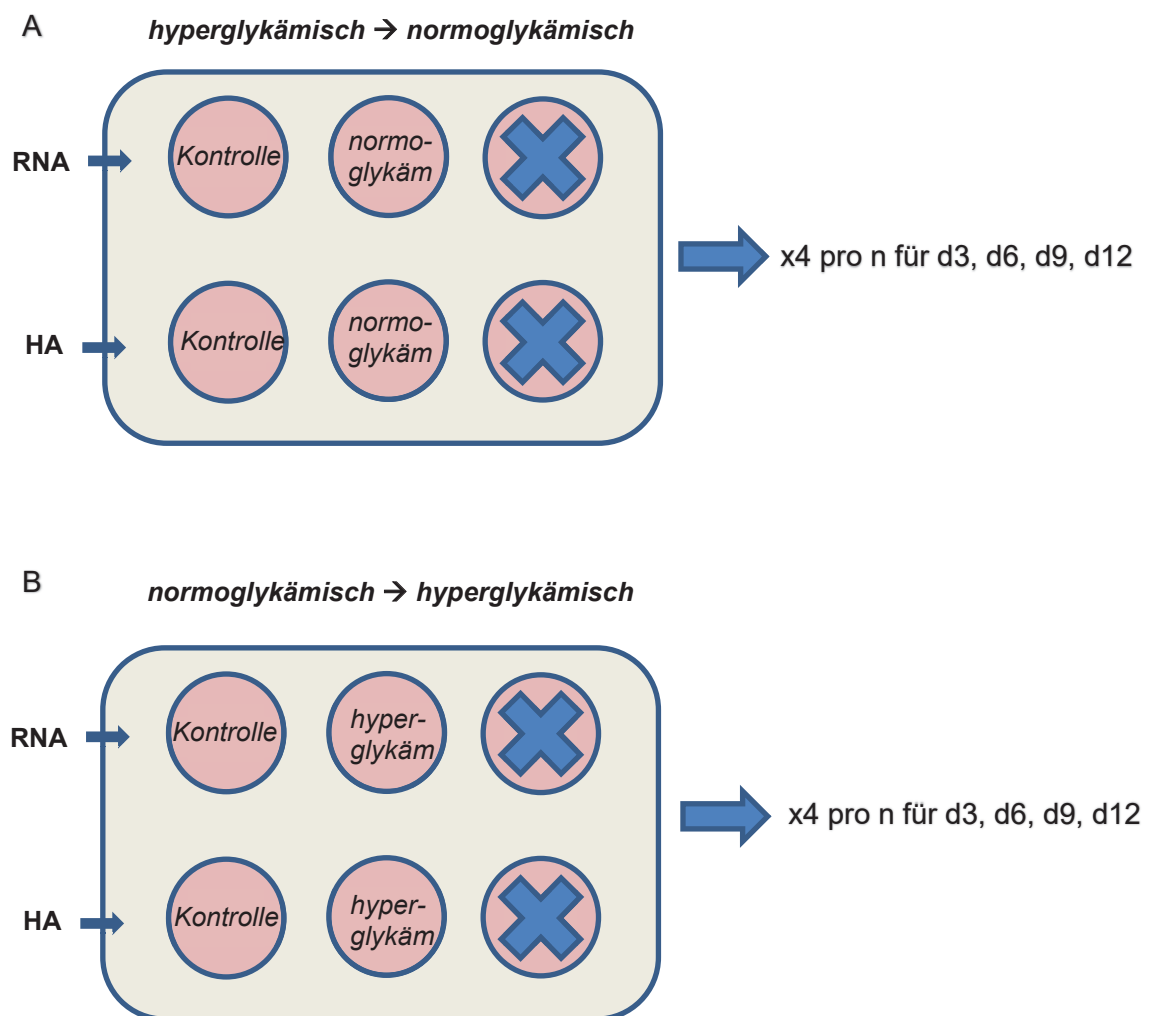


Abb. 2: Schematischer Versuchsansatz des Modells oviner VICs auf normo- und hyperglykämischem Nährboden. A zeigt die Zellen, die von hohem Glukosegehalt (hyperglykäm) auf normalen Glukosegehalt (normoglykäm) umgestellt wurden sowie eine auf hyperglykämischem Medium bleibender Kontrollgruppe (Kontrolle). In jeweils zwei Vertiefungen wurden Zellen zur Gewinnung von RNA, weitere zwei zur Extraktion von HA mittels ELISA gesät. Die mit X markierten Vertiefungen wurden nicht belegt. B zeigt die von normoglykämischem auf hyperglykämisches Medium umgestellten VICs sowie die während der Zeit auf normoglykämischem Medium kultivierte Kontrollgruppe. Von A und B wurden jeweils 4 Ansätze pro n für den jeweiligen Erntetag hergestellt, die Ernte erfolgte an den Tagen (d) 3, 6, 9 und 12.

Ernte der Zellen

Die Ernte der Zellen erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Dabei wurde der Ansatz d 3 an Tag 3, der Ansatz d 6 an Tag 6, der Ansatz d 9 an Tag 9 und der Ansatz d 12 an Tag 12 geerntet.

Aus denen in Abb. 2 mit RNA bezeichneten Mikrovertiefungen wurde an jedem Erntetag RNA isoliert, aus den mit HA bezeichneten Feldern an d 12 HA extrahiert.

RNA-Isolation aus ovinen Zellen

Die Platten wurden komplett vom Medium befreit und im Anschluss daran 2 x mit PBS gewaschen. In jede Mikrovertiefung wurden 350 µl β-ME + RLT-Puffer pipettiert (10 µl β-ME/1 ml RLT-Puffer) und die Zellmasse mit einem Zellschaber abgetragen.

Die zähe Masse wurde anschließend jeweils auf die *QIAshredder* aufgetragen und 2 min bei RT mit 15.000 rcf zentrifugiert. Der Überstand im Reaktionsgefäß wurde mit 350 µl EtOH vermischt und auf die Säulen der Firma Qiagen transferiert.

Die verwendeten Chemikalien entstammen dem RNeasy® Mini-Kit der Firma Qiagen (wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben).

Die nachfolgenden Schritte sind der Tabelle 9 zu entnehmen.

Schritt	Vorgang
1	15 sec bei RT mit 15.000 rcf zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
2	350 µl RW1-Puffer auf Säulen pipettieren
3	15 sec bei RT mit 15.000 rcf zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
4	75 µl DNase auf Säulen geben
5	15 min bei RT inkubieren
6	350 µl RW1-Puffer hinzufügen
7	15 sec bei RT mit 15.000 rcf zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
8	500 µl RPE-Puffer hinzufügen
9	15 sec bei RT mit 15.000 rcf zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
10	500 µl RPE-Puffer hinzufügen
11	2 min bei RT mit 15.000 rcf zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
12	Säulen in frische Reaktionsgefäße überführen
13	1 min bei RT mit 15.000 rcf zentrifugieren
14	Säulen in Reaktionsgefäße überführen
15	30 µL RNase freies Wasser hinzufügen
16	1 min bei RT mit 15.000 rcf zentrifugieren, Säulen entsorgen

Tabelle 9: Protokoll zur RNA-Isolation aus ovinen valvulären Interstitialzellen. sec = Sekunden, min = Minuten, rcf = *relative centrifugal force* (relative Zentrifugalkraft), RT = Raumtemperatur

Das Umschreiben der RNA in cDNA sowie die Durchführung der RT-PCR erfolgten analog zu den in den Kapiteln 2.2.7 und 2.2.8 beschriebenen Arbeitsschritten.

HA-Extraktion

Zur HA-Extraktion wurde an d 12 je 1 ml des Medium-Überstandes in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und der HA-ELISA, wie in Kapitel 2.2.9 beschrieben, durchgeführt.

Der Rest der Nährlösung wurde entfernt und jede Mikrovertiefung mit 1 ml PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Zellen nach Zugabe von 100 µl RIPA-Puffer/Mikrovertiefung mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Diese Lösung diente der späteren Proteinquantifizierung, auf die der HA-Gehalt normiert wurde.

Proteinquantifizierung

Die Proteinquantifizierung wurde nach Bradford mit dem *Bio-Rad-Dye Reagent Concentrate* durchgeführt. Dieses wurde dazu in der benötigten Menge 1:5 mit Aqua dest. verdünnt. Pro Probe und Standard wurden 200 µl des Reagenzes eingesetzt und dieses durch leichtes Rütteln der 96-Mikrovertiefungsplatte vermischt. Die Messung erfolgte bei RT in einem Zeitraum von 5-30 min nach Zugabe des Reagenzes.

Als Standard wurde ein BSA (1 mg/ml) der Firma Invitrogen eingesetzt. Diese Lösung wurde mit Aqua dest. 1:5 verdünnt. Im Proteinassay wurden Standards mit 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0; 2,4 und 2,8 µg Endkonzentration eingesetzt.

Die Proben wurden, wenn nötig, ebenfalls mit Aqua dest. verdünnt. Die photometrische Auswertung erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm, die Erstellung der entsprechenden Eichkurve und weitere Verarbeitung der Rohdaten mit Microsoft Excel.

2.2.12 Inhibition der HA durch das HA-hemmende Peptid Pep1 in einem *in vitro*-Modell an ovinen VICs

Um einen möglichen Einfluss der HA-Inhibierung auf die Kalziumanreicherung oviner VICs zu zeigen, wurde die in Abb. 3 schematisch dargestellte Versuchsreihe über 10 d durchgeführt. Der Wechsel des Mediums erfolgte jeden 3. Tag mit je 1 ml Medium.

Für jeden Versuch n (insgesamt n=6) wurden zwei 6 Mikrovertiefung-Platten angelegt. In den Zellen der einen Platte wurde die Kalziumkonzentration an d 10 bestimmt, aus denen der anderen Proteine quantifiziert, die zur Normierung dienen.

Als Basismedium diente das *Dulbecco's modified eagle* Medium, im Folgenden als Kontrolle bezeichnet. Das in Abb. 3 als β-GP bezeichnete Medium enthielt zusätzlich 10 µl β-GP (10 mM) pro ml Medium. Das TGF-β-Medium bestand zusätzlich zum

Grundmedium aus 5 ng/ml TGF- β , 1 μ l/ml CaCl₂ (1,5 mM) und 10 μ l/ml β -GP (10 mM). Pro Mikrovertiefung wurde 1 ml des jeweiligen Mediums verwendet.

Jede dieser Nährlösungen wurde zusätzlich entweder mit einem sog. Kontrollpeptid (KP) (12-mer SATPASAPYPLA) oder dem HA-inhibierenden Peptid Pep1 (12-mer GAHWQFNALTVR) der Firma GeneCust in einer Konzentration von 0,5 mg/ml versehen.

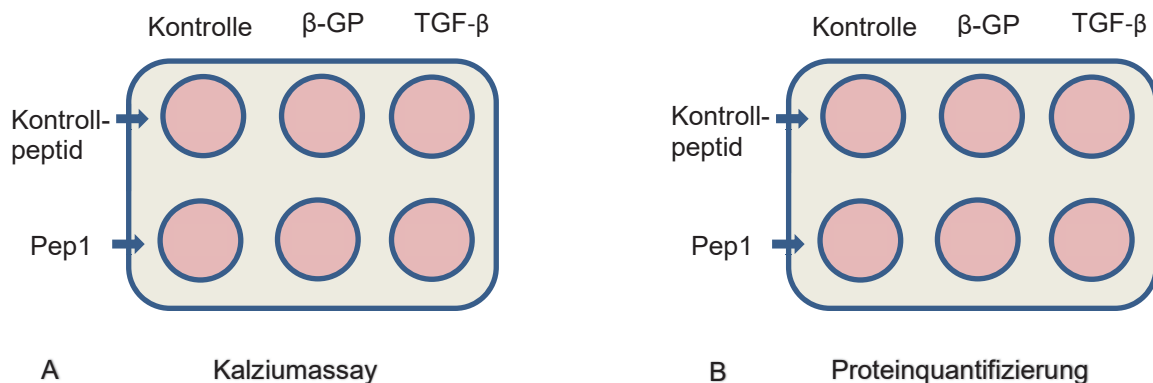


Abb. 3 Schematischer Aufbau des *in vitro* Pep1-/Kontrollpeptid-Versuchs. A = Ansatz zur kolorimetrischen Kalziummessung, B = Ansatz zur Proteinquantifizierung, der zur Normierung der Kalziumkonzentration benötigt wird. Beide Ansätze bestehen aus jeweils drei verschiedenen Medien: einer Kontrollgruppe (Kontrolle), die aus Grundmedium besteht, einer β -GP-Gruppe und einer TGF- β -Gruppe (Zusammensetzung s. Kapitel 2.1.5). Zu den Medien wurde in einem Ansatz ein KP bzw. Pep1 in einer Konzentration von 0,5 mg/ml hinzugefügt. Die Kultivierung fand über 10 Tage statt.

Kolorimetrische Kalziumbestimmung

Nach 10 d wurde jede Mikrovertiefung der Platten nach Entfernen des Mediums 2 x mit PBS gewaschen. Es folgte das Hinzufügen von 200 μ l Tris-Puffer. Zur Zellfragmentierung wurden die Zellen mit einem Zellschaber von ihrem Untergrund gelöst und in ein Röhrchen überführt, auf- und abpipetiert sowie zusätzlich mit einer Ultraschallsonde bearbeitet.

Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 10.000 rcf konnte der Überstand abgenommen und zur kolorimetrischen Kalziumbestimmung basierend auf der Kresolphtalein-Komplex-Methode genutzt werden.

Diese wurde mit dem *Calcium Assay Kit* der Firma *Cayman Chemicals* durchgeführt. Zur exakten Berechnung der Kalziumkonzentration wurde das im Kit enthaltene Protokoll, wie in Tabelle 10 dargestellt, modifiziert.

Lfd. Bezeichnung	Kalziumstandard (μ l) 20 mg/dl	Tris-Puffer (μ l)	finale Kalzium- Konzentration (mg/dl)
A	0	100	0
B	2,5	97,5	0,5
C	5	95	1
D	10	90	2
E	20	80	4
F	25	75	5
G	40	60	8
H	50	50	10
I	75	25	15
J	100	0	20

Tabelle 10: Protokoll zur Herstellung des Kalziumstandards. Lfd = laufende, μ l = Mikroliter, mg = Milligramm, dl = Deziliter. Die Messung der Extinktion erfolgt bei einer Wellenlänge von 575 Nanometern.

Pro Standard und pro Probe wurden 10 μ l in die Mikrovertiefungen der im Kit enthaltenen Platte pipettiert. Jeder Standard und jede Probe wurden einer 2-fachen Messung unterzogen. Zu jeder befüllten Mikrovertiefung wurden 100 μ l *Working Detector Reagent*, bestehend aus *Calcium Detector* R1 und R2 im Verhältnis 1:1, hinzugefügt.

Die Platte wurde ca. 30 sec leicht manuell geschüttelt und anschließend für 5 min bei RT inkubiert.

Die Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 575 nm am Spektrometer.

Die Auswertung der Rohdaten wurde mit Microsoft Excel durchgeführt.

Dazu wurde zunächst der Mittelwert der Absorption der jeweils doppelt gemessenen Proben und Standards gebildet. Der errechnete Mittelwert des Standards A wurde von sich selbst und den anderen Standards und Proben subtrahiert, sodass man schließlich die jeweils korrigierten Absorptionen erhielt. Darauf folgte die Erstellung einer Standardkurve (s. Abb. 4), indem die korrigierten Absorptionen der Standards als Funktion der finalen Kalziumkonzentrationen aufgetragen wurden und so ein nahezu linearer Graph entstand.

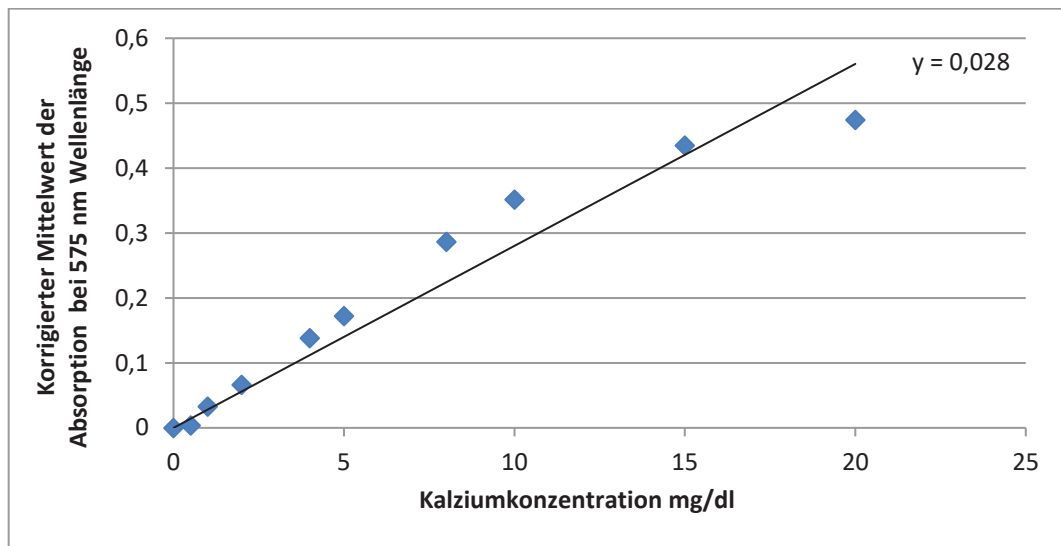


Abb. 4: Linearer Graph aus den korrigierten Absorptionen der Kalzium-Standards. Auf der x-Achse ist die Kalziumkonzentration in mg/dl angegeben, auf der y-Achse der korrigierte Mittelwert der Absorptionen bei 575 nm Wellenlänge, nm = Nanometer, y = Steigung der Gerade

Aus diesem Graphen wurde die Steigung abgelesen und die Kalziumkonzentration nach folgender, dem Handbuch des Kits entnommener Gleichung, berechnet:

$$\text{Kalzium (mg/dl)} = \left[\frac{\text{korrigierter Wert der Probenabsorption} - \text{Schnittpunkt mit der y-Achse}}{\text{Steigung der Gerade}} \right] \times \text{Verdünnung der Proben}$$

Proteinquantifizierung

Zur Proteinbestimmung wurden die Proben bei RT für 5 min und mit 12000 rcf zentrifugiert und der Überstand zur Analyse verwendet.

Als Standard diente eine Stocklösung aus BSA in RIPA-Puffer mit einer Ausgangskonzentration von 2 mg BSA/ml Puffer. Diese wurde entsprechend weiter verdünnt, sodass mit Endkonzentrationen von 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1 und 2 mg/ml BSA gearbeitet wurde.

Als Arbeitslösung wurden in benötigter Menge Kupfersulfat-Lösung mit *Bicinchoninic Acid Solution* gemischt (20 µl Kupfersulfat-Lösung pro ml) und je 800 µl dieses Gemisches zu 10 µl der Proben gegeben. Als Leerwert dienten analog 10 µl RIPA-Puffer, die ebenfalls mit 800 µl der Arbeitslösung versehen wurden.

Die Proben sowie der Leerwert wurden dann bei 65°C auf einem beweglichen Heizschüttler durchgemischt und anschließend bei einer Wellenlänge von 550 nm in einem Spektrometer gemessen.

Die weitere Datenauswertung sowie die Erstellung einer Eichkurve erfolgten mit Microsoft Excel.

2.2.13 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit dem Programm GraphPad Prism 6.0. Angegeben sind die Daten als Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts.

Zur grundlegenden Festlegung, ob die zu analysierenden Daten normalverteilt sind, wurde ein D'agostino-Test durchgeführt. Nicht normalverteilte Daten zweier unabhängiger Stichproben wurden mit einem Mann-Whitney U-Test untersucht. Zum Vergleich mehrerer Gruppen diente ein Kruskal-Wallis-Test mit einem Dunn's multiple comparisons-Test.

Für die statistische Auswertung von Patientendaten wurde für den Vergleich zweier Gruppen ein Fisher's exact test bei kategorischen Variablen und ein Dunn's post hoc test für kontinuierliche Variablen verwendet. Bei mehr als zwei Gruppen kam der Chi-Quadrat-Test für kategorische und der Kruskal-Wallis-Test für kontinuierliche Variablen zum Einsatz. Für alle statistischen Analysen wurde ein p-Wert < 0.05 als signifikant angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Die Genexpression in der ECM degenerierter humaner Aortenklappentaschen

Aus den humanen Aortenklappentaschen wurde die Genexpression unterschiedlicher Gene der ECM bestimmt.

Untersucht wurden die Genexpressionen der SLRPs BGN, DCN, LUM, des PGs VER, der HAS1-3, des Knochenmarkers OPN, codiert durch das Gen SPP1 und der ALPL als Gen der AP.

Verglichen wurde die Höhe der Genexpression zwischen den in Kapitel 2.2.5 beschriebenen Gruppen:

1. fibrotisch ohne T2DM (n=38)
2. fibrotisch mit T2DM (n=27)
3. kalzifiziert ohne T2DM (n=39)
4. kalzifiziert mit T2DM (n=33)

Ct-Werte > 34 wurden, wie vorbeschrieben, aus der Auswertung ausgeschlossen. Aufgrund dessen variieren die Gruppengrößen in Abhängigkeit des untersuchten Gens. Die statistisch ausgewerteten Gruppengrößen sind im Folgenden für jedes Gen separat angegeben.

Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert von < 0.05 angenommen. Zur besseren Veranschaulichung in den folgenden Abbildungen wurden die Signifikanzen mit *, ** und *** gekennzeichnet. * steht für $p < 0.05$, ** für $p < 0.01$ und *** für $p < 0.0001$. Neben dem p-Wert wird nachfolgend auch der Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts genannt.

3.1.1 Die Genexpression von SLRPs

Die in dieser Studie untersuchten SLRPs sind BGN, DCN und LUM.

BGN

In die Analyse von BGN gingen die in Kapitel 3.2 genannten Gruppengrößen ein. Es fand sich eine statistisch signifikant höhere Expression ($p = 0.0003$) in fibrotischen Aortenklappentaschen von Nicht-T2DM-Patienten (1 ± 0.06) im Vergleich zu kalzifizierten Aortenklappentaschen von Nicht-T2DM-Patienten (0.66 ± 0.06) (s. Abb. 5) [148]. Keine signifikanten Unterschiede zeigten sich im Vergleich von fibrotischen und kalzifizierten Klappentaschen von T2DM-Patienten (fibrotisch m. T2DM: $0,89 \pm 0,07$,

kalzifiziert m. T2DM: $0,82 \pm 0,05$, $p > 0.9999$). Ebenso zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Nicht-T2DM- und T2DM-Patienten mit fibrotischen Aortenklappentaschen (fibrotisch o. T2DM: $1 \pm 0,06$, fibrotisch m. T2DM: $0,89 \pm 0,07$, $p > 0.9999$) sowie zwischen Nicht-T2DM- und T2DM-Patienten mit kalzifizierten Aortenklappentaschen (kalzifiziert o. T2DM: $0,66 \pm 0,06$, kalzifiziert m. T2DM: $0,82 \pm 0,05$, $p = 0.1836$).

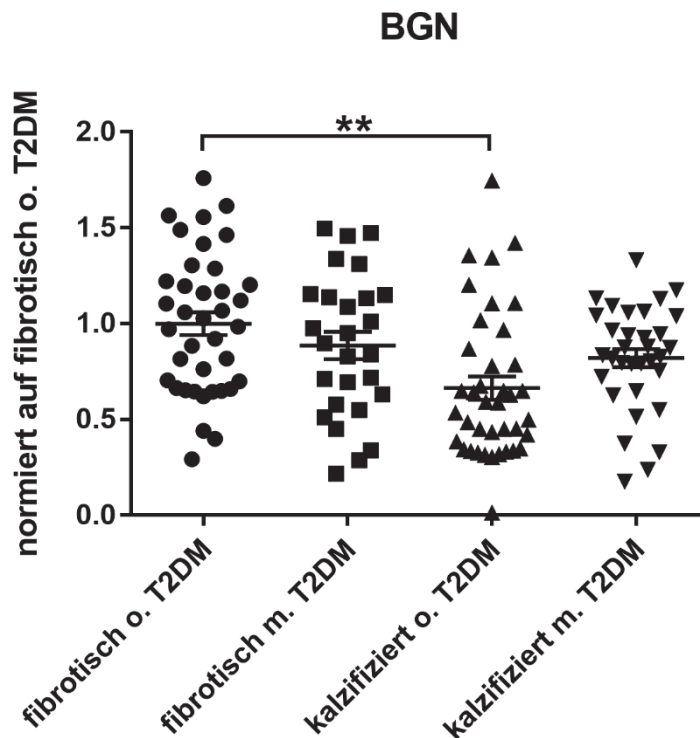


Abb. 5: Die Genexpression von Biglykan in humanen Aortenklappentaschen. T2DM = Diabetes mellitus Typ 2, o. = ohne, m. = mit, fibrotisch o. T2DM (n=38), fibrotisch m. T2DM (n=27), kalzifiziert o. T2DM (n=39), kalzifiziert m. T2DM (n=33), ** = $p < 0.01$. Fibrotische Aortenklappentaschen von Nicht-T2DM-Patienten wiesen eine signifikant höhere BGN-Expression auf als kalzifizierte Klappentaschen von Nicht-T2DM-Patienten ($p = 0.0003$).

DCN

Auch DCN fand sich in fibrotischen Aortenklappentaschen von Nicht-T2DM-Patienten statistisch signifikant höher exprimiert als in kalzifizierten Aortenklappentaschen von Nicht-T2DM-Patienten (fibrotisch ohne T2DM: 1 ± 0.06 , kalzifiziert ohne T2DM: 0.68 ± 0.05 , $p < 0.0001$) (s. Abb. 6) [148]. Nicht signifikant unterschiedlich war die DCN-Expression in fibrotischen und kalzifizierten Aortenklappentaschen von T2DM-Patienten (fibrotisch m. T2DM: $0,84 \pm 0,04$, kalzifiziert m. T2DM: $0,74 \pm 0,44$, $p = 0.7401$).

Keine statistisch signifikanten Unterschiede wiesen auch der Vergleich von T2DM- und Nicht-T2DM-Patienten mit fibrotischen und kalzifizierten Klappentaschen auf (fibrotisch o. T2DM: $1 \pm 0,06$, fibrotisch m. T2DM: $0,84 \pm 0,04$, $p = 0,7886$ und kalzifiziert o. T2DM: $0,68 \pm 0,05$, kalzifiziert m. T2DM: $0,74 \pm 0,44$, $p > 0,9999$).

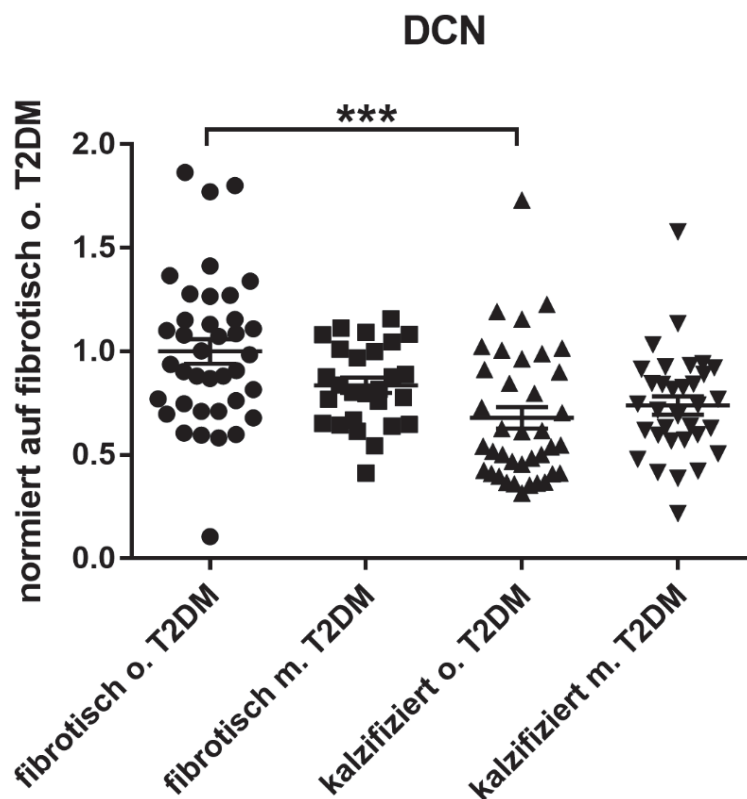


Abb. 6: Die Genexpression von Decorin in humanen Aortenklappentaschen. T2DM = Diabetes mellitus Typ 2, o. = ohne, m. = mit, *** = $p < 0,0001$, fibrotisch o. T2DM ($n=38$), fibrotisch m. T2DM ($n=27$), kalzifiziert o. T2DM ($n=38$), kalzifiziert m. T2DM ($n=33$), Fibrotische Aortenklappentaschen von Nicht-T2DM-Patienten wiesen eine signifikant höhere DCN-Expression auf als kalzifizierte Klappentaschen von Nicht-T2DM-Patienten ($p < 0,0001$).

LUM

In der LUM-Expression (s. Abb. 7) zeigten sich weder Signifikanzen im Vergleich fibrotischer und kalzifizierter Aortenklappentaschen von Nicht-T2DM-Patienten (fibrotisch o. T2DM: $1 \pm 0,04$, kalzifiziert o. T2DM: $0,91 \pm 0,03$, $p = 0,1169$) noch von T2DM-Patienten (fibrotisch m. T2DM: $0,89 \pm 0,03$, kalzifiziert m. T2DM: $0,92 \pm 0,04$, $p > 0,9999$) [148]. Auch der Vergleich von fibrotischen Aortenklappentaschen bei T2DM- und Nicht-T2DM-Patienten als auch von kalzifizierten Aortenklappentaschen von T2DM- und Nicht-T2DM-Patienten ergab jeweils keinen statistisch signifikanten

Unterschied (fibrotisch o. T2DM: $1 \pm 0,04$, fibrotisch m. T2DM: $0,89 \pm 0,03$, $p = 0.2333$ und kalzifiziert o. T2DM: $0,91 \pm 0,03$, kalzifiziert m. T2DM: $0,92 \pm 0,04$, $p > 0.9999$).

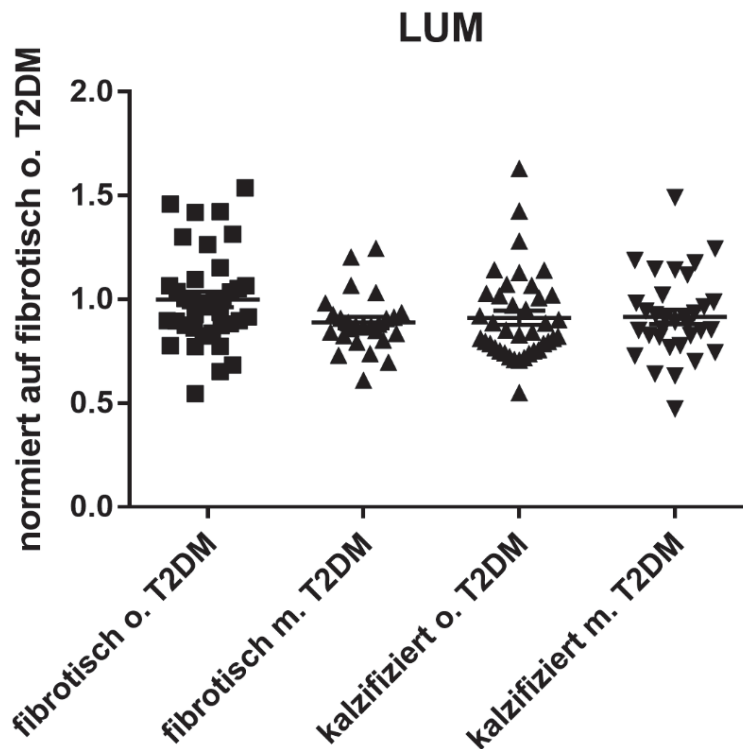


Abb. 7: Die Genexpression von Lumican in humanen Aortenklappentaschen. T2DM = Diabetes mellitus Typ 2, o. = ohne, m. = mit, fibrotisch o. T2DM (n=38), fibrotisch m. T2DM (n=26), kalzifiziert o. (n=39), kalzifiziert m. T2DM (n=33). Die LUM-Expression zeigte in allen Gruppen eine ähnliche Ausprägung ohne signifikante Unterschiede.

3.1.2 Die Genexpression des Proteoglykans VER

VER

Die Expressionslevel des in der ECM von humanen Aortenklappentaschen vorkommenden VER ist für die vordefinierten Gruppen in Abb. 8 dargestellt.

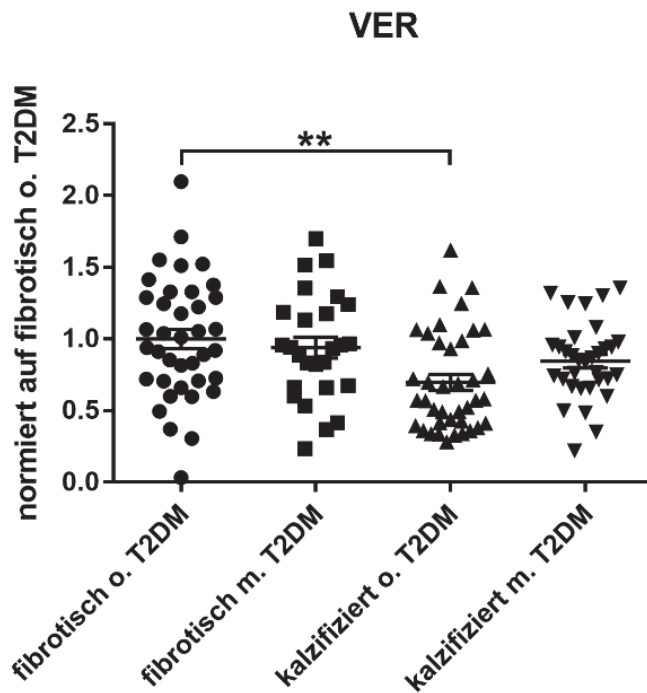


Abb. 8: Die Genexpression von Versican in humanen Aortenklappentaschen. T2DM = Diabetes mellitus Typ 2, o. = ohne, m. = mit, ** = $p < 0.01$, fibrotisch o. T2DM (n=38), fibrotisch m. T2DM (n=26), kalzifiziert o. T2DM (n=39), kalzifiziert m. T2DM (n=33). Fibrotische Aortenklappentaschen von Nicht-T2DM-Patienten wiesen eine signifikant höhere VER-Expression auf als kalzifizierte Klappentaschen von Nicht-T2DM-Patienten ($p = 0.0023$).

Wie bei den SLRPs BGN und DCN fand sich auch für VER bei Nicht-T2DM-Patienten eine signifikant höhere Expression in fibrotischen Aortenklappen im Vergleich zu kalzifizierten (fibrotisch o. T2DM: 1 ± 0.07 , kalzifiziert o. T2DM 0.70 ± 0.06 , $p = 0.0023$). Keine Signifikanzen ergaben sich im Vergleich der Klappentaschen von T2DM-Patienten (fibrotisch m. T2DM: 0.93 ± 0.07 , kalzifiziert m. T2DM: 0.84 ± 0.05 , $p > 0.9999$). Auch der Vergleich von T2DM- und Nicht-T2DM-Patienten lieferte für fibrotische und kalzifizierte Aortenklappen keine statistischen Signifikanzen (fibrotisch o. T2DM: 1 ± 0.07 , fibrotisch m. T2DM: 0.93 ± 0.07 , $p > 0.9999$ und kalzifiziert o. T2DM 0.70 ± 0.06 , kalzifiziert m. T2DM: 0.84 ± 0.05 , $p = 0.2983$).

3.1.3 Die Genexpression von chondroosteogenen Markern

ALPL

Abb. 9 zeigt die Genexpression der ALPL in den unterschiedlichen Gruppen. Statistisch signifikante Expressionsunterschiede zeigten sich weder zwischen Früh- und Spätstadien der Degeneration bei Nicht-T2DM-Patienten (fibrotisch o. T2DM: 1 ± 0.11 , kalzifiziert o. T2DM: 0.67 ± 0.07 , $p = 0.0845$) noch bei T2DM-Patienten

(fibrotisch m. T2DM: $1,26 \pm 0,19$, kalzifiziert m. T2DM $0,82 \pm 0,09$, $p = 0.4995$). Ebenfalls keine Unterschiede ergaben sich beim Vergleich von T2DM- und Nicht-T2DM-Patienten mit fibrotischen Aortenklappentaschen (fibrotisch o. T2DM: $1 \pm 0,11$, fibrotisch m. T2DM: $1,26 \pm 0,19$, $p > 0.9999$) sowie mit kalzifizierten Aortenklappentaschen (kalzifiziert o. T2DM: $0,67 \pm 0,07$, kalzifiziert m. T2DM: $0,82 \pm 0,09$, $p = 0.9301$).

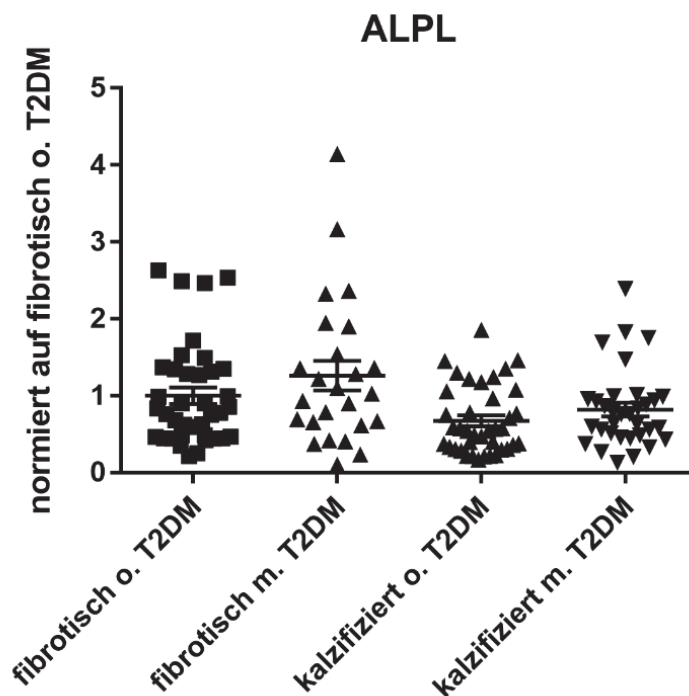


Abb. 9: Die Genexpression der Alkalischen Phosphatase in humanen Aortenklappentaschen. T2DM = Diabetes mellitus Typ 2, o. = ohne, m. = mit, fibrotisch o. T2DM (n=38), fibrotisch m. T2DM (n=25), kalzifiziert o. T2DM (n=39), kalzifiziert m. T2DM (n=33). Die Genexpression der ALPL zeigte beim Vergleich der unterschiedlichen Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

SPP1

Hochsignifikant gesteigert war die Expression des SPP1 bei Nicht-T2DM-Patienten in kalzifizierten Klappentaschen im Vergleich zu fibrotischen Klappentaschen (kalzifiziert o. T2DM: 3.01 ± 0.33 , fibrotisch o. T2DM: 1 ± 0.22 , $p < 0.0001$) [148].

Auch bei T2DM-Patienten fand sich eine signifikant höhere Ausprägung des SPP1-Gens in kalzifizierten Klappentaschen im Vergleich zu fibrotischen (kalzifiziert m. T2DM: 2.46 ± 0.34 , fibrotisch m. T2DM: 0.93 ± 0.11 , $p = 0.0066$) [148]. Keine statistisch signifikanten Unterschiede in der SPP1-Expression zeigten sich in den frühen Degenerationsstadien bei T2DM- und Nicht-T2DM-Patienten (fibrotisch o. T2DM: 1 ± 0.22 , fibrotisch m. T2DM: 0.93 ± 0.11 , $p > 0.9999$) sowie in fortgeschrittenen Stadien

(kalzifiziert o. T2DM: 3.01 ± 0.33 , kalzifiziert m. T2DM: 2.46 ± 0.34 , $p > 0.9999$, s. Abb. 10).

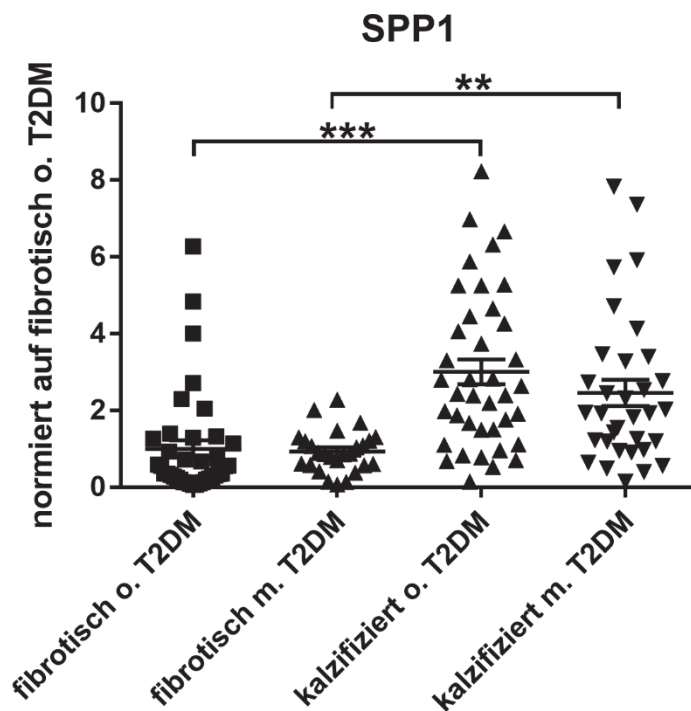


Abb. 10: Die Genexpression von SPP1 in humanen Aortenklappentaschen.

T2DM = Diabetes mellitus Typ 2, o. = ohne, m. = mit, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.0001$. fibrotisch o. T2DM (n=38), fibrotisch m. T2DM (n=26), kalzifiziert o. T2DM (n=39), kalzifiziert, m. T2DM (n=33). Sowohl in Aortenklappentaschen bei Nicht-T2DM-Patienten als auch bei T2DM-Patienten liegt eine signifikant höhere SPP1-Expression in fortgeschrittener Degeneration im Vergleich zu frühen Stadien vor (ohne T2DM: $p < 0.0001$, mit T2DM = $p = 0.0066$).

3.1.4 Die Genexpression der HAS1-3

HAS1

Wie aus Abb. 11 ersichtlich ist die Genexpression der HAS1 in allen Gruppen ähnlich. Es zeigten sich sowohl für T2DM- als auch für Nicht-T2DM-Patienten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen frühen und späten Degenerationsstadien (fibrotisch o. T2DM: 1 ± 1.07 , kalzifiziert o. T2DM: 0.77 ± 0.12 , $p > 0.9999$ und fibrotisch m. T2DM: 0.85 ± 0.15 , kalzifiziert m. T2DM: 0.56 ± 0.09 , $p > 0.9999$). Ebenfalls keine signifikant veränderten Genexpressionslevel ergaben sich für fibrotische Klappen von

Nicht-T2DM- und T2DM-Patienten (fibrotisch o. T2DM: $1 \pm 1,07$, fibrotisch m. T2DM: $0,85 \pm 0,15$, $p > 0.9999$) als auch für kalzifizierte Aortenklappentaschen (kalzifiziert o. T2DM: $0,77 \pm 0,12$, kalzifiziert m. T2DM: $0,56 \pm 0,09$, $p > 0.9999$).

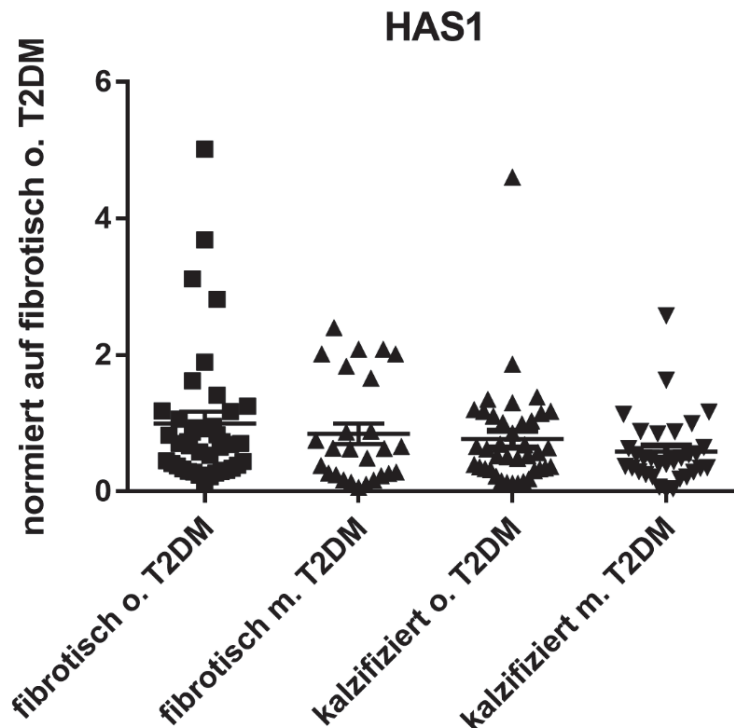


Abb. 11: Die Genexpression der Hyaluronsäuresynthase 1 in humanen Aortenklappentaschen. T2DM = Diabetes mellitus Typ 2, o. = ohne, m. = mit, fibrotisch o. T2DM (n=38), fibrotisch m. T2DM (n=26), kalzifiziert o. T2DM (n=39), kalzifiziert m. T2DM (n=32). Es zeigten sich in allen Gruppen ähnliche Expressionen.

HAS2

Betrachtet man hingegen die Genexpression der HAS2, dargestellt in Abb. 12, so erkennt man eine signifikant höhere HAS2-Expression in fibrotischen Aortenklappentaschen bei Nicht-T2DM-Patienten im Vergleich zur kalzifizierten Vergleichsgruppe (fibrotisch o. T2DM: $1 \pm 0,08$, kalzifiziert o. T2DM: $0,44 \pm 0,05$, $p < 0.0001$).

Eine ebenfalls signifikante Mehrexpression der Synthase weisen T2DM-Patienten mit fibrotischen Aortenklappentaschen auf (fibrotisch m. T2DM: $1,01 \pm 0,10$, kalzifiziert m. T2DM: $0,60 \pm 0,07$, $p = 0.0141$).

Keine statistisch signifikant veränderten Genexpressionslevel ergaben sich für fibrotische Klappentaschen von Nicht-T2DM- und T2DM-Patienten (fibrotisch o. T2DM: $1 \pm 0,08$, fibrotisch m. T2DM: $1,01 \pm 0,10$, $p > 0.9999$) sowie für kalzifizierte

Aortenklappentaschen von Nicht-T2DM- und T2DM-Patienten (kalzifiziert o. T2DM: 0.44 ± 0.05 , kalzifiziert m. T2DM: 0.60 ± 0.07 , $p = 0.3225$).

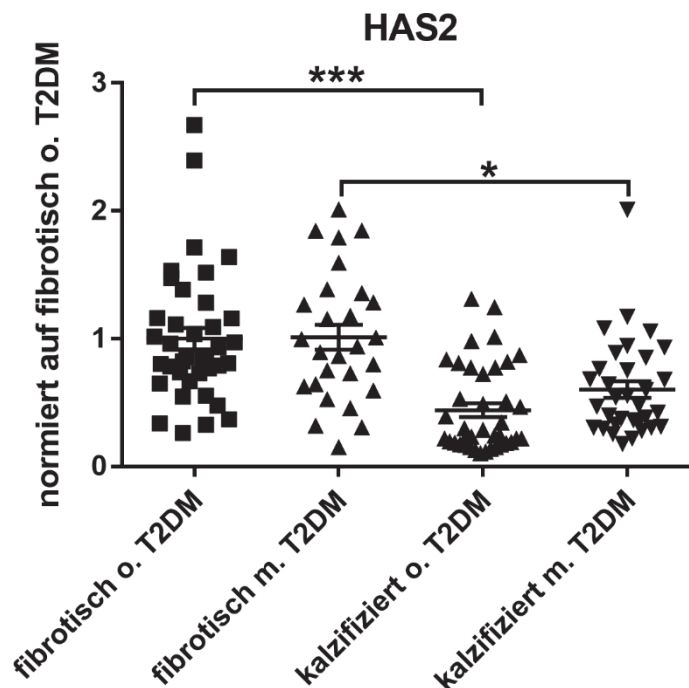


Abb. 12: Die Genexpression der Hyaluronsäuresynthase 2 in humanen Aortenklappentaschen. T2DM = Diabetes mellitus Typ 2, o. = ohne, m. = mit, * = $p < 0.05$, *** = $p < 0.0001$, fibrotisch o. T2DM ($n=38$), fibrotisch m. T2DM ($n=27$), kalzifiziert o. T2DM ($n=39$), kalzifiziert m. T2DM ($n=33$). In fibrotischen Herzklappen von Nicht-T2DM-Patienten ($p < 0.0001$) als auch von T2DM-Patienten ($p=0.0141$) fanden sich signifikant höhere HAS2-Expressionslevel als bei Patienten mit kalzifizierten Aortenklappentaschen mit und ohne T2DM.

HAS3

Abb. 13 zeigt die Expression von HAS3. Die HAS3 war im Kollektiv der Nicht-T2DM-Patienten signifikant ($p = 0.017$) höher in fibrotischen Klappen (1 ± 0.09) als in kalzifizierten Aortenklappentaschen (0.64 ± 0.06) exprimiert. T2DM-Patienten mit fibrotischen Aortenklappentaschen zeigten hingegen keine signifikant höheren Expressionslevel als T2DM-Patienten mit kalzifizierten Klappentaschen (fibrotisch m. T2DM: 0.96 ± 0.1 , kalzifiziert m. T2DM: 0.66 ± 0.05 , $p = 0.1100$). Auch keine signifikanten Unterschiede in der HAS3-Expression ließen sich zwischen fibrotischen Klappentaschen von T2DM- und Nicht-T2DM-Patienten sowie in kalzifizierten Aortenklappen von T2DM- und Nicht-T2DM-Patienten erkennen (fibrotisch o. T2DM:

1 ± 0.09 , fibrotisch m. T2DM: $0,96 \pm 0,1$, $p > 0.9999$ und kalzifiziert o. T2DM: 0.64 ± 0.06 , kalzifiziert m. T2DM: $0,66 \pm 0,05$, $p > 0.9999$).

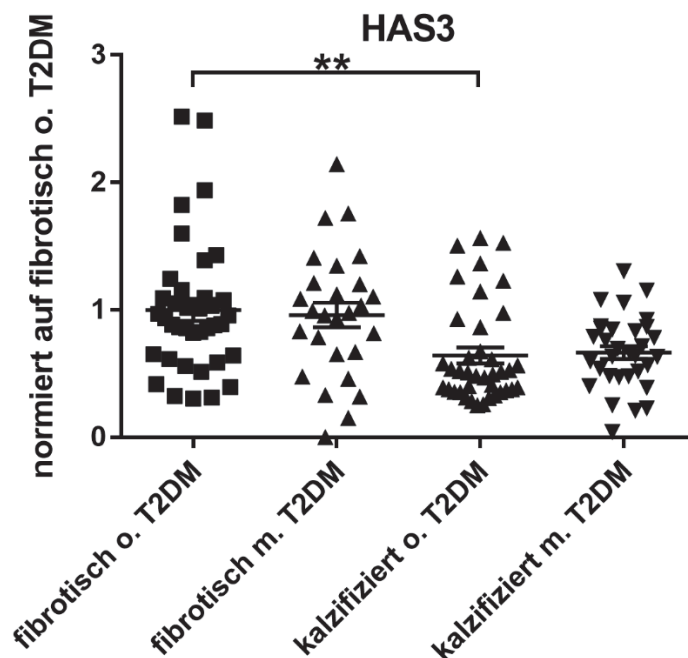


Abb. 13: Die Genexpression der Hyaluronsäuresynthase 3 in humanen Aortenklappentaschen. T2DM = Diabetes mellitus Typ 2, o. = ohne, m. = mit, ** = $p < 0.01$, fibrotisch o. T2DM (n=38), fibrotisch m. T2DM (n=27), kalzifiziert o. T2DM (n=39), kalzifiziert m. T2DM (n=32). In fibrotischen Herzklappen von Nicht-T2DM-Patienten fanden sich signifikant höhere Expressionen als in der kalzifizierten Vergleichsgruppe ($p = 0.0017$).

3.2 Der quantitative HA-Gehalt in humanen Aortenklappentaschen

Zum Vergleich der auf mRNA gewonnenen Ergebnisse mit der Proteinebene erfolgte die Quantifizierung des HA-Gehalts der Aortenklappentaschen mittels eines HA-ELISAs.

Die Gruppeneinteilung erfolgte analog zu den Gruppen, die in die PCR eingingen. Da jedoch nicht von jedem Patienten, von dem eine Klappentasche in die RNA-Analyse einging, eine weitere Tasche für die Bestimmung des HA-Gehalts zur Verfügung stand, verkleinerten sich die Gruppen entsprechend. Es resultierten bei einer Gesamtzahl von n=94 folgende Gruppengrößen:

1. fibrotisch ohne T2DM (n=26)
2. fibrotisch mit T2DM (n=15)

3. kalzifiziert ohne T2DM (n=30)

4. kalzifiziert mit T2DM (n=23).

Ermittelt wurde der Gehalt an HA in μg bezogen auf das Trockengewicht des jeweiligen in die Analyse eingegangenen Anteils der Aortenklappentasche in g (s. Kapitel 2.2.9).

Die Ergebnisse sind graphisch in Abb. 14 dargestellt.

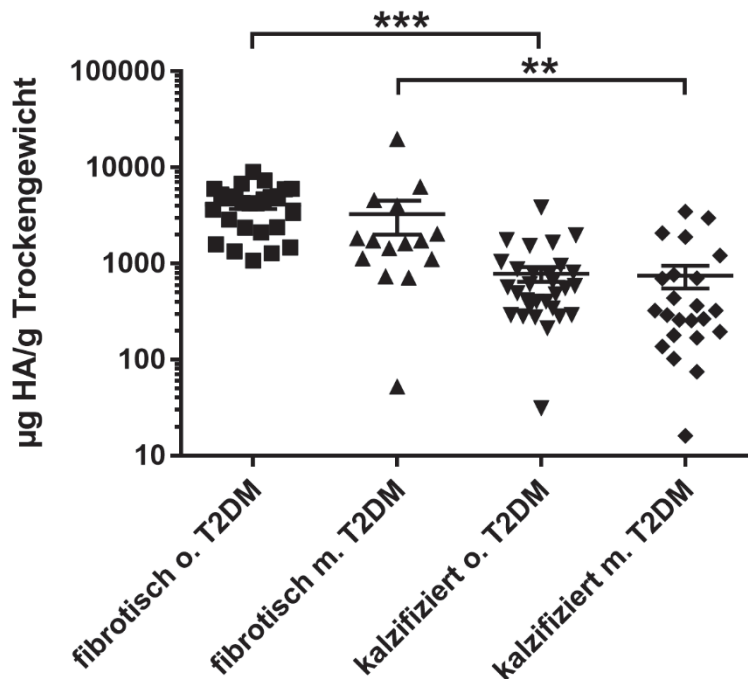


Abb. 14: Ergebnis des HA-ELISAs. T2DM = Diabetes mellitus Typ 2, o. = ohne, m. = mit, HA: Hyaluronsäure, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.0001$, fibrotisch o. T2DM (n=26), fibrotisch m. T2DM (n=15), kalzifiziert o. T2DM (n=30), kalzifiziert m. T2DM (n=23). In fibrotischen Aortenklappentaschen findet sich sowohl bei T2DM-Patienten ($p = 0.0036$) als auch bei Nicht-T2DM-Patienten ($p < 0.0001$) ein signifikant höherer HA-Gehalt als in den jeweiligen kalzifizierten Vergleichsgruppen.

Korrespondierend mit den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse von HAS2 und HAS3 fand sich bei Nicht-T2DM-Patienten ein signifikant höherer Gehalt von HA in fibrotischen Taschen im Vergleich zu kalzifizierten (fibrotisch o. T2DM: 4116.0 ± 404.9 , kalzifiziert o. T2DM: 784.7 ± 137.3 , $p < 0.0001$).

Auch T2DM-Patienten wiesen in früheren Degenerationsstadien einen signifikant höheren HA-Gehalt auf als in Spätstadien (fibrotisch m. T2DM: 3268.0 ± 1260.0 , kalzifiziert m. T2DM: 749.3 ± 199.0 , $p = 0.0036$). Der Vergleich von T2DM- mit Nicht-T2DM-Patienten ergab bei der Untersuchung des HA-Gehalts keine relevanten

Unterschiede in fibrotischen und kalzifizierten Klappentaschen (fibrotisch o. T2DM: 4116.0±404.9, fibrotisch m. T2DM: 3268.0±1260.0, $p = 0.3283$ und kalzifiziert o. T2DM: 784.7±137.3, kalzifiziert m. T2DM: 749.3±199.0, $p > 0.9999$).

3.3 Auswertung der Patientendaten

Die zu jedem Patienten ermittelten Daten bezüglich Alter, Geschlecht, Begleiterkrankungen, Vormedikation, Raucherstatus, Echokardiographieparameter etc. wurden getrennt für die in die Genexpressionsanalyse und in die quantitative HA-Analyse eingegangenen Gruppen statistisch ausgewertet und sind in Tabelle 9 und 10 dargestellt (modifiziert nach Barth et al. [148]). Es fand ein gezielter Vergleich der Parameter zwischen T2DM- Patienten und Nicht-T2DM-Patienten statt.

	alle Patienten (n=137)	fibrotisch (n=65)			kalzifiziert (n=72)		
		ohne T2DM (n=38)	mit T2DM (n=27)	p-Werte*	ohne T2DM (n=39)	mit T2DM (n=33)	p-Werte*
Geschlecht (männlich), n (%)	77 (56)	19 (50)	10 (37)	0.3242	15 (38)	16 (48)	0.4761
Alter, J	74±8	72±11	73±6	0.8764	77±5	73±6	<0.01
BMI (kg/m ²)	28±5	26±4	29±5	<0.05	26±4	31±5	<0.001
Primäre Indikation, n (%)							
Stenose	115 (84)	19 (50)	24 (89)	<0.01	39 (100)	33 (100)	1.0000
Insuffizienz	18 (13)	17 (45)	1 (4)	<0.001	0 (0)	0 (0)	-
Herztransplantat-Empfänger	4 (3)	2 (5)	2 (7)	1.0000	0 (0)	0 (0)	-
Lipide (mg/dL)							
Gesamtcholesterin	149±39	149±44	147±36	0.7169	148±33	153±64	0.8954
HDL	44±14	45±14	43±13	0.7539	45±14	43±14	0.6776
LDL	94±33	95±36	89±30	0.6013	96±29	95±38	0.8600
Triglyzeride	135±71	121±53	193±106	<0.01	110±42	140±66	0.0901
LVEF (%)	58±13	59±12	54±15	0.1910	62±6	54±15	0.0608
Kategorien der indizierten Stenosegrade, n (%)							
I	24 (20)	11 (46)	8 (32)		1 (3)	4 (12)	
II	45 (38)	5 (21)	13 (52)		14 (37)	13 (39)	
III	51 (43)	8 (33)	4 (16)	0.0691	23 (61)	16 (49)	0.2522
Kardiovaskuläre Risikofaktoren, n (%)							
Raucheranamnese	65 (48)	20 (54)	13 (48)	0.8005	21 (54)	11 (33)	0.0992
Arterielle Hypertonie	121 (88)	35 (92)	27 (93)	1.0000	31 (80)	30 (91)	0.2083
T2DM	60 (43)	-	27 (100)	-	-	33 (100)	-
davon IDDM	14 (23)	-	7 (26)	-	-	7 (21)	-
Dyslipoproteinämie	102 (75)	26 (68)	26 (96)	<0.01	30 (77)	29 (88)	0.3573
KHK	90 (66)	27 (71)	18 (67)	0.7879	22 (56)	23 (70)	0.3296
Extrakardiale Gefäßerkrankungen	33 (24)	6 (16)	13 (48)	<0.01	10 (26)	4 (12)	0.2322
Medikamente, n (%)							
Statine	75 (60)	15 (46)	19 (79)	<0.05	17 (46)	24 (75)	<0.05
Antikoagulantien	29 (21)	5 (13)	8 (30)	0.1244	8 (21)	8 (24)	0.7801
ASS	83 (66)	19 (58)	18 (75)	0.2614	23 (62)	23 (72)	0.4498

Tabelle 9: Patientendaten (Genexpressionsanalyse, PCR). HDL = *high density lipoprotein*, LDL = *low density lipoprotein*, LVEF = linksventrikuläre Ejektionsfraktion, T2DM = Diabetes mellitus Typ 2, IDDM = Insulin-abhängiger Diabetes mellitus Typ 2, ASS = Acetylsalicylsäure, J = Jahre, p-Werte < 0.05 wurden als statistisch signifikant angenommen

	alle Patienten (n=94)	fibrotisch (n=41)			kalzifiziert (n=53)		
		ohne T2DM (n=26)	mit T2DM (n=15)	p-Werte*	ohne T2DM (n=30)	mit T2DM (n=23)	p-Werte*
Geschlecht (männlich), n (%)	53 (56)	15 (58)	11 (73)	0.0502	18 (60)	9 (39)	0.1704
Alter, J	74±8	71±11	74±7	0.6343	76±5	74±6	0.3232
BMI (kg/m ²)	27±5	25±3	27±5	0.2106	26±4	31±5	<0.01
Primäre Indikation, n (%)							
Stenose	77 (82)	11 (42)	13 (87)	<0.01	30 (100)	23 (100)	1.0000
Insuffizienz	13 (14)	13 (50)	0 (0)	<0.01	0 (0)	0 (0)	-
Herztransplantat-Empfänger	4 (4)	2 (8)	2 (13)	0.6149	0 (0)	0 (0)	-
Lipide (mg/dL)							
Gesamtcholesterin	150±41	143±46	152±42	0.7767	150±32	158±49	0.5811
HDL	43±14	42±15	37±12	0.4209	45±14	43±14	0.6275
LDL	95±34	92±37	94±30	0.8536	95±30	99±40	0.8007
Triglyzeride	139±78	126±62	238±115	<0.01	109±42	138±63	0.1203
LVEF (%)	57±13	58±14	48±14	0.0657	62±7	56±15	0.3778
Kategorien der indizierten Stenosegrade, n (%)							
I	16 (20)	7 (44)	4 (31)		1 (3)	4 (17)	
II	31 (38)	4 (25)	7 (54)		11 (37)	9 (39)	
III	35 (43)	5 (31)	2 (15)	0.2671	18 (60)	10 (43)	0.1808
Kardiovaskuläre Risikofaktoren, n (%)							
Raucheranamnese	46 (49)	13 (52)	7 (74)	1.0000	17 (57)	9 (39)	0.2709
Arterielle Hypertonie	82 (87)	24 (92)	14 (93)	1.0000	23 (77)	21 (91)	0.2699
T2DM	38 (40)	-	15 (100)	-	-	23 (100)	-
davon IDDM	10 (26)	-	4 (27)	-	-	6 (26)	-
Dyslipoproteinämie	79 (84)	21 (81)	14 (93)	0.3878	24 (80)	20 (87)	0.7153
KHK	61 (65)	19 (73)	10 (67)	0.7300	16 (53)	16 (70)	0.2688
Extrakardiale Gefäßkrankungen	20 (21)	4 (15)	6 (40)	0.1302	7 (23)	3 (13)	0.4844
Medikamente, n (%)							
Statine	51 (60)	12 (55)	10 (83)	0.1397	13 (46)	16 (70)	0.1552
Antikoagulantien	18 (19)	3 (12)	4 (27)	0.3902	7 (23)	4 (17)	0.7379
ASS	54 (64)	12 (55)	10 (83)	0.1397	15 (54)	17 (77)	0.1373

Tabelle 10: Patientendaten (HA-ELISA). HDL = *high density lipoprotein*, LDL = *low density lipoprotein*, LVEF = linksventrikuläre Ejektionsfraktion, T2DM = Diabetes mellitus Typ 2, IDDM = Insulin-abhängiger Diabetes mellitus Typ 2, ASS = Acetylsalicylsäure, J = Jahre, p-Werte < 0.05 wurden als statistisch signifikant angenommen

56 % aller Patienten in beiden Kohorten (PCR- und HA-Kohorte) waren männlichen Geschlechts. In beiden Kohorten lag das Durchschnittsalter zum OP-Zeitpunkt bei 74±8 Jahren. Innerhalb der PCR-Kohorte zeigte sich für Patienten mit kalzifizierten Aortenklappen ein signifikant geringeres Lebensalter zum OP-Zeitpunkt im Falle des Vorliegens eines T2DM (kalzifiziert mit T2DM: 73±6 Jahre, kalzifiziert ohne T2DM 77±5, $p < 0.01$). Bei Aortenklappen-Fibrosierungen ließen sich keine signifikanten Altersdifferenzen zwischen T2DM-Patienten und Nicht-T2DM-Patienten in den jeweiligen Kohorten finden (PCR: fibrotisch ohne T2DM: 72±11 Jahre, fibrotisch mit T2DM: 73±6 Jahre, $p = 0.3242$ und HA: fibrotisch ohne T2DM: 71±11 Jahre, fibrotisch mit T2DM: 74±7 Jahre, $p = 0.6343$).

BMI

Der mittlere BMI-Wert aller Patienten in der PCR-Gruppe lag bei $28 \pm 5 \text{ kg/m}^2$ bzw. bei $27 \pm 5 \text{ kg/m}^2$ in der HA-Gruppe. T2DM-Patienten mit kalzifizierten Aortenklappentaschen wiesen in beiden Kohorten einen signifikant höheren BMI auf als Nicht-T2DM-Patienten (PCR: kalzifiziert mit T2DM: $31 \pm 5 \text{ kg/m}^2$, kalzifiziert ohne T2DM $26 \pm 4 \text{ kg/m}^2$, $p < 0.001$; HA: kalzifiziert mit T2DM: $31 \pm 5 \text{ kg/m}^2$, kalzifiziert ohne T2DM $26 \pm 4 \text{ kg/m}^2$, $p < 0.01$). Gleiches gilt für T2DM-Patienten und Klappenfibrosierung im PCR-Kollektiv (fibrotisch mit T2DM: $29 \pm 5 \text{ kg/m}^2$, fibrotisch ohne T2DM $26 \pm 4 \text{ kg/m}^2$, $p < 0,05$). In der HA-Gruppe ergab sich bei bestehender Klappenfibrosierung keine Signifikanz zwischen Nicht-T2DM- und T2DM-Patienten (fibrotisch mit T2DM: $27 \pm 5 \text{ kg/m}^2$, fibrotisch ohne T2DM $25 \pm 3 \text{ kg/m}^2$, $p = 0.2106$).

Die primäre OP-Indikation

Das primär zur Klappenoperation führende Vitium unabhängig vom Vorliegen eines T2DM stellte bei allen Patienten in der PCR- und HA-Kohorte im Falle einer Aortenklappenkalzifizierung die Stenose dar. Signifikante Unterschiede ergaben sich in den früheren, fibrotischen Degenerationsstadien. So wiesen in der PCR-Gruppe 89 % der T2DM-Patienten eine Stenose als primäre OP-Indikation auf (bei den Nicht-T2DM-Patienten nur 50 %, $p < 0.01$). 45 % der Nicht-Diabetiker wurden aufgrund einer Herzklappeninsuffizienz einer OP zugeführt, der Anteil der T2DM-Gruppe lag bei lediglich 4 % ($p < 0.001$). Ähnliche Ergebnisse fanden sich in der fibrotischen HA-Gruppe. Hier war die primäre OP-Indikation bei 87 % der Diabetiker eine Stenose (42 % bei den Nicht-Diabetikern, $p < 0.01$). Keiner der Diabetiker wurde primär aufgrund einer Aortenklappeninsuffizienz operiert, jedoch die Hälfte der Nicht-Diabetiker ($p < 0.01$).

Blutfettwerte

Das Gesamtcholesterin und die Fraktionen von HDL und LDL wiesen in beiden untersuchten Kohorten keine signifikanten Differenzen zwischen T2DM- und Nicht-T2DM-Patienten auf.

Betrachtet man die Triglyzeride, so lagen die Mittelwerte in der gesamten PCR-Gruppe bei $135 \pm 71 \text{ mg/dl}$, in der HA-Gruppe bei $139 \pm 78 \text{ mg/dl}$. Zwischen T2DM- und Nicht-T2DM-Patienten gab es sowohl in der PCR- als auch der HA-Gruppe bei Patienten in anfänglichen Degenerationsstadien signifikante Unterschiede. T2DM-Patienten wiesen deutlich höhere Werte auf als Nicht-T2DM-Patienten (PCR: fibrotisch mit T2DM: $193 \pm 106 \text{ mg/dl}$, fibrotisch ohne T2DM: $121 \pm 53 \text{ mg/dl}$, $p < 0.01$; HA: fibrotisch mit T2DM: $238 \pm 115 \text{ mg/dl}$, fibrotisch ohne T2DM: $126 \pm 62 \text{ mg/dl}$, $p < 0.01$). Einen in diese Richtung gehenden Trend, jedoch ohne statistische Signifikanz, fand man auch in der

PCR-Gruppe bei Patienten mit kalzifizierten Aortenklappentaschen (kalzifiziert mit T2DM: 140 ± 66 mg/dl, kalzifiziert ohne T2DM: 110 ± 42 mg/dl, $p = 0.0901$).

Linksventrikuläre Ejektionsfraktion

Die mittlere LVEF (%) aller Patienten lag bei 58 ± 13 % (PCR) bzw. 57 ± 13 % (HA). Signifikante Unterschiede ließen sich nicht erkennen. Die Subgruppen von Patienten mit fortgeschrittener Klappendegeneration in der PCR-Kohorte und diejenigen mit beginnender Degeneration in der HA-Kohorte zeigten jedoch den Trend einer geringeren linksventrikulären Auswurfleistung bei T2DM-Patienten (PCR: kalzifiziert mit T2DM: 54 ± 15 %, kalzifiziert ohne T2DM: 62 ± 6 %, $p = 0.068$; HA: fibrotisch mit T2DM: 48 ± 14 %, fibrotisch ohne T2DM: 58 ± 14 %, $p = 0.0657$).

Schweregrade der Stenose

In beiden analysierten Kohorten wiesen 43 % der Patienten eine Stenose III°, 38 % eine Stenose II° und 20 % eine erstgradige Stenose auf. Signifikanzen der Schweregradverteilung zwischen T2DM-Patienten und Nicht-T2DM-Patienten fanden sich weder für frühe noch für späte Stadien der Klappendegeneration.

Kardiovaskuläre Risikofaktoren

In der PCR-Kohorte wiesen 96 % der T2DM-Patienten mit einer fibrotischen Aortenklappentasche eine Dyslipoproteinämie auf, in der Vergleichsgruppe der Nicht-T2DM-Patienten mit fibrotischen Aortenklappentaschen lediglich 68 % ($p < 0.01$). Zwar lag auch in der HA-Kohorte bei Patienten mit fibrotischen Aortenklappen der Anteil von Patienten mit Dyslipoproteinämie mit 93 % bei gleichzeitigem Vorliegen eines T2DM höher als bei Nicht-T2DM-Patienten (81 %), eine statistische Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht.

Für die Risikofaktoren arterielle Hypertonie und positive Raucheranamnese ließen sich in beiden Kohorten zwischen T2DM-Patienten nicht Nicht-T2DM-Patienten keine statistisch signifikanten Unterschiede erkennen.

KHK und extrakardiale Gefäßerkrankungen

In der PCR-Kohorte fand sich bei Patienten mit Aortenklappenfibrose und Vorliegen eines T2DM signifikant häufiger eine extrakardiale Gefäßerkrankung (cAVK oder pAVK) als bei Nicht-T2DM-Patienten (fibrotisch mit T2DM: 13 (48 %), fibrotisch ohne T2DM: 6 (16 %), $p < 0.01$). Von einer KHK waren 66 % aller Patienten der PCR und 65% der HA-Kohorte betroffen. Signifikante Prävalenzunterschiede ließen sich in den Subgruppen nicht erkennen.

Medikamentenanamnese

Die Einnahme von ASS wurde bei der Analyse der Medikamentenanamnese gesondert von den übrigen Antikoagulantien betrachtet. ASS fand sich bei 66 % der Patienten in der PCR-Kohorte und 64 % der Patienten der HA-Kohorte in der Dauermedikation. Auch, wenn in den Subgruppen T2DM-Patienten ASS tendenziell häufiger einnahmen, ließ sich statistisch keine Signifikanz nachweisen (PCR: fibrotisch ohne T2DM: 19 (58 %), fibrotisch mit T2DM: 18 (75 %), $p = 0.2614$, kalzifiziert ohne T2DM: 23 (62 %), kalzifiziert mit T2DM: 23 (72 %), $p = 0.4498$ und HA: fibrotisch ohne T2DM: 12 (55 %), fibrotisch mit T2DM: 10 (83 %), $p = 0.1397$, kalzifiziert ohne T2DM: 15 (54 %), kalzifiziert mit T2DM: 17 (77 %), $p = 0.1373$). Weitere Antikoagulantien wurden von 21 % der Patienten der PCR-Kohorte und 19 % der HA-Kohorte eingenommen, signifikante Unterschiede zwischen T2DM-Patienten und Nicht-T2DM-Patienten ließen sich nicht erkennen.

In beiden Kohorten nahmen 60 % der Patienten Statine ein, wobei in der PCR-Kohorte T2DM-Patienten mit fibrotischen Aortenklappentaschen diese Medikamentengruppe statistisch signifikant häufiger einnahmen als die Vergleichsgruppe ohne T2DM (fibrotisch mit T2DM: 19 (79 %), fibrotisch ohne T2DM: 15 (46 %), $p < 0.05$).

3.4 *In vitro*-Kultivierung oviner VICs auf normo- und hyperglykämischem Medium

Wie in Kapitel 2.2.11 beschrieben, wurden ovine VICs über 12 d ($n=7$) kultiviert. Aus jedem Ansatz wurde nach 3, 6, 9 und 12 d RNA isoliert und die Genexpression von BGN und HAS1-3 ermittelt. An d 12 wurde zusätzlich mittels HA-ELISA die HA-Menge in den Zellen quantifiziert.

3.4.1 Die Genexpression von BGN und HAS 1-3

Die in der PCR ermittelten Ct-Werte wurden mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode (s. Kapitel 2.2.8) ausgewertet. Es erfolgte jeweils die Normierung auf die Zellpopulation der Kontrollgruppe an d 3. Für jedes n existiert seine eigene Kontrollgruppe.

BGN

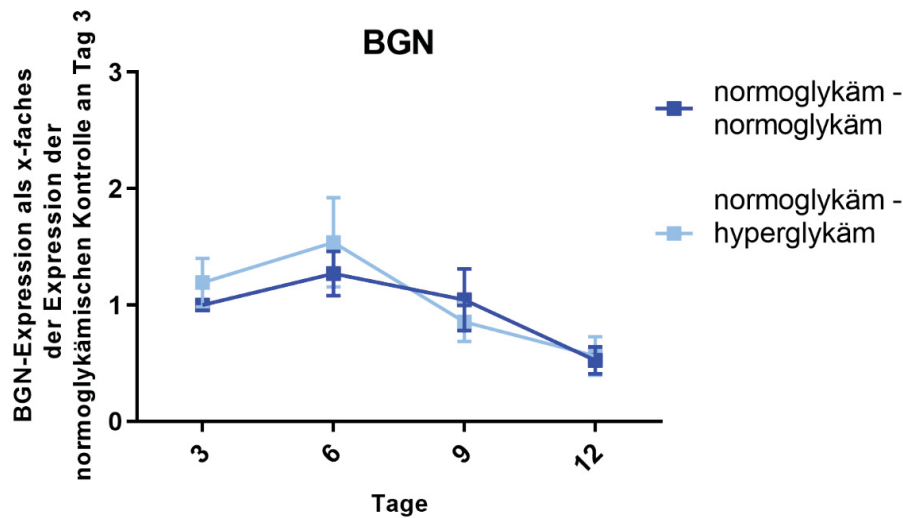


Abb. 15: Die Genexpression von Biglykan in ovinen VICs nach Umstellung von normoglykämischem auf hyperglykämisches Medium nach 24 Stunden. Analyse im Zeitverlauf über 12 Tage (dargestellt auf der x-Achse) mit PCR an d 3, 6, 9 und 12. Dunkelblau ist die BGN-Expression in der auf normoglykämischem Medium gebliebenen Kontrollgruppe. Hellblau stellt die nach 24 h von normoglykämischem auf hyperglykämisches Medium umgesetzten Zellen dar. Die Normierung erfolgte jeweils innerhalb der Kontrollgruppe von d 3. Signifikante Unterschiede der BGN-Expression sind nicht zu erkennen. normoglykäm = Medium mit niedrigem Glukosegehalt, hyperglykäm = Medium mit hohem Glukosegehalt, BGN = Biglykan

In Abb. 15 ist die BGN-Expression über den Zeitraum von 12 d (x-Achse) graphisch dargestellt. Beide Expressionskurven (hellblau = nach 24 h von normo- auf hyperglykämisches Medium umgesetzte Zellen, dunkelblau = auf normoglykämischem Medium gebliebene Kontrollgruppe) lassen an d 6 einen leichten Anstieg erkennen und fallen an d 12 auf ein dem Anfang ähnliches Niveau ab. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe, die während der Zeit auf normoglykämischem Medium blieb und der Gruppe, die nach 24 h auf hyperglykämisches Medium gesetzt wurde, existiert während der gesamten Zeit nicht:

d 3 normoglykäm - normoglykäm: 1 ± 0 ,

d 3 normoglykäm - hyperglykäm: $1,193 \pm 0,207$, $p = 0.9511$

d 6 normoglykäm - normoglykäm: $1,1269 \pm 0,109$

d 6 normoglykäm - hyperglykäm: $1,537 \pm 0,384$, $p = 0.8511$

d 9 normoglykäm - normoglykäm: $1,044 \pm 0,264$

d 9 normoglykäm - hyperglykäm: $0,854 \pm 0,169$, $p = 0.9523$

d 12 normoglykäm - normoglykäm: $0,523 \pm 0,115$

d 12 normoglykäm - hyperglykäm: $0,561 \pm 0,165$, $p = 0.9999$

Abb. 16 zeigt die BGN-Expression in ovinen Zellen, die während der 12 d hyperglykämisches Medium bekamen (roter Graph) und denen, die von hyper- auf normoglykämisches Medium umgestellt wurden (orangener Graph). Ein Ausreißer an d 12, in Klammern markiert, wurde bei der statistischen Auswertung exkludiert. Zu erkennen ist in beiden Gruppen ein leichter Anstieg der BGN-Expression an d 6, nachfolgend fällt die Expression zu den weiteren Messzeitpunkten ab. Signifikante Expressionsunterschiede bis d 12 sind nicht erkennbar:

d 3 hyperglykäm - hyperglykäm: 1 ± 0

d 3 hyperglykäm - normoglykäm: $0,840 \pm 0,110$, $p = 0.9941$

d 6 hyperglykäm - hyperglykäm: $1,530 \pm 0,435$

d 6 hyperglykäm - normoglykäm: $1,479 \pm 0,475$, $p > 0.9999$

d 9 hyperglykäm - hyperglykäm: $0,950 \pm 0,184$

d 9 hyperglykäm - normoglykäm: $1,191 \pm 0,352$, $p = 0.9727$

d 12 hyperglykäm - hyperglykäm: $0,578 \pm 0,133$

d 12 hyperglykäm - normoglykäm: $1,111 \pm 0,439$, $p = 0.7003$

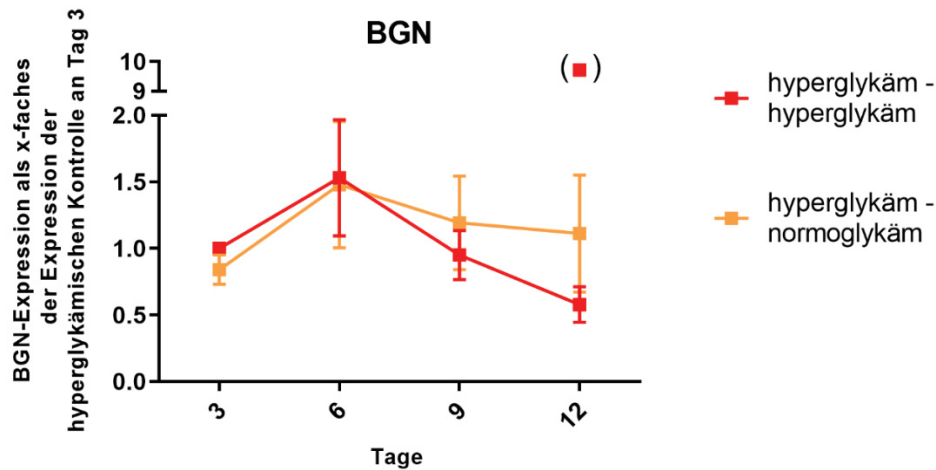


Abb. 16: Die Genexpression von Biglykan in ovinen VICs nach Umstellung von hyperglykämischem auf normoglykämisches Medium nach 24 Stunden. Analyse im Zeitverlauf über 12 Tage (dargestellt auf der x-Achse) mit PCR an d 3, 6, 9 und 12. Rot ist die BGN-Expression in der auf hyperglykämischem Medium gebliebenen Kontrollgruppe. Orange stellt die nach 24 h von hyperglykämischem auf normoglykämisches Medium umgesetzten Zellen dar. Die Normierung erfolgte jeweils innerhalb der Kontrollgruppe von d 3. Signifikante Unterschiede der BGN-Expression sind nicht zu erkennen. normoglykäm = Medium mit niedrigem Glukosegehalt, hyperglykäm = Medium mit hohem Glukosegehalt, BGN = Biglykan, Ausreißer in Klammern markiert

Es erfolgte zudem der Vergleich der jeweiligen Kontrollgruppen, die über dem gesamten Zeitraum entweder auf normoglykämischem oder hyperglykämischem Medium kultiviert wurden (s. Abb. 17). Ein Ausreißer an d 12, in Klammern markiert, wurde bei der statistischen Auswertung exkludiert. Die Messwerte der BGN-Expression an den d 3,6,9 und 12 zeigten keine signifikanten Unterschiede:

d 3 normoglykämisch - normoglykämisch: 1 ± 0

d 3 hyperglykämisch - hyperglykämisch: 1 ± 0 , $p > 0.9999$

d 6 normoglykämisch - normoglykämisch: $1,1269 \pm 0,109$

d 6 hyperglykämisch - hyperglykämisch: $1,530 \pm 0,435$, $p = 0.8613$

d 9 normoglykämisch - normoglykämisch: $1,044 \pm 0,264$

d 9 hyperglykämisch - hyperglykämisch: $0,950 \pm 0,184$, $p = 0.9964$

d 12 normoglykämisch - normoglykämisch: $0,523 \pm 0,115$

d 12 hyperglykämisch - hyperglykämisch: $0,578 \pm 0,133$, $p = 0.9996$

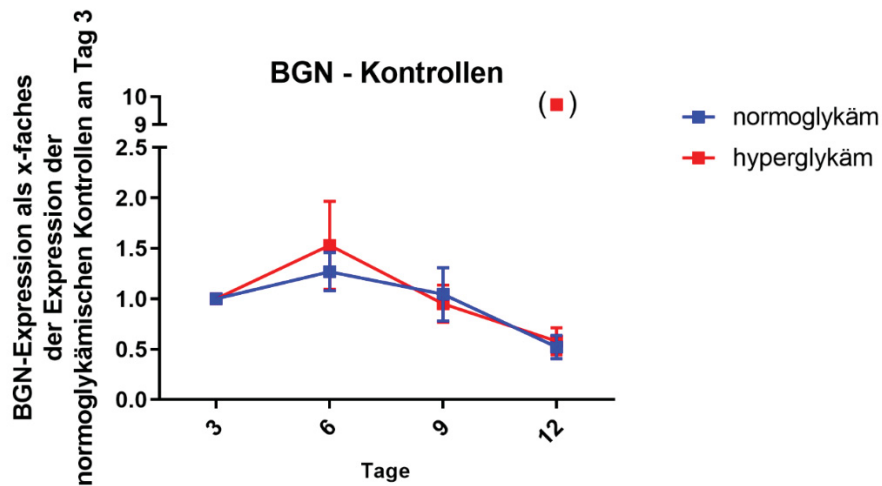


Abb. 17: Vergleich der Biglykan-Expression innerhalb der Kontrollgruppen. Analyse im Zeitverlauf über 12 Tage (dargestellt auf der x-Achse) mit PCR an d 3, 6, 9 und 12. Rot ist die BGN-Expression in der auf hyperglykämischem Medium kultivierten Kontrollgruppe. Blau stellt die BGN-Expression der durchgehend auf normoglykämischem Medium kultivierten Zellen dar. Die Messwerte der BGN-Expression an den d 3,6,9 und 12 zeigen keine signifikanten Unterschiede. normoglykäm = Medium mit niedrigem Glukosegehalt, hyperglykäm = Medium mit hohem Glukosegehalt, BGN = Biglykan, Ausreißer in Klammern markiert

HAS1

Neben BGN wurde in dem gleichen Versuchsaufbau auch die Expression der HAS1-3 bestimmt. Die HAS1-Expression der ovinen VICs, die initial auf dem normoglykämischen Medium kultiviert und auf das hyperglykämische Medium umgestellt wurden, ist zusammen mit der normoglykämischen Kontrollgruppe in Abb. 18 dargestellt.

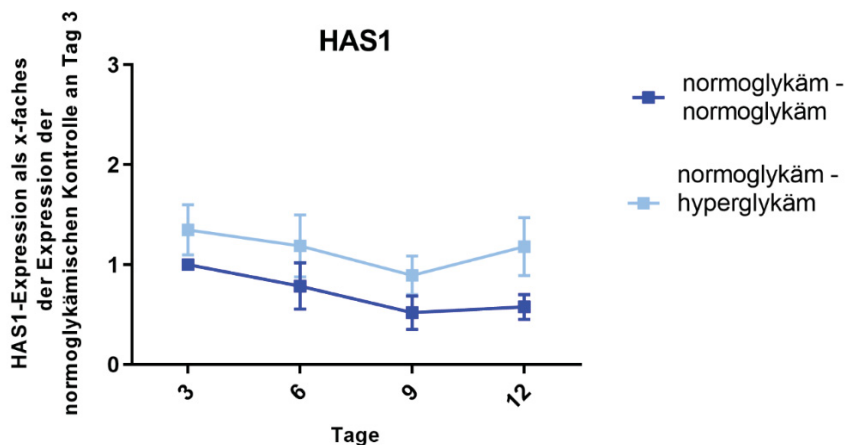


Abb. 18: Die Genexpression der Hyaluronsäuresynthase 1 in ovinen VICs nach Umstellung von normoglykämischem auf hyperglykämisches Medium nach 24 Stunden. Analyse im Zeitverlauf über 12 Tage (dargestellt auf der x-Achse) mit PCR an d 3, 6, 9 und 12. Dunkelblau ist die HAS1-Expression in der auf normoglykämischem Medium gebliebenen Kontrollgruppe. Hellblau stellt die nach 24 h von normoglykämischem auf hyperglykämisches Medium umgesetzten Zellen dar. Die Normierung erfolgte jeweils innerhalb der Kontrollgruppe von d 3. Signifikante Unterschiede in der Ausprägung des HAS1-Gens sind nicht zu erkennen. normoglykäm = Medium mit niedrigem Glukosegehalt, hyperglykäm = Medium mit hohem Glukosegehalt, HAS1 = Hyaluronsäuresynthase 1

Beide Graphen zeigen bis zu d 9 einen nahezu parallelen Verlauf:

d 3 normoglykäm - normoglykäm: 1 ± 0

d 3 normoglykäm - hyperglykäm: $1,347 \pm 0,251$, $p = 0.6986$

d 6 normoglykäm - normoglykäm: $0,785 \pm 0,230$

d 6 normoglykäm - hyperglykäm: $1,186 \pm 0,311$, $p = 0.6133$

d 9 normoglykäm - normoglykäm: $0,519 \pm 0,166$

d 9 normoglykäm - hyperglykäm: $1,179 \pm 0,290$, $p = 0.6410$

An d 12 lässt sich ein Ansteigen der HAS1-Expression im Ansatz normoglykäm - hyperglykäm beobachten, der im Vergleich mit dem normoglykäm - normoglykäm-Ansatz jedoch nicht signifikant ist:

d 12 normoglykäm - normoglykäm: $0,576 \pm 0,124$

d 12 normoglykäm - hyperglykäm: $1,179 \pm 0,290$, $p = 0.1961$

Der primäre Ansatz in einem hyperglykämischen Medium mit Umstellung auf ein normoglykämisches Medium nach 24 h lässt folgende HAS1-Expressionen erkennen (s. Abb. 19):

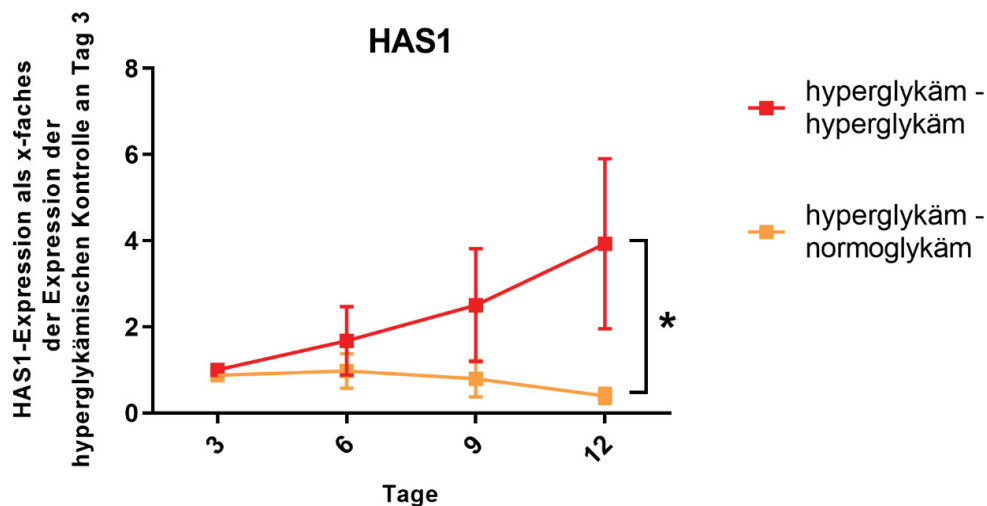


Abb. 19: Die Genexpression der Hyaluronsäuresynthase 1 in ovinen VICs nach Umstellung von hyperglykämischen auf normoglykämischen Medium nach 24 Stunden. Analyse im Zeitverlauf über 12 Tage (dargestellt auf der x-Achse) mit PCR an d 3, 6, 9 und 12. Rot ist die HAS1-Expression in der auf hyperglykämischen Medium gebliebenen Kontrollgruppe. Orange stellt die nach 24 h von hyperglykämischen auf normoglykämischen Medium umgesetzten Zellen dar. Die Normierung erfolgte jeweils innerhalb der Kontrollgruppe von d 3. An d 12 exprimieren die auf hohem Glukosemedium kultivierten Zellen signifikant mehr HAS1 als die auf niedrigem Glukosegehalt ($p = 0,0271$). * = $p < 0,05$, normoglykäm = Medium mit niedrigem Glukosegehalt, hyperglykäm = Medium mit hohem Glukosegehalt, HAS1 = Hyaluronsäuresynthase 1

Die von hyperglykämischem auf normoglykämisches Medium umgestellten Zellen (orangene Kurve) zeigen während der gesamten Versuchsdauer eine niedrige, tendenziell sinkende HAS1-Expression. Im Vergleich dazu steigt die HAS1-Expression bei den während der gesamten Zeit auf hohem Glukosegehalt kultivierten Zellen (rote Kurve) kontinuierlich an:

d 3 hyperglykäm - hyperglykäm: 1 ± 0

d 3 hyperglykäm - normoglykäm: $0,878 \pm 0,151$, $p > 0.9999$

d 6 hyperglykäm - hyperglykäm: $1,676 \pm 0,795$

d 6 hyperglykäm - normoglykäm: $0,976 \pm 0,399$, $p = 0.9630$

d 9 hyperglykäm - hyperglykäm: $2,504 \pm 1,309$

d 9 hyperglykäm - normoglykäm: $0,800 \pm 0,422$, $p = 0.5066$

An d 12 liegt die Genexpression von HAS1 in dem hyperglykäm - hyperglykäm-Ansatz signifikant höher als in den nach 24 h auf normoglykämisches Medium gesetzten Zellen:

d 12 hyperglykäm - hyperglykäm: $3,932 \pm 1,972$

d 12 hyperglykäm - normoglykäm: $0,399 \pm 0,179$, $p = 0.0271$

Korrespondierend mit den vorangehend beschriebenen Ergebnissen zeigt der Vergleich der HAS1-Expression in den jeweiligen Kontrollgruppen bei Gegenüberstellung einen sehr ähnlichen Verlauf der Graphen (s. Abb. 20).

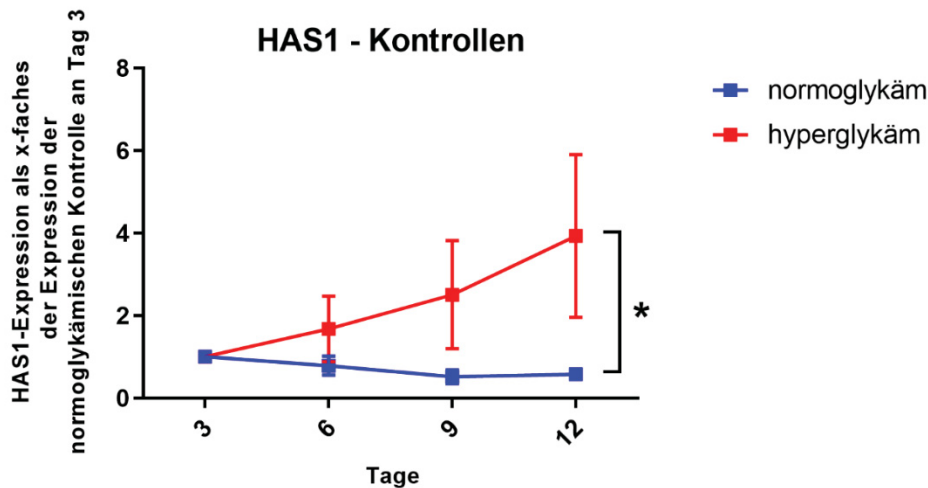


Abb. 20: Vergleich der Hyaluronsäuresynthase 1-Expression innerhalb der Kontrollgruppen. Analyse im Zeitverlauf über 12 Tage (dargestellt auf der x-Achse) mit PCR an d 3, 6, 9 und 12. Rot ist die HAS1-Expression in der auf hyperglykämischem gebliebenen Kontrollgruppe. Blau stellt die HAS1-Expression der durchgehend auf normoglykämischem Medium kultivierten Zellen dar. An d 12 exprimieren die auf hohem Glukosemedium kultivierten Zellen signifikant mehr HAS1 als die kontinuierlich auf niedrigem Glukosegehalt kultivierten Zellen ($p = 0.0321$). * = $p < 0.05$, normoglykäm = Medium mit niedrigem Glukosegehalt, hyperglykäm = Medium mit hohem Glukosegehalt, HAS1 = Hyaluronsäuresynthase 1

Die HAS1-Expression der auf Medium mit niedrigem Glukosegehalt kultivierten Zellen bewegt sich während des Untersuchungszeitraums auf niedrigem Niveau. Im Vergleich hierzu lassen die auf Medium mit hohem Glukosegehalt kultivierten Zellen eine ansteigende HAS1-Expression erkennen, die an d 12 signifikant über der der normoglykämisch kultivierten Zellen liegt:

d 3 normoglykäm - normoglykäm: 1 ± 0

d 3 hyperglykäm - hyperglykäm: 1 ± 0 , $p > 0.9999$

d 6 normoglykäm - normoglykäm: $0,785 \pm 0,230$

d 6 hyperglykäm - hyperglykäm: $1,676 \pm 0,795$, $p = 0.9190$

d 9 normoglykäm - normoglykäm: $0,519 \pm 0,166$

d 9 hyperglykäm - hyperglykäm: $2,504 \pm 1,309$, $p = 0.3296$

d 12 normoglykäm - normoglykäm: $0,576 \pm 0,124$

d 12 hyperglykäm - hyperglykäm: $3,932 \pm 1,972$, $p = 0.0321$

HAS2

Im Folgenden (s. Abb. 21) werden die Ergebnisse der HAS2-Expression dargestellt.

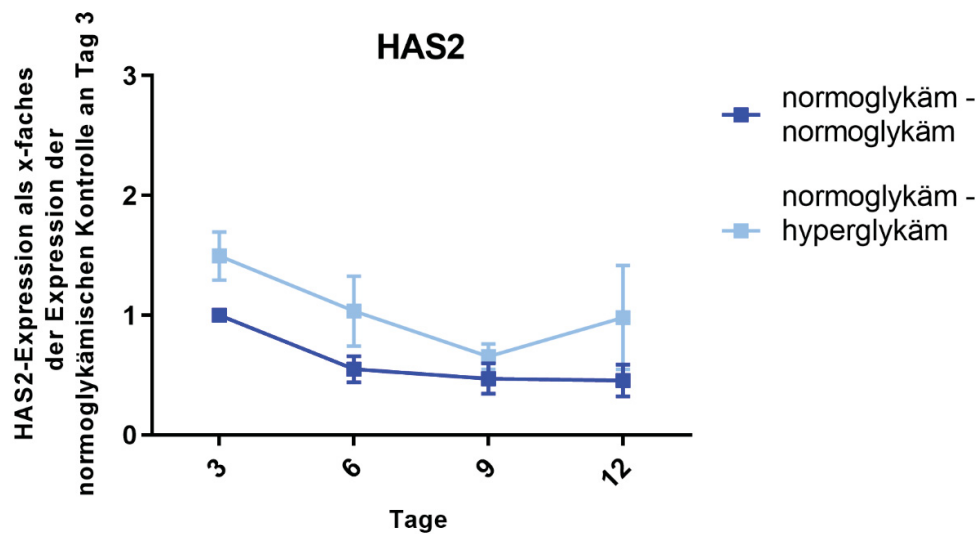


Abb. 21: Die Genexpression der Hyaluronsäuresynthase 2 in ovinen VICs nach Umstellung von normoglykämischem auf hyperglykämisches Medium nach 24 Stunden. Analyse im Zeitverlauf über 12 Tage (dargestellt auf der x-Achse) mit PCR an d 3, 6, 9 und 12. Dunkelblau ist die HAS2-Expression in der auf normoglykämischem Medium gebliebenen Kontrollgruppe. Hellblau stellt die nach 24 h von normoglykämischem auf hyperglykämisches Medium umgesetzten Zellen dar. Die Normierung erfolgte jeweils innerhalb der Kontrollgruppe von d 3. Signifikante Unterschiede in der Ausprägung des HAS2-Gens sind nicht zu erkennen. normoglykäm = Medium mit niedrigem Glukosegehalt, hyperglykäm = Medium mit hohem Glukosegehalt, HAS2 = Hyaluronsäuresynthase 2

Die initiale Kultivierung auf einem normoglykämischen Medium mit nachfolgendem Wechsel nach 24 h auf ein hyperglykämisches Medium lässt an d 6 und 9 in beiden Ansätzen einen Abfall der HAS2-Expression erkennen:

d 3 normoglykäm - normoglykäm: 1 ± 0

d 3 normoglykäm - hyperglykäm: $1,493 \pm 0,201$, $p = 0.3823$

d 6 normoglykäm - normoglykäm: $0,548 \pm 0,108$

d 6 normoglykäm - hyperglykäm: $1,033 \pm 0,290$, $p = 0.4385$

d 9 normoglykäm - normoglykäm: $0,470 \pm 0,127$

d 9 normoglykäm - hyperglykäm: $0,653 \pm 0,106$, $p = 0.9599$

An d 12 kann wieder eine erhöhte HAS2-Expression im Ansatz normoglykäm - hyperglykäm detektiert werden. Im Vergleich mit dem normoglykäm - normoglykäm-Ansatz ist dieser Unterschied jedoch nicht signifikant:

d 12 normoglykäm - normoglykäm: $0,454 \pm 0,133$

d 12 normoglykäm - hyperglykäm: $0,980 \pm 0,433$, $p = 0.3201$ (s. Abb. 21)

Abb. 22 zeigt die HAS2-Expression im primären hyperglykämischen Ansatz. Nach Umstellung nach 24 h auf das normoglykämische Medium lässt sich initial ein leichter Abfall und nachfolgender Wiederanstieg der HAS2-Expression beobachten. Bei durchgehender Kultivierung der Zellen auf hyperglykämischem Medium liegt die Expression insgesamt höher mit einem statistisch signifikanten Unterschied an d 9 (s. Abb. 22):

d 3 hyperglykäm - hyperglykäm: 1 ± 0

d 3 hyperglykäm - normoglykäm: $0,604 \pm 0,124$, $p = 0.4097$

d 6 hyperglykäm - hyperglykäm: $0,689 \pm 0,177$

d 6 hyperglykäm - normoglykäm: $0,493 \pm 0,076$, $p = 0.9028$

d 9 hyperglykäm - hyperglykäm: $1,094 \pm 0,372$

d 9 hyperglykäm - normoglykäm: $0,260 \pm 0,077$, $p = 0.0073$

d 12 hyperglykäm - hyperglykäm: $0,980 \pm 0,273$

d 12 hyperglykäm - normoglykäm: $0,511 \pm 0,106$, $p = 0.3340$

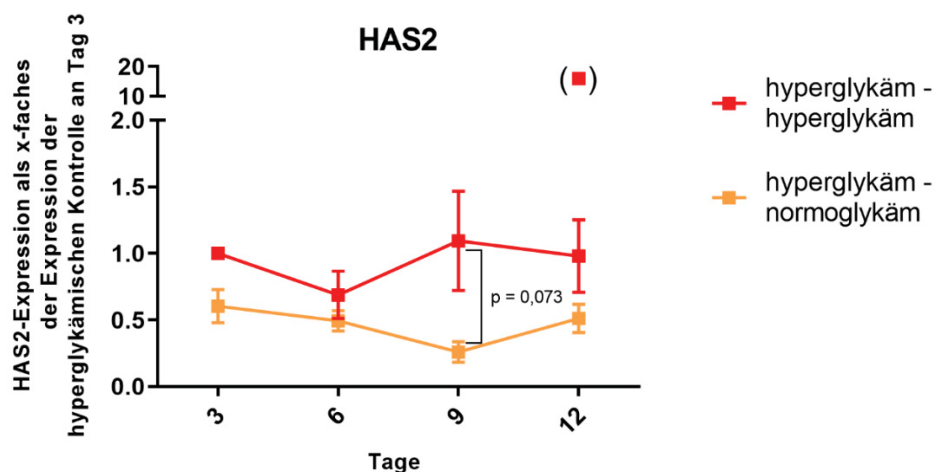


Abb. 22: Die Genexpression der Hyaluronsäuresynthase 2 in ovinen VICs nach Umstellung von hyperglykämischem auf normoglykämisches Medium nach 24 Stunden. Analyse im Zeitverlauf über 12 Tage (dargestellt auf der x-Achse) mit PCR an d 3, 6, 9 und 12. Rot ist die HAS2-Expression in der auf hyperglykämischem Medium gebliebenen Kontrollgruppe. Orange stellt die nach 24 h von hyperglykämischem auf normoglykämisches Medium umgesetzten Zellen dar. Die Normierung erfolgte jeweils innerhalb der Kontrollgruppe von d 3. An d 9 exprimieren die auf hohem Glukosemedium kultivierten Zellen deutlich mehr HAS2 als die auf niedrigem Glukosegehalt ($p = 0.073$). normoglykäm = Medium mit niedrigem Glukosegehalt, hyperglykäm = Medium mit hohem Glukosegehalt, HAS2 = Hyaluronsäuresynthase 2, Ausreißer in Klammern markiert

Die Gegenüberstellung der HAS2-Expression der jeweiligen Kontrollgruppen ist in Abb. 23 veranschaulicht.

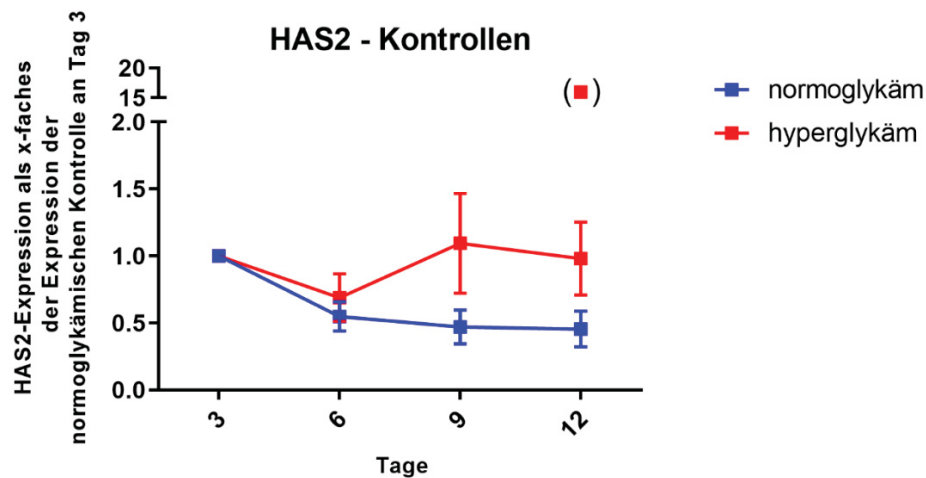


Abb. 23: Vergleich der Hyaluronsäuresynthase 2-Expression innerhalb der Kontrollgruppen. Analyse im Zeitverlauf über 12 Tage (dargestellt auf der x-Achse) mit PCR an d 3, 6, 9 und 12. Rot ist die HAS2-Expression in der auf hyperglykämischen Medium gebliebenen Kontrollgruppe. Blau stellt die HAS2-Expression der durchgehend auf normoglykämischen Medium kultivierten Zellen dar. Signifikante Unterschiede in der Ausprägung des HAS2-Gens lassen sich nicht finden. normoglykäm: Medium mit niedrigem Glukosegehalt, hyperglykäm = Medium mit hohem Glukosegehalt, HAS2 = Hyaluronsäuresynthase 2, Ausreißer in Klammern markiert

Tendenziell liegt die HAS2-Expression in den auf hyperglykämischen Medium kultivierten VICs ab d 6 höher als in der normoglykämischen Kontrollgruppe, signifikante Unterschiede in der Ausprägung des HAS2-Gens finden sich aber zu keinem Zeitpunkt des Experiments:

d 3 normoglykäm - normoglykäm: 1 ± 0

d 3 hyperglykäm - hyperglykäm: 1 ± 0 , $p > 0.9999$

d 6 normoglykäm - normoglykäm: $0,548 \pm 0,108$

d 6 hyperglykäm - hyperglykäm: $0,689 \pm 0,177$, $p = 0.9751$

d 9 normoglykäm - normoglykäm: $0,470 \pm 0,127$

d 9 hyperglykäm - hyperglykäm: $1,094 \pm 0,372$, $p = 0.0745$

d 12 normoglykäm - normoglykäm: $0,454 \pm 0,133$

d 12 hyperglykäm - hyperglykäm: $0,980 \pm 0,273$, $p = 0.2466$

HAS3

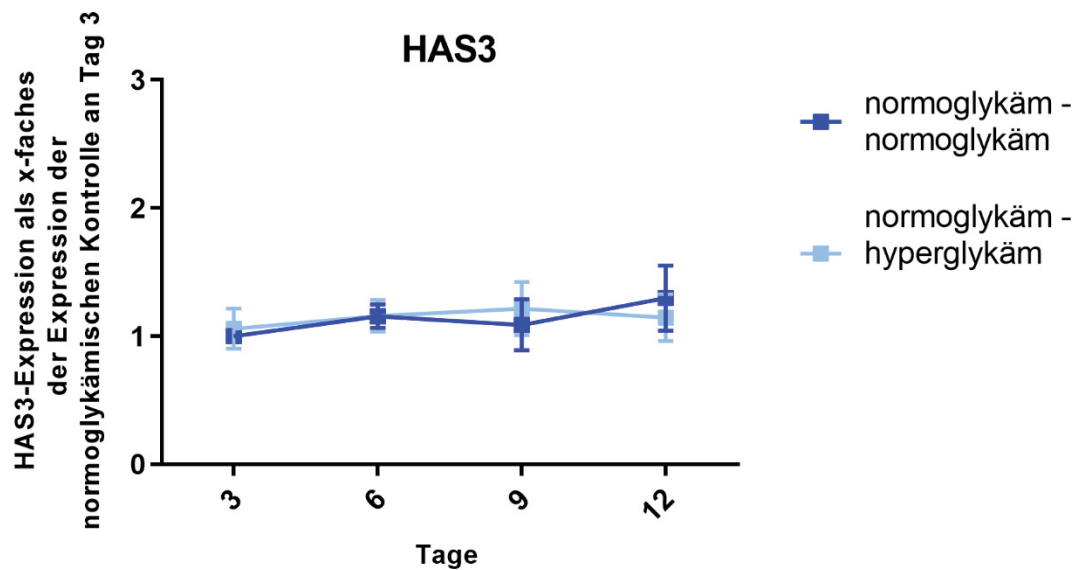


Abb. 24: Die Genexpression der Hyaluronsäuresynthase 3 in ovinen VICs nach Umstellung von normoglykämischem auf hyperglykämisches Medium nach 24 Stunden. Analyse im Zeitverlauf über 12 Tage (dargestellt auf der x-Achse) mit PCR an d 3, 6, 9 und 12. Dunkelblau ist die HAS3-Expression in der auf normoglykämischem Medium gebliebenen Kontrollgruppe. Hellblau stellt die nach 24 h von normoglykämischem auf hyperglykämisches Medium umgesetzten Zellen dar. Die Normierung erfolgte jeweils innerhalb der Kontrollgruppe von d 3. Signifikante Unterschiede in der Ausprägung des HAS3-Gens sind nicht zu erkennen. normoglykäm = Medium mit niedrigem Glukosegehalt, hyperglykäm = Medium mit hohem Glukosegehalt, HAS3 = Hyaluronsäuresynthase 3

Abb. 24 zeigt die HAS3-Expression von ovinen VICs, die zu Beginn auf normoglykämischem Medium kultiviert wurden. Die Umstellung auf ein hyperglykämisches Medium nach 24 h führt im Vergleich mit der Fortführung der Kultur auf einem normoglykämischen Medium an allen Messzeitpunkten nur zu diskreten Unterschieden der HAS3-Expression ohne statistische Signifikanz:

d 3 normoglykäm - normoglykäm: 1 ± 0

d 3 normoglykäm - hyperglykäm: $1,057 \pm 0,156$, $p = 0.9988$

d 6 normoglykäm - normoglykäm: $1,155 \pm 0,091$

d 6 normoglykäm - hyperglykäm: $1,157 \pm 0,125$, $p > 0.9999$

d 9 normoglykäm - normoglykäm: $1,087 \pm 0,199$

d 9 normoglykäm - hyperglykäm: $1,214 \pm 0,207$, $p = 0.9742$

d 12 normoglykäm - normoglykäm: $1,296 \pm 0,254$

d 12 normoglykäm - hyperglykäm: $1,144 \pm 0,183$, $p = 0.9519$

Während der gesamten Zeit findet demnach eine fast konstante HAS3-Expression unabhängig des verwendeten Mediums statt.

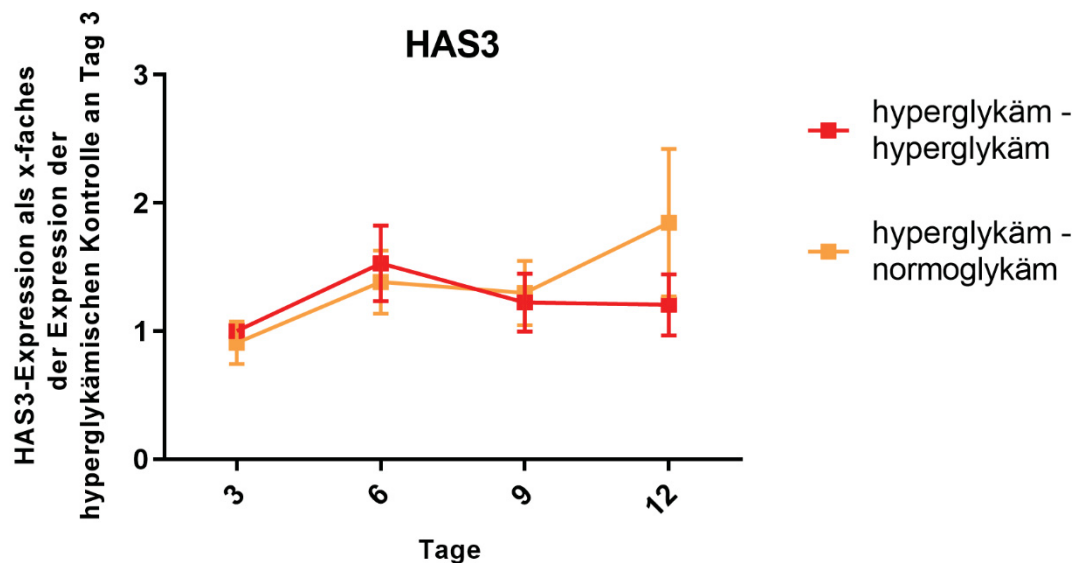


Abb. 25: Die Genexpression der Hyaluronsäuresynthase 3 in ovinen VICs nach Umstellung von hyperglykämischem auf normoglykämisches Medium nach 24 Stunden. Analyse im Zeitverlauf über 12 Tage (dargestellt auf der x-Achse) mit PCR an d 3, 6, 9 und 12. Rot ist die HAS3-Expression in der auf hyperglykämischem Medium gebliebenen Kontrollgruppe. Orange stellt die nach 24 h von hyperglykämischem auf normoglykämisches Medium umgesetzten Zellen dar. Die Normierung erfolgte jeweils innerhalb der Kontrollgruppe von d 3. Signifikante Unterschiede in der Ausprägung des HAS3-Gens lassen sich nicht erkennen. normoglykäm = Medium mit niedrigem Glukosegehalt, hyperglykäm = Medium mit hohem Glukosegehalt, HAS3 = Hyaluronsäuresynthase 3

Bei primärer Kultivierung auf einem hyperglykämischen Medium liegt die HAS3-Expression an d 6 und 9 bei Fortführung der Mediumgabe in nahezu der gleichen Größe wie in den nach 24 h auf normoglykämisches Medium umgestellten Zellen. An d 12 lässt sich in der normoglykämischen Kultur eine höhere Expression messen, jedoch ohne, dass eine statistische Signifikanz vorliegt (s. Abb. 25):

d 3 hyperglykäm - hyperglykäm: 1 ± 0

d 3 hyperglykäm - normoglykäm: $0,909 \pm 0,165$, $p = 0.9991$

d 6 hyperglykäm - hyperglykäm: $1,529 \pm 0,294$

d 6 hyperglykäm - normoglykäm: $1,383 \pm 0,246$, $p = 0.9942$

d 9 hyperglykäm - hyperglykäm: $1,223 \pm 0,227$

d 9 hyperglykäm - normoglykäm: $1,299 \pm 0,521$, $p = 0.9996$

d 12 hyperglykäm - hyperglykäm: $1,205 \pm 0,239$

d 12 hyperglykäm - normoglykäm: $1,847 \pm 0,575$, $p = 0.4518$

Beim Vergleich beider Kontrollgruppen (siehe Abb. 26) präsentiert sich auch hier ein ähnlicher Verlauf beider Kurven. Die HAS3-Expression an d 6 ist in der hyperglykämischen Gruppe diskret höher ausgeprägt als in der normoglykämischen Gruppe. Einen signifikanten Unterschied findet man hier jedoch nicht:

d 3 normoglykäm - normoglykäm: 1 ± 0

d 3 hyperglykäm - hyperglykäm: 1 ± 0 , $p > 0.9999$

d 6 normoglykäm - normoglykäm: $1,155 \pm 0,091$

d 6 hyperglykäm - hyperglykäm: $1,529 \pm 0,294$, $p = 0.5851$

d 9 normoglykäm - normoglykäm: $1,087 \pm 0,199$

d 9 hyperglykäm - hyperglykäm: $1,223 \pm 0,227$, $p = 0.9799$

d 12 normoglykäm - normoglykäm: $1,296 \pm 0,254$

d 12 hyperglykäm - hyperglykäm: $1,205 \pm 0,239$, $p = 0.9962$

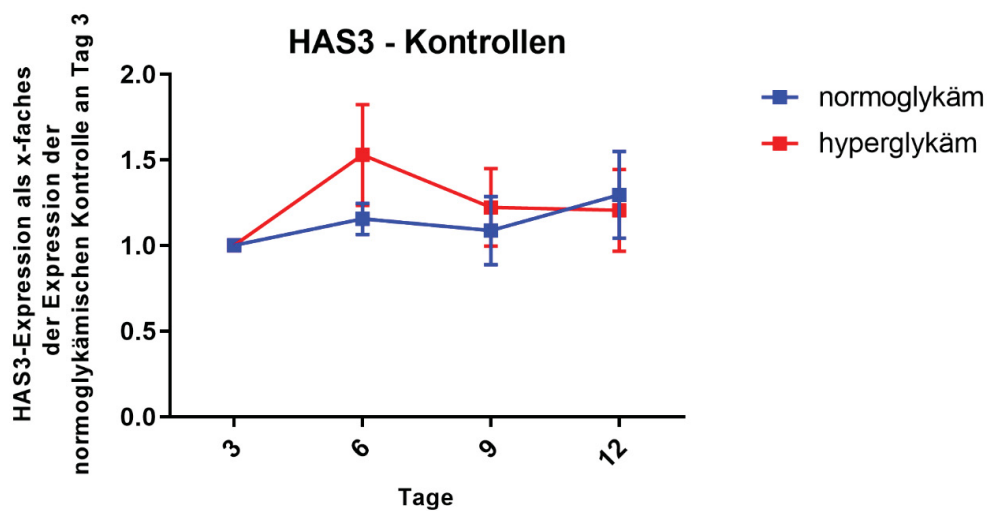


Abb. 26: Vergleich der Hyluronsäuresynthase 3-Expression innerhalb der Kontrollgruppen. Analyse im Zeitverlauf über 12 Tage (dargestellt auf der x-Achse) mit PCR an d 3, 6, 9 und 12. Rot ist die HAS3-Expression in der auf hyperglykämischen Medium gebliebenen Kontrollgruppe. Blau stellt die HAS3-Expression der durchgehend auf normoglykämischen Medium kultivierten Zellen dar. Signifikante Unterschiede in der Ausprägung des HAS3-Gens lassen sich nicht finden. normoglykäm = Medium mit niedrigem Glukosegehalt, hyperglykäm = Medium mit hohem Glukosegehalt, HAS3 = Hyaluronsäuresynthase 3

3.4.2 Der HA-Gehalt der ovinen VICs an d 12

Da die Genexpression auch durch posttranskriptionelle Prozesse beeinflusst wird, erfolgte an d 12 eine Analyse auf Proteinebene. Hierzu wurden die verschiedenen Kulturansätze mittels HA-ELISA untersucht. Aufgrund begrenzter Ressourcen bei der Verfügbarkeit der HA-ELISA-Kits gingen in die Auswertung jeweils nur fünf Zellkulturansätze ein. Die Normierung des HA-Gehalts erfolgte auf den Gesamtproteingehalt des jeweiligen Zellkulturansatzes.

Abb. 27 stellt als Boxplot-Diagramm den HA-Gehalt der ovinen VICs an d 12 bei durchgehender Kultivierung auf normoglykämischem oder hyperglykämischem Medium dar.

HA-Menge bei konstantem Glukosegehalt

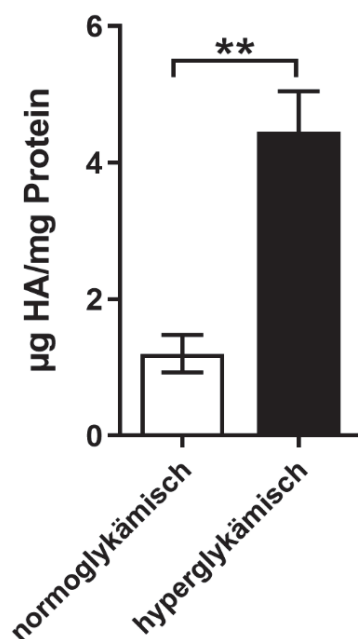


Abb. 27: Hyaluronsäuregehalt in ovinen VICs an Tag 12 nach Kultivierung auf normoglykämischem und hyperglykämischem Medium. Die HA-Menge ist in hyperglykämischen Ansätzen signifikant höher als in normoglykämischen Ansätzen ($p = 0.0079$). ** = $p < 0.01$, μg = Mikrogramm, mg = Milligramm, normoglykämisch = Kontrollgruppe kultiviert auf Medium mit niedrigem Glukosegehalt, hyperglykämisch = Kontrollgruppe kultiviert auf Medium mit hohem Glukosegehalt, HA = Hyaluronsäure

In der hyperglykämischen Kontrollgruppe lässt sich ein signifikant höherer HA-Gehalt nachweisen als in der normoglykämischen Kontrollgruppe (normoglykäm: $1,20 \pm 0,27 \mu\text{g HA/mg Protein}$, hyperglykäm: $4,45 \pm 0,60 \mu\text{g HA/mg Protein}$, $p = 0.0079$).

In Abb. 28 ist der HA-Gehalt der Zellen mit primärer Kultivierung auf einem normoglykämischen Medium dargestellt sowie der HA-Gehalt der Zellen, die nach 24 h auf ein hyperglykämisches Medium umgestellt wurden.

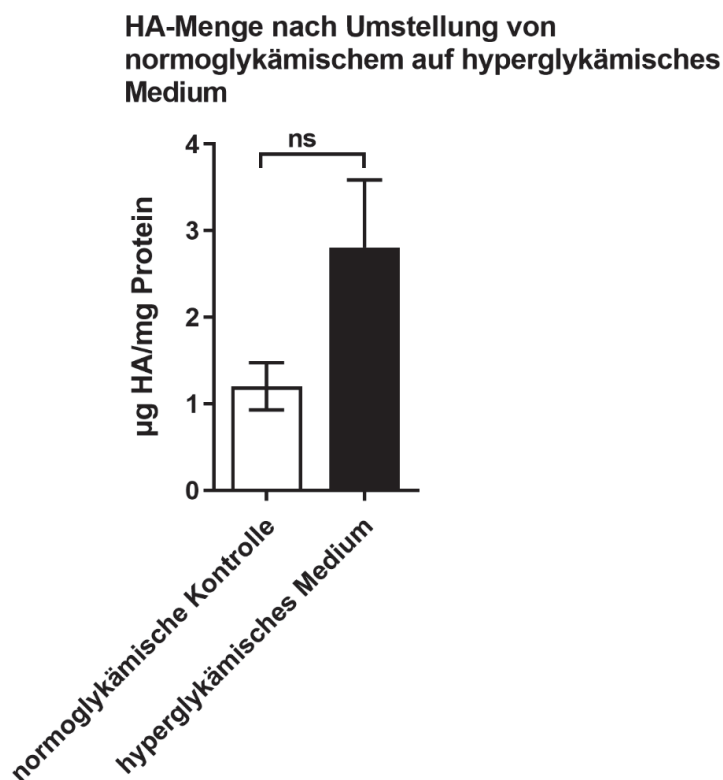


Abb. 28: Hyaluronsäuregehalt in ovinen VICs an Tag 12 nach Kultivierung auf normoglykämischem Medium und nach Umstellung auf hyperglykämisches Medium nach 24 Stunden. Eine signifikante Mehrexpression unter hyperglykämischen Bedingungen findet sich nicht, jedoch ein Trend dorthin ($p = 0.0952$). μg = Mikrogramm, mg = Milligramm, normoglykämische Kontrolle = Kontrollgruppe auf Medium mit niedrigem Glukosegehalt kultiviert, hyperglykämisches Medium = Zellen nach 24 h auf hyperglykämischem Medium kultiviert, HA = Hyaluronsäure, ns = nicht signifikant

Eine Signifikanz zwischen den HA-Mengen besteht nicht ($p = 0.0952$), ein Trend zugunsten einer Mehrexpression in der auf hyperglykämisches Medium umgestellten Kultur wird jedoch erkennbar (hyperglykämisches Medium: $2,806 \pm 0,779 \mu\text{g HA/mg Protein}$, normoglykämische Kontrolle: $1,202 \pm 0,2732 \mu\text{g HA/mg Protein}$).

Die primäre Zellkultivierung auf einem hyperglykämischen Medium führt bei Fortführung der Gabe dieses Mediums bis d 12 zu signifikant höheren HA-Mengen als sich diese in Gruppen mit dem Wechsel auf normoglykämisches Medium nach 24 h beobachten lassen (s. Abb. 29) (hyperglykämische Kontrolle: $4,45 \pm 0,60$ μg HA/mg Protein, normoglykämisches Medium: $1,63 \pm 0,47$ μg HA/mg Protein, $p = 0.0159$).

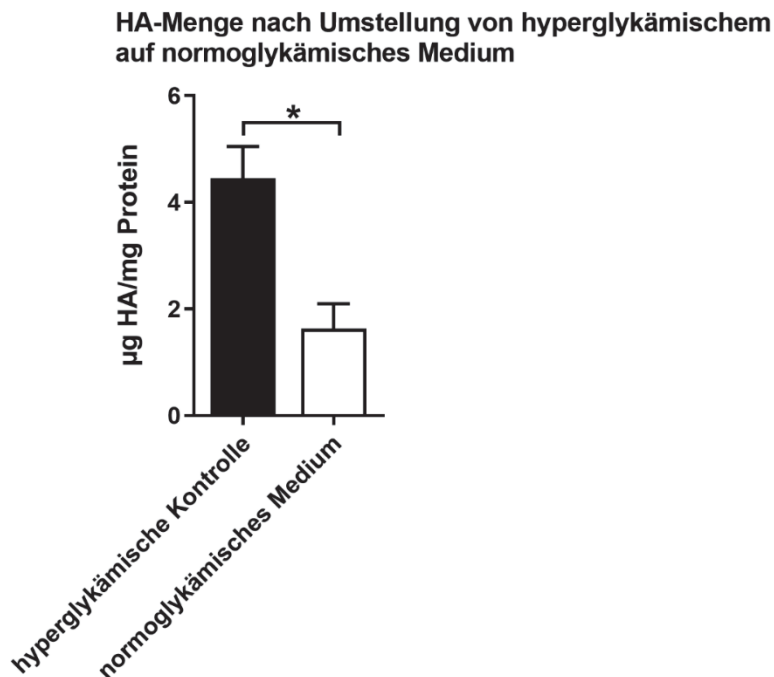


Abb. 29: Hyaluronsäuregehalt in ovinen VICs an Tag 12 nach Kultivierung auf hyperglykämischem Medium und nach Umstellung auf normoglykämisches Medium nach 24 Stunden. Es findet sich eine signifikant höhere Bildung von Hyaluronsäure unter hyperglykämischen Bedingungen ($p = 0.0159$). μg = Mikrogramm, mg = Milligramm, hyperglykämische Kontrolle = Kontrollgruppe auf hyperglykämischem Medium kultiviert, normoglykämisches Medium = Zellen auf normoglykämisches Medium umgestellt, HA = Hyaluronsäure, * = $p < 0.05$ (statistisch signifikant)

3.5 Inhibition der HA durch das HA-hemmende Peptid Pep1 in einem *in vitro*-Modell an ovinen VICs

Aus den an d 10 geernteten ovinen VICs wurde aus jeder der 6 Gruppen sowohl die Kalziumkonzentration als auch die Gesamtproteinmenge bestimmt. Die Menge an Kalzium wurde auf die Menge an Gesamtprotein bezogen und die Ergebnisse so in μg Kalzium/mg Protein angegeben. In Abb. 30 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

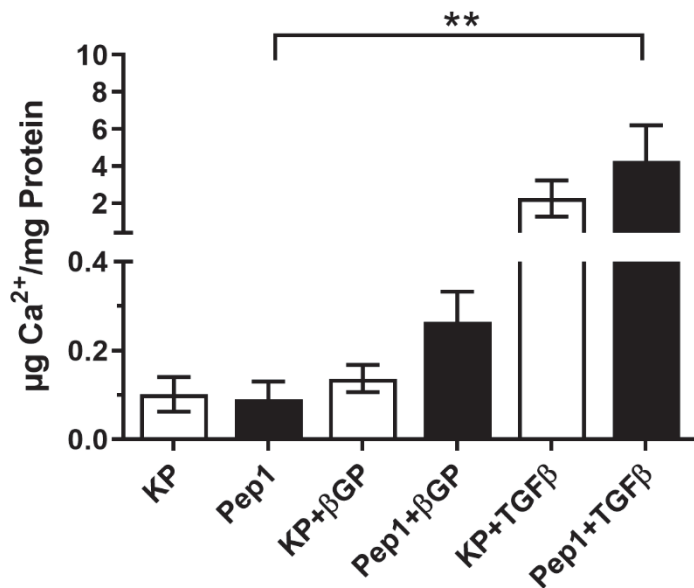


Abb. 30: Kalziumkonzentrationen des *in vitro* Pep1-/Kontrollpeptid-Versuchs. Unter kalzifizierendem Medium bilden mit Pep1 behandelte ovine VICs signifikant mehr Kalzium als ohne Kalzifizierungsreiz ($p = 0,0075$). Ca²⁺ = Kalzium, mg = Milligramm, KP = Kontrollpeptid, Pep1 = Hyaluronsäure-inhibierendes Peptid, β-GP = beta-Glycerophosphat-Medium, TGFβ = transforming growth factor beta-Medium, ** = $p < 0.01$ (signifikant)

Der auf die Gesamtmenge Protein standardisierte Kalziumgehalt weist bei alleiniger Kultivierung der Zellen auf dem Grundmedium und Zusatz von KP oder Pep1 keine signifikanten Unterschiede auf (Grundmedium mit KP: $0,1013 \pm 0,03898$, Grundmedium mit Pep 1: $0,9067 \pm 0,03932$ µg Ca²⁺/mg Protein, $p > 0.9999$).

Auch bei Anzucht der Zellen auf einem β-GP-Medium lassen sich zwischen dem KP- und dem Pep1-Ansatz keine signifikanten Differenzen erkennen (β-GP-Medium mit KP: $0,1368 \pm 0,03087$ µg Ca²⁺/mg Protein, β-GP-Medium mit Pep 1: $0,2638 \pm 0,0688$ µg Ca²⁺/mg Protein, $p > 0.9999$). Gleiches gilt ebenso für die Kultivierung auf TGF-β-Medium. Letzteres Medium führt sowohl in der KP- als auch in der Pep1-Population zu einer gesteigerten Kalziumkonzentration. Diese weist zwischen den beiden Ansätzen keinen signifikanten Unterschied auf (TGF-β-Medium mit Pep1: $4,281 \pm 1,931$ µg Ca²⁺/mg Protein, TGF-β-Medium mit KP: $2,252 \pm 0,9841$ µg Ca²⁺/mg Protein, $p > 0.9999$). Für die mit Pep1 behandelten Zellen ergibt sich jedoch im Vergleich zu der auf Grundmedium kultivierten Population ein signifikant höherer Kalziumgehalt (TGF-β-Medium mit Pep1: $4,281 \pm 1,931$ µg Ca²⁺/mg Protein, Grundmedium mit Pep1: $0,9067 \pm 0,03932$ µg Ca²⁺/mg Protein, $p = 0.0075$).

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Ergebnisse

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klärung der Fragestellung, ob sich Unterschiede in der Genexpression verschiedener Bestandteile der ECM humaner Aortenklappentaschen zwischen frühen (fibrotischen) und späten (kalzifizierten) Stadien der Degeneration finden. Zudem sollte untersucht werden, ob sich die Genexpression der ECM-Bestandteile zwischen Diabetikern und Nicht-Diabetikern unterscheidet.

Hierzu wurde die mRNA-Expression der SLRPs BGN, DCN und LUM, des PGs VER, der chonroosteogenen Marker SPP1 und ALPL sowie der HAS1-3 analysiert. Auf Proteinebene wurde der Gehalt an HA quantifiziert.

Zur Klärung der zusätzlichen Fragestellung, ob sich die in die PCR- und HA-ELISA-Analysen herangezogenen Patientenkollektive von Diabetikern und Nicht-Diabetikern unterscheiden, wurden bei entsprechenden Patienten Vorerkrankungen, Risikofaktoren und weitere individuelle Parameter verglichen.

Weiterhin sollte in einem *in vitro*-Modell überprüft werden, ob hyperglykämische Bedingungen, wie sie bei einem DM anzunehmen sind, zu einer veränderten Expression von BGN und HAS1-3 führen und ob sich der tatsächliche HA-Gehalt auf Proteinebene von der HAS-Expression unterscheidet. Auch die Auswirkungen einer HA-Inhibition auf die Kalzifizierung oviner VICs sollten *in vitro* demonstriert werden.

Patientendaten

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit des analysierbaren Materials (resezierte Aortenklappentaschen) variieren die Gruppengrößen der PCR- und HA-ELISA-Kohorte. Für nähere Angaben hierzu darf auf den Teil Material und Methoden dieser Arbeit in Kapitel 2 verwiesen werden.

Statistische Auffälligkeiten in der PCR-Kohorte sind in der kleineren HA-ELISA-Kohorte geringer ausgeprägt oder verfehlen das Signifikanzniveau.

Insgesamt fällt auf, dass das Patientenalter im Falle einer Aortenklappenkalzifikation höher liegt als im Falle einer Klappenfibrose. Dies stützt das Modell eines im Alterungsprozess voranschreitenden Degenerationsprozesses bei betroffenen Patienten, dessen Folge-/Endstadium die Aortenklappenkalzifikation darstellt. Im untersuchten Kollektiv lag das Durchschnittsalter der Patienten mit Klappenkalzifizierung > 70 Jahre, was sich mit Daten aus der Literatur deckt [17].

T2DM-Patienten sowohl mit fibrotischen als auch mit kalzifizierten Aortenklappentaschen weisen einen höheren BMI auf als Nicht-T2DM-Patienten. In der größeren PCR-Kohorte liegt der durchschnittliche BMI bei T2DM-Patienten mit

kalzifizierten Klappentaschen mit 31,5 kg/m² im Bereich einer Adipositas I°, bei T2DM-Patienten mit fibrotischen Klappentaschen liegt der BMI in dieser Kohorte mit 29,5 kg/m² im Übergangsbereich Präadipositas zu Adipositas I°. Nicht-T2DM-Patienten in allen Degenerationsformen weisen in Bezug auf den durchschnittlichen BMI eine Präadipositas auf. Die Beobachtung, dass T2DM-Patienten eine höhere Prävalenz für Adipositas haben, stimmt mit klinischen Erfahrungen überein und spiegelt sich auch in einer höheren Typ 2-Diabetes-Prävalenz bei Adipositas wieder [149].

Im untersuchten PCR-Studienkollektiv unterziehen sich T2DM-Patienten mit kalzifizierten Aortenklappentaschen in signifikant jüngerem Lebensalter einem chirurgischen Eingriff als Nicht-T2DM-Patienten. Dies legt nahe, dass ein T2DM als Grunderkrankung degenerationsfördernd wirken könnte. Darüber hinaus ist denkbar, dass auch mit einem DM assoziiert auftretende Erkrankungen Progressionsfaktoren der Aortenklappendegeneration sein könnten. In dieser Studie wiesen T2DM-Patienten in definierten Kohorten signifikant häufiger extrakardiale Gefäßerkrankungen (PCR-Kohorte mit Klappentaschenfibrose), eine Dyslipoproteinämie (PCR-Kohorte mit Klappentaschenfibrose) und höhere Plasma-Triglyzerid-Werte auf. Ebenso werden Statine signifikant häufiger von T2DM-Patienten in der PCR-Kohorte in allen Degenerationsformen eingenommen.

Da bei der Auswahl der Klappentaschen bewusst stark verkalkte Proben ausgewählt wurden, war es zu erwarten, dass das führende Vitium unabhängig vom Vorliegen eines T2DM bei allen Patienten in der PCR- und HA-Kohorte die Stenose darstellte.

BGN

In dieser Studie zeigte sich die BGN-Expression in frühen Degenerationsstadien humaner Aortenklappen signifikant hochreguliert [148]. Gleiches fanden Derbali et al. in einer Untersuchung an 87 Patienten mit degenerierten Aortenklappen heraus, die sich aufgrund einer hieraus resultierenden Aortenklappenstenose einem Klappenersatz unterzogen [55].

Von der Pathophysiologie der zur Aortenklappendegeneration ähnlichen Atherosklerose ist bekannt, dass BGN mit seiner negativ geladenen GAG-Kette eine hohe Affinität zur Bindung der positiv geladenen Aminosäureketten von LDL besitzt [150, 151] und als ein Mediator der Lipidretention fungiert [51]. Derbali et al. fanden heraus, dass BGN in kalzifizierten Aortenklappen gehäuft sowohl mit dem Phospholipidtransferprotein (PLTP), als auch mit oxLDL zusammen in der Fibrosa vorlag. Auch zeigte sich in der Studie eine positive Korrelation von PLTP- und BGN-Expression [55].

Die BGN-Wirkung scheint, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, maßgeblich über die TLR-2 und 4 vermittelt zu werden [35, 55]. TLR fanden sich in stenosierte Aortenklappen

sowie in valvulären Interstitialzellen und werden unter anderem von Immunzellen wie z.B. Makrophagen exprimiert [35, 65, 152].

Song et al. konnten in humanen Aortenklappenzellen nachweisen, dass BGN über TLR zu einer Hochregulation von BMP-2 und TGF β -1 führt, über die eine pro-osteogene Umwandlung der Zellen initiiert wird. In der Vermittlung der pro-osteogenen Wirkung spielen Smad-Signalwege eine zentrale Rolle [153].

Die gleiche pro-osteogene Wirkung von BGN über Smad-Signaltransduktionskaskaden wurde bereits in der extrazellulären Knochenmatrix nachgewiesen. Dort fördert es die Differenzierung von Osteoblasten und wirkt pro-mineralisierend [154, 155]. Hingegen wiesen BGN-*knockout*-Mäuse weniger Knochenmasse auf und zeigten einen Osteoporose-ähnlichen Phänotypen [156, 157].

Auch die Kalzifizierung der humanen Aortenklappe ist mit einem Osteoblasten-modulierten Prozess ähnlich der Knochenbildung assoziiert [158].

Übertragen auf die Hochregulation von BGN gerade in frühen Stadien der Aortenklappendegeneration könnte dies auf eine aktive, pro-degenerative Rolle von BGN im Kalzifizierungsprozess hindeuten.

Die Tatsache, dass BGN in *vitro* proliferierende Eigenschaften bezogen auf verschiedene Zelltypen besitzt [49] und insbesondere frühe Degenerationsstadien durch eine Zunahme der Taschenstärke infolge einer hohen ECM-Synthese und Proliferation der valvulären Interstitialzellen gekennzeichnet sind [151], ist mit der Hochregulation der BGN-Expression in fibrotischen Stadien vereinbar.

In dieser Studie fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der BGN-Expression der Klappentaschen von T2DM- und Nicht-T2DM-Patienten. Dies lässt mutmaßen, dass ein T2DM keinen Einfluss auf die BGN-Expression hat. Die bisherige Studienlage zum Einfluss hoher Glukoselevel auf die Expression von PGs weist heterogene Resultate auf. Diverse nicht-valvuläre Zelltypen zeigten *in vitro* unter hohen Glukosekonzentrationen im Kulturmedium ebenfalls keine veränderte PG-Expression [159]. In kultivierten humanen Umbilicalvenen-Endothelzellen konnten Gharagozian et al. eine verminderte PG-Sekretion bei hohem Glukosegehalt dokumentieren [160], hingegen fanden sich in den Plazenten von Frauen mit einem Gestationsdiabetes und in kultivierten Trophoblastenzellen ein erhöhter Gehalt von BGN und DCN unter hyperglykämischen Bedingungen [161].

In den von uns zusätzlich durchgeführten Zellkulturexperimenten an ovinen VICs fand sich ebenso kein Einfluss der Glukosekonzentration im Kulturmedium auf die BGN-Expression. Die geringe Gruppengröße in diesem Experiment (n=7), zu berücksichtigende Speziesunterschiede und der Wegfall weiterer DM-assoziierter metabolischer Faktoren sind bei hypothetischen Übertragungen auf pathogenetische

Konzepte bei Patienten mit degenerativen Aortenklappenerkrankungen jedoch kritisch zu berücksichtigen.

DCN

Auch DCN fand sich in fibrotischen Aortenklappentaschen von Nicht-T2DM-Patienten statistisch signifikant höher exprimiert als in kalzifizierten Aortenklappentaschen von Nicht-T2DM-Patienten [148]. Keine Signifikanzen ließen sich hingegen in der DCN-Expression zwischen fibrotischen und kalzifizierten Aortenklappen von T2DM-Patienten nachweisen. Vorangegangene Studien beschrieben eine vermehrte Anwesenheit von DCN in kalzifizierenden Aortenklappen bzw. in der Umgebung von Kalzifikationsherden [65, 66].

Unklar hierbei ist, welche Rolle DCN für den Kalzifizierungsprozess spielt. Adam et al. konnten *in vitro* an nicht-valvulärem Gewebe nachweisen, dass es in Anwesenheit von DCN zu einem fibrotischen Gewebeumbau kommt [63] und Fischer et al. demonstrierten an aortalen Muskelzellen eine Induktion der Degeneration durch DCN [64]. DCN-*knockout*-Mäuse wiesen eine fragile Kutis mit einer relevant verminderten Zugfestigkeit auf. Stukturanalysen von Haut und Sehnen dieser Mäuse ließen eine abnorme Kollagenfibrillenmorphologie erkennen [162]. Diese Ergebnisse weisen auf eine wichtige Rolle von DCN für die Bindegewebsarchitektur und -regulation hin und könnten somit gut mit dem Ergebnis unserer Untersuchung in Deckung gebracht werden.

Andererseits scheint TGF β -1, ein Schlüsselfaktor und Trigger im Degenerationsprozess [90], zwar die Bildung der PG BGN und VER zu fördern, die DCN-Expression jedoch zu inhibieren [89, 163]. Hoshi et al. untersuchten die primäre Kalzifizierung der Knochenmatrix an Ratten und sahen DCN in nicht kalzifizierten Bereichen gehäuft in räumlicher Nähe zu Kollagenfibrillen. In verkalkten Bereichen war das PG jedoch stark vermindert, sodass die Autoren der Studie DCN gar als inhibierenden Faktor für die Kalzifizierung werteten [62]. Das wiederum wirft die Frage auf, ob DCN tatsächlich direkt pro-kalzifizierend wirkt, lediglich Promotor einer Fibrosierung ist, die über weitere Prozesse in einer Kalzifizierung mündet oder aus anderen, nicht bekannten Gründen in Degenerationsprozessen vermehrt exprimiert wird.

Interessanterweise führt *in vitro* die Abwesenheit von DCN zu einer vermehrten BGN-Expression, was eine höhere Dichte kollagenen Gewebes bedingt. Diese Beobachtung führt zu der Hypothese, dass die Bildung von DCN und BGN voneinander abhängig sind [163].

In der hier durchgeführten Studie sind sowohl BGN als auch DCN signifikant in frühen Degenerationsstadien hochreguliert [148]. Es stellt sich somit unter Berücksichtigung

der vorangehend benannten Hypothese die Frage, ob die BGN-Expression ohne gleichzeitige Hochregulation von DCN noch höher läge.

Unterschiede in der DCN-Expression zwischen T2DM- und Nicht-T2DM-Patienten finden sich in unserer Untersuchung nicht, woraus abgeleitet werden kann, dass eine hyperglykämische Stoffwechsellage in der humanen extrazellulären Aortenklappenmatrix keinen Stimulus für die DCN-Expression darstellt.

LUM

LUM, auch ein Mitglied der SLRP-Familie und unter anderem verantwortlich für die Formation der Kollagenfibrillen [71, 164], zeigte in unserer Genexpressionsanalyse keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten [148]. Vielmehr wurde LUM in allen vier Vergleichsgruppen in ähnlicher Höhe exprimiert. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu einer Studie von Martin-Rojas und Kollegen, die mittels Proteomanalyse in kalzifizierten Aortenklappentaschen einen gesteigerten Mengennachweis von LUM erbringen konnten [65]. Kritisch zu berücksichtigen ist jedoch die geringe Gruppengröße (n=18) in dieser Untersuchung. Auch bei der pathogenetisch mit der Aortenklappenkalzifizierung ähnlich erachteten Atherosklerose konnte LUM vermehrt in atherosklerotischen Läsionen der Koronararterien durch Onda et al. nachgewiesen werden [79]. Die Beobachtung einer vermehrten Expression von LUM in atherosklerotischen Läsionen wirft die Frage auf, ob weitere, z.B. Ischämie-getriggerte Faktoren ursächlich für das Resultat der Studie von Onda et al. sein könnten.

Baba und Kollegen demonstrierten anhand der fibrotischen Umbauprozesse ischämischer und reperfundierter Rattenherzen eine hochregulierte LUM-Expression [165], sodass die Hypoxämie als möglicher Stimulus hierfür diskutiert werden kann. Diese spielt jedoch keine Rolle in der Pathogenese der Aortenklappendegeneration, sodass damit auch keine Wirkung auf LUM in der ECM kalzifizierender Aortenklappentaschen zu erwarten ist.

Suzuki et al. analysierten in einer kleinen Studie an 6 degenerierten Aortenklappen verschiedene Klappenareale. Zum einen wurden die Proteine aus kalzifizierten Klappenbereichen extrahiert, zum anderen die Proteine aus makroskopisch nicht verdickten und nicht kalzifizierten Arealen. Die Gesamtmenge an LUM variierte zwischen den Arealen nicht signifikant, es fiel jedoch eine verminderte Glykosylierung von LUM in kalzifizierten Klappenbereichen auf [80]. Interessant wäre es in weiteren Studien zu untersuchen, ob die Glykosylierung von LUM in den verschiedenen Stadien der Aortenklappendegeneration differiert und ob die Variation des Glykosylierungsstatus Epiphänomen oder Trigger im Kalzifizierungsprozess ist.

VER

Ebenso wie die zur Familie der SLRPs gehörenden BGN und DCN zeigte auch das PG VER in der vorliegenden Arbeit eine signifikant höhere Expression in fibrotischen Aortenklappentaschen im Vergleich zu kalzifizierten Klappentaschen.

Stephens und Kollegen wiesen in einer vorangegangenen Untersuchung bereits nach, dass VER im Prozess der Aortenklappenkalzifizierung vermehrt in der Peripherie entstehender Kalkknötchen zu finden ist. Im Zentrum der Knoten fanden sie jedoch deutlich weniger VER [66]. Dies könnte ein Hinweis auf eine aktive Rolle im Kalzifizierungsgeschehen sein und erklären, warum VER gerade in frühen Stadien der Degeneration vermehrt exprimiert wird. Gleichzeitig ist anzunehmen, dass im Spätstadium mit nahezu vollständiger Klappenkalzifizierung die räumlichen Abstände zwischen den Kalkknötchen abnehmen und kalkfreie Zonen flächenmäßig rückläufig sind. Diese Annahme würde unsere Beobachtung einer geringeren VER-Expression in kalzifizierten Klappen stützen.

Worüber die vermeintlich pro-kalzifizierende VER-Wirkung in humanen Aortenklappen vermittelt wird, ist bislang nicht hinreichend geklärt. Den TLR könnte hierbei eine tragende Rolle zukommen. Kim et al. beschrieben die Bindung von VER an TLR [83]. Ferner konnten TLR in kalzifizierten Aortenklappen und in VICs gefunden werden [35, 65, 152].

In vitro wurde bereits gezeigt, dass TGF- β 1, ein Triggerfaktor der Kalzifizierung [90], die VER-Expression in Fibroblasten hochreguliert [89]. Im Tiermodell führte die Blockierung von TGF- β 1 nach Gefäßverletzung zu einer nahezu fehlenden VER-Expression in dem geschädigten Bereich. Nicht behandelte Tiere mit erhaltener TGF- β 1-Wirkung exprimierten hingegen weiterhin reichlich VER [166]. Auch *in vivo* wäre denkbar, dass TGF- β 1 die gesteigerte VER-Expression in humanen Aortenklappen induziert und VER eine pro-degenerative Rolle einnimmt.

Neben TLR ist auch CD44 ein Rezeptor für VER [84, 85], der wiederum ein Mediator in inflammatorischen Prozessen ist [167]. Weitere Studien zur abschließenden Klärung sind zweifelsohne notwendig, um den exakten Mechanismus zu entschlüsseln.

Auch mit den im Rahmen der Atherosklerose stattfindenden Vorgänge wird LUM in Verbindung gebracht. So kommt es durch erkrankungsbedingte Gefäßwandläsionen zu einer Hochregulation der Genexpression von VER [85]. Ferner konnte bei der Atherosklerose gezeigt werden, dass das PG, ebenso wie in Läsionen der Aortenklappe, an der Grenze der nekrotischen Zentren atherosklerotischer Bereiche lokalisiert ist [85].

Für den T2DM zeigte sich in der vorliegenden Arbeit kein Einfluss auf die VER-Expression. Weiterführende Studien zu dieser Thematik finden sich in der wissenschaftlichen Literatur bislang nicht.

Chondroosteogene Marker: ALPL und SPP1

In dieser Studie fanden sich zwischen den untersuchten Gruppen keine signifikanten Expressionsunterschiede der ALPL. Dieses Ergebnis war unter Berücksichtigung der bislang vorliegenden Studienlage nicht sicher zu erwarten, da anderweitige Untersuchungen der ALP eine relevante Rolle im Kalzifizierungsprozess zusprechen.

Mathieu et al. untersuchten die Degeneration humaner VICs und demonstrierten *in vitro* eine Abhängigkeit der Degeneration von der ALP [117]. Ebenso wiesen Schoen et al. im Degenerationsprozess bioprotethischer Herzklappen eine erhöhte ALP-Aktivität nach [118] und stellten Gemeinsamkeiten zwischen kalzifizierenden Erkrankungen wie der Aortenklappenkalzifizierung und der Knochenmineralisierung her, in der die ALP eine pro-osteogene Rolle spielt [168]. Auch bei der Koronararterienkalzifizierung findet sich eine Assoziation mit hohen Spiegeln der ALP [169]. Beertsen und Kollegen konnten in einem Tiermodell eine ALP-vermittelte Steigerung der Phosphationenkonzentration und somit eine pro-kalzifizierende Wirkung nachweisen [170].

Unter Berücksichtigung dieser Studien wäre somit auch in der vorliegenden Arbeit eine Hochregulierung des ALPL-Gens zu erwarten gewesen. Die vermeintlich diskrepanten Resultate unserer Studie könnten jedoch durch eine frühere Arbeit von Henrichsen et al. erklärt werden. Er beschreibt in seiner Untersuchung von Gewebekulturen vier Phasen im Kalzifizierungsprozess mit unterschiedlichen ALP-Aktivitäten. Das erste Stadium ist gekennzeichnet durch noch vitale Zellen, die Anzeichen der Degeneration zeigten. Gewebekalzifikationen sind an dieser Stelle noch nicht sichtbar. In diesem Stadium kann ALP nachgewiesen werden. Auch im zweiten beschriebenen Stadium mit beginnenden intrazellulären Kalzifikationen kann der Nachweis von ALP erbracht werden. Dieses Stadium scheint zeitlich betrachtet jedoch nur kurzfristig vorzuliegen. Die sich anschließende dritte Phase ist gekennzeichnet durch den fehlenden Nachweis von ALP. Phase vier lässt neben intrazellulären Kalzifikationen auch Kalkablagerungen im Interzellularraum erkennen. ALP kann in diesem Stadium ebenfalls nicht nachgewiesen werden [171].

Es ließe sich somit diskutieren, dass die ALP möglicherweise nur bei der Initiierung des Kalzifizierungsprozesses beteiligt ist. Die vorliegende Arbeit untersuchte jedoch bereits fibrosierte und kalzifizierte Aortenklappen, zeitlich betrachtet somit Stadien eines bereits begonnenen bzw. weit fortgeschrittenen Degenerationsprozesses. Angesichts der Tatsache, dass die ALP eventuell nur kurzzeitig und/oder in sehr frühen Degenerationsstadien in den Kalzifizierungsprozess involviert ist, wäre es denkbar, dass diese Phase im von uns untersuchten Material nicht mehr vorlag.

Zu berücksichtigen sind ferner die Überlegungen von Nijweide und Kollegen, die *in vitro* die Effekte von ALP-Inhibitoren auf die Enzymaktivität und die Kalzifizierung

untersuchten. Die Ergebnisse der Studie geben zwar Hinweise dafür, dass die ALP eine wichtige Rolle im Kalzifizierungsprozess spielt, sie jedoch vermutlich keinen kritischen Faktor hierfür darstellt [172].

Mehrere Studien beschäftigten sich auch mit dem Einfluss erhöhter Blutglukosewerte und eines T2DM auf die ALPL-Expression. So wiesen beispielsweise Chua und Shrago 3- bis 5-fach erhöhte ALP-Serumspiegel nach der Fütterung diabetischer Ratten nach [135]. Auch beim Menschen fanden Tibi und Kollegen signifikant gesteigerte Aktivitäten der intestinalen und hepatischen ALP-Aktivität bei T2DM-Patienten im Vergleich zu Nicht-T2DM-Patienten [136]. Einen Brückenschlag zur potentiellen Rolle der ALP für degenerative Prozesse bei T2DM-Patienten liefern Kocabay et al., die aufgrund ihrer Beobachtungen bei T2DM-Patienten mit bestehender Nicht-alkoholischer Steatohepatitis (NASH) diskutieren, dass die ALP einen Risikofaktor für die hepatische Fibrosierung darstellen könnte [137]. Da sich in unserer Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Kollektiv der T2DM- und Nicht-T2DM-Patienten zeigten, ist es fraglich, ob eine entsprechende Hypothese auch auf andere Gewebe und Organe übertragen werden kann.

Unsere Resultate und die bisherige Studienlage lassen somit eine abschließende Beurteilung der Bedeutung der ALP im Kalzifizierungsprozess humaner Aortenklappen nicht zu. Weitere Studien zur Klärung des Sachverhalts sind zu fordern.

Im Gegensatz zur ALPL-Expression stellt sich in dieser Studie die SPP1-Expression sowohl in kalzifizierten Aortenklappen von T2DM- als auch von Nicht-T2DM-Patienten signifikant hochreguliert dar [148]. Neben der bereits bekannten Bedeutung des SPP1-Expressionsprodukts OPN für den Kalzifizierungsprozess in Knochen belegen diverse Studien auch eine tragende Rolle des OPN in der Pathogenese degenerativer Herzklappenerkrankungen und stützen somit unsere Resultate. Hohe Plasma-OPN-Spiegel konnten nicht nur mit dem Vorliegen einer kalzifizierten Aortenklappe in Verbindung gebracht werden, sondern weisen auch bei asymptomatischen Patienten auf eine Aortenklappenstenose hin [105, 110-112]. Canver und Kollegen wiesen bei Patienten mit einer Mitralklappenstenose eine starke Assoziation zwischen OPN-Aktivität und Kalkablagerungen in Mitralklappen nach [173]. Auch in verkalkenden bioprothetischen Herzklappen wurde OPN in pathologisch veränderten Bereichen nachgewiesen [113]. Ebenso wird dem Protein eine wichtige Rolle in der Atherosklerose zugesprochen [174-176], deren Pathogenese als ähnlich zur Klappendegeneration erachtet wird.

Über welche exakten Mechanismen OPN Einfluss auf die Aortenklappenkalzifizierung nimmt, ist jedoch noch nicht hinreichend geklärt. In der Literatur werden für OPN regulierende, pro-inflammatorische und pro-kalzifizierende Mechanismen diskutiert

[177]. OPN stellt einen Liganden für den Rezeptor CD44 dar, der pro-inflammatorische Prozesse wie beispielsweise eine Makrophagenfusion vermittelt [178]. Inflammatorische Prozesse wiederum stehen im Verdacht, aktiv zur Aortenklappendegeneration beizutragen [31-34]. Interessanterweise können jedoch auch OPN-vermittelt anti-inflammatorische Prozesse begünstigt werden. Ge et al. identifizierten bei Hypertonikern mit Gefäßverkalkungen durch OPN eine Förderung der Differenzierung von Makrophagen in einen anti-inflammatorischen Phänotyp mit verminderter Expression von Entzündungsfaktoren und konsekutiv reduzierter Osteoklastenformierung [179].

Weiterhin zeigten Passmore et al. eine Verbindung zwischen OPN und der *High-mobility group box 1* (HMGB1) [111]. HMGB1 ist ein im Zellkern fast aller Zellen vorkommendes Protein, das zum einen passiv von nekrotischen Zellen freigesetzt, aber auch aktiv von Entzündungszellen wie Makrophagen sezerniert wird und dann als proinflammatorisches Zytokin seine Wirkung vermittelt [111]. HMGB1 ist in der Lage, an TLR-2 und 4 zu binden, die bekanntermaßen mit der Aortenklappendegeneration assoziiert sind [35, 152]. Auch beeinflusst es *in vitro* die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen in Osteoblasten [180] und konnte in erhöhter Menge in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden [181, 182]. Es wird vermutet, dass OPN die HMGB1-Sekretion aktiv regulieren und fördern kann und somit degenerationsfördernd wirkt [111].

Andere Studien lassen für OPN gar vermeintlich anti-kalzifizierende Wirkungen erkennen. So konnten Boskey et al. OPN als effektiven Inhibitor des Wachstums der Hauptknochensubstanz Hydroxyapatit identifizieren [183]. Weiterhin lieferten Shapses und Kollegen im Mausmodell Hinweise dafür, dass OPN an der Osteoklastenrekrutierung und Knochenresorption beteiligt ist [184]. Steitz et al. demonstrierten die Rolle von OPN als natürlicher Inhibitor einer ektopen Kalzifizierung [115].

Die Begründung für diese hochkomplexen und teils scheinbar konträr zueinanderstehenden Funktionen des OPN scheint in der posttranslationalen Modifikation begründet. Insbesondere Phosphorylierungen kommt hierbei eine entscheidende Bedeutung für die multiplen biologischen Funktionen des Signalproteins zu [185]. Mittels der in unserer Arbeit angewendeten Genexpressionsanalyse werden posttranslationale Modifikationen nicht erfasst. Es kann somit nicht einwandfrei geklärt werden, welche funktionelle Bedeutung die von uns gefundene signifikant gesteigerte SPP1-Expression in kalzifizierten Aortenklappentaschen hat. In Kenntnis der Studienlage zu OPN ist neben einer aktiven Förderung der Kalzifizierung auch eine regulierende Funktion und/oder gar eine Rolle im Abbau bereits angefallener Kalkfragmente in den Aortenklappentaschen zu diskutieren.

Keinen relevanten Einfluss auf die SPP1-Expression scheint in humanen Aortenklappen ein T2DM zu haben. Sowohl bei fibrotischen als auch bei kalzifizierten Klappentaschen fanden sich in unseren Analysen keine signifikanten Unterschiede der Expressionslevel zwischen T2DM- und Nicht-T2DM-Patienten. Studien an anderen Geweben konnten hingegen eine Assoziation zwischen Vorliegen eines DM bzw. einer Hyperglykämie und einer gesteigerten OPN-Expression nachweisen [138, 139, 186]. Zahlreiche weitere Untersuchungen sind sicherlich notwendig, um die komplexen Aufgaben und die Regulation dieses mannigfaltigen Proteins weiter zu entschlüsseln.

Die HAS1-3-Expression und der quantitative HA-Gehalt in humanen Aortenklappen sowie die Regulation der HAS1-3 und HA *in vitro*

In der Untersuchung der Genexpression der HAS1-3 zeigte die HAS1 eine nahezu konstante Ausprägung in allen 4 Gruppen und wies somit weder relevante Expressionsunterschiede zwischen frühen und späten Degenerationsstadien noch zwischen T2DM- und Nicht-T2DM-Patienten auf.

Auf Proteinebene ließ sich hingegen mittels HA-ELISA ein signifikant höherer HA-Gehalt in fibrotischen Aortenklappentaschen im Vergleich zu kalzifizierten Klappentaschen nachweisen. Dieses Ergebnis zeigte sich sowohl in der Kohorte der T2DM- als auch Nicht-T2DM-Patienten. Hieraus ist zu folgern, dass der HA-Anteil, der durch die HAS1 synthetisiert wird, gering sein muss. Hierzu passend wird in der Literatur HAS2 als das führende Enzym bei der HA-Synthese erachtet, deren Funktion scheinbar nicht durch HAS1 und HAS3 kompensiert werden kann. HAS2 besitzt unter anderem eine zentrale Rolle in der Organogenese des Herzens und führt im Mausexperiment bei Deletion des Gens zu schweren kardialen Malformationen und schließlich zum Tod [95]. Ferner konnte *in vitro* und in einem *in vivo*-Mausmodell gezeigt werden, dass zwischen der dermalen fetalen sowie der verletzungsinduzierten HA-Akkumulation und der HAS2- und HAS3-Expression, nicht aber der HAS1-Expression ein kausaler Zusammenhang besteht [187].

In unserer Arbeit fand sich bei T2DM- und Nicht-T2DM-Patienten mit fibrotischen Klappentaschen eine signifikant gesteigerte Genexpression der HAS2 im Vergleich zu Patienten mit kalzifizierten Klappentaschen. Auch bei der HAS3 konnte für die Kohorte der Nicht-T2DM-Patienten mit fibrotischen Klappentaschen eine Signifikanz im Expressionsniveau dokumentiert werden. Es ist somit anzunehmen, dass der höhere HA-Gehalt auf Proteinebene durch die Syntheseaktivität der HAS2 und wohl auch der HAS3 bedingt ist. Die Tatsache, dass sich ein signifikant höherer HA-Gehalt im fibrotischen Krankheitsstadium detektieren lässt, könnte anhand der Beobachtungen von Stephens et al. erklärt werden. In ihrer Studie untersuchten die Forscher

kalzifizierende Aortenklappen und sahen HA in der Umgebung von Kalkknötchen lokalisiert, was sie als aktive Beteiligung der HA im Umbauprozess werteten. Innerhalb der Kalkknoten konnte jedoch keine oder nur wenig HA nachgewiesen werden [66]. Diese Beobachtungen lassen sich gut auf den von uns untersuchten Krankheitsprozess mit einem frühen fibrotischen und späten kalzifizierten Erkrankungsstadium übertragen: Im Frühstadium findet sich HA in signifikant höherer Menge, da die beginnenden Kalzifizierungen noch nicht die gesamte Fläche bzw. das gesamte Gewebavolumen einnehmen. Im kalzifizierten Spätstadium wird ein Großteil des Volumens von Kalkknötchen eingenommen, in denen sich nach der Beobachtung von Stephens keine oder nur wenig HA nachweisen lässt.

Die Ergebnisse deuten zwar eine Beteiligung der HA an den Kalzifizierungsprozessen hin, lassen aber keine Rückschlüsse auf die von ihr vermittelten Wirkungen und Effekte zu. Zahlreiche Untersuchungen weisen für die HA eine Abhängigkeit der biologischen Funktion von der Molekülgröße auf. HA mit hohem Molekulargewicht, hauptsächlich von der HAS2 synthetisiert, wirkt anti-proliferativ, anti-angiogenetisch und immunsuppressiv. Der von der HAS3 synthetisierten HA mit mittlerem und niedrigem Molekulargewicht wird eine pro-inflammatorische, angiogenetische und immunstimulierende Wirkung zugeschrieben [100, 144]. Da sich in unserer Studie sowohl eine vermehrte HAS2-, als auch HAS3-Expressionen in fibrotischen Erkrankungsstadien zeigte, ist von der Synthese unterschiedlich großer HA mit potenziell zahlreichen unterschiedlichen biologischen Funktionen im Degenerationsprozess auszugehen.

Effekte der HA werden zu einem großen Teil über den Oberflächenrezeptor CD44 vermittelt [97-100]. Die Bindung von HA an CD44 hat eine Monozyten- und Makrophagenrekutierung zur Folge, von der angenommen wird, dass sie eine wichtige inflammatorische Rolle bei der Induktion der Kalzifizierung spielt und wiederum weitere Kaskaden aktiviert [98, 167].

In unserer Untersuchung wurde die durch den Rezeptor CD44 vermittelte HA-Wirkung *in vitro* an ovinen VICs weiter untersucht. Dazu wurden das 12-mer Peptid Pep1 (GAHWQFNALTVR) als Inhibitor der CD44-vermittelten HA-Wirkung [188] sowie ein KP ohne Funktion eingesetzt (12-mer SATPASAPYPLA). Jeweils eine Gruppe erhielt über 10 d ein Basismedium versetzt mit Pep1 bzw. dem KP. Die anschließende Ermittlung des Kalziumgehaltes in den Interstitialzellen zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. HA oder deren Abwesenheit scheint somit zumindest bei von weiteren Kalzifizierungstriggern unbeeinflussten Zellen nicht den primären Induktor des Degenrationsprozesses darzustellen.

Eine weitere Vergleichsgruppe erhielt neben Pep1 bzw. dem KP ein mit β -GP versetztes Medium. Dieser Protein-Phosphataseinhibitor vermittelt die Mineralisation

der Knochenmatrix und fördert in der von uns eingesetzten Konzentration von 10 mM die Kalzifizierung *in vitro* von vaskulären *smooth muscle cells* über einen ALP-verwandten Mechanismus [189, 190]. Auch in diesem Experimentalansatz konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Pep1- und der KP-Gruppe gefunden werden. Im Vergleich mit den auf Basismedium kultivierten Zellen zeigte sich die Kalziumkonzentration nur marginal erhöht.

In einem weiteren Ansatz wurde ein mit β -GP, TGF- β und Kalziumchlorid angereichertes Medium genutzt, um eine maximale Degenerationsstimulation der ovinen VICs zu erreichen. So ließen sich *in vitro* aortale VICs unter dem Einfluss von TGF- β zur Bildung von Kalkknötchen anregen [191].

In unserem Experiment sahen wir im Vergleich zu den auf Basismedium gezüchteten Zellen eine deutliche Zunahme des Kalziumgehalts mit einer signifikanten Mehr-Kalzifizierung auf Seiten der mit TGF- β behandelten Pep1-Zellen. Kein Unterschied hingegen war zwischen der KP- und Pep1-Gruppe erkennbar.

Anzumerken ist, dass sich unsere Experimentalserie an ovinen VICs lediglich über einen Zeitraum von 10 d erstreckte, jedoch krankhafte Kalzifizierungsprozesse beim Menschen wesentlich längere Zeiträume in Anspruch nehmen. Kritisch ist weiterhin darauf hinzuweisen, dass das von uns verwendete Kalzium-Assay nur Kalzium nachweist, nicht jedoch Hydroxyapatitkristalle [192]. Nach der Studie von Cloyd et al. scheint es *in vitro* gar nicht möglich zu sein, Hydroxyapatit zu generieren, vielmehr wird eine starke Kollagensynthese angeregt [192].

Ebenso ist es fraglich, ob die potenzielle HA-Beteiligung am Kalzifizierungsprozess tatsächlich primär über den Rezeptor CD44 vermittelt wird oder andere Rezeptoren eine relevantere Beteiligung aufweisen. Zu diskutieren ist auch, dass TGF- β nicht der Trigger für die Aktivierung der HA ist und diese von anderen, im Kalzifizierungsprozess vorkommenden Substanzen beeinflusst wird, die dieses *in vitro*-Modell nicht beinhaltete. Auch wenn unsere *in vitro*-Experimente eine Beteiligung der HA am Kalzifizierungsprozess nicht nachweisen konnten, legen unsere Ergebnisse auf mRNA- und Proteinebene eine Beteiligung der HAS1-3 an diesem Vorgang in frühen Stadien der Aortenklappendegeneration beim Menschen nahe.

Neben der Rolle der HA innerhalb des Kalzifizierungsprozesses war es Ziel dieser Arbeit, den Einfluss eines DM auf die HA-Bildung bzw. die HAS1-3-Expression zu untersuchen. Weder im Kollektiv der Patienten mit fibrotischen noch im Kollektiv derer mit kalzifizierten Aortenklappentaschen zeigte sich zwischen T2DM- und Nicht-T2DM-Patienten ein Unterschied in der HAS1-3 Expression. Gleiches fand sich auch beim Vergleich der Gruppen bezüglich des quantitativen HA-Gehalts. Bisherige Untersuchungen bei T2DM-Patienten hätten durchaus eine vermehrte HAS-Expression bzw. einen erhöhten HA-Gehalt in der ECM humaner Aortenklappentaschen von

T2DM-Patienten erwarten lassen. So fanden Heickendorff und Kollegen in der Tunica media der Aorta bei DM vermehrt HA [143]. Mesangiumzellen von DM-Patienten wiesen in einer Studie von Yevdokimova eine hochregulierte HAS2-Expression auf [144]. Auch konnten McDonald und Kollegen im Tiermodell bei Schweinen mit Hyperlipidämie im Falle des Vorliegens eines Diabetes signifikant mehr HA in den Koronararterien nachweisen [127]. Die vorangehend aufgeführten Beobachtungen an vaskulärem Gewebe scheinen somit nicht auf die bei der Aortenklappenkalzifizierung zugrundeliegenden Mechanismen übertragbar zu sein. In unserer Studie diente aufgrund dessen ein *in vitro*-Modell oviner VICs zur Analyse des Einflusses einer Hyperglykämie auf die HAS1-3 Expression. Ein hoher Glukosegehalt des Kulturmediums sollte hierbei die Konditionen eines DM simulieren. Insbesondere für die HAS1, die höhere Glukosespiegel als die HAS2 und HAS3 benötigt [193], wären bei diesem Versuchsaufbau relevante Expressionsdifferenzen zu erwarten gewesen. Sowohl die HAS1-Expression der Zellreihe, die während der gesamten Beobachtungszeit ein Medium mit niedrigem Glukosegehalt erhielt, als auch die Zellreihe, die nach d 3 auf hohe Glukosespiegel umgesetzt wurde, blieb im gesamten Untersuchungszeitraum nahezu konstant. Prinzipiell wäre durch die erhöhte Bereitstellung von Glukose als Substrat der HAS1 auch eine höhere Expression von HAS1 zu diskutieren gewesen. Es ist jedoch denkbar, dass die HAS1-Expression direkt durch die von uns initial verwendeten niedrigen Glukosespiegel im Sinne einer negativen Rückkopplung herabreguliert wurde und die dann eingesetzten höheren Glukosespiegel bei einmal inaktiverter Expression nicht als Trigger zur gesteigerten Genexpression ausreichten.

Zellen, die von Beginn des Experiments an auf einem hyperglykämischen Medium kultiviert wurden, ließen im Vergleich zu denen, die an d 3 auf ein normoglykämisches Medium umgestellt wurden, eine signifikant höhere HAS1-Expression an d 12 erkennen. In Analogie zum vorangehend ausgeführtem ist zu diskutieren, dass hyperglykämie Zustände zum Beginn der Kultivierung einen ausreichenden Triggerfaktor für die Genexpression darstellen und eine zumindest basale HAS1-Ausprägung bewirken. Das Herunterregulieren der HAS1-Expression nach Umstellung auf ein Medium mit niedrigem Glukosegehalt könnte ebenfalls wieder durch ein empfindliches Reagieren der VICs auf das fehlende Substratangebot erklärbar sein.

Keine signifikanten Unterschiede fanden sich in der Genexpression der HAS2 und 3 zwischen VICs, die durchgehend auf normoglykämischem Medium gezüchtet wurden und denjenigen, die ab d 3 auf ein hyperglykämisches Medium umgestellt wurden. Auch dieses Ergebnis könnte eine sensible Abhängigkeit der Genexpression vom vorhandenen Glukoseangebot und einer initialen Inaktivierung der HAS-Expression bei fehlendem Glukosereiz nahelegen. In den 12 d auf hohem Glukoselevel gezüchteten

Zellen zeigte sich im Vergleich zu denen, die an d 3 von einem hohem auf ein niedriges Glukoselevel umgestellt wurden, kein signifikanter Unterschied in der HAS3-Expression. Es ist zu diskutieren, ob der Expression der 3 HAS-Isoformen unterschiedliche Empfindlichkeiten auf wechselnde Glukoseangebote zugrunde liegen. Denkbar wäre es, dass die HAS3-Expression nicht unmittelbar durch negative Rückkopplung reduziert wird, sondern diese erst zeitlich verzögert auftritt. Denn im Gegensatz zur HAS3-Expression zeigt die HAS2-Expression in den kontinuierlich auf hyperglykämischem Medium kultivierten Zellen im Vergleich zu den nach d 3 auf ein normoglykämisches Medium umgestellten VICs an d 9 eine signifikant höhere HAS2-Expression. Hielte man die These der unterschiedlichen Rückkopplungszeiten der HAS-Isoformen aufrecht, so könnte die HAS2-Expression ähnlich der HAS1-Expression reguliert sein.

Zusätzlich zur Genexpression der HAS sollte in dem *in vitro*-Modell der tatsächliche HA-Gehalt der auf unterschiedlichen Medien kultivierten VICs ermittelt werden. Zum einen wurden hierzu die Kontrollgruppen der VICs untersucht, die während der gesamten Studiendauer auf jeweils einem Medium mit konstant hohem oder niedrigem Glukosegehalt kultiviert wurden. Es zeigte sich ein signifikant höherer HA-Gehalt in den auf hyperglykämischen Medien gezüchteten Zellen. Zum anderen analysierten wir die VICs, deren Medien im Glukosegehalt variiert wurden. Zellen, die durchgehend hyperglykämisch kultiviert wurden, wiesen einen höheren HA-Gehalt auf, verglichen mit Zellen, deren Medium nach 3 d auf normoglykämische Bedingungen umgestellt wurde. Berücksichtigt man die bereits erläuterten Ergebnisse der HAS1 und HAS2-Expression, kann die These aufgestellt werden, dass die synthetisierte HA zu großen Anteilen durch diese beiden HAS-Isoformen synthetisiert wurde.

Keine Signifikanzen in Bezug auf die HA-Menge ließen VICs erkennen, die von normo- auf hyperglykämisches Medium umgesetzt wurden. Dies könnte die Hypothese einer Inaktivierung der HAS durch niedrige Glukosespiegel stützen.

Der sich in dieser *in vitro*-Untersuchungsreihe zeigende Einfluss unterschiedlicher Glukosespiegel auf die HAS1-3 Expression und den HA-Gehalt oviner VICs lässt nur sehr vage Spekulationen über die zugrundeliegenden Regulationsmechanismen und mögliche biologische und/oder pathologische Funktionen zu. Nahezu unberücksichtigt in diesem Modell bleibt die Komplexität der sich im menschlichen Körper abspielenden Prozesse. Als Beispiele hierfür seien Glukose-vermittelte hormonelle Einflüsse sowie Zytokin- und Mediatorfreisetzungen genannt. Der genutzte experimentelle Ansatz bietet jedoch sicherlich die Möglichkeit, einzelne Variablen in diesem Kontext mittels weiterführender Experimente zu analysieren.

4.2 Diskussion der Methoden und Studienlimitierung

Humane Aortenklappen

Die in dieser Arbeit durchgeführte Genexpressionsanalyse von Bestandteilen der ECM humaner Aortenklappen konnte an einem Kollektiv von insgesamt 137 Patienten durchgeführt werden. Durch eine umfangreichere Gruppe hätten sich Tendenzen bzw. Signifikanzen eventuell deutlicher abzeichnen können.

Die operativ gewonnen Aortenklappentaschen wurden anhand makroskopischer Kriterien einer fibrotischen und kalzifizierten Gruppe zugeteilt. Idealerweise hätte neben diesen beiden Gruppen eine weitere Gruppe mit noch makroskopisch unveränderten Aortenklappentaschen für die Studie zur Verfügung gestanden. Von besonderem Interesse in dieser Gruppe wäre sicherlich die ALPL-Expression gewesen, da die ALP scheinbar nur in sehr frühen Stadien der Erkrankung eine Rolle im Kalzifizierungsprozess spielt. Potenzielle Spender für makroskopisch nicht fibrosierte oder kalzifizierte Klappentaschen hätten Herztransplantat-Empfänger darstellen können. Dafür standen jedoch zu wenig bisher asservierte unveränderte Klappentaschen zum Zeitpunkt der Arbeit zur Verfügung.

Unberücksichtigt in dieser Arbeit blieben aufgrund der Gruppengröße ethnische Aspekte. Ebenso wurden auch keine geschlechtsspezifischen Unterschiede zwischen Männern und Frauen analysiert, die im Falle größerer Gruppen sicherlich ein weiteres interessantes Studienobjekt darstellen würden.

Patienten in dieser Studie wurden anhand anamnestischer Angaben der Gruppe T2DM oder Nicht-T2DM zugeteilt. Keine Berücksichtigung in der Gruppeneinteilung fanden laborchemische Werte wie z.B. der HbA1c, der hyperglykämische Stoffwechsellagen innerhalb bestimmter Zeiträume sicherlich besser hätte abbilden können als die anamnestische Zuteilung. Dies war den nur lückenhaft vorliegenden Daten geschuldet. Zweifelsohne muss man davon ausgehen, dass es auch im Kollektiv der T2DM-Patienten einige Patienten gab, die durch ihre Medikation und/oder Lebensstil relativ euglykäm eingestellt waren. Die Gleichsetzung eines DM mit einer Hyperglykämie, wie von uns in der *in vitro*-Untersuchungsreihe angenommen, ist somit sicherlich kritisch zu hinterfragen. Ebenso muss bedacht werden, dass es bei Annahme der Hyperglykämie als kalzifizierungsfördernden Faktor schwieriger sein kann, Effekte zwischen den von uns eingeteilten Gruppen zu erkennen. Mit Ausnahme des HA-Gehalts wurde in dieser Studie lediglich die Genexpression auf Basis der mRNA quantifiziert. Posttranslationale Modifikationen auf RNA-Ebene oder später auf Proteinebene wurden hierbei allerdings nicht erfasst. Sie besitzen oftmals jedoch eine zentrale Bedeutung für die spätere Funktion und Wirkungsweise der Moleküle.

***In vitro*-Versuche**

Für die *in vitro*-Versuche verwendeten wir VICs ovinen Ursprungs. Diese Zellen konnten aufgrund der räumlichen Nähe zu einem Schlachthof problemlos beschafft werden. Sie entstammten gesunden, für den menschlichen Verzehr vorgesehenen Tieren. Wir gingen somit von gesunden Zellen aus, deren natürliches Wachstum von Krankheiten unbeeinflusst war. Die Hinzugabe kalzifizierenden Mediums sollte in den Zellen einen Degenerationsprozess induzieren. Studien legen jedoch nahe, dass derartige induzierte Prozesse sich von den *in vivo* abspielenden pathophysiologischen Vorgängen bei der Aortenklappendegeneration relevant unterscheiden [192, 194]. Auch muss immer die Translation von Studienergebnissen im Tierexperiment auf den Menschen kritisch hinterfragt werden.

Zellen aus den Aortenklappentaschen von Herztransplantat-Empfängern hätten eine Alternative für die verwendeten VICs darstellen können, standen jedoch unter Berücksichtigung der geringen Anzahl von asservierten unveränderten Klappentaschen zum Zeitpunkt der Arbeit nicht ausreichend zur Verfügung.

4.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

Durch die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bestandteile der ECM in verschiedenen Stadien der kalzifizierenden Aortenklappenstenose unterschiedlich reguliert sind. Insbesondere im fibrotischen Degenerationsstadium zeigte sich die Genexpression des SLRPs BGN signifikant erhöht, das vermutlich kalzifizierungsfördernde Eigenschaften besitzt. Signifikante Unterschiede in den untersuchten Teilkohorten fanden sich auch bei der DCN-, VER- und HAS2- und 3-Expression. Der chondroosteogene Marker SPP1 war hingegen im kalzifizierten Stadium signifikant höher exprimiert.

Die Ursachen und die durch die beschriebenen Expressionsunterschiede bedingten pathophysiologischen Prozesse konnten nicht hinreichend geklärt werden. Auch gaben unsere Analysen nur Teileinblicke in die Bedeutung der vermeintlich hochkomplexen HA-Wirkungen und auf den Einfluss eines T2DM im Prozess der Aortenklappenkalzifizierung. Unsere Ergebnisse tragen somit einen weiteren Baustein im Verständnis der Pathogenese der Aortenklappendegeneration bei. Gleichzeitig werfen die Resultate weitere interessante Fragestellungen auf, die vorangehend diskutiert wurden und können einen Beitrag dazu leisten, zukünftige Studien zu dieser Thematik weiter zu fokussieren.

Aufgabe zukünftiger Studien zu dieser Thematik wird es sein, Bestandteile der ECM nicht nur als Strukturbestandteile zu verstehen, sondern diese auch exakt hinsichtlich

ihrer funktionellen Bedeutung zu charakterisieren. Zudem sollten weitere Analysen sich intensiv dem Einfluss eines DM und weiterer assoziierter Erkrankungen widmen, um deren Bedeutung im Krankheitsprozess näher zu ergründen.

Ein Ansatz hierbei könnte ein *in vitro*-Modell zur Degeneration bei Insulinresistenz darstellen, das besser mit den T2DM-assoziierten Prozessen korreliert als das in unserer Untersuchung verwendete Hyperglykämie-Modell. Wie bereits vorangehend ausgeführt, wäre auch die Erweiterung zukünftiger Studien um eine Kontrollgruppe gesunder Aortenklappentaschen ein wünschenswerter Ansatz. Interessante Daten könnten ferner Proteomanalysen liefern.

Das Verständnis der Mechanismen der Aortenklappendegeneration birgt das große Potential, biologische Marker als Ansatzpunkte für Früherkennungsuntersuchungen zu identifizieren, Präventionsmaßnahmen bei Risikokonstellationen zu entwickeln oder eventuell den Erkrankungsprogress zu modifizieren oder gar zu unterbrechen. Auch ließen sich aus dem Verständnis der Mechanismen und der Pathophysiologie möglicherweise Erkenntnisse ableiten, die bislang verwendete biologische Prothesen in der Zusammensetzung ihrer ECM so modifizieren ließen, dass ein geringeres Risiko für erneute Kalzifizierungsprozesse besteht.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Mensah, G.A. and D.W. Brown, *An overview of cardiovascular disease burden in the United States*. Health Aff (Millwood), 2007. **26**(1): p. 38-48.
2. DESTATIS, S.B., *Todesursachen Deutschland*.
<https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/todesfaelle.html>, Stand 04.01.2020.
3. DESTATIS, S.B., *Pressemitteilung Nr. 022 vom 19.01.2017 - Zahl der Todesfälle im Jahr 2015 um 6,5 % gestiegen*. 2017.
4. DESTATIS, S.B., *Pressemitteilung vom 29. September 2017 – 347/17: Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachen die höchsten Kosten*. 2017.
5. Nkomo, V.T., et al., *Burden of valvular heart diseases: a population-based study*. Lancet, 2006. **368**(9540): p. 1005-11.
6. Arora, S., J.A. Misenheimer, and R. Ramaraj, *Transcatheter Aortic Valve Replacement: Comprehensive Review and Present Status*. Tex Heart Inst J, 2017. **44**(1): p. 29-38.
7. Lerman, D.A., S. Prasad, and N. Alotti, *Calcific Aortic Valve Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches*. Eur Cardiol, 2015. **10**(2): p. 108-112.
8. Goldberg, S.H., et al., *Insights into degenerative aortic valve disease*. J Am Coll Cardiol, 2007. **50**(13): p. 1205-13.
9. Nishimura, R.A., et al., *2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. Journal of the American College of Cardiology, 2014. **63**(22): p. 2438-2488.
10. Otto, C.M. and B. Prendergast, *Aortic-valve stenosis--from patients at risk to severe valve obstruction*. N Engl J Med, 2014. **371**(8): p. 744-56.
11. Stewart, B.F., et al., *Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study*. J Am Coll Cardiol, 1997. **29**(3): p. 630-4.
12. Mao, M., et al., *Prosthetic aortic valve stenosis in end-stage renal failure*. Int J Nephrol, 2011. **2011**: p. 386368.
13. Swierszcz, J., et al., *[Smoking, increase in plasma lipoprotein (a) and triglycerides, as well as decrease in plasma HDL-cholesterol concentrations seem to be linked with aortic valve stenosis and its progression]*. Przegl Lek, 2009. **66**(4): p. 159-65.
14. Katz, R., et al., *Features of the metabolic syndrome and diabetes mellitus as predictors of aortic valve calcification in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*. Circulation, 2006. **113**(17): p. 2113-9.
15. Karalis, D.G., et al., *Severe stenosis involving a congenitally bicuspid aortic valve in the tenth decade of life*. Am J Cardiol, 1990. **65**(3): p. 264-5.
16. Carapetis, J.R., et al., *The global burden of group A streptococcal diseases*. Lancet Infect Dis, 2005. **5**(11): p. 685-94.
17. Izquierdo-Gomez, M.M., et al., *Valve Calcification in Aortic Stenosis: Etiology and Diagnostic Imaging Techniques*. Biomed Res Int, 2017. **2017**: p. 5178631.
18. Nishimura, R.A., et al., *2017 AHA/ACC Focused Update of the 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines*. Circulation, 2017. **135**(25): p. e1159-e1195.
19. Beckmann, A., et al., *German Heart Surgery Report 2017: The Annual Updated Registry of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery*. Thorac Cardiovasc Surg, 2018. **66**(8): p. 608-621.
20. Lindroos, M., et al., *Prevalence of aortic valve abnormalities in the elderly: An echocardiographic study of a random population sample*. Journal of the American College of Cardiology, 1993. **21**(5): p. 1220-1225.

21. Bouma, B.J., et al., *To operate or not on elderly patients with aortic stenosis: the decision and its consequences*. Heart, 1999. **82**(2): p. 143-8.
22. Go, A.S., et al., *Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association*. Circulation, 2013. **127**(1): p. e6-e245.
23. Varadarajan, P., et al., *Survival in elderly patients with severe aortic stenosis is dramatically improved by aortic valve replacement: Results from a cohort of 277 patients aged > or =80 years*. Eur J Cardiothorac Surg, 2006. **30**(5): p. 722-7.
24. Chakos, A., et al., *Long term outcomes of transcatheter aortic valve implantation (TAVI): a systematic review of 5-year survival and beyond*. Ann Cardiothorac Surg, 2017. **6**(5): p. 432-443.
25. Marquis-Gravel, G., et al., *Medical Treatment of Aortic Stenosis*. Circulation, 2016. **134**(22): p. 1766-1784.
26. Xu, S., A.C. Liu, and A.I. Gotlieb, *Common pathogenic features of atherosclerosis and calcific aortic stenosis: role of transforming growth factor-beta*. Cardiovasc Pathol, 2010. **19**(4): p. 236-47.
27. Rajamannan, N.M., *Calcific aortic stenosis: lessons learned from experimental and clinical studies*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(2): p. 162-8.
28. Rajamannan, N.M., *Mechanisms of aortic valve calcification: the LDL-density-radius theory: a translation from cell signaling to physiology*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **298**(1): p. H5-15.
29. Salvador, B., et al., *Modulation of endothelial function by Toll like receptors*. Pharmacol Res, 2016. **108**: p. 46-56.
30. Liu, A.C., V.R. Joag, and A.I. Gotlieb, *The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology*. Am J Pathol, 2007. **171**(5): p. 1407-18.
31. Rajamannan, N.M., et al., *Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update*. Circulation, 2011. **124**(16): p. 1783-91.
32. Otto, C.M., *Calcific aortic stenosis--time to look more closely at the valve*. N Engl J Med, 2008. **359**(13): p. 1395-8.
33. Mohler, E.R., 3rd, *Mechanisms of aortic valve calcification*. Am J Cardiol, 2004. **94**(11): p. 1396-402, A6.
34. Akat, K., M. Borggrefe, and J.J. Kaden, *Aortic valve calcification: basic science to clinical practice*. Heart, 2009. **95**(8): p. 616-23.
35. Schaefer, L., et al., *The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages*. J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 2223-33.
36. Schünke M., S.E., Schumacher U., Voll M., Wesker K., *Prometheus Lernatlas Hals und Innere Organe*. Thieme, 2005: p. 106, 108.
37. Schoen, F.J., *Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering*. Circulation, 2008. **118**(18): p. 1864-80.
38. Wight, T.N. and S. Potter-Perigo, *The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis?* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011. **301**(6): p. G950-5.
39. Adams, J.C. and F.M. Watt, *Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix*. Development, 1993. **117**(4): p. 1183-98.
40. Tiede, K., A. Melchior-Becker, and J.W. Fischer, *Transcriptional and posttranscriptional regulators of biglycan in cardiac fibroblasts*. Basic Res Cardiol, 2010. **105**(1): p. 99-108.
41. Ruoslahti, E., *Structure and biology of proteoglycans*. Annu Rev Cell Biol, 1988. **4**: p. 229-55.
42. Sotoodehnejadnematalahi, F. and B. Burke, *Structure, function and regulation of versican: the most abundant type of proteoglycan in the extracellular matrix*. Acta Med Iran, 2013. **51**(11): p. 740-50.

43. Iozzo, R.V., *The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins*. J Biol Chem, 1999. **274**(27): p. 18843-6.
44. Geng, Y., D. McQuillan, and P.J. Roughley, *SLRP interaction can protect collagen fibrils from cleavage by collagenases*. Matrix Biol, 2006. **25**(8): p. 484-91.
45. Iozzo, R.V., *Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 609-52.
46. Iozzo, R.V., *The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1997. **32**(2): p. 141-74.
47. Halper, J., *Proteoglycans and diseases of soft tissues*. Adv Exp Med Biol, 2014. **802**: p. 49-58.
48. Grandoch, M., et al., *Loss of Biglycan Enhances Thrombin Generation in Apolipoprotein E-Deficient Mice: Implications for Inflammation and Atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016. **36**(5): p. e41-50.
49. Shimizu-Hirota, R., et al., *Extracellular matrix glycoprotein biglycan enhances vascular smooth muscle cell proliferation and migration*. Circ Res, 2004. **94**(8): p. 1067-74.
50. Dreher, K.L., et al., *Vascular smooth muscle biglycan represents a highly conserved proteoglycan within the arterial wall*. Eur J Cell Biol, 1990. **53**(2): p. 296-304.
51. O'Brien, K.D., et al., *Smooth muscle cell biglycan overexpression results in increased lipoprotein retention on extracellular matrix: implications for the retention of lipoproteins in atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2004. **177**(1): p. 29-35.
52. Williams, K.J., *Arterial wall chondroitin sulfate proteoglycans: diverse molecules with distinct roles in lipoprotein retention and atherogenesis*. Curr Opin Lipidol, 2001. **12**(5): p. 477-87.
53. Latif, N., et al., *Localization and pattern of expression of extracellular matrix components in human heart valves*. J Heart Valve Dis, 2005. **14**(2): p. 218-27.
54. Berezki, E. and M. Santha, *The role of biglycan in the heart*. Connect Tissue Res, 2008. **49**(3): p. 129-32.
55. Derbali, H., et al., *Increased biglycan in aortic valve stenosis leads to the overexpression of phospholipid transfer protein via Toll-like receptor 2*. Am J Pathol, 2010. **176**(6): p. 2638-45.
56. Song, R., et al., *Biglycan induces the expression of osteogenic factors in human aortic valve interstitial cells via Toll-like receptor-2*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(11): p. 2711-20.
57. Yamaguchi, Y., D.M. Mann, and E. Ruoslahti, *Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin*. Nature, 1990. **346**(6281): p. 281-4.
58. Goetsch, K.P. and C.U. Niesler, *The extracellular matrix regulates the effect of decorin and transforming growth factor beta-2 (TGF-beta2) on myoblast migration*. Biochem Biophys Res Commun, 2016. **479**(2): p. 351-357.
59. Seidler, D.G. and R. Dreier, *Decorin and its galactosaminoglycan chain: extracellular regulator of cellular function?* IUBMB Life, 2008. **60**(11): p. 729-33.
60. Neill, T., L. Schaefer, and R.V. Iozzo, *Decorin: a guardian from the matrix*. Am J Pathol, 2012. **181**(2): p. 380-7.
61. Gubbiotti, M.A., et al., *Decorin interacting network: A comprehensive analysis of decorin-binding partners and their versatile functions*. Matrix Biol, 2016. **55**: p. 7-21.
62. Hoshi, K., et al., *The primary calcification in bones follows removal of decorin and fusion of collagen fibrils*. J Bone Miner Res, 1999. **14**(2): p. 273-80.
63. Adam, M., et al., *High levels of the extracellular matrix proteoglycan decorin are associated with inhibition of testicular function*. Int J Androl, 2012. **35**(4): p. 550-61.

64. Fischer, J.W., et al., *Decorin promotes aortic smooth muscle cell calcification and colocalizes to calcified regions in human atherosclerotic lesions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(12): p. 2391-6.
65. Martin-Rojas, T., et al., *iTRAQ proteomic analysis of extracellular matrix remodeling in aortic valve disease*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 17290.
66. Stephens, E.H., et al., *Differential proteoglycan and hyaluronan distribution in calcified aortic valves*. Cardiovasc Pathol, 2011. **20**(6): p. 334-42.
67. Chakravarti, S., et al., *Primary structure of human lumican (keratan sulfate proteoglycan) and localization of the gene (LUM) to chromosome 12q21.3-q22*. Genomics, 1995. **27**(3): p. 481-8.
68. Funderburgh, J.L., et al., *Arterial lumican. Properties of a corneal-type keratan sulfate proteoglycan from bovine aorta*. J Biol Chem, 1991. **266**(36): p. 24773-7.
69. Qin, H., T. Ishiwata, and G. Asano, *Effects of the extracellular matrix on lumican expression in rat aortic smooth muscle cells in vitro*. J Pathol, 2001. **195**(5): p. 604-8.
70. Nikitovic, D., et al., *Lumican, a small leucine-rich proteoglycan*. IUBMB Life, 2008. **60**(12): p. 818-23.
71. Raouf, A., et al., *Lumican is a major proteoglycan component of the bone matrix*. Matrix Biol, 2002. **21**(4): p. 361-7.
72. D'Onofrio, M.F., et al., *Identification of beta1 integrin as mediator of melanoma cell adhesion to lumican*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **365**(2): p. 266-72.
73. Leygue, E., et al., *Expression of lumican in human breast carcinoma*. Cancer Res, 1998. **58**(7): p. 1348-52.
74. Lu, Y.P., et al., *Expression of lumican in human colorectal cancer cells*. Pathol Int, 2002. **52**(8): p. 519-26.
75. Nikitovic, D., et al., *Lumican expression is positively correlated with the differentiation and negatively with the growth of human osteosarcoma cells*. FEBS J, 2008. **275**(2): p. 350-61.
76. Ping Lu, Y., T. Ishiwata, and G. Asano, *Lumican expression in alpha cells of islets in pancreas and pancreatic cancer cells*. J Pathol, 2002. **196**(3): p. 324-30.
77. Troup, S., et al., *Reduced expression of the small leucine-rich proteoglycans, lumican, and decorin is associated with poor outcome in node-negative invasive breast cancer*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(1): p. 207-14.
78. Vuillermoz, B., et al., *The small leucine-rich proteoglycan lumican inhibits melanoma progression*. Exp Cell Res, 2004. **296**(2): p. 294-306.
79. Onda, M., et al., *Expression of lumican in thickened intima and smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis*. Exp Mol Pathol, 2002. **72**(2): p. 142-9.
80. Suzuki, H., et al., *Aberrant Glycosylation of Lumican in Aortic Valve Stenosis Revealed by Proteomic Analysis*. Int Heart J, 2016. **57**(1): p. 104-11.
81. Gutierrez, P., et al., *Differences in the distribution of versican, decorin, and biglycan in atherosclerotic human coronary arteries*. Cardiovasc Pathol, 1997. **6**(5): p. 271-8.
82. Wight, T.N., *Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(5): p. 617-23.
83. Kim, S., et al., *Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis*. Nature, 2009. **457**(7225): p. 102-6.
84. Karangelis, D.E., et al., *Glycosaminoglycans as key molecules in atherosclerosis: the role of versican and hyaluronan*. Curr Med Chem, 2010. **17**(33): p. 4018-26.
85. Wight, T.N. and M.J. Merrilees, *Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key roles for versican*. Circ Res, 2004. **94**(9): p. 1158-67.
86. Yao, L.Y., et al., *Identification of the proteoglycan versican in aorta and smooth muscle cells by DNA sequence analysis, in situ hybridization and immunohistochemistry*. Matrix Biol, 1994. **14**(3): p. 213-25.

87. Wight, T.N., et al., *Selective deposits of versican in the extracellular matrix of restenotic lesions from human peripheral arteries*. Am J Pathol, 1997. **151**(4): p. 963-73.
88. Arciniegas, E., et al., *Differential versican isoforms and aggrecan expression in the chicken embryo aorta*. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2004. **279**(1): p. 592-600.
89. Kahari, V.M., H. Larjava, and J. Uitto, *Differential regulation of extracellular matrix proteoglycan (PG) gene expression. Transforming growth factor-beta 1 up-regulates biglycan (PGI), and versican (large fibroblast PG) but down-regulates decorin (PGII) mRNA levels in human fibroblasts in culture*. J Biol Chem, 1991. **266**(16): p. 10608-15.
90. Jian, B., et al., *Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis*. Ann Thorac Surg, 2003. **75**(2): p. 457-65; discussion 465-6.
91. Laurent, T.C. and J.R. Fraser, *Hyaluronan*. FASEB J, 1992. **6**(7): p. 2397-404.
92. Itano, N., et al., *Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties*. J Biol Chem, 1999. **274**(35): p. 25085-92.
93. Jacobson, A., et al., *Expression of human hyaluronan synthases in response to external stimuli*. Biochem J, 2000. **348 Pt 1**: p. 29-35.
94. Weigel, P.H., V.C. Hascall, and M. Tammi, *Hyaluronan synthases*. J Biol Chem, 1997. **272**(22): p. 13997-4000.
95. Camenisch, T.D., et al., *Regulation of cardiac cushion development by hyaluronan*. Exp Clin Cardiol, 2001. **6**(1): p. 4-10.
96. Nagy, N., et al., *Inhibition of hyaluronan synthesis accelerates murine atherosclerosis: novel insights into the role of hyaluronan synthesis*. Circulation, 2010. **122**(22): p. 2313-22.
97. Lee, J.Y. and A.P. Spicer, *Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(5): p. 581-6.
98. Grande-Allen, K.J., et al., *Glycosaminoglycan synthesis and structure as targets for the prevention of calcific aortic valve disease*. Cardiovasc Res, 2007. **76**(1): p. 19-28.
99. Krasinski, R. and H. Tchorzewski, *[Hyaluronan-mediated regulation of inflammation]*. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2007. **61**: p. 683-9.
100. Berbis, P., *[Hyaluronan in inflammation, auto-immunity and cardio-vascular diseases]*. Ann Dermatol Venereol, 2010. **137 Suppl 1**: p. S40-3.
101. Johansson, B., et al., *Evaluation of hyaluronan and calcifications in stenotic and regurgitant aortic valves*. Eur J Cardiothorac Surg, 2011. **39**(1): p. 27-32.
102. Rodriguez, K.J., L.M. Piechura, and K.S. Masters, *Regulation of valvular interstitial cell phenotype and function by hyaluronic acid in 2-D and 3-D culture environments*. Matrix Biol, 2011. **30**(1): p. 70-82.
103. Krishnamurthy, V.K., et al., *Dysregulation of hyaluronan homeostasis during aortic valve disease*. Matrix Biol, 2017. **62**: p. 40-57.
104. McKee, M.D. and A. Nanci, *Osteopontin and the bone remodeling sequence. Colloidal-gold immunocytochemistry of an interfacial extracellular matrix protein*. Ann N Y Acad Sci, 1995. **760**: p. 177-89.
105. Yu, P.J., et al., *Correlation between plasma osteopontin levels and aortic valve calcification: potential insights into the pathogenesis of aortic valve calcification and stenosis*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2009. **138**(1): p. 196-9.
106. Ding, Y., et al., *Pathophysiological role of osteopontin and angiotensin II in atherosclerosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2016. **471**(1): p. 5-9.
107. McKee, M.D. and A. Nanci, *Secretion of Osteopontin by macrophages and its accumulation at tissue surfaces during wound healing in mineralized tissues: a potential requirement for macrophage adhesion and phagocytosis*. Anat Rec, 1996. **245**(2): p. 394-409.
108. Matsue, Y., et al., *Serum osteopontin predicts degree of hepatic fibrosis and serves as a biomarker in patients with hepatitis C virus infection*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0118744.

109. Clemente, N., et al., *Osteopontin Bridging Innate and Adaptive Immunity in Autoimmune Diseases*. J Immunol Res, 2016. **2016**: p. 7675437.
110. Sainger, R., et al., *Dephosphorylation of circulating human osteopontin correlates with severe valvular calcification in patients with calcific aortic valve disease*. Biomarkers, 2012. **17**(2): p. 111-8.
111. Passmore, M., et al., *Osteopontin alters endothelial and valvular interstitial cell behaviour in calcific aortic valve stenosis through HMGB1 regulation*. Eur J Cardiothorac Surg, 2015. **48**(3): p. e20-9.
112. Grau, J.B., et al., *Analysis of osteopontin levels for the identification of asymptomatic patients with calcific aortic valve disease*. Ann Thorac Surg, 2012. **93**(1): p. 79-86.
113. Shen, M., et al., *Osteopontin is associated with bioprosthetic heart valve calcification in humans*. C R Acad Sci III, 1997. **320**(1): p. 49-57.
114. Grases, F., et al., *Role of phytate and osteopontin in the mechanism of soft tissue calcification*. J Nephrol, 2008. **21**(5): p. 768-75.
115. Steitz, S.A., et al., *Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification*. Am J Pathol, 2002. **161**(6): p. 2035-46.
116. Viviane Van Hoof, M.E.D.B., *Interpretation and Clinical Significance of Alkaline Phosphatase Isoenzyme Patterns*. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 1994. **31**(3): p. 197-293.
117. Mathieu, P., et al., *Calcification of human valve interstitial cells is dependent on alkaline phosphatase activity*. J Heart Valve Dis, 2005. **14**(3): p. 353-7.
118. F.J. Schoen, R.J.L., *Bioprosthetic heart valve calcification: membrane-mediated events and alkaline phosphatase*. Bone and Mineral, Elsevier, 1992. **17**: p. 129-133.
119. Cho, N.H., et al., *IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045*. Diabetes Res Clin Pract, 2018. **138**: p. 271-281.
120. Expert Committee on the, D. and M. Classification of Diabetes, *Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2003. **26 Suppl 1**: p. S5-20.
121. Misra, A. and S. Garg, *HbA1c and blood glucose for the diagnosis of diabetes*. Lancet, 2011. **378**(9786): p. 104-6.
122. Association, A.D., *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. Diabetes Care, 2013. **36**(Supplement 1): p. S67-S74.
123. Gerich, J.E., *Type 2 diabetes mellitus is associated with multiple cardiometabolic risk factors*. Clin Cornerstone, 2007. **8**(3): p. 53-68.
124. Deutscher S., R.H.E., Krishnaswami, V., *Diabetes and hypercholesterolemia among patients with calcific aortic stenosis*. J Chron Dis, 1984. **37**(5): p. 407-415.
125. Lorusso, R., et al., *Type 2 diabetes mellitus is associated with faster degeneration of bioprosthetic valve: results from a propensity score-matched Italian multicenter study*. Circulation, 2012. **125**(4): p. 604-14.
126. Dasu, M.R., et al., *Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects*. Diabetes Care, 2010. **33**(4): p. 861-8.
127. McDonald, T.O., et al., *Diabetes and arterial extracellular matrix changes in a porcine model of atherosclerosis*. J Histochem Cytochem, 2007. **55**(11): p. 1149-57.
128. Mangat, R., et al., *Arterial retention of remnant lipoproteins ex vivo is increased in insulin resistance because of increased arterial biglycan and production of cholesterol-rich atherogenic particles that can be improved by ezetimibe in the JCR:LA-cp rat*. J Am Heart Assoc, 2012. **1**(5): p. e003434.
129. Umaerus, M., et al., *HDL2 interferes with LDL association with arterial proteoglycans: a possible athero-protective effect*. Atherosclerosis, 2012. **225**(1): p. 115-20.

130. Bolton, K., et al., *Decorin is a secreted protein associated with obesity and type 2 diabetes*. Int J Obes (Lond), 2008. **32**(7): p. 1113-21.
131. Bolton, K., D. Segal, and K. Walder, *The small leucine-rich proteoglycan, biglycan, is highly expressed in adipose tissue of Psammomys obesus and is associated with obesity and type 2 diabetes*. Biologics, 2012. **6**: p. 67-72.
132. Williams, K.J., et al., *Decorin deficiency enhances progressive nephropathy in diabetic mice*. Am J Pathol, 2007. **171**(5): p. 1441-50.
133. Merline, R., et al., *Decorin deficiency in diabetic mice: aggravation of nephropathy due to overexpression of profibrotic factors, enhanced apoptosis and mononuclear cell infiltration*. J Physiol Pharmacol, 2009. **60 Suppl 4**: p. 5-13.
134. Thompson, J., et al., *Renal accumulation of biglycan and lipid retention accelerates diabetic nephropathy*. Am J Pathol, 2011. **179**(3): p. 1179-87.
135. Chua, B. and E. Shrago, *Effects of experimental diabetes and food intake on rat intestine and serum alkaline phosphatase*. J Nutr, 1978. **108**(2): p. 196-202.
136. Tibi, L., et al., *Plasma alkaline phosphatase isoenzymes in diabetes mellitus*. Clin Chim Acta, 1988. **177**(2): p. 147-55.
137. Kocabay, G., et al., *Alkaline phosphatase: can it be considered as an indicator of liver fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis with type 2 diabetes?* Bratisl Lek Listy, 2011. **112**(11): p. 626-9.
138. Gong, Q., et al., *Expression and regulation of osteopontin in type 1 diabetes*. Islets, 2009. **1**(1): p. 34-41.
139. Berezin, A.E. and A.A. Kremzer, *Circulating osteopontin as a marker of early coronary vascular calcification in type two diabetes mellitus patients with known asymptomatic coronary artery disease*. Atherosclerosis, 2013. **229**(2): p. 475-81.
140. Roseman, S., et al., *The biosynthesis of hyaluronic acid by group A Streptococcus. I. Utilization of 1-C14-glucose*. J Biol Chem, 1953. **203**(1): p. 213-25.
141. Chajara, A., et al., *Circulating hyaluronan and hyaluronidase are increased in diabetic rats*. Diabetologia, 2000. **43**(3): p. 387-8.
142. Nieuwdorp, M., et al., *Perturbation of hyaluronan metabolism predisposes patients with type 1 diabetes mellitus to atherosclerosis*. Diabetologia, 2007. **50**(6): p. 1288-93.
143. Heickendorff, L., T. Ledet, and L.M. Rasmussen, *Glycosaminoglycans in the human aorta in diabetes mellitus: a study of tunica media from areas with and without atherosclerotic plaque*. Diabetologia, 1994. **37**(3): p. 286-92.
144. Yevdokimova, N.Y., *Elevated level of ambient glucose stimulates the synthesis of high-molecular-weight hyaluronic acid by human mesangial cells. The involvement of transforming growth factor beta1 and its activation by thrombospondin-1*. Acta Biochim Pol, 2006. **53**(2): p. 383-93.
145. Wilkenshoff, U. and I. Kruck, *Handbuch der Echokardiographie*. Thieme, 2011. **5**: p. 76.
146. Lang, R.M., et al., *Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging*. Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 2015. **16**(3): p. 233-70.
147. Willems, E., L. Leyns, and J. Vandesompele, *Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates*. Anal Biochem, 2008. **379**(1): p. 127-9.
148. Barth, M., et al., *Degenerative aortic valve disease and diabetes: Implications for a link between proteoglycans and diabetic disorders in the aortic valve*. Diab Vasc Dis Res, 2019. **16**(3): p. 254-269.
149. WHO, *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation*. World Health Organ Tech Rep Ser, 2000. **894**: p. i-xii, 1-253.
150. Gustafsson, M. and J. Boren, *Mechanism of lipoprotein retention by the extracellular matrix*. Curr Opin Lipidol, 2004. **15**(5): p. 505-14.

151. Chen, J.H. and C.A. Simmons, *Cell-matrix interactions in the pathobiology of calcific aortic valve disease: critical roles for matricellular, matricrine, and matrix mechanics cues*. Circ Res, 2011. **108**(12): p. 1510-24.
152. Meng, X., et al., *Expression of functional Toll-like receptors 2 and 4 in human aortic valve interstitial cells: potential roles in aortic valve inflammation and stenosis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **294**(1): p. C29-35.
153. Song, R., et al., *BMP-2 and TGF-beta1 mediate biglycan-induced pro-osteogenic reprogramming in aortic valve interstitial cells*. J Mol Med (Berl), 2015. **93**(4): p. 403-12.
154. Parisuthiman, D., et al., *Biglycan modulates osteoblast differentiation and matrix mineralization*. J Bone Miner Res, 2005. **20**(10): p. 1878-86.
155. Wang, X., et al., *Matrix protein biglycan induces osteoblast differentiation through extracellular signal-regulated kinase and Smad pathways*. Biol Pharm Bull, 2010. **33**(11): p. 1891-7.
156. Young, M.F., et al., *Biglycan knockout mice: new models for musculoskeletal diseases*. Glycoconj J, 2002. **19**(4-5): p. 257-62.
157. Xu, T., et al., *Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice*. Nat Genet, 1998. **20**(1): p. 78-82.
158. Rajamannan, N.M., et al., *Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype*. Circulation, 2003. **107**(17): p. 2181-4.
159. Wilson, P., K. Drennon, and L.R. Tannock, *Regulation of vascular proteoglycan synthesis by metabolic factors associated with diabetes*. J Investig Med, 2007. **55**(1): p. 18-25.
160. Gharagozlian, S., et al., *Effect of hyperglycemic condition on proteoglycan secretion in cultured human endothelial cells*. Eur J Nutr, 2006. **45**(7): p. 369-75.
161. Chen, C.P., S.C. Chang, and W.C. Vivian Yang, *High glucose alters proteoglycan expression and the glycosaminoglycan composition in placentas of women with gestational diabetes mellitus and in cultured trophoblasts*. Placenta, 2007. **28**(2-3): p. 97-106.
162. Danielson, K.G., et al., *Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility*. J Cell Biol, 1997. **136**(3): p. 729-43.
163. Ferdous, Z., et al., *Decorin-transforming growth factor- interaction regulates matrix organization and mechanical characteristics of three-dimensional collagen matrices*. J Biol Chem, 2007. **282**(49): p. 35887-98.
164. Austin, B.A., et al., *Altered collagen fibril formation in the sclera of lumican-deficient mice*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. **43**(6): p. 1695-701.
165. Baba, H., et al., *Expression and localization of lumican in the ischemic and reperfused rat heart*. Jpn Circ J, 2001. **65**(5): p. 445-50.
166. Wolf, Y.G., L.M. Rasmussen, and E. Ruoslahti, *Antibodies against transforming growth factor-beta 1 suppress intimal hyperplasia in a rat model*. J Clin Invest, 1994. **93**(3): p. 1172-8.
167. Johnson, P. and B. Ruffell, *CD44 and its role in inflammation and inflammatory diseases*. Inflamm Allergy Drug Targets, 2009. **8**(3): p. 208-20.
168. Schoen, F.J., et al., *Biomaterial-associated calcification: pathology, mechanisms, and strategies for prevention*. J Biomed Mater Res, 1988. **22**(A1 Suppl): p. 11-36.
169. Panh, L., et al., *Association between serum alkaline phosphatase and coronary artery calcification in a sample of primary cardiovascular prevention patients*. Atherosclerosis, 2017. **260**: p. 81-86.
170. Beertsen, W. and T. van den Bos, *Calcification of dentinal collagen by cultured rabbit periosteum: the role of alkaline phosphatase*. Matrix, 1989. **9**(2): p. 159-71.
171. Henrichsen, E., *Alkaline phosphatase and the calcification in tissue cultures*. Exp Cell Res, 1956. **11**(2): p. 403-16.

172. Nijweide, P.J., E.W. Kawilarang-de Haas, and A.M. Wassenaar, *Alkaline phosphatase and calcification, correlated or not?* Metab Bone Dis Relat Res, 1981. **3**(1): p. 61-6.
173. Canver, C.C., et al., *Association of osteopontin with calcification in human mitral valves.* J Cardiovasc Surg (Torino), 2000. **41**(2): p. 171-4.
174. Fitzpatrick, L.A., et al., *Diffuse calcification in human coronary arteries. Association of osteopontin with atherosclerosis.* J Clin Invest, 1994. **94**(4): p. 1597-604.
175. Cho, H.J., H.J. Cho, and H.S. Kim, *Osteopontin: a multifunctional protein at the crossroads of inflammation, atherosclerosis, and vascular calcification.* Curr Atheroscler Rep, 2009. **11**(3): p. 206-13.
176. Ikeda, T., et al., *Osteopontin mRNA is expressed by smooth muscle-derived foam cells in human atherosclerotic lesions of the aorta.* J Clin Invest, 1993. **92**(6): p. 2814-20.
177. O'Brien, K.D., et al., *Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions.* Circulation, 1995. **92**(8): p. 2163-8.
178. Denhardt, D.T., et al., *Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival.* J Clin Invest, 2001. **107**(9): p. 1055-61.
179. Ge, Q., et al., *Osteopontin regulates macrophage activation and osteoclast formation in hypertensive patients with vascular calcification.* Sci Rep, 2017. **7**: p. 40253.
180. Meng, E., et al., *High mobility group box 1 protein inhibits the proliferation of human mesenchymal stem cells and promotes their migration and differentiation along osteoblastic pathway.* Stem Cells Dev, 2008. **17**(4): p. 805-13.
181. de Souza, A.W., et al., *HMGB1 in vascular diseases: Its role in vascular inflammation and atherosclerosis.* Autoimmun Rev, 2012. **11**(12): p. 909-17.
182. Kalinina, N., et al., *Increased expression of the DNA-binding cytokine HMGB1 in human atherosclerotic lesions: role of activated macrophages and cytokines.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(12): p. 2320-5.
183. Boskey, A.L., et al., *Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel.* Bone Miner, 1993. **22**(2): p. 147-59.
184. Shapses, S.A., et al., *Osteopontin facilitates bone resorption, decreasing bone mineral crystallinity and content during calcium deficiency.* Calcif Tissue Int, 2003. **73**(1): p. 86-92.
185. Saad, F.A., E. Salih, and M.J. Glimcher, *Identification of osteopontin phosphorylation sites involved in bone remodeling and inhibition of pathological calcification.* J Cell Biochem, 2008. **103**(3): p. 852-6.
186. Inagaki, Y., et al., *High glucose levels increase osteopontin production and pathologic calcification in rat dental pulp tissues.* J Endod, 2010. **36**(6): p. 1014-20.
187. Tammi, R., et al., *Hyaluronan synthase induction and hyaluronan accumulation in mouse epidermis following skin injury.* J Invest Dermatol, 2005. **124**(5): p. 898-905.
188. Mummert, M.E., et al., *Development of a peptide inhibitor of hyaluronan-mediated leukocyte trafficking.* J Exp Med, 2000. **192**(6): p. 769-79.
189. Chung, C.H., et al., *Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization.* Calcif Tissue Int, 1992. **51**(4): p. 305-11.
190. Shioi, A., et al., *Beta-glycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine vascular smooth muscle cells.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(11): p. 2003-9.
191. Gwanmesia, P., et al., *Opposite effects of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor on the degeneration of aortic valvular interstitial cell are modified by the extracellular matrix protein fibronectin:*

- implications for heart valve engineering*. Tissue Eng Part A, 2010. **16**(12): p. 3737-46.
192. Cloyd, K.L., et al., *Characterization of porcine aortic valvular interstitial cell 'calcified' nodules*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e48154.
193. Rilla, K., et al., *Hyaluronan synthase 1 (HAS1) requires higher cellular UDP-GlcNAc concentration than HAS2 and HAS3*. J Biol Chem, 2013. **288**(8): p. 5973-83.
194. Monzack, E.L. and K.S. Masters, *Can valvular interstitial cells become true osteoblasts? A side-by-side comparison*. J Heart Valve Dis, 2011. **20**(4): p. 449-63.

6 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg für die Aufnahme in sein junges, motiviertes Forschungsteam, für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Möglichkeit, mein Promotionsvorhaben an seiner Klinik zu verwirklichen.

Ganz besonders danken möchte ich außerdem Dr. rer. nat. Mareike Barth, die mich in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mir jederzeit mit unermüdlichem Einsatz und Erklärungen verlässlich zur Seite stand. Dass daraus eine mittlerweile langjährige Freundschaft entstanden ist, die auch nach Fertigstellung dieser Dissertation besteht, freut mich umso mehr.

Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari als Leiter der Experimentellen Chirurgie der Herzchirurgie bin ich ebenfalls zu großem Dank verpflichtet. Durch seine Präsenz, seinen Ehrgeiz und seine Denkanstöße wurden der Umfang und die Themen dieser Arbeit maßgeblich mitbestimmt und realisierbar.

Ohne die zahlreichen Menschen, die zu der Zeit meiner Arbeit in der Forschungsgruppe tätig waren, wären viele Wege steiniger gewesen. Hier möchte ich insbesondere unserer MTA Gisela Müller für ihren Fleiß und ihre Gewissenhaftigkeit sowie Dr. rer. nat. Antonio Pinto für seine fachlichen Ratschläge und Erklärungen danken.

Meiner damaligen Mitdotorandin und besten Freundin Antje Schomakers verdanke ich nicht nur die vielen heiteren und prägenden Monate im Labor, sondern auch so vieles mehr. Antje, ich danke dir für deine unendliche Freundschaft.

Meinen tiefen Dank möchte ich zudem meinem Freund Sebastian Böing aussprechen, der viele Stunden in konstruktive Kritik zur Optimierung dieser Arbeit gesteckt und mich immer wieder motiviert und angespornt hat.

Abschließend sei meine Familie erwähnt. Insbesondere durch die Unterstützung meiner Eltern wurde mir überhaupt die Möglichkeit meines Medizinstudiums gegeben. Ihren bedingungslosen Rückhalt, ihre Geduld und ihre Liebe empfinde ich als große Privilegien.