Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Klinikdirektor: Prof. Dr. med. Malte Kelm

Sphingosin-1-phosphat im Kontext der Progression der Aortenklappenstenose

Dissertation

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

vorgelegt von

Paulina Emma Kahmann

2026

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

gez.:
Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker
Erstgutachter: Prof. Dr. med. Amin Polzin
Zweitgutachter: PD Dr. med. Christian Buchbender

- Für meine Eltern und Johannes -

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht: Benkhoff M, Barcik M, Mourikis P, Dahlmanns J, **Kahmann P**, Wollnitzke P, Hering M, Huckenbeck T, Hoppe J, Semleit N, Deister-Jonas J, Zako S, Seel J, Coman C, Barth M, Cramer M, Helten C, Wildeis L, Hu H, Al-Kassis G, Metzen D, Hesse J, Weber J, Dannenberg L, Akhyari P, Lichtenberg A, Quast C, Gerdes N, Zeus T, Borst O, Kelm M, Petzold T, Ahrends R, Levkau B, Polzin A. **Targeting Sphingosine-1-Phosphate Signaling to Prevent the Progression of Aortic Valve Disease**. *Circulation.* 2025 Jan 28;151(4):333-347.

Zusammenfassung

Die Aortenklappenstenose (AS) ist der weitverbreitetste erworbene Herzklappenfehler in der westlichen Welt. Im Vordergrund der Pathogenese stehen Verkalkungsprozesse, die initial der Atherosklerose-Entstehung gleichzusetzen sind. Die Verengung auf Klappenebene hat hämodynamische Auswirkungen, beispielsweise eine erhöhte Flussgeschwindigkeit. Die Mehrbeanspruchung kann wiederum andere kardiale Komorbiditäten, wie eine schwere Herzinsuffizienz, begünstigen. Sphingosin-1-phosphat (S1P) ist ein amphiphiles Lipid, das neben inflammatorisch-regulatorischer Aktivität auch kalzifizierende Prozesse fördert. Es sind S1P-Modulatoren in Deutschland zugelassen, jedoch werden sie derzeit ausschließlich in der Therapie der Multiplen Sklerose verwendet. Der Einfluss von S1P auf die AS ist jedoch unbekannt.

In dieser Arbeit wird hypothetisiert, dass die hochregulierte S1P-Sekretion auf Klappenebene einen Progress der Klappenkalzifizierung bedeutet.

In drei grundlagenwissenschaftlichen Versuchsteilen konnte unter Verwendung muriner oder humaner Aortenklappen sowie valvulärer interstitieller Zellen (VICs) eine sich gegenseitig verstärkende Rückkopplung zwischen dem Progress der AS sowie der S1P-Produktion erarbeitet werden. Neben vielen hämodynamisch relevanten Faktoren wirken bei der AS signifikant erhöhte Scherkräfte auf die Klappenzellen. Es folgten in vitro Analysen von VICs, die für insgesamt 24 Stunden mit einer Frequenz von einer Schwingung pro Sekunde gedehnt und damit den Bedingungen, die auf kardialer Ebene vorzufinden sind, ausgesetzt wurden. Die Auswertung der entsprechenden Polymerasekettenreaktion (PCR) zeigte, dass jene Scherkräfte eine Hochregulation der S1P-bildenden Sphingosin-Kinase 1 bedeuten. Neben der enzymatischen Aktivität konnten ebenfalls lokal erhöhte S1P-Spiegel mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie nachgewiesen werden, während der S1P-Spiegel im Plasma unverändert blieb. Die gesteigerte S1P-Bildung korreliert mit dem weiteren Progress der AS. Eine differenzierte Modulation bis Hemmung der S1P-Kaskade sollte in der Therapie der AS nach Nutzen-Risiko-Abwägung berücksichtigt werden, um einem weiteren Progress entgegenzuwirken.

Summary

Aortic valve stenosis is the most common heart valve disease in the western world. The calcification process, which can be compared to pathogenesis of atherosclerosis, is paramount to the progression of aortic valve stenosis. The narrowing at the aortic valve has hemodynamic effects, such as increased flow velocity. The additional strain can lead to other cardiac comorbidities such as severe heart failure. Sphingosine-1-phosphate (S1P) is known as an amphiphilic lipid that promotes inflammatory regulatory as well as calcification processes. S1P modulators are legal pharmaceuticals in Germany but are currently used exclusively in the treatment of multiple sclerosis. The influence of S1P on AS is unknown.

This thesis hypothesizes that the upregulation of S1P secretion leads to progression of valve calcification.

In three basic research experiments which involved the use of murine or human aortic valves and valvular interstitial cells (VIC), a vicious circle between the pathogenesis of aortic valve stenosis and S1P production was identified. In addition to many hemodynamically relevant factors, aortic valve stenosis leads to a significant increase in wall shear stress on valvular cells. This finding was followed by in vitro analyses of VICs, which were stretched for a total of 24 hours at a frequency of one oscillation per second and thus exposed to conditions which can be compared to the human heart. Analysis of the corresponding polymerase chain reaction (PCR) showed that increased wall shear stress leads to upregulation of S1P-forming sphingosine kinase. In addition to enzymatic activity, locally elevated S1P levels were also detected by high-performance liquid chromatography, while the systemic S1P level in plasma remained unchanged. The increased S1P formation correlates with further progression of aortic valve stenosis. A particular modulation or inhibition of the S1P cascade should be discussed in the treatment of aortic valve stenosis after considering the benefits and risks to prevent additional calcification in aortic valve stenosis.

Abkürzungsverzeichnis

Δp_{mean} ..... Mittlerer Druckgradient

4D ..... Vierdimensional

ANOVA ..... *Analysis of Variance*

AP ..... Alkalische Phosphatase

AS ..... Aortenklappenstenose

ATP ..... Adenosintriphosphat

AV-Block ..... Atrioventrikulärer Block

BMI ..... *Body-Mass-Index*

BMP-2 .. *Bone morphogenic protein 2*

C57BL/6J ..... C57 *black* 6

CT ..... Computertomographie

DNS ..... Desoxyribonukleinsäure

DOP 4-Deoxypyridoxin

EF ..... Ejektionsfraktion

EKG ..... Elektrokardiogramm

E-Selektin ..... Endothel-Selektin

FTY720 ..... Fingolimod

GPCR ..... G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

GTP ..... Guanosintriphosphat

HDL ..... *High Density Lipoprotein*

HPLC ..... Hochleistungsflüssigkeits chromatographie

ICAM-1 ..... *Intercellular adhesion molecule 1*

IL-1 ..... Interleukin 1

IL-6 ..... Interleukin 6

KHK ..... Koronare Herzerkrankung

KÖF ..... Klappenöffnungsfläche

LC-MS ..... *Liquid*-Chromatographie-Massenspektometrie

LFLG ..... *Low-flow-low-gradient*

Lp(a) ……..……...Lipoprotein(a)

LVEDV ..... Linksventrikuläres end-diastolisches Volumen

LVID ..... Linksventrikulärer Innen-durchmesser

LV-Masse .... Linksventrikuläre Masse

LVOT ..... *Left ventricular outflow tract*

MMP ..... Matrix-Metalloproteinasen

MR ..... Magnetresonanz

MRT .... Magnetresonanztomographie

MS ..... Multiple Sklerose

NOTCH1 ..... *Neurogenic locus notch homolog protein 1*

NYHA-*Score* ..... Einteilung der Herz-insuffizienz nach der New York Heart Association

PBS ..... *Phosphate buffered saline*

PCR ..... Polymerasekettenreaktion

PKC ..... Proteinkinase C

RNS ..... Ribonukleinsäure

S1P Sphingosin-1-phosphat

S1PR Sphingosin-1-phosphat-Rezeptor

SAVR ..... *Surgical aortic valve replacement*

SD .....Standard deviation

SEM ..... Standard error of the mean

SphK .....Sphingosin-Kinase

SPNS2 .... Sphingolipid Transporter 2

STS-PROM/EuroSCORE ...*Society of Thoracic Surgeons Risk Score and European System for Cardiac Operative Risk Evaluation*

SV .....Schlagvolumen

TAVI .....*Transcatheter aortic valve implantation*

TNF-alpha Tumornekorsefaktor-alpha

UHPLC ..... *Ultra-High-Performance Liquid Chromatography*

VECs .....*Valvular endothelial cells*

VICs .....*Valvular interstitial cells*

V_{max} ..Maximale Flussgeschwindigkeit

WSS .....*Wall shear stress*

VTI ..... *Velocity-Time-Integral*

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 Aortenklappenstenose 1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie 1
1.1.2 Zelluläre Pathophysiologie 2
1.1.3 Morphologische und hämodynamische Pathophysiologie 4
1.2 Diagnostik und Klassifikation der Aortenklappenstenose 5
1.3 Therapieoptionen der Aortenklappenstenose 6
1.3.1 Pharmakotherapie 6
1.3.2 Interventionelle oder kardiochirurgische Therapie 8
1.4 Sphingosin-1-phosphat 9
1.4.1 Transportmechanismen 9
1.4.2 S1P-Rezeptoren und Signalwege 10
1.4.3 Beeinflussung kardiovaskulärer Prozesse 11
1.4.4 S1P-bezogene Medikation 12
1.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit 14
1.6 Ethikvoten 14
2 Material und Methoden 15
2.1 Studiendesign 15
2.2 Patientenkollektiv 17
2.2.1 Auswertung kardialer Magnetresonanztomographien 17
2.2.2 Bezug von Gewebe aus menschlichen Aortenklappen 18
2.2.3 S1P-Messung im Plasma 20
2.3 Versuchstiere 21
2.4 Material 22
2.4.1 Substanzen 22
2.4.2 Utensilien 24
2.4.3 Gerätschaften 25
2.4.4 Software 26
2.4.5 Lösungen und Puffer 27
2.5 Methoden 28
2.5.1 Humane Magnetresonanztomografie 28
2.5.2 S1P-Messung 29
2.5.3 *Real-Time* PCR 31

2.5.4 Zellkultur und Alizarinrot-Färbung 32
2.5.5 Dehnung von VICs 33
2.5.6 Induktion der murinen Aortenklappenstenose 33
2.5.7 Murine Echokardiografie 34
2.5.8 Histologische Färbung und Auswertung 35
2.5.9 Statistische Analysen 36
3 Ergebnisse 37
3.1 Die Scherkräfte sowie maximale Flussgeschwindigkeit nehmen bei Aortenklappenstenose zu 37
3.2 In kalzifizierten Klappen besteht eine erhöhte S1P-Konzentration 39
3.3 Die Klappenstenosierung führt zu einer Hochregulation der S1P-bildenden SphK1 40
3.4 Die systemische S1P-Freisetzung ist bei Aortenklappenstenosierung unverändert 41
3.5 Die Dehnung von VICs führt zu einer vermehrten SphK1-Genexpression sowie lokalen S1P-Konzentrationen 42
3.6 Erhöhte S1P-Spiegel führen im Mausmodell zu einer verstärkten Progression der AS 44
4 Diskussion 49
4.1 Ausblick 53
4.2 Limitationen 55
4.3 Schlussfolgerung 55
5 Literatur- und Quellenverzeichnis 56

1 Einleitung

1.1 Aortenklappenstenose

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Die Aortenklappenstenose (AS) ist der weitverbreitetste erworbene Herzklappenfehler in der westlichen Welt (1). Laut Statistischem Bundesamt ist sie einer der zehn vorherrschenden Gründe für einen Herz-Kreislauf-bedingten Todesfall (2). In Europa und Nordamerika gilt die AS als der häufigste zur interventionellen oder kardiochirurgischen Behandlung führende Herzklappenfehler (3). Die häufigste Form, die degenerative kalzifizierende AS, tritt vor allem bei Personen über 65 Jahren auf und betrifft etwa 1-2 % dieser Altersgruppe. Somit rückt die Erkrankung vor allem wegen der alternden Gesellschaft in den Vordergrund. Es wird davon ausgegangen, dass sich die Prävalenz bis 2050 verdoppeln wird (4). In diesem Sinne sieht man aktuell einen linearen Anstieg der Prävalenz der AS (5). Sie liegt bei den 60- bis 69-Jährigen bei ca. 1,3 %, während sie sich in der 8. Lebensdekade auf 3,9 % und in der 9. Lebensdekade auf 9,8 % erhöht (3). In der Allgemeinbevölkerung liegt die Neuerkrankungsrate derzeit bei etwa 4,9 pro 1.000 Personen pro Jahr (5). Bei einer Bevölkerung von 83,5 Millionen Menschen in Deutschland (Stand 2024) (6) bedeutet dies allein auf nationaler Ebene eine jährliche Inzidenz von 400.000. Vor diesem Hintergrund wird die Relevanz der AS deutlich.

Die Ätiologie der AS ist dreigeteilt. Führend gelten degenerative Ursachen, die pathophysiologisch inflammatorischen Prozessen der Atherosklerose ähneln (7). Zunächst sklerosieren die Klappentaschen von der Basis zum freien Rand, worauf eine durch turbulenten Blutstrom verstärkte Degeneration und Kalzifizierung und letztendlich die Stenose der Klappe folgt (4). Auf Grund der Ähnlichkeit zu atherosklerotischen Prozessen ist es naheliegend, dass zu den bekannten Risikofaktoren Nikotinabusus, Übergewicht, Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, erhöhte Lipoprotein(a) (Lp(a))-Werte und chronische Niereninsuffizienz zählen (5).

An ätiologisch zweiter Stelle stehen bikuspid angelegte Klappen, die vor allem bei jüngeren Patient*innen von Bedeutung sind (6). In jenen Fällen bestehen die Aortenklappen nicht aus drei, sondern nur aus zwei, meist größenunterschiedlichen Taschenklappen (7). Diese verursachen eine höhere

Beanspruchung des Gewebes sowie abnormale Strömungsmuster (8). Die veränderte Scherbeanspruchung initiiert schlussendlich Sklerosierung und somit degenerative Veränderungen auf Klappenebene (9). Verglichen mit anderen Ursachen vollzieht sich der Stenosierungsprozess signifikant schneller (10).
An dritter Stelle steht, als eine in den westlichen Ländern immer seltener werdende Form, die rheumatische AS (11). Diese resultiert aus einer abnormalen Immunreaktion auf eine Infektion mit dem Erreger *Streptococcus pyogenes*, welcher zu den Streptokokken der Gruppe A gezählt wird (12). In Folge des rheumatischen Fiebers verwachsen die Kommissuren und vernarben, bis sie schließlich verkalken (13).

1.1.2 Zelluläre Pathophysiologie

Nach aktuellem Forschungsstand ist es bekannt, dass neben einer chronisch degenerativen Komponente zusätzlich entzündliche Prozesse das Voranschreiten der AS begünstigen (14). Beim gesunden Erwachsenen ist das Interstitium der Aortenklappen in drei Bereiche unterteilt: der *Lamina fibrosa*, der *Lamina spongiosa* und der *Lamina ventricularis* (15). Vorwiegend sind hier valvuläre interstitielle Herzklappenzellen (*valvular interstitial cells*, VICs) vertreten (16). Als Klappenstruktur erhaltende Zellen spielen sie eine tragende Rolle im Voranschreiten der AS (17). Zusätzlich sind je nach Schicht und entsprechender Funktion Kollagen Typ 1, Elastin oder Glykosaminoglykane vorzufinden (18). Die Klappen sind beidseits von Endothel bestehend aus valvulären endothelialen Zellen (*valvular endothelial cells*, VECs) überzogen (15). Diese komplex miteinander vernetzten Schichten dienen der mechanischen Beanspruchung während des Herzzyklus (19). Im Normalzustand beträgt die Klappenöffnungsfläche (KÖF) ca. 3-4 cm^2 (20).
Die Lamina fibrosa gilt als anfälligste Schicht für Fibrokalzifizierung (21). Wie in Abbildung 1 dargestellt, kommt es analog zur Atherosklerose vor allem in diesem Bereich bei initialer Endothelschädigung durch hämodynamische Belastung zur Einwanderung von Lipoproteinen wie Lp(a) oder *Low-Density* Lipoprotein-Cholesterin (22). Diese werden im Anschluss von reaktiven Sauerstoffspezies oxidiert, wodurch vermehrt Monozyten in Richtung Klappengewebe freigesetzt werden (15). Eingewanderte Monozyten differenzieren sich zu Makrophagen,

welche die oxidierten Lipoproteine aufnehmen, und Schaumzellen bilden. Es bildet sich ein Kreislauf, in dem die angestiegene Expression der Zelladhäsionsmoleküle Endothel-Selektin (E-Selektin) und *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) die weitere Migration von Entzündungszellen stimuliert (23,24).

Die von Makrophagen freigesetzten proinflammatorischen Zytokine wie Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α), Interleukin 1 (IL-1) und Interleukin 6 (IL-6) induzieren die Aktivierung von VICs, Fibrosierung der extrazellulären Matrix sowie Einwanderung von T-Zellen (25). Die Differenzierung der aktivierten VICS zu myofibroblastischen und osteoblastenähnlichen Zellen wird durch Signalwege wie *Neurogenic locus notch homolog protein 1 (NOTCH1),* alkalische Phosphatase (AP) und knochenmorphogenetisches Protein 2 (bone morphogenic protein 2, BMP-2) stimuliert (16). Folglich werden Matrix-Metalloproteinasen (MMP) ausgeschüttet, wodurch knochenähnliche Matrixproteine produziert werden (26). Es entstehen Mikroverkalkungen als kleine, fokale Ablagerungen von Kalziumphosphat.

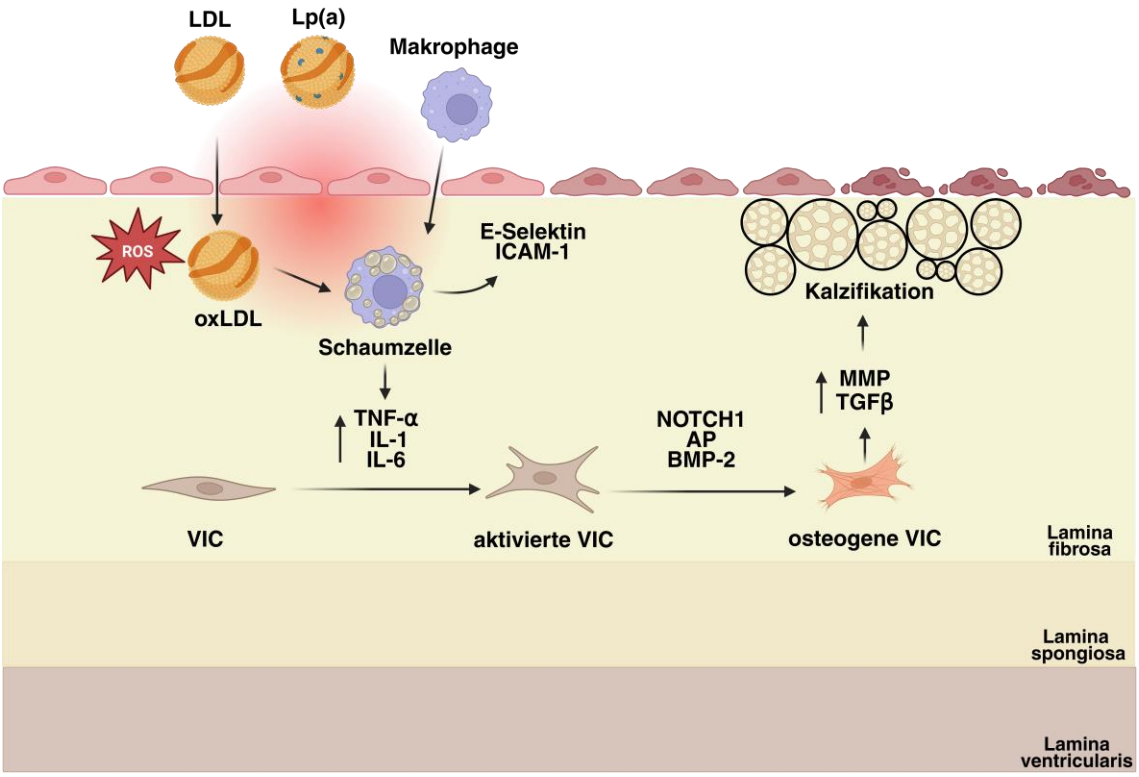


Abb. 1: Zelluläre Pathophysiologie der AS. LDL = *Light Density* Lipoprotein, Lp(a) = Lipoprotein(a), oxLDL = oxidiertes LDL, ROS = reaktive Sauerstoffspezies, E-Selektin = Endothel-Selektin, ICAM-1 = *intercellular adhesion molecule* 1, VIC = Valvuläre interstitielle Zelle, TNF-α = Tumornekrosefaktor Alpha, IL-1 = Interleukin 1, IL-6 = Interleukin 6, NOTCH1 = *Neurogenic locus notch homolog protein* 1, AP = Alkalische Phosphatase, BMP-2 = *bone morphogenic protein* 2, MMP = Matrix-Metalloproteinasen, TGFβ = *Transforming growth factor* Beta. Erstellt mit BioRender.com.

1.1.3 Morphologische und hämodynamische Pathophysiologie

Da pathologische Prozesse im Voranschreiten der AS zu Beginn auf zellulärer Ebene stattfinden, treten Symptome meist erst nach Beeinflussung der Morphologie von Klappengewebe und Myokard sowie der Hämodynamik auf. In der subklinischen Phase kommt es zu einer Klappenverdickung, die vorerst keinen Einfluss auf den Blutfluss hat (27). Zwischen der subklinischen Sklerosierung und symptomatischen mittel- bis hochgradigen Stenose liegen durchschnittlich sechs bis acht Jahre (28). Nach Erstdiagnose wird bei ca. 50 % der asymptomatischen Patient*innen innerhalb von fünf Jahren die Indikation für einen Aortenklappenersatz gestellt (29). Die Stenose fällt durch reduzierte hämodynamische Stabilität sowie verminderte Klappenbeweglichkeit auf (30). Folglich kommt es zu einer Fehlbelastung des Herz-Kreislauf-Systems. Im Sinne des Frank-Starling-

Mechanismus sorgt die Stenose für eine vermehrte Nachlast, wodurch der Ventrikel einen höheren Druck aufbauen muss, um die gleiche Menge an Volumen auszuwerfen (31). Daraus resultiert als Kompensationsmechanismus eine konzentrische Hypertrophie der linken Herzkammer, welche wiederum zu einer diastolischen Dysfunktion führen kann (32). Wenn jene Adaptationsprozesse erschöpft sind, resultiert dies in einer dekompensierten Herzinsuffizienz (33).

1.2 Diagnostik und Klassifikation der Aortenklappenstenose

Neben der Anamnese und Erhebung der patientenindividuellen Symptome, beginnt die Diagnose der AS mit der körperlichen Untersuchung. Auskultatorisch zeigt sich die AS mit einem *Crescendo-Decrescendo*-Systolikum mit maximaler Ausprägung rechtsseitig parasternal im zweiten Interkostalraum (34). Zusätzlich ist eine Fortleitung in beide Karotiden möglich (35). Weitere diagnostische Hinweise können ein leiser zweiter Herzton sowie ein abgeschwächter, verzögerter Puls ("*Pulsus parvus et tardus"*) sein (36). Im weiteren Verlauf können Symptome der Herzinsuffizienz, beispielsweise periphere Ödeme oder juguläre Einflussstauung, in der körperlichen Untersuchung auffallen (34).

In der weiteren Diagnostik liegt der Goldstandard bei der transthorakalen Echokardiografie (37), da sie die Beurteilung von Schweregrad, Kalzifizierungszustand, Ejektionsfraktion (EF) sowie Wanddicke ermöglicht (34). Wie der nachfolgenden Tabelle 1 entnehmen zu ist, wird die AS in vier Grade eingeteilt, wobei ersterer vielmehr als Sklerose und weniger als Stenose gewertet werden kann (38).

Echokard. Parameter	Flussgeschwin-digkeit [m/sec]	Druckgradient [mmHg]	KÖF [cm^2]	KÖF-Index [cm^2/m^2]
Sklerose	< 2,5	normal	normal	normal
Leichtgradige AS (I)	2,5 - 3	< 20	≥ 1,5	> 0,85
Mittelgradige AS (II)	3 - 4	20 - 40	1 - 1,5	0,6 - 0,85
Hochgradige AS (III)	> 4	> 40	< 1	< 0,6

Tabelle 1: Klassifikation der AS. Entscheidende Parameter sind die Flussgeschwindigkeit, der mittlere Druckgradient, die KÖF sowie der KÖF-Index (38).

Von den erhobenen Parametern ist die maximale Flussgeschwindigkeit am besten reproduzierbar und somit ein entscheidender Prädiktor (39). Ergänzend können hierzu Belastungstests, koronare Computertomografie (CT) oder kardiale Magnetresonanztomografie (MRT) zum Einsatz kommen (34).
Neben der in Tabelle 1 aufgeführten Einteilung wird eine weitere Form der Stenose klassifiziert. Bei der *Low-flow-low-gradient* (LFLG)-AS besteht trotz KÖF von < 1 cm eine maximale Flussgeschwindigkeit von < 4 m/s sowie ein mittlerer Druckgradient von < 40 mmHg. Grund dafür ist ein vermindertes Schlagvolumen (SV), wodurch der hieraus resultierende geringere Druck zu einer unzureichenden Klappenöffnung führt (40). Es wird zwischen der klassischen und paradoxen LFLG-AS unterschieden. Erstere geht mit einer verminderten EF (< 50 %) einher, Zweiters zeigt lediglich ein reduziertes SV. Die Unterscheidung erfolgt laut aktueller Leitlinie anhand der Dobutamin-Stress-Echokardiographie und des Computertomographie-Kalkscores (38).

1.3 Therapieoptionen der Aortenklappenstenose

1.3.1 Pharmakotherapie

Derzeit ist keine medikamentöse Therapie zugelassen, die einen Einfluss auf das Fortschreiten der AS hat. Der Einsatz Lipidstoffwechsel-beeinflussender Medikamente, die unter anderem in der Therapie der Atherosklerose verwendet

werden, zeigte bisher keinen signifikanten Einfluss in Richtung einer verlangsamten AS-Pathogenese oder einer Beeinflussung der Notwendigkeit eines Klappenersatzes (37). Eine Cochrane Analyse von vier randomisierten kontrollierten Studien mit über 2000 Proband*innen ergab, dass Statine keinen entscheidenden Unterschied in der hämodynamischen Belastung noch in der Rate an interventionellen Behandlungen brachten (41). Es wird vermutet, dass die mangelnde Wirksamkeit auf Grund der fehlenden Beeinflussung des Lp(a)-Stoffwechsels bestehe (42). Laut *American College of Cardiology* und *American Heart Association* könne lediglich der Einsatz zur Reduktion ischämischer Ereignisse bei begleitender koronarer Herzkrankheit (KHK) diskutiert werden (29). Ein möglicher Nutzen in sehr frühen Stadien entsprechend einer Aortensklerose oder milden Stenose wird in retrospektiven Analysen diskutiert, ist aber nicht durch prospektive Studien belegt und hat keinen Eingang in die Leitlinien gefunden.
Je nach resultierender Folgesymptomatik der AS ist eine Pharmakotherapie von Herzinsuffizienz oder arterieller Hypertonie empfohlen (38). Zu den prognoseverbessernden Medikamenten, die hier zum Einsatz kommen, zählen:

- *Angiotensin Converting Enzyme*-Hemmer oder Angiotensin-Rezeptor-Neprilysin-Inhibitoren
- Betablocker
- *Sodium dependent glucose co-transporter 2*-Inhibitoren
- Mineralokortikoidrezeptorantagonisten

Des Weiteren können vier ergänzende Pharmakotherapeutika verwendet werden, die nach Erhebung des klinischen Zustandes und der entsprechenden Einteilung nach der *New York Heart Association* (NYHA-Score) hinzugezogen werden können (43):

- Diuretika bei Volumenbelastung
- Ivabradin bei NYHA ≥ II und Herzfrequenz ≥ 75 min^{-1}
- Vericiguat nach Dekompensation mit intravenöser Therapie
- Digitoxin/Digoxin bei NYHA ≥ III

Zudem wird bei begleitender Hypertonie ein Zielblutdruck von < 130/80 mmHg empfohlen, um kardiovaskuläre Ereignisse zu vermeiden (44).

1.3.2 Interventionelle oder kardiochirurgische Therapie

Nach aktueller Leitlinie (38) gibt es mehrere Voraussetzungen, die eine invasive Behandlung der AS bedingen. Bei symptomatischen Patient*innen gelten folgende Indikationen:

- *High-Gradient*-AS oder
- Klassische *LFLG*-AS oder
- EF > 50 % und nachgewiesene hochgradige Stenose oder
- EF < 50 % mit kontraktiler Reserve oder
- EF < 50 % ohne kontraktile Reserve mit positivem CT-Calcium-*Scoring*

Bei asymptomatischen Patient*innen dienen folgende Bedingungen zur Orientierung:

- Hochgradige AS und EF < 50 %
- Hochgradige AS und nachweisbare Symptome im Belastungstest

Als invasive Therapiemaßnahmen kommen vor allem zwei Verfahren zum Einsatz. Die eine Variante ist die *transcatheter aortic valve implantation* (TAVI), bei der ein Katheter meist über einen transfemoralen Zugang bis zur Aortenklappe vorgeschoben wird. An diesem Punkt wird eine bioprothetische Klappe positioniert, die die erkrankte, native Klappe verdrängt und so ihre Funktion übernimmt (45). Da sie mit einer geringen Rate an prozeduralen Komplikationen einhergeht und eine schnellere Genesung zu erwarten ist (46), findet die TAVI vor allem bei älteren Patient*innen (> 75 Jahre) mit hohem intraoperativem Risiko entsprechend *Society of Thoracic Surgeons (STS) Risk Score* und *European System for Cardiac Operative Risk Evaluation* (STS-PROM/EuroSCORE IId > 8 %) Verwendung (47,48).

Die zweite invasive Behandlungsmöglichkeit ist der operative Ersatz der Aortenklappe (*surgical aortic valve replacement,* SAVR). Hierbei wird unter Vollnarkose der Brustkorb eröffnet, sodass nach Anlage einer Herz-Lungen-Maschine die kalzifizierte Aortenklappe durch eine mechanische oder biologische Prothese ersetzt werden kann (49). Für eine mechanischen Ersatz kommen jüngere Patient*innen (< 60 Jahre) in Frage, bei denen man wegen der langen Haltbarkeit keine erneute Operation anstrebt (50), dafür jedoch eine lebenslange Antikoagu-

lation mit Vitamin-K-Antagonisten und regelmäßigen laborchemischen Gerinnungskontrollen in Kauf nimmt (29). Die biologische Prothese kommt vor allem bei älteren Patient*innen (> 65 Jahre) zum Einsatz, bei denen eine dauerhafte Antikoagulation wegen der erhöhten Blutungsgefahr nicht in Frage kommt (37). Die Haltbarkeit der Klappe ist abhängig vom Voranschreiten der Klappendegeneration. Mit zunehmendem Alter nimmt die Wahrscheinlichkeit von relevanten Klappenveränderungen ab. Dies bedeutet, dass die Haltbarkeit des Klappenersatzes die erwartete Lebensdauer überschreitet (29,51). Im Vergleich zur TAVI findet die SAVR vor allem bei jüngeren Patient*innen (< 75 Jahre) Verwendung, die ein geringeres intraoperativem Risiko (STS-PROM/EuroSCORE II < 4 %) aufweisen oder für eine TAVI nicht geeignet sind (38).

1.4 Sphingosin-1-phosphat

Sphingosin-1-phosphat (S1P) gehört zur Gruppe der Sphingolipide, die als bioaktive Moleküle eine zunehmend erforschte Rolle bei Transportprozessen sowie inflammatorischer Aktivität spielen (52). Es wirkt an spezifischen G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR), den sogenannten Sphingosin-1-phosphat-Rezeptoren (S1PR).

1.4.1 Transportmechanismen

S1P wird mit Hilfe der Sphingosinkinasen (SphK) gebildet (53). Die SphK-Isoformen werden durch unterschiedlichste Mediatoren wie Immunglobuline oder Zytokine aktiviert (54). Nach der S1P-Synthese kann jenes wegen seiner amphiphilen Eigenschaften nicht frei durch die Zellmembran diffundieren. Es sind mehrere spezifische Transporter bekannt, die an der Freisetzung von S1P aus der Zelle beteiligt sind. Dazu gehören zum einen die beiden nicht-Adenosintriphosphat (ATP)-abhängigen Transporter *Sphingolipid Transporter 2* (SPNS2) und *Major Facilitator Superfamily Domain Containing 2b* (Mfsd2b) der *Major Facilitator Superfamily* und zum anderen die ATP-abhängigen Transporter, darunter der *ATP binding cassette subfamily C member 1* (ABCC1)-Transporter (55). Im extrazellulären Raum bindet S1P vorwiegend an *High Density Lipoprotein* (HDL)/Apolipoprotein M oder an Albumin (56).

1.4.2 S1P-Rezeptoren und Signalwege

Seit der erstmaligen Offenlegung der physiologischen Funktion von S1P im Jahr 1991 (57), konnte es als Mediator für fünf verschiedene Membranrezeptoren (S1PR1-S1PR5) identifiziert werden (58). Hierbei handelt es sich um GPCR, die nach Ligandenbindung, in dem Fall S1P, die Konformation des Rezeptors ändern. Es folgt der Austausch des inaktiven Guanosindiphosphat (GDP) zu dem aktiven Guanosintriphosphat (GTP) an der Gα-*Subunit*. Nach anschließender Dissoziation der an GTP gekoppelten Gα-*Subunit* von den Gβγ-*Subunits* können die aktivierten G-Proteine unterschiedliche Signalkaskaden navigieren (59). Diese stehen in Zusammenhang mit der Klasse des GPCR: die G_i-gekoppelte Kaskade fungiert via Phosphoinositid-3-Kinase/Akt (PI3K/Akt)- und Mitogen-aktivierte Proteinkinase/Extrazelluläre signalregulierte Kinase (MAPK/ERK)-Signalwegen. G_q-gekoppelt werden Phospholipase C-β- sowie die PKC-Signalkaskade aktiviert. $G_{12/13}$-abhängige Rezeptoren sind an Rho/Rho-Kinase-vermittelte Aktivierung gebunden. Die aktivierten Signalwege führen zu unterschiedlichen zellulären Prozessen, die unter anderem die zelluläre Expression, Proliferation, Migration oder Apoptose betreffen (60). Die spezifischen Funktionen der fünf S1PR sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Rezeptor	Wirkung	
S1PR1 (G_i)	peripher: Lymphozytenauswanderung, Angiogenese, Zellwachstum und -proliferation, antimikrobielle Zytotoxizität	zentral: Proliferation und Aktivierung von Astrozyten, morphologische Veränderung von Neuronen, Migration von neuronalen Vorläuferzellen zu Läsionsstellen
S1PR2 ($G_{12/13}$, G_q)	Zellproliferation, Apoptose-Hemmung und Positionierung von B-Zellen in Follikeln. Bildung von Endothelbarrieren, vor allem Retina und Innenohr	
S1PR3 (G_i, G_q, $G_{12/13}$)	Regulierung des Gefäßtonus, Zytokinproduktion und Schutz vor Myokardischämie	
S1PR4 (G_i-, $G_{12/13}$)	Regulation von Megakaryozyten-Differenzierung sowie Immunzellfunktion im lymphatischen Gewebe, vor allem Minderung der Zytokinsekretion	
S1PR5 (G_i-, $G_{12/13}$)	Einfluss auf Migration und Überleben primär von Oligodendrozyten und myelinisierenden Zellen	

Tabelle 2: Einfluss der Signaltransduktion an den verschiedenen S1PR (60–73)**.**

1.4.3 Beeinflussung kardiovaskulärer Prozesse

S1P kann auch im kardiovaskulären Kontext protektive als auch pathologische Prozesse initiieren. Hier wirkt es primär an den S1PR1-3, die sowohl auf Endothelzellen als auch Kardiomyozyten exprimiert sind (74).

Bereits in der Embryonalphase wirkt S1P in entscheidendem Maß auf die Entwicklung des Herz- und Gefäßsystems (74). Ein über SphK und den S1P-Transporter SPNS2 aufgebauter Gradient ist maßgeblich an der Fusion der mesodermalen Vorläuferzellen zu einem primitiven Herzschlauch beteiligt (75). Es fungiert auf physiologischer Ebene als Schutzfaktor vor Apoptose sowie endothelialer Dysfunktion. Dies bedeutet vor allem bei myokardialen Ischämiezuständen eine Kardioprotektion (76). Zudem ist die Regulation des Gefäßtonus beschrieben. Des Weiteren besteht ein präventiver Einfluss in Bezug auf Athero-

sklerose, welcher vor allem durch eine Modulation des Stickstoffmonoxid-Haushalts, anti-inflammatorische Effekte sowie eine verminderte vaskuläre Permeabilität zustande kommt (77). Es konnte gezeigt werden, dass es bei myokardialer Ischämie durch Apoptose-Hemmung und ein positives *Outcome* haben kann.
Eine S1P-Fehlregulation kann verschiedenste kardiovaskulären Erkrankungen resultieren, darunter arterieller Hypertonus, Herzinsuffizienz und atherosklerotische Plaquebildung (77). Auf Embryonalebene verursacht eine jene Imbalance fehlerhafte Herz- und Gefäßentwicklung, die neben leichter Gefäßmusteranomalien zum embryonalen Tod führen kann (78).

1.4.4 S1P-bezogene Medikation

Es gibt eine Reihe an Möglichkeiten, an verschiedenen Punkten im S1P-Haushalt eingreifen. Dazu gehören SphK, S1P-Lyase oder S1P-Exportmechanismen. Bisher sind diese Angriffspunkte alle Teil von Experimenten oder (prä)klinischen Studien. Den vielversprechendsten Ansatz bieten S1P-Modulatoren, die als funktionelle Antagonisten unterschiedlich spezifisch an die S1PR binden und zu einer Rezeptorinternalisierung sowie -degradierung führen (79). Insgesamt sind bisher vier Modulatoren in Deutschland bei Multipler Sklerose (MS) zugelassen.
Zu ihnen zählt Fingolimod (FTY720), das bei schubförmiger MS zum Einsatz kommt. Es wirkt unselektiv auf alle S1PR mit Ausnahme des S1PR2 (80). Durch die S1PR1-vermittelte, gehemmte Lymphozytenfreisetzung hat es primär immunmodulatorische Effekte, vor allem im zentralen Nervensystem, was die Verwendung bei der neurologischen Autoimmunerkrankungen ergründet (81). Zudem wird der Einsatz bei malignen Erkrankungen erforscht, bei denen S1P-Modulatoren einen Effekt auf Angiogenese, Proliferation und Metastasierung haben sollen (82). Zu den bekannten Nebenwirkungen der Therapie zählen unter anderem atrioventrikuläre (AV)-Blockierung, arterielle Hypertonie sowie Bradykardien, die vor allem in Abhängigkeit der Rezeptoren S1PR3-5 auftreten (83).
Der Modulator Siponimod wirkt selektiv antagonistisch an den S1PR1 und S1PR5 (84) und ist bei aktiver sekundär progredienter MS zugelassen. Zu den Effekten der Therapie zählen modulierte neuronale Zellen sowie aktivierte Immunzellen

im zentralen Nervensystem (85). Im Gegensatz zu FTY720 kann es die Blut-Hirn-Schranke passieren, sodass ein direkter protektiver Einfluss auf neuronaler Ebene vermutet wird (86). Durch die gezielte Wirkung an den beiden S1P-Rezeptoren treten zuvor beschriebene Nebenwirkungen seltener auf (87).

Ozanimod gilt als funktioneller Agonist an den S1PR1 und 5 (88) und ist als einer der neueren Modulatoren seit 2020 in Europa zugelassen (89). Die Wirkweise ähnelt den zuvor beschriebenen Medikamenten: es führt zu einer reduzierten Anzahl zirkulierender Lymphozyten. Neben der Verwendung bei neuro-immunologischen Krankheiten, wird Ozanimod bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn verwendet (90). Es flutet schnell dosisabhängig an und wird entsprechend seiner kurzen Halbwertszeit eliminiert (88).

Ponesimod wirkt selektiv am S1PR1 mit Modulation der Entzündungskaskade, die sich vor allem in einer Hemmung der Lymphozyten-abhängigen Immunreaktion äußert (91). Ebenso wie beim Ozanimod gilt die Wirkung als schnell reversibel (92). Es werden weniger Nebenwirkungen unter Ponesimod-Einnahme beobachtet, was primär mit der spezifischen Bindung an S1PR1 zusammenhängt.

Andere S1P-Modulatoren wie Ceralifimod oder Cenerimod haben entweder bisher keine Zulassung für die Verwendung in Deutschland oder sind weiterhin Teil klinischer Studien (93).

Je nach Substanz unterscheiden sich die spezifischen Nebenwirkungen sowie Kontraindikationen. Allgemein erhöhen S1P-Modulatoren das Risiko für Lymphozytopenien, wodurch Infektionen, insbesondere durch virale oder opportunistische Erreger, häufiger auftreten. Andere relevante unerwünschte Wirkungen sind das makuläre Ödem sowie eine Transaminasenerhöhung (94,95). Zusätzlich kann es zu kardialen Nebenwirkungen, wie AV-Blöcken, Hypertonie oder Bradykardie, kommen. Speziell die Neigung zu Bradykardien kann vermieden werden, indem eine stufenweise Aufdosierung der Medikation erfolgt (96). Entsprechend wird vor Therapiebeginn die laborchemische Erhebung von Leberwerten und immunaktiven Zellen sowie die elektrokardiografische Voruntersuchung empfohlen (79,97).

Neben der zahlreichen primär neurologischen Verwendungsgebiete gibt es derzeit keine kardiale Indikation für die Verwendung S1P-wirksamer

Medikamente (79). Es ist bekannt, dass S1P-Modulatoren potenziell kardioprotektiv wirken können. Derzeit beziehen sich die Ergebnisse auf (prä)klinische und experimentelle Studien, die ein positives kardiales *Outcome* auf die Reduktion inflammatorischer Prozesse sowie Protektion der Endothelbarriere zurückführen (98).

1.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit

In dieser Dissertation werden die folgenden Fragestellungen untersucht:

- Wie verändern sich die Scherkräfte auf die Aortenklappenzellen durch die Pathophysiologie der AS?
- Wird dadurch mehr S1P in kalzifizierten Klappen gebildet? Welcher enzymatische Prozess ist hierfür verantwortlich?
- Gibt es Unterschiede zwischen den lokalen und zirkulierenden S1P-Konzentrationen bei AS? Führt S1P so (im Sinne eines Teufelskreises) zu einer verstärkten Progression der AS?

In dieser Arbeit wurde hypothetisiert, dass gesteigerte Scherkräfte bei AS eine Hochregulation der S1P-Sekretion und somit einen Einfluss auf den Progress der Kalzifizierung bedeuten.

1.6 Ethikvoten

Die Tierversuche wurden gemäß § 8 Abs. 1 Tierschutzgesetz in Verbindung mit § 31 Tierschutz-Versuchstierverordnung von dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt. Das Votum läuft unter dem Aktenzeichen 81-02.04.2018.A410.

Die Verwendung von Daten sowie Gewebe humanen Ursprungs wurde unter der Studiennummer 2018-144-KFogU von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in drei grundwissenschaftliche Versuchsteile, die sich primär in den untersuchten Gewebearten und -materialien unterscheiden.

Im ersten Teil wurden humane Daten erhoben und ausgewertet (s. 2.2). Dies beinhaltete die Magnetresonanz (MR)-grafische Darstellung humaner Klappen bei schwergradiger AS im Vergleich zu gesundem Klappengewebe (s. 2.5.1). Das Ziel lag darin, mögliche Unterschiede in der mechanischen Beanspruchung der Klappenzellen zu quantifizieren. In einem anderen Ansatz konnten sowohl humanes Plasma als auch Aortenklappen genutzt werden, um den jeweiligen S1P-Gehalt durch die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) (s. 2.5.2) zu bestimmen und somit potenzielle Konzentrationsunterschiede zu analysieren.

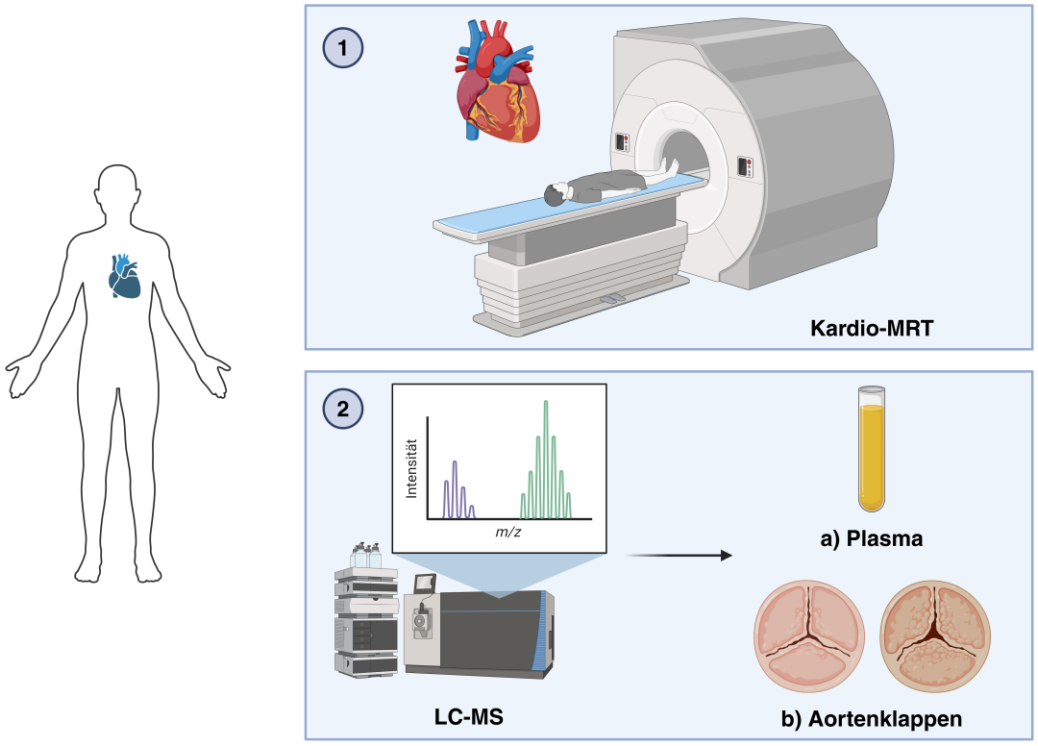


Abb. 2: Versuchsaufbau am humanen Modell. Kardio-MRT = Kardio-Magnetresonanztomografie, LC-MS = Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie. Erstellt mit BioRender.com.

Im zweiten Teil wurden VICs kultiviert. Ein Teil wurde mit einem Ossifikationsmedium behandelt, um die stenotischen Bedingungen auf Klappenebene nachzustellen. Jene kalzifizierten Bereiche wurden im Anschluss mittels Alizarinrot-Färbung quantifiziert und zum Nativzustand verglichen (s. 2.5.4). Im zweiten Versuchsansatz wurden die Zellen einem Strecksystem in Analogie zur mechanischen Beanspruchung bei der AS ausgesetzt (s. 2.5.5). Die Zellen konnten im Anschluss via Polymerasekettenreaktion (PCR) ausgewertet und der S1P-Gehalt mittels Flüssigkeitschromatographie bestimmt werden.

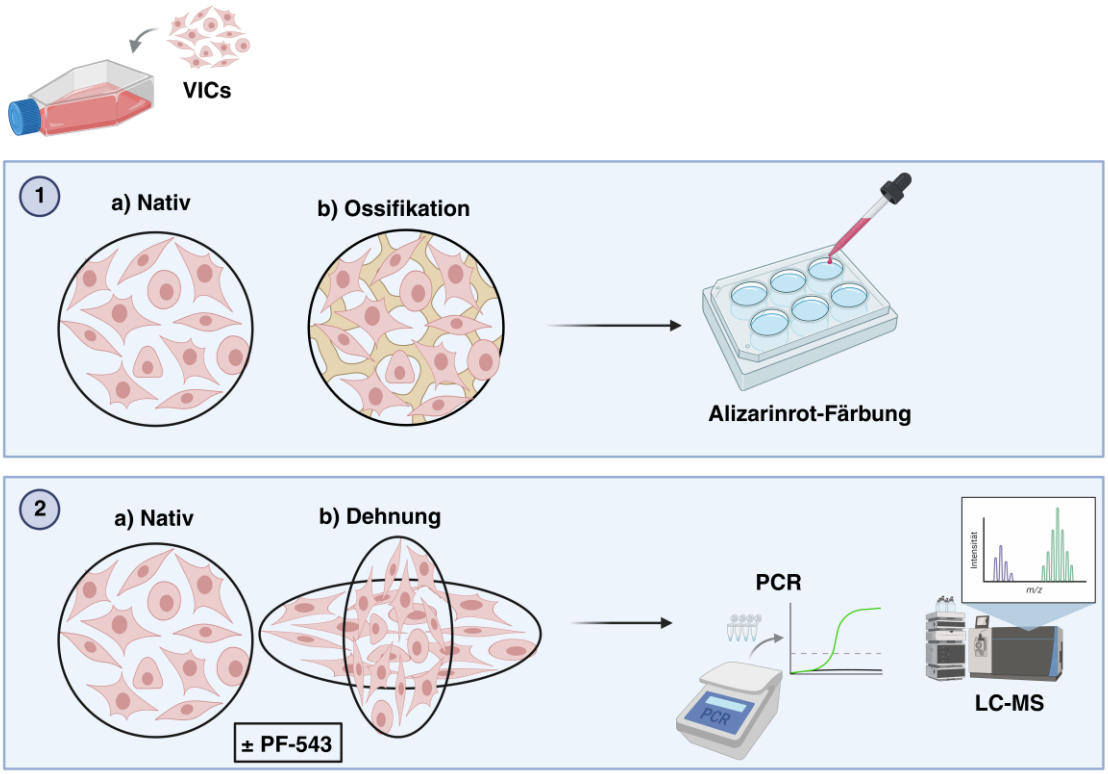


Abb. 3: In-vitro Versuche mit VICs. VICs = Valvuläre interstitielle Zellen, PCR = Polymerasekettenreaktion, LC-MS = Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie. Erstellt mit BioRender.com.

Im dritten Teil wurden die Effekte von S1P auf den Progress der AS an C57 *black* 6 (C57BL/6J) Wildtyp (WT)-Mäusen getestet (s. 2.3 & 2.5.6). Während die eine Hälfte nativ gehalten wurde, erhielt die andere Hälfte der Versuchsmäuse eine 4-Deoxypyridoxin (DOP)-Behandlung, um erhöhte S1P-Konzentrationen auf Klappenebene zu generieren. Anteilig erfolgte die echokardiografische Beurteilung des Schweregrades der AS (s. 2.5.7), die histologische Einordnung der Befunde (s. 2.5.8) sowie eine PCR-Analytik des Klappengewebes (s. 2.5.3). Der Fokus

lag hierbei in der Erhebung und Einordnung der Effekte von S1P auf das Voranschreiten der Klappenstenosierung.

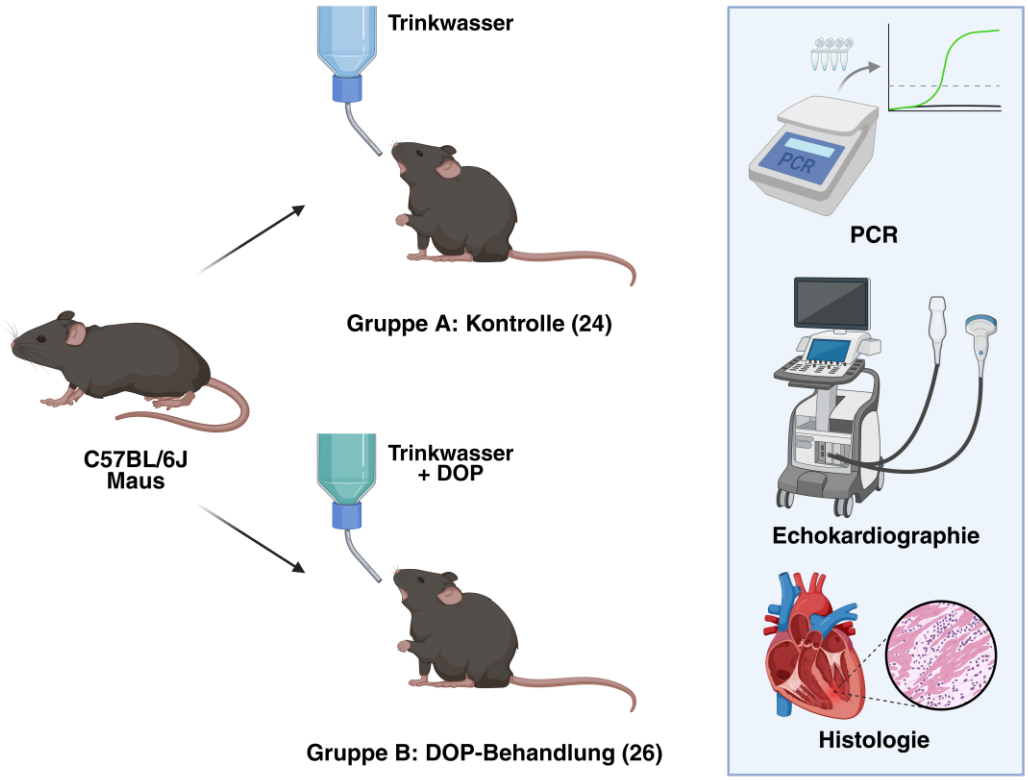


Abb. 4: Versuche am Mausmodell. C57BL/6J = C57 *black* 6, DOP = 4-Deoxypyridoxin, PCR = Polymerasekettenreaktion. Erstellt mit BioRender.com.

2.2 Patientenkollektiv

2.2.1 Auswertung kardialer Magnetresonanztomographien

Um die kardiale Beanspruchung bei AS darzustellen, wurde ein Patientenkollektiv von insgesamt 22 Patient*innen herangezogen, die im Rahmen einer Registerstudie am Universitätsklinikum Düsseldorf eine kardiale MRT erhielten. Das Kollektiv bestand aus elf Kontrollproband*innen und elf Patient*innen mit schwerer AS. Die Stichprobengröße ergab sich aus einer Vollerhebung aller verfügbaren Patient*innen. Auf Grund der begrenzten Populationsgröße wurde auf eine a-priori-Fallzahlplanung verzichtet, Gruppenvergleiche erfolgten mittels Mann-Whitney-U-Test.

Die Tabelle 3 zu entnehmenden Charakteristika stammen aus Arztbriefen sowie den zugänglichen Untersuchungsergebnissen.

	Kontrolle	Hochgradige AS (III)	p-Wert
Personenbezogene Daten			
Patientenzahl	11	11	/
Alter [Jahre]	64,9 ± 5,7	80,2 ± 5,2	**<0,001**
Gewicht [kg]	73,6 ± 14,4	69,7 ± 12,9	0,519
Body-Mass-Index (BMI) [kg/m^2]	24,3 ± 3,6	25,0 ± 4,1	0,675
Geschlecht (weiblich) [%]	36,4	63,4	0,670

Tabelle 3: Charakteristika der Patient*innen aus der Kontrollgruppe sowie der Gruppe an AS-Erkrankten.

2.2.2 Bezug von Gewebe aus menschlichen Aortenklappen

Die Analyse humaner Aortenklappen wurde an Klappengewebe vorgenommen, das im Rahmen kardiochirurgischer Interventionen entfernt wurde (99). Entsprechende Patientendaten aus vorliegenden Untersuchungsergebnissen und Befunden sind in Tabelle 4 vermerkt. Die angegebenen Laborwerte wurden im Zentrallabor des Universitätsklinikums Düsseldorf erhoben. Gewebe, das den Kontroll-Aortenklappen zugeschrieben wurde, stammte aus Herztransplantationen ohne makroskopisch feststellbare Strukturveränderungen. Gewebe, das der Gruppe der stenosierten Aortenklappen zugeschrieben wurde, stammte aus Klappenersatz-Operationen. Ein wichtiger Punkt war hierbei, dass das makroskopische Korrelat einer Segelfibrose mit Verdickung gegeben war, jedoch keine grobe Verkalkung nachgewiesen wurde. Als Ausschlusskriterien galten eine aktive Endokarditis, postinfektiöse Herzerkrankung nach rheumatischem Fieber und/oder bikuspide Aortenklappe.

	Kontrolle	AS	p-Wert
Patientenbezogene Daten			
Patientenzahl	7	12	-
Alter [Jahre]	63,3 ± 2,5	65,6 ± 8,3	0,487
Gewicht [kg]	78,7 ± 10,7	85,8 ± 20,8	0,420
BMI [kg/m^2]	25,3 ± 5,4	26,7 ± 4,5	0,556
Geschlecht (weiblich) [%]	14,3	16,7	0,891
Kardiovaskuläre Risikofaktoren			
Diabetes mellitus [%]	28,6	16,7	0,539
Arterieller Bluthochdruck [%]	71,4	50	0,362
KHK [%]	57,1	58,3	0,960
Rauchen [%]	14,3	16,7	0,891
Dyslipoproteinämie [%]	57,1	25	0,161
Vormedikation			
Antikoagulation [%]	14,3	33,3	0,363
Thrombozytenaggregationshemmer [%]	28,6	50	0,362
Betablocker [%]	28,6	50	0,362
Diuretika [%]	42,9	33,3	0,678
Statine [%]	71,4	66,6	0,830
Labordaten			
Plättchen [x1000/µl]	212,7 ± 62,6	207,4 ± 59,7	0,857
Leukozyten [x1000/µl]	9,1 ± 4,6	7,9 ± 2,2	0,446
HDL [mg/dl]	40,6 ± 19,6	45,1 ± 8,2	0,503
Glomeruläre Filtrationsrate nach *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* [ml/min]	69,9 ± 23,2	77,4 ± 9,9	0,332

Tabelle 4: Demografische und Labor-Daten der Proband*innen, dessen Aortenklappen-Gewebe analysiert wurde.

2.2.3 S1P-Messung im Plasma

Die Grundlage zur Messung von S1P-Konzentrationen im Plasma lag bei einer *Single-Center*-Studie, bei der je 59 Kontrollproband*innen und 59 Patient*innen mit schwerer AS teilnahmen. Die patientenbezogenen Daten konnten Arztbriefen sowie zugänglichen Untersuchungsergebnissen entnommen werden und sind in Tabelle 5 abgebildet. Es kam die Software G*Power zum Einsatz, mit Hilfe derer eine Stichprobengröße von 118 Proband*innen berechnet wurde. Dafür vorausgesetzte Annahmen waren ein α-Fehler von 0,05, ein β-Fehler von 0,2 und eine mittlere Effektgröße, um eine Teststärke von 80 % zu generieren.

	Kontrolle	**AS**	**p-Wert**
Patientenbezogene Daten			
Patientenzahl	59	59	-
Alter [Jahre]	79 ± 8	79 ± 10	0,707
Gewicht [kg]	80,8 ± 16,2	81,7 ± 17,4	0,781
BMI [kg/m^2]	27,39 ± 5,18	27,85 ± 4,97	0,618
Geschlecht (weiblich) [%]	39	37,3	0,850
Kardiovaskuläre Risikofaktoren			
Diabetes mellitus [%]	55,9	57,6	0,853
Arterieller Bluthochdruck [%]	79,7	78,0	0,822
KHK [%]	66,1	64,4	0,847
Rauchen [%]	22	13,6	0,229
Dyslipoproteinämie [%]	22	15,3	0,344
Vormedikation			
Antikoagulation [%]	58,3	44,1	0,097
Thrombozytenaggregations-hemmer [%]	52,5	54,3	0,847
Betablocker [%]	72,8	62,7	0,237
Diuretika [%]	61	55,9	0,575
Statine [%]	64,4	67,8	0,697

Tabelle 5: Patientencharakteristika der Proband*innen, deren S1P-Spiegel im Plasma bestimmt wurden.

2.3 Versuchstiere

Bei den verwendeten Versuchstieren handelte es sich um fünf bis sechs Monate alte C57BL/6J-Mäuse, welche von *Janvier Labs* (Saint-Berthevin, Frankreich) bezogen wurden. Alle Mäuse wurden vor und nach den Versuchen fachgerecht in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf betreut. Die Haltungsbedingungen beliefen sich entsprechend der Empfehlungen der *Federation of European Laboratory Animal Science Association* auf eine konstante Raumtemperatur von ca. 22°C und Luftfeuchtigkeit von ca. 50 %. In den Tierkäfigen wurde neben dem stetigen Zugang zu Futter und Trinkwasser auf eine zirkadiane Rhythmik durch Beleuchtung zwischen 7 und 19 Uhr geachtet. Da sich Gewichtsunterschiede innerhalb der Kohorte zeigten, wurden die ermittelten Daten auf die Körperoberfläche standardisiert, um eine korrekte Analyse zu gewährleisten.

Die Versuchsansätze unterschieden sich in der Gabe von 4-Desoxypyridoxinhydrochlorid, einem Inhibitor der S1P-Lyase. Dabei erfolgte die Applikation anhand bestehender Protokolle in einer Dosierung von mit 180 mg/l über das Trinkwasser der Mäuse (100), um bei einem Körpergewicht von ungefähr 25 g und einer Wasseraufnahme von ca. 5 ml pro Tag eine gewünschte Dosis von 36 mg/kg pro Tag zu erzielen. Insgesamt wurden 50 Mäuse verwendet, die dem Zufall nach in zwei Gruppen unterteilt.

Gruppe A/Kontrollgruppe: C57BL/6J ohne DOP-Behandlung: 24 Mäuse (im Verlauf Ausschluss von zwei Mäusen wegen starker Aortenklappeninsuffizienz).

Gruppe B/Behandlungsgruppe: C57BL/6J mit DOP-Behandlung: 26 Mäuse (im Verlauf Ausschluss einer Maus wegen starker Aortenklappeninsuffizienz).

Hierbei konnte vorab keine Berechnung des Stichprobenumfangs vorgenommen werden, was der Begründung unterliegt, dass eine Abschätzung der Schwere der AS vor Operation nahezu unmöglich war.

2.4 Material

2.4.1 Substanzen

1-Butanol (≥99,5 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Alizarin Rot S Färbelösung (2 %)	ScienCell, San Diego, USA
Amphotericin B	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Buprenorphin (Temgesic®)	Indivior PLC, Slough, Vereinigtes Königreich
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Calcium *Stain Kit* (*Modified* Von Kossa)	ScyTek Laboratories Inc., Logan, USA
Calciumhydroxyphosphat	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Thermo Fisher *Scientific,* Waltham, USA
Elektrodenkontaktcreme	Gello GmbH Geltechnik, Ahaus, Deutschland
Enthaarungscreme	Reckitt Benckiser, Slough, Vereinigtes Königreich
Essigsäure (10 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol (70 %, 100 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
ezDNase-Enzym	Qiagen, Hilden, Deutschland
ezDNase-Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Fibronectin	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Fötales Kälberserum, zertifiziert, hitzeinaktiviert	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Isofluran	Piramal *critical care,* Voorschoten, Niederlande

Ketamin	Pfizer Pharma PFE GmbH, New York City, USA
Methanol	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA
Milli-Q®	Millipore GmBH, Burlington, USA
Natriumhydroxid	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Nuklease-freies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland
Paraformaldehyd (4 %)	Alfa Aesar, Haverhill, USA
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PF-543 Hydrochlorid	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Proteinase K-Mastermix	Qiagen, Hilden, Deutschland
RLT- Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase-freies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland
RN*easy* Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RPE-Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
RW1-Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Saccharose-Standardlösung 30 %	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sphingosine-1-phosphat-d_7 (d18:1)	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA
Sphingosine-1-phosphate, D-erythro	Enzo Life Sciences, Farmingdale, USA
SphK1 (Hs00184211_m1)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Standardfutter	Ssniff, Soest, Deutschland
SuperScript IV VILO Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

TaqMan *Fast Advanced Master* Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tissue-Tek® O.C.T. *Compound*	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ultraschallgel (Aquasonic)	Roeser Medical, Essen, Deutschland
VectaMount *Permanent Mounting Medium* (Vector H-5000)	Vector *laboratories,* Newark, USA
Xylazin	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland

2.4.2 Utensilien

5-0 Prolene	Ethicon, Raritan, New Jersey, USA
6-*Well* Bioflex-Platte	Flexcell International Corporation, Burlington, USA
96-*Well*-Platte	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Adhäsionsobjektträger	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eppendorf *Tubes*®	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Koronardraht	Universal, Abbott *Cardiovascular,* Wetzlar, Deutschland
Massenspektrometer Fläschchen	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
MicroAmp™ optische Klebefolie	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
QIAshredder	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy mini spin column	Qiagen, Hilden, Deutschland
Supelco Ascentis Express C18-HPLC-Säule	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
T75 EasY*Flask*, *Non-Treated Surface, Filter Cap*	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TissueRuptor Disposable Probes	Qiagen, Hilden, Deutschland
Vacutainer® Blutentnahmeset Safety-Lok und Einmalhalter	BD Beckton, Dickson and Company, Franklin Lakes, USA

Vacutainer® Citrat-Röhrchen	BD Beckton, Dickson and Company, Franklin Lakes, USA
Vacutainer® EDTA-Röhrchen	BD Beckton, Dickson and Company, Franklin Lakes, USA
MicroAmp™ *Fast Optical* 96-Well-Reaktionsplatte (0,1 ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.4.3 Gerätschaften

1,5-Tesla-MRT-Scanner	Achieva, Philips *Healthcare,* Hamburg, Deutschland
18-38 MHz Schallkopf MS400	Visual Sonics, Fujifilm, Toronto, Kanada
Cryolys® *module*	Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich
Flex Jr.™ *Tension* System	Flexcell International Corporation, Burlington, USA
Heated small animal operating table, 50- 1247	Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland
Hellfeldmikroskop Leica DM4000M	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Kryotom Leica CM3050	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Plattenlesegerät FLUOstar Omega	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Precellys® Evolution Touch Homogenizer	Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich
QTRAP 6500+	SCIEX, Framingham, USA
QuantStudio™ 7 Flex *Real-Time*-PCR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermo-*Shaker* TS-100	BioSan SIA, Riga, Lettland
Ultraschallgerät Vevo 3100	Visual Sonics, Fujifilm, Toronto, Kanada
Vanquish Flex Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography (UHPLC)-System	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA

Vortex Mixer VWRI444-1372	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge 5810R	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Microstar 17R	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge Mikro 2000R	Hettich Zentrifugen, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Mini *Star Silverline*	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge Rotina 38R	Hettich Zentrifugen, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Universal 120R	Hettich Zentrifugen, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland

2.4.4 Software

cvi42	Circle Cardiovascular Imaging, Calgary, Kanada
Analyst Version 1.7.2	AB Sciex, Redwood City, USA
BioRender	Science Suite Inc., Toronto, Kanada
*G*Power*	Axel Buchner (Düsseldorf, Deutschland), Edgar Erdfelder (Mannheim, Deutschland), Franz Faul (Kiel, Deutschland), Albert-Georg Lang (Düsseldorf, Deutschland)
GraphPad-Prism® 8	GraphPad Software, Boston, USA
IBM SPSS®-*Statistics* 25	International Business Machines Corporation, Armonk, New York, USA

ImageJ Version 1.53c	Wayne Rasband*, Research Services Branch, National Institutes of Health,* Bethesda, USA
QuantStudio™ Real Time PCR Software v1.7.1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Skyline	University of Washington, USA
Vevo LAB 3.2.6	Visual Sonics, Fujifilm, Toronto, Kanada

2.4.5 Lösungen und Puffer

Liquid-Chromatographie-Massenspektometrie (LC-MS) – Lösungsmittel A

Acetonitril	11,49 mol/l	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Milli-Q®	22,2 mol/l	Millipore GmbH, Burlington, USA

LC-MS – Lösungsmittel B

Acetonitril	1,91 mol/l	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Isopropanol (≥99,9 %)	11,76 mol/l	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Lipidomanalytik (Aortenklappengewebe) – Puffer A

Dikaliumhydrogenphosphat (≥98 %)	40 mmol/l	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Zitronensäure (99 %)	30 mmol/l	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Lipidomanalytik (Aortenklappengewebe) – Puffer B

2-Propanol (70 %)	3,01 mol/l	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
1-Butanol (≥99,5 %)	0,875 mol/l	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Milli-Q®	55,5 mol/l	Millipore GmbH, Burlington, USA

2.5 Methoden

2.5.1 Humane Magnetresonanztomografie

Die Erhebung von maximaler Flussgeschwindigkeit und Scherkräften auf Aortenklappenebene wurde durch einen 1,5-Tesla-MRT-Scanner mit 32-Kanal-Spule realisiert. Der Vergleich fand zwischen je elf Kontrollpersonen und elf Patient*innen mit schwerer AS statt (Tabelle 3).

Zur genauen Gewebedifferenzierung und anatomischen Orientierung wurden *Balanced Steady-State Free Precession*-Sequenzen beurteilt. Hierbei kompensierte ein Gradient mit entgegengesetzter Polarität die durch die einzelnen eingesetzten Gradienten entstehende Akquisition der Dephasierung (101).

Die Darstellung der Klappenebene, auf der die Messung des Öffnungsbereichs der Aortenklappe stattfand, erfolgte in einer Cine-Sequenz. Für die vierdimensionale (4D) Flussmessung wurden *Spoiled* Gradient Echo-Sequenzen verwendet, wodurch noch vorhandene transversale Magnetisierung zerstört wurden (102). Dabei fand die Datenakquisition Elektrokardiogramm (EKG)- und Atem-getriggert statt.

In bis zu 50 Schichten konnte die Gesamtlänge der thorakalen Aorten erfasst werden. Die Kodierung erfolgte mit einer isotropen Auflösung von 2,8 mm, was eine einheitliche *Voxel*-Größe von 2,8 mm in allen drei Dimensionen bedeutete. Je nach Kohorte lag die Kodiergeschwindigkeit zwischen 120 und 250 cm/s. Der Kippwinkel belief sich auf 5 Grad.

Zur Auswertung der Daten wurde die Bildgebungsplattform cvi42 von Circle Cardiovascular Imaging verwendet. Die an der Aortenklappe herrschenden Strömungsverhältnisse konnten mittels 4D-*Flow*-Analyse des Strömungsmoduls gemessen werden. In dem Bereich zwischen dem linken Ventrikel und der Aorta descendens konnte eine dreidimensionale Gefäßumrandung zunächst durch das Programm grob erhoben und schließlich manuell ergänzt werden. Hiervon wurden die maximale Strömungsgeschwindigkeit sowie die axialen und zirkulären Scherkräfte auf Aortenklappenebene abgeleitet.

2.5.2 S1P-Messung

Lipidomics steht für die Untersuchung aller Lipide einer Zelle oder eines Organismus. Diese Disziplin ermöglicht unter anderem die Analyse von S1P-Konzentrationen in verschiedenen Geweben. Ein Bereich der Lipidomics wird durch die LC-MS abgedeckt, die die genaue Identifizierung und S1P-Quantifizierung bedeutet. Orientierend erfolgte die LC-MS, wie beschrieben von Peng et al. (103), durch erfahrene Doktorand*innen der Arbeitsgruppe. Die Auswertung resultierender Daten wurde im Rahmen dieser Dissertation vorgenommen. Für die Massenspektometrie kam ein *Vanquish Flex* UHPLC-System von Thermo Fisher Scientific Inc. zum Einsatz. Dieses wurde ausgestattet mit einer Supelco Ascentis Express C18-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Säule mit den Maßen 150 mm x 2,1 mm und einer Partikelgröße von 2,7 µm. Hinzu kam eine Schutzpatrone von Supelco mit einer Größe von 50 mm x 2,1 mm und ebenfalls einer Partikelgröße von 2,7 µm. Die Temperatur der Säule wurde in einem Säulenofen auf 60° Celsius gestellt. Zur Trennung der Probe lag die Flussgeschwindigkeit bei 0,5 ml/min mit den in der Tabelle 6 dargestellten Gradienten:

Zeit in Minuten	Lösungsmittel A in Prozent	Lösungsmittel B in Prozent
0 - 2	70	30
2 - 3	70 - 43,9	30 - 56,1
3 - 4	43,9 - 41,7	56,1 - 58,3
4 - 5,5	41,7 - 39,8	58,3 - 60,2
5,5 - 7	39,8 - 39,4	60,2 - 60,6
7 - 8,5	39,4 - 37,7	60,6 - 62,3
8,5 - 10	37,7 - 36,0	62,3 - 64,0
10 - 11,5	36,0 - 35,5	64,0 - 64,5
11,5 - 13	35,5 - 33,8	64,5 - 66,2
13 - 14,5	33,8 - 33,1	66,2 - 66,9
14,5 - 15	33,1 - 0	66,9 - 100
15 - 19	0	100
19 - 22	95	5
22 - 25	70	30

Tabelle 6: Anteile der verwendeten Lösungsmittel über einen Zeitraum von 25 Minuten zum Aufbau eines Gradienten und damit zur Auftrennung der Probe.

Bei Lösungsmittel A handelte es sich um Acetonitril/Wasser (6:4), bei Lösungsmittel B wurde Isopropanol/Acetonitril (9:1) verwendet. Zu Analysezwecken wurde das System mit einem QTRAP 6500+ verbunden. Die erhobenen Daten konnten mit der Software Analyst (Version 1.7.2) von AB Sciex aufgezeichnet und mittels Skyline (104) visualisiert werden.

Bei den zu untersuchenden Proben handelte es sich zum einen um Plasma von 59 Kontrollproband*innen sowie 59 Patient*innen mit schwerer AS (Tabelle 5).

Zum anderen konnten menschliche Aortenklappenproben mittels LC-MS analysiert werden. Vorbereitend wurden jene in einem System bestehend aus Precellys® *Evolution Touch Homogenizer* und Cryolys® *Evolution* mit einer Methanol-Wasser-Mischung homogenisiert. Insgesamt fanden vier Zyklen bei 7500 Umdrehungen pro Minute für 20 Sekunden bei 4° Celsius statt. Zwischen den Zyklen erfolgte eine Pause von je 30 Sekunden. Zur Gewinnung der Lipide wurde zunächst Puffer A angemischt, der bei pH 4 aus 30 mmol/l Zitronensäure und 40 mmol/l Dikaliumhydrogenphosphat bestand. 50 µl der homogenisierten Zellen

wurden mit Sphingosine-1-phosphat-d_7 (d18:1) vermengt, worauf 400 µl des Puffers hinzugegeben wurden. Zu Extraktionszwecken folgten ein Milliliter 1-Butanol sowie 500 µl mit Wasser gesättigtes 1-Butanol. Nach einem anschließenden Trocknungsprozess wurden die Proben in 50 µl von Puffer B aus 2-Propanol, 1-Butanol und Wasser (23:8:69) sowie 5 mM Phosphorsäure resuspendiert. Zur Analyse im Sinne der Flüssigkeitschromatographie wurden 8 µl hiervon verwendet.

2.5.3 *Real-Time* PCR

In der Real-Time PCR wurde Desoxyribonukleinsäure (DNS) amplifiziert, die aus Proben von Mausherzen und VICs generiert wurde.

Zunächst wurde Ribonukleinsäure (RNS) mittels RNeasy Mini Kit isoliert. Hierfür wurden die Herzen durch *tissue ruptors* homogenisiert. Nach mehreren Schritten, die unter anderem die Behandlung mit Proteinase K-Mastermix und 100%igen Ethanol beinhalteten, wurde das Gemisch auf eine RNeasy mini *spin column* gegeben, sodass die RNS an eine Silikatsäule band. Nachdem der *flow-through* verworfen wurde, konnte die RNS von der Säule gelöst werden.

Da zur weiteren Analyse doppelsträngige DNS benötigt wurde, musste im nächsten Schritt die RNS zu DNS umgeschrieben werden. Dafür wurde je nach gewünschter RNS-Konzentration jene mit 1 µl ezDNase-Puffer, 1 µl ezDNase-Enzym und entsprechender Menge an Nuklease-freiem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Die anschließende Reverse Transkription konnte mit Hilfe des SuperScript IV VILO *Master Mix* mit dem ezDNase-Synthesekit von Thermo Fisher Scientific umgesetzt werden. In den folgenden Inkubationsschritten wurden die Proben für 10 Minuten auf 25°C erhitzt, um eine Bindung der Primer zu ermöglichen. Die eigentliche Reverse Transkription fand bei 10-minütiger Erwärmung auf 50°C statt. Im letzten Schritt, der Inaktivierung der Enzyme, erfolgte die Erwärmung der Proben für 5 Minuten auf 85°C.

Im Anschluss fand die PCR mittels TaqMan *Fast Advanced Master Mix* statt. Hierfür wurde der Primer SphK1 (Hs00184211_m1) verwendet. Die Analyse der gewonnen Daten wurde durch die 2-ΔΔCT-Methode auf Grundlage der *x-fold change* durchgeführt. Die *x-fold change* gibt an, um welchen Faktor sich eine Größe zwischen zwei Messungen verändert hat.

2.5.4 Zellkultur und Alizarinrot-Färbung

Im Rahmen der Zellkultur kamen humane VICs von Innoprot (Derio, Spanien) zum Einsatz. Zum Aussäen und Kultivieren wurde das Zellkulturmedium Gibco *Dulbecco's Modified Eagle Medium* verwendet, welches um die 10-prozentige Menge an fetalem Kälberserum und um die je 1-prozentige Menge an Penicillin/Streptomycin (P/S) und Amphotericin B ergänzt wurde. Die VICs wurden vor den Experimenten zwei bis vier Passagen lang kultiviert. Der Medienwechsel lief im zweitägigen Rhythmus ab, bis die Zellen eine ca. 80-prozentige Konfluenz aufwiesen.

Für das Ossifikationsmedium wurden 2,8 mM anorganisches Phosphat verwendet, um eine Kalzifizierung zu induzieren (99). Über das Medium wurden die Zellen für zehn Tage mit je 1 µM S1P behandelt, bevor sie geerntet und analysiert werden konnten.

Die Kalzifizierung wurde mittels Alizarinrot-Färbung quantifiziert (105). Das Prinzip beruht auf einer Bindung des pH-gepufferten Farbstoffs mit Calciumionen. Zu Beginn wurde der Überstand der Zellkultur abgesaugt, sodass die Zellen mit destilliertem Wasser gewaschen werden konnten. Es folgte die Fixation der VICs mit 70%igem Ethanol über eine Stunde hinweg, wonach die Zellen mit Phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen wurden. Anschließend konnten die VICs für 30 Minuten mit 2-prozentiger Alizarinrot-Färbelösung inkubiert werden, worauf erneute Waschungen mit destilliertem Wasser folgten. Im nächsten Schritt wurde 10%ige Essigsäure für eine halbe Stunde appliziert.

Hiernach konnten die Zellen inklusive Überstand geerntet und in ein Eppendorf *Safe-Lock Tube*-Reaktionsgefäß (1,5 ml) pipettiert werden. Es folgte eine Erhitzung der Proben auf 85° C für zehn Minuten. Im Anschluss wurden jene fünf Minuten auf Eis platziert, um schließlich bei 15.000 g für 15 Minuten zentrifugiert zu werden. Der Überstand wurde abgenommen und mittels 1 mM Natriumhydroxid auf einen pH-Wert von ca. 4,5 neutralisiert. Die Absorption der Proben wurde bei 405 nm in einer 96-Well-Platte mit dem Plattenlesegerät FLUOstar Omega gemessen (106).

2.5.5 Dehnung von VICs

Ein zusätzlicher Ansatz war die Dehnung von VICs, um sie ähnlichen Scherbindungen, wie sie an der humanen Aortenklappe vorherrschen, auszusetzen. Als Kontrolle gelten VICs, die gleich kultiviert, jedoch nicht gedehnt wurden. In dem Versuchsansatz wurden die Zellen, wie zuvor in 2.5.4 beschrieben, behandelt, nur dass sie nach entsprechender Konfluenz-Generierung auf eine 6-*Well* Bioflex-Platte mit flexiblem Boden verteilt wurden. Der Boden der Kulturplatte war mit 0,05 mg/ml Fibronectin beschichtet.

Nach 24-stündiger Inkubation konnten die 6-*Well*-Platten dem Strecksystem „Flex Jr. Tension System“ ausgesetzt werden, das eine dem Herzschlag adäquate Druckwelle nachbildet. Für insgesamt 24 Stunden wurden die Zellen mit einer Frequenz von einer Schwingung pro Sekunde (= 1 Hz) gedehnt. So wurde eine Längendehnung von ca. 10 % erreicht. Die später mittels LC-MS gemessene S1P-Produktion basiert auf der Umwandlung von C17-Sphingosin zu C17-S1P. Um eine Korrelation zwischen S1P-Produktion und SphK1-Aktivität darzustellen, wurden VICs in zusätzlichen Versuchsansätzen mit dem SphK1-spezifischen Inhibitor PF-543 (10 µM) behandelt.

2.5.6 Induktion der murinen Aortenklappenstenose

Eine Woche vor entsprechender Induktion der AS begann die DOP-Behandlung der Mäuse aus der Gruppe B. Die Mäuse wurden zur Reduktion von Störfaktoren in einer zufälligen Abfolge operiert. Dem Operierenden war zu keiner Zeit bekannt, welcher Gruppe die Mäuse zuzuordnen waren, um einer Ergebnis-Verzerrung entgegenzuwirken.

Für das Vorgehen der Operation wurden bereits bestehende Protokolle genutzt (107,108). Die praktische Durchführung nahmen Doktorand*innen der Arbeitsgruppe im *Cardiovascular Research Laboratory* vor. Die Auswertung, Ergebnisdarstellung und wissenschaftliche Interpretation erfolgten im Rahmen dieser Dissertation.

Die Narkoseeinleitung wurde mit intraperitoneal injiziertem Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (10 mg/kg) vollzogen. Im weiteren Verlauf wurde die Narkose durch das Inhalationsanästhetikum Isofluran in 2%iger Dosierung aufrechterhalten. Es

folgte die Freilegung der rechten Halsschlagader, in die ein Koronardraht eingeführt und mittels Ultraschall-gestützter Wegleitung bis auf Aortenklappen-Höhe vorgeschoben wurde. An dieser Stelle wurde der Draht mehrfach rotiert, bevor die Arterie ligiert wurde.
Im Anschluss wurden die Mäuse bis drei Tage nach Operation mit Buprenorphin (0,1 mg/kg) zur Schmerzreduktion behandelt.

2.5.7 Murine Echokardiografie

Die echokardiografischen Daten dienen der Darstellung der Herzfunktion sowie Geschwindigkeitsmessung über der Aortenklappe. Sie wurden vier Wochen nach AS-Induktion erhoben, sodass mögliche Verfälschungen der Parameter durch sekundäre Prozesse, wie Fibrosierung oder Dilatation, vermieden wurden. Vor der Bildgebung wurden die Mäuse auf ein Wärmekissen gelegt, sodass eine konstante Körpertemperatur von ca. 37 °C sichergestellt werden konnte. Es erfolgte ein kontinuierliches Monitoring von Atemfrequenz und in Form eines EKGs. Des Weiteren wurden sie mit 1,5%igen Isofluran sediert. Durch eine Enthaarung des Brustkorbs mittels Enthaarungscreme konnte eine optimale Bildgebungsqualität suggeriert werden. Die Darstellung zur Erhebung der Spitzengeschwindigkeit über der Aortenklappe erfolgte in suprasternaler Ansicht mittels Pulswellen-Doppler mit einer Winkelkorrektur zwischen 45 und 55 Grad. Zum Einsatz kam das Ultrahochfrequenzgerät Visualsonics Vevo 3100 mit hochauflösendem Ultraschallwandler (18-38 MHz). Die Messung der linksventrikulären EF sowie des linksventrikulären Innendurchmessers konnte in der parasternal langen Achse mit der Vevo LV-*Trace*-Funktion durchgeführt werden. Andere Parameter, wie die KÖF und Klappenmorphologie, wurden in parasternal langen und kurzen Achsen sowie apikalen Ansichten erhoben. Anschließende Analysen wurden mit der Hersteller-Software durchgeführt. In einer Re-Evaluation der Aortenklappe nach vier Wochen wurden drei Mäuse von weiteren Analysen ausgeschlossen, da sie im Farbdopplermodus in der parasternal langen Achse eine schwere Aortenklappeninsuffizienz aufwiesen.

Die KÖF wurde anhand der Kontinuitätsgleichung bestimmt. Hierbei ist die grundlegende Annahme, dass der Fluss über der Aortenklappe dem des linksventrikulären Ausflusstraktes (LVOT) entspricht. Aus dieser Basis ergibt sich folgende Formel:

$$LVOT\ Durchmesser^2 \times VTI\ (LVOT) = K\ddot{O}F\ \times VTI\ (Aortenklappe)$$

Das *Velocity-Time-Integral* (VTI) des LVOT wurde mittels *Pulsed Wave* Doppler und das der Aortenklappe mittels *Continuous Wave* Doppler gemessen. Um nun die KÖF zu bestimmen, wurde die zuvor eingeführte Formel entsprechend umgestellt:

$$K\ddot{O}F\ (cm^2) = \frac{LVOT\ Durchmesser^2 \times VTI\ (LVOT)}{VTI\ (Aortenklappe)}$$

2.5.8 Histologische Färbung und Auswertung

Zwölf Wochen nach Induktion der AS wurden die Mäuse tierschutzgerecht getötet und mit kaltem PBS perfundiert. Der Zeitpunkt orientierte sich an dem hier vollständig ausgeprägten *Remodelings* bei chronischer Druckbelastung. Nach Entnahme der Herzen wurden jene in 4%igen Paraformaldehyd bei 4 °C fixiert. Es folgte eine Dehydrierung in 30%iger Saccharose und Einbettung in Tissue Tek. Mit dem Kryotom Leica CM3050 wurden 8µm dicke Schnitte angefertigt, die anschließend mit 2%igen Alizarinrot angefärbt und nach fünf Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen, dehydriert und gesäubert wurden. Daraufhin wurden die Herzen getrocknet und mit H-5000 eingebettet.
Neben der Alizarinrot-Färbung wurde zusätzlich die modifizierte von-Kossa-Färbung nach den Anweisungen des Herstellers ScyTek *Laboratories* durchgeführt. Die Darstellung der angefärbten Schnitte wurde mittels Leica Hellfeldmikroskop DM4000M unter 20-facher Vergrößerung visualisiert. Die Messung der Dicke der Klappen wurde an der dicksten Stelle mittels ImageJ-Software umgesetzt. Diese kam ebenfalls zum Einsatz, um die Verkalkungen sowie Klappenfläche auszumessen, wodurch der prozentuale verkalkte Anteil an der gesamten Klappe berechnet werden konnte.

2.5.9 Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden mit der Software SPSS®-*Statistics* 25 und GraphPad-Prism® 8 durchgeführt. Der Vergleich normalverteilter Zufallsvariablen erfolgte via t-Test. Nicht normalverteilte Variablen, also speziell kleinere Stichproben, wurden hingegen mittels Mann-Whitney-U-Test analysiert. Die Ergründung, ob eine Normalverteilung vorlag, unterlag den Analysen mittels Kolmogorov-Smirnov-Tests. Um zu prüfen, ob die Varianzen von zwei oder mehr Gruppen gleich waren, kam der Levene-Test zum Einsatz.

Sofern eine Homogenität der Varianz vorlag, wurde zum Vergleich von drei oder mehr Gruppen die Varianzanalyse (ANOVA) herangezogen. Als Post-Hoc-Test wurde der Tukey-Test verwendet, wenn ein signifikanter F-Test festgestellt wurde, was auf einen Unterschied zwischen mindestens zwei Gruppenmittelwerten hindeutet. Bei zweifaktorieller ANOVA kam als Post-Hoc-Test alternativ zum Tukey-Mehrfachvergleich die Šidák-Korrektur zum Einsatz. Sofern jedoch keine Homogenität der Varianz vorlag, wurde der Welch-Test durchgeführt, welcher Aufschluss darüber gab, ob sich die Mittelwerte zweier unabhängiger Gruppen voneinander unterschieden. Als Ergänzung wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet, um Unterschiede zwischen drei oder mehr Gruppen zu vergleichen.

Zu den analysierten Daten wurde der Mittelwert mit der dazugehörigen Standardabweichung (SD) angegeben. Eine Ausnahme stellten die Diagramme dar, die einen zeitlichen Verlauf innehielten. Hier wurde der Mittelwert mit dem dazugehörigen Standardfehler (SEM) verwendet, da dieser eine präzisere Aussage über die Unsicherheit des geschätzten Mittelwerts des Kollektivs trifft. Eine Signifikanz der Ergebnisse wurde angenommen, wenn ein p-Wert $< 0{,}05$ vorlag.

3 Ergebnisse

3.1 Die Scherkräfte sowie maximale Flussgeschwindigkeit nehmen bei Aortenklappenstenose zu

Die Pathologie der AS bezieht sich grundsätzlich auf veränderte Flussgeschwindigkeiten, die wegen der Verengung auf Klappenebene das Herz-Kreislauf-System beeinträchtigen. Um die kardiale Beanspruchung bei AS zu analysieren, wurde ein Patientenkollektiv von insgesamt 22 Patient*innen herangezogen, die eine kardiale MRT erhielten. Das Kollektiv bestand aus elf Kontrollproband*innen und elf Patient*innen mit schwerer AS. In der Kontrollgruppe lag das Alter bei 64,9 ± 5,7 Jahren. 36,4 % von ihnen waren weiblich. Die MRT-Bilder ergaben ein durchschnittliches linksventrikuläres enddiastolisches Volumen (LVEDV) von 129,7 ml, ein SV von 79,4 ml und eine EF von 61,2 %. In der Patientengruppe mit AS III lag ein mittleres Alter von 80,2 ± 5,2 Jahren vor. Hier nahm das weibliche Geschlecht einen Anteil von 63,4 % ein. Das durchschnittliche LVEDV lag bei 125,9 ml, das SV bei 80,9 ml und die EF bei 64,5 %. Wie Tabelle 7 zu entnehmen ist, lag hinsichtlich der erhobenen Parameter kein Unterschied zwischen den Gruppen vor. Zusätzliche Patientencharakteristika sind in Tabelle 3 aufgeführt.

	Kontrolle	**AS III**	**p-Wert**
Messwerte der MRT			
LVEDV [ml]	129,7 ± 17,7	125,9 ± 22,6	0,665
SV [ml]	79,4 ± 12,3	80,9 ± 14,5	0,796
EF [%]	61,2 ± 4,3	64,5 ± 6,0	0,154

Tabelle 7: MR-Daten der Patient*innen mit oder ohne schwere AS.

Ein weiterer Parameter, der neben der Flussgeschwindigkeit zur Beurteilung der Beanspruchung der Klappe herangezogen werden kann, ist die Scherkraft. Diese wird durch Verschiebung der Klappenschichten gegeneinander verursacht. Um hier einen Zusammenhang herzustellen, wurden neben der maximalen Flussgeschwindigkeit (v_{max}) auch die zirkumferentiellen (WSS_{zirk}) und axialen (WSS_{ax}) Scherkräfte in den MRT-Bildern gemessen. Die Flussgeschwindigkeit hatte in der Kontrollgruppe einen mittleren Wert von 158,6 ± 49,07 cm/s, wobei der niedrigste Wert bei 114,6 cm/s und der höchste Wert bei 285,9 cm/s lag. Im Vergleich zeigte

sich in der Gruppe der Erkrankten eine mehr als verdoppelte Flussgeschwindigkeit auf 336,8 ± 63,86 cm/s bei einem Minimum von 271,8 cm/s und einem Maximalwert von 459,9 cm/s. Eine signifikante Erhöhung der maximalen Flussgeschwindigkeit bei AS ist bereits zuvor vielfach beschrieben und im Rahmen der pathophysiologischen Grundlage der Verengung der Aortenklappe mit resultierendem beschleunigtem Blutstrom durch die reduzierte Öffnungsfläche zu erwarten. Somit ist die Erhebung der Flussgeschwindigkeit als interne Kontrolle zu werten.

Im Fokus der MR-grafischen Datenerhebung stand die Auswertung der bislang kaum beschriebenen Scherkräfte. Die zirkumferentiellen Scherkräfte lagen bei den Kontrollproband*innen durchschnittlich bei 1,47 ± 0,56 Pa. Das Minimum befand sich bei 0,88 Pa, während das Maximum bei 2,64 Pa war. In der AS III-Gruppe wurde der mittlere Wert bei 2,94 ± 1,4 Pa gemessen. Der geringste Wert belief sich auf 1,24 Pa. Daneben wurde eine maximale Spannung von 3,93 Pa ermittelt. Zuletzt wurden die axialen Scherkräfte beurteilt. In der Kontrollgruppe lagen diese durchschnittlich bei 1,38 ± 0,56 Pa mit Höchstwerten bei 2,22 Pa und Tiefstwerten bei 0,62 Pa. Bei den Proband*innen mit AS III erreichten die axialen Scherkräfte minimale Werte von 1,13 Pa sowie maximale Werte von 6,67 Pa. Im Durchschnitt wurde eine Spannung von 3,16 ± 1,62 Pa ermittelt. Die p-Werte sind der Abbildung 5 zu entnehmen.

Abschließend lässt sich sagen, dass die MRT-Daten signifikante Erhöhungen der maximalen Flussgeschwindigkeit als auch der Scherkräfte bei Vorliegen einer AS ergeben haben. Im Fokus stehen hierbei die bisher kaum untersuchten Scherkräfte. Bei AS herrschen verdoppelte zirkumferentielle Scherkräfte, auf axialer Ebene konnte eine 2,3-fache Zunahme nachgewiesen werden.

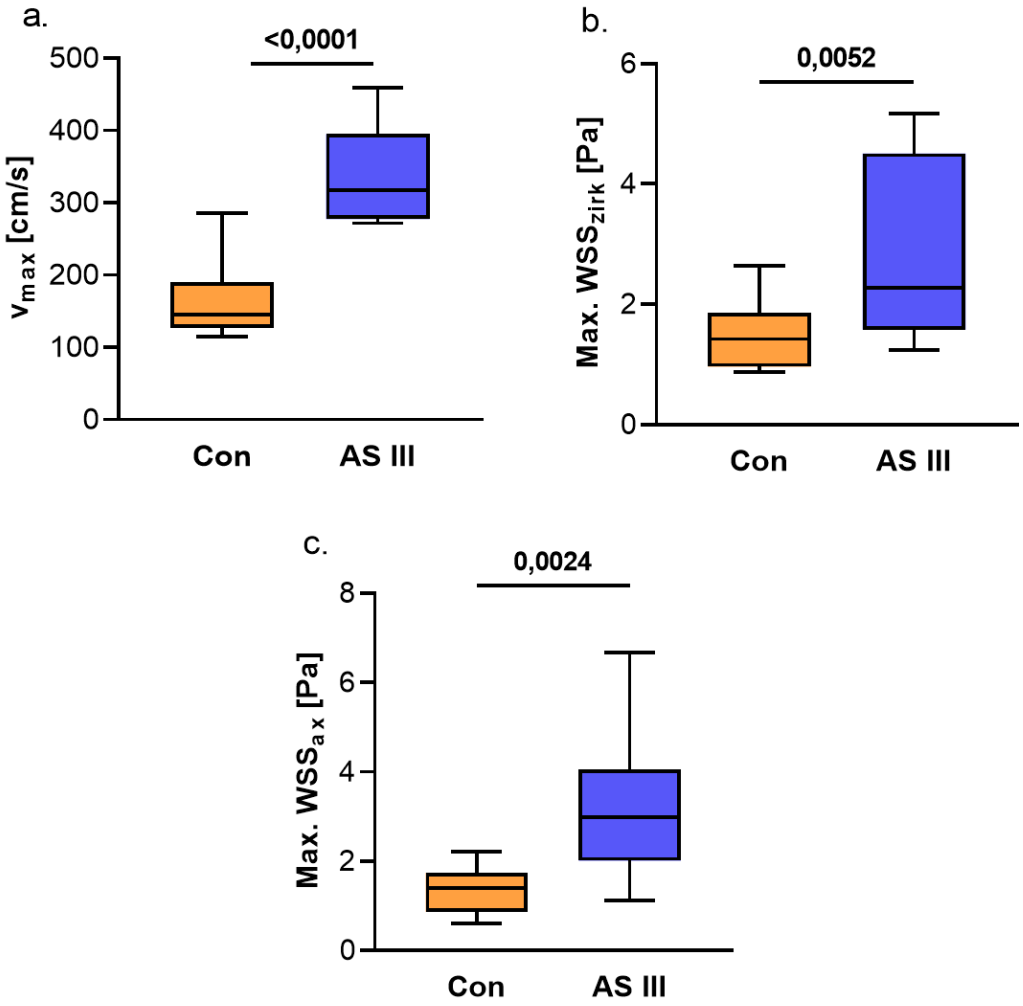


Abb. 5: Vermessung der MRT-Bilder; a. maximale Flussgeschwindigkeit (p <0,0001), b. maximale zirkumferentielle Scherkraft (p = 0,052) und c. maximale axiale Scherkraft (p = 0,0024) sind bei Patient*innen mit AS III (n = 22, Mann-Whitney-U-Test) deutlich erhöht.

3.2 In kalzifizierten Klappen besteht eine erhöhte S1P-Konzentration

Ein weiterer Grundgedanke bestand in der Annahme, dass eine S1P-Erhöhung in stenosierten Aortenklappen vorliegt. Um hier einen Bezug generieren zu können, wurden die S1P-Spiegel sowohl in gesunden als auch kalzifizierten Aortenklappen gemessen und miteinander verglichen. Das Patientenkollektiv wird in Tabelle 4 dargestellt. Das mittlere Alter lag in der Kontrollgruppe bei 63,3 ± 2,5 Jahren. 14,3 % von ihnen waren weiblich. Vor allem arterieller Bluthochdruck (71,4 %), KHK (57,1 %) und Dyslipoproteinämie (57,1 %) waren als kardiovaskuläre Risikofaktoren vorrangig vorzufinden. In der Patientengruppe mit AS

lag ein durchschnittliches Alter von 65,6 ± 8,3 Jahren vor. Hier nahm das weibliche Geschlecht einen Anteil von 16,7 % ein. Die beiden mit Abstand am häufigsten vorkommenden kardiovaskulären Risikofaktoren waren die KHK (58,3 %) sowie arterielle Bluthochdruck (50,0 %). Hinsichtlich der patientenbezogenen Daten lag kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen vor.

Die S1P-Konzentration wurde anhand LC-MS bestimmt und analysiert. Hier zeigte sich eine durchschnittliche S1P-Konzentration der Kontrollgruppe bei 1,43 ± 0,44 pmol/mg mit Tiefstwerten bei 0,99 pmol/mg und Höchstwerten bei 2,29 pmol/mg. Der mittlere Wert in der Gruppe der kalzifizierten Aortenklappen lag bei 3,73 ± 2,64 pmol/mg und war somit um den 2,6-fachen Faktor höher als in der Kontrollgruppe. Hier befanden sich der niedrigste Wert bei 1,21 pmol/mg und der höchste Wert bei 8,33 pmol/mg (Abbildung 6).

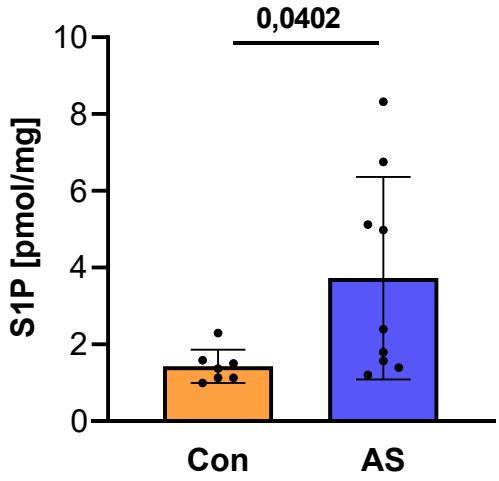


Abb. 6: Bestimmung der S1P-Spiegel in Aortenklappen-Gewebe. Die Konzentration ist bei kalzifizierten Klappen ca. 2,6-fach höher als in der Kontrollgruppe (p = 0,0402).

3.3 Die Klappenstenosierung führt zu einer Hochregulation der S1P-bildenden SphK1

Nachdem erhöhte S1P-Spiegel in kalzifizierten Klappen dargestellt werden konnten, galt der nächste Arbeitsschritt dem dafür verantwortlichen Enzym. Mittels PCR erfolgte eine Analyse der Genexpression der SphK1, also dem Enzym, welches die Reaktion von Sphingosin zu S1P katalysiert. Wie in Abbildung 7 dargestellt, konnte gezeigt werden, dass verglichen zu der Kontrollgruppe eine durchschnittlich dreifach höhere Genexpression der SphK1 in den stenotischen Klappen vorlag.

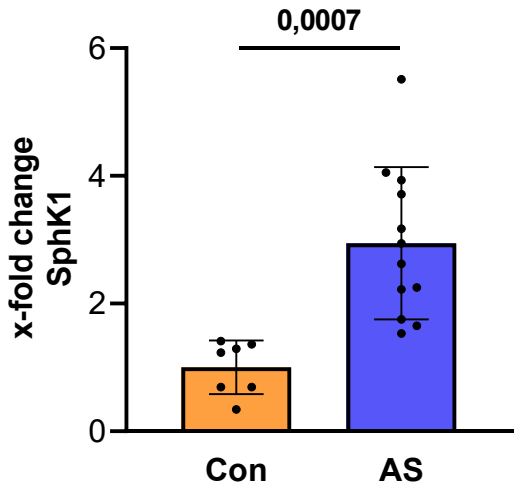


Abb. 7: PCR-Auswertung der x-fold change von SphK1 in Aortenklappen-Gewebe. Die Genexpression der SphK1 ist im Vergleich zur Kontrollgruppe in kalzifizierten Klappen um einen ca. 2,9-fachen Faktor erhöht (p = 0,0007).

3.4 Die systemische S1P-Freisetzung ist bei Aortenklappenstenosierung unverändert

Im nächsten Schritt wurde der S1P-Spiegel im Plasma von 118 Patient*innen bestimmt, um zu analysieren, ob die zuvor nachgewiesene erhöhte S1P-Bildung in kalzifizierten Klappen ebenfalls zu einer Zunahme der S1P-Spiegel im Blut führt. Das Patientenkollektiv wurde in 59 Kontrollproband*innen und 59 Patient*innen mit schwerer AS unterteilt. Die Patientencharakteristika werden in Tabelle 5 dargestellt. Das Durchschnittsalter lag in der Kontrollgruppe bei 79 ± 8 Jahren. Das weibliche Geschlecht nahm einen 39%igen Anteil ein. Primär vorliegende kardiovaskuläre Risikofaktoren waren arterieller Bluthochdruck (79,7 %), koronare Herzerkrankung (66,1 %) und Diabetes mellitus (55,9 %). In der Kohorte der Patient*innen mit AS Grad III lag das mittlere Alter bei 79 ± 10 Jahren. 37,3 % von ihnen waren Patientinnen. Ähnlich wie bei der Kontrollgruppe waren die mit Abstand am häufigsten vertretenen kardiovaskulären Risikofaktoren arterieller Bluthochdruck mit 78 %, KHK mit 64,4 % und Diabetes mit 57,6 %. Die erhobenen Patientencharakteristika weisen keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen auf.

Die grundlegende Fragestellung war hierbei, ob die erhöhten Werte, die man zuvor in den kalzifizierten Klappen nachgewiesen hat, ebenfalls im Blut darzustellen sind. Trotz lokaler S1P-Unterschiede zeigten sich ähnliche systemische S1P-

Spiegel zwischen den Gruppen, sodass sich kein Hinweis auf einen signifikanten Unterschied in den zirkulierenden S1P-Konzentrationen ergab (p = 0,3134). Der Mittelwert in der Kontrollgruppe lag bei 1,01 µM, während jener in der Gruppe mit AS bei 1,05 µM lag (Abbildung 8).

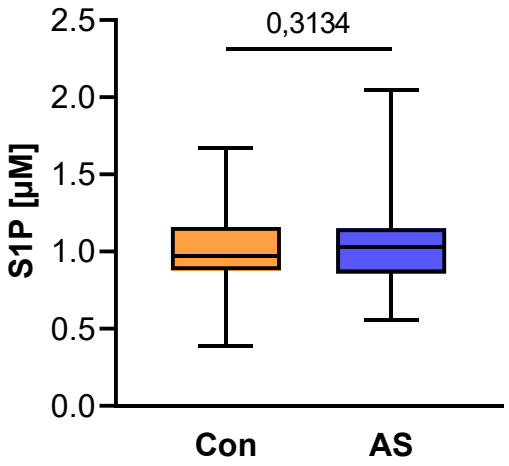


Abb. 8: Messung des zirkulierenden S1P im Plasma. Es kann kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (p = 0,3134).

3.5 Die Dehnung von VICs führt zu einer vermehrten SphK1-Genexpression sowie lokalen S1P-Konzentrationen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass erhöhte S1P-Spiegel sowie eine vermehrte SphK1-Genexpression in kalzifizierten Zellen, jedoch nicht systemisch nachgewiesen werden können, wurde im nächsten Schritt der Fragestellung nachgegangen, ob speziell die Zunahme der Scherkräfte durch Dehnung der Klappenzellen einen S1P-Anstieg auslösen. Hierzu kam es zur Auswertung der VICs, die für einen Tag mit einer Frequenz von einer Schwingung pro Sekunde gedehnt wurden.

Zunächst wurde mittels PCR die Genexpression der SphK1 zwischen unbehandelten und gedehnten VICs analysiert. Dabei zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression der SphK1 in den gedehnten VICs (Abbildung 9).

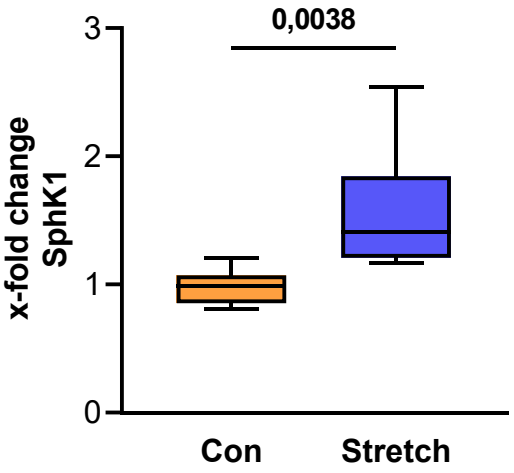


Abb. 9: PCR-Auswertung der x-fold change von SphK1 in VICs. Die Genexpression der SphK1 ist im Vergleich zur Kontrollgruppe um einen ca. 1,6-fachen Faktor erhöht (p = 0,0038).

Sowohl die Kontrollreihen als auch die gedehnten VICs wurden in einem weiteren Ansatz mit dem SphK1-Antagonisten PF-543 behandelt. Darauf folgte die Bestimmung der C17-S1P-Menge in den Zellen via LC-MS. Um lediglich das neu gebildete S1P und nicht das in den Zellen ohnehin vorliegende S1P zu messen, kam es speziell zur Verwendung des C17-Vorläufermoleküls. Hierdurch können Unterschiede in der S1P-Konzentration ausschließlich durch eine veränderte S1P-Bildung begründet werden.

Im direkten Vergleich der Kontrollgruppe und der gedehnten VICs fiel auf, dass signifikant höhere C17-S1P-Konzentrationen nach Stretching-Ansatz vorlagen (p <0,0001). Der mittlere Wert der Kontrollgruppe lag bei 514,9 ± 280,9 pmol/10^6 Zellen, während ein verdoppelter Wert in der gedehnten Gruppe bei 1.052,3 ± 350,4 pmol/10^6 Zellen vorzufinden war. Nach Hinzugabe des SphK1-spezifischen Inhibitors PF-543 konnte man sowohl in der Kontroll- als auch Stretch-Gruppe einen Rückgang der C17-S1P-Konzentration sehen. In der Kontrollgruppe lag der mittlere Wert nach PF-543-Gabe bei 6,64 ± 2,86 pmol/10^6 Zellen. In der Gruppe der gedehnten VICs lag der Wert nach Inhibitor-Gabe bei 9,1 ± 5,79 pmol/10^6 Zellen. Dies bedeutet einen Rückgang um den 78-fachen und 116-fachen Faktor (Abbildung 10).

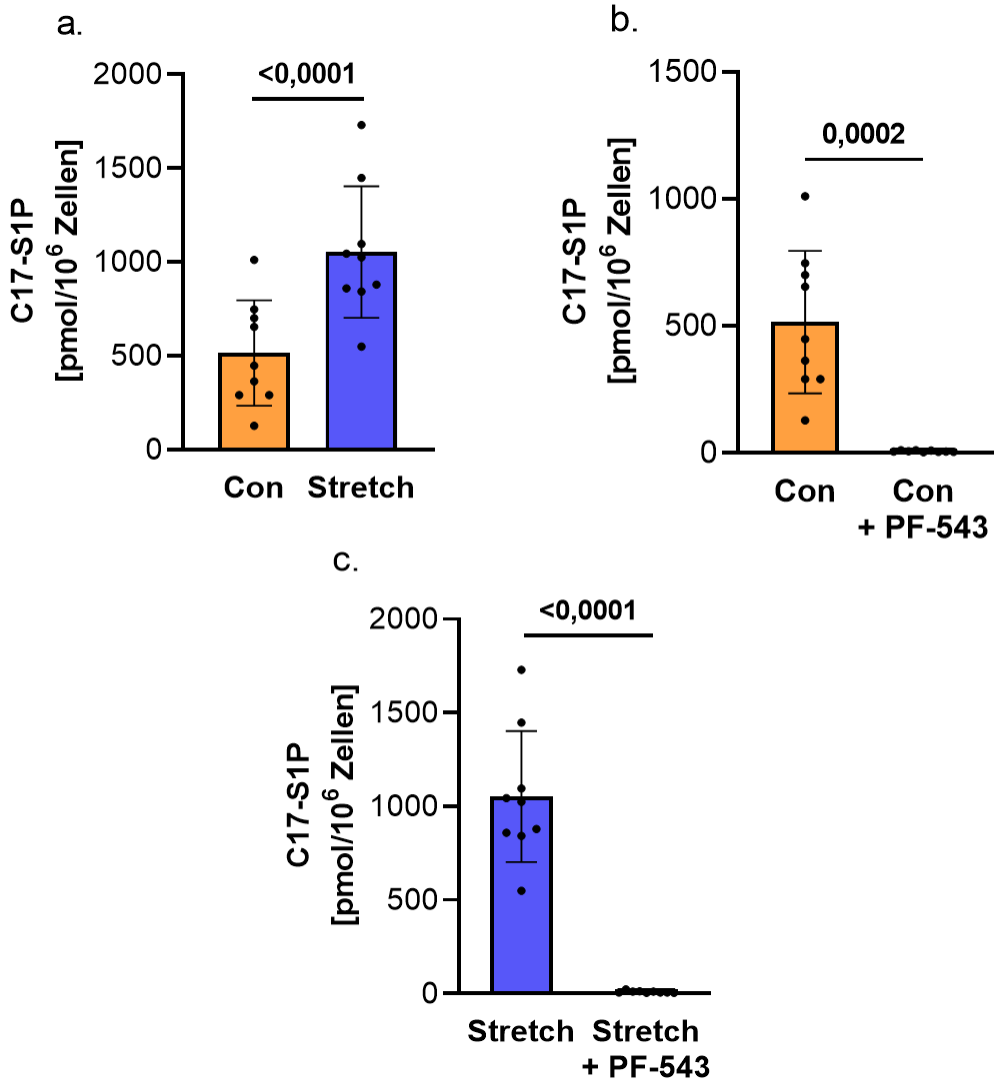


Abb. 10: C17-S1P-Konzentration in VICs; a. Erhöhte Konzentrationen bei gedehnten VICs (p <0,0001); b./c. Rückgang nach PF-543-Behandlung sowohl in Kontrollgruppe als auch in Stretching-Ansatz (b.: p = 0,0002; c.: p <0,0001).

3.6 Erhöhte S1P-Spiegel führen im Mausmodell zu einer verstärkten Progression der AS

Im letzten Versuchsansatz wurde der Einfluss von erhöhten S1P-Spiegeln in Bezug auf den Stenose-Progress untersucht. Hierzu wurden insgesamt 50 Mäuse einer Kontroll- und einer Behandlungsgruppe zugeteilt, in der sie entweder keine (Gruppe A) oder eine DOP-Prämedikation (Gruppe B) vor Induktion der AS erhalten haben (vgl. 2.1/2.3). DOP ist ein S1P-Lyase-Inhibitor, sodass eine einwöchige Prämedikation vor der Intervention zu erhöhten S1P-Spiegeln in der

Klappe führte. Zu Analysezwecken wurde sowohl auf echokardiografische als auch histologische Methoden zurückgegriffen.

Zunächst steht die Überlebensrate der Mäuse über einen Zeitraum von vier Wochen nach OP im Fokus. Von ursprünglich 22 Mäusen in der Kontrollgruppe waren nach vier Wochen noch 20 am Leben, was ein Überleben von 91 % bedeutete. In der DOP-Behandlungsgruppe starben von den ursprünglich 25 Mäusen insgesamt 9 Mäuse, was ein Überleben von 64 % und somit eine um den 1,4-fachen Faktor erhöhte Sterblichkeit ergab (Abbildung 11).

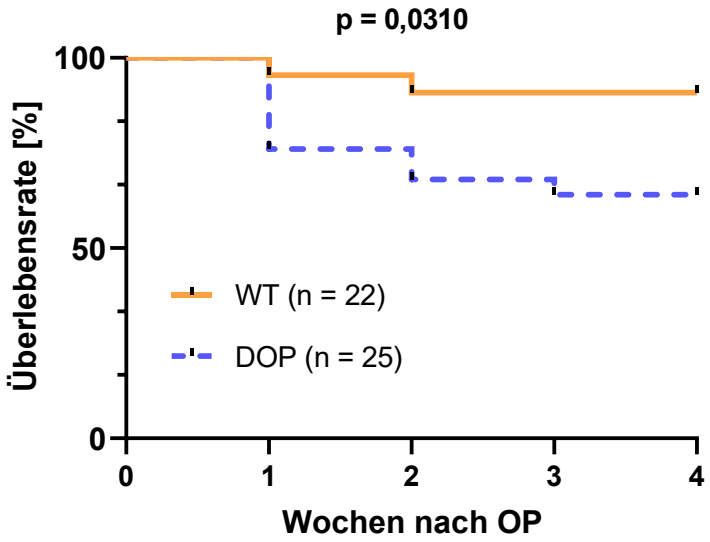


Abb. 11: Überlebensrate nach AS-Induktion. Nach vier Wochen ist eine 1,4-fach erhöhte Sterblichkeit in der Gruppe der mit dem S1P-Lyase-Inhibitor DOP (p = 0,0310) behandelten Mäuse zu vermerken.

Vier Wochen nach AS-Induktion wurden als echokardiografische Parameter die EF, die KÖF, die Masse des linken Ventrikels, der linksventrikuläre Innendurchmesser (LVID) sowie die maximale Flussgeschwindigkeit (v_{max}/KÖF) und der mittlere Druckgradient (Δp_{mean}/KÖF) erhoben.

Sowohl die EF als auch KÖF waren in der Gruppe der DOP-Behandlung signifikant reduziert. Die KÖF war hierbei in Gruppe B um den 1,27-fachen Faktor niedriger als in Gruppe A. Andere Parameter, wie die maximale Flussgeschwindigkeit sowie der mittlere Druckgradient, waren in Gruppe B signifikant erhöht. Vor allem die maximale Flussgeschwindigkeit stach heraus, da sie in der Behandlungsgruppe 1,25-fach höher war. Die LV-Masse sowie der linksventrikuläre Durchmesser waren im Vergleich unverändert (Abbildung 12).

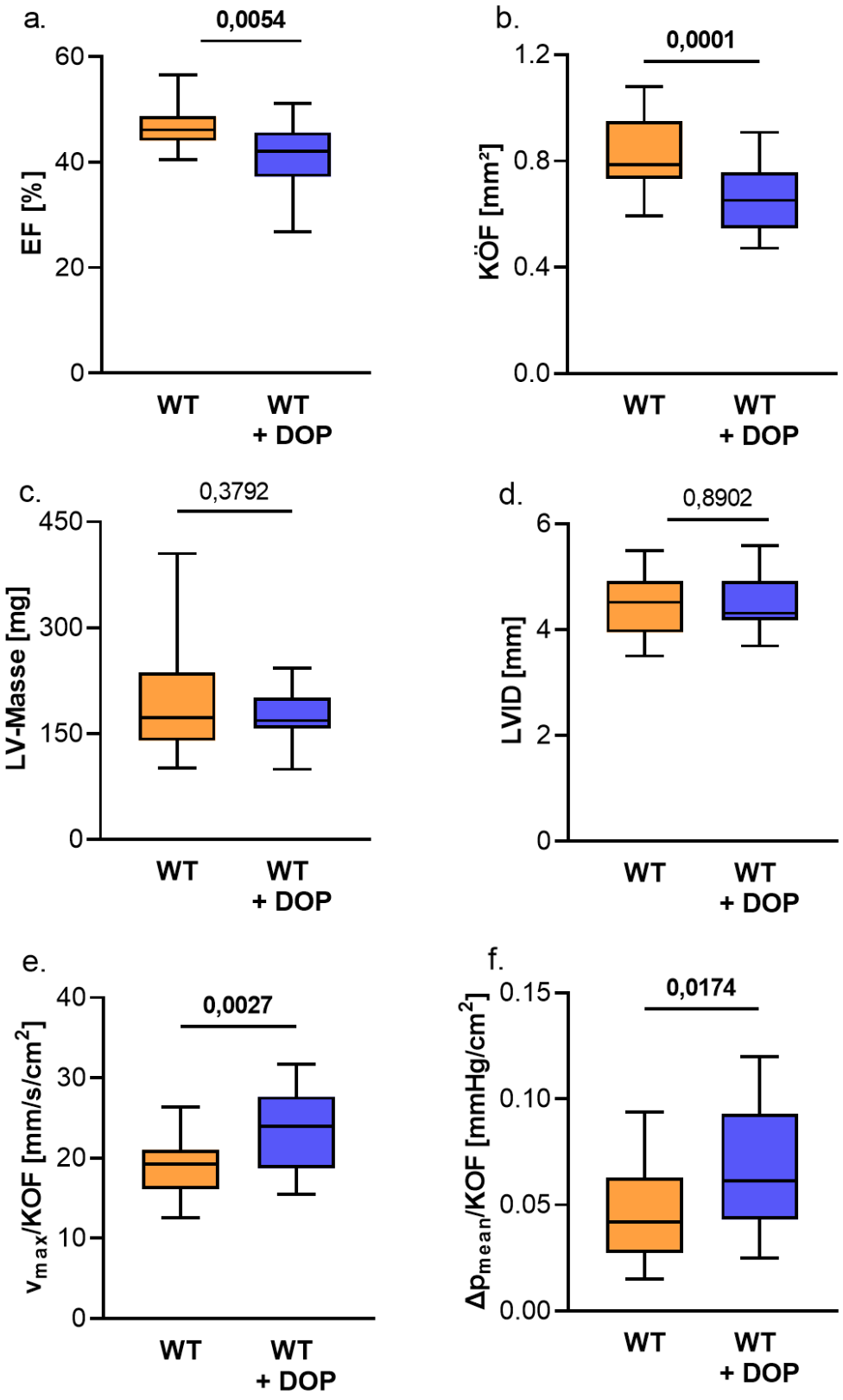


Abb. 12: Echokardiografische Daten. Verminderte a. EF (p = 0,0054) und b. KÖF (p = 0,0001) in Gruppe B; keine signifikante Veränderung in c. LV-Masse (p = 0,3792) sowie d. LVID (p = 0,8902); Zunahme von e. Flussgeschwindigkeit (p = 0,0027) und f. mittleren Druckgradienten (p = 0,0174).

Zwölf Wochen nach AS-Induktion wurde die Segeldicke der Aortenklappe auf histologischer Ebene beurteilt. Es fiel bereits in der mikroskopischen Übersicht eine Zunahme der Segeldicke in der Interventionsgruppe auf, beispielhaft ist diese in Abbildung 13 dargestellt.

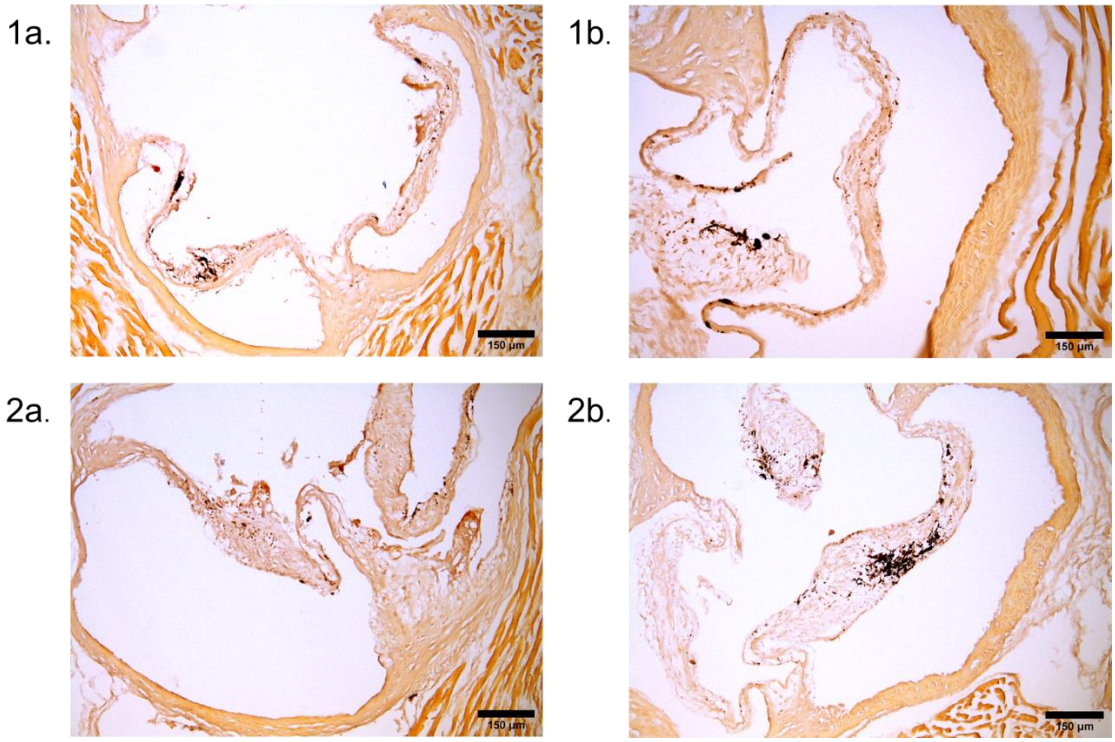


Abb. 13: Histologische Darstellung der Aortenklappe nach Alizarinrot-Färbung, 20-fache Vergrößerung (1a/b = WT, 2a/b = WT + DOP). Im Vergleich der Versuchsgruppen ergab sich eine Verdickung der Segel nach DOP-Behandlung.

In der Kontrollgruppe lag die durchschnittliche Dicke bei 128,9 ± 28,7 µm mit einem Minimum bei 96,7 µm und einem Maximum bei 163,8 µm. In der Behandlungsgruppe hingegen war der Mittelwert von 175,9 ± 14,4 µm signifikant höher ($p = 0,0112$) mit der geringsten Dicke bei 162,9 µm und der größten Dicke bei 199,1 µm. Somit waren die Segel nach DOP Behandlung um den 1,3-fachen Faktor dicker als in der Kontrollgruppe (Abbildung 14).

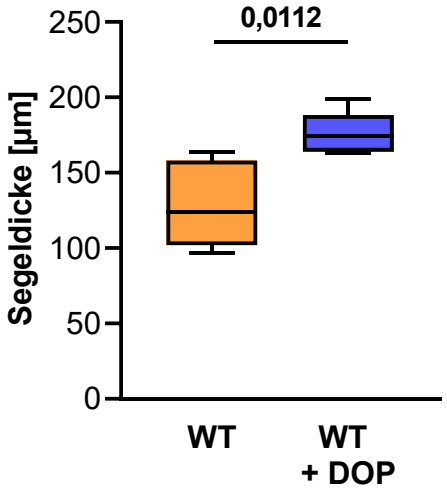


Abb. 14: Histologische Betrachtung der Segeldicke der Aortenklappe. Signifikante Verdickung bei Prämedikation mit DOP (p = 0,0112).

4 Diskussion

In dieser Arbeit konnte ein *Circulus vitiosus* in der Progression der AS identifiziert werden. Eine jene Stenose bedeutet eine große Mehrbelastung im Sinne erhöhter Scherbeanspruchung der Klappenzellen, die hierauf mit einer Hochregulation der SphK1 und somit S1P-Bildung reagieren. Erhöhte S1P-Spiegel sind wiederum mit einer Stenosierung assoziiert, sodass ein weiteres Voranschreiten der Aortenklappenverengung begünstigt wird.

In der Entwicklung der AS stehen Kalzifizierungsprozesse im Vordergrund, da sie maßgeblich an der Verhärtung der Klappe beteiligt sind (109). Auf molekularer Ebene führen verschiedene Signalwege dazu (110), dass die Transkriptionsregulatoren BMP-2 und RUNX2 (*Runt-related transcription factor* 2) angesteuert und somit die Osteoblasten-Aktivität erhöht wird (111).

Ein weiterer osteoblastisch wirkender Mediator ist S1P. Dieses gehört zur Klasse der Sphingolipide mit amphiphilen, also sowohl hydrophilen als auch lipophilen, Eigenschaften (112). Auf struktureller Ebene wird S1P generiert, indem Sphingosin mittels SphK1 und SphK2 phosphoryliert wird, wobei SphK1 anabole Prozesse wie Zellproliferation und SphK2 katabole Abläufe wie Apoptose fördert. Als Gewebshormon wirkt S1P unter anderem auf Angiogenese, Proliferation sowie Zellwachstum (113). Es konnte gezeigt werden, dass S1P im Knochen über den S1PR2-Rezeptor ähnlich wie die drei Signalwege an der Aortenklappe zu Kalzifikation führte (114). Auf Grund dieser Eigenschaft rückte S1P in den Fokus möglicher Faktoren, die den Progress der AS vorantreiben.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der S1P-Spiegel in kalzifizierten Klappen erhöht ist. Dies steht in Einklang mit dem Ergebnis der PCR-Analyse, welche eine vermehrte Genexpression von SphK1 in Klappengewebe zeigte. SphK1 ist das Enzym, welches Sphingosin an seiner Hydroxylgruppe ATP-abhängig zu S1P phosphoryliert. Es hat eine intrinsische Enzymaktivität, wird jedoch auch von Signalmolekülen wie Wachstumsfaktoren oder proinflammatorischen Zytokinen aktiviert (115). Somit passt die gesteigerte Genexpression von SphK1 zu dem erhöhten S1P-Spiegel bei AS. Eine systemische Erhöhung von S1P im Blut kann hingegen nicht gezeigt werden. Dies könnte in Verbindung mit der raschen hepatischen Eliminierung von S1P durch den effizienten Abbau mit-

tels S1P-spezifischer Phosphatasen oder Lysolipidphosphat-Phosphatasen stehen (116). Zusätzlich sollte ein Verdünnungseffekt diskutiert werden. Demnach würden lokale Spiegel-Erhöhungen auf Klappenebene keine quantifizierbaren Unterschiede in der Zirkulation ausmachen.

Ein zusätzlich entscheidender Faktor bei Betrachtung der AS ist, dass diese einen signifikanten Einfluss auf das hämodynamische Umfeld der Aorta hat und abnorme Strömungsmuster hervorrufen kann (117). Es ist bekannt, dass die maximale Flussgeschwindigkeit mit zunehmendem Schweregrad der AS zunimmt, sodass selbst im distalen Aortenbogen turbulente Strömungsverhältnisse nachgewiesen werden können (118). Ein wenig erforschter Parameter im Zusammenhang mit der AS ist die zirkumferentielle sowie axiale Scherkraft. Bekanntlich setzen veränderte Scherkräfte pathologische Reize, die zu einer Modifikation im Bereich Genexpression und Funktionsfähigkeit der Endothelzellen führen (119). Die erhobenen MRT-Bilder zeigen, dass auch bei der AS eine erhöhte Scherkraft im Vergleich zu gesunden Proband*innen zu vermerken ist. Aus der bisherigen Datenlage geht jedoch nicht hervor, ob bei bestehender Stenose die bereits veränderte Hämodynamik einen zusätzlichen negativen Einfluss auf den Progress der Klappenkalzifizierung hat.

Somit sind zwei grundlegende Gedanken zur Entstehung der AS gefasst. Zum einen ist S1P ist ein Signalmolekül, dass die AS-Pathogenese fördert. Zum anderen herrschen erhöhte Scherkräfte bei AS. Um eine Verbindung zwischen diesen beiden Aspekten herzustellen, kam die Methode der Dehnung von VICs zum Einsatz. VICs sind die am häufigsten vertretenen Zellen im Klappengewebe. In ihrer Funktion der Aufrechterhaltung der strukturellen Unversehrtheit der Klappe sind sie in allen drei histologischen Klappenebenen vorzufinden (17). Bei Erkrankungen der Herzklappen kommt es neben der Neovaskularisation auch zur Anhäufung von VICs und Entzündungszellen, die in ihrer gesamten Formation zur Fibrosierungs- und Kalzifizierungsprozessen beitragen (120). Eine beliebte Methode, um die Reaktion von VICs im menschlichen Organismus nachzustellen, ist das Stretching-System im Sinne der zuvor beschriebenen FlexCell-Behandlung (16). Es ist bekannt, dass dies zu einem Anstieg von Markern der Kalzifizierung wie Osteocalcin und Osteopontin führen (121).

In dieser Arbeit zeigt sich, dass die C17-S1P-Spiegel nach Dehnung signifikant erhöht sind. C17-S1P stellt als Vorläufermolekül von S1P den Standard zur

Quantifizierung der S1P-Bildung in Gewebeproben dar. Es ermöglicht die Differenzierung des neu gebildeten S1P in Abgrenzung zum ohnehin bestehenden S1P. Die nachgewiesene Erhöhung der C17-S1P-Spiegel bedeutet demnach, dass speziell die Dehnung in Analogie zu den erhöhten Scherkräften an der kalzifizierten Klappe und somit auch die erhöhten Scherkräfte bei AS zu einer S1P-Anreicherung im Gewebe führen. Weiterhin stellt sich die Frage, welches Enzym die Mehrproduktion von S1P katalysiert. Passend dazu ergaben die PCR-Ergebnisse eine 1,6-fache Steigerung der Genexpression der SphK1. Zudem zeigte sich unabhängig vom Dehnungszustand ein nahezu vollständiger Rückgang der S1P-Bildung in kalzifizierten VICs nach Behandlung mit dem SphK1-spezifischen Inhibitors PF-543. Somit lässt sich vermuten, dass nach Dehnung bereits kalzifizierter Klappen vermehrt S1P in einem SphK1-abhängigen Mechanismus produziert und freigesetzt wird. Neben der osteoblastischen Aktivierung von BMP-2 und AP verstärkt die S1P vermittelte Signaltransduktion die Expression proinflammatorischer Mediatoren wie IL-6 und Cyclooxygenase 2 sowie die Ausschüttung proangiogener Faktoren, beispielsweise von *Vascular Endothelial Growth Factor A* (122). Dies fördert vollumfänglich die weitere Progression der AS.

Zuletzt gilt es, den Einfluss von erhöhten S1P-Spiegeln im Sinne des Stenose-Progresses darzustellen. Damit eine Erhöhung von S1P vor Induktion der AS bei Mäusen generiert werden konnte, wurden diese, wie zuvor beschrieben, mit dem S1P-Lyase-Inhibitor DOP für eine Woche vorbehandelt. In der anschließenden Echokardiografie zeigte sich eine signifikante Senkung der EF und KÖF sowie eine Erhöhung der maximalen Flussgeschwindigkeit und des mittleren Druckgradienten. Die Parameter dienen der Beurteilung der Relevanz einer hämodynamisch relevanten AS mit systolischer linksventrikulärer Dysfunktion. In der Zusammenschau sprechen sie dafür, dass die Gabe von DOP zu einer signifikant stärker ausgeprägten Kalzifizierung führt. Dabei spricht die Reduktion der EF, also die Auswurfleistung des Herzens, für eine Dekompensation der linken Herzkammer. Ein weiteres klassisches Kriterium, das für einen zunehmenden Progress der AS durch voranschreitende Verkalkung auf Klappenebene steht, ist die verminderte KÖF (123). Die erhöhte Flussgeschwindigkeit sowie der Druckgradient tragen hingegen primär zu einer Beanspruchung der Strömungsmechanik des Blutes bei (118). Hierzu fügt sich die histologische

Beurteilung, dass die Segeldicke der Aortenklappe nach Prämedikation mit DOP signifikant zunimmt. Eine solche Verdickung spricht für einen Progress der Stenose, welcher üblicherweise mit einer verminderten Beweglichkeit der hypertrophierten und kalzifizierten Segel gekennzeichnet ist (124).

Zudem hat sich gezeigt, dass die echokardiografischen Auswertungen von LV-Masse und linksventrikulären Innendurchmesser keinen signifikanten Unterschied zwischen den analysierten Gruppen ergeben. Beide Werte dienen zur Beurteilung maladaptiver *Remodeling*-Prozesse. Im Sinne der AS ist bekannt, dass ein Progress in späteren Stadien zu einer Hypertrophie, also erhöhten LV-Masse, führt. Die Pathogenese liegt darin, dass ein erhöhter Druck in der linken Herzkammer erforderlich ist, um Blut durch die verengte Klappe zu schleusen (125). Im weiteren Verlauf kann es zum Ausgleich der zunehmenden Druckverhältnisse zu einer Dilatation des linken Ventrikels kommen, die folglich anhand des LVID quantifiziert wird (126). Die nicht signifikanten Veränderungen deuten darauf hin, dass im Rahmen der Versuchsbedingungen eher frühe Stadien des kardialen *Remodeling*-Prozesses abgebildet und somit strukturelle Umbauprozesse nicht voll ausgeprägt sind.

In Verbindung mit der vorherigen Erkenntnis, dass nach Dehnung bereits kalzifizierter Klappen vermehrt S1P in einem SphK1-abhängigen Mechanismus produziert wird, kann festgehalten werden, dass die Gabe von DOP und die damit einhergehende S1P-Erhöhung sowohl kalzifizierende Vorgänge auf Aortenklappenebene als auch inflammatorische Prozesse mit struktureller Anpassung des Myokards fördert (122).

Neben den erhobenen echokardiografischen und histologischen Parameter ist zusätzlich die Sterblichkeit nach AS-Induktion von Interesse. In der Behandlungsgruppe mit DOP war eine um den 1,4-fachen Faktor erhöhte Sterblichkeit zu vermerken. Eine Ursache hierfür kann die schneller voranschreitende Dekompensation sein (122). Ein weiterer relevanter Faktor ist die als unerwünschte Nebenwirkung von S1P-Lyase-Inhibitoren bekannte Störung der Cholesterin-Homöostase. Hierdurch induzierte atherosklerotische Plaquebildung erhöht die Wahrscheinlichkeit kardiovaskulärer Folgeerscheinungen, wie beispielsweise thromboembolischer Ereignisse (127).

Abschließend gilt es, die AS in den klinischen Alltag einzuordnen. Wie zuvor festgehalten, ist die AS einer der zehn vorherrschenden Gründe für einen Herz-Kreislauf-bedingten Todesfall (2) und wird auf nationaler Ebene mit einer jährlichen Inzidenz von 400.000 beziffert (5). Trotz intensiver Forschung ist derzeit keine medikamentöse Therapie zugelassen, die einen Einfluss auf das Fortschreiten der AS hat. In dieser Arbeit konnte ein krankheitsfördernder Effekt von S1P auf den AS-Progress nachgewiesen werden. Vor diesem Hintergrund erhält die Frage nach einer pharmakologischen Beeinflussbarkeit des Krankheitsverlauf zusätzliche Relevanz.

4.1 Ausblick

Auf Grundlage der erhobenen Daten ist eine mögliche Beeinflussung des S1P-Stoffwechsels von Bedeutung. S1P-Modulatoren wie FTY720, Ozanimod oder Siponimod sind für die Behandlung der MS in Deutschland zugelassen (129). Obwohl einige präklinische Modelle zeigen, dass eine Modulation des S1P-Metabolismus als therapeutischer Ansatz vielversprechende Resultate auf kardiovaskulärer Ebene liefert, besteht derzeit keine abgeschlossene klinische Studie, die eine Zulassung für eine solche Indikation bewirken würde (130). Zudem wirken die in Deutschland zugelassenen Modulatoren hauptsächlich auf die Lymphozytenmigration, was keinen Vorteil auf kardiovaskulärer Ebene bringt (79). Darüber hinaus beschreibt die Literatur anhand großer Metaanalysen, dass unerwünschte Nebenwirkungen der S1P-Modulatoren auftreten, die gerade bei Vorerkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems von Bedeutung sind. Es wird berichtet, dass bei Medikation mit S1P-Modulatoren das Risiko für AV-Blockierungen, Bradyarrhythmien sowie QT-Zeit-Verlängerungen erhöht ist (131).

Von besonderem Interesse sind derzeit S1PR1-Modulatoren wie FTY720 oder Amiselimod, die in mehreren präklinischen Modellen kardioprotektive Effekte bei Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz vermitteln. Hier wird beschrieben, dass eine Verringerung der endothelialen Permeabilität die Einwanderung proinflammatorischer Zellen minimiert und somit Gewebeschäden limitiert (132). Zudem wird durch reduzierten oxidativen Stress eine antiapoptotische Wirkung auf Kardiomy-

ozyten vermittelt, mittels regulierendem Einfluss auf den intrazellulären Calciumhaushalt werden die Kontraktions- und Relaxationsabläufe der Herzmuskelzellen stabilisiert (133). In der Literatur wird betont, dass die Modulation am S1PR1 großes Potenzial im zukünftigen Therapieregime bei kardiovaskulären Erkrankungen bietet, jedoch bedarf es weiterer, vor allem translationaler Forschung.

Ein spezifischer Ansatz für die potenzielle Behandlung der AS ist S1PR2, welcher primär für den Knochenstoffwechsel und somit für Kalzifizierungsprozesse von Bedeutung ist. JTE-013, ein S1PR2-Inhibitor, könnte demnach ein potenzieller Mediator zur Reduktion osteogener Prozesse an der Aortenklappe sein (122). Eine relevante potenzielle Kontraindikation, die in Betracht gezogen werden müsste, wäre die Osteoporose. Diese ist, genau wie die AS, eine Erkrankung des Alters. Eine Förderung der Migration und Differenzierung von Osteoklasten mit verstärkter Knochenresorption wäre demnach eine unerwünschte Nebenwirkung in Bezug auf den weiteren Progress der Osteoporose. Auf dieser Grundlage wäre eine routinemäßige Überwachung der Knochendichte bei entsprechenden Risikofaktoren unter S1P-Modulatoren zu erwägen.

Ein weiterer spezifischer Ansatz wäre die Hemmung der SphK1, wodurch ebenfalls geringere Mengen an S1P generiert würden. Auch in diesem Fall befinden sich Substanzen wie SK1-IN-1 oder PF-543 in präklinischen Phasen, sodass eine baldige Zulassung vorerst nicht vorgesehen ist. Dies liegt unter anderem daran, dass neben den beabsichtigen Effekten auch potenziell schädliche Nebenwirkungen, wie beispielsweise eine vermehrte Gefäßverkalkung, auftreten (134).

Somit gilt es abzuwägen, ob positive Effekte durch Verhinderung eines weiteren Voranschreitens der AS die Gabe und somit die Inkaufnahme negativer Auswirkungen beziehungsweise Risiken der S1P-Modulatoren rechtfertigen. Für diese spezifische Indikation bedarf es an klinischen Studien, die eine Zulassung eines Medikaments ermöglichen, sodass zukünftig nicht nur der weitere Krankheitsprogress verzögert, sondern wohlmöglich der initialen Entstehung entgegengewirkt werden kann.

4.2 Limitationen

Ein Großteil der in dieser Arbeit erfassten Ergebnisse beruht auf Tierversuchen an Mäusen. Damit sind Generalisierbarkeit und Übertragbarkeit auf Menschen nur bedingt anwendbar. Um die Translation leichter zu gestalten, wurden bereits einige Ansätze an humanen Zellen und Klappen durchgeführt. Weitere Versuche oder eine potenzielle medikamentöse Therapie müssten in zusätzlichen Studien mit einer entsprechenden Patientenzahl im Hinblick auf Validität und Reliabilität untersucht werden.

Die Stichprobengröße liegt bei zwei Experimenten mit humanen Proband*innen im niedrigen zweistelligen Bereich, was für eine valide Aussage zunächst ausreicht, jedoch sollten zusätzliche Ergebnisse durch größere Stichproben ergänzt werden.

Bei den humanen MRT-Daten waren die Proband*innen der Kontrollgruppe signifikant jünger. An dieser Stelle wäre es sinnvoll, zusätzliche MRT-Bilder gesunder Patient*innen ähnlicher Altersstruktur auszuwerten und diese mit den Bildern der Patient*innen mit schwerer AS zu vergleichen.

4.3 Schlussfolgerung

Es konnte ein bisher unbekannter krankheitsfördernder Effekt von S1P auf das Voranschreiten der Aortenklappenkalzifizierung nachgewiesen werden. Die Stenosierung der Klappe bedeutet neben der erhöhten Flussgeschwindigkeit ebenfalls eine Zunahme der Scherkräfte. Hiervon geht die Aktivierung der SphK1 und somit eine gesteigerte S1P-Bildung aus. S1P fördert wiederum die Stenosierung, wodurch sich ein Teufelskreis zwischen Aortenklappenkalzifizierung und S1P-Produktion bildet. S1P-Modulatoren haben bisher keine Zulassung bei kardialen Erkrankungen, jedoch gilt es, eine mögliche Indikationserweiterung in weiteren Studien tiefergehend zu untersuchen.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Bahlmann E, Kuck KH, Nienaber C. Die asymptomatische Aortenklappenstenose. Kardiologie up2date. 2010;6(01):59–74. doi:10.1055/s-0029-1243921

2. Statistisches Bundesamt (Destatis). Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen [Internet]. 2023 [cited 2025 Aug 5]. Available from: https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html

3. Braun D, Massberg S. Erworbene Erkrankungen der Aortenklappe. In: e.Medpedia, Springer Medizin [Internet]. 2022 [cited 2025 Aug 5]. Available from: https://www.springermedizin.de/emedpedia/detail/klinische-kardiologie/erworbene-erkrankungen-der-aortenklappe?epediaDoi=10.1007%2F978-3-662-62939-0_16

4. Mohler ER, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane MG, Kaplan FS. Bone formation and inflammation in cardiac valves. Circulation. 2001;103(11):1522–8. doi:10.1161/01.CIR.103.11.1522

5. Bäck M, Larsson SC. Risk factors for aortic stenosis. E-Journal of Cardiology Practice. 2020;18(11-19 Feb).

6. Dare AJ, Veinot JP, Edwards WD, Tazelaar HD, Schaff H V. New observations on the etiology of aortic valve disease: A surgical pathologic study of 236 cases from 1990. Hum Pathol. 1993;24(12):1330–8. doi:10.1016/0046-8177(93)90267-K

7. Weidemann F, Ertl G. Aortenklappenstenose. In: e.Medpedia [Internet]. 2016 [cited 2025 Aug 11]. Available from: https://www.springermedizin.de/emedpedia/detail/dgim-innere-medizin/aortenklappenstenose?epediaDoi=10.1007%2F978-3-642-54676-1_483#CR10

8. Mathieu P, Bossé Y, Huggins GS, Corte A Della, Pibarot P, Michelena HI, et al. The pathology and pathobiology of bicuspid aortic valve: State of the

art and novel research perspectives. Journal of Pathology: Clinical Research. 2016;2(1):195–206. doi:10.1002/cjp2.21

9. Daniel WG, Baumgartner H, Gohlke-Bärwolf C, Hanrath P, Horstkotte D, Koch KC, et al. Klappenvitien im Erwachsenenalter. Clinical Research in Cardiology. 2006;95(11):620–41. doi:10.1007/s00392-006-0458-8

10. Beppu S, Suzuki S, Matsuda H, Ohmori F, Nagata S, Miyatake K. Rapidity of progression of aortic stenosis in patients with congenital bicuspid aortic valves. Am J Cardiol. 1993;71(4):322–7. doi:10.1016/0002-9149(93)90799-I

11. Alizadeh L, Peters F, Vainrib A, Freedberg R, Saric M. Rheumatic Heart Disease: A Rare Cause of Very Severe Valvular Aortic Stenosis. CASE. 2024 May;8(5):320–4.

12. Zhuang S, Guo D, Yu D. A mini review of the pathogenesis of acute rheumatic fever and rheumatic heart disease. Front Cell Infect Microbiol. 2025;15.

13. Bonow RO, Carabello BA, Chatterjee K, de Leon AC, Faxon DP, Freed MD, et al. 2008 Focused update incorporated into the ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 1998 Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease): endorsed by the Society of Cardiovascular. Circulation. 2008;118(15):e523–661. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.190748

14. Dweck MR, Khaw HJ, Sng GKZ, Luo ELC, Baird A, Williams MC, et al. Aortic stenosis, atherosclerosis, and skeletal bone: Is there a common link with calcification and inflammation? Eur Heart J. 2013;34(21):1567–74. doi:10.1093/eurheartj/eht034

15. Goody PR, Hosen MR, Christmann D, Niepmann ST, Zietzer A, Adam M, et al. Aortic Valve Stenosis: From Basic Mechanisms to Novel Therapeutic Targets. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2020. p. 885–90. doi:10.1161/ATVBAHA.119.313067

16. Rutkovskiy A, Malashicheva A, Sullivan G, Bogdanova M, Kostareva A, Stensløkken KO, et al. Valve interstitial cells: The key to understanding the pathophysiology of heart valve calcification. J Am Heart Assoc. 2017;6(9). doi:10.1161/JAHA.117.006339

17. Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. American Journal of Pathology. 2007. p. 1407–18. doi:10.2353/ajpath.2007.070251

18. Simionescu DT, Lovekamp JJ, Vyavahare NR. Glycosaminoglycan-degrading enzymes in porcine aortic heart valves: Implications for bioprosthetic heart valve degeneration. Journal of Heart Valve Disease. 2003;12(2):217–25.

19. Mazur P, Kopytek M, Ząbczyk M, Undas A, Natorska J. Towards Personalized Therapy of Aortic Stenosis. Journal of Personalized Medicine. 2021. p. 1292. doi:10.3390/jpm11121292

20. Otto CM, Pearlman AS, Gardner CL. Hemodynamic progression of aortic stenosis in adults assessed by doppler echocardiography. J Am Coll Cardiol. 1989;13(3):545–50. doi:10.1016/0735-1097(89)90590-1

21. Yip CYY, Simmons CA. The aortic valve microenvironment and its role in calcific aortic valve disease. Cardiovascular Pathology. 2011. p. 177–82. doi:10.1016/j.carpath.2010.12.001

22. Small AM YKBBVKKBNNMDAEOCSHCAHAC on G and PMC on CCCP and R, Council on Cardiovascular and Stroke Nursing. Unraveling the Mechanisms of Valvular Heart Disease to Identify Medical Therapy Targets: A Scientific Statement From the American Heart Association. Circulation. 2024;150(6):e109–28.

23. Natorska J, Kopytek M, Undas A. Aortic valvular stenosis: Novel therapeutic strategies. European Journal of Clinical Investigation. 2021. doi:10.1111/eci.13527

24. Zheng KH, Tzolos E, Dweck MR. Pathophysiology of Aortic Stenosis and Future Perspectives for Medical Therapy. Cardiology Clinics. 2020. p. 1–12. doi:10.1016/j.ccl.2019.09.010

25. Zebhi B, Lazkani M, Bark D. Calcific Aortic Stenosis—A Review on Acquired Mechanisms of the Disease and Treatments. Frontiers in Cardiovascular Medicine. 2021. doi:10.3389/fcvm.2021.734175

26. Latif N, Quillon A, Sarathchandra P, McCormack A, Lozanoski A, Yacoub MH, et al. Modulation of human valve interstitial cell phenotype and function using a fibroblast growth factor 2 formulation. PLoS One. 2015;10(6). doi:10.1371/journal.pone.0127844

27. Freeman R V., Otto CM. Spectrum of calcific aortic valve disease: Pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. Circulation. 2005. p. 3316–26. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.486738

28. Cosmi JE, Kort S, Tunick PA, Rosenzweig BP, Freedberg RS, Katz ES, et al. The risk of the development of aortic stenosis in patients with “benign” aortic valve thickening. Arch Intern Med. 2002;162(20):2345–7. doi:10.1001/archinte.162.20.2345

29. Otto CM, Nishimura RA, Bonow RO, Carabello BA, rwin JP, Gentile F, et al. 2020 ACC/AHA Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. Circulation. 2021. doi:10.1161/CIR.0000000000000932

30. Zakkar M, Bryan AJ, Angelini GD. Aortic stenosis: Diagnosis and management. BMJ (Online). 2016;355. doi:10.1136/bmj.i5425

31. Delicce A V., Makaryus AN. Physiology, Frank Starling Law. StatPearls. 2018.

32. Chambers J. The left ventricle in aortic stenosis: Evidence for the use of ace inhibitors. Heart. 2006. p. 420–3. doi:10.1136/hrt.2005.074112

33. Bing R, Cavalcante JL, Everett RJ, Clavel MA, Newby DE, Dweck MR. Imaging and Impact of Myocardial Fibrosis in Aortic Stenosis. JACC: Cardiovascular Imaging. 2019. p. 283–96. doi:10.1016/j.jcmg.2018.11.026

34. Czarny MJ, Resar JR. Diagnosis and management of valvular aortic stenosis. Clinical Medicine Insights: Cardiology. 2014. p. 15–24. doi:10.4137/CMC.S15716

35. Carabello B, Paulus WJ. Aortic stenosis. Lancet. 2009 Mar 14;373(9667):956–66.

36. Vogelgesang A, Hasenfuß G, Jacobshagen C. Diagnose und Therapie der Aortenklappenstenose. Internist (Berl). 2018;59(12):1279–90. doi:10.1007/s00108-018-0519-x

37. Otto CM, Newby DE, Hillis GS. Calcific Aortic Stenosis: A Review. JAMA. 2024 Dec 17;332(23):2014–26.

38. ESC/EACTS, DGK e.V., DGTHG e.V. ESC/EACTS Pocket Guidelines Herzklappenerkrankungen (Version 2021) [Internet]. [cited 2025 Aug 16]. Available from: https://leitlinien.dgk.org/files/27_2021_pocket_leitlinien_herzklappenerkrankungen_aktualisiert.pdf

39. Otto CM. Valvular Aortic Stenosis. Disease Severity and Timing of Intervention. Journal of the American College of Cardiology. 2006. p. 2141–51. doi:10.1016/j.jacc.2006.03.002

40. Clavel MA, Magne J, Pibarot P. Low-gradient aortic stenosis. European Heart Journal. 2016. p. 2645–57. doi:10.1093/eurheartj/ehw096

41. Thiago L, Tsuji SR, Nyong J, Puga MES, Gois AFT, Macedo CR, et al. Statins for aortic valve stenosis. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2016. p. 9. doi:10.1002/14651858.CD009571.pub2

42. Norrington K, Androulakis E, Oikonomou E, Vogiatzi G, Tousoulis D. Statins in Aortic Stenosis. Curr Pharm Des. 2017;23(46):7121–7. doi:10.2174/1381612823666170816113521

43. Bundesärztekammer KB und A der WMF. Nationale Versorgungsleitlinie Chronische Herzinsuffizienz (Version 4.0, AWMF-Register-Nr. nvl-006) [Internet]. 2023 [cited 2025 Aug 29]. Available from:

https://register.awmf.org/assets/guidelines/nvl-006l_S3_Chronische_Herzinsuffizienz_2023-12.pdf

44. Johnson HM, Shimbo D, Abdalla M, Altieri MM, Bress AP, Carter J, et al. 2025 AHA/ACC/AANP/AAPA/ABC/ACCP/ACPM/AGS/AMA/ASPC/NMA/PCNA/SGIM Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. Hypertension. 2025;82(10). doi:10.1161/HYP.0000000000000249

45. Davidson LJ, Davidson CJ. Transcatheter Treatment of Valvular Heart Disease: A Review. JAMA - Journal of the American Medical Association. 2021. p. 2480–94. doi:10.1001/jama.2021.2133

46. Blankenberg S, Seiffert M, Vontheim R, Baumgartner H, Bleiziffer S, Borgner M. Transcatheter or Surgical Treatment of Aortic-Valve Stenosis. New England Journal of Medicine. 2024 Apr 8;390(17):1572–83.

47. Nashef SAM, Roques F, Sharples LD, Nilsson J, Smith C, Goldstone AR, et al. Euroscore II. European Journal of Cardio-thoracic Surgery. 2012;41(4):734–44. doi:10.1093/ejcts/ezs043

48. O'Brien SM, Shahian DM, Filardo G, Ferraris VA, Haan CK, Rich JB, et al. The Society of Thoracic Surgeons 2008 Cardiac Surgery Risk Models: Part 2-Isolated Valve Surgery. Annals of Thoracic Surgery. 2009;88(1 SUPPL.):23–42. doi:10.1016/j.athoracsur.2009.05.056

49. Jagadeesan V, Mehaffey JH, Darehzereshki A, Daggubati R, Raikar G, Wei L, et al. Surgical versus transcatheter aortic valve replacement: the future role of robotic aortic valve replacement. Ann Cardiothorac Surg. 2025;14(3). doi:10.21037/acs-2024-ravr-0181

50. Bowdish M, Mehaffey J, Chang S, O'Gara P, Mack M, Goldstone A, et al. Bioprosthetic vs Mechanical Aortic Valve Replacement in Patients 40 to 75 Years of Age. J Am Coll Cardiol. 2025 Apr 1;85(12):1289–98.

51. Svensson LG, Adams DH, Bonow RO, Kouchoukos NT, Miller DC, O'Gara PT, et al. Aortic valve and ascending aorta guidelines for management and quality measures: Executive summary. Annals of Thoracic Surgery. 2013;95(4):1–66. doi:10.1016/j.athoracsur.2012.12.027

52. Bravo GÁ, Cedeño RR, Casadevall MP, Ramió-Torrentà L. Sphingosine-1-Phosphate (S1P) and S1P Signaling Pathway Modulators, from Current Insights to Future Perspectives. Cells. 2022. p. 2058. doi:10.3390/cells11132058

53. Tani M, Ito M, Igarashi Y. Ceramide/sphingosine/sphingosine 1-phosphate metabolism on the cell surface and in the extracellular space. Cellular Signalling. 2007. p. 229–37. doi:10.1016/j.cellsig.2006.07.001

54. Snider AJ, Alexa Orr Gandy K, Obeid LM. Sphingosine kinase: Role in regulation of bioactive sphingolipid mediators in inflammation. Biochimie. 2010. p. 707–15. doi:10.1016/j.biochi.2010.02.008

55. Pang B, Yu L, Li T, Jiao H, Wu X, Wang J, et al. Molecular basis of Spns2-facilitated sphingosine-1-phosphate transport. Cell Research. 2024. p. 173–6. doi:10.1038/s41422-023-00908-x

56. Książek M, Chacińska M, Chabowski A, Baranowski M. Sources, metabolism, and regulation of circulating sphingosine-1-phosphate. Journal of Lipid Research. 2015. p. 1271–81. doi:10.1194/jlr.R059543

57. Zhang H, Desai NN, Olivera A, Seki T, Brooker G, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. Journal of Cell Biology. 1991;114(1):155–67. doi:10.1083/jcb.114.1.155

58. Kihara Y, Maceyka M, Spiegel S, Chun J. Lysophospholipid receptor nomenclature review: IUPHAR Review 8. British Journal of Pharmacology. 2014. p. 3575–94. doi:10.1111/bph.12678

59. Jiang H, Galtes D, Wang J, Rockman HA. G protein-coupled receptor signaling: transducers and effectors. American journal of physiology. Cell physiology. 2022. p. 731–48. doi:10.1152/ajpcell.00210.2022

60. Chun J, Giovannoni G, Hunter SF. Sphingosine 1-phosphate Receptor Modulator Therapy for Multiple Sclerosis: Differential Downstream Receptor Signalling and Clinical Profile Effects. Drugs. 2021. p. 207–31. doi:10.1007/s40265-020-01431-8

61. Colombo E, Farina C. Lessons from S1P receptor targeting in multiple sclerosis. Pharmacology and Therapeutics. 2022. doi:10.1016/j.pharmthera.2021.107971

62. Pan S, Mi Y, Pally C, Beerli C, Chen A, Guerini D, et al. A Monoselective Sphingosine-1-Phosphate Receptor-1 Agonist Prevents Allograft Rejection in a Stringent Rat Heart Transplantation Model. Chem Biol. 2006;13(11):1227–34. doi:10.1016/j.chembiol.2006.09.017

63. Quancard J, Bollbuck B, Janser P, Angst D, Berst F, Buehlmayer P, et al. A potent and selective S1P(1) antagonist with efficacy in experimental autoimmune encephalomyelitis. Chem Biol. 2012 Sep 21;19(9):1142–51.

64. Blankenbach K V., Schwalm S, Pfeilschifter J, Meyer zu Heringdorf D. Sphingosine-1-phosphate receptor-2 antagonists: Therapeutic potential and potential risks. Frontiers in Pharmacology. 2016. p. 167. doi:10.3389/fphar.2016.00167

65. Bigaud M, Dincer Z, Bollbuck B, Dawson J, Beckmann N, Beerli C, et al. Pathophysiological consequences of a break in S1P1-dependent homeostasis of vascular permeability revealed by S1P1 competitive antagonism. PLoS One. 2016;11(12). doi:10.1371/journal.pone.0168252

66. Kono M, Belyantseva IA, Skoura A, Frolenkov GI, Starost MF, Dreier JL, et al. Deafness and stria vascularis defects in S1P2 receptor-null mice. Journal of Biological Chemistry. 2007;282(14):10690–6. doi:10.1074/jbc.M700370200

67. Burczyk M, Burkhalter MD, Blätte T, Matysik S, Caron MG, Barak LS, et al. Phenotypic regulation of the sphingosine 1-phosphate receptor miles apart by G protein-coupled receptor kinase 2. Biochemistry. 2015;54(3):765–75. doi:10.1021/bi501061h

68. Murakami A, Takasugi H, Ohnuma S, Koide Y, Sakurai A, Takeda S, et al. Sphingosine 1-phosphate (S1P) regulates vascular contraction via S1P 3 receptor: Investigation based on a new S1P3 receptor antagonist. Mol Pharmacol. 2010;77(4):704–13. doi:10.1124/mol.109.061481

69. Awojoodu AO, Ogle ME, Sefcik LS, Bowers DT, Martin K, Brayman KL, et al. Sphingosine 1-phosphate receptor 3 regulates recruitment of anti-inflammatory monocytes to microvessels during implant arteriogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(34):13785–90. doi:10.1073/pnas.1221309110

70. Golfier S, Kondo S, Schulze T, Takeuchi T, Vassileva G, Achtman AH, et al. Shaping of terminal megakaryocyte differentiation and proplatelet development by sphingosine-1-phosphate receptor S1P 4 . The FASEB Journal. 2010;24(12):4701–10. doi:10.1096/fj.09-141473

71. Gräler MH, Grosse R, Kusch A, Kremmer E, Gudermann T, Lipp M. The sphingosine 1-phosphate receptor S1P4 regulates cell shape and motility via coupling to Gi and G12/13. J Cell Biochem. 2003;89(3):507–19. doi:10.1002/jcb.10537

72. Niedernberg A, Scherer CR, Busch AE, Kostenis E. Comparative analysis of human and rat S1P5 (edg8): Differential expression profiles and sensitivities to antagonists. Biochem Pharmacol. 2002;64(8):1243–50. doi:10.1016/S0006-2952(02)01289-3

73. Im DS, Clemens J, Macdonald TL, Lynch KR. Characterization of the human and mouse sphingosine 1-phosphate receptor, S1P5 (Edg-8): Structure - Activity relationship of sphingosine 1-phosphate receptors. Biochemistry. 2001;40(46):14053–60. doi:10.1021/bi011606i

74. Jozefczuk E, Guzik TJ, Siedlinski M. Significance of sphingosine-1-phosphate in cardiovascular physiology and pathology. Pharmacological Research. 2020. doi:10.1016/j.phrs.2020.104793

75. Mendelson K, Lan Y, Hla T, Evans T. Maternal or zygotic sphingosine kinase is required to regulate zebrafish cardiogenesis. Developmental Dynamics. 2015;244(8):948–54. doi:10.1002/dvdy.24288

76. Mihanfar A, Nejabati HR, Fattahi A, Latifi Z, Pezeshkian M, Afrasiabi A, et al. The role of sphingosine 1 phosphate in coronary artery disease and ischemia reperfusion injury. Journal of Cellular Physiology. 2019. p. 2083–94. doi:10.1002/jcp.27353

77. Wang N, Li JY, Zeng B, Chen GL. Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Cardiovascular Diseases. Biomolecules. 2023. p. 818. doi:10.3390/biom13050818

78. Mendelson K, Zygmunt T, Torres-Vázquez J, Evans T, Hla T. Sphingosine 1-phosphate receptor signaling regulates proper embryonic vascular patterning. Journal of Biological Chemistry. 2013;288(4):2143–56. doi:10.1074/jbc.M112.427344

79. McGinley MP, Cohen JA. Sphingosine 1-phosphate receptor modulators in multiple sclerosis and other conditions. The Lancet. 2021. p. 1184–94. doi:10.1016/S0140-6736(21)00244-0

80. Chaudhry BZ, Cohen JA, Conway DS. Sphingosine 1-Phosphate Receptor Modulators for the Treatment of Multiple Sclerosis. Neurotherapeutics. 2017. p. 859–73. doi:10.1007/s13311-017-0565-4

81. Cohen JA, Chun J. Mechanisms of fingolimod's efficacy and adverse effects in multiple sclerosis. Ann Neurol. 2011;69(5). doi:10.1002/ana.22426

82. Patmanathan SN, Yap LF, Murray PG, Paterson IC. The antineoplastic properties of FTY720: Evidence for the repurposing of fingolimod. J Cell Mol Med. 2015;19(10):2329–2040. doi:10.1111/jcmm.12635

83. Gold R, Comi G, Palace J, Siever A, Gottschalk R, Bijarnia M, et al. Assessment of cardiac safety during fingolimod treatment initiation in a real-world relapsing multiple sclerosis population: A phase 3b, open-label study. J Neurol. 2014;261(2):267–76. doi:10.1007/s00415-013-7115-8

84. Stepanovska B, Huwiler A. Targeting the S1P receptor signaling pathways as a promising approach for treatment of autoimmune and inflammatory diseases. Pharmacological Research. 2020. doi:10.1016/j.phrs.2019.02.009

85. Tiwari-Woodruff S, Yamate-Morgan H, Sekyi M, Lauderdale K, Hasselmann J, Schubart A. The Sphingosine 1-phosphate (S1P) Receptor Modulator, Siponimod Decreases Oligodendrocyte Cell Death and Axon Demyelination in a Mouse Model of Multiple Sclerosis (P5.325). Neurology. 2016;86(16_supplement):86. doi:10.1212/wnl.86.16_supplement.p5.325

86. Gentile A, Musella A, Bullitta S, Fresegna D, De Vito F, Fantozzi R, et al. Siponimod (BAF312) prevents synaptic neurodegeneration in experimental multiple sclerosis. J Neuroinflammation. 2016;13(1):207. doi:10.1186/s12974-016-0686-4

87. Selmaj K, Li DKB, Hartung HP, Hemmer B, Kappos L, Freedman MS, et al. Siponimod for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (BOLD): An adaptive, dose-ranging, randomised, phase 2 study. Lancet Neurol. 2013;12(8):846. doi:10.1016/S1474-4422(13)70102-9

88. Tran JQ, Hartung JP, Peach RJ, Boehm MF, Rosen H, Smith H, et al. Results From the First-in-Human Study With Ozanimod, a Novel, Selective Sphingosine-1-Phosphate Receptor Modulator. J Clin Pharmacol. 2017;57(8):988–96. doi:10.1002/jcph.887

89. Deutsches Ärzteblatt. Neue orale Therapieoption für MS: Zulassung für Ozanimod. Perspektiven der Neurologie [Internet]. 2020 May 20 [cited 2025 Sep 18];117(1):33. Available from: https://www.aerzteblatt.de/archiv/neue-orale-therapieoption-fuer-ms-zulassung-fuer-ozanimod-8b49e2ea-7579-472f-9257-dfcf492519b5

90. Baumgart DC, Le Berre C. Newer Biologic and Small-Molecule Therapies for Inflammatory Bowel Disease. New England Journal of Medicine. 2021;385(14):1302–15. doi:10.1056/nejmra1907607

91. D'Ambrosio D, Freedman MS, Prinz J. Ponesimod, a selective S1P1 receptor modulator: A potential treatment for multiple sclerosis and other immune-mediated diseases. Therapeutic Advances in Chronic Disease. 2016. p. 18–33. doi:10.1177/2040622315617354

92. D'Ambrosio D, Steinmann J, Brossard P, Dingemanse J. Differential effects of ponesimod, a selective S1P1 receptor modulator, on blood-circulating

human T cell subpopulations. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2015;37(1):103–9. doi:10.3109/08923973.2014.993084

93. Dumitrescu L, Papathanasiou A, Coclitu C, Garjani A, Evangelou N, Constantinescu CS, et al. An update on the use of sphingosine 1-phosphate receptor modulators for the treatment of relapsing multiple sclerosis. Expert Opinion on Pharmacotherapy. 2023. p. 385–402. doi:10.1080/14656566.2023.2178898

94. Yang X, Yan Y, Liu S, Wang Z, Feng X. Potential adverse events associated with sphingosine-1-phosphate (S1P) receptor modulators in patients with multiple sclerosis: an analysis of the FDA adverse event reporting system (FAERS) database. Front Pharmacol. 2024 May 23;15.

95. Joni SS, Cheshmavar M, Shoureshi P, Zamani Z, Taoosi N, Akbari M, et al. Effects of fingolimod treatments on alanine transaminase and aspartate transaminase levels in patients with multiple sclerosis. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol. 2020;12(3):88–94.

96. Comi G, Hartung HP, Bakshi R, Williams IM, Wiendl H. Benefit–Risk Profile of Sphingosine-1-Phosphate Receptor Modulators in Relapsing and Secondary Progressive Multiple Sclerosis. Drugs. 2017. p. 1755–68. doi:10.1007/s40265-017-0814-1

97. Fazekas F. Fingolimod in the treatment algorithm of relapsing remitting multiple sclerosis: A statement of the Central and East European (CEE) MS Expert Group. Wiener Medizinische Wochenschrift. 2012. p. 354–66. doi:10.1007/s10354-012-0123-y

98. Ouyang J, Shu Z, Chen S, Xiang H, Lu H. The role of sphingosine 1-phosphate and its receptors in cardiovascular diseases. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2020. p. 10290–301. doi:10.1111/jcmm.15744

99. Barth M, Selig JI, Klose S, Schomakers A, Kiene LS, Raschke S, 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):254–69. doi:10.1177/1479164118817922

100. Wagner JM, Wille A, Fueth M, Weske S, Lotzien S, Reinkemeier F, et al. Pharmacological elevation of sphingosine-1-phosphate by S1P lyase inhibition accelerates bone regeneration after post-traumatic osteomyelitis. J Cell Mol Med. 2023;27(23). doi:10.1111/jcmm.17952

101. Attenberger U, Birkemeier K, Chien D, Fries P, Giesel F, Nitz W, et al. Praxiskurs MRT. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2011.

102. Sträter A, Huber A, Rudolph J, Berndt M, Rasper M, Rummeny EJ, et al. 4D-Flow MRI: Technique and Applications. RoFo Fortschritte auf dem Gebiet der Rontgenstrahlen und der Bildgebenden Verfahren. 2018. p. 1025–35. doi:10.1055/a-0647-2021

103. Peng B, Geue S, Coman C, Münzer P, Kopczynski D, Has C, et al. Identification of key lipids critical for platelet activation by comprehensive analysis of the platelet lipidome. Blood. 2018;132(5):e1–12. doi:10.1182/blood-2017-12-822890

104. Adams KJ, Pratt B, Bose N, Dubois LG, St. John-Williams L, Perrott KM, et al. Skyline for Small Molecules: A Unifying Software Package for Quantitative Metabolomics. J Proteome Res. 2020;19(4):1447–58. doi:10.1021/acs.jproteome.9b00640

105. Zabirnyk A, Ferrer MD, Bogdanova M, Pérez MM, Salcedo C, Kaljusto ML, et al. SNF472, a novel anti-crystallization agent, inhibits induced calcification in an in vitro model of human aortic valve calcification. Vascul Pharmacol. 2019;122–123. doi:10.1016/j.vph.2019.106583

106. Bogdanova M, Kostina A, Enayati KZ, Zabirnyk A, Malashicheva A, Stensløkken KO, et al. Inflammation and mechanical stress stimulate osteogenic differentiation of human aortic valve interstitial cells. Front Physiol. 2018;9(NOV). doi:10.3389/fphys.2018.01635

107. Niepmann ST, Steffen E, Zietzer A, Adam M, Nordsiek J, Gyamfi-Poku I, et al. Graded murine wire-induced aortic valve stenosis model mimics human functional and morphological disease phenotype. Clinical Research in Cardiology. 2019;108(8):847–56. doi:10.1007/s00392-019-01413-1

108. Quast C, Kober F, Becker K, Zweck E, Hoffe J, Jacoby C, et al. Multiparametric MRI identifies subtle adaptations for demarcation of disease transition in murine aortic valve stenosis. Basic Res Cardiol. 2022;117(1):29. doi:10.1007/s00395-022-00936-5

109. Goldbarg SH, Elmariah S, Miller MA, Fuster V. Insights Into Degenerative Aortic Valve Disease. Journal of the American College of Cardiology. 2007. p. 1205–13. doi:10.1016/j.jacc.2007.06.024

110. Lindman BR, Clavel MA, Mathieu P, Iung B, Lancellotti P, Otto CM, et al. Calcific aortic stenosis. Nat Rev Dis Primers. 2016;2. doi:10.1038/nrdp.2016.6

111. Yang X, Fullerton DA, Su X, Ao L, Cleveland JC, Meng X. Pro-Osteogenic Phenotype of Human Aortic Valve Interstitial Cells Is Associated With Higher Levels of Toll-Like Receptors 2 and 4 and Enhanced Expression of Bone Morphogenetic Protein 2. J Am Coll Cardiol. 2009;53(6):491–500. doi:10.1016/j.jacc.2008.09.052

112. Gupta VK, You Y, Klistorner A, Graham SL. Focus on molecules: Sphingosine 1 phosphate (S1P). Experimental Eye Research. 2012. p. 119–20. doi:10.1016/j.exer.2011.09.023

113. Rotstein NP, Miranda GE, Abrahan CE, German OL. Regulating survival and development in the retina: Key roles for simple sphingolipids. Journal of Lipid Research. 2010. p. 1247–62. doi:10.1194/jlr.R003442

114. Weske S, Vaidya M, Reese A, Von Wnuck Lipinski K, Keul P, Bayer JK, et al. Targeting sphingosine-1-phosphate lyase as an anabolic therapy for bone loss article. Nat Med. 2018;24(5):667–78. doi:10.1038/s41591-018-0005-y

115. Wang Z, Min X, Xiao SH, Johnstone S, Romanow W, Meininger D, et al. Molecular basis of sphingosine kinase 1 substrate recognition and catalysis. Structure. 2013;21(5):798–809. doi:10.1016/j.str.2013.02.025

116. Kharel Y, Huang T, Salamon A, Harris TE, Santos WL, Lynch KR. Mechanism of sphingosine 1-phosphate clearance from blood. Biochemical Journal. 2020;477(5):925–35. doi:10.1042/BCJ20190730

117. Hope MD, Wrenn J, Sigovan M, Foster E, Tseng EE, Saloner D. Imaging biomarkers of aortic disease: Increased growth rates with eccentric systolic flow. Journal of the American College of Cardiology. 2012. p. 356–7. doi:10.1016/j.jacc.2012.01.072

118. Jhun CS, Newswanger R, Cysyk JP, Ponnaluri S, Good B, Manning KB, et al. Dynamics of Blood Flows in Aortic Stenosis: Mild, Moderate, and Severe. ASAIO Journal. 2021;67(6):666–74. doi:10.1097/MAT.0000000000001296

119. Garcia J, Barker AJ, Markl M. The Role of Imaging of Flow Patterns by 4D Flow MRI in Aortic Stenosis. JACC: Cardiovascular Imaging. 2019. p. 252–66. doi:10.1016/j.jcmg.2018.10.034

120. McManus B. Native valvular heart disease. In: Atlas of cardiovascular pathology for the clinician. 2nd ed. Philadelphia: Springer Current Medicine Group; 2001. p. 201–15.

121. Lehmann S, Walther T, Kempfert J, Rastan A, Garbade J, Dhein S, et al. Mechanical Strain and the Aortic Valve: Influence on Fibroblasts, Extracellular Matrix, and Potential Stenosis. Annals of Thoracic Surgery. 2009;88(5):1476–83. doi:10.1016/j.athoracsur.2009.07.025

122. Fernández-Pisonero I, López J, Onecha E, Dueñas AI, Maeso P, Crespo MS, et al. Synergy between sphingosine 1-phosphate and lipopolysaccharide signaling promotes an inflammatory, angiogenic and osteogenic response in human aortic valve interstitial cells. PLoS One. 2014;9(10). doi:10.1371/journal.pone.0109081

123. Jozefowicz-Okonkwo G. The value of echocardiography in aortic valve disease: an in-depth analysis. e-Journal of Cardiology Practice. 2020 Mar 25;18(15):139–52.

124. Boudoulas KD, Borer JS, Boudoulas H. Etiology of valvular heart disease in the 21st century. Cardiology (Switzerland). 2013;126(3). doi:10.1159/000354221

125. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: A consensus paper from an International Forum on Cardiac

Remodeling. J Am Coll Cardiol. 2000;35(3):569–82. doi:10.1016/S0735-1097(99)00630-0

126. Collinson J, Henein M, Flather M, Pepper JR, Gibson DG. Valve replacement for aortic stenosis in patients with poor left ventricular function: Comparison of early changes with stented and stentless valves. Circulation. 1999;100(19 SUPPL.). doi:10.1161/01.cir.100.suppl_2.ii-1

127. Keul P, Peters S, von Wnuck Lipinski K, Schröder NH, Nowak MK, Duse DA, et al. Sphingosine-1-Phosphate (S1P) Lyase Inhibition Aggravates Atherosclerosis and Induces Plaque Rupture in ApoE−/− Mice. Int J Mol Sci. 2022;23(17):9606. doi:10.3390/ijms23179606

128. Eveborn GW, Schirmer H, Heggelund G, Lunde P, Rasmussen K. The evolving epidemiology of valvular aortic stenosis. the Tromsø Study. Heart. 2013;99(6). doi:10.1136/heartjnl-2012-302265

129. Xie YX, Yao H, Peng JF, Ni D, Liu WT, Li CQ, et al. Insight into modulators of sphingosine-1-phosphate receptor and implications for cardiovascular therapeutics. Journal of Drug Targeting. 2024. p. 300–10. doi:10.1080/1061186X.2024.2309577

130. Huwiler A, Zangemeister-Wittke U. The sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod as a therapeutic agent: Recent findings and new perspectives. Pharmacology and Therapeutics. 2018. p. 34–49. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.11.001

131. Zhao Z, Lv Y, Gu ZC, Ma CL, Zhong MK. Risk for Cardiovascular Adverse Events Associated With Sphingosine-1-Phosphate Receptor Modulators in Patients With Multiple Sclerosis: Insights From a Pooled Analysis of 15 Randomised Controlled Trials. Frontiers in Immunology. 2021. doi:10.3389/fimmu.2021.795574

132. Wilkins GC, Gilmour J, Giannoudaki E, Kirby JA, Sheerin NS, Ali S. Dissecting the Therapeutic Mechanisms of Sphingosine-1-Phosphate Receptor Agonism during Ischaemia and Reperfusion. Int J Mol Sci. 2023;24(13). doi:10.3390/ijms241311192

133. Keul P, van Borren MMGJ, Ghanem A, Müller FU, Baartscheer A, Verkerk AO, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor 1 regulates cardiac function by modulating Ca2+ sensitivity and Na+/H+ exchange and mediates protection by ischemic preconditioning. J Am Heart Assoc. 2016;5(5). doi:10.1161/JAHA.116.003393

134. Razazian M, Bahiraii S, Jannat I, Tiffner A, Beilhack G, Levkau B, et al. Sphingosine kinase 1 inhibition aggravates vascular smooth muscle cell calcification. Pflugers Arch. 2025 Jun;477(6).

Danksagung

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Kelm für die Möglichkeit, eine Dissertation in der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie entwickeln und schreiben zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Polzin für die engagierte Betreuung und vielfältige Unterstützung während der gesamten Promotionszeit. Ihre wertvollen fachlichen Hinweise sowie konstruktive Diskussionen haben wesentlich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen.

Zusätzlich möchte ich mich bei Dr. Carolin Helten, Dr. Philipp Mourikis und Dr. Marcel Benkhoff bedanken, die mir sowohl im Labor als auch im Schreibprozess jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein Dank gilt ebenfalls der Arbeitsgruppe. Ohne euch hätte die Arbeit nur halb so viel Spaß gemacht.

Vielen Dank an meine engsten Freunde und Freundinnen - egal ob aus Gelsenkirchen, Polsum oder Düsseldorf. Eure Ermutigung, Geduld und die vielen gemeinsamen Momente haben diese Zeit nicht nur leichter, sondern auch besonders gemacht. Ich weiß euch und euren bedingungslosen Rückhalt sehr zu schätzen.

Außerdem möchte ich mich bei Moritz bedanken. Du hast mir in den stressigsten Phasen dieser Dissertationsschrift den Rücken freigehalten und meinen Kopf mit frischer Energie geflutet. Danke, dass du immer die richtigen Worte findest, damit sich das Chaos in meinem Kopf legt.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meinem Bruder Johannes. Alles, was ich erreicht habe, beruht auf eurer tatkräftigen Unterstützung, euerem Verständnis und eurem unermüdlichen Zuspruch. Ihr habt mir von klein auf das Gefühl gegeben, dass ich alles erreichen kann, was ich mir in den Kopf setze - danke, dass ihr mich immer daran erinnert.