

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

**Die Rolle des Activin A-Systems in der degenerativen
Aortenklappenerkrankung bei Diabetes mellitus Typ 2**

Dissertation

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

vorgelegt von
Sebastian Johannes Bauer

2021

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari

Zweitgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Margriet Ouwens

Meinen Großeltern gewidmet.

Zusammenfassung

Die Aortenklappenstenose stellt in Industrieländern das häufigste Klappenitium dar. Grund für die Verengung der Aortenklappe ist dabei ein aktiver Pathomechanismus, die degenerative Aortenklappenerkrankung (*Calcific aortic valve disease*, CAVD). Ein Risikofaktor sowohl für die Entstehung als auch für die Progression der CAVD ist Diabetes mellitus Typ 2 (T2D). Es wurden zwar Biomarker und Risikofaktoren der Erkrankung identifiziert, dennoch gibt es bis heute keine therapeutischen Möglichkeiten, um das Fortschreiten der Stenosierung zu unterbinden, sodass ein operativer oder interventioneller Ersatz der Klappe bislang die einzige Therapiemöglichkeit darstellt.

Das ursprünglich aus der Reproduktionsmedizin bekannte Activin A-System könnte sich in diesem Zusammenhang als vielversprechendes Zielmolekül abzeichnen. Es ist bekannt, dass es an prodegenerativen und proinflammatorischen Prozessen beteiligt ist. Darüber hinaus konnte eine Beteiligung des Moleküls und seines Signalweges in kardiovaskulären Pathologien und T2D gezeigt werden. Ein signifikanter Zusammenhang mit diabetischer Kardiomyopathie wurde aber erst 2013 beschrieben. Trotz vieler Erkenntnisse über die zellulären Effekte, ist die Rolle des Activin A, seiner Rezeptoren und Zielmoleküle in der Entstehung bzw. Progression der CAVD bei T2D noch nicht bekannt und soll in dieser Arbeit näher untersucht werden.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden humane Aortenklappentaschen mittels *quantitative real-time polymerase chain reaction*, *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* und histologischer Färbungen untersucht. Dabei wurden die zwei Stadien der Pathogenese (Fibrosierung und Kalzifizierung) isoliert betrachtet, indem fibrotische und kalzifizierte Bereiche der Klappen getrennt voneinander untersucht wurden. Weiterhin wurde der Einfluss von T2D durch die Unterscheidung zwischen Nicht-Diabetikern und Diabetikern untersucht. Genexpressionsanalysen zeigten hier, dass *Activin A* und dessen Rezeptoren in kalzifiziertem Gewebe stärker exprimiert sind, die intrazellulären Signalmoleküle *SMAD2*, *SMAD3* und *SMAD7* jedoch keinen Unterschied in der Genexpression beider Taschenanteile aufweisen. Bei Diabetikern war *SMAD7* hochreguliert und die Proteinbestimmung zeigte bei isolierter Betrachtung der fibrotischen Taschenanteile eine signifikant höhere Activin A-Konzentration in Aortenklappengewebe von Diabetikern.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Activin A und sein Signalweg an Entstehung bzw. Progression der CAVD beteiligt zu sein scheinen. Zusätzlich könnte T2D vor allem im Initialstadium eine entscheidende Rolle spielen. Perspektivisch könnte dies durch die nähere Analyse der Komponenten des Activin A-Signalwegs *in vitro* untersucht werden.

Summary

Aortic valve stenosis is the most common valvular heart disease in industrial countries. The reason for the gradual narrowing of the aortic valve is an active pathomechanism: calcific aortic valve disease (CAVD). Type 2 diabetes mellitus (T2D) is a risk factor for onset as well as progression of the stenosis. Biomarkers and risk factors have been identified, yet there is no pharmacological target to prevent stenotic progression, and an interventional or surgical valve replacement remains the only therapeutic option.

Originally known in the field of reproductive medicine, the activin A-system seems to be a promising modulating therapeutic variant. It was found to have prodegenerative as well as proinflammatory functions. Additionally, it is known to be involved in cardiovascular diseases and T2D. In 2013 it was reported to be regulated in the context of diabetic cardiomyopathy. Despite its cellular effects, little is known about the role of activin A and its receptors modulating occurrence and progression of CAVD in patients also suffering from T2D. Thus, this will be the focus of the presented work.

The experimental set up of this doctoral thesis was to analyze humane aortic valves with quantitative real-time polymerase chain reaction, enzyme-linked immunosorbent assay and histological staining techniques. To examine two different stages of the pathogenesis (fibrosis and calcification), fibrotic and calcified valve tissues were analyzed separately. Additionally, it was differentiated between diabetic and non-diabetic biological material. Gene expression analysis showed that expression of *activin A* and its receptors is enhanced in calcific valve tissue. Analyzation of the second messengers *SMAD2*, *SMAD3* and *SMAD7* did not concur with these findings. *SMAD7* was upregulated in diabetic valves. Protein analyses showed - when observed in a separate cohort - a higher activin A concentration in fibrotic tissue of diabetics. In summary, the experimental analyses demonstrate that activin A could modulate CAVD in terms of occurrence and progression. T2D could be a triggering factor in initial phases of the disease. Subsequent in vitro evaluations of the components could help to elucidate the potential of activin A as a therapeutic target.

Abkürzungsverzeichnis

ACTA2	α -smooth muscle actin	HRP	horseradish peroxidase
ACVR2A	Activin A Rezeptor Typ 2A	INHBA	Activin A
ACVR2B	Activin A Rezeptor Typ 2B	MAP	Mitogen activated protein
AK	Aortenklappe	mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
ALK	<i>Activin receptor-like kinase</i>	OPN	Osteopontin
AS	Aortenklappenstenose	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
BAMBI	<i>Bone morphogenic protein and activin membrane-bound inhibitor</i>	qPCR	<i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
BCA	Bicinchoninsäure	RANK	Receptoractivator of nuclear factor kappa B
BGP	Osteocalcin	RPL13A	Ribosomales Protein L13a
BMI	Körpermasseindex	SDS	Natriumaurylsulfat
BMP-2	<i>Bone morphogenic protein 2</i>	SEM	Standardfehler des Mittelwertes
BSA	Bovines Serum Albumin	SMAD	Mothers against decapentaplegic homolog
CAVD	<i>Calcific aortic valve disease</i> Degenerative Aortenklappenerkrankung	T2D	Diabetes mellitus Typ 2
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure	TGF	Transforming Growth Factor
CRIPTO	<i>Cryptic family protein 1B</i>	VIC	Valvuläre Interstitialzelle
CHI3L1	Chitinase-3-like-1		
COL1A1	Kollagen Typ 1		
CT	<i>Cycle threshold</i>		
DAB	3,3'-Diaminobenzidine		
DM	Diabetes mellitus		
DNA	Desoxyribonukleinsäure		
ELISA	Enzyme-linked Immunsorbent Assay		
EZM	Extrazelluläre Matrix		
Hb	Hämoglobin		

Entsprechend den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe sowie der Genomenomenklatur der *Human Genome Organisation* wurden Proteine groß und die zugehörigen humanen Gene groß und kursiv geschrieben [6, 7].

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Inhaltsverzeichnis	IV
1. Einleitung.....	1
1.1. Die degenerative Aortenklappenerkrankung	1
1.1.1. Ätiologie und Epidemiologie.....	1
1.1.2. Pathogenese.....	2
1.2. Diabetes mellitus.....	4
1.2.1. Diabetes mellitus und die degenerative Aortenklapperkrankung	4
1.3. Activin A und der Activin A-Signalweg	4
1.3.1. Activin A, Diabetes mellitus und kardiovaskuläre Erkrankungen.....	6
1.4. Zielsetzung dieser Arbeit	8
2. Materialien und Methoden.....	9
2.1. Patientenkohorten	9
2.2. mRNA-Isolation aus Klappengewebe.....	10
2.3. Quantität und Qualität der mRNA und reverse Transkription.....	11
2.4. Primersequenzen.....	12
2.5. Expressionsanalyse mittels qPCR.....	12
2.6. Proteinaufreinigung.....	13
2.7. Proteinkonzentrationsbestimmung.....	14
2.8. Activin A Enzyme linked Immunosorbent Assay	16
2.9. Histologie und Immunhistochemie	17
2.9.1. Hämatoxylin Eosin Färbung	17
2.9.2. Von Kossa Färbung.....	18
2.9.3. Movat Pentachrom Färbung.....	19
2.9.4. Immunhistologische Färbungen.....	22
2.10. Statistische Auswertung.....	24
3. Ergebnisse	25
3.1. Patientenkohorten	25
3.2. Charakterisierung der Genexpression	26
3.2.1. Integritätsmessung	26
3.2.2. Genexpression der Activin A-Signalkaskade	26
3.2.3. Genexpression von Umbau- und Degenerationsmarkern	28

3.2.4. Einfluss von Diabetes mellitus Typ 2 auf die Genexpression der Activin A-Signalkaskade	30
3.2.5. Einfluss von Diabetes mellitus Typ 2 auf die Genexpression von Umbau- und Degenerationsmarkern	32
3.3. Proteinexpression von Activin A und der Einfluss von Diabetes mellitus Typ 2	34
3.4. Histologische Darstellung von Matrixbestandteilen degenerierter humaner Aortenklappen.....	37
3.5. Immunhistochemische Darstellung von Matrixbestandteilen degenerierter humaner Aortenklappen.....	39
4. Diskussion.....	42
4.1. Versuchsaufbau und Etablierungsarbeiten.....	42
4.2. Activin A, die degenerative Aortenklappenerkrankung und Diabetes mellitus	43
4.3. Extrazelluläre Matrixbestandteile: Eine mögliche Schlüsselstelle im Degenerationsprozess der Aortenklappe.....	47
4.4. Aussagekraft und Limitationen der Promotionsarbeit	50
4.5. Ausblick	51
5. Literaturverzeichnis	53
6. Abbildungsverzeichnis.....	60
7. Tabellenverzeichnis	60

1. Einleitung

1.1. Die degenerative Aortenklappenerkrankung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die führende Todesursache weltweit [8]. Herzklappenerkrankungen (sogenannte Klappenvitien) werden neben Krankheitsbildern wie der Koronaren Herzkrankheit und der Herzinsuffizienz auch zu den kardiovaskulären Erkrankungen gezählt [9]. Sie können grundsätzlich jede Klappe betreffen, am häufigsten treten jedoch Mitralklappen- und Aortenklappenerkrankungen auf [10]. Dabei ist die Aortenklappenstenose (AS), nach der koronaren Herzkrankheit, die zweithäufigste Indikation zu einer kardiovaskulären Intervention [11].

Die Aortenklappe (AK) liegt im Ausgang des linken Ventrikels zur Aorta ascendens. Es handelt sich um eine Taschenklappe, bestehend aus drei halbmondförmigen Taschen, die den Rückfluss des Blutes in den linken Ventrikel verhindern [12].

Aortenklappenerkrankungen werden in Stenosen und Insuffizienzen unterteilt. Stenosen sind Verengungen der Klappe, die eine verminderte Klappenöffnungsfläche nach sich ziehen. Bei Insuffizienzen kann die Klappe nicht mehr richtig schließen und es kommt während der Diastole zu einem vermehrten Rückfluss in den linken Ventrikel. Beide Aortenklappenerkrankungen können aufgrund kardialer Anpassungsmechanismen viele Jahre asymptomatisch verlaufen. Schlussendlich führt sowohl eine Stenose als auch eine Insuffizienz über längere Zeit zu einer vermehrten Volumen- bzw. Druckbelastung des linken Ventrikels. Ohne weitere Intervention hat dies einen Umbau des linken Ventrikels und letztendlich eine chronische Herzinsuffizienz zur Folge [12-14].

1.1.1. Ätiologie und Epidemiologie

Eine AS resultiert in Industrienationen am häufigsten aus Kalzifizierungen des Klappengewebes. Die Prävalenz der Erkrankung ist altersabhängig und erreicht fast 10% in der über 80-jährigen Bevölkerung. Folglich ist bei stetiger Alterung der Bevölkerung eine Zunahme der Prävalenz zu erwarten [15]. Zusätzlich können Entstehung und Progression durch sogenannte kardiovaskuläre Risikofaktoren beeinflusst werden. Hierzu zählen Diabetes mellitus (DM), arterielle Hypertonie, Dyslipoproteinämie und eine positive Raucheranamnese [16]. Angeborene bikuspidale AK stellen die zweithäufigste Ursache für eine Stenose dar. Ein AK-Ersatz muss bei jüngerem Erkrankungsalter wesentlich früher erfolgen [15].

Eine AK-Insuffizienz ist ebenso vielfältiger Genese. Während in Entwicklungsländern rheumatische Herzerkrankungen für eine Stenose und eine Insuffizienz die führende Ursache

darstellen, ist in Industrienationen eine Insuffizienz meist auf Degenerationsprozesse oder kongenitale Anomalien zurückzuführen. Akut kann eine Insuffizienz auch im Rahmen einer Endokarditis oder einer Aortendissektion auftreten [13]. Wie auch bei der Stenose nimmt die Prävalenz mit zunehmendem Alter zu [10].

1.1.2. Pathogenese

Der Pathomechanismus der degenerativen Aortenklappenerkrankung (*Calcific aortic valve disease*, CAVD) ist ein aktiver Prozess mit multifaktorieller Genese, der dem der Arteriosklerose ähnelt (Abbildung 2) [17]. Es wird angenommen, dass neben Biomechanik und Inflammation auch eine hormonelle und genetische Komponente besteht. Grundsätzlich führt eine Beschädigung der Klappe zu einer Entzündungsreaktion, die bei weiterem Bestehen zu einem fibrösen Umbau und schlussendlich zur Kalzifizierung von Taschenanteilen führt [5].

Die AK wird in drei Schichten unterteilt: Lamina fibrosa, spongiosa und ventricularis (Abbildung 1). Auf aortaler und ventrikulärer Seite werden diese durch eine Endothelzellschicht begrenzt. Durch chronische mechanische Mehrbelastung und vermehrte Scherkräfte in höherem Alter kommt es initial zu einer Endothelzellschädigung. Wie auch bei der Arteriosklerose folgt der Schädigung die Einwanderung von Immunzellen und Lipoproteinen. Monozyten differenzieren zu Makrophagen und sekretieren proinflammatorische Zytokine (u.a. Tumornekrosefaktor α , *Transforming Growth Factor* (TGF) β 1, Interleukin-1 β). Eine langanhaltende Entzündungsreaktion aktiviert valvuläre Interstitialzellen (VICs). VICs sind in jeder Zellschicht der Klappe vorhanden und können je nach Stimulus differenzieren [18]. Proinflammatorische Stimuli führen zu einer vermehrten Differenzierung zu Myofibroblasten. Eine gesteigerte Synthese und Sekretion von Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM) ist die Folge. Eine Verdickung der AK mit Fibroseknötchen wird sichtbar. Zusätzlich sind durch Angiogenese auch vermehrt Mikrovaskularisationen vorhanden. Aufgrund weiterer Aktivierungen von Signalwegen differenzieren Myofibroblasten zu Osteoblasten. *Wnt3-Lrp5-beta catenin* [19], RANK/RANKL [*receptor activator of nuclear factor kappa B* -(ligand)] [20] und *Runx-2/NOTCH-1* [21] sind als wichtige Mediatoren dieses Schrittes identifiziert worden. Schlussendlich werden vermehrt Proteine der Knochensubstanz synthetisiert: Kollagen Typ 1 (COL1A1), Osteopontin (OPN), Osteocalcin (BGP), *Bone morphogenic protein 2* (BMP-2) [22]. Der Pathomechanismus ist irreversibel und ein Klappenersatz wird unumgänglich [5].

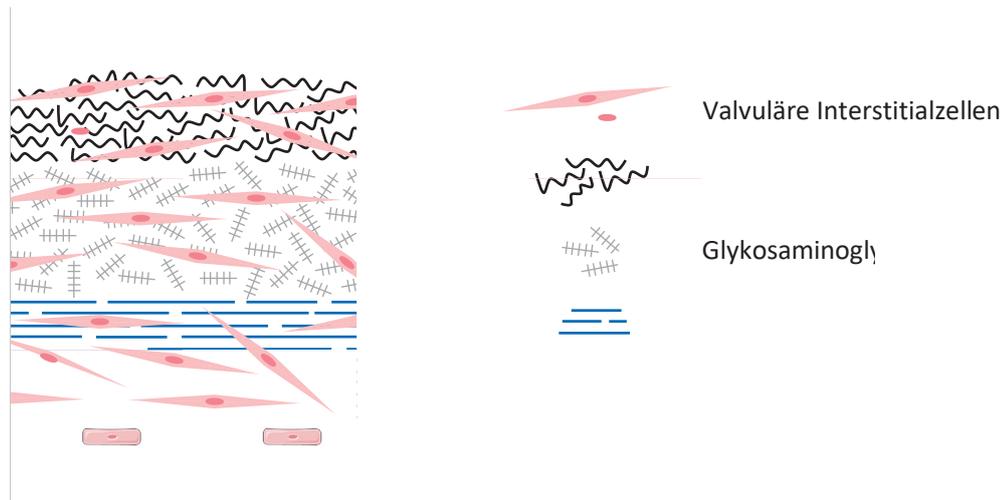
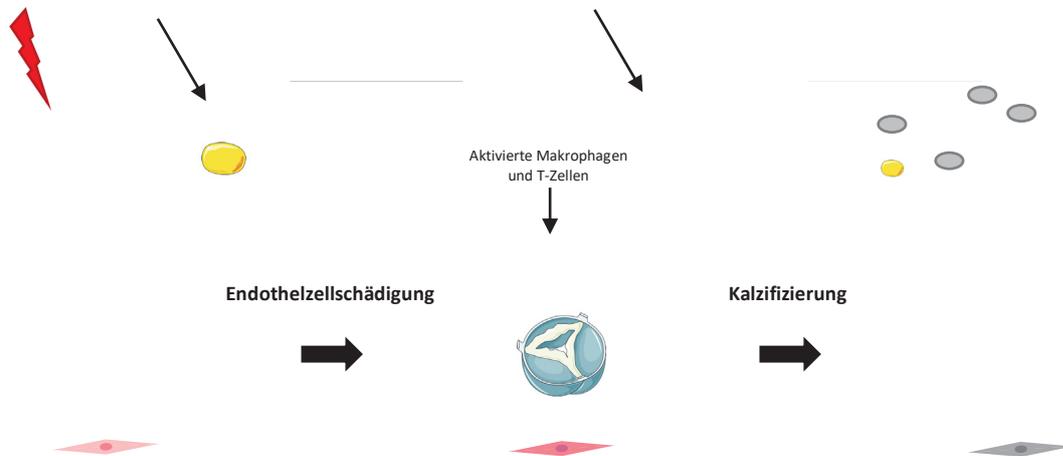


Abbildung 1: Dreischichtiger Aufbau der AV

Die AV zeigt einen dreischichtigen Aufbau. **A:** Endothel auf der aortalen Seite. **B:** Lamina fibrosa mit VIC und Kollagenfasern **C:** Lamina spongiosa mit Glykosaminoglykanen und VICs. **D:** Lamina ventricularis mit Elastin und VICs. **E:** Endothel der ventrikulären Seite. Die gezeigte schematische Abbildung der AV wurde [1] angelehnt und mit [4] erstellt.



Anfangs führt mechanischer Stress zu einer Endothelzellschädigung des AV-Gewebes. Immunzellen und Lipide wandern ein und proinflammatorische Zytokine (Tumornekrosefaktor α , Interleukin-1 β , TGF β) werden ausgeschüttet. Es folgt die Differenzierung von VICs zu Myofibroblasten. Durch eine langanhaltend vermehrte Synthese von EZM-Proteinen wird die Klappe fibrotisch. Schlussendlich folgt eine Differenzierung zu Osteoblasten. Proteine der Knochensubstanz werden vermehrt synthetisiert und Kalziumablagerungen werden sichtbar. Die gezeigte schematische Abbildung der CAVD wurde an [1] angelehnt und mit [4] erstellt.

1.2. Diabetes mellitus

DM beschreibt eine Gruppe von Stoffwechselerkrankungen, die mit einer erhöhten Blutglukosekonzentration einhergehen [23]. Weltweit leidet fast jeder zehnte Erwachsene unter DM und mit einem Anteil von 90 % stellt Diabetes mellitus Typ 2 (T2D) den häufigsten Subtyp dar. Die Pathogenese von T2D basiert auf einer genetischen Komponente und Übergewicht. Da vor allem in Industrienationen eine Zunahme des durchschnittlichen Körpergewichts zu beobachten ist wird vermutet, dass 2040 über 600 Millionen Menschen an DM leiden werden [24-26].

Pathophysiologisch resultiert T2D aus einer peripheren Insulinresistenz. Eine zunächst gesteigerte, dann aber verminderte Insulinsekretion der β -Zellen des Pankreas ist die Folge. Der Transport von Glukose in die Zelle ist beeinträchtigt und ohne medikamentöse Intervention haben Patienten chronisch erhöhte Blutzuckerwerte. Durch die Zunahme der Glukosekonzentration im Blut, bindet Glukose vermehrt an Hämoglobin (Hb), woraus sich der sogenannte HbA1c als diagnostischer Parameter ableitet, der den Langzeitblutzucker widerspiegelt. Werte $> 6,5 \%$ werden als pathologisch angesehen [26].

Neben Folgeschäden wie verschiedenen Mikroangiopathien ist auch das Erkrankungsrisiko für Makroangiopathien wie der Koronaren Herzkrankheit oder der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit erhöht [26]. Bei der CAVD wird ebenfalls ein erhöhtes Erkrankungsrisiko bei bestehendem T2D beobachtet [27].

1.2.1. Diabetes mellitus und die degenerative Aortenklappenkrankung

Der Einfluss von kardiovaskulären Risikofaktoren auf Erkrankungsbeginn, Progression und Mortalität der CAVD wurde in vielen Studien untersucht. 32 % aller Typ-2-Diabetiker leiden an mindestens einer kardiovaskulären Erkrankung und das Risiko an dieser zu versterben ist höher als bei Menschen ohne Diabetesleiden [28]. Ebenso zeigen verschiedene retrospektive und prospektive Studien, dass Diabetes signifikant mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit an einer AS zu erkranken assoziiert ist. Mit jedem weiteren kardiovaskulären Risikofaktor wird eine zusätzliche Kalzifizierung wahrscheinlicher [29]. Trotz der fundierten klinischen Datenlage sind die zellulären Mechanismen noch weitestgehend ungeklärt.

1.3. Activin A und der Activin A-Signalweg

Die Glykoproteine Activin und Inhibin bilden eine Subgruppe der bekannten TGF-Superfamilie [30]. Anfangs als Regulatoren des Follikel-stimulierenden Hormons entdeckt, sind die

Funktionen längst nicht mehr auf hormonelle Kreisläufe beschränkt [3]. Mittlerweile werden je nach Untereinheit mehrere Isoformen des Activins unterschieden, wobei Activin A (INHBA) die am besten erforschte Isoform darstellt. Durch Bindung an die extrazelluläre Domäne transmembranärer Rezeptoren erfolgt die intrazelluläre Signaltransduktion durch *mothers against decapentaplegic homolog* (SMAD)-Proteine oder den *mitogen activated protein* (MAP)-Kinase-Weg. Transkriptionsfaktoren werden aktiviert und je nach Zelltyp und -stadium entsprechende Gene exprimiert [31].

Durch die Zugehörigkeit zur TGF-Superfamilie sind Rezeptoren und intrazelluläre Signaltransduktion ähnlich denen des TGF-Signalwegs (Abbildung 3) [32]. INHBA und Activin B wirken über die Bindung an einen von zwei Typ 2 Rezeptoren (*activin receptor type-2A*, ACVR2A; *activin receptor type-2B*, ACVR2B), der anschließend mit einem Typ 1 Rezeptor (*activin receptor-like kinase*, ALK) einen Rezeptorkomplex bildet. Je nach Activin-Isoform wird ein bestimmter ALK-Rezeptor (ALK1-7) rekrutiert, im Falle von INHBA ist dies ALK4 [33]. Obwohl Typ 1 und Typ 2 Rezeptoren eine extrazelluläre Bindedomäne besitzen, bindet INHBA lediglich an Typ 2 Rezeptoren [32]. Es kommt in weiterer Folge zu Phosphorylierungen der *second messenger* SMAD2 und SMAD3. Die aktivierten SMAD2 und SMAD3 komplexieren mit SMAD4. Dieser Komplex migriert in den Zellkern und bindet zell- und triggerabhängig verschiedene Transkriptionsfaktoren. SMAD7 wirkt u.a. durch Dephosphorylierungen und Ubiquitinierungen inhibierend auf die Signalweiterleitung [34, 35].



Durch die Bindung von INHBA an ACVR2A oder ACVR2B dimerisiert der Rezeptor mit ALK4. SMAD1 und SMAD3 werden phosphoryliert und bilden mit SMAD4 einen Signalkomplex, der in den Zellkern migriert, Transkriptionsfaktoren bindet und entsprechende Gene moduliert. SMAD7 wirkt u.a. durch Dephosphorylierungen inhibierend auf die Signaltransduktion. Abkürzungen: ACVR2A/B = Activin Rezeptor Typ-2A/B, ALK4 = *Activin receptor-like kinase 4*, P = Phosphorylierung, SMAD = *Mothers against decapentaplegic homolog*. Die gezeigte Abbildung der INHBA-Signalkaskade wurde an [2, 3] angelehnt und mit [4] erstellt.

1.3.1. Activin A, Diabetes mellitus und kardiovaskuläre Erkrankungen

Die Funktionen von INHBA sind vielfältig und beschränken sich nicht auf die Reproduktionsmedizin [36]. Mittlerweile wurde ein dysreguliertes INHBA-System mit einer Vielzahl von Erkrankungen in Verbindung gebracht. Ebenso ist es an der Hämatopoese beteiligt und wird in Immunzellen und Fibroblasten exprimiert [3].

INHBA wird abhängig von Entzündungsphase und Gewebe eine pro- und anti-inflammatorische Funktion zugeschrieben. In der Anfangsphase führt eine INHBA-Exposition bei Monozyten und Makrophagen zu einer gesteigerten Synthese proinflammatorischer Mediatoren [37, 38]. Zusätzlich hat es chemotaktische Eigenschaften [39]. In Spätphasen wirkt INHBA hingegen eher antiinflammatorisch. Zytokine, deren Synthese zuvor stimuliert wurde,

werden in aktivierten Makrophagen inhibiert. INHBA kann eine mögliche regulatorische Funktion bei Inflammationsprozessen zugeschrieben werden [2].

Beteiligungen von INHBA an Fibrosierungsprozessen konnten in mehreren Organsystemen nachgewiesen werden [40, 41]. In Fibroblasten der Lunge zeigten *in vitro* Versuche bereits bei niedrigen INHBA-Konzentrationen einen unmittelbaren Proliferationsstimulus. Auch Differenzierungen zu Myofibroblasten, ein entscheidender Schritt der Fibrosierung, konnten gezeigt werden [42]. Neben Proliferation und Differenzierung führte eine INHBA-Exposition auch zu einer vermehrten Genexpression von *COL1A1* und *α -smooth muscle actin (ACTA2)*, zwei Proteine, die selbst auch profibrotisch wirken [41, 42].

Bei kardiovaskulären Erkrankungen wurde INHBA bisher vor allem eine regulatorische Funktion zugeschrieben [43]. Es zeigte eine Beteiligung am linksventrikulären *Remodeling*, sowohl bei akuten Ereignissen wie einem akuten Myokardinfarkt als auch bei chronischer Belastung im Rahmen einer Herzinsuffizienz [44, 45]. Zusätzlich korrelieren bei einer chronischen Herzinsuffizienz INHBA Serumspiegel mit der Ausprägung der Erkrankung [45]. Da es auch an Fibrosierungsprozessen weiterer Organe beteiligt ist, wird auch beim Herzen ein Zusammenhang vermutet. Neben kardialen Erkrankungen ist INHBA auch an vaskulären Erkrankungen beteiligt. Bei Arteriosklerose zeigte Kozaki et. al, dass es die Differenzierung von Makrophagen zu Schaumzellen inhibiert [46]. Gleichzeitig wurde in *in vivo* Versuchen gezeigt, dass es als Proliferationsstimulus für glatte Muskelzellen an Reparaturmechanismen der Gefäßwand beteiligt ist [47].

Im Zusammenhang mit T2D wurde gezeigt, dass INHBA zum einen als klinischer Verlaufsparemeter in Erwägung gezogen werden könnte, zum anderen wurde es als möglicher pathologischer Faktor identifiziert. Denn bei Diabetikern mit zusätzlicher koronarer Herzkrankheit korrelierte das Serumlevel von INHBA mit dem Schweregrad der Erkrankung. Ueland *et al.* vermutet, dass dies auf antiinflammatorische Gegensteuerungsmechanismen von INHBA zurückzuführen ist [48]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass INHBA mit Insulinresistenzparametern korreliert und in diesem Zusammenhang auch einen möglichen Indikator für den Schweregrad des Diabetes darstellen könnte [49]. Bei der diabetischen Kardiomyopathie, einer der vielen Folgeerkrankungen des T2D, wird INHBA eine entscheidende Rolle im Pathomechanismus zugeschrieben [50]. Es wird bei Diabetikern verstärkt in epikardialen Adipozyten synthetisiert und sekretiert [51].

1.4. Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Rolle des INHBA-Systems bei der Entstehung und Progression der CAVD im Zusammenhang mit DM. Um die damit einhergehenden Fragen zu beantworten, wurden Proben bei einem AK-Ersatz entnommen, der Methodik entsprechend aufbereitet und mittels *quantitative real-time polymerase chain reaction* (qPCR, n=90), *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA, n=20) und histologischer Färbungen (n=12) analysiert.

2. Materialien und Methoden

2.1. Patientenkohorten

Die Genehmigung für die Verwendung von AK-Gewebe erfolgte durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Studiennummer des Ethikvotums: 4412R). Nach präoperativ erfolgter Aufklärung und schriftlicher Zustimmung der Patienten darf demnach AK-Gewebe im Zuge einer AK-Operation verwendet werden. Die einzelnen Taschen der AK wurden dafür bei geeigneter Morphologie unmittelbar nach Entnahme in einen makroskopisch sichtbaren kalzifizierten und fibrotischen Anteil geteilt, fotografiert und innerhalb weniger Minuten in Kryoröhrchen bei -160 °C in flüssigem Stickstoff gelagert (Abbildung 4). Für die Analyse wurden nur Proben verwendet, die klar voneinander abgrenzbare fibrotische und kalzifizierte Degenerationsstadien zeigten. Neben der Archivierung des Gewebes selbst wurden demografische Patientendaten, sowie präoperative Labor- und echokardiographische Befunde, erhoben. Eine trikuspidale Klappe und Angabe des präoperativen HbA1c bzw. eine gesicherte Diabetes-Diagnose waren dabei Einschlusskriterium für die Aufnahme der Proben in die entsprechenden Kohorten. Zusätzlich wurden aufgrund eines nachweislich verfrühten Kalzifizierungsprozesses bei Patienten mit kongenitalen bikuspiden AKs eben diese nicht in die jeweiligen Patientenkohorten mit einbezogen [52].

Die in Frage kommenden Patientenproben wurden in zwei Gruppen unterteilt: Diabetiker (im Folgenden als T2D bezeichnet) und Nicht-Diabetiker (im Folgenden als non-T2D bezeichnet). Dabei erfolgte die Eingruppierung anhand gesicherter Diagnose oder anhand des HbA1c Wertes. Patienten ohne Diabetes-Diagnose aber mit einem HbA1c > 6,5 % wurden als Diabetiker gewertet. AK von Typ 1 Diabetikern wurden nicht aufgenommen. Aufgrund der tabellarischen Auflistung von Untersuchungsbefunden und Nebendiagnosen konnten AKs von Diabetikern mit einem sehr gut eingestellten HbA1c (< 6,5 %) ebenso ausgeschlossen werden. Bei beiden Gruppen wurden der fibrotische und kalzifizierte Klappenanteil separat analysiert.

Messenger ribonucleic acid (mRNA)-Expressionsanalyse mittels qPCR

Zur mRNA-Expressionsanalyse wurden in Summe 90 Patientenproben bearbeitet. Die T2D-Kohorte umfasste 19 Patienten, während 26 Taschen von non-T2D analysiert wurden.

Activin A Enzyme linked Immunosorbent Assay

Zur Coomassie-basierten Proteinkonzentrationsbestimmung und Bestimmung der INHBA-Konzentration in humanem Klappengewebe mittels ELISA wurden insgesamt 40 Proben bearbeitet, welche von zehn Patienten aus der T2D-Kohorte und zehn Patienten aus der non-

T2D-Kohorte stammten. Dabei handelte es sich um Patienten aus der mRNA-Kohorte, jedoch wurde hier eine andere Tasche der AK aufgearbeitet.

Histologie

Wie auch bei der mRNA-Expressionsanalyse und dem ELISA, wurden hier AK derselben Patienten verwendet, jedoch ein weiterer dritter Klappenanteil analysiert. In Summe wurden also sechs Taschen separat in ihren fibrotischen und kalzifizierten Anteilen histologisch aufbereitet: drei AK der T2D-Kohorte und weitere drei der non-T2D-Kohorte.



Abbildung 4: Degenerationsgrade einer humanen AK-Tasche

Die AK-Tasche wurde unmittelbar postoperativ in einen fibrotischen und kalzifizierten Anteil unterteilt. Fibroseknötchen und Kalzifizierungen sind deutlich sichtbar.

2.2. mRNA-Isolation aus Klappengewebe

Die mRNA-Isolation aus Klappengewebe erfolgte auf Basis der Phenol-Chloroform-Methode [53], in Anlehnung an ein Protokoll der Arbeitsgruppe Ma Hongbao et. al [54] und mit Hilfe eines RNeasy® Mini Kits. Die gesamten Arbeiten wurden, soweit es möglich war, unter einem Abzug und unter gekühlten Bedingungen durchgeführt. Die Proben wurden zwischen den Arbeitsschritten auf Eis gelagert und die Zentrifuge auf 4 °C gekühlt. Es wurde mit RNase freien bzw. RNASE AWAY® beschichteten Materialien gearbeitet.

Zunächst wurde das Gewebe mittels eines gekühlten Mörsers zerkleinert und in 1,5 ml TRI Reagent® gelöst. Die weitere Aufreinigung erfolgte durch Zugabe von 0,3 ml Chloroform je 1,5 ml TRI Reagent® und manuellem Schütteln mit anschließender 15-minütiger Zentrifugation bei 11.000 rpm. Durch die Zentrifugation bildeten sich drei Phasen [54]: Eine wässrige transparente RNA-haltige Phase, eine weißliche Desoxyribonukleinsäure (DNA)-haltige Interphase und eine rötliche, protein- und lipidhaltige Phenol-Chloroform-Phase. Zur weiteren RNA-Isolation wurde die wässrige transparente Phase in ein neues

Mikroreaktionsgefäß überführt und mit der gleichen Menge Ethanol (70 %) vermischt. Die verbliebenen Phasen wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

Die weiteren Schritte der Aufreinigung wurden mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits nach Herstellerangaben durchgeführt und die erhaltene RNA sofort auf Eis gestellt bzw. bei -80 °C gelagert.

Materialien	Hersteller	Artikel-Nummer
LiChrosolv® Water	Merck Millipore	1.15333.2500
Ethanol Chromasolv® ≥ 99.8%	Sigma-Aldrich	34852
TRI Reagent®	Sigma	T9424
RNASE AWAY®	Molecular BioProducts	7003
Chloroform	Sigma	C2432
RNeasy® Mini Kit	Qiagen	74106
RDD-Puffer	Qiagen	1011132
DNase	Qiagen	79254

Laborgeräte	Hersteller
Homogenisator (D-8)	Micra
Zentrifuge 5804R	Eppendorf

2.3. Quantität und Qualität der mRNA und reverse Transkription

Konzentrationsbestimmung

Zur Messung der RNA-Qualität und Quantität wurde ein Tecan Reader (Infinite M1000 PRO) verwendet. Die Absorption wurde bei 260 nm und 280 nm in Doppelbestimmungen gemessen und das Verhältnis der Absorptionen bei unterschiedlicher Wellenlänge bestimmt (Ratio).

Integritätsmessung

Zur Qualitätskontrolle gemäß der *MIQE Guidelines (Minimum information for the publication of quantitative real-time PCR experiments)* [55] wurden RNA-Integritätsmessungen in Auftrag gegeben. Durch einen 2100 Bioanalyzer (Agilent USA) wurde für jede in der RNA-Isolation bearbeitete Patientenprobe die *RNA Integrity Number* bestimmt. Die *RNA Integrity Number* kategorisiert die Qualität der RNA in zehn Stufen: 1 repräsentiert eine teilweise abgebaute, qualitativ schlechte RNA, 10 steht hingegen für eine qualitativ sehr gute und stabile RNA [56].

Reverse Transkription

Für die Schritte der reversen Transkription der RNA in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) wurde ein QuantiTect® Reverse Transcription Kit verwendet

und nach dem Protokoll des Herstellers (Qiagen) gearbeitet. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die cDNA anschließend bei -20 °C gelagert.

Materialien	Hersteller	Artikel-Nummer
Nuclease-Free Water	Promega Corporation	P119
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen	205313

Laborgeräte	Hersteller
Tecan Reader, infinite M1000 PRO	Tecan Deutschland
2100 Bioanalyzer	Agilent USA
T3000 Thermocycler	Biometra®

2.4. Primersequenzen

Tabelle 1: Primersequenzen

Zielgen	Vorwärtsprimer 5'-3'	Rückwärtsprimer 5'-3'
<i>INHBA</i>	GGAGGGCAGAAATGAATGAA	ATCTCGAAGTGCAGCGTCTT
<i>ACVR2A</i>	GAAAGCCAGTTGCTTAACG	ATGCTTCATTCCAGGCAAAC
<i>ACVR2B</i>	AGTTCATTGCTGCCGAGAAG	TGTGATGATGTTCCCCTTGA
<i>ALK4</i>	CGGGCTTGATATTGGGAGA	TTCCTCAATGGAAGGGTCAG
<i>SMAD2</i>	ATGGAGAAACAAGTGACCAACA	CACCAAATGCAGGTTCTGA
<i>SMAD3</i>	CCCTGGCTACCTGAGTGAAG	ATTCGGGGATAGGTTTGGAG
<i>SMAD7</i>	CCCGATGGATTTTCTCAAAC	AGGGGCCAGATAATTCGTTT
<i>CHI3L1</i>	AAGCAACGATCACATCGA	AAGTTCCATCCTCCGACAGA
<i>ACTA2</i>	CGGGACTAAGACGGGAATCCT	AGAGCCATTGTCACACACCA
<i>COL1A1</i>	ATGACTATGAGTATGGGG	TGGGTCCTCTGTTACTTTT
<i>OPN</i>	TTGCAGTGATTTGCTTTTGC	GCCACAGCATCTGGGTATTT
<i>TGFβ1</i>	CTGAACCCGTGTTGCTCTC	GAGGTATCGCCAGGAATTGT
<i>RPL13A</i>	GTACGCTGTGAAGGCATCAA	GTTGGTGTTGTTTCATCCGCTTG

2.5. Expressionsanalyse mittels qPCR

Zur mRNA-Expressionsanalyse wurde ein GoTaq® qPCR Master Mix verwendet und nach Protokoll des Herstellers (Promega) gearbeitet. Die durchgeführte Messung erfolgte mit einem StepOnePlus Real Time PCR System und mit der StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems Inc.). Als endogenes Kontrollgen wurde *ribosomales protein L13a (RPL13A)* herangezogen. Die Auswertung erfolgte unter Berücksichtigung von Doppelbestimmungen. Proben, deren Schmelzkurven mehr als einen *cycle threshold* (CT)-Wert voneinander abwichen wurden zunächst wiederholt und bei weiter bestehender Abweichung nicht in die Auswertung mit einbezogen. Ebenso wurde bei CT-Werten > 35 eines AK-Anteils die gesamte Probe (fibrotisch + kalzifiziert) in der Auswertung nicht berücksichtigt. Die Unterschiede in der angegebenen

Probenanzahl in den Ergebnissen ergibt sich aus diesen Ausschlusskriterien. Die Quantifizierung der einzelnen Zielgene wurde gemäß der von Livak et al. beschriebenen $\Delta\Delta CT$ -Methode durchgeführt und nach Korrektur durch die endogene Kontrolle *RPL13A* ermittelt [57]. Dabei wurde bei jeder neuen Genanalyse die mRNA-Expression auf dieselbe interne fibrotische Kontrolle bezogen.

Materialien	Hersteller	Artikel-Nummer
GoTaq® qPCR Master Mix	Promega	A6002
Nuclease-Free Water	Promega Corporation	P119

Laborgeräte	Hersteller
StepOnePlus, Real Time PCR System	Applied Biosystems Inc.

2.6. Proteinaufreinigung

Aus TRI Reagent®

Die gesamte Arbeit der Proteinisolation aus der bei der RNA-Isolation mittels TRI Reagent® anfallenden Phenol-Chloroform-Phase wurde, soweit es möglich war, unter einem Abzug und unter gekühlten Bedingungen durchgeführt. Die Proben wurden dauerhaft auf Eis gelagert. Die Zentrifugation wurde bei 4 °C durchgeführt. Die Durchführung der Proteinisolation ist an das Protokoll der Arbeitsgruppe Ma Hongbao et. al [54] angelehnt.

Zunächst wurde die Phenol-Chloroform-Phase mit 450 µl Ethanol (100 %) pro 1,5 ml ursprünglichen TRI Reagents® vorsichtig vermischt, für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für fünf Minuten bei 4600 rpm zentrifugiert. Das anschließend angefallene Pellet wurde verworfen und der Überstand in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Durch die Zugabe von 2,25 ml Isopropanol (100 %) pro 1,5 ml ursprünglichen Tri Reagents® wurde der Proteinanteil nach zehnminütiger Inkubation mit konsekutiver zehnminütiger Zentrifugation bei 11400 rpm präzipitiert. Es folgten drei Reinigungsschritte des Pellets mit 0,3 M Guanidin-Hydrochlorid in Ethanol (95 %), 20-minütiger Inkubation und fünfminütiger Zentrifugation bei 9000 rpm. Abschließend wurde ein Reinigungsschritt mit Ethanol (100 %) durchgeführt und das Pellet zehn Minuten lang bei Raumtemperatur getrocknet. Das gereinigte Pellet wurde in 200 µl Natriumaurylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS, 1 %) gelöst und bei -20 °C gelagert.

In RD5-54-Verdünnungslösung

Die gesamte Arbeit der Proteinisolation aus humanem Klappengewebe wurde, soweit es möglich war, unter einem Abzug und unter gekühlten Bedingungen durchgeführt. Die Proben wurden dauerhaft auf Eis gelagert. Die Zentrifugation wurde bei 4 °C durchgeführt.

Nachdem die Probe mit einem Mörser bearbeitet wurde, wurde pro Gewebe 400 µl der RD5-54-Verdünnungslösung des QUANTIKINE® ELISA Kit hinzu pipettiert. Anschließend folgte zweiminütiges Homogenisieren, worauf eine zehnminütige Zentrifugation bei 10.000 rpm folgte. Schlussendlich konnte die flüssige Phase abpipettiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert werden.

Materialien	Hersteller	Artikel-Nummer
Ethanol Chromasolv® ≥ 99.8%	Sigma-Aldrich	34852
Isopropanol	Sigma-Aldrich	I9516
Guanidin-Hydrochlorid	SIGMA	G3272
Sodium dodecyl sulfate	Sigma-Aldrich	L3771
LiChrosolv® Water	Merck Millipore	1.15333.2500
Calibrator Diluent RD5-54	R&D Systems	895598

Laborgeräte	Hersteller
Pellet Pestle®	Merck Millipore
Homogenisator (D-8)	Micra
Zentrifuge 5804R	Eppendorf

2.7. Proteinkonzentrationsbestimmung

Bicinchoninsäure (BCA)-Assay

Der BCA-Assay wurde im Verlauf der experimentellen Arbeiten mit zwei unterschiedlich bearbeiteten Probenreihen durchgeführt: Mit Proben gelöst in SDS (1 %) aus der Phenol-Chloroformphase der RNA-Isolation mit TRI Reagent® und mit Proben gelöst in RD5-54-Verdünnungslösung des QUANTIKINE® ELISA Kit.

Als Puffer für die Standardreihen wurde entsprechend SDS (1 %) bzw. RD5-54-Verdünnungslösung verwendet. Die Arbeitslösung wurde in einem Verhältnis von 50:1 aus einer BCA-Lösung und einer Kupfer (III)-Sulfat-Pentahydrat-Lösung (4 %) hergestellt. Jede Probe wurde mit 200 µl der Arbeitslösung vermischt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Absorption wurde mit einem Tecan Reader (Infinite M1000 PRO) bei einer Wellenlänge von 562 nm ausgelesen. Nach der Erstellung einer Standardkurve und Korrektur der Absorption durch Subtraktion des Puffers (SDS (1 %) bzw. RD5-54-Verdünnungslösung) konnte die Proteinmenge der einzelnen Proben bestimmt werden.

Coomassie-basierte Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Coomassie-basierte Proteinkonzentrationsbestimmung wurde auf Basis einer Methode der Arbeitsgruppe um Gosh et. al durchgeführt [58], bei der Aminosäuren auf

Chromatographiepapier mit Brilliantblau gefärbt und anschließend in SDS (3 %) gelöst werden [6, 59].

Vor Beginn des Assays wurden folgende Lösungen vorbereitet:

Bovines-Serum-Albumin (BSA)-Lösung	
40 mg	BSA
1 ml	Calibrator Diluent RD5-54
Coomassieblau-Lösung	
250 mg	Coomassie Brilliant Blue
40 ml	Methanol
10 ml	Essigsäure 100 %
50 ml	LiChrosolv® Water
Entfärbelösung	
50 ml	Methanol
17,5 ml	Essigsäure (100 %)
182,5 ml	LiChrosolv® Water
SDS-Lösung (3%)	
6 g	Sodium dodecyl sulfate
200 ml	LiChrosolv® Water

Zunächst wurde eine in RD5-54-Verdünnungslösung verdünnte Standardreihe angesetzt. Anschließend wurden je 5 µl der in RD5-54 gelösten Proben und die Standardreihe auf 1,5 cm² große Chromatographiepapiere aufgetragen. Es folgten zehnmünütige Trocknung bei Raumtemperatur, Färbung mit 500 µl Coomassieblau-Lösung, zehn Minuten Inkubation und mehrere Waschschrirte bis eine weitere Entfärbung nicht mehr möglich war. Die Filterpapiere wurden in neue 12-Well Platten überführt, das Brilliantblau in 1 ml SDS (3 %) gelöst und 24 Stunden inkubiert. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 590 nm mit einem Tecan Reader (Infinite M1000 PRO) ausgelesen. Nach der Bildung einer Standardkurve und Korrektur der Absorption durch Subtraktion der RD5-54 Verdünnungslösung konnte die Proteinmenge der einzelnen Proben bestimmt werden.

Materialien	Hersteller	Artikel-Nummer
Bicinchoninic Acid Solution Reagent A	Sigma-Aldrich	B9643
Cooper(II) Sulfate Pentahydrate Solution (4 %)	Sigma-Aldrich	C2284
BSA Protein Standard	Sigma-Aldrich	P0919
SDS	Sigma-Aldrich	L3771
LiChrosolv® Water	Merck Millipore	1.15333.2500
Calibrator Diluent RD5-54	R&D Systems	895598

Coomassie Brilliant Blue	Roth	9598.2
Methanol	VWR Chemicals	20847.320
Essigsäure 100 %	Roth	6755.2
Ampuwa Spüllösung	Fresenius Kabi AG	1080181
Whatman Chromatographie Papier	Roth	CL75.1

Laborgeräte	Hersteller
Tecan Reader, Infinite M1000 PRO	Tecan Deutschland
Vibrax VXR Schüttler	IKA Deutschland

2.8. Activin A Enzyme linked Immunosorbent Assay

Die INHBA-Konzentrationsbestimmung wurde mit Hilfe eines Quantikine® ELISA durchgeführt. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers (R&D Systems) gearbeitet.

Zur Plattenvorbereitung wurden Streptavidin beschichtete Wells mit 200 µl biotinylierten Antikörpern befüllt, für 15 Minuten auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei 500 rpm inkubiert und zweimalig mit 400 µl Waschpufferlösung gereinigt. Es folgten 100 µl der Assay Verdünnungslösung RD1-98 und 100 µl der zuvor verdünnten Standardreihe und der aufgearbeiteten Proben. Durch die dreistündige Inkubationszeit auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei 500 rpm konnten die Antikörper binden. Fünfmaliges Reinigen mit 400 µl Waschpufferlösung entfernte ungebundene Probenanteile, sodass der verbliebene gebundene Anteil nach Zugabe von 200 µl INHBA-Konjugat wiederum mit der INHBA β-Untereinheit binden konnte. Es folgte abermals fünfmaliges Reinigen mit 400 µl Waschpufferlösung. Durch 200 µl Substratlösung kam es je nach INHBA-Konzentration zu einem bläulichen Farbumschlag. Nach der Zugabe von 50 µl Stopplösung, konnte die Absorption innerhalb von 30 Minuten mit einem Tecan Reader (Infinite M1000 PRO) bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgelesen werden. Es folgten die Bildung einer Standardkurve, die Korrektur der Absorption durch Subtraktion der RD5-54-Verdünnungslösung und schlussendlich die Bestimmung der INHBA-Konzentration der einzelnen Proben.

Materialien	Hersteller	Artikel-Nummer
Quantikine® ELISA Activin A Immunoassay	R&D Systems	DAC00B
LiChrosolv® Water	Merck Millipore	1.15333.2500

Laborgeräte	Hersteller
Tecan Reader, Infinite M1000 PRO	Tecan Deutschland
Vibrax VXR Schüttler	IKA Deutschland

2.9. Histologie und Immunhistochemie

Zur mikroskopischen Beurteilung fibrotischer und kalzifizierter Anteile einer Tasche wurden diese in KP-CryoCompound® separat eingebettet und bei -80 °C gelagert. Anschließend wurden 5 µm dicke Gewebsschnitte auf Objektträger aufgetragen. Die Lagerung der Objektträger bis zur Färbung erfolgte bei -20 °C. Nach erfolgter Färbung folgte die digitale Bildaufnahme der Gewebsschnitte mit dem Programm Leica Application Suite (Version V3.8.0). Zur finalen Bearbeitung wurde das Bildbearbeitungsprogramm GIMP (Version 2.8.22) verwendet.

Materialien/Geräte	Hersteller	Artikel-Nummer
Cryostat	Leica Biosystems	CM-1950
Feather S35 Microtome Blades	Cell Path Ltd.	JDA-0100-00A
Filterpapiere	Macherey-Nagel	531 024
Heiz- und Magnetrührer Rotilabo®	Roth	MH15
Histology tissue molds 7x7x5 mm	Medite	48-6301-00
Isopenthan	Roth	3927.2
KP-CryoCompound	Klinipath	1620C
Menzel™ Cover Slips 24x50mm	Thermo Scientific Menzel	10767371
Mikroskop	Leica	DM2000
Roti®-Histokitt II	Roth	T160.2
SuperFrost® Plus Objektträger 25x75x1,0 mm	R. Langenbrinck GmbH	03-0060
Waage	Sartorius	BP 110 S

2.9.1. Hämatoxylin Eosin Färbung

Eine Hämatoxylin Eosin Färbung wurde als Übersichtsfärbung angefertigt. Hämatoxylin hat eine dunkelbläuliche Farbe und färbt vor allem saure Zellbestandteile. Eosin hingegen stellt den pinken Anteil der Färbung dar und färbt vorwiegend unspezifisch azidophile Proteine. Typischerweise erscheinen somit die im Zellkern enthaltene DNA bläulich, während Zytoplasma, Zellmembran und Proteine der EZM in pink unterschiedlicher Intensität gefärbt werden [60].

Vor Beginn der Färbung wurden folgende Lösungen vorbereitet:

Eosin-Lösung	
1 g	Eosin B
100 ml	Demineralisiertes Wasser
100 ml	Ethanol 99,5 %
200 µl	Eisessig

4-5 % Essigsäure	
10 ml	Essigsäure (100 %)
190 ml	Demineralisiertes Wasser

Zu Beginn wurden die 5 µm dicken Schnitte eine Minute lang in zuvor filtrierter Gill-Hämatoxylin-Lösung getaucht, gefolgt von einer Minute demineralisiertem Wasser, einer Minute 4-5 % Essigsäure und einer weiteren Minute demineralisiertem Wasser. Anschließend wurden die Schnitte zwei Minuten lang unter fließendes Leitungswasser gestellt, wobei der Wasserstrahl nicht direkt auf die Präparate lief. Es folgte eine Minute in 70 % Alkohol und 12 Minuten in der Eosin-Lösung, die zuvor gefiltert wurde. Nachfolgend wurden die Schnitte mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (96 %, 100 %, Xylol) zweimalig je eine Minute entwässert. Nach der Trocknung der Präparate folgte das Eindecken des Objektträgers mittels Roti®-Histokit II. Um das spätere Austrocknen zu verhindern, wurde das Deckglas zusätzlich mit Nagellack fixiert.

Chemikalien/Lösungen	Hersteller	Artikel-Nummer
Demineralisiertes Wasser	Fischar	18880
Eosin B	Sigma-Aldrich	861006-100G
Essigsäure 100 %	Roth	6755.2
Ethanol 99,5 %	VWR Chemicals	85033.360
Gill 3 Hämatoxylin	Thermo Scientific	6765009
Xylol	VWR Chemicals	28975.325

2.9.2. Von Kossa Färbung

Eine von Kossa Färbung wurde zum mikroskopischen Nachweis von Kalzifizierungen angefertigt. In dieser Färbung reagieren Silber Kationen mit in Kalziumablagerungen befindlichem Phosphat und Karbonat. Anschließend werden diese durch Licht und Natriumkarbonat-Formaldehydlösung reduziert und in Form von schwarzbraunen Ablagerungen sichtbar [61].

Vor Beginn der Färbung wurden folgende Lösungen vorbereitet:

Silbernitratlösung (5 %)	
200 ml	Demineralisiertes Wasser
10 g	Silbernitrat

Natriumthiosulfat-Lösung (5 %)	
200 ml	Demineralisiertes Wasser
10 g	Natriumthiosulfat

Natriumkarbonat-Formaldehydlösung	
150 ml	Demineralisiertes Wasser
50 ml	Formaldehyd
10 g	Natriumkarbonat

Anfangs wurden die Schnitte acht Minuten lang in auf -20 °C gekühltes Aceton getaucht. Darauf folgte fünfminütiges Lufttrocknen. Anschließend wurden die Objektträger kurz in demineralisiertes Wasser getaucht und eine Stunde lang in Silbernitratlösung (5 %) starker Lichtstrahlung ausgesetzt. Es folgten dreimalig dreiminütiges Spülen, zwei Minuten Reduktion in Natriumkarbonat-Formaldehydlösung und zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser. Zur Entfernung von überschüssigem Silber wurde fünf Minuten Natriumthiosulfatlösung (5 %) verwendet. Anschließend wurden die Objektträger nochmals gespült, mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat gefärbt, gespült und über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert (50 %, 70 %, 90 %, 100 % Ethanol, Xylol). Nach zwanzigminütiger Trocknung der Präparate folgte das Eindecken des Objektträgers mittels Roti®-Histokit II. Um das spätere Austrocknen zu verhindern, wurde das Deckglas zusätzlich mit Nagellack fixiert.

Chemikalien/Lösungen	Hersteller	Artikel-Nummer
Aceton	Merck Millipore	1.00003.1000
Demineralisiertes Wasser	Fischar	18880
Ethanol 99,5%	VWR Chemicals	85033.360
Formaldehydlösung 37%	Roth	4979.2
Kernechtrot	Roth	N069.1
Aluminiumsulfatlösung		
Natriumkarbonat	Merck Millipore	1.06392.1000
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich	72049
Silbernitrat	VWR Chemicals	21570.238
Xylol	VWR Chemicals	28975.325

2.9.3. Movat Pentachrom Färbung

Die Movat Pentachrom Färbung wurde als Übersichtsfärbung zur Beurteilung der EZM angefertigt [62]. Die Färbung wurde auf Basis der von H. K. Russell Jr. modifizierten Methode durchgeführt [63], bei der Zellkerne und elastische Fasern schwarz, Muskulatur blau, Kollagen

und retikuläres Bindegewebe gelb, Glykosaminoglykane grün und Fibrin intensiv rot gefärbt werden.

Vor Beginn der Färbung wurden folgende Lösungen vorbereitet:

<u>Alkalischer Alkohol</u>	
360 ml	Ethanol (96 %)
40 ml	Ammoniumhydroxid (30 %)
<u>Bouin's Lösung</u>	
300 ml	Pikrinsäure
100 ml	Formaldehyd (37-40 %)
20 ml	Essigsäure (100 %)
<u>Natriumthiosulfat-Lösung</u>	
200 ml	Demineralisiertes Wasser
10 mg	Natriumthiosulfat
<u>Alcianblaue Lösung</u>	
2 g	Alcianblau
200 ml	Demineralisiertes Wasser
<u>Alkoholische Hämatoxylin (2 %)-Lösung</u>	
10 g	Hämatoxylin
500 ml	Ethanol (96 %)
<u>Eisenchlorid-Lösung</u>	
12,4 g	Eisen-Chlorid-Hexahydrat
500 ml	Demineralisiertes Wasser
5 ml	Salzsäure (32-37 %)
<u>Jodlösung</u>	
10 g	Jod
20 g	Kaliumjodid
500 ml	Demineralisiertes Wasser
<u>Brilliant Crocein R Stock</u>	
4 g	Brilliant Crocein R
398 ml	Demineralisiertes Wasser
<u>Säurefuchsin Stock</u>	
0,5 g	Säurefuchsin
2,5 ml	Essigsäure (100 %)
497,5 ml	Demineralisiertes Wasser
<u>Phosphorwolframsäure-Lösung</u>	
25 g	Phosphorwolframsäure
500 ml	Demineralisiertes Wasser
<u>Eisessig (1 %)</u>	
5 ml	Essigsäure (100 %)
495 ml	Demineralisiertes Wasser

Alkoholische Safranlösung

12 g	Safran du Gatinais
200 ml	Ethanol (100 %)

Zusätzlich war zu beachten, dass die Jodlösung und der Säurefuchsin Stock 24 bzw. der alkoholische Safran 48 Stunden zuvor angefertigt wurden. Der alkoholische Safran wurde bei 60 °C in einer luftdichten Flasche erhitzt. Die Objektträger wurden über Nacht bei 37 °C gelagert.

Die Schnitte wurden nach dem Anfertigen der Lösungen fünf Minuten in demineralisiertes Wasser, zehn Minuten in Formaldehydlösung (4 %) und nochmals fünf Minuten in demineralisiertes Wasser getaucht. Darauf folgten zehn Minuten in auf 50 °C erhitzter Bouin's Lösung, Spülen, fünf Minuten in Natriumthiosulfat (5 %), Spülen, und 20 Minuten in Alcianblau (1 %) mit anschließendem Spülen. Danach wurden die Schnitte zehn Minuten in erhitztem alkalischem Alkohol stabilisiert, gespült, neun Minuten in frisch angesetzter Weigert's Working-Solution (60 ml Hämatoxylin (2 %), 40 ml Eisenchlorid, 20 ml Jodlösung) gefärbt, gespült und eine Minute in frisch angesetzter Brilliant-Crocein-Säurefuchsin Working-Solution (80 ml Brilliant Crocein R Stock, 20 ml Säurefuchsin Stock) gefärbt und gespült. Es folgten drei Waschschrte mit demineralisiertem Wasser, fünf Minuten in Phosphorwolframsäure (5 %), fünf Minuten in Essigsäure (1 %), gefolgt von drei weiteren Waschschrten. Anschließend wurden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert, acht Minuten in alkoholischem Safran gefärbt, gespült, nochmals entwässert und mittels Xylol dreimal fünf Minuten entfettet. Nach zwanzigminütigem Lufttrocknen folgte das Eindecken mittels Roti®-Histokit II. Um das spätere Austrocknen zu verhindern, wurde das Deckglas zusätzlich mit Nagellack fixiert.

Chemikalien/Lösungen	Hersteller	Artikel-Nummer
Alcianblau	SIGMA	A5268-25G
Ammoniaklösung 30%	Roth	CP17.1
Brilliant Crocein R	Waldeck	1B-109
Demineralisiertes Wasser	Fischar	18880
Eisenchlorid III Hexahydrat	Sigma-Aldrich	236489-100G
Essigsäure 100%	Roth	6755.2
Ethanol 99,5%	VWR Chemicals	85033.360
Formaldehydlösung 37%	Roth	4979.2
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich	H3136-25G
HCl 37%	Merck Millipore	1.00317.1000
Jod	Roth	7935.1
Kaliumjodid	Roth	8491.3
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich	72049
Phosphorwolframsäure	Sigma-Aldrich	P4006-250G

Pikrinsäure	VWR Chemicals	84512.260
Safran du Gatinais	Waldeck	5A-394
Säurefuchsin	Roth	T128.1
Xylol	VWR Chemicals	28975.325

2.9.4. Immunhistologische Färbungen

Immunhistochemische DAB (3,3'-Diaminobenzidine)-Färbungen wurden zur Darstellung verschiedener Zellen und zur Beurteilung des extrazellulären Bindegewebes angefertigt. Dabei binden humane Antikörper die Zielstruktur und je nach Wirt des Primärantikörpers wird ein entsprechender Sekundärantikörper ausgewählt. Den Waschschritten zur Beseitigung unspezifisch gebundener Antikörper folgt die Zugabe von DAB. Bei den noch vorhandenen Sekundärantikörpern führt dies, katalysiert durch eine Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP), zu einem braunen Farbumschlag und die ursprüngliche Bindung des Primärantikörpers wird sichtbar. Durch immunhistochemische Färbungen konnten Endothelzellen (Anti-Von-Willebrand-Faktor), COL1A1 (Anti-Col1A1) und Elastin (Anti-Elastin) im Klappengewebe nachgewiesen werden.

Vor Beginn der Färbung wurden folgende Lösungen vorbereitet:

Triton X-Lösung (0,25 %)	
99,75 ml	Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)
250 µl	Triton X-Lösung
BSA-Lösung (5 %)	
99,9 ml	PBS
100 µl	Tween ® 20 Detergent
5 g	BSA
Wasserstoffperoxid (3 %)	
72 ml	PBS
8 ml	Wasserstoffperoxid (30 %)
Salzsäure (1 %)	
2,703 ml	Salzsäure (37 %),
97,297 ml	Demineralisiertes Wasser
TB-Pufferlösung	
1000 ml	Demineralisiertes Wasser
60,57 g	Tris-aminomethan

Um spätere Vermischungen mit der auf dem gleichen Objektträger befindlichen Negativkontrolle zu vermeiden, wurden die Gewebsschnitte zunächst mit einem Dako Pen umrandet. Anschließend folgte eine zehnmünütige Fixation in Formaldehydlösung. Nach drei Waschschritten in PBS wurden die Objektträger zehn Minuten in Triton X-Lösung getaucht. Es

folgten drei weitere Waschschritte und eine 60-minütige Blockierung in BSA-Lösung (5 %). Nach kurzer Zwischenlagerung in PBS wurde der Primärantikörper in zuvor hergestellter Verdünnung auf die Gewebsschnitte pipettiert und 60 Minuten in einer Feuchtkammer inkubiert. Einer weiteren Zwischenlagerung in PBS und zehnminütigen Blockierung mit Wasserstoffperoxid (3 %) folgten abermals drei fünfminütigen Waschschritte. Anschließend wurde der Sekundärantikörper in entsprechender Verdünnung auf die Gewebsschnitte pipettiert und 45 Minuten inkubiert. Es folgten erneutes Waschen, zehn Minuten in TB-Pufferlösung und eine fünfminütige Inkubation mit DAB bis zum mikroskopisch sichtbaren braunen Farbumschlag. Bei Eintreten des Farbumschlages wurden die Objektträger fünf Minuten in TB-Pufferlösung getaucht. Dem Auswaschen mit destilliertem Wasser folgte die Färbung mit Hämalaunlösung, sowie eine Oxidation durch kurzzeitiges Eintauchen in Salzsäure (1 %). Abschließend wurden die Objektträger fünf Minuten unter laufendem Leitungswasser gespült und mit Ethanol (99 %) entwässert. Nach kurzzeitigem Lufttrocknen folgte das Eindecken mittels Roti®-Histokit II. Um das spätere Austrocknen zu verhindern, wurde das Deckglas zusätzlich mit Nagellack fixiert.

Chemikalien/Lösungen	Hersteller	Artikel-Nummer
Albumin Fraktion V	Roth	8076.3
DAB Substrat Kit	Zytomed	DAB530
Dako Pen	Agilent Technologies	S2002
Demineralisiertes Wasser	Fischar	18880
Ethanol 99,5%	VWR Chemicals	85033.360
Formaldehydlösung 4%	Roth	A5268-25G
Mayers Hämalaunlösung	Merck Millipore	1092490500
PBS	Thermo Fisher scientific	14190144
Salzsäure 37%	Roth	2601.1
Tris(hydromethyl)-aminomethan	Merck Millipore	1083822500
Triton X-100	Sigma	T9284
Tween ® 20 Detergent	Calbiochem	655205
Wasserstoffperoxid 30%	Roth	9681.1

Primärantikörper	Hersteller	Artikel-Nummer	Verdünnung
Anti-Elastin	Abcam	AB21610	1:50
Anti-Kollagen Typ 1	Merck Millipore	AB758	1:20
Anti-Von-Willebrand-Faktor	Agilent Technologies	A0082	1:300

Sekundärantikörper	Hersteller	Artikel-Nummer	Verdünnung
Anti Kaninchen IgG	Dianova	111-035-003	1:500
Anti Ziege IgG	Dianova	305-035-003	1:500

2.10. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der in der Arbeit erhobenen Daten und zur graphischen Darstellung wurde die Statistiksoftware GraphPad Prism (Version 6.01) verwendet. Unabhängig von der verwendeten Statistik wurden die Ergebnisse als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant angesehen und entsprechend gekennzeichnet.

Bei Vergleichen zwischen zwei Gruppen wurde entweder ein Wilcoxon Test oder ein Mann-Whitney Test durchgeführt. Der Wilcoxon Test wurde bei abhängigen Stichproben wie z.B. dem Vergleich zwischen fibrotischen und kalzifizierten Anteilen einer AK-Tasche des gleichen Patienten verwendet. Der Mann-Whitney Test wurde hingegen bei unabhängigen Stichproben wie z.B. dem Vergleich zwischen AK von Diabetikern und Nicht-Diabetikern verwendet. Für Vergleiche mit vier Gruppen und zwei Variablen wurde ein 2way ANOVA mit *Tukey's multiple comparison* Testung durchgeführt. Die statistische Analyse der Patientendaten erfolgte bei kategorialen Variablen mittels Fisher's exact Test und bei kardinale Variablen mittels Mann-Whitney Test.

3. Ergebnisse

3.1. Patientenkohorten

Für die Genexpressionsanalysen wurden AK-Taschen von 36 Nicht-Diabetikern mit den AK-Taschen von 19 Diabetikern verglichen (Tabelle 2). In beiden Kohorten waren überwiegend Männer (non-T2D: 88,5 %; T2D: 73,7 %; $p = 0,253$) im Alter zwischen 68 und 74 Jahren (non-T2D: $70 \pm 1,9$; T2D: $72 \pm 1,2$; $p = 0,628$) vorhanden. Die primäre OP-Indikation in beiden Kohorten war überwiegend eine AS (non-T2D: 80,8 %; T2D 73,7 %; $p = 0,572$). Kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie arterielle Hypertonie, Dyslipoproteinämie oder eine positive Raucheranamnese zeigten keine Unterschiede in der Prävalenz beider Gruppen. Auch bei der Dauermedikation der Patienten waren, mit der Ausnahme von Statinen, die in der Kohorte der Diabetiker signifikant öfter eingenommen wurden (non-T2D: 50%; T2D: 89,5%; $p = 0,009$), keine Unterschiede zu sehen. Diabetiker hatten im Durchschnitt einen signifikant höheren Körpermasseindex (*Body-Mass-Index*, BMI) als Nicht-Diabetiker (non-T2D: $27 \pm 0,9$; T2D: $20,6 \pm 1,1$; $p = 0,004$) und zeigten den erwartungsgemäßen Unterschied des durchschnittlichen HbA1c (non-T2D: $5,5 \pm 0,1$; T2D: $7,4 \pm 0,3$; $p < 0,001$).

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung wurden innerhalb der bereits beschriebenen Patientenkohorte 5 Nicht-Diabetiker mit 5 Diabetikern verglichen. Ebenso wurden bei den histologischen Arbeiten 3 Nicht-Diabetiker mit 3 Diabetikern innerhalb derselben Kohorte miteinander verglichen.

Tabelle 2: Patientenkohorten zur Genexpressionsanalyse, Proteinkonzentrationsbestimmung und histologischen Aufarbeitung humaner AK-Taschenproben

Da bei der Analyse der Degenerationsstadien immer Klappenanteile derselben AK-Tasche und somit auch desselben Patienten verglichen wurden, wurde auf eine Auflistung mit fibrotischen und kalzifizierten Probenanteilen verzichtet. Kategoriale Variablen, wie Geschlecht und Komorbiditäten, werden als absolute Anzahl mit prozentualem Anteil der entsprechenden Kohorte (non-T2D vs. T2D) angegeben. Die statistische Analyse kategorialer Variablen erfolgte mittels *Fisher's exact test*. Kardinale Variablen, wie Alter und Körpermasseindex, werden als Mittelwert \pm SEM angegeben. Die statistische Analyse kardinaler Variablen erfolgte mittels *Mann Whitney test*. Abkürzungen: GFR = glomeruläre Filtrationsrate, CKD = chronische Nierenerkrankung, ACE = Angiotensin konvertierendes Enzym.

	Gesamt n = 45	non-T2D n = 26	T2D n = 19	p-Wert
Geschlecht (männlich), n (%)	37 (82,2)	23 (88,5)	14 (73,7)	0,253
Alter (Jahre)	$71 \pm 1,2$	$70 \pm 1,9$	$72 \pm 1,2$	0,628
Körpermasseindex (kg/m ²)	$28,5 \pm 0,7$	$27 \pm 0,9$	$30,6 \pm 1,1$	0,004

Operative Primärindikation, n (%)				
Aortenklappenstenose	35 (77,8)	21 (80,8)	14 (73,7)	0,572
Koronare Herzkrankheit	9 (20,0)	5 (19,2)	4 (21,1)	0,880
Andere	1 (2,2)	0 (0,0)	1 (5,3)	0,237
Kardiovaskuläre Risikofaktoren, n (%)				
Positive Raucheranamnese	12 (26,7)	8 (30,8)	4 (21,1)	0,517
Arterielle Hypertonie	43 (95,6)	24 (92,3)	19 (100)	0,501
Dyslipoproteinämie	28 (62,2)	14 (53,8)	14 (73,7)	0,222
Komorbiditäten, n (%)				
Nierenfunktion (GFR)				
normal (> 90 ml/min)	5 (11,1)	4 (15,4)	1 (5,3)	0,378
milde CKD (60-89 ml/min)	20 (44,4)	12 (46,2)	8 (42,1)	1,000
moderate/schwere CKD (< 60 ml/min)	20 (44,4)	10 (38,5)	10 (52,6)	0,379
Koronare Herzkrankheit	35 (77,8)	19 (73,1)	16 (84,2)	0,481
Extrakardiale Gefäßerkrankungen	6 (13,3)	4 (15,4)	2 (10,5)	1,000
Medikamente, n (%)				
Statine	30 (66,7)	13 (50,0)	17 (89,5)	0,009
Diuretika	16 (35,6)	8 (30,8)	8 (42,1)	0,534
ACE-Inhibitoren	28 (62,2)	13 (50,0)	15 (78,9)	0,066
β-Adrenozeptor Antagonisten	25 (55,6)	15 (57,7)	10 (52,6)	0,770
Antikoagulanzen				
Orale Antikoagulanzen	11 (24,4)	5 (19,2)	6 (31,6)	0,485
Acetylsalicylsäure	24 (53,3)	16 (61,5)	8 (42,1)	0,237
Laborwerte				
HbA1c (%)	6,4 ± 0,2	5,5 ± 0,1	7,4 ± 0,3	< 0,001
Serumkreatinin	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,4	1,2 ± 0,1	0,727
Thrombozyten	232,7 ± 7,9	228,6 ± 11,2	238,2 ± 11,2	0,949
Leukozyten	8 ± 0,4	11,9 ± 4,1	8,1 ± 0,5	0,967
C-reaktives Protein	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,3	0,546

3.2. Charakterisierung der Genexpression

3.2.1. Integritätsmessung

Vor Beginn der Genexpressionsanalysen mittels qPCR wurden Qualitätskontrollen durch Ermittlung der *RNA Integrity Number* durchgeführt. Die Integritätsmessung zeigte bei der Analyse aller Proben einen Mittelwert von 6,71. Der Standardfehler war hierbei 0,27.

3.2.2. Genexpression der Activin A-Signalkaskade

Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses des INHBA-Systems auf die Progredienz der Degeneration der CAVD wurde die Genexpression in humanen fibrotischen und kalzifizierten AK-Taschenanteilen verglichen. Unterschieden wurde dabei zwischen *INHBA* selbst, dessen Rezeptoren (*ACVR2A*, *ACVR2B*, *ALK4*) und den intrazellulären Signalmolekülen (*SMAD2*, *SMAD3* und *SMAD7*). *INHBA* und seine Rezeptoren waren im kalzifizierten Taschenanteil

signifikant stärker exprimiert als im fibrotischen Anteil (*INHBA* fibrotisch: $0,60 \pm 0,05$, *INHBA* kalzifiziert: $0,83 \pm 0,07$; $p = 0,001$; *ACVR2A* fibrotisch: $0,72 \pm 0,05$, *ACVR2A* kalzifiziert: $0,99 \pm 0,04$; $p < 0,001$; *ACVR2B* fibrotisch: $0,43 \pm 0,03$, *ACVR2B* kalzifiziert: $0,55 \pm 0,04$; $p < 0,001$; *ALK4* fibrotisch: $0,26 \pm 0,02$, *ALK4* kalzifiziert: $0,35 \pm 0,02$; $p < 0,001$; Abbildung 5). Im Gegensatz zeigten Moleküle der intrazellulären Signalkaskade keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression (*SMAD2* fibrotisch: $0,70 \pm 0,04$, *SMAD2* kalzifiziert: $0,68 \pm 0,03$; $p = 0,964$; *SMAD3* fibrotisch: $0,40 \pm 0,03$, *SMAD3* kalzifiziert: $0,38 \pm 0,02$, $p = 0,607$; *SMAD7* fibrotisch: $0,89 \pm 0,11$, *SMAD7* kalzifiziert: $0,85 \pm 0,07$, $p = 0,427$; Abbildung 6).

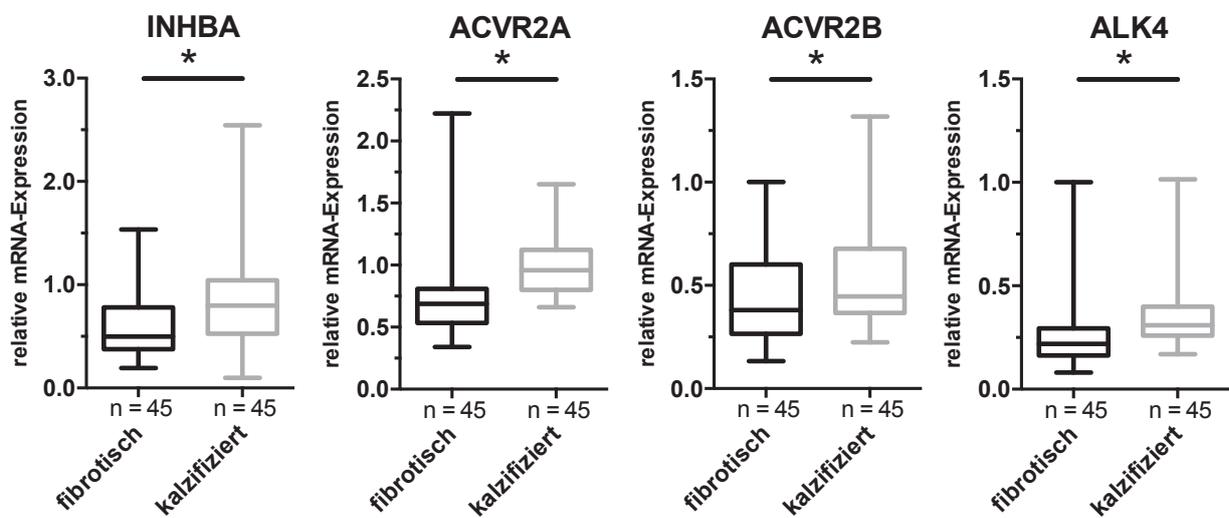


Abbildung 5: mRNA-Expression der *INHBA*-Signalkaskade in humanen fibrotischen und kalzifizierten Anteilen einer AK-Tasche

Gezeigt ist die relative Genexpression von *INHBA* und dessen Rezeptoren (*ACVR2A*, *ACVR2B* und *ALK4*) in fibrotischen und kalzifizierten Anteilen der AK. Die Werte wurden auf eine fibrotische Klappenprobe bezogen und werden hier als Mittelwert \pm SEM dargestellt. *: $p < 0,05$.

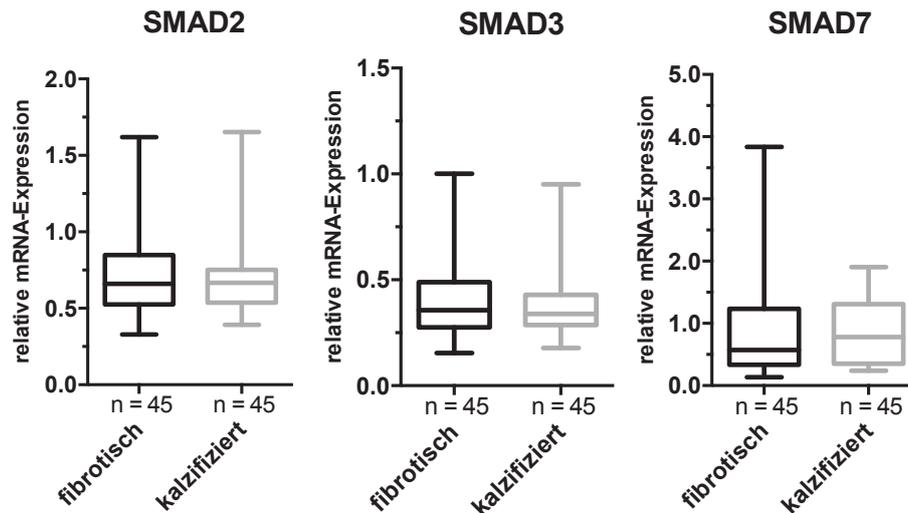


Abbildung 6: mRNA-Expression der intrazellulären Signalmoleküle in humanen fibrotischen und kalzifizierten Anteilen einer AK-Tasche

Gezeigt ist die relative Genexpression der intrazellulären Signalmoleküle *SMAD2*, *SMAD3* und *SMAD7* im fibrotischen und kalzifizierten Klappenanteil. Die Werte wurden auf eine fibrotische Klappenprobe bezogen und werden hier als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

3.2.3. Genexpression von Umbau- und Degenerationsmarkern

Als Biomarker der CAVD beschrieben und im Rahmen der Degeneration beteiligt, zeigen sich auch extrazelluläre Strukturproteine und matrizelluläre Proteine [64]. Zum Nachweis einer Beteiligung am fortschreitenden Kalzifizierungsprozess wurden *ACTA2*, *COL1A1*, *TGF β 1*, *Chitinase-3-like-1 (CHI3L1)* und *OPN* analysiert. *ACTA2* ist dabei als ein Aktivierungsmarker in VICs anzusehen [65]. Ein Unterschied in der Genexpression in den verglichenen AK-Taschenanteilen ließ sich jedoch nicht nachweisen (*ACTA2* fibrotisch: $0,40 \pm 0,03$, *ACTA2* kalzifiziert: $0,43 \pm 0,03$; $p = 0,318$; Abbildung 7). *Col1A1*, ein Marker für Umbau- und beginnende Degenerationsprozesse, zeigte hingegen eine signifikante Hochregulation im kalzifizierten Klappenanteil (*COL1A1* fibrotisch: $0,43 \pm 0,09$, *COL1A1* kalzifiziert: $12,36 \pm 3,305$; $p < 0,001$, Abbildung 7). Mehrere Publikationen deuten darauf hin, dass *TGF β 1* an degenerativen Prozessen beteiligt ist und vor allem in Phasen der Fibrosierung eine Rolle spielt [66, 67]. Bei der Analyse der AK-Taschenanteile ließ sich eine signifikante Hochregulation der Genexpression von *TGF β 1* in kalzifiziertem AK-Gewebe nachweisen (*TGF β 1* fibrotisch: $0,59 \pm 0,04$; *TGF β 1* kalzifiziert: $1,09 \pm 0,07$; $p < 0,001$, Abbildung 7). *CHI3L1* wurde bereits als Biomarker der AS identifiziert [68]. Bei der Genexpressionsanalyse zeigte *CHI3L1* in kalzifizierten AK-Taschenanteilen eine signifikant stärkere Genexpression (*CHI3L1* fibrotisch:

0,13 ± 0,06; *CHI3L1* kalzifiziert: 0,77 ± 0,12; p < 0,001, Abbildung 7). Wie bereits in Abbildung 2 gezeigt ist OPN an Kalzifizierungsprozessen der AK sowie der osteogenen Differenzierung beteiligt [69]. Im Rahmen der Genexpressionsanalysen ließ sich in kalzifizierten AK-Taschenanteilen eine deutliche Hochregulation nachweisen (*OPN* fibrotisch: 0,53 ± 0,15, *OPN* kalzifiziert: 16,57 ± 2,28; p < 0,001; Abbildung 7).

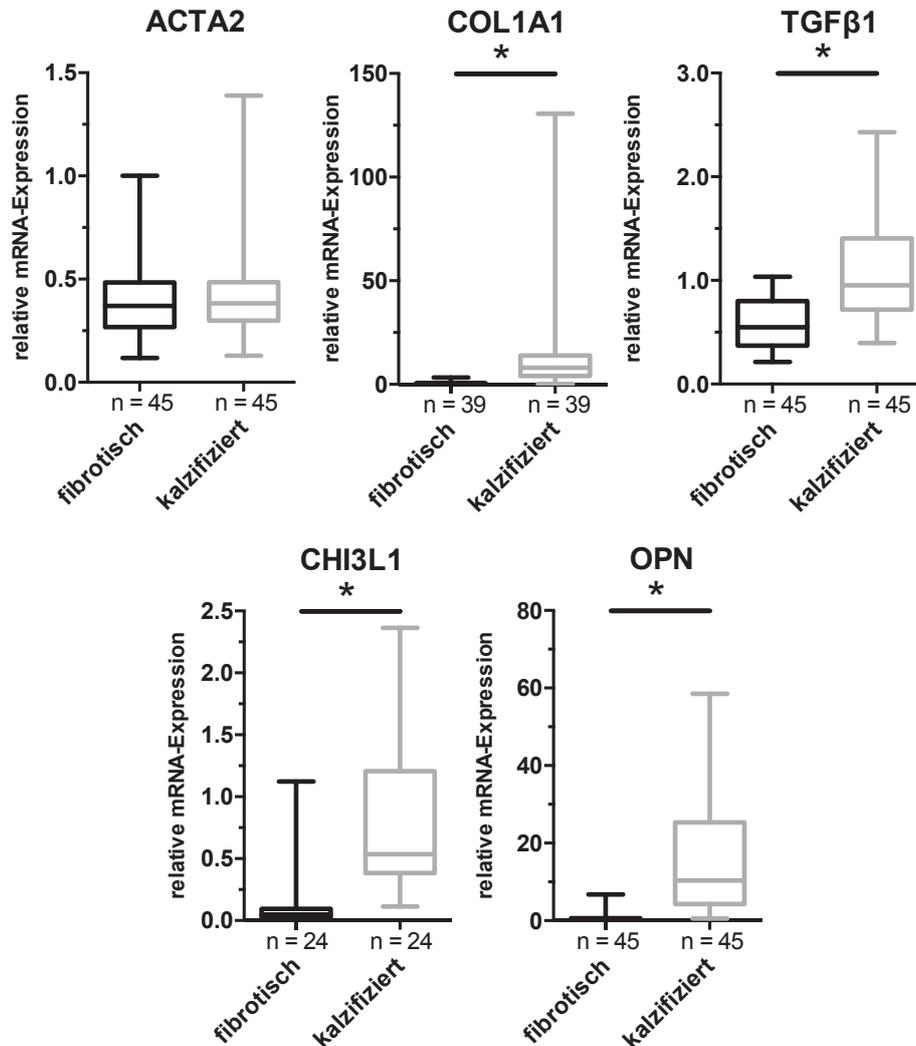


Abbildung 7: mRNA-Expression von Umbau und Degenerationsmarkern in humanen fibrotischen und kalzifizierten Anteilen einer AK-Tasche

Gezeigt ist die relative Genexpression der Proteine *ACTA2*, *COL1A1*, *TGFβ1*, *CHI3L1* und *OPN* im fibrotischen und kalzifizierten Klappenanteil. Die Werte wurden auf eine fibrotische Klappenprobe bezogen und werden hier als Mittelwert ± SEM dargestellt. *: p < 0,05.

3.2.4. Einfluss von Diabetes mellitus Typ 2 auf die Genexpression der Activin A-Signalkaskade

INHBA wird in der Literatur auch in Zusammenhang mit diabetischer Kardiomyopathie gebracht [70]. Um einen möglichen Zusammenhang von INHBA, T2D und CAVD zu untersuchen, wurde zusätzlich zur Messung der Genexpression in fibrotischen und kalzifizierten AK-Taschenanteilen, auch zwischen T2D und non-T2D unterschieden. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression von *INHBA* (non-T2D fibrotisch: $0,58 \pm 0,05$, T2D fibrotisch: $0,62 \pm 0,08$, $p = 0,981$; non-T2D kalzifiziert: $0,80 \pm 0,06$, T2D kalzifiziert: $0,86 \pm 0,14$, $p = 0,950$), *ACVR2A* (non-T2D fibrotisch: $0,68 \pm 0,05$, T2D fibrotisch: $0,77 \pm 0,09$, $p = 0,731$; non-T2D kalzifiziert: $0,98 \pm 0,05$, T2D kalzifiziert: $1,01 \pm 0,06$, $p = 0,981$), *ACVR2B* (non-T2D fibrotisch: $0,46 \pm 0,05$, T2D fibrotisch: $0,39 \pm 0,4$, $p = 0,686$; non-T2D kalzifiziert: $0,62 \pm 0,06$, T2D kalzifiziert: $0,45 \pm 0,03$, $p = 0,063$) und *ALK4* (non-T2D fibrotisch: $0,27 \pm 0,04$, T2D fibrotisch: $0,25 \pm 0,03$, $p = 0,980$; non-T2D kalzifiziert: $0,37 \pm 0,04$, T2D kalzifiziert: $0,32 \pm 0,02$, $p = 0,644$) in Klappenproben von T2D und non-T2D (Abbildung 8).

Während die intrazellulären Signalmoleküle *SMAD2* (non-T2D fibrotisch: $0,64 \pm 0,04$, T2D fibrotisch: $0,78 \pm 0,08$, $p = 0,217$; non-T2D kalzifiziert: $0,69 \pm 0,05$, T2D kalzifiziert: $0,67 \pm 0,03$, $p = 0,986$) und *SMAD3* (non-T2D fibrotisch: $0,39 \pm 0,04$, T2D fibrotisch: $0,42 \pm 0,04$, $p = 0,944$; non-T2D kalzifiziert: $0,40 \pm 0,04$; T2D kalzifiziert: $0,35 \pm 0,02$, $p = 0,709$) keine Differenzen in der Genexpression aufwiesen, zeigte sich *SMAD7* (non-T2D fibrotisch: $0,50 \pm 0,08$; T2D fibrotisch: $1,44 \pm 0,17$, $p < 0,001$; non-T2D kalzifiziert: $0,54 \pm 0,07$, T2D kalzifiziert: $1,29 \pm 0,07$, $p < 0,001$) im Klappengewebe von T2D signifikant hochreguliert (Abbildung 9).

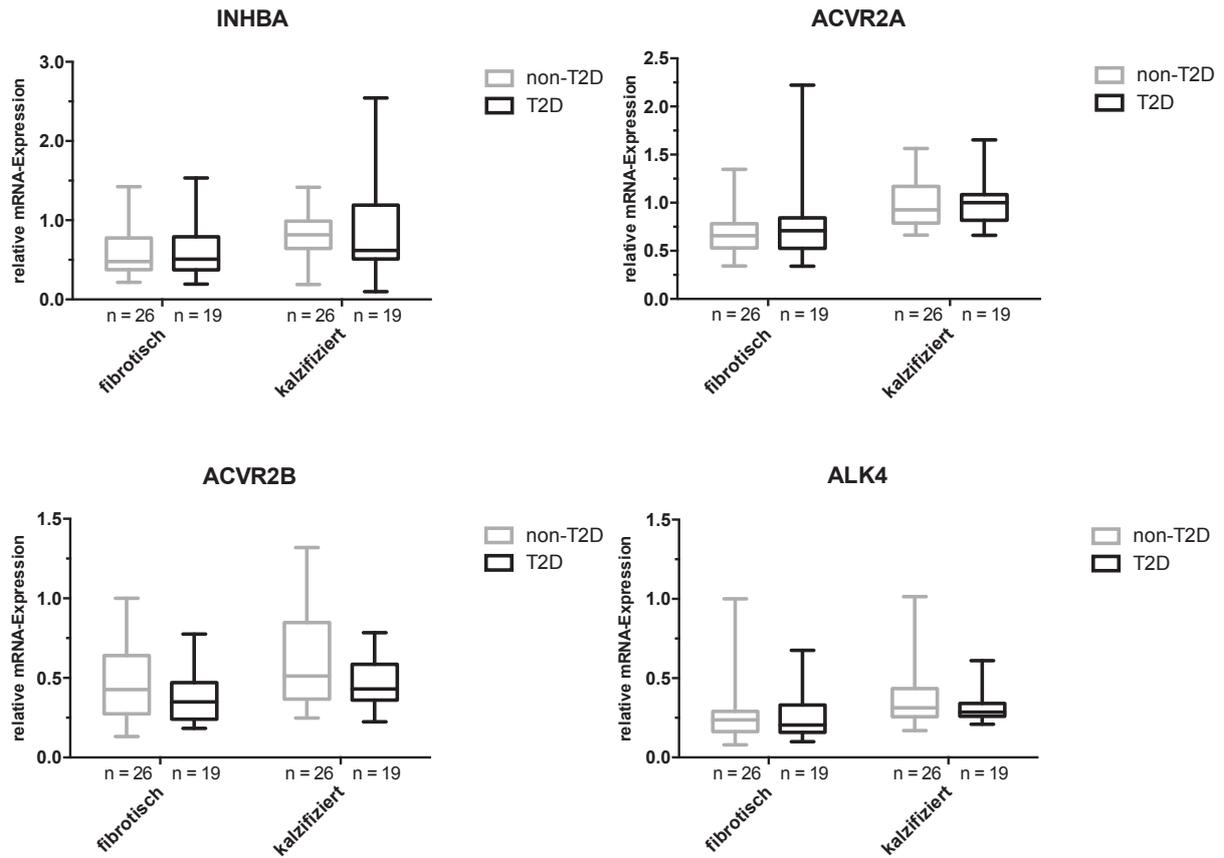


Abbildung 8: mRNA-Expression von INHBA und seinen Rezeptoren in Klappengewebe von non-T2D und T2D

Gezeigt ist die relative Genexpression von *INHBA*, *ACVR2A*, *ACVR2B* und *ALK4* im fibrotischen und kalzifizierten Klappenanteil von non-T2D und T2D. Die Werte wurden auf eine fibrotische nicht-diabetische Klappenprobe bezogen und werden hier als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

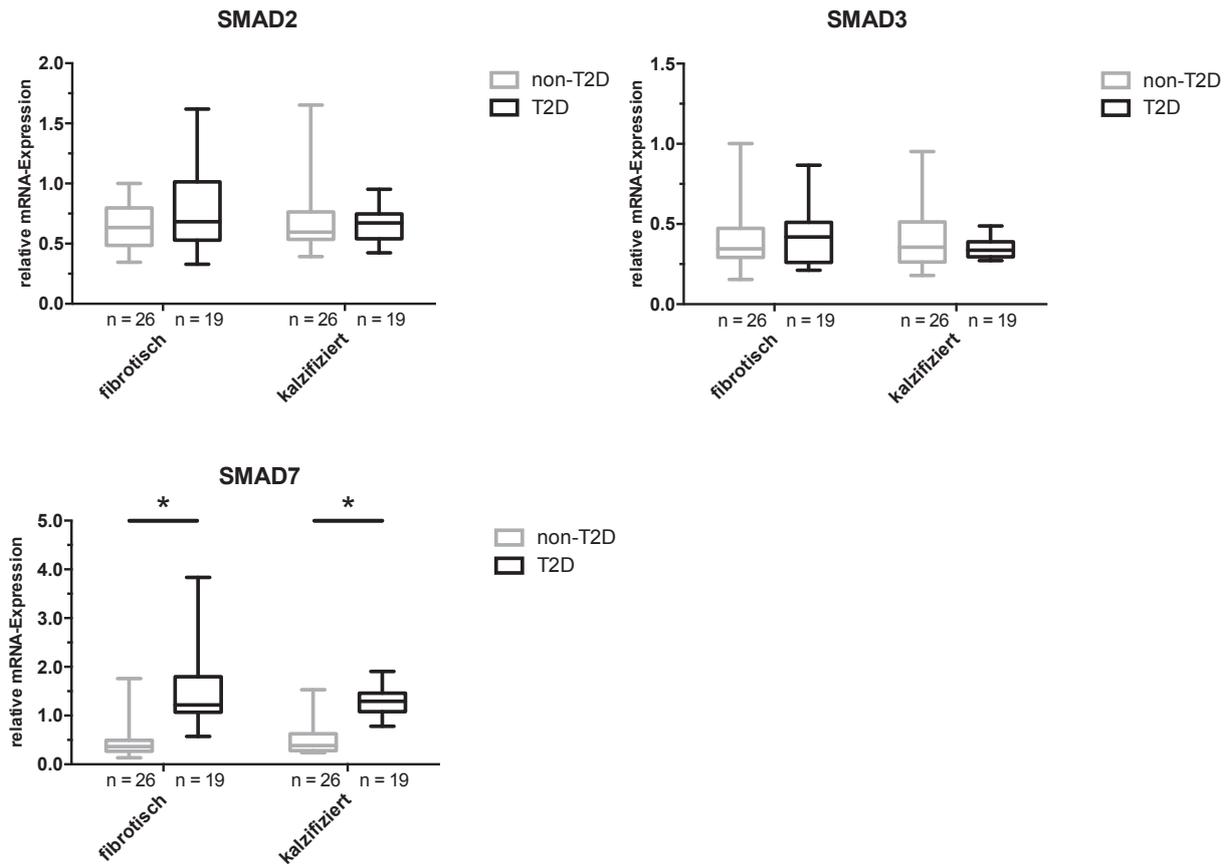


Abbildung 9: mRNA-Expression intrazellulärer Signalmoleküle in Klappengewebe von non-T2D und T2D

Fibrotische und kalzifizierte AK-Klappenanteile von non-T2D und T2D wurden auf die mRNA-Expression von *SMAD2*, *SMAD3* und *SMAD7* untersucht. Die Werte wurden auf eine fibrotische nicht-diabetische Klappenprobe bezogen und werden hier als Mittelwert \pm SEM dargestellt. *: $p < 0,05$.

3.2.5. Einfluss von Diabetes mellitus Typ 2 auf die Genexpression von Umbau- und Degenerationsmarkern

Analog zu den bereits dargestellten Ergebnissen, wurde ebenfalls bei den Umbau- und Degenerationsmarkern zwischen non-T2D und T2D unterschieden. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede in der Genexpression von *ACTA2* (non-T2D fibrotisch: $0,40 \pm 0,03$, T2D fibrotisch: $0,39 \pm 0,04$, $p > 0,999$; non-T2D kalzifiziert: $0,46 \pm 0,05$, T2D kalzifiziert: $0,40 \pm 0,03$, $p = 0,747$), *COL1A1* (non-T2D fibrotisch: $0,36 \pm 0,06$, T2D fibrotisch: $0,52 \pm 0,19$, $p > 0,9999$; non-T2D kalzifiziert: $16,46 \pm 5,69$, T2D kalzifiziert: $7,06 \pm 1,15$, $p = 0,055$), *TGF β 1* (non-T2D fibrotisch: $0,58 \pm 0,05$; T2D fibrotisch: $0,60 \pm 0,05$, $p = 0,996$; non-T2D kalzifiziert: $1,07 \pm 0,09$; T2D kalzifiziert: $1,12 \pm 0,11$, $p = 0,972$), *CHI3L1* (non-T2D fibrotisch: $0,17 \pm 0,08$; T2D fibrotisch: $0,05 \pm 0,01$, $p = 0,929$; non-T2D kalzifiziert: $0,86 \pm 0,15$, T2D kalzifiziert: $0,55 \pm 0,14$, $p = 0,416$) und *OPN* (non-T2D fibrotisch: $0,43 \pm 0,08$, $p = 0,999$; T2D fibrotisch:

0,67 ± 0,35, non-T2D kalzifiziert: 16,97 ± 2,82; T2D kalzifiziert: 16,03 ± 3,85, p = 0,992; Abbildung 10).

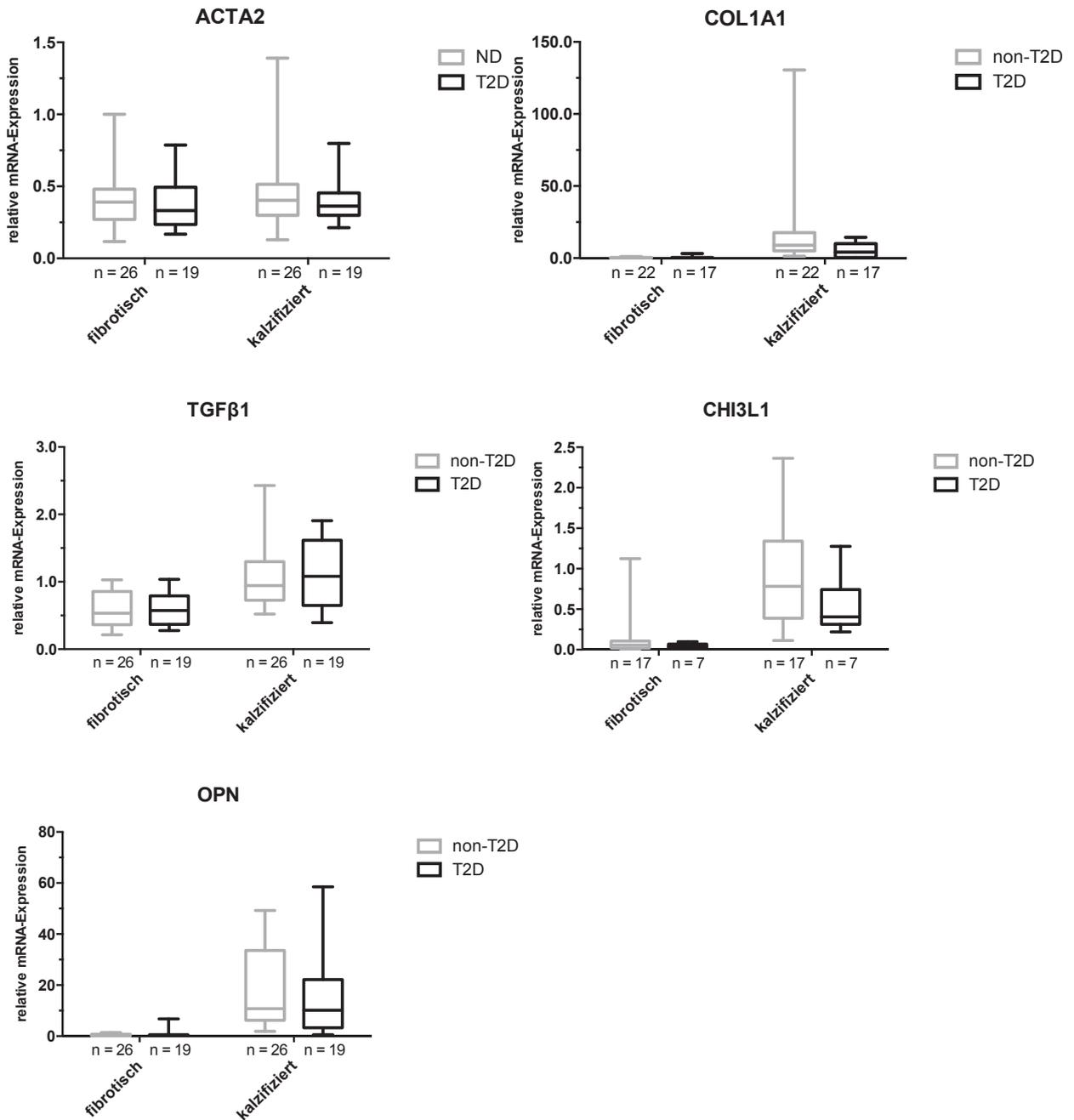


Abbildung 10: mRNA-Expression von Umbau- und Degenerationsmarkern in Klappengewebe von non-T2D und T2D

Fibrotische und kalzifizierte AK-Klappenanteile von non-T2D und T2D wurden auf die mRNA-Expression von *ACTA2*, *COL1A1*, *TGFβ1*, *CHI3L1* und *OPN* untersucht. Die Werte wurden auf eine fibrotische nicht-diabetische Klappenprobe bezogen und werden hier als Mittelwert ± SEM dargestellt.

3.3. Proteinexpression von Activin A und der Einfluss von Diabetes mellitus Typ 2

Zum Nachweis, ob das in kalzifizierten Klappengeweben vermehrt exprimierte *INHBA* auch vermehrt auf Proteinebene synthetisiert wurde, wurden BCA-basierte und Coomassie-basierte Proteinkonzentrationsbestimmungen durchgeführt. Anschließend wurde die im ELISA erhaltene *INHBA*-Konzentration auf die totale Proteinkonzentration des analysierten AK-Gewebes normiert.

Proteinkonzentrationsbestimmung

Proteinkonzentrationsbestimmungen wurden aufgrund von Etablierungsarbeiten BCA- und Coomassie-basiert durchgeführt. Grund hierfür war eine notwendige Kompatibilität der Pufferlösung (SDS vs. RD5-54) mit dem QUANTIKINE® ELISA Kit von R&D Systems.

Beim BCA-Assay mit in SDS-gelösten (1 %) Proteinlysaten aus TRI Reagent®-Phasen der mRNA-Isolation zeigte sich eine annähernd lineare Standardkurve. Jedoch war diese Probenreihe im ELISA nicht auswertbar, da sich hier repetitiv fehlerhafte Standardkurven zeigten.

Um eine Kompatibilität mit dem QUANTIKINE® ELISA Kit zu erreichen wurde als nächstes eine im Kit enthaltene Verdünnungslösung verwendet (RD5-54). In RD5-54-Verdünnungslösung gelöste AK-Taschenanteile führten jedoch beim BCA-Assay ebenso zu fehlerhaften Standardkurven. Diese Proteinkonzentrationsbestimmung konnte folglich ebenso nicht zur relativen *INHBA*-Konzentrationsbestimmung verwendet werden.

Die Coomassie-basierte Proteinbestimmung mit RD5-54-Verdünnungslösung erwies sich als kompatibel zur Normierung der *INHBA*-Bestimmung und zeigte bei der absoluten Proteinkonzentrationsbestimmung eine annähernd lineare Standardkurve. Im kalzifizierten Klappengewebe zeigte sich eine signifikant höhere Proteinkonzentration (fibrotisch: $51,62 \pm 1,46$, kalzifiziert $63,51 \pm 1,92$, $p < 0,001$, Abbildung 11)

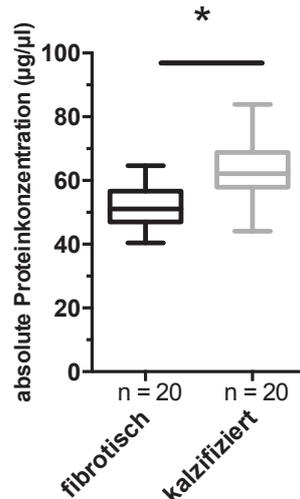


Abbildung 11: Absolute Proteinkonzentration in humanen fibrotischen und kalzifizierten AV-Anteilen

Proteine wurden aus humanen AVs isoliert, in RD5-54-Verdünnungslösung gelöst und die Proteinkonzentration Coomassie-basiert bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM der absoluten Proteinkonzentration in fibrotischen und kalzifizierten AV-Anteilen. *: $p < 0,05$.

Activin A-Konzentrationsbestimmung

Zur Untersuchung der INHBA-Konzentration im Klappengewebe von non-T2D und T2D wurde mit Proteinlysaten aus humanen fibrotischen und kalzifizierten AV-Anteilen gearbeitet. Initiale Versuchsläufe mit in SDS-gelösten (1 %) Probenreihen waren aufgrund fehlerhafter Standardreihen nicht vergleichbar. Nur in RD5-54-Verdünnungslösung gelöste Proben erwiesen sich mit dem QUANTIKINE® ELISA Kit kompatibel. Die ermittelte absolute INHBA-Konzentration wurde auf die absolute Proteinkonzentration eines Klappenanteils eines Patienten normiert.

Bei der Analyse der Daten zeigte sich keine signifikante Differenz der INHBA-Konzentration zwischen fibrotischem und kalzifiziertem Gewebe (Abbildung 12A). Ebenso ließen sich bei non-T2D und T2D keine signifikanten Unterschiede in kalzifiziertem Klappengewebe nachweisen (non-T2D kalzifiziert: $0,14 \pm 0,01$; T2D kalzifiziert: $0,13 \pm 0,02$; $p = 0,859$; Abbildung 12B). Eine Tendenz war beim Vergleich fibrotischer AV-Anteile von non-T2D und T2D zu sehen (non-T2D fibrotisch: $0,13 \pm 0,01$; T2D fibrotisch: $0,18 \pm 0,01$; $p = 0,143$). Diese Tendenz erwies sich jedoch bei isoliertem Vergleich mittels *Mann Whitney test* als signifikant ($p = 0,019$; Abbildung 12B).

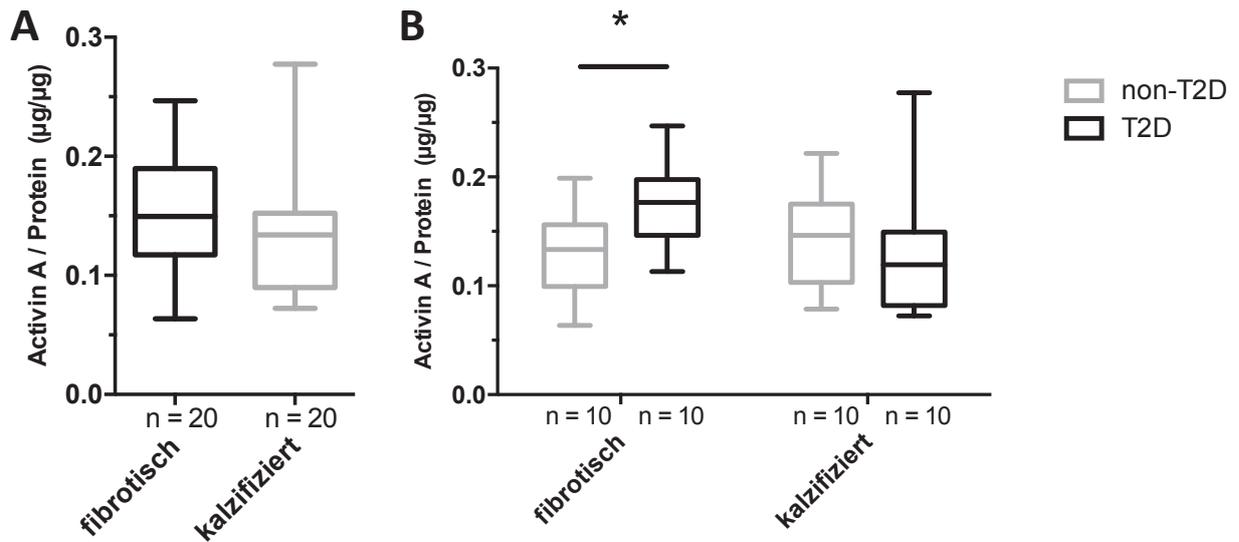


Abbildung 12: Relative INHBA-Konzentration in AK-Anteilen bei non-T2D und T2D

Mittels des QUANTIKINE® ELISA Kits ermittelte INHBA-Konzentrationen wurden auf die Coomassie-basierte Proteinkonzentration normiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der INHBA-Konzentration pro Gesamtproteinkonzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$. **A:** Isolierte Betrachtung aller fibrotischen und kalzifizierten AK-Anteile unabhängig der Vorerkrankungen der Patienten. Bei der Auswertung mittels *Wilcoxon test* zeigte sich keine signifikante Differenz der INHBA-Konzentration. **B:** Bei der Auswertung mittels *Two-way ANOVA* zeigte sich keine signifikante Differenz der INHBA-Konzentration. Bei isolierter Betrachtung der fibrotischen Klappenanteile und Analyse mittels *Mann Whitney test* zeigte sich eine signifikant erhöhte INHBA-Konzentration in Gewebe von T2D (*).

3.4. Histologische Darstellung von Matrixbestandteilen degenerierter humaner Aortenklappen

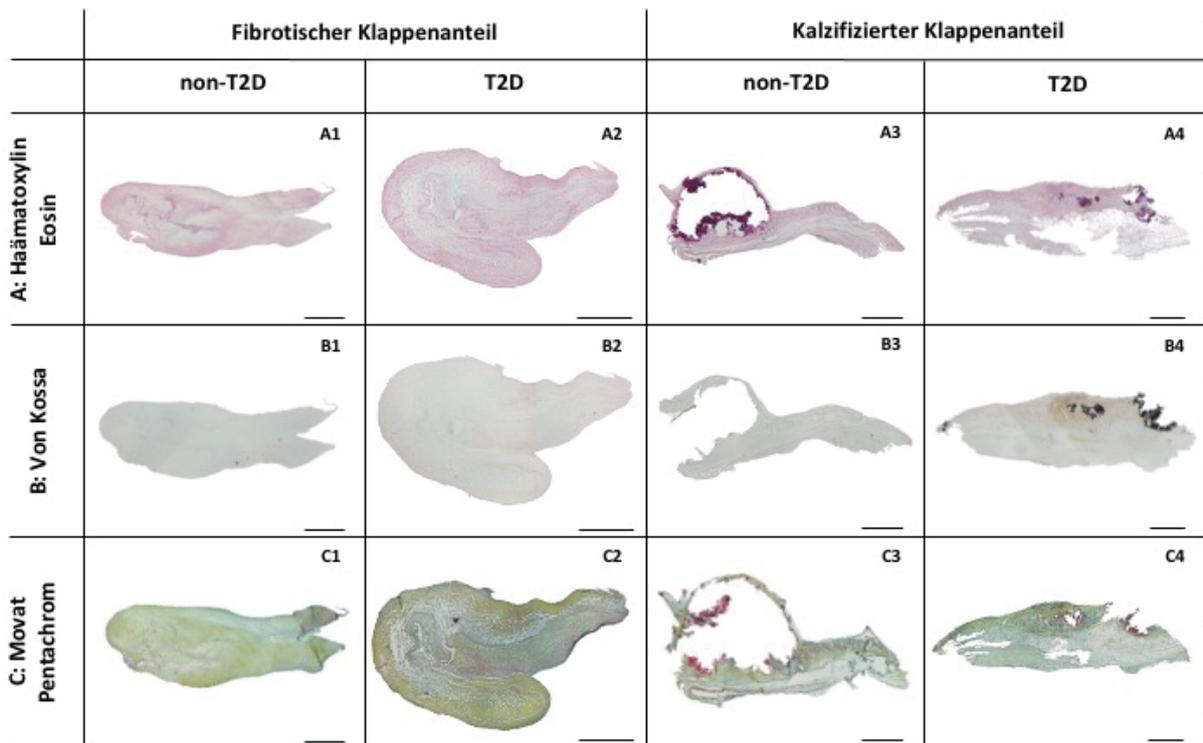


Abbildung 13: Histologische Färbungen fibrotischer und kalzifizierter AK-Taschenanteile bei non-T2D und T2D

Abgebildet sind 5 µm dicke Gewebsschnitte fibrotischer und kalzifizierter Klappenanteile. **A1-4:** In der Übersichtsfärbung mittels Hämatoxylin Eosin zeigte sich eine deutliche Destruktion im kalzifizierten AK-Anteil (A3 + A4), wobei kein signifikanter Unterschied zwischen non-T2D und T2D zu sehen war. **B1-4:** Schwarz gefärbte Kalzifizierungen wurden in der von Kossa Färbung deutlich. **C1-4:** Die Movat Pentachrom Färbung ließ den mehrschichtigen Klappenaufbau vermuten. Maßstab: 800 µm.

Die Hämatoxylin Eosin Übersichtsfärbung zeigte einen strukturierten Aufbau des fibrotischen Anteils der AK. Der kalzifizierte Anteil der Klappe erschien wesentlich destruiertes mit intensiv rot gefärbten Kalzifizierungen, die durch von Kossa Färbungen als solche identifiziert wurden. Gleichzeitig wurde, durch Ausbleiben von Schwarzfärbungen im fibrotischen Gewebe, die korrekte makroskopische Unterteilung bestätigt. Eine Movat Pentachrom Färbung erlaubte Rückschlüsse auf den bekannten Aufbau der Klappe. Während im fibrotischen Klappenanteil vor allem vermehrt gelb gefärbtes Kollagen in der Lamina fibrosa und grün gefärbte Glykosaminoglykane in der Lamina spongiosa zu sehen waren, zeigte sich im kalzifizierten Anteil weniger Gelbfärbung und zudem eine Zunahme der Blaufärbung (Muskulatur). Schwarz gefärbtes Elastin zeigte sich vor allem im basalen Bildrand des fibrotischen AK-Anteils.

Zellkerne wurden in beiden Arealen vor allem in der Lamina ventricularis der AK gefärbt. Beim Vergleich von non-T2D mit T2D zeigten sich weder im fibrotischen noch im kalzifizierten Anteil Unterschiede (Abbildung 13).

3.5. Immunhistochemische Darstellung von Matrixbestandteilen degenerierter humaner Aortenklappen

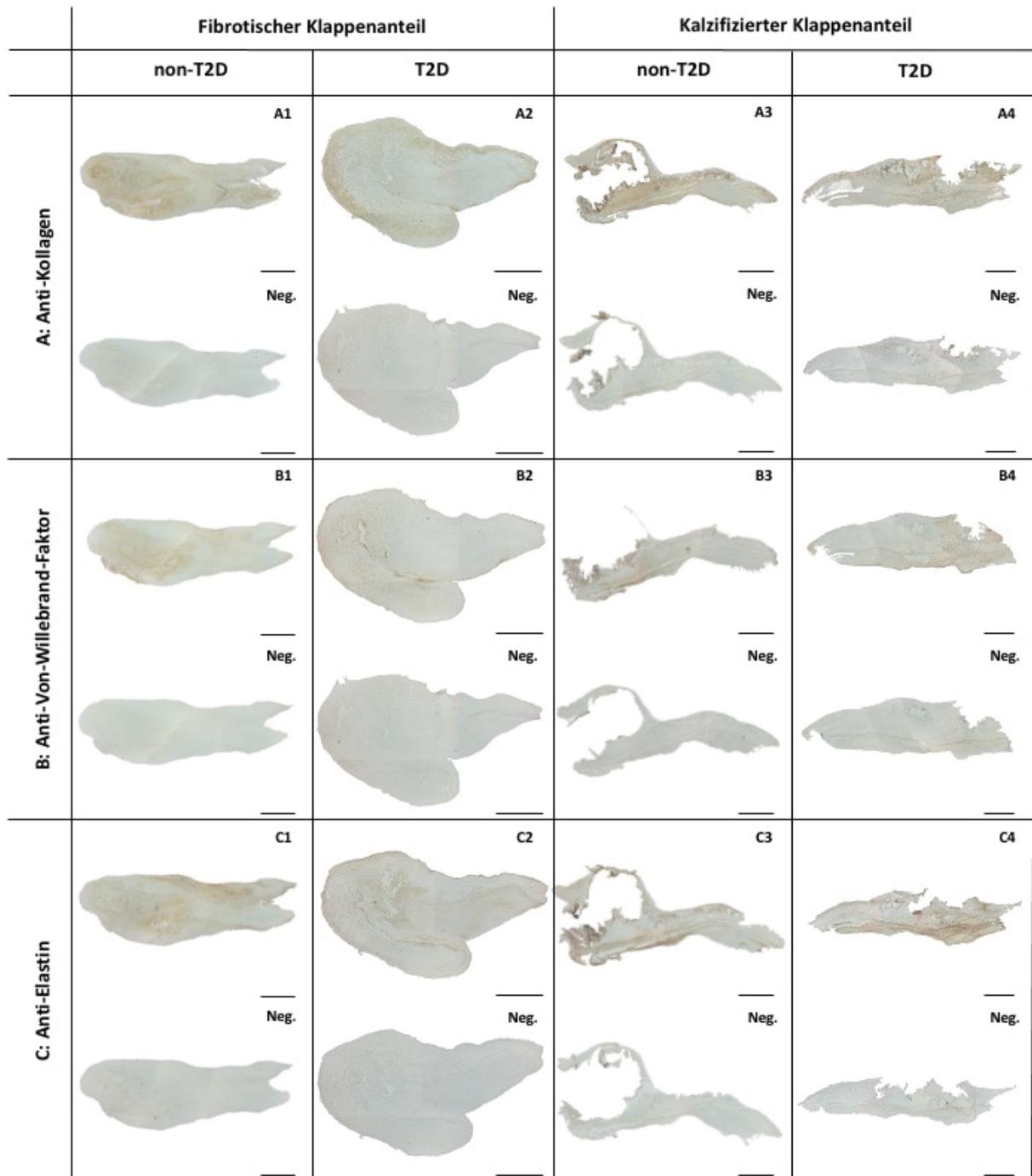


Abbildung 14: Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen, Von-Willebrand-Faktor und Elastin in fibrotischen und kalzifizierten AK-Taschenanteilen bei non-T2D und T2D

Abgebildet sind 5 µm dicke Gewebsschnitte fibrotischer und kalzifizierter Klappenanteile. **A:** In fibrotischen Klappenarealen (A1 + A2) zeigte sich bei der Verwendung von COL1A1-Antikörpern ein vermehrter Farbumschlag in der Lamina fibrosa und ventricularis. Beim Vergleich beider Stadien erschien die Färbung in kalzifizierten Klappenanteilen stärker ausgeprägt und nicht nur auf zwei Gewebsschichten begrenzt. Die stärkste Färbung war in der Lamina spongiosa im Bereich von Kalzifizierungen zu sehen. **B:** Sowohl in fibrotischen als auch kalzifizierten Klappen wurden luminale Endothelzellen verstärkt braun angefärbt. Ein

Unterschied zwischen fibrotischen und kalzifizierten Klappenarealen bzw. non-T2D und T2D war nicht zu erkennen. C: Elastin konnte in fibrotischen und kalzifizierten Klappenanteilen nachgewiesen werden. In fibrotischem Klappengewebe zeigte die Färbung kein nachvollziehbares Muster. Abkürzungen: Neg. = Negativkontrolle. Maßstab: 800 µm.

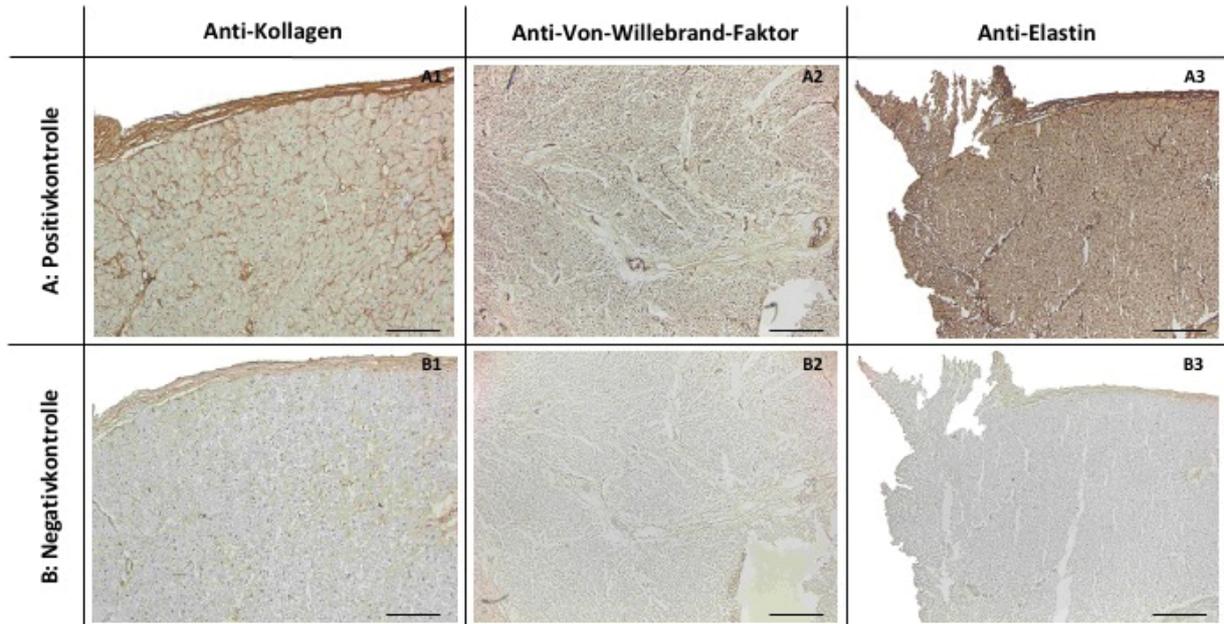


Abbildung 15: Positivkontrollen immunhistochemischer Färbungen

Gezeigt sind gleichzeitig mit dem AK-Gewebe gefärbte Anteile humanen Myokards, welches als Positivkontrolle verwendet wurde. Maßstab: 400 µm.

Durch vorangegangene histologische Arbeiten konnten Analysen immunhistochemischer Färbungen direkt auf die Gewebsschichten der Klappen bezogen werden. Beim Nachweis von COL1A1 zeigte sich eine Übereinstimmung mit der Movat Pentachrom Färbung. Durch die Zugabe von DAB kam es zu einem vermehrten Farbumschlag in der Lamina fibrosa und ventricularis. Zusätzlich zeigte sich eine starke Färbung der Lamina ventricularis in kalzifizierten AK-Anteilen. Ein Unterschied zwischen non-T2D und T2D war dabei nicht zu beobachten.

Durch Von-Willebrand-Faktor-Antikörper ließen sich sowohl in fibrotischen als auch kalzifizierten Anteilen lumenale Endothelzellen nachweisen. Ein spezifischer Farbumschlag innerhalb der Gewebsschichten war nicht zu beobachten. Ebenso zeigte sich sowohl zwischen fibrotischen und kalzifizierten AK-Arealen als auch zwischen non-T2D und T2D kein Unterschied.

Bei der indirekten Färbung von Elastin zeigte sich eine diffuse Farbverteilung in fibrotischen Klappenanteilen. Es konnte keine klare Begrenzung auf eine Gewebsschicht ausgemacht

werden. In kalzifiziertem Gewebe zeigte sich eine starke Färbung in der Lamina ventricularis (Abbildung 14). Zusätzlich zu den AK-Gewebsproben wurde humanes Myokard als Positivkontrolle gefärbt (Abbildung 15).

4. Diskussion

CAVD stellt die führende Aortenklappenerkrankung dar [15]. Der aktive Pathomechanismus ist irreversibel und dem der Arteriosklerose ähnlich. Entstehung und Progression beider Erkrankungen werden durch sogenannte kardiovaskuläre Risikofaktoren begünstigt [5, 16]. DM ist einer dieser Risikofaktoren [16]. Eine medikamentöse Therapie, um die Progression der CAVD zu beeinflussen, besteht bis heute nicht. INHBA, ein Protein der TGF-Superfamilie, werden neben proinflammatorischen und profibrotischen Eigenschaften auch Beteiligungen an kardiovaskulären Erkrankungen von Diabetikern zugeschrieben [2, 48, 50]. Im Rahmen des Promotionsvorhabens wurde ein möglicher Zusammenhang von INHBA, CAVD und T2D untersucht.

4.1. Versuchsaufbau und Etablierungsarbeiten

Patientenauswahl

Die retrospektive Patientenauswahl erfolgte bewusst nicht randomisiert, was den Vorteil beinhaltete, dass patientengebundene Störfaktoren gemindert wurden. Bei gepaarter *Wilcoxon* Testung wurden nur die Stadien der Fibrose und Kalzifizierung einer AK-Tasche miteinander verglichen. Alter, Vorerkrankungen oder Medikamenteneinnahmen haben somit keinen Einfluss auf das Ergebnis. Dies unterscheidet die Promotionsarbeit zu Vorarbeiten, bei denen gesamte Klappen mit Klappen von Transplantatempfängern verglichen wurden.

Genexpressionsanalyse und Activin A-Konzentrationsbestimmungen

Genexpressionsanalysen bildeten bei der Arbeit den Grundstein für weitere Untersuchungen. Da sich anhand dieser aber keine Aussagen über die wirkliche Proteinkonzentration im Gewebe treffen lässt, folgten den qPCR-Arbeiten auch Proteinkonzentrationsanalysen mittels ELISA. Zunächst wurde versucht, mit Trizolphasen der RNA-Isolationen weiterzuarbeiten. Bei absoluten Proteinkonzentrationsanalysen zeigten sich signifikant höhere Proteinkonzentrationen in kalzifiziertem Klappengewebe. Jedoch erwiesen sich die Proteinlysate nicht mit dem anschließend durchgeführten INHBA-ELISA kompatibel. Da sich bereits Fehler in der Standardkurve des ELISAs zeigten, ist die Inkompatibilität wahrscheinlich Folge des verwendeten Lösungsmittels SDS (1 %). Auch bei Verdünnungen des SDS (0,1 %) blieb diese Problematik bestehen. Dennoch konnte in kalzifiziertem Gewebe eine höhere absolute Proteinkonzentration ermittelt werden. Postoperativ aufgenommene Fotos zeigten einen wesentlich größeren kalzifizierten Klappenanteil, was der wahrscheinlichste Grund für die erhöhte absolute Proteinkonzentration ist. Um eine Kompatibilität mit dem ELISA zu

erreichen, wurde anschließend ein Lösungsmittel des ELISAs selbst verwendet: RD5-54. Daraufhin kam es bei Ermittlungen der absoluten Proteinkonzentration mittels BCA-Assay zu fehlerhaften Standardreihen, was abermals eine Interaktion des Lösungsmittels mit der Methodik vermuten ließ. Da der Hersteller keine Angaben bezüglich des Inhalts des verwendeten Puffers machte, wurde alternativ zur Proteinkonzentrationsbestimmung ein Coomassie basiertes Verfahren durchgeführt. Aufgrund des unbekanntes Inhalts der Pufferlösung musste dieses Verfahren zunächst modifiziert werden. Eine infolge hoher Proteinkonzentrationen durchgeführte Verdünnung der Proben war nur möglich, wenn die Standardreihe auch verdünnt wurde. Schlussendlich erwies sich die Coomassie basierte Konzentrationsanalyse als erfolgreich und wies ebenfalls signifikant höhere Proteinkonzentrationen in kalzifiziertem Klappengewebe nach (Abbildung 11). Auffallend war dabei eine sowohl im fibrotischen als auch im kalzifizierten Klappenanteil höhere Proteinkonzentration im Vergleich zu BCA-Assay-Analysen. Dies lässt in RD5-54 enthaltene Proteine als mögliche Störfaktoren der BCA-Assay-Standardreihe vermuten.

4.2. Activin A, die degenerative Aortenklappenerkrankung und Diabetes mellitus

Activin A im Verlauf der degenerativen Aortenklappenerkrankung

Mehrere Publikationen weisen darauf hin, dass INHBA in Abhängigkeit von Gewebe, Zelltyp und -stadium unterschiedliche Effekte hat. Teilweise sind diese sogar gegensätzlich der ursprünglichen Funktion. Beispielsweise wurde gezeigt, dass die initial proinflammatorische Proteinwirkung von INHBA bei Makrophagen im Laufe des Entzündungsgeschehens in eine regulierende antiinflammatorische Wirkung umschlägt [2, 37, 38]. Im Zusammenhang mit Fibrose wurden von INHBA ausgehende proliferative Stimuli beobachtet [42].

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Analyse humaner AKs zeigte, dass *INHBA* im kalzifizierten Klappenanteil signifikant stärker exprimiert ist. Die Rezeptoren *ACVR2A*, *ACVR2B* und *ALK4* waren beim Vergleich mit dem fibrotischen Klappenanteil ebenfalls hochreguliert (Abbildung 5). Intrazellulär erfolgt die Signalweiterleitung über SMAD-Proteine oder den MAP-Kinase-Weg [2]. *SMAD2* und *SMAD3* zeigten keine Änderungen der Genexpression. Ebenso zeigte *SMAD7*, ein Regulator der Signaltransduktion, der über R-SMAD-Aktivierung vermehrt exprimiert wird [71], keine Änderung der Genexpression (Abbildung 6). Inhibin, *Bone morphogenic protein and activin membrane-bound inhibitor* (BAMBI) und *Cryptic family protein 1B* (CRIPTO) wirken an der Zellmembran als Regulatoren der INHBA-Bioaktivität und könnten hingegen einen Einfluss haben, wurden aber in dieser

Arbeit nicht analysiert. Mittels Analyse der Genexpression konnte also lediglich das Vorhandensein der *SMAD* bewiesen werden, nicht aber ihre Funktion. In der Signalkaskade werden SMAD-Proteine durch Phosphorylierungen aktiviert. Es folgt eine Oligomerisierung, Migration in den Nucleus und Bindung an Transkriptionsfaktoren [2]. Die Analyse der Phosphorylierung von SMAD Proteinen und der Vergleich dieser zwischen AK unterschiedlicher Patienten bzw. zwischen AK-Anteilen mit unterschiedlicher Degeneration wäre entsprechend in weiterführenden Arbeiten der nächste Schritt. Das heißt, gleichermaßen ausgeprägte Genexpressionen der *SMAD* schließen somit eine ausbleibende Signalweiterleitung nicht zwingend aus. Ein zellulärer Effekt des in kalzifiziertem Gewebe vermehrt exprimierten *INHBA* könnte hier trotz unveränderter *SMAD*-Expressionen vorliegen. Effekte in VICs, die die größte zelluläre Komponente in AKs bilden [18], wären hier denkbar. Je nach Stimulus können diese zu unterschiedlichen Phänotypen differenzieren, wie beispielsweise Myofibroblasten [18]. Da in Lungengewebe gezeigt wurde, dass bereits geringe *INHBA*-Konzentrationen zu einer Differenzierung zu Myofibroblasten führen [42], ist dies auch bei VICs in Klappengewebe denkbar. VICs synthetisieren in weiterer Folge vermehrt Proteine der EZM [18], unter anderem *COL1A1* und *ACTA2*. Während in der vorliegenden Arbeit auch bei *COL1A1* eine signifikante Hochregulation der Genexpression in kalzifiziertem Gewebe nachgewiesen wurde, blieben Unterschiede bei *ACTA2* aus (Abbildung 7). Anschließend durchgeführte Movat Pentachrom Färbungen und immunhistologische Färbungen bestätigten dies (Abbildung 13 + Abbildung 14). *COL1A1*, das physiologisch überwiegend in der Lamina fibrosa zu finden ist [18], wurde im gesamten Klappengewebe vermehrt nachgewiesen. Da aber in renalen Fibroblasten ein Zusammenhang von *INHBA* und *ACTA2* beobachtet wurde [41], könnte die ausbleibende Differenz der Genexpression in dieser Arbeit in den Stadien der CAVD begründet sein: Unterschiedliche Phasen bedürfen unterschiedlicher Stimuli. In frühen Phasen des Degenerationsprozesses ist auch das Zytokin *TGFβ1* ein entscheidender Faktor. Es stimuliert die Differenzierung zu Myofibroblasten und führt zu einer vermehrten Expression von *ACTA2* [72]. Im kalzifizierten Klappenanteil konnten zwar erhöhte *TGFβ1*-Genexpressionen nachgewiesen werden (Abbildung 7), doch mit dem Vergleich von Fibrose und Kalzifizierung wurden eher spätere Stadien der Degeneration untersucht. Bei Vergleichen mit gesunden Klappen – der Analyse früherer Stadien – könnte *ACTA2* eher hochreguliert sein. Unterstrichen wurde die Untersuchung der zwei Degenerationsstadien histologisch durch von Kossa Färbungen und auf mRNA-Ebene durch die Analyse der Genexpression von *OPN*.

Neben Genexpressionsanalysen wurden ELISA-basierte INHBA-Proteinkonzentrationsbestimmungen durchgeführt (Abbildung 12). Konzentrationsunterschiede zwischen fibrotischen und kalzifizierten AK-Taschenanteilen ließen sich hierbei nicht nachweisen, was gegensätzlich den Ergebnissen der Genexpressionsanalysen ist. Eine mögliche Begründung könnte die zugrundeliegende Methodik sein. Der verwendete ELISA ist laut Hersteller für Zellkultur-, humane Speichel-, Plasma- und Serumproben geeignet. Mit humanen Gewebeproben erfolgte bisher noch keine Testung. Ebenso könnten Kreuzreaktionen eine Ursache sein. Bei Inhibin B, CRIPTO und BAMBI können diese zwar laut Herstellerangabe ausgeschlossen werden, keine Erwähnung findet jedoch *follistatin-like 3*. *Follistatin-like 3* bindet ebenfalls INHBA, führt aber zu seiner Inaktivierung und ist somit an der Regulation der Bioaktivität beteiligt [73]. Zusätzlich wurden in der vorliegenden Arbeit für die Genexpressionsanalysen und Proteinkonzentrationsbestimmungen unterschiedliche AK-Taschen verwendet. Dies könnte ebenfalls für die beschriebenen Gegensätze verantwortlich sein. Neben der Methodik könnte die Proteingruppe der Follistatine eine entscheidende Rolle spielen. Es wird zwischen Follistatin 288, 315 und *follistatin-like 3* unterschieden. Gemein ist allen drei der schlussendliche Wirkmechanismus im Zusammenhang mit INHBA. Zum einen führt eine Bindung an INHBA zu einer Hemmung der Proteinaktivität, zum anderen wird das Protein anschließend durch Endozytose aufgenommen und lysosomal abgebaut [73]. Bei vermehrtem Abbau könnte eine Differenz zwischen Genexpression und schlussendlicher Proteinkonzentration entstehen. Posttranslational könnte abermals Inhibin für niedrige INHBA-Konzentrationen verantwortlich sein, z.B. durch konkurrierende Untereinheiten bei der Dimerisierung des Proteins [74]. Auch Activin C werden durch selbigen Mechanismus regulative Funktionen zugeschrieben [74]. Die Bildung des Homodimers INHBA bliebe somit aus. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Diskrepanz zwischen Ergebnissen der Genexpressionsanalyse und Proteinkonzentrationsbestimmung auf mehreren Ebenen entstehen kann. Dies reicht von ausbleibender Dimerisierung, über Störfaktoren im ELISA bis zum lysosmalen Abbau des Proteins.

Activin A und der Einfluss von Diabetes mellitus Typ 2

INHBA wurde in der Literatur auch mit T2D in Verbindung gebracht [48, 49]. Für diese Promotionsarbeit am interessantesten erscheint dabei der Ansatz bei der Analyse des INHBA-Systems im Zusammenhang mit diabetischer Kardiomyopathie [50]. Schlüsselstelle ist eine INHBA induzierte verminderte Insulinwirkung [75]. Durch Bindung von INHBA an Oberflächenrezeptoren auf Kardiomyozyten, wird über mehrere Zwischenschritte die

Insulinwirkung herunterreguliert [75]. Da Insulin in mehreren Studien eine kardioprotektive Funktion nachgewiesen werden konnte, könnte die initiale Auswirkung der INHBA Sekretion durch epikardiale Adipozyten einen entscheidenden Faktor bei der Entstehung der diabetischen Kardiomyopathie darstellen [50].

Zusätzlich zur Untersuchung der Degenerationsstadien, wurden somit auch AK-Gewebe von Patienten mit einer T2D-Erkrankung und einem HbA1c > 6,5 % untersucht. Dabei zeigte sich jedoch kein Unterschied der Genexpression von *INHBA*, den Rezeptoren *ACVR2A*, *ACVR2B*, *ALK4* und den intrazellulären *SMAD*-Proteinen *SMAD2* und *SMAD3* (Abbildung 8 + Abbildung 9). *SMAD7* hingegen war in AK-Gewebe von Diabetikern signifikant hochreguliert (Abbildung 9). Nagarajan et al. zeigte 1999 erstmals, dass TGFβ1- und Activin-Signalwege für eine gesteigerte *SMAD7* Expression verantwortlich sind. Durch vermehrte Rezeptoraktivierungen kommt es zu Phosphorylierungen der R-SMADs 3 und 4, die daraufhin im Nucleus unter anderem auch an den Promoter von *SMAD7* binden [71]. *SMAD7* ist anschließend für einen negativen Feedbackmechanismus verantwortlich. Es interagiert mit Typ 1 Rezeptoren und ubiquitiniert diese, was einen vermehrten Abbau des Rezeptors zur Folge hat [76]. Wie auch bei Prozessen der koronaren Herzkrankheit beschrieben, könnte *INHBA* über *SMAD7* nach initialer proinflammatorischer Wirkung auch antiinflammatorische Wirkungen im Zusammenhang mit T2D und CAVD haben [48]. Da die schlussendliche Wirkung bei Immunzellen mit der Dauer der Inflammation zusammenhängt [2], könnte dies auch die Diskrepanz zwischen Genexpressionsanalyse und Proteinkonzentrationsbestimmung von *INHBA* erklären. Denn bei der Untersuchung des Einflusses von T2D zeigte sich bei Proteinkonzentrationsbestimmungen bei Diabetikern eine höhere *INHBA*-Konzentration im fibrotischen AK-Taschenanteil. Während mRNA-Bestandteile bereits abgebaut sind, könnten Proteine noch nachweisbar sein. Neben einer zeitlichen Begründung, könnte auch die zugrundeliegende Methodik einen Einfluss haben. Es wurden zwar AKs derselben Patienten untersucht, jedoch in Genexpressionsanalysen und Proteinkonzentrationsbestimmung unterschiedliche AK-Taschen verwendet. Minimale Fibrose- und Kalzifizierungsunterschiede können hier nicht ausgeschlossen werden. *INHBA* könnte somit aufgrund chronischer Inflamationsprozesse bei T2D und gleichzeitig zunehmender Schädigung der AK je nach CAVD-Stadium unterschiedliche Effekte haben. Inflamationsphasen könnten aufgrund der ohnehin schon bestehenden leichten chronischen Inflammation früher erreicht werden [77], was einen Unterschied der *INHBA*-Konzentrationen erklären würde. Während es in frühen Phasen der Inflammation mit anschließender Fibrose in Monozyten und Fibroblasten prodegenerativ

wirken könnte, könnte in späteren Phasen vor allem bei T2D eine antiinflammatorische Wirkung über SMAD7 eintreten.

4.3. Extrazelluläre Matrixbestandteile: Eine mögliche Schlüsselstelle im Degenerationsprozess der Aortenklappe

Zunehmende Destruktion und eine verminderte Zellzahl in kalzifiziertem Gewebe

Die Zusammensetzung der EZM ist ein wichtiger Aspekt in der Entstehung und Progression der CAVD [78]. Zur initialen Untersuchung wurde eine Hämatoxylin Eosin Färbung durchgeführt. Durch die bläuliche Färbung von Zellkernen konnten zellreiche und zellarme Areale identifiziert werden. Da die EZM lediglich in verschiedenen Rosatönen gefärbt wird, eignet sich diese vergleichsweise einfache Färbung eher als Bezugs- bzw. Übersichtsfärbung (Abbildung 13A).

Die anschließend durchgeführte von Kossa Färbung diente der Identifizierung von Kalziumablagerungen. Die makroskopische Unterteilung der AK-Tasche konnte verifiziert und beginnende Kalzifizierungen in fibrotischen Anteilen ausgeschlossen werden (Abbildung 13B). Nach Beurteilungen der Zelldichte, Gewebsstruktur und Ausmaß der Kalzifizierung folgte zur Analyse der EZM eine Movat Pentachrom Färbung (Abbildung 13C). Diese Färbung eignet sich sehr gut zur Beurteilung der einzelnen Gewebsschichten und wurde auch in vorangegangenen Publikationen genutzt [78]. Diese zeigten, dass Kollagenfasern vermehrt in der Lamina fibrosa, Glykosaminoglykane in der Lamina spongiosa und Elastinfasern in der Lamina ventricularis vorhanden sind [79]. Neben dem Nachweis der Umstrukturierung war eine Movat Pentachrom Färbung so auch essentiell zur Identifizierung der drei Gewebsschichten: Lamina fibrosa, spongiosa und ventricularis. In fibrotischen Klappenanteilen waren diese noch intakt, während in kalzifizierten AK-Anteilen eine deutliche Destruktion sichtbar wurde. Zusätzlich wurde eine Zunahme des Kollagengehalts sichtbar, was auch in Genexpressionsanalysen wiedergespiegelt werden konnte und gleichzeitig mit Forschungsergebnissen von Hutson et al. übereinstimmt [78]. Zellreich erschien die Klappe vor allem in der Lamina ventricularis in fibrotischen Gewebsschnitten. Aufgrund des physiologisch hohen Anteils an VICs in AK-Taschen ist davon auszugehen, dass es sich auch hier um diese Zellen handelt [18]. Denkbar wäre auch eine vermehrte Einwanderung von Immunzellen wie Makrophagen aufgrund des initialen Inflammationsprozesses.

Als vierte histologische Methode wurden DAB basierte immunhistochemische Färbungen durchgeführt (Abbildung 14). Da bei Entstehung und Progression der CAVD auch Mikroangiogenese ein Bestandteil ist [80], wurden zum Nachweis von Endothelzellen Von-

Willebrand-Faktor-Primärantikörper verwendet. Ein zu erwartender zunehmender Farbumschlag war auf ventrikulärer und aortaler Seite im fibrotischen AK-Anteil zu beobachten. Im kalzifizierten AK-Anteil war eine Aussage aufgrund der ausgeprägten Destruktion schwer zu treffen, wobei öfters ein methodisch bedingter Verlust von Kalziumablagerungen zu beobachten war. Innerhalb der Schichten zeigte sich kein Endothel-spezifischer Farbumschlag. Denkbar ist, dass eine zunehmende Vaskularisation vor allem im Initialstadium der Klappendegeneration von Bedeutung ist. *Vascular endothelial growth factor* und Matrix-Metalloproteasen wurden bereits als wichtige Faktoren dieses Degenerationsschrittes identifiziert [80]. Mit zunehmendem Zelluntergang könnte die Vaskularisation aber in späten Phasen der CAVD eher eine untergeordnete Rolle spielen und schlussendlich durch verdrängende Kalziumablagerungen mikroskopisch nicht mehr nachweisbar sein. Da sich in Übersichtsfärbungen bereits fibrotisches Gewebe eher zellarm zeigte, könnte auch hier der zeitliche Faktor ausschlaggebend gewesen sein. Protein- und Genexpressionsanalysen von *Vascular endothelial growth factor* und Matrix-Metalloproteasen könnten zusätzliche Erkenntnisse bringen. In weiteren Färbungen wurden COL1A1 und Elastin Antikörper basiert gefärbt. Eine Veränderung der Zusammensetzung der EZM mit einem hohen Anteil an COL1A1 wurden bei CAVD bereits berichtet, in der Movat Pentachrom Färbung gezeigt und hiermit nochmals verifiziert [78]. Das Strukturprotein Elastin kommt physiologisch überwiegend auf der ventrikulären Seite der AK vor. Im Rahmen des extrazellulären Umbaus führt eine zunehmende Fibrosierung und ein enzymatischer Abbau durch Metalloproteasen zum Verlust der elastischen Fasern [81]. Ein ausgeprägter Unterschied der Braunfärbung zwischen fibrotischen und kalzifizierten AK-Anteilen war bei immunhistochemischen Analysen nicht zu sehen. Keine Aussage lässt sich jedoch über die Funktion des dargestellten Elastins treffen. Durch die Färbung konnte aber gezeigt werden, dass die in der von Kossa Färbung dargestellten Kalzifizierungen nicht im Bereich der Elastinfasern liegen. Daher könnte Elastin am Funktionsverlust der AK durch Abnahme der Elastizität beteiligt sein, nicht aber aktiv am schlussendlichen Kalzifizierungsprozess. Perrotta et al. beschreibt in diesem Zusammenhang abermals Metalloproteasen als wichtige Faktoren, da diese nach Fragmentierung des Elastins an einer vermehrten Mineralisierung des Gewebes beteiligt sein könnten [82]. Eine Erhaltung der elastischen Fasern könnte somit möglicherweise den Degenerationsprozess verlangsamen oder gar unterbinden.

Der Einfluss von Diabetes mellitus Typ 2 auf den Umbau der extrazellulären Matrix

Zusätzlich zur Untersuchung der Progression der CAVD wurde bei histologischen und immunhistochemischen Arbeiten auch der Einfluss von T2D analysiert. Die Analyse erfolgte deskriptiv und zeigte keine Unterschiede zwischen den Kohorten. Dennoch schließt dies einen Einfluss von T2D nicht aus.

Prospektive Studien zeigten, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen T2D und dem Auftreten einer AS besteht [29]. In diesem Kontext könnte auch die Dauer der Diabeteserkrankung ausschlaggebend für das Ausbleiben morphologischer Unterschiede gewesen sein. Eine positive Korrelation zwischen der Dauer und dem kardialen Erkrankungsrisiko wird beschrieben [29]. Bei der im Rahmen dieser Promotionsarbeit beschriebenen Patientenkohorte ist die Dauer der Diabeteserkrankung nicht erfasst, wenn auch aufgrund des Durchschnittalters von $72 \pm 1,2$ Jahren von einem schon länger bestehenden Diabetesleiden auszugehen ist. Die Stichprobengröße von insgesamt sechs Patienten und dadurch bedingte deskriptive Analytik könnte somit ein möglicher Grund für die Diskrepanz sein. Darüber hinaus könnte ein erst seit Kurzem bestehender T2D nicht sicher ausgeschlossen werden und somit auch einen entscheidenden Faktor darstellen.

Ebenso könnte T2D eher an der initialen Entzündungsreaktion als an dem über mehrere Jahre fortschreitenden Degenerationsprozess beteiligt sein. In ovinen VICs konnte dies bereits gezeigt werden. Hyperinsulinämie führt in Kombination mit Hyperglykämie zu einer vermehrten Expression von COL1A1 [83]. Eine Hochregulation von *COL1A1* konnte im Rahmen dieser Arbeit in kalzifiziertem Gewebe nachgewiesen werden. Ein T2D-induzierter verfrühter Umbau durch eine gesteigerte Kollagensynthese wäre somit denkbar. Phänotypisch zeigte sich dies auch in immunhistochemischen Färbungen dieser Arbeit (Abbildung 14A).

Wenn auch ein morphologischer Unterschied der analysierten Kohorten durch diese Promotionsarbeit nicht sichtbar wurde, ist dennoch bekannt, dass die EZM in AK-Gewebe durch T2D moduliert wird. Wie auch bei COL1A1, führt ebenfalls bei Proteoglykanen erst die Kombination mehrerer Stimuli zu einer signifikanten Hochregulation des Proteins. Zusätzlich wurde es vermehrt in kalzifizierten Anteilen humaner Klappen nachgewiesen [69].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass T2D einen kardiovaskulären Risikofaktor darstellt. Bei CAVD wurde eine Beteiligung am Degenerationsprozess durch hyperglykämische und hyperinsulinämische Bedingungen gezeigt [69, 83]. Der entscheidende Zeitpunkt bleibt aber unklar. Am ehesten ist eine Modulation der EZM im Initialstadium der CAVD denkbar, was ausbleibende morphologische Unterschiede in AK-Arealen fortgeschrittener Degeneration erklären könnte.

4.4. Aussagekraft und Limitationen der Promotionsarbeit

Zur Analyse wurde in der gesamten Arbeit mit humanen AK-Proben gearbeitet. Da die AK aus drei Taschen besteht, konnte für jedes Teilprojekt der Promotion (Histologie und Immunhistochemie, Genexpressionsanalyse, Proteinkonzentrationsanalyse) jeweils eine Tasche desselben Patienten untersucht werden. Dennoch könnten unterschiedliche Degenerationsgrade der einzelnen AK-Taschenanteile Auswirkungen auf die Rückschlüsse zwischen den Methoden haben. Zusätzlich erfolgte bei Probenentnahme keine exakte Zeitmessung bis zur Asservierung in Flüssigstickstoff, was bei mehrminütigen Zeitunterschieden ebenso einen Einfluss auf Ergebnisse der Genexpressions- und Proteinanalysen haben könnte.

Die Analyse einzelner AK-Anteile und der Vergleich des Fibrose- mit dem Kalzifizierungsstadium bringt mit sich, dass nur späte Stadien analysiert wurden. Die Untersuchung von Frühstadien, die sich aus dem Vergleich von gesund vs. fibrotisch ergeben würde, konnte im gesamten Versuchsaufbau nicht beachtet werden. Die Aussagen beziehen sich somit auf spätere Stadien der CAVD.

Bei der Untersuchung des Einflusses von T2D zeigten statistische Analysen der Patientenkohorten, dass signifikante Unterschiede im HbA1c, BMI und in der Häufigkeit der Statineinnahme bestehen (Tabelle 2). Ein erhöhter BMI, ist ebenso wie erhöhte HbA1c-Werte mit T2D assoziiert. Beide stellen einen kardiovaskulären Risikofaktor dar, werden zum metabolischen Syndrom gezählt und bestätigen die gezielte Probenauswahl [6]. Dennoch könnte dies auch Auswirkungen auf die Analyse gehabt haben, da ein kausaler Zusammenhang zwischen Adipositas und der Inzidenz der AS beschrieben wird [84]. Teo et al. zeigte im Rahmen klinischer Studien, dass die Einnahme von Statinen aber keinen signifikanten Einfluss auf das Fortschreiten der Kalzifizierung hat [85]. Von einem Einfluss der Medikation auf die Analyseergebnisse rund um CAVD ist somit nicht auszugehen.

Die Umstrukturierung der EZM ist ein Kernelement des CAVD Pathomechanismus [78, 79]. Um die makroskopisch unterteilten AK-Taschen auch mikroskopisch untersuchen zu können, wurden bei histologischen Arbeiten 6 AKs analysiert. Mit zunehmender AK-Kalzifizierung ließen sich diese zunehmend schlechter schneiden bzw. auf den Objektträger auftragen. Extreme Kalzifizierungen konnten somit nicht abgebildet werden, was einen Einfluss auf die deskriptive Analyse haben könnte.

4.5. Ausblick

Chitinase-3-like-1: Ein weiteres potentielles Zielmolekül

Zusätzlich zur Analyse des INHBA-Systems wurde auch das Adipokin CHI3L1 im AK-Taschengewebe untersucht. Mehrere Studien lassen annehmen, dass CHI3L1 in Zukunft aufgrund erhöhter Serumlevel ein möglicher Screening- oder Verlaufsparameter bei CAVD sein könnte [86, 87]. Im Rahmen der Tagung der *European Association for the Study of Diabetes* (2016) vorgestellte Forschungsergebnisse der Experimentellen Chirurgie der Klinik für Herzchirurgie zeigten bereits, dass das Glykoprotein auch im Zusammenhang mit CAVD reguliert ist [88].

Die Genexpressionsanalysen dieser Promotionsarbeit zeigten eine signifikante Hochregulation von *CHI3L1* in kalzifiziertem Klappengewebe (Abbildung 7). Ein Unterschied in fibrotischen Gewebsanteilen zwischen T2D-Proben und non-T2D-Proben konnte nicht nachgewiesen werden (Abbildung 10). In weiteren Arbeiten könnten aber Protein- und Rezeptornachweise erfolgen, um der erhöhten Genexpression in kalzifiziertem Gewebe nachzugehen.

Activin A: Zukünftige Forschungsprojekte

Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Forschungsergebnisse erhärten den Verdacht eines möglichen Zusammenhangs von INHBA, T2D und CAVD. In kalzifizierten AK-Taschenanteilen wurde eine erhöhte *INHBA* Genexpression nachgewiesen (Abbildung 5). Da die anschließende intrazelluläre Signalweiterleitung durch Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen reguliert wird, könnten Analysen des Phosphorylierungsstatus von SMAD2, SMAD3 und ALK4 neue Erkenntnisse bringen. Auch eine Verifizierung des in fibrotischen AK-Taschenanteilen vermehrt exprimierten *SMAD7* auf Proteinebene wäre erstrebenswert.

Da in der Arbeit zwischen Fibrose und Kalzifizierung unterschieden wurde, der Pathomechanismus aber schon mit Inflammationsprozessen beginnt [17], wäre auch eine Analyse des INHBA-Systems in diesem Zusammenhang interessant. Das Einbeziehen von Klappenproben von Herztransplantatempfängern würde eine Möglichkeit der Analyse darstellen.

INHBA Wirkungen wurden in einer Vielzahl von Zelltypen beobachtet [2]. Eine Untersuchung des Ursprungs der vermehrten Genexpression wäre interessant. Durch Zellkulturversuche könnte der direkte Effekt von INHBA auf VICs untersucht werden. Hat INHBA einen direkten oder indirekten Effekt auf den Fibroseprozess mit anschließender Kalzifizierung? Der vermutete Differenzierungsstimulus könnte in VICs bestätigt werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass das INHBA-System einen potentiellen prodegenerativen Faktor im Rahmen der CAVD darstellt. Durch zusätzliche Untersuchungen könnten weitere Stellschrauben des Systems erforscht werden und möglicherweise in Zukunft für präventive oder therapeutische Ansätze verwendet werden.

5. Literaturverzeichnis

1. 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.
2. Hedger, M.P. and D.M. de Kretser, *The activins and their binding protein, follistatin-Diagnostic and therapeutic targets in inflammatory disease and fibrosis*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2013. **24**(3): p. 285-95.
3. Wijayarathna, R. and D.M. de Kretser, *Activins in reproductive biology and beyond*. *Hum Reprod Update*, 2016. **22**(3): p. 342-57.
4. Servier, L.L. *Smart Servier Medical Art*. 2020; Available from: <https://smart.servier.com>.
5. Dweck, M.R., N.A. Boon, and D.E. Newby, *Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium*. *J Am Coll Cardiol*, 2012. **60**(19): p. 1854-63.
6. Selig, J.I., *Die Rolle der extrazellulären Matrix in der degenerativen Aortenklappenerkrankung unter dem Einfluss von Diabetes*, in *Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät*. 2018, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
7. HGNC. *HGNC Guidelines*. 2020; Available from: <https://www.genenames.org/about/guidelines/>.
8. WHO. *Cardiovascular diseases (CVDs)*. 2017; Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
9. Benjamin, E.J., et al., *Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association*. *Circulation*, 2019. **139**(10): p. e56-e528.
10. Nkomo, V.T., et al., *Burden of valvular heart diseases: a population-based study*. *Lancet*, 2006. **368**(9540): p. 1005-11.
11. Beckmann, A., et al., *German Heart Surgery Report 2019: The Annual Updated Registry of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery*. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2020. **68**(4): p. 263-276.
12. Christian Mewis, R.R., Ioakim Spyridopoulos, *Kardiologie compact*. Vol. 1. 2004: Georg Thieme Verlag.
13. Maurer, G., *Aortic regurgitation*. *Heart*, 2006. **92**(7): p. 994-1000.
14. Maganti, K., et al., *Valvular heart disease: diagnosis and management*. *Mayo Clin Proc*, 2010. **85**(5): p. 483-500.

15. Wenn, P. and R. Zeltser, *Aortic Valve Disease*, in *StatPearls*. 2020: Treasure Island (FL).
16. 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.
17. Mathieu, P. and M.C. Boulanger, *Basic mechanisms of calcific aortic valve disease*. Can J Cardiol, 2014. **30**(9): p. 982-93.
18. 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.
19. Caira, F.C., et al., *Human degenerative valve disease is associated with up-regulation of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 receptor-mediated bone formation*. J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(8): p. 1707-12.
20. Kaden, J.J., et al., *Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification*. J Mol Cell Cardiol, 2004. **36**(1): p. 57-66.
21. Garg, V., et al., *Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease*. Nature, 2005. **437**(7056): p. 270-4.
22. Mohler, E.R., 3rd, et al., *Bone formation and inflammation in cardiac valves*. Circulation, 2001. **103**(11): p. 1522-8.
23. Sapra, A. and P. Bhandari, *Diabetes Mellitus*, in *StatPearls*. 2020: Treasure Island (FL).
24. Zheng, Y., S.H. Ley, and F.B. Hu, *Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications*. Nat Rev Endocrinol, 2018. **14**(2): p. 88-98.
25. Collaboration, N.C.D.R.F., *Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants*. Lancet, 2016. **387**(10026): p. 1377-1396.
26. Helmut Schatz, A.F.H.P., *Diabetologie kompakt*. Vol. 5. 2014: Springer Verlag.
27. Kamalesh, M., et al., *Does diabetes accelerate progression of calcific aortic stenosis?* Eur J Echocardiogr, 2009. **10**(6): p. 723-5.
28. Einarson, T.R., et al., *Prevalence of cardiovascular disease in type 2 diabetes: a systematic literature review of scientific evidence from across the world in 2007-2017*. Cardiovasc Diabetol, 2018. **17**(1): p. 83.
29. Yan, A.T., et al., *Association Between Cardiovascular Risk Factors and Aortic Stenosis: The CANHEART Aortic Stenosis Study*. J Am Coll Cardiol, 2017. **69**(12): p. 1523-1532.
30. Vale, W., et al., *Chemical and biological characterization of the inhibin family of protein hormones*. Recent Prog Horm Res, 1988. **44**: p. 1-34.

31. Mathews, L.S., *Activin receptors and cellular signaling by the receptor serine kinase family*. *Endocr Rev*, 1994. **15**(3): p. 310-25.
32. Mathews, L.S. and W.W. Vale, *Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase*. *Cell*, 1991. **65**(6): p. 973-82.
33. Tsuchida, K., et al., *Activin isoforms signal through type I receptor serine/threonine kinase ALK7*. *Mol Cell Endocrinol*, 2004. **220**(1-2): p. 59-65.
34. ten Dijke, P. and C.S. Hill, *New insights into TGF-beta-Smad signalling*. *Trends Biochem Sci*, 2004. **29**(5): p. 265-73.
35. Miyazawa, K., et al., *Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling*. *Genes Cells*, 2002. **7**(12): p. 1191-204.
36. Vale, W., et al., *Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid*. *Nature*, 1986. **321**(6072): p. 776-9.
37. Nusing, R.M. and J. Barsig, *Induction of prostanoid, nitric oxide, and cytokine formation in rat bone marrow derived macrophages by activin A*. *Br J Pharmacol*, 1999. **127**(4): p. 919-26.
38. Yamashita, N., et al., *Effects of activin A on IgE synthesis and cytokine production by human peripheral mononuclear cells*. *Clin Exp Immunol*, 1993. **94**(1): p. 214-9.
39. Yu, J. and K.E. Dolter, *Production of activin A and its roles in inflammation and hematopoiesis*. *Cytokines Cell Mol Ther*, 1997. **3**(3): p. 169-77.
40. Sugiyama, M., et al., *Expression of activin A is increased in cirrhotic and fibrotic rat livers*. *Gastroenterology*, 1998. **114**(3): p. 550-8.
41. Yamashita, S., et al., *Activin A is a potent activator of renal interstitial fibroblasts*. *J Am Soc Nephrol*, 2004. **15**(1): p. 91-101.
42. Ohga, E., et al., *Effects of activin A on proliferation and differentiation of human lung fibroblasts*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **228**(2): p. 391-6.
43. Molloy, C.J., D.S. Taylor, and J.E. Pawlowski, *Novel cardiovascular actions of the activins*. *J Endocrinol*, 1999. **161**(2): p. 179-85.
44. Bjornstad, J.L., et al., *Alterations in circulating activin A, GDF-15, TGF-beta3 and MMP-2, -3, and -9 during one year of left ventricular reverse remodelling in patients operated for severe aortic stenosis*. *Eur J Heart Fail*, 2008. **10**(12): p. 1201-7.
45. Yndestad, A., et al., *Elevated levels of activin A in heart failure: potential role in myocardial remodeling*. *Circulation*, 2004. **109**(11): p. 1379-85.
46. Kozaki, K., et al., *Role of activin-A and follistatin in foam cell formation of THP-1 macrophages*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(11): p. 2389-94.

47. Pawlowski, J.E., et al., *Stimulation of activin A expression in rat aortic smooth muscle cells by thrombin and angiotensin II correlates with neointimal formation in vivo*. J Clin Invest, 1997. **100**(3): p. 639-48.
48. Ueland, T., et al., *Activin A and cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus*. Diab Vasc Dis Res, 2012. **9**(3): p. 234-7.
49. Wu, H., et al., *Correlation between blood activin levels and clinical parameters of type 2 diabetes*. Exp Diabetes Res, 2012. **2012**: p. 410579.
50. Ouwens, D.M. and M. Diamant, *Myocardial insulin action and the contribution of insulin resistance to the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy*. Arch Physiol Biochem, 2007. **113**(2): p. 76-86.
51. Greulich, S., et al., *Secretory products of guinea pig epicardial fat induce insulin resistance and impair primary adult rat cardiomyocyte function*. J Cell Mol Med, 2011. **15**(11): p. 2399-410.
52. Atkins, S.K. and P. Sucusky, *Etiology of bicuspid aortic valve disease: Focus on hemodynamics*. World J Cardiol, 2014. **6**(12): p. 1227-33.
53. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on*. Nat Protoc, 2006. **1**(2): p. 581-5.
54. Ma Hongbao, J.Y., Chong Shen, *RNA, DNA and protein isolation using TRIzol reagent*. Nature and Science, 2008. **6**(3): p. 66-74.
55. Taylor, S.C. and E.M. Mrkusich, *The state of RT-quantitative PCR: firsthand observations of implementation of minimum information for the publication of quantitative real-time PCR experiments (MIQE)*. J Mol Microbiol Biotechnol, 2014. **24**(1): p. 46-52.
56. Schroeder, A., et al., *The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements*. BMC Mol Biol, 2006. **7**: p. 3.
57. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
58. Ghosh, S., et al., *Use of a scanning densitometer or an ELISA plate reader for measurement of nanogram amounts of protein in crude extracts from biological tissues*. Anal Biochem, 1988. **169**(2): p. 227-33.
59. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.

60. Fischer, A.H., et al., *Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections*. CSH Protoc, 2008. **2008**: p. pdb prot4986.
61. Susan N. Meloan, H.P., *Chemical Mechanisms of Staining Methods: Von Kossa's Technique: What von Kossa Really Wrote and a Modified Reaction for Selective Demonstration of Inorganic Phosphates*. Journal of Histotechnology, 1985. **8**(1).
62. Movat, H.Z., *Demonstration of all connective tissue elements in a single section; pentachrome stains*. AMA Arch Pathol, 1955. **60**(3): p. 289-95.
63. Russell, H.K., Jr., *A modification of Movat's pentachrome stain*. Arch Pathol, 1972. **94**(2): p. 187-91.
64. Small, A., et al., *Biomarkers of Calcific Aortic Valve Disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017. **37**(4): p. 623-632.
65. van Rijswijk, J.W., et al., *Pathology of aortic valve remodeling after continuous-flow left ventricular assist device support*. J Heart Lung Transplant, 2017. **36**(1): p. 113-116.
66. Zhang, Y., P.B. Alexander, and X.F. Wang, *TGF-beta Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017. **9**(4).
67. Jenke, A., et al., *Transforming growth factor-beta1 promotes fibrosis but attenuates calcification of valvular tissue applied as a three-dimensional calcific aortic valve disease model*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2020. **319**(5): p. H1123-H1141.
68. Arain, F., et al., *YKL-40 (Chitinase-3-Like Protein 1) Serum Levels in Aortic Stenosis*. Circ Heart Fail, 2020. **13**(10): p. e006643.
69. 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.
70. Chen, W.J., et al., *Activin A is associated with impaired myocardial glucose metabolism and left ventricular remodeling in patients with uncomplicated type 2 diabetes*. Cardiovasc Diabetol, 2013. **12**: p. 150.
71. Nagarajan, R.P., et al., *Regulation of Smad7 promoter by direct association with Smad3 and Smad4*. J Biol Chem, 1999. **274**(47): p. 33412-8.
72. Liu, A.C. and A.I. Gotlieb, *Transforming growth factor-beta regulates in vitro heart valve repair by activated valve interstitial cells*. Am J Pathol, 2008. **173**(5): p. 1275-85.
73. Schneyer, A., et al., *Differential binding and neutralization of activins A and B by follistatin and follistatin like-3 (FSTL-3/FSRP/FLRG)*. Endocrinology, 2003. **144**(5): p. 1671-4.

74. Vale, W., et al., *Activins and inhibins and their signaling*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1038**: p. 142-7.
75. Blumensatt, M., et al., *Activin A impairs insulin action in cardiomyocytes via up-regulation of miR-143*. Cardiovasc Res, 2013. **100**(2): p. 201-10.
76. Yan, X., Z. Liu, and Y. Chen, *Regulation of TGF-beta signaling by Smad7*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2009. **41**(4): p. 263-72.
77. Wellen, K.E. and G.S. Hotamisligil, *Inflammation, stress, and diabetes*. J Clin Invest, 2005. **115**(5): p. 1111-9.
78. Hutson, H.N., et al., *Calcific Aortic Valve Disease Is Associated with Layer-Specific Alterations in Collagen Architecture*. PLoS One, 2016. **11**(9): p. e0163858.
79. 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.
80. Hakuno, D., et al., *Molecular mechanisms underlying the onset of degenerative aortic valve disease*. J Mol Med (Berl), 2009. **87**(1): p. 17-24.
81. Tesfamariam, M.D., et al., *Elastin-Dependent Aortic Heart Valve Leaflet Curvature Changes During Cyclic Flexure*. Bioengineering (Basel), 2019. **6**(2).
82. Perrotta, I., et al., *New evidence for a critical role of elastin in calcification of native heart valves: immunohistochemical and ultrastructural study with literature review*. Histopathology, 2011. **59**(3): p. 504-13.
83. Selig, J.I., et al., *Impact of hyperinsulinemia and hyperglycemia on valvular interstitial cells - A link between aortic heart valve degeneration and type 2 diabetes*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019. **1865**(9): p. 2526-2537.
84. Kaltoft, M., A. Langsted, and B.G. Nordestgaard, *Obesity as a Causal Risk Factor for Aortic Valve Stenosis*. J Am Coll Cardiol, 2020. **75**(2): p. 163-176.
85. Teo, K.K., et al., *Lipid lowering on progression of mild to moderate aortic stenosis: meta-analysis of the randomized placebo-controlled clinical trials on 2344 patients*. Can J Cardiol, 2011. **27**(6): p. 800-8.
86. Boot, R.G., et al., *Strong induction of members of the chitinase family of proteins in atherosclerosis: chitotriosidase and human cartilage gp-39 expressed in lesion macrophages*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(3): p. 687-94.
87. Ratheke, C.N. and H. Vestergaard, *YKL-40--an emerging biomarker in cardiovascular disease and diabetes*. Cardiovasc Diabetol, 2009. **8**: p. 61.

88. Julia Kistner, S.R., Mareike Barth, Payam Akhyari, Artur Lichtenberg, *The novel adipokine chitinase-3-like-protein 1 (CHI3L1) is up-regulated in fibrotic and calcified aortic valves of type 2 diabetic patients.* 2016.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Dreischichtiger Aufbau der AK.....	3
Abbildung 2: Pathophysiologie der degenerativen Aortenklappenerkrankung.....	3
Abbildung 3: Activin A-Rezeptoren und deren intrazelluläre Signaltransduktion.....	6
Abbildung 4: Degenerationsgrade einer humanen AK-Tasche	10
Abbildung 5: mRNA-Expression der INHBA-Signalkaskade in humanen fibrotischen und kalzifizierten Anteilen einer AK-Tasche	27
Abbildung 6: mRNA-Expression der intrazellulären Signalmoleküle in humanen fibrotischen und kalzifizierten Anteilen einer AK-Tasche	28
Abbildung 7: mRNA-Expression von Umbau und Degenerationsmarkern in humanen fibrotischen und kalzifizierten Anteilen einer AK-Tasche	29
Abbildung 8: mRNA-Expression von INHBA und seinen Rezeptoren in Klappengewebe von non-T2D und T2D.....	31
Abbildung 9: mRNA-Expression intrazellulärer Signalmoleküle in Klappengewebe von non-T2D und T2D	32
Abbildung 10: mRNA-Expression von Umbau- und Degenerationsmarkern in Klappengewebe von non-T2D und T2D.....	33
Abbildung 11: Absolute Proteinkonzentration in humanen fibrotischen und kalzifizierten AK-Anteilen.....	35
Abbildung 12: Relative INHBA-Konzentration in AK-Anteilen bei non-T2D und T2D	36
Abbildung 13: Histologische Färbungen fibrotischer und kalzifizierter AK-Taschenanteile bei non-T2D und T2D.....	37
Abbildung 14: Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen, Von-Willebrand-Faktor und Elastin in fibrotischen und kalzifizierten AK-Taschenanteilen bei non-T2D und T2D	39
Abbildung 15: Positivkontrollen immunhistochemischer Färbungen	40

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primersequenzen.....	12
Tabelle 2: Patientenkohorten zur Genexpressionsanalyse, Proteinkonzentrationsbestimmung und histologischen Aufarbeitung humaner AK-Taschenproben.....	25

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari für das Überlassen des Promotionsthemas und die Aufnahme in das Team der experimentellen Chirurgie der Klinik für Herzchirurgie danken. Dabei möchte ich mich vor allem für seine stetige Hilfsbereitschaft und Förderung, die weit über die Promotion hinaus gingen und gehen ganz besonderes bedanken. Er hat mich in den letzten vier Jahren nicht nur wissenschaftlich und klinisch, sondern auch persönlich weitergebildet, wofür ich überaus dankbar bin.

Ebenso danke ich Frau Prof. Dr. rer. nat. Margriet Ouwens für die Co-Betreuung, den einfachen Austausch mit dem Deutschen Diabetes-Zentrum, sowie wichtige Beiträge und Fragestellungen, die maßgeblich zum Entstehen der Dissertation beigetragen haben.

Meiner wissenschaftlichen Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Mareike Barth bin ich auch zu größtem Dank verpflichtet. Mit einfach formulierten Erklärungen, neuen Denkansätze und Hilfestellungen bei Laborarbeiten, Auswertungen und dem schlussendlichen Verfassen der Dissertation bin ich der Abgabe der Dissertation Schritt für Schritt nähergekommen. Vor allem möchte ich mich aber für die Atmosphäre im Labor, dein immer offenes Ohr und das freundschaftliche Verhältnis bedanken, die Basis sowohl für Entstehung als auch Vollendung der Arbeit.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg möchte ich ebenfalls danken, dass ich die Arbeiten im Labor der experimentellen Chirurgie durchführen durfte. Schlussendlich hat mich dies auch zur ärztlichen Weiterbildung in der Klinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf geführt.

Dem gesamten Team der experimentellen Chirurgie möchte ich für die tatkräftige Unterstützung, die lustige und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die unterhaltsamen Weihnachtsfeiern, Sommerfeste und Tagungen in Leipzig und Wiesbaden danken. Namentlich sollen an dieser Stelle Frau Dr. rer. nat. Jessica Selig, Vera Schmidt und Gisela Müller Erwähnung finden, die mir die Methodiken mit wertvollsten Tipps und Tricks nähergebracht haben.

Abschließend will ich den Menschen danken, die das große Rückgrat hinter Studium – mittlerweile Beruf – und Forschung bilden: allen voran meiner Freundin Linda, ebenso meiner Familie und meinen Freunden. Danke für eure Motivation und gleichzeitig Geduld, wenn man während der Semesterferien und am Wochenende doch nochmal ins Labor oder an den Computer musste. Ohne eure Hilfe, Unterstützung und Liebe hätte ich die Promotion nicht bis zu diesem letzten Satz gebracht.

Danke