

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

**Die Expressionsmuster und
Oberflächenmarkerexpression von Proteinen der TGF-
Beta Superfamilie sind unterschiedlich bei Patienten
mit Aortenstenose unterschiedlicher Schweregrade**

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

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

**vorgelegt von
Öksüz, Ender
2023**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. I. Müller
2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Straub

Tag der Disputation: 13.09.2023

Meinen Eltern in tiefer Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	V
1. Einleitung.....	1
1.1. Aortenklappenstenose	1
1.1.1. Klinische Darstellung und Pathomechanismus	1
1.1.2. Diagnostik.....	3
1.1.3. Apparative Untersuchungen	3
1.1.4. Therapie.....	4
1.2. Pathophysiologie der Aortenklappenstenose	6
1.3. Monozyten	9
1.3.1. Klassische Monozyten (CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻)	11
1.3.2. Intermediäre Monozyten (CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺)	11
1.3.3. Nicht klassische Monozyten (CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺).....	11
1.4. Thrombozyten	12
1.4.1. Rolle der Thrombozyten bei der Aortenstenose.....	13
1.5. Transforming growth factor-beta Superfamilie	14
1.5.1. Funktionen von TGF- β 1	14
1.5.2. Die Signaltransduktion von Transforming growth factor-beta1 und Bone morphogenetic proteins	16
1.5.3. BMPs (Bone Morphogenetic Proteins).....	18
1.5.4. Funktionen von BMP-2	18
1.5.5. Funktionen von BMP-4	19
1.5.6. Funktionen von BMP-7	20
1.6. Fragestellung dieser Arbeit	21
2. Material und Methoden	23
2.1. Material	23
2.1.1. Verwendetes Material zur Blutentnahme und Zellfärbung	23
2.1.2. Verwendete Antikörper	24
2.1.3. Chemikalien und Reagenzien	24
2.1.4. Herstellung von Paraformaldehyd (PFA) 0,5%	25

2.1.5. Durchflusszytometrie	25
2.1.6. Statistische Auswertung.....	25
2.1.7. Weitere Geräte.....	25
2.2. Methoden	26
2.2.1. Blutentnahme und Patientenkohorte.....	26
2.2.2. Monozytenisolation und Färbung mit anti-CD14 und anti-CD16 Antikörpern	26
2.2.3. Thrombozytenisolation und Färbung mit anti-CD42b PE Antikörper	27
2.2.4. Fluorescence activated cell scanning (FACS)	27
2.2.5. Messauswertung.....	29
2.2.6. Verwendete Computerprogramme.....	30
2.2.7. Statistische Auswertung.....	31
3. Ergebnisse	33
3.1. Patientencharakteristika	33
3.2. Monozyten- und Thrombozytenauswertung	36
3.2.1. TGF- β 1	36
3.2.2. BMP-2.....	39
3.2.3. BMP-4.....	42
3.2.4. BMP-7.....	45
4. Diskussion	49
4.1. Betrachtung der Patientenkohorte.....	49
4.2. Klinische Bedeutung der TGF- β 1-Messung	50
4.3. Klinische Bedeutung der BMP-2-Messung.....	52
4.4. Klinische Bedeutung der BMP-4-Messung.....	54
4.5. Klinische Bedeutung der BMP-7-Messung.....	55
4.6. Limitationen.....	57
5.0. Zusammenfassung.....	59
6.0. Literaturverzeichnis	61
7. Erklärung zum Eigenanteil	77

Abkürzungsverzeichnis

ActRIIA/B	Activin type II receptor A or B
AIF1	Allograft inflammatory factor 1
ALK	Activin receptor-like kinase
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aortenklappenstenose
BMP-2,4,7	Bone Morphogenetic Protein 2,4,7
BMPRII	BMP type II receptor
CCR1	C-C chemokine receptor type 1
CDK	Cyclin-dependent kinase
CTSB	Cathepsin B
DCBLD2	Neuropilin-like protein
EC	Endothelial cells
EMT	Epithelial-mesenchymal-Transition
FN	Fibronectin
GATA-1	Globin transcription factor 1
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor
IFI30	Interferon Gamma Inducible Protein 30
LDL	Low density Lipoprotein
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MFI	Mittlere Frequenzintensität
MHC II	Major histocompatibility complex class II
MMP	Matrix Metalloproteinase
OPN	Osteopontin
oxLDL	Oxidized low density lipoprotein
PTPN6	Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 6
ROS	Reactive oxygen species
Runx2	Runt-related transcription factor 2

SMA	α -smooth muscle actin
SMAD	Small mothers against decapentaplegic homolog
SMC	Smooth muscle cells
TGF- β 1	Transforming Growth Factor β 1
TIE2	Angiopoietin-1 Receptor
TIMP	Tissue inhibitory Metalloproteinase
TLR2/4	Toll-like receptor
TPO	Thrombopoetin
VIC	Valve interstitial cells
vWF	Von-Willebrand-Faktor

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Einteilung der Schweregrade der Aortenklappenstenose.....	4
Tabelle 2 Inhalt der thrombozytären Granulae	13
Tabelle 3 Verwendetes Material zur Blutentnahme und Zellfärbung	23
Tabelle 4 Verwendete Antikörper	24
Tabelle 5 Chemikalien und Reagenzien	24
Tabelle 6 Durchflusszytometrie	25
Tabelle 7 Statistikprogramme.....	25
Tabelle 8 Weitere verwendete Geräte.....	25
Tabelle 9 Patientencharakteristika der Aortenklappenstenose.....	33
Tabelle 10 Laborwerte bei Studienaufnahme als Mittelwert	34
Tabelle 11 Prämedikation bei Studienaufnahme	35
Tabelle 12 Vordiagnosen bei Studienaufnahme.....	35

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Algorithmus zur Behandlung von hochgradigen Aortenstenosen ...	5
Abbildung 2 Schematische Darstellung der Pathophysiologie der Aortenklappenstenose.....	9
Abbildung 3 Monozytäre Subpopulationen.....	10
Abbildung 4 Darstellung der Signaltransduktion von TGF- β 1 und den BMPs ..	17
Abbildung 5 Beispielhafte thrombozytäre Messung in CellQuest Pro.....	29
Abbildung 6 Beispielhafte monozytäre Auswertung in FlowJo™	30
Abbildung 7 TGF- β 1-Expression der klassischen Monozyten	37
Abbildung 8 TGF- β 1-Expression der intermediären Monozyten.....	37
Abbildung 9 TGF- β 1-Expression der nicht-klassischen Monozyten	38
Abbildung 10 TGF- β 1-Expression der Thrombozyten	39
Abbildung 11 BMP-2-Expression der klassischen Monozyten.....	40
Abbildung 12 BMP-2-Expression der intermediären Monozyten	40
Abbildung 13 BMP-2-Expression der nicht-klassischen Monozyten.....	41
Abbildung 14 BMP-2-Expression der Thrombozyten.....	42
Abbildung 15 BMP-4-Expression der klassischen Monozyten.....	43
Abbildung 16 BMP-4-Expression der intermediären Monozyten	43
Abbildung 17 BMP-4-Expression der nicht-klassischen Monozyten.....	44
Abbildung 18 BMP-4-Expression der Thrombozyten.....	45
Abbildung 19 BMP-7-Expression der klassischen Monozyten.....	46
Abbildung 20 BMP-7-Expression der intermediären Monozyten	46
Abbildung 21 BMP-7-Expression der nicht-klassischen Monozyten.....	47
Abbildung 22 BMP-7-Expression der Thrombozyten.....	48

1. Einleitung

Die Aortenklappenstenose ist weltweit das häufigste behandlungsbedürftige erworbene Vitium bei Patienten über 75 Jahren [58, 94]. Die Inzidenz der nicht rheumatischen Aortenklappenstenose ist aufgrund des demographischen Wandels der Bevölkerung tendenziell steigend und geht mit einer hohen Morbidität sowie Mortalität einher [78, 146]. Vor allem Mönckeberg postulierte Anfang des 20. Jahrhunderts einen passiv degenerativen Prozess, der durch Kalziumknoten an der Klappenoberfläche wie auch erhöhtes Serumkalzium gekennzeichnet und mit fortschreitendem Alter sowie rheumatischem Fieber assoziiert ist [88]. Einer Studie aus dem Jahre 1994 gelang es erstmals den molekularen Mechanismus offenzulegen und durch immunhistochemischen Nachweis Lipidablagerungen, Makrophagen- und T-Zellinfiltration an Aortenklappen darzustellen. Folglich kann eine multifaktorielle Genese, ähnlich der Atherosklerose, als zugrunde liegende Ursache betrachtet werden [98]. Abschließend führt die Pathogenese zu einer vermehrten Akkumulation von Kalzium, Verhärtung der Klappensegel sowie des Anulus und eine damit einhergehende Einengung des Ausflusstraktes. Sinnvolle therapeutische Optionen ergeben sich aktuell lediglich im operativen- oder interventionellen Klappenersatz.

1.1. Aortenklappenstenose

1.1.1. Klinische Darstellung und Pathomechanismus

Die Aortenklappenstenose ist in den anfänglichen Stadien asymptomatisch und wird deshalb initial selten erkannt. Während die Lebenserwartung bei asymptomatischen Stenosen nicht verkürzt ist, steigt die Mortalität bei symptomatischen Stenosen aufgrund eines erhöhten plötzlichen Herztodrisikos deutlich [46].

Das Primärsymptom der Aortenklappenstenose stellt oft die Belastungssynkope dar. Körperliche oder seelische Anstrengung führen im physiologischen Zustand zur Vasodilatation der peripheren Gefäße und systemischen Hypotension. Das gesunde Herz kann die erwähnten Prozesse durch kardiale Mehrarbeit mittelfristig kompensieren, wohingegen eine Aortenklappenstenose in Kombination mit

Einleitung

einer Fehlantwort der linksventrikulären Barorezeptoren zur zerebralen Minderperfusion, Schwindel und Synkope führt.

Bei Voranschreiten der Stenose ist durch das Auswurfhindernis die Erhöhung der Vorlast vordergründig. Diese dauerhafte Vorlastserhöhung führt nach langer asymptomatischer Phase zu einer initial konzentrischen Hypertrophie, Mehrverbrauch von Sauerstoff, erhöhter Wandspannung im Subendokardium und steigert konsekutiv das Risiko einer kardialen Minderperfusion. Die anfänglich konzentrische Hypertrophie nimmt im Verlauf die Form einer exzentrischen Linksherzdilatation an.

Fünfunddreißig Prozent der Aortenklappenstenosepatienten präsentieren anginatypische Symptome [117], die auch bei koronarangiographischer Abwesenheit von Koronararterienstenosen auftreten können [46]. Angina Pectoris tritt auf, wenn der kardiale Sauerstoffbedarf die vorhandene Sauerstoffzufuhr überschreitet. Hypertrophierte Kardiomyozyten haben einen höheren Sauerstoffbedarf als gesundes Myokard, während das Endokard durch den erhöhten diastolischen Druck und komprimierten intramuralen Gefäßen innerhalb des Ventrikels schlechter perfundiert wird [56].

Die durch die Stenose bedingte Vorlastserhöhung wird zu Beginn durch das Herz im Rahmen der physiologischen Gegenregulierung kompensiert. Hierzu zählt der Frank-Starling Mechanismus, die ventrikuläre Hypertrophie oder die kardiale sympathische Innervierung. Nach einer latenten Phase kann das Herz die notwendigen Maßnahmen nicht mehr aufbringen, dekomponiert infolgedessen und wird insuffizient. Hier zeigen sich die für die Herzinsuffizienz typischen Symptome wie Ödeme, Ruhe- oder Belastungsdyspnoe, Abgeschlagenheit, Einschränkung der Leistungsfähigkeit und der Belastbarkeit.

Um entgegen des gesteigerten diastolischen Widerstandes eine suffiziente diastolische Füllung des Herzens zu gewährleisten, muss das Atrium Mehrarbeit leisten und hypertrophiert im Verlauf ebenfalls, was wiederum zu anderen Folgeerkrankungen (z.B. Vorhofflimmern oder Mitralsuffizienz) führen kann [125].

1.1.2. Diagnostik

Neben den typischen Symptomen einer AS (Aortenklappenstenose) ist die klinische Untersuchung essenziell und bietet einen schnellen Hinweis auf das vorliegende Vitium. Auskultatorisch charakterisierend ist ein spindelförmiges Holosystolikum mit punctum maximum über dem 2. ICR rechts mit Fortleitung in die Karotiden. In der körperlichen Untersuchung ist zudem ein „pulsus tardus et parvus“ sowie ein palpabler, hebender Herzspitzenstoß im 5. ICR links zu erwarten [46].

1.1.3. Apparative Untersuchungen

Neben der Blutdruckmessung nach Riva Rocci und des EKGs gibt die Röntgen-Thorax-Untersuchung weitere schnelle Indizien für eine AS. Besonders eine poststenotische Dilatation der Aorta ascendens, eine verbreiterte Herzsilhouette, eine abgerundete Herzspitze, ein eingeschränkter Retrokardialraum und eine verkalkte Aortenklappe sind hier charakterisierend.

Das wichtigste diagnostische Tool und der Goldstandard zur Diagnosestellung ist jedoch die Dopplerechokardiographie. Die ESC empfiehlt zur Diagnosestellung eine Echokardiographie, in der erst das morphologische Erscheinungsbild der Aortenklappe beurteilt wird, gefolgt von Evaluation der peak jet velocity, der mean pressure gradient sowie der Klappenöffnungsfläche [4]. Zur Feststellung der maximalen Ausflussgeschwindigkeit (peak jet velocity) und des durchschnittlichen Druckgradienten (mean pressure gradient) wird ein continuous-wave Doppler an die Aorta angelegt und die höchst gemessene Geschwindigkeit bzw. der durchschnittliche Druck als Wert angenommen [21]. Weiterhin ist es möglich die hochgradige AS in vier Kategorien zu unterteilen [133]:

1. High-gradient aortic stenosis mit Klappenöffnungsfläche $<1\text{ cm}^2$ und einem Druckgradienten von durchschnittlich $>40\text{ mmHg}$
2. Low-flow, low-gradient aortic stenosis mit einer Klappenöffnungsfläche von $<1\text{ cm}^2$, einem Druckgradienten von durchschnittlich $<40\text{ mmHg}$, einer Ejektionsfraktion von $<50\%$ und einem Schlagvolumen von $\leq 35\text{ ml/L}^2$. Hier empfiehlt die ESC eine low-dose Dobutamin Echokardiographie zur Unterscheidung von wahren schweren AS und pseudoschweren AS.

Einleitung

3. Low-flow, low-gradient aortic stenosis mit einer Klappenöffnungsfläche von $<1\text{cm}^2$, einem Druckgradienten von durchschnittlich $<40\text{mmHg}$, einer erhaltenen Ejektionsfraktion von $\geq 50\%$ und einem Schlagvolumen von $\leq 35\text{ml/L}^2$.
4. Normal-flow, low-gradient aortic stenosis mit einer Klappenöffnungsfläche von $<1\text{cm}^2$, einem Druckgradienten von durchschnittlich $<40\text{mmHg}$, einer erhaltenen Ejektionsfraktion von $\geq 50\%$ und einem Schlagvolumen von $>35\text{ml/L}^2$.

Zur vereinfachten Veranschaulichung der Schweregrade sind Grenzwerte in Tabelle 1 zusammengetragen.

	Klappenöffnungsfläche KÖF (cm ²)	Durchschnittlicher Druckgradient Δp (mmHg)	Maximale Flussgeschwindigkeit Vmax (m/s)
Normal	3-4	<10	$<2,0$
Leicht	$>1,5$	<20	$<3,0$
Moderat	1-1,5	20-40	3,0-4,0
Schwer	<1	>40	$>4,0$

Tabelle 1 Einteilung der Schweregrade der Aortenklappenstenose

1.1.4. Therapie

Obwohl oft eine frühzeitige Diagnose einer AS möglich ist, sind die therapeutischen Möglichkeiten limitiert. Trotz der pathogenetischen Ähnlichkeit und gemeinsamen Risikofaktoren mit der Atherosklerose konnten Statine im Gegensatz zur KHK keine Vorteile im Überleben bzw. im Krankheitsprogress der AS erbringen [19, 112]. Bei asymptomatischen Patienten ohne eine schwere, hämodynamisch relevante AS ist die Indikation einer therapeutischen Intervention nicht gegeben, es wird vielmehr das Prinzip des „watchful waitings“ verfolgt.

Hingegen spricht die ESC bei symptomatischen Patienten mit zulässigen Komorbiditäten eine starke Empfehlung für eine interventionelle Therapie aus. Die einzig sinnvollen Therapieoptionen sind in minimalinvasiven oder offen operativen Klappenersatz geboten, wobei im offen operativen Ansatz in der Regel versucht

Einleitung

wird den Klappenersatz mit anderen notwendigen Eingriffen (u.a. aortokoronare Bypassoperationen) zu kombinieren.

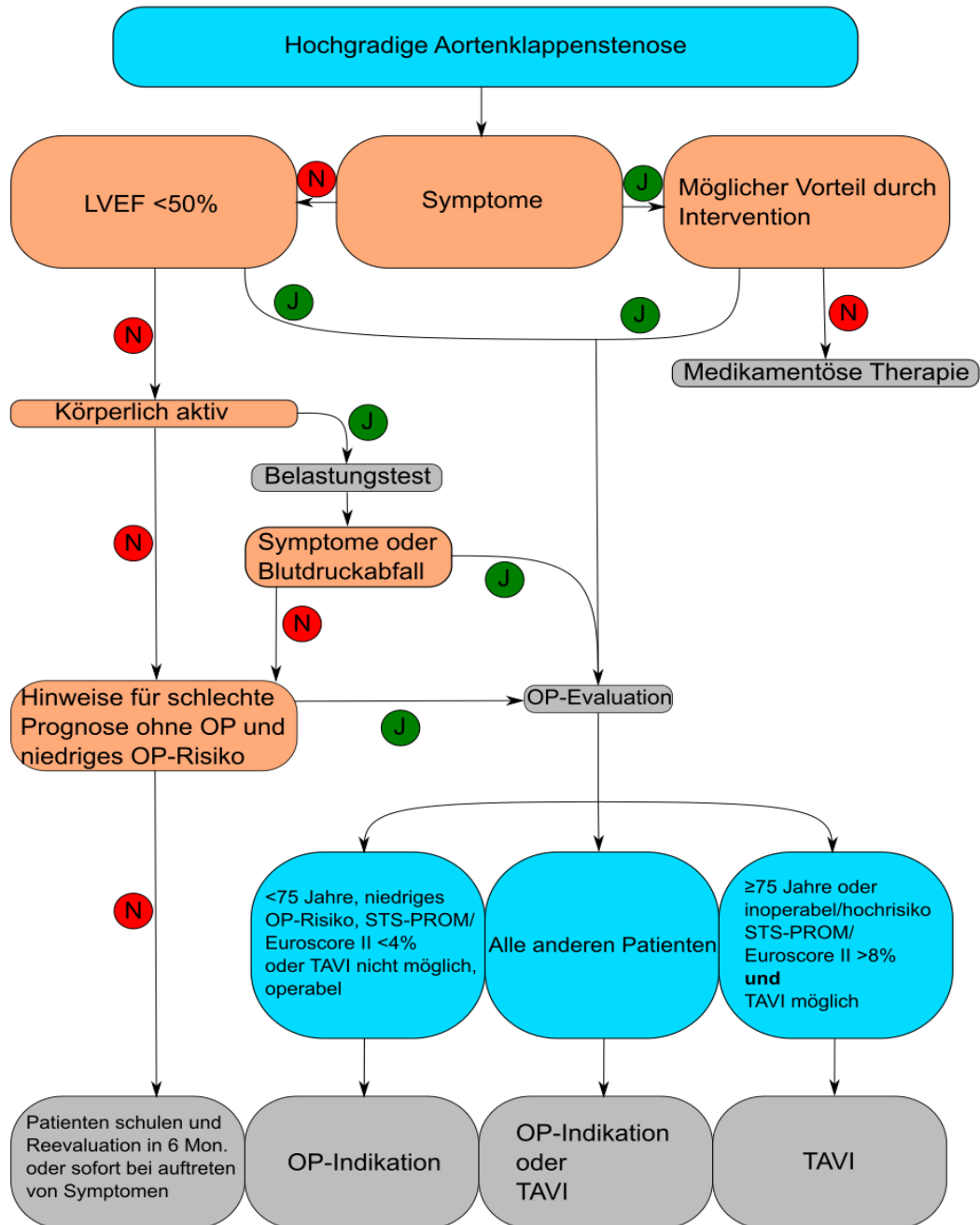


Abbildung 1 Algorithmus zur Behandlung von hochgradigen Aortenstenosen analog der ESC-Empfehlung 2022. EuroSCORE=European System for Cardiac Operative Risk Evaluation; LVEF=left ventricular ejection fraction; STS-PROM=Society of Thoracic Surgeons predicted risk of mortality; TAVI=transcatheter aortic valve implantation; Modifiziert mit Genehmigung nach [133].

Bei inoperablen Patienten empfiehlt die ESC stattdessen eine minimalinvasive Intervention mittels transfemoraler TAVI (transcatheter aortic valve implantation) analog dem Algorithmus aus Abbildung 1.

Bei minimalinvasiven Eingriffen besteht die Möglichkeit der Implantation eines biologischen Klappenersatzes, wohingegen in offen operativen Varianten sowohl ein biologischer als auch mechanischer Klappenersatz durchführbar ist [133]. Mechanische Klappen bestehen aus Carbon oder Titan und zeichnen sich durch eine jahrzehntelange Haltbarkeit aus. Jedoch ist aufgrund eines erhöhten Thrombembolierisikos die Notwendigkeit einer lebenslangen Antikoagulation gegeben. Biologische Klappen hingegen bestehen aus humanem oder tierischem Gewebe und benötigen keine Antikoagulation. Die Klappen sind im Gegenzug anfälliger für degenerative Prozesse und verfügen deshalb vergleichsweise nur über eine eingeschränkte Haltbarkeit (im Mittel ca. 10 Jahre) [101]. Aufgrund der unterschiedlichen Haltbarkeit sowie der notwendigen Begleitmedikation sollten patientenbezogene Faktoren wie Lebensstil, Lebenserwartung, Thrombembolierisiko, Wahrscheinlichkeit eines weiteren operativen Eingriffes und der informierte Patientenwunsch bei der Wahl zwischen mechanischer- und biologischer Klappe berücksichtigt werden [133].

Neben des Herzklappenersatzes ist eine Optimierung und Behandlung kardiovaskulärer Risikofaktoren und anderer Komorbiditäten wie Hypertension oder Vorhofflimmern indiziert. Weitere therapeutische Ansätze beziehen sich auf die Folgen der Aortenklappenstenose wie die Herzinsuffizienz und deren medikamentöse Therapie.

1.2. Pathophysiologie der Aortenklappenstenose

Der genaue Ursprung der Aortenstenose bleibt weiterhin unbekannt, da bisher kein eindeutiger einzelner Mechanismus identifiziert werden konnte, sondern die AS vielmehr auf multiple Einflüsse zurückzuführen ist. Diese Mechanismen involvieren Inflammation, Angiogenesis und Hämorrhagie, Fibrose, oxidativer Stress und letztlich Verknöcherung im finalen Stadium. Histologisch bestehen Herzklappen aus drei Zellarten; interstitielle Zellen (VIC= valve interstitial cells), glatte

Einleitung

Muskulatur (SMC= smooth muscle cells) und endothelialen Zellen (EC= endothelial cells). Endotheliale Klappenzenellen dienen als Barriere zwischen Blut und Klappengewebe, wohingegen sich VIC in der gesamten Herzklappe verteilen und der physiologischerweise mechanisch beanspruchten Klappenregion Stabilität verleihen.

Zu Beginn der Erkrankung besteht eine durch Scherkräfte verursachte endotheliale Dysfunktion mit subendothelialer Verdickung, gefolgt von Infiltration mit Makrophagen, Lymphozyten und Lipiden, die eine Kaskade mit inflammatorischen Zytokinen und fibrotischen Mediatoren initiieren [98]. Eines dieser Zytokine ist TGF- β 1, welches an stenosierten Aortenklappen nachweisbar ist [62]. Durch TGF- β 1 induzierte Stimulation von VIC und sequenzieller Aktivierung von Fibroblasten wird die Kollagenproduktion und Kollagenablagerung in der extrazellulären Matrix angeregt [139].

Weitere proinflammatorische und profibrotische Zytokine wie interleukin-1 β [57] oder TNF- α [69] konnten ebenfalls in der extrazellulären Matrix von Klappenzenellen nachgewiesen werden. Sie scheinen mit dem Progress der AS durch Stimulation von MMP (Matrix metalloproteinase) und seinem Antagonisten TIMP-1 (tissue inhibitory metalloproteinase-1) zu korrelieren [26]. Die MMPs gehören zu einer Gruppe proteolytischer Schlüsselenzyme, welche durch den NF- κ B-Pathway Zytokine wie MCP-1, IL-8 und IL-1 aktivieren und in der Atherosklerose und AS eine zentrale Bedeutung in inflammatorischen Geschehen besitzen [26]. Überdies sind MMPs durch proteolytische Eigenschaften im extrazellulären Remodelling der Atherosklerose beteiligt. Das Remodelling kann in der Atherosklerose als essenzieller pathophysiologischer Schritt gesehen werden und scheint diese Rolle in der AS beizubehalten [34, 59].

Das Peptidhormon Angiotensin II, was unter anderem eine Blutdruck- und Wasserhaushaltregulierende Funktion via Renin-Angiotensin-Aldosteron-System übernimmt, ist durch inflammatorische und fibrotische Prozesse durch einen ähnlichen Mechanismus via MMP relevant [10]. Zusätzlich zu einem immunhistochemischen Nachweis von ACE (Angiotensin converting enzyme) in kalzifizierten

Einleitung

Aortenklappen, waren erhöhte Serum ACE2-Niveaus mit erhöhter Mortalität und einer schlechteren Prognose in der AS assoziiert [96, 105].

Ein weiterer möglicher pathophysiologischer Ansatz ist in der intravalvulären Neovaskularisation und Hämorrhagie durch Gefäßruptur und konsekutiver Hämoglobineinlagerung zu finden [18]. Eisenüberladungen induzieren in der Genese der Atherosklerose oxidativen Stress, wirken proinflammatorisch und begünstigen die weitere Progression [152]. Entgegen erster Studiendaten hinsichtlich der zuvor erwähnten Mechanismen an Aortenklappen kann hier mangels ausreichender Verifizierung lediglich ein perspektivisches Konzept in der Entschlüsselung der Pathogenese der AS geboten werden.

Im letzten Schritt der Kaskade steht die Verknöcherung und die finale Einengung des Anulus. Eines der hier involvierten Proteine ist das saure ossifizierende OPN (Osteopontin), welches durch hohe Affinität zu Knochenmatrizes gekennzeichnet ist. Durch eine RGD (arginine-glycine-aspartate) und integrin-binding sequence ist es in der Lage, Osteoblasten und Osteoklasten an die Knochenmatrix zu binden und die Verknöcherung zu beschleunigen [95]. Durch histologischen Beweis von Osteopontin an kalzifizierten Aortenklappen zeigte O'Brien et al. 1995 erstmals die Involvierung des Peptids in der Genese der Aortenklappenstenose [95]. Diese Annahme wurde durch erhöhte Serumspiegel von OPN und Korrelation zur AS im Vergleich zu gesunden Patienten weiter untermauert [151].

Weitere zu erwähnende osteogene Faktoren, sind Osteocalcin, alkalische Phosphatase und Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2). Im Allgemeinen sind das Peptidhormon Osteocalcin und das Stoffwechsellenzym alkalische Phosphatase Bestandteil des physiologischen Knochenstoffwechsels, dessen Relationen zur Aortenstenose als aktive osteoblastische Phenotypen in den Spätstadien der Erkrankung an Bedeutung gewinnen [15, 104, 120].

Das durch valvuläre Lipidablagerungen induzierte BMP-2 wurde ebenfalls vermehrt an kalzifizierten Aortenklappen nachgewiesen. Es besitzt multiple verknöchernde Eigenschaften, die wird im Laufe dieser Arbeit dezidiert diskutiert werden [68, 106].

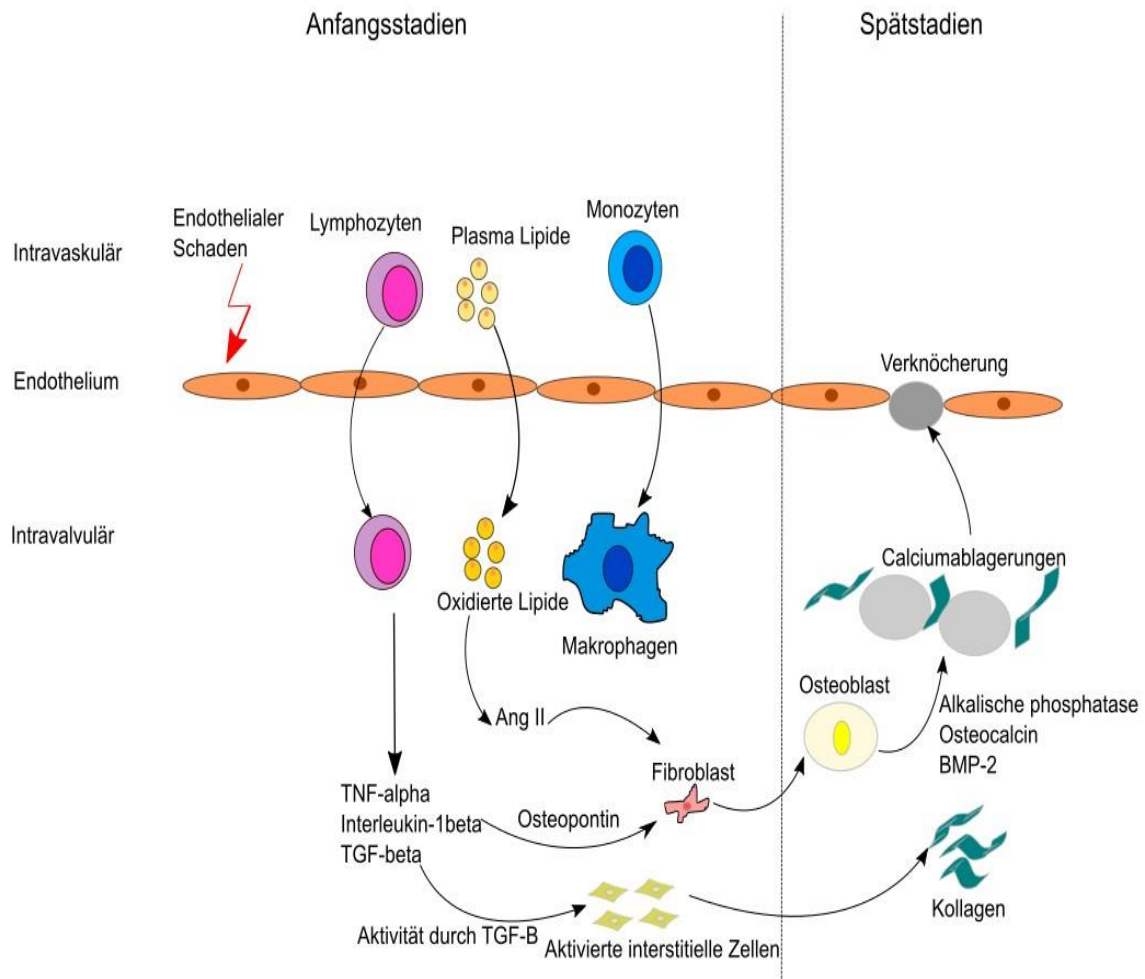


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Pathophysiologie der Aortenklappenstenose. Durch einen initialen endothelialen Schaden durch Scherkräfte beginnt die intravalvuläre Infiltration von Lymphozyten, Monozyten und Lipiden. Lipide oxidieren und induzieren durch Angiotensin II Fibroblasten. Monozyten proliferieren zu Makrophagen und induzieren gemeinsam mit Lymphozyten durch andere Mechanismen und Faktoren wie TGF- β 1 und TNF- α ebenfalls Fibroblasten. Diese leiten eine Osteogenese durch Osteoblasten und Kalzifizierung und Kollagenablagerungen die Verknöcherung der AS ein. Kollagen wird durch interstitielle Zellen induziert, die wiederum durch TGF- β 1 aktiviert werden. Kollagen ist essenziell für die Kalzifikation. Intravalvuläre Hämorrhagien werden nicht dargestellt. Modifiziert mit Genehmigung aus [97], Copyright Massachusetts Medical Society.

1.3. Monozyten

Bereits 1968 zeigten Untersuchungen, dass Vorstufen von Monozyten im Knochenmark entstehen und sich im Blut zirkulierend zu Monozyten differenzieren, bevor sie sich im Gewebe zu Makrophagen oder dendritischen Zellen entwickeln

Einleitung

[43, 134]. Als Teil der angeborenen Immunantwort besitzen Monozyten wichtige immunologische Aufgaben: Phagozytose, Antigenpräsentation und Zytokinproduktion [35]. Außerdem verfügen sie über eine inflammatorische Komponente durch eben genannte Zytokininduktion, die sich vor allem bei der Genese der Atherosklerose als essenziell erwiesen hat [52].

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie war es möglich, Monozyten vor nicht allzu langer Zeit durch die Cluster of Differentiation- Rezeptoren (CD) in weitere Subpopulationen zu differenzieren. Dabei wurden die an der Zelloberfläche exprimierten Zellrezeptoren, hauptsächlich CD14 und CD16, hinzugezogen und anhand dieser zwischen klassischen Monozyten mit hoher CD14 Rezeptoranzahl ($CD14^{++}CD16^{-}$), nicht klassischen Monozyten mit wenig CD14 und höherer CD16 Expression ($CD14^{+}CD16^{++}$) sowie intermediären Monozyten mit hoher CD14 Anzahl und niedriger CD16 Anzahl ($CD14^{++}CD16^{+}$) unterschieden [100, 156].

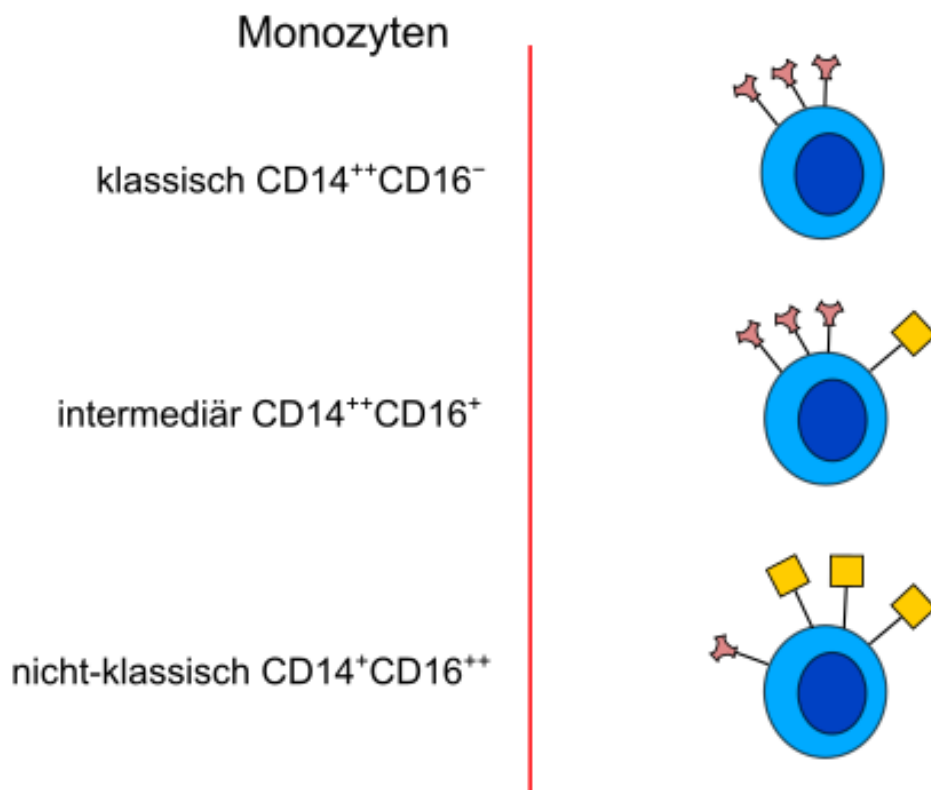


Abbildung 3 Monozytäre Subpopulationen. Modifiziert mit Genehmigung nach [156].

1.3.1. Klassische Monozyten (CD14⁺⁺CD16⁻)

Klassische Monozyten machen 80-95% aller Monozyten aus und kennzeichnen sich durch phagozytierende Eigenschaften, erhöhte chemokine Rezeptorexpression (CCR1, C-C chemokine receptor type 1) sowie durch Produktion von Entzündungsmediatoren wie IL-6, was ein Hinweis auf die entzündliche Funktion dieser Subpopulation ist [143]. Klassische Monozyten sind in der Lage LDL (low density lipoprotein) zu phagozytieren und infolge dessen ROS (reactive oxygen species) oder andere Zytokine freizusetzen und so die Atherosklerose zu fördern [52].

1.3.2. Intermediäre Monozyten (CD14⁺⁺CD16⁺)

Intermediäre Monozyten nehmen eine Position zwischen den klassischen und nicht klassischen Monozyten ein [143]. Sie machen ca. 2-8% der Monozytenpopulation aus, sind geprägt durch MHC II (major histocompatibility complex class II) und mit Aufgaben wie Angiogenese (TIE2, CD105), Antigenpräsentation (CD74, HLA-DR, IFI30, CTSB), inflammatorische Antworten (TGF- β 1, AIF1, PTPN6), Produktion von ROS und T-Zellstimulation betraut [143, 153].

1.3.3. Nicht klassische Monozyten (CD14⁺CD16⁺⁺)

Nicht klassische Monozyten charakterisieren sich durch eine leicht positive CD14-Expression sowie deutlich positive CD16-Expression und sind zu 5-10% an der gesamten Monozytenpopulation beteiligt. Funktionell unterscheiden sie sich durch phagozytierende Eigenschaften bei Zellschäden sowie nach Virus- oder Nukleinsäurekontakt via TLR7 und TLR8 (toll-like-Receptor 7- und 8) [20]. Darüber hinaus produziert der Subtyp unter Stimulation von Lipopolysacchariden vermehrt TNF- α und IL-1 β [5, 143]; zwei vordergründig maßgeblich bei Autoimmunerkrankungen beteiligte Zytokine. Misharin et al. konnten eine Gelenkdestruktion durch nicht klassische Monozyten im Rahmen eines Mausmodells bei der rheumatoiden Arthritis belegen [86]. Neuerliche Assoziationen erbrachten weitere Studien zwischen nicht klassischen Monozyten und anderen Erkrankungen wie der Sepsis oder des Lupus Erythematodes [91].

1.4. Thrombozyten

Die Thrombozytendifferenzierung findet in Megakaryozyten statt und kennzeichnet sich durch eine Sezernierung der ausgereiften Thrombozyten aus den Pseudopodien der Vorläuferzellen aus [71]. Megakaryozyten sind diametrisch die größten Zellen im Knochenmark und sind bei 0,5% der medullären Proliferationen beteiligt. Sie entstehen aus myeloischen Vorläuferzellen und differenzieren sich mithilfe von GATA-1 (Globin transcription factor 1) und MYB, während diese beiden Transkriptionsfaktoren als Gegenspieler fungieren und das Gleichgewicht zwischen Erythropoese und Thrombopoese halten. In den frühen Phasen der Megakaryozytendifferenzierung tragen Co-Faktoren wie GM-CSF, IL-3, IL-6, IL-11, TPO (Thrombopoetin) zur megakaryozytären Hämatopoese bei, wobei letztere als regulierende Faktoren fungieren [71].

Thrombozyten charakterisieren sich durch einen fehlenden Zellkern und durch Übernahme von wichtigen Aspekten in der Hämostase und einige Immunfunktionen. Elektronenmikroskopisch ist intrazellulär ein dichtes transmembranöses Kanalsystem mit endozytärer und sekretioneller Funktion (Surface-connected canalicular system (SCCS)) zu finden. Durch dieses System werden die thrombozytären Granulae bei Aktivierung freigesetzt und die koagulatorischen sowie inflammatorischen Funktionen der Plättchen entfaltet [71].

Nach erfolgtem Endothelschaden kommt es zur Ausschüttung von zytoplasmatischem VWF (von-Willebrand-Faktor) und Adhäsion von Thrombozyten durch GPIIb α -Rezeptoranbindung [71]. GPIIb α (CD42b), Faktor IX und Faktor X bilden einen Komplex und binden an den VWF an, der als wichtiges Bindeglied zwischen Thrombozyten und dem subendothelialen Fibrin gesehen werden kann. Nach fortschreitender Aktivierung der Koagulationskaskade und weiterer Anbindung von Fibrin und zunehmender Aggregation kommt es letztendlich zur Ausschüttung der intrazellulären Granulae aus den aktivierten Thrombozyten durch oben genanntem SCCS.

Diese intrazellulär enthaltenen Granulae sind untereinander durch ihre Zusammensetzung different. Sie werden während der Entstehung in Megakaryozyten

synthetisiert und enthalten sowohl multifunktionale Proteine wie PDGF, VEGF, FGF, TGF- β als auch diverse Gerinnungsfaktoren. Eine grobe Übersicht über den Inhalt der Granulae kann aus untenstehender Tabelle entnommen werden.

Granula	Inhaltstoff
α Granula	VWF
	Faktor V
	Faktor VIII
	Fibrinogen
	Fibronectin
	VEGF/VPF, TGF- β , PDC1, PDGF
Δ Granula (dense Granula)	ADP
	ATP
	Serotonin
	Ca ²⁺ , Mg ²⁺

Tabelle 2 Inhalt der thrombozytären Granulae VWF= Von-Willebrand-Faktor; VEGF= vascular endothelial growth factor/ vascular permeability factor; TGF- β = transforming growth factor - β , PDC1= platelet derived collagenase inhibitor; PDGF= platelet derived growth factor [71]

1.4.1. Rolle der Thrombozyten bei der Aortenstenose

Die Rolle von Thrombozyten bei Herzinfarkten oder Schlaganfällen durch Adhäsion an rupturierte atherosklerotische Plaques und konsekutiven thromboembolischen Ereignissen ist allgemein bekannt. Gawaz et al. zeigten, dass Thrombozyten nicht nur in der Spätphase der Atherosklerose, sondern unter anderem bereits in den Anfangsstadien durch Chemotaxis mithilfe von IL-1 und MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) intervenieren und durch Aktivierung des NF- κ B-Pathways die Erkrankung beeinflussen können [37, 38].

In diesem Zusammenhang alteriert turbulenter Blutfluss, wie es bei der Aortenklappenstenose der Fall ist, thrombozytäre Funktionen, aktiviert diese und induziert eine Adhärenz der Zellen an das Endothelium [109]. Das proinflammatorische Zytokin TGF- β ist in Thrombozyten intrazellulär quantitativ hundertfach höher exprimiert als in anderen Körperzellen und ist serologisch bei AS Patienten im Vergleich zur Normalpopulation zudem vermehrt nachweisbar [2, 137]. Dieser

Umstand suggeriert eine inflammatorische Beteiligung von Thrombozyten in der Genese der Aortenstenose, ähnlich der Atherosklerose.

1.5. Transforming growth factor-beta Superfamilie

Der Transforming growth factor-beta1 (TGF- β 1) ist ein Zellprotein, das 1983 erstmals aus menschlichen Thrombozyten isoliert und beschrieben wurde [2]. In den Folgejahren konnten nach Entdeckung des ersten humanen Proteins andere, sich strukturell und in der Wirkweise ähnelnde, Geschwisterproteine isoliert und identifiziert werden. Die Peptide gliedern sich hauptsächlich in zwei Subfamilien: Die TGF- β /Activin/Nodal Subfamilie und BMP (bone morphogenetic protein)/GDF (growth and differentiation factor)/MIF (Muellerian inhibiting factor). Unterschiede dieser Subfamilien sind hauptsächlich durch unterschiedliche Affinitäten gegenüber verschiedenen Transmembranrezeptoren und konsekutiv differierenden Signalwegen geprägt. Die meist als inaktive Prohormone sekretierten Zytokine benötigen proteolytische Spaltung durch die extrazelluläre Matrix, bevor sie in ihrer aktiven Form von Signalrezeptoren erkannt werden [49, 50, 118].

1.5.1. Funktionen von TGF- β 1

TGF- β gilt als stark pleiotropes Peptid in Diversen physiologischen und pathologischen Funktionen wie Inflammation, Fibrose oder Chemotaxis. Beispielsweise kann die Wundheilung als komplexer multiphasischer Prozess mit Chemotaxis, Fibroblastendifferenzierung, Angiogenese, Kollagenablagerungen und Narbenbildung im Endstadium angesehen werden, welcher durch TGF- β maßgeblich stimuliert und beeinflusst wird. TGF- β bildet gemeinsam mit VEGF einen entscheidenden Faktor in der Angiogenese der Wundheilung. In der Chemotaxis besitzt TGF- β insbesondere in der Stimulation von Neutrophilen sowie Monozyten eine wichtige Funktion [32, 108, 138]. Diese Immunzellen können durch Aktivierung von Fibroblasten sowie Myofibroblasten die Narbenbildung weiter vorantreiben.

Die profibrotische Funktion von TGF- β wird durch erhöhte TGF- β Nachweise und Kollagen-Gen-Expression in der Lungenfibrose unter Bleomycingabe, einem lungenfibroseinduzierendem Antibiotikum und Zytostatikum verdeutlicht [22].

Einleitung

Neuere Studien zeigten den Einfluss des Proteins bei der Entstehung von anderen kollagenassoziierten Pathologien wie der Atherosklerose und systemischen Sklerose [70, 113].

Die Diversität in den Funktionen des Peptids setzt sich durch dessen Wirkung in der Chemotaxis fort. Zusätzlich zu den oben erwähnten chemotaktischen Eigenschaften inhibiert TGF- β T-Zellen, T-Helferzellen, B-Zellen oder auch NK-Zellen und kann deshalb als Regulator von Immunfunktionen gesehen werden [77]. Hiermit vereinbar sind diverse Studien hinsichtlich des Peptids und dessen bipolaren Einfluss auf autoimmune Erkrankungen [45, 103].

In der Tumorgenese wirkt TGF- β im Frühstadium suppressiv, wohingegen es in späteren Stadien die Tumorprogression und Metastasierung begünstigt. In den anfänglichen Stadien entfaltet das Protein seine tumorsuppressive Wirkung durch Hochregulierung von CDK (Cyclin-dependent kinase) [23]. Diese antitumorale Wirkung verliert das Peptid jedoch im Verlauf aufgrund herunterregulierter TGF- β -Rezeptoren und Induktion von EMT (Epithelial-mesenchymal-Transition) und konsekutiver Aktivierung von MMP [44].

TGF- β nimmt über Fibrosierung in der Wundheilung und organassoziierten Fibrosen hinaus an kardiovaskulären Pathologien, insbesondere der AS teil. Fielitz et. al zeigten eine Korrelation zwischen kardialer Druck- und Volumenüberladung sowie ACE und TGF- β 1-Expression mit hieraus resultierenden kardialen Kollagenablagerungen [33]. Angiotensin II stimuliert TGF- β durch den Wnt-Signalweg und treibt die Fibrosierung hiermit weiter voran [31]. Zusätzlich beschrieben Jian et al. ein erhöhtes extrazelluläres TGF- β 1 an kalzifizierten Aortenklappen mithilfe immunhistochemischer Färbung und vermuteten eine Beschleunigung des Progresses der Aortenklappenstenosen via apoptotische valvuläre Knötchen [62].

Neben den fibrosierenden Eigenschaften von TGF- β scheint es kalzifizierende Effekte an der Aortenklappe zu besitzen. Durch Hochregulierung von VIC aktiviert TGF- β gemeinsam mit BMP-2 und der alkalischen Phosphatase die osteoblastischen Eigenschaften der VIC und ist mit einer Progression der AS assoziiert [155].

1.5.2. Die Signaltransduktion von Transforming growth factor-beta1 und Bone morphogenetic proteins

Proteine der TGF- β Superfamilie besitzen einen aus vier Aminosäureresten bestehenden Cystin-Knoten und einer weiteren Disulfidbrücke zwischen dem ersten und vierten Aminosäurerest [90]. TGF- β wirkt via Anbindung an gleichnamige Rezeptoren, mit denen es heteromere Komplexe bildet. Beschrieben sind sieben Typ I Rezeptoren (ALK 1-7) und vier Typ II Rezeptoren (T β RII, BMPRII, ActRIIA/B), die sich durch N- und C-Terminus sowie einen transmembranösen Teil auszeichnen [92]. TGF- β und Activin weisen die höchste Affinität zu Typ II Rezeptoren auf. Durch Anbindung dieser Rezeptoren und konsekutiver Einleitung von Typ II Rezeptor-Kinasen kommt es zur Phosphorylierung an der GS-Box, einem Glycin/Serin-reichen Teil der Membran und die Typ I Rezeptor-Kinase wird induziert [53, 89]. Die Typ I Rezeptor-Kinase ist in der Lage R-SMAD (receptor associated- small mothers against decapentaplegic), in diesem Fall SMAD 2/3 zu aktivieren, welche nach Phosphorylierung Komplexe bilden und durch Akkumulation die Transkription im Nukleus mit regulieren [111]. SMADS sind wichtige Co-Faktoren in der Transkription, die diese entweder als R-SMADS modifizieren oder als I-SMADS hemmen können.

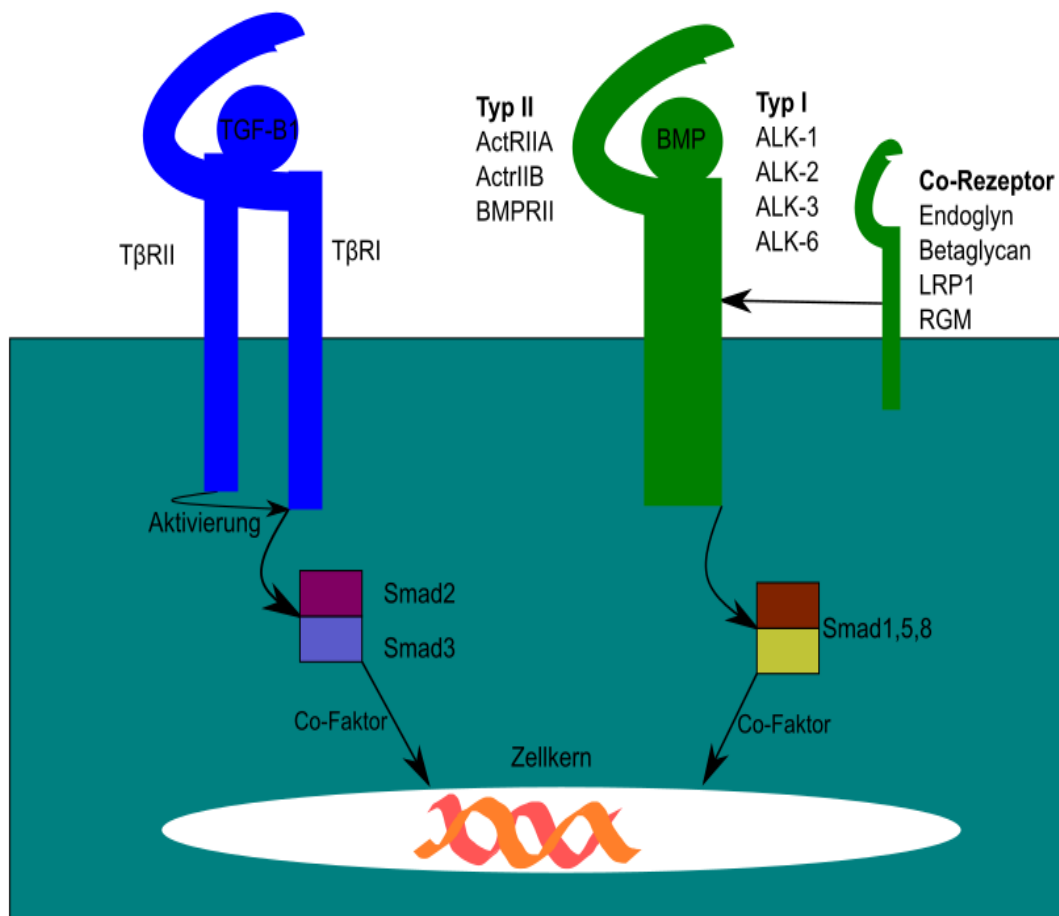


Abbildung 4 Darstellung der Signaltransduktion von TGF-β1 und den BMPs mit jeweiligen Rezeptortypen und Co-Rezeptoren. Modifiziert mit Genehmigung nach [41, 75]

Ein ähnlicher Mechanismus liegt dem Transduktionsweg der BMPs zugrunde. Unterschiede finden sich hier lediglich in den bevorzugten zugehörigen Signalrezeptoren und in den folglich aktivierten SMADs. BMPs präferieren Typ I Rezeptoren (ALK 1-3 und 6) oder Typ II Rezeptoren (BMPRII oder ActRIIA/B), differenzieren sich jedoch untereinander durch unterschiedlich starke Ligandenaffinitäten [41]. Die infolgedessen in Gang gesetzten intrazellulären Mediatoren unterscheiden sich in der Funktion von denen der durch TβRII aktivierten Peptide. Zudem sind Co-Rezeptoren wie Endoglycin oder LRP1 vorhanden, die die Signaltransduktion weiterhin beeinflussen können [27, 73].

1.5.3. BMPs (Bone Morphogenetic Proteins)

BMPs sind ein Teil der TGF- β Superfamilie, dessen Aktivitäten erstmals 1965 von Urist beobachtet worden sind [132]. Im Anschluss an subcutaner oder intramuskulärer Knochenmatrixinjektion in Rodentia waren ektope Knochenwachstume zu beobachten. Die BMPs als ursächliche Proteine konnten erst Jahrzehnte später verantwortlich gemacht werden [81, 140]. Eine essenzielle Rolle spielen BMPs somit bei der Induktion und Regulierung von Knochen- und Knorpelbildung [106, 115, 144], welche sich vor allem während der Embryogenese und Frakturheilungen entfalten [47, 107].

Es existieren mehr als 15 strukturell Verwandte BMPs, die anhand ihrer Aminosäuresequenzen in weitere Subgruppen zu unterteilen sind. BMP -2/-4 bilden eine Gruppe, ebenso wie BMP-5/-6/-7/-8, GDF-5/-6/-7, GDF-8/-11, BMP-9/-10, GDF-1/-3 und GDF-10/BMP-3 [90].

1.5.4. Funktionen von BMP-2

Wie auch das Geschwisterprotein TGF- β 1, besitzt BMP-2 multifunktionale Eigenschaften. Diese zeigen sich unter anderem in einer hepatozellulären Überexpression von Hecpudin, einem Eisenspeicher unter Stimulation von BMPs, wie auch in der Regulierung und Distribution von adipösem Gewebe [25, 130]. Als erste entdeckte und weitreichendsten erforschte Eigenschaft ist die Rolle im Knochenstoffwechsel zu benennen. Seit jeher bestand das Ziel, die osteogenetische Funktion von BMP-2 zu nutzen, weshalb Shimandle et al. Mäusen bei Spondyloesen rekombinantes BMP-2 verabreichte. Die Knochenformation sowie Knochenversteifung in der Versuchsgruppe gelang deutlich schneller als in der Kontrollgruppe [116]. Govender et al. versuchte diesen Umstand bei humanen Probanden zu verifizieren und bestätigte dies durch die Tatsache, dass Patienten eine verbesserte Heilungsrate und weniger Komplikationen nach einer offenen Tibiafraktur unter supplementärer BMP-2-Substitution erlitten [42]. Zudem wirkt der Ligand bei einigen osteotropen Pathologien mutmaßlich als eine der treibenden Kräfte, insbesondere bei Tumoren wie Pankreaskarzinomen,

Prostatakarzinomen oder Osteosarkomen scheint BMP-2 in Abhängigkeit der Tumorentität eine inhibierende oder aktivierende Rolle innezuhaben [48, 54, 74].

Die Rolle des Peptids im Knochenmetabolismus setzt sich in der Verknöcherung der Aortenstenose fort. Seya et al. zeigten an Untersuchungen der Herzklappen von Nagetieren unterschiedlichen Alters (9 Wochen und 30 Wochen), dass bei älteren Mäusen eine erhöhte Expression von BMP-2, AP und AP-Aktivität der VIC zu beobachten war. Der Versuch, die valvuläre Verknöcherung mit osteogenen Medikamenten wie TNF- α , Dexamethason, β -Glycerophosphat und hohe Phosphatkonzentrationen zu beschleunigen scheiterte. Die Studie legte somit die Vermutung nahe, dass mutmaßlich andere ossifizierende Prozesse, vor allem der BMP-2-Pathway, Ursache für die AS sind [119]. Kaden et al. demonstrierten darüber hinaus durch immunhistochemischer Färbungen eine erhöhte BMP-2-Expression an kalzifizierten Aortenklappen im Vergleich zu nicht kalzifizierten Aortenklappen [68].

1.5.5. Funktionen von BMP-4

Wie auch BMP-2 trägt BMP-4, neben osteoinduktiver Funktionen, entscheidend zur Embryogenese, insbesondere der Entwicklung von Extremitäten, Organogenese sowie des ZNS bei [66]. Jones et al. fand eine besonders hohe Expression des Zytokins während der Entwicklung des Diencephalons, insbesondere der Hypophyse im Mausmodell. Der Einfluss des Signalproteins beläuft sich zusätzlich auf die dorsoventrale Achse des Embryos zusammen mit dem Gegenspieler Noggin und unterstreicht deren Wichtigkeit in der Entwicklung [65, 82, 157].

Die Unabdingbarkeit von BMP-4 in der Embryogenese bestätigte sich im Tierversuch durch frühzeitiges Versterben des Embryos bei Abwesenheit von BMP-4-Transgenen [99].

Im Spektrum der Tumorgenese stellt BMP-4, ähnlich wie TGF- β , eine durch umfassende Studien belegte vordergründig divergente Rolle dar. Einerseits agiert das Protein tumorsuppressiv bei Lungen-, Mamma-, Kolorektal- oder Blasenkarzinomen indem es die Tumorprogression verlangsamt oder die Chemotherapiesensitivität erhöht und den Wnt-Signalweg aktiviert [7, 30, 72, 79, 93],

andererseits bringt es das Tumorwachstum weiterhin in Gang und fördert die Metastasenneigung [24, 76].

Neuerliche Studien unterstreichen den Einfluss von BMP-4 auf das kardiovaskuläre System. Bei starker mechanischer Beanspruchung begünstigt das endotheliale BMP-4 die Adhäsion von Monozyten an das Endothelium via ICAM-1 Expression und somit die Inflammation und in Folge die Atherosklerose [123, 124]. Die Inhibition von BMPs durch das Matrix GLA Protein, ein Antagonist des Peptids, führte zu einem Rückgang der Atherosklerose, der Media- und Intimainflammation sowie Kalzifikation im Mausmodell [150].

Sun et al. wiesen einen BMP-4-vermittelten Anstieg von ROS (reactive oxygen species) und NOX (NADPH oxidase), zwei Schlüsselfaktoren der kardialen Hypertrophie und Aortenstenose, innerhalb der Kardiomyozyten nach [131]. Darüber hinaus spielt das mechanosensitive BMP-4 eine Rolle in der kardialen Fibrose und präsentierte sich bei starken Scherkräften an Aortenklappenstenosen deutlich erhöht [128, 129].

1.5.6. Funktionen von BMP-7

Nach erfolgreicher Identifizierung und Klonung von BMP-7 (auch osteogenic protein 1 genannt) wurde rasch dessen Fähigkeit, Stammzellen zu Osteoblasten zu stimulieren und differenzieren, erwiesen [11]. Diese Eigenschaft untermauerte Cook et al. durch den Nachweis einer verbesserten Frakturheilung im Mausmodell unter BMP-7-Gabe [17]. Am Menschen hingegen war die Überlegenheit des Zytokins hinsichtlich osteogener Funktion gegenüber autologer Knochen transplantation nicht zu beweisen, weshalb die therapeutische Applikation von rhBMP-7 (recombinant human BMP-7) beim Menschen lediglich als alternative zur autologen Knochen transplantation verwendet wird [36].

Parallelen zwischen BMP-7 und BMP-4 in embryogenetischen Funktionen und der Unentbehrlichkeit beider Peptide sind aufzuzeigen. Ähnlich wie BMP-4 hatte eine vollständige Inhibition von BMP-7 im Mausmodell ein frühzeitiges Versterben der Versuchstiere zufolge. Anders als bei BMP-4 allerdings verstarben diese

erst nach der Geburt und präsentierten morphologisch eine Anophthalmie sowie renale Dysplasie [29].

BMP-7 wurde außerdem als „Gegenspieler“ von TGF- β unter anderem bei malignen Erkrankungen identifiziert. Während TGF- β ossäre Metastasierungen insgesamt begünstigt, scheint BMP-7 eine konträre, inhibierende Aufgabe zu übernehmen [8, 9].

Dieser Gegensatz setzt sich jenseits maligner Erkrankungen fort. TGF- β agierte beispielsweise in der renalen Fibrose proinflammatorisch und profibrotisch, wohingegen BMP-7 seinen protektiven Effekt entfaltete und die bereits von TGF- β verursachte Fibrose revidierte [40, 145, 147].

Überdies waren sowohl im Tiermodell als auch bei humanen Probanden in linksventrikulären Biopsien histologisch, via Western Blot und qPCR bei hochgradigen AS, BMP-7-Expressionen deutlich vermindert. Die durch kardiales Remodelling gezeichneten Myozyten mit nachweislichem Disäquilibrium von BMP-7 und TGF- β konsolidierten die Theorie der gegensätzlichen Funktionen beider Peptide erneut [85, 142].

1.6. Fragestellung dieser Arbeit

Wie oben erläutert, spielen einige Proteine der TGF- β -Superfamilie in der Apoptose, Chemotaxis, Embryogenese, Tumorwachstum sowie bei Inflammatonsprozessen und Fibrosen eine relevante Rolle. Inwieweit diese Proteine die Fibrose und Kalzifikation der Aortenklappe in Abhängigkeit vom Stadium und dessen Progression induzieren, beschleunigen oder verlangsamen ist noch nicht endgültig untersucht.

In dieser Studie wurde in einer Kohorte von 43 Patienten mit einer nativen Aortenklappenstenose die Expression von TGF- β 1, BMP-2, BMP-4 und BMP-7 an Monozyten und Thrombozyten untersucht. Die Expressionsmuster der oben genannten Proteine wurden bei Patienten mit unterschiedlichen Schweregraden einer Aortenklappenstenose analysiert. Hierbei wurden frühe Stadien (Grad I) mit späten Stadien (Grad II und III) miteinander verglichen. Außerdem wurden die jeweiligen Vorerkrankungen, Prämedikationen,

Einleitung

Laborwerte und die kardiovaskulären Risikoprofile der unterschiedlichen Schweregrade untersucht und miteinander verglichen.

2. Material und Methoden

Für das Studienkonzept liegt ein gültiges Ethikvotum vor mit der Projektnummer: 270/2011B02.

2.1. Material

2.1.1. Verwendetes Material zur Blutentnahme und Zellfärbung

Verwendetes Material	Hersteller
Safety-Multifly-Kanüle	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette 8,5 ml CPDA	
Universal 32R V3.01 Zentrifuge	Hettich AG, Bäch, Schweiz
Eppendorf Reference 100-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research 100-1000µl	
Eppendorf Research 10-100µl	
Eppendorf Research 0,5-10µl	
Eppendorf 20 µl	
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	
Safe-Lock Tubes 0,5 ml	
Pipettenspitzen Blau 100-1000 µl	
Spitzen 10 µl farblos	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
CellPro™ Flow Cytometry Tubes	Alkali Scientific

Tabelle 3 Verwendetes Material zur Blutentnahme und Zellfärbung

2.1.2. Verwendete Antikörper

Name	Hersteller	Katalog #
Human TGF-beta 1 Fluorescein-conjugated Antibody	R&D Systems	IC240F
BMP2 Polyclonal Antibody, FITC Conjugated	Bioss Antibodies	bs-1012R-FITC
Anti-BMP4 antibody [EPR6211] (Alexa Fluor® 488)	Abcam	ab200794
Milli-Mark Anti-BMP-7-FITC Antibody, clone 2A10	Merck Millipore	FCMAB135F
Human CD14 PE-conjugated Antibody	R&D Systems	FAB3832P-100
Human Fc gamma RIII (CD16) APC-conjugated Antibody	R&D Systems	FAB2546A-100
PE Mouse Anti-Human CD42b	BD Pharmingen™	555473

Tabelle 4 Verwendete Antikörper

2.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Paraformaldehyd	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Dulbecco's PBS 500 ml	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Sodium Hydroxide (NaOH) 10 mol/l	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure Maßlösung 6 M	
Erylysepuffer	BD FACS™ Lysing Solution, Franklin Lakes, USA

Tabelle 5 Chemikalien und Reagenzien

2.1.4. Herstellung von Paraformaldehyd (PFA) 0,5%

Zunächst wird 5 g Paraformaldehyd zusammen mit 40 ml NaOH in 400 ml PBS unter ständigem Rühren und Erhitzen auf 65°C vermischt. Nach Abkühlung wird das Gemisch mit 1 mol/l Salzsäure auf einen pH von 7,4 titriert und mit einem 0,2 µ-Filter gereinigt. Vor Gebrauch des PFAs zur Monozytenfärbung muss das Gemisch zusammen mit PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt werden. Die Lösung kann auf -20°C im Kühlschrank gelagert werden.

2.1.5. Durchflusszytometrie

Gerät und Programme	Hersteller
BD FACSCalibur	BD Biosciences
BD CellQuest Pro™ Software	
BD FACSRinse Solution	
BD Clean Solution	
FlowJo™	

Tabelle 6 Durchflusszytometrie

2.1.6. Statistische Auswertung

Software	Softwareprovider
SPSS Statistics	International Business Machines Corporation (IBM)

Tabelle 7 Statistikprogramme

2.1.7. Weitere Geräte

Gerät	Hersteller
Multifuge 1s Heraeus	Thermo Corporation, Osterode, Deutschland
VF2 Vortexer	Janke & Kunkel GmbH, Staufen, Deutschland

Tabelle 8 Weitere verwendete Geräte

2.2. Methoden

2.2.1. Blutentnahme und Patientenkohorte

Die Blutentnahme erfolgte mithilfe einer Safety-Multifly-Kanüle und Entnahme von 8,5 ml venösem Blut in eine CPDA (citrate phosphate dextrose adenine) - Monovette nach proximaler Venenstauung und zweimaliger Hautdesinfektion. Die Patientenkohorte ergibt sich aus stationären Patienten des Universitätsklinikums Tübingen in der Abteilung für Kardiologie und Angiologie. Ein Echokardiographische native Aortenklappenstenose war Voraussetzung für den Studieneinschluss. Ein schriftliches Einverständnis aller 43 Patienten liegt vor.

2.2.2. Monozytenisolation und Färbung mit anti-CD14 und anti-CD16 Antikörpern

Zu Beginn der Färbung wurde das Blut in einer mit CPDA versetzten 8,5 ml Monovette vorsichtig geschwenkt, die Blutbestandteile somit durchgemischt und dann jeweils 150 µl Vollblut in vier Cell flow cytometry tubes (im folgenden FACS-Röhrchen genannt) pipettiert.

Anschließend wurde in jedes FACS-Röhrchen jeweils 10 µl anti-CD14⁺ und anti-CD16⁺ Antikörper gegeben. Dazu wurde 10 µl eines der Antikörper- in diesem Fall entweder Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) oder die Bone morphogenetic proteins (BMP-2, BMP-4 oder BMP-7) in jeweils eines der vier FACS-Röhrchen zu dem Vollblut hinzugegeben.

Zur Anbindung der Antikörper an die Antigene der Monozyten erfolgte nach kurzem vortexen eine lichtlose Inkubation für insgesamt 30 Minuten. Hierbei waren die bereits FITC konjugierten Antikörper essenziell, um die Detektion durch die Durchflusszytometrie sicherzustellen.

Nach der Inkubation wurde jedes FACS-Röhrchen jeweils 1 ml Erylyse-Puffer befüllt, um die Lyse des größten Teils der Erythrozyten zu gewährleisten und Messungenauigkeiten zu vermeiden. Nach kurzem Vortexen und 12-minütiger Inkubation folgte die Zentrifugation der FACS-Röhrchen mit 1200 rpm für 10 Minuten. Die Dichtezentrifugation diente zur Trennung und Sortierung der Zellbestandteile in der Probe. Im Anschluss wurde das Lysat, welches sich nicht am

Grund des Röhrchens befand entsorgt und die übrig gebliebenen Blutzellen am Boden des FACS-Röhrchens mit einer 300 µl 0,5% PFA-Lösung vermischt, um einen Zellzerfall zu verhindern. Die Endprobe wurde daraufhin bei 4°C gelagert und innerhalb von 48 Stunden via Durchflusszytometrie ausgezählt.

2.2.3. Thrombozytenisolation und Färbung mit anti-CD42b PE Antikörper

Zur Isolation und Färbung von Thrombozyten wird 20 µl Vollblut der Patienten aus der CPDA Monovette entnommen und mit 980 µl PBS (phosphate buffered saline) in einer Safe-Lock Tube vermischt um ein Mischverhältnis von 1:50 zu erhalten.

Nach durchmischen des Blutes durch vorsichtiges Schwenken, um eine Schädigung der Thrombozyten zu vermeiden, erhielt jedes FACS-Röhrchen 40 µl des vermischten Blutes in insgesamt 4 FACS-Behälter. Dazu kamen 5 µl des anti-CD42b PE Antikörpers in jedes FACS-Röhrchen, sowie TGF-β1, BMP-2, BMP-4 oder BMP-7 Antikörper in jeweils eines der Tuben. Nach erneutem vorsichtigem Schwenken wurden die Proben mit den Blutbestandteilen und den Antikörpern für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Im letzten Schritt wurde jede Probe mit 300 µl PFA 0,5% befüllt und für maximal 48 Stunden gelagert, bis sie mit der Durchflusszytometrie ausgezählt wurden.

2.2.4. Fluorescence activated cell scanning (FACS)

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, das der schnellen Differenzierung von Zellen dient und meist in Gebieten wie der Immunologie, Mikrobiologie oder der molekularen Biologie Anwendung findet. Das FACS schickt dazu Zellen in einen Mikrokanal, wo diese auf einen Laser treffen und im Anschluss mithilfe der emittierten Streustrahlung, dem FSC (forward scattered light) das Volumen der Zelle und durch den SSC (side scattered light) den Zellinhalt bestimmt. Diese werden an einer Photodiode detektiert, ausgezählt und in elektrische Signale umgewandelt [51, 84]. Mit den von uns verwendeten fluorchrom konjugierten Antikörpern ist eine nähere Differenzierung der Zellpopulationen anhand des emittierten

Material und Methoden

Lichts möglich. Die gemessene Fluoreszenz ist direkt proportional zur Anzahl spezifisch farbstoffkonjugierter gebundener Antikörper.

Der hier verwendete FACSCalibur des Herstellers BD Biosciences nutzt einen dualen Laser zur Zellzählung, einen Argon-Ion Laser mit 488 nm und einen optionalen optischen Laser mit 635 nm. Die maximale Obergrenze der gemessenen Ereignisse wurde hierbei auf 10.000 limitiert. Die MFI (mittlere Fluoreszenzenintensität) der markierten Antikörper (TGF- β 1, BMP-2, BMP-4, BMP-7) innerhalb der gezählten Zellpopulation wurden an Thrombozyten und Monozyten gezählt und zur statistischen Auswertung hinzugezogen.

FITC ist ein hellgrünes Fluochrom und wird ab einer Wellenlänge von maximal 494 nm angeregt und emittiert bis zu einer Wellenlänge von 520 nm [84]. Die verwendeten FITC konjugierten Antikörper waren: TGF- β 1, BMP-2, BMP-7.

Alexa Fluor[®] 488 ist farblich ähnlich wie FITC und wird ab einer Wellenlänge von maximal 495 nm angeregt und emittiert bis zu einer Wellenlänge von 519 nm. Alexa Fluor ist pH-stabiler als FITC, weshalb es für intrazelluläre Anwendungen verwendet werden kann [84]. BMP-4 war mit Alexa Fluor[®] 488 konjugiert worden.

R-phycoerythrin (PE) zeichnet sich durch gelbe Farbe und einer maximalen Exzistabilität von 496 nm und einer maximalen Emission bis zu 578 nm aus [84]. CD42b und CD14 waren mit R-phycoerythrin markiert worden.

Allophycocyanin (APC) ist das einzige Fluochrom, das sich dem roten Farbspektrum zuordnet. Die maximale Anregung findet bei einer Wellenlänge von 650 nm und die maximale Emission bei 660 nm statt [84]. CD16 war der einzige durch APC fluoreszierende Antikörper.

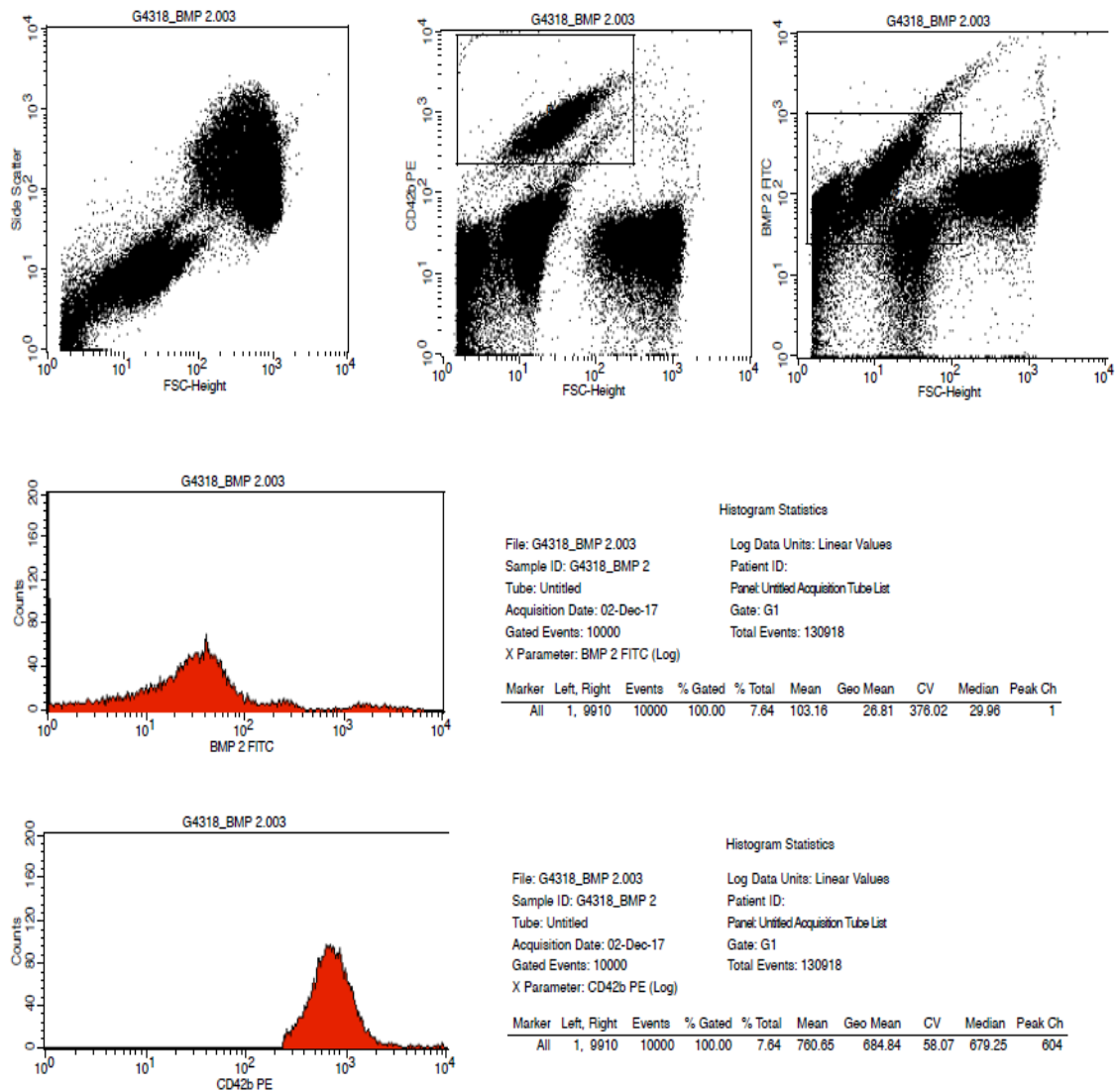


Abbildung 5 Beispielhafte thrombozytäre Messung in CellQuest Pro

2.2.5. Messauswertung

Bei Erythrozyten lysiertem Vollblut ergeben sich drei unterschiedliche leukozytäre Zellpopulationen: Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten. Um diese voneinander differenzieren zu können werden in BD CellQuest™ Pro Analysis Software die gemessenen Fluoreszenzantikörper anhand SSC und FSC detektiert und in einem Streudiagramm festgehalten. Um CD42b-positive Thrombozyten, CD14⁺⁺CD16⁻ klassische Monozyten, CD14⁺CD16⁺⁺ nicht klassische Monozyten und CD14⁺⁺CD16⁺ intermediäre Monozyten differenzieren zu können, erfolgt die Festlegung einer „Region of interest“ innerhalb der Software.

Um Überlagerungen der Floreszenzen und damit einhergehende Messungenauigkeiten zu vermeiden, wird die weitere Auswertung in FlowJo® übertragen. Hier sind die isolierte Betrachtung und Bewertung durch Anpassung der zu untersuchenden Fenster gegeben. Die Quantifikation wird mittels MFI angegeben.

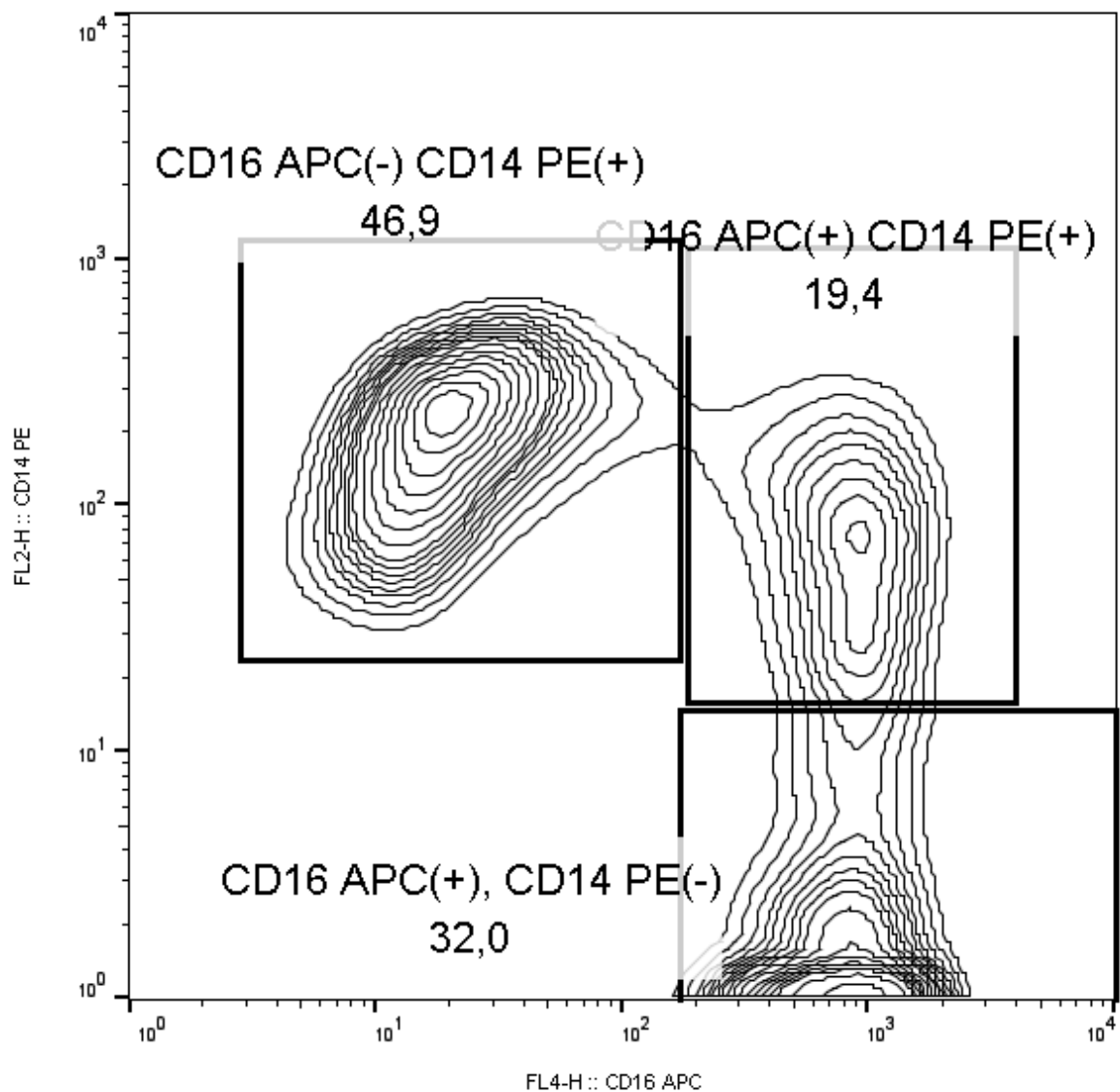


Abbildung 6 Beispielhafte monozytäre Auswertung in FlowJo™

2.2.6. Verwendete Computerprogramme

Die Textverarbeitung erfolgte via Microsoft® Word® 2016. Zur Erstellung von Tabellen und Diagrammen wurde Microsoft® Excel® 2016 (Fa. Microsoft

Deutschland GmbH, Stuttgart, Deutschland) und zur Erstellung von Abbildungen Inkscape (Inkscape community, GPL (freie Software)) verwendet. Als Zitationssoftware und zur Erstellung des Literaturverzeichnisses nutzten wir Citavi® Version 6 (Fa. Swiss Academic Software, Wädenswil, Schweiz). Für die Erfassung der durchflusszytometrischen Zellen fand BD CellQuest™ Pro Analysis Software (Fa. Becton Dickinson, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten) Anwendung. Zur weiteren dezidierten Auswertung der durchflusszytometrisch erhobener Daten machten wir von Flowjo® (Fa. Becton Dickinson, Ashland, Oregon, Vereinigte Staaten) Gebrauch. Die statistische Auswertung wurde mit IBM SPSS Statistics 25 (Fa. IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland) durchgeführt.

2.2.7. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wird IBM® SPSS Statistics, Version 25 genutzt. Die Quantifizierung der Oberflächenrezeptorexpression erfolgt mittels der MFI.

Erhobene Daten wie Pmax, Pmean, Druckgradient, Klappenöffnungsfläche in cm³ sowie die MFI werden hierbei als absolutskalierte Variable angegeben. Daten wie das Geschlecht, kardiovaskuläre Risikofaktoren und die Vormedikation werden hingegen als nominalskalierte Merkmale erfasst und als absolute Häufigkeit und in Prozentwerten illustriert. Der Schweregrad der AS wird mittels vorgegebener Klappenöffnungsflächengrenzen klassifiziert.

Zur Prüfung der Normalverteilung wird der Shapiro-Wilk-Test angewandt. Bei vorhandener Normalverteilung erfolgt der T-Test für unabhängige Stichproben. Zur Prüfung der Varianzhomogenität wird der Levene-Test gewählt. Hierbei wird der Mittelwert als zentrale Tendenz und die Standardabweichung als Streuungsmaß verwendet. Im Falle einer fehlenden Normalverteilung wird die Signifikanz mittels Mann-Whitney-U-Test geprüft. Der Median gilt hierbei als zentrale Tendenz und der IQR (Interquartilsabstand) als Streuungsmaß. Kategoriale Variablen werden mittels Chi-Quadrat-Test analysiert.

Material und Methoden

Das Signifikanzniveau dieser Studie liegt bei $p < 0,05$ mit folgenden Hypothesen:

Die Oberflächenmarkerexpressionen der TGF- β -Proteine unterscheiden sich bei Thrombozyten und monozytären Subtypen signifikant in AS unterschiedlicher Schweregrade.

Zwischen der Prämedikation, dem Aufnahmehabitus, der Vorerkrankungen und weiterer Basischarakteristika gibt es einen statistisch signifikanten Unterschied bei den Schweregraden der AS.

3. Ergebnisse

Die Daten der Studie wurden am Universitätsklinikum Tübingen über insgesamt 1 Jahr und 7 Monate hinweg erfasst. Insgesamt wurden 43 Patienten für die Studie rekrutiert. Hiervon wiesen 11 Patienten eine Aortenklappenstenose Grad I (26%), 10 Patienten eine AS Grad II (23%) und 22 Patienten eine AS Grad III auf (51%). In der statistischen Auswertung wurden Stenosegrad II und III als höhergradige Stenosen zusammengefasst und mit Stenosegrad I verglichen. In den untenstehenden Tabellen sind weitere genauere Patientencharakteristika aufgelistet.

3.1. Patientencharakteristika

	Alle Patienten N=43	Stenosegrad I N=11	Stenosegrad II +III N=32	p
Geschlecht:				
m	21 (49%)	4 (36%)	17 (53%)	0,728
w	22 (51%)	7 (64%)	15 (47%)	0,728
Alter	81,8 ± 7,80	77,18 ± 11,2	83,44 ± 5,62	0,1
Pmax (mmHg)	40 [15 - 52]	9,5 [8 - 21]	46,5 [34 - 55]	0,001
Pmean (mmHg)	21,26 ± 13,86	7,13 ± 4,12	25,62 ± 12,87	0,001
Druckgradient (mmHg)	17,5 [6 - 22]	4 [3,5 - 12,5]	20 [13 - 23]	0,011

Tabelle 9 Patientencharakteristika der Aortenklappenstenose. Die Daten sind wie folgt abzulesen: Absolute Häufigkeit (relative Häufigkeit der zugehörigen Gruppe), Mittelwert ± Standardabweichung, Median [IQR], m=männlich, w=weiblich, p=Signifikanzniveau zwischen AS I und AS II+III

Die oben genannte Tabelle verdeutlicht den Altersunterschied zwischen beiden Gruppen. Während niedriggradige Stenosegrade im Durchschnitt im vergleichsweise jüngeren Alter vorkommen (77 Jahre), sind Patienten mit hochgradigen Stenosen älter (83 Jahre). Die Geschlechterverteilung präsentiert sich in höheren

Ergebnisse

Stenosegraden weitestgehend ähnlich (männlich 53%, weiblich 47%), wohingegen die an AS Grad I erkrankten Patienten vorwiegend weiblich sind (männlich 36%; weiblich 64%).

	Alle Patienten N=43	Stenosegrad I N=11	Stenosegrad II + III N=32	p
C-reaktives Protein (mg/dl)	0,62 [0,2 - 1,3]	0,7 [0,2 - 1,2]	0,6 [0,1 - 1,3]	0,889
Creatinkinase (U/l)	92 [68 - 119]	101 [78 - 309]	89 [67 - 109]	0,160
Kreatinin (mg/dl)	0,9 [0,8 - 1,4]	0,9 [0,7 - 1,1]	1,0 [0,8 - 1,4]	0,257

Tabelle 10 Laborwerte bei Studienaufnahme in Median [IQR], p=Signifikanzniveau zwischen AS I und AS II+III

	Alle Patienten N=43	Stenosegrad I N=11	Stenosegrad II+III N=32	p
Thrombozytenaggregationshemmer	9 (21%)	2 (18%)	7 (22%)	1
Vitamin K Antagonist	8 (19%)	1 (9%)	7 (22%)	0,656
DOAK	12 (32%)	1 (9%)	11 (34%)	0,107
Acetylsalicylsäure	19 (43%)	6 (54%)	13 (41%)	0,495
Statine	26 (61%)	10 (91%)	16 (50%)	0,029
β-Blocker	26 (61%)	6 (54%)	20 (63%)	0,728
AT1-Antagonisten	10 (23%)	3 (27%)	7 (22%)	0,698
ACE-Hemmer	19 (44%)	6 (54%)	13 (41%)	0,495
Kalzium-Kanal-Inhibitoren	13 (30%)	3 (27%)	10 (31%)	1
Diuretika	32 (74%)	6 (54%)	26 (81%)	0,114

Ergebnisse

Aldosteronantagonisten	11 (26%)	4 (36%)	7 (22%)	0,430
Digitalis	3 (7%)	0	3 (9%)	0,558
Antidiabetika (OAD, Insulin)	3 (7%)	0	3 (9%)	1
Heparine	1 (2,3%)	0	1 (3%)	1
α-Rezeptor-Blocker	6 (14%)	2 (18%)	4 (12,5%)	0,637
Protonenpumpeninhibitoren	20 (46,5%)	4 (36%)	16 (50%)	0,501

Tabelle 11 Prämedikation bei Studienaufnahme in absoluter Häufigkeit und relativer Häufigkeit der zugehörigen Gruppe in Klammern, AT-1-Antagonisten= Angiotensin-1-Rezeptorblocker, ACE-Hemmer= Angiotensin converting enzyme Hemmer, DOAK= Direkte orale Antikoagulantien, OAD= orale Antidiabetika, p=Signifikanzniveau zwischen AS I und AS II+III

	Alle Patienten N=43	Stenosegrad I N=11	Stenosegrad II + III N=32	p
Diabetes Mellitus	7 (16,3%)	2 (18,2%)	5 (15,6%)	1
Vorhofflimmern	29 (67,4%)	6 (54,5%)	23 (72%)	0,457
Kardiovaskuläre Risikofaktoren	42 (97,7%)	11 (100%)	31 (97%)	1
Hypercholesterinämie	22 (51,2%)	6 (54,5%)	16 (50%)	1
Niereninsuffizienz	6 (14%)	1 (9%)	5 (15,6%)	1
Arterielle Hypertonie	38 (88,4%)	11 (100%)	27 (84,4%)	0,306
Koronare Herzkrankheit	31 (72%)	9 (81%)	22 (69%)	0,219

Tabelle 12 Vordiagnosen bei Studienaufnahme in absoluter Häufigkeit und relativer Häufigkeit der zugehörigen Gruppe in Klammern, Koronare Herzkrankheit = 1-,2-,3-Gefäß-KHK zusammenfasst, p=Signifikanzniveau zwischen AS I und AS II+III

In den Tabellen 11 und 12 sind die Medikamenteneinnahmen und die Vordiagnosen der Patienten aufgelistet. Hier sind keine statistisch signifikanten Unterschiede der beiden eingeschlossenen Gruppen festzustellen. Lediglich in der Statineinnahme zeigt sich ein signifikanter Unterschied bei einem p von 0,029. Während 10 Patienten (90%) der AS I Statine einnahmen, lag diese bei AS II und AS III bei 16 Patienten (50%).

3.2. Monozyten- und Thrombozytenauswertung

Im Folgenden werden die Oberflächenexpressionen von TGF- β 1, BMP-2, BMP-4, BMP-7 auf klassischen, intermediären und nicht-klassischen Monozyten sowie Thrombozyten dargestellt.

Die untersuchten Patientengruppen werden miteinander verglichen und in Abhängigkeit der Normalverteilung durch Mittelwert und Standardfehler oder Median und IQR der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in Balkendiagrammen dargestellt. Zudem erfolgt die Präsentation von Signifikanzen, die in Abhängigkeit des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung mittels T-Test oder Mann-Whitney-U-Test auf ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ festgelegt sind.

3.2.1. TGF- β 1

3.2.1.1. *klassische, intermediäre, nicht-klassische Monozyten*

In der Anwendung des Shapiro-Wilk-Tests zeigt sich keine Normalverteilung der Werte, weshalb der Mann-Whitney-U-Test angewendet wird. In den klassischen Monozyten liegt die Antigenexpression von TGF- β 1 im Median bei 2,85 [2,47 - 4,84] bei niedriggradigen Stenosen (AS I) und bei höhergradigen Stenosen (AS II+III) bei 1,65 [1,46 - 3,55] mit einem signifikanten p von **0,042**. In den intermediären Monozyten liegt die MFI bei einer Signifikanz von $p=0,077$ bei einem Median von 8,02 [6,22 - 10] (AS I) und 5,9 [4,01 - 7,47] (AS II+III). Nicht-klassische Monozyten charakterisierten sich durch einen Median bei 13 [10,79 - 14,2] (AS I) und 11,3 [9,55 - 13,2] (AS II+III). Der p -Wert beträgt $p=0,45$. Somit ist lediglich bei den klassischen Monozyten eine statistische Signifikanz nachweisbar. In allen untersuchten Monozytenpopulationen zeigen sich die TGF- β 1-Expression in den niedriggradigen Stenosegraden im direkten Vergleich erhöht.

Ergebnisse

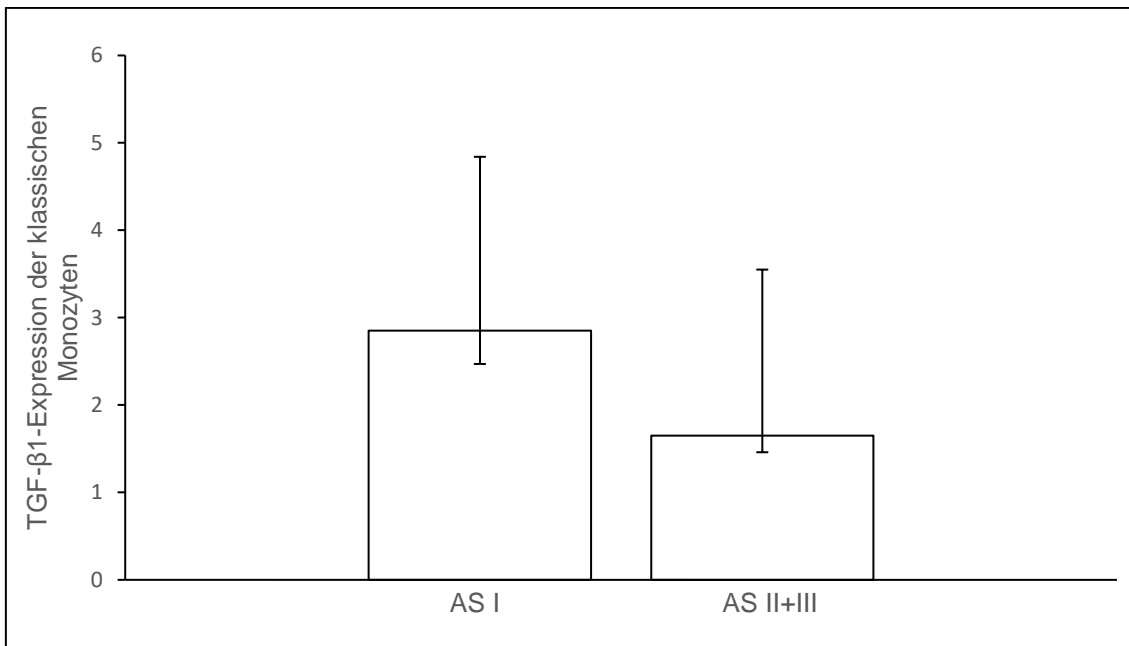


Abbildung 7 TGF-β1-Expression der klassischen Monozyten im Median und IQR im Vergleich, $p=0,042$

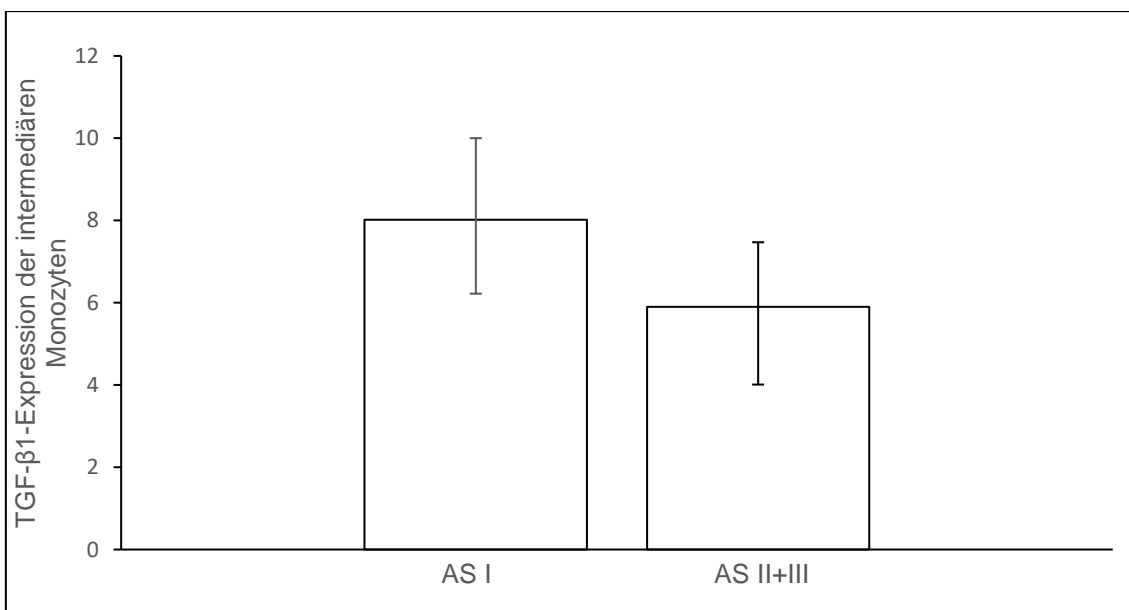


Abbildung 8 TGF-β1-Expression der intermediären Monozyten mit Median und IQR im Vergleich, $p=0,077$

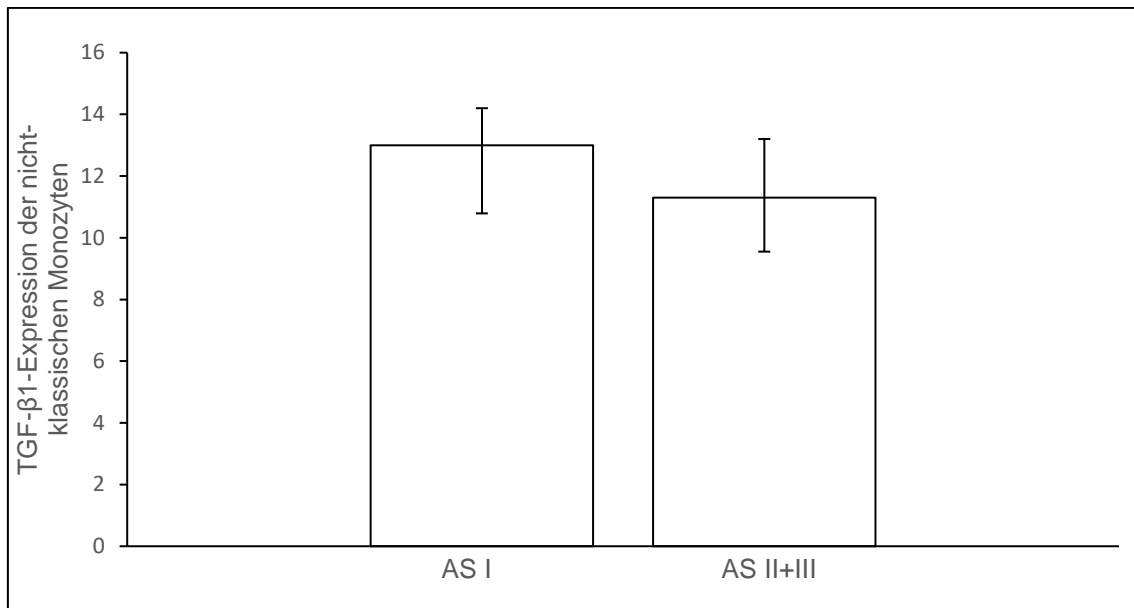


Abbildung 9 TGF- β 1-Expression der nicht-klassischen Monozyten im Median mit IQR im Vergleich, $p=0,45$

3.2.1.2. Thrombozyten

In den thrombozytären Auswertungen liegt keine Normalverteilung vor. Insgesamt legt TGF- β 1 ein Median von 7,04 [6,67 - 10,23] bei der AS I und in höhergradigen Stenosen einen Wert von 8,55 [7,41 - 9,9] dar. Der p-Wert liegt hierbei bei 0,356 und ist somit nicht signifikant. Die Intensität der TGF- β 1-Expression verhält sich im Gegensatz zu denen der monozytären Messungen mit führenden Werten bei AS II und III.

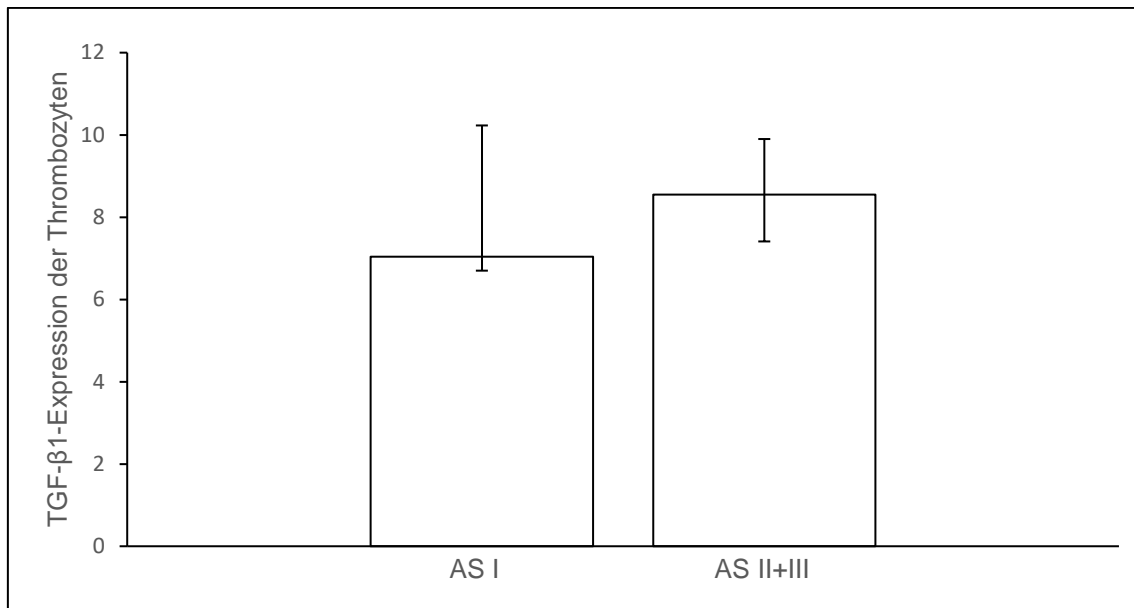


Abbildung 10 TGF- β 1-Expression der Thrombozyten im Median und IQR im Vergleich, $p=0,356$

3.2.2. BMP-2

3.2.2.1. klassische, intermediäre, nicht-klassische Monozyten

In der Auswertung der mit BMP-2 versehenen Monozytenantigene sind klassische- und nicht-klassische Monozyten nicht Normalverteilt. Hierbei zeigt sich in der Gruppe der klassischen Monozyten ein Median von 63,8 [52,7 - 107,2] bei den niedriggradigen Stenosen; respektive 72,35 [34,8 - 102] bei den höhergradigen Stenosen ($p=0,537$). Nicht-klassische Monozyten liegen bei einem Median von 104 [79,85 - 173,5] bei AS I und bei AS II + III 120,5 [75,65 - 184,5] mit einem Wert von $p=0,816$. Die intermediären Monozyten hingegen sind Normalverteilt und liegen bei einem Mittelwert von $161,74 \pm 79,3$ (AS I) und $142,55 \pm 66,47$ (AS II+ III). Die Signifikanz beträgt 0,43. Somit liegen BMP-2-Expressionsniveaus bei nicht-klassischen und intermediären Monozyten bei niedriggradigen Stenosen höher, während klassische Monozytenzellreihen eine leichte Erhöhung von BMP-2 bei höhergradigen Stenosen aufzeigen.

Ergebnisse

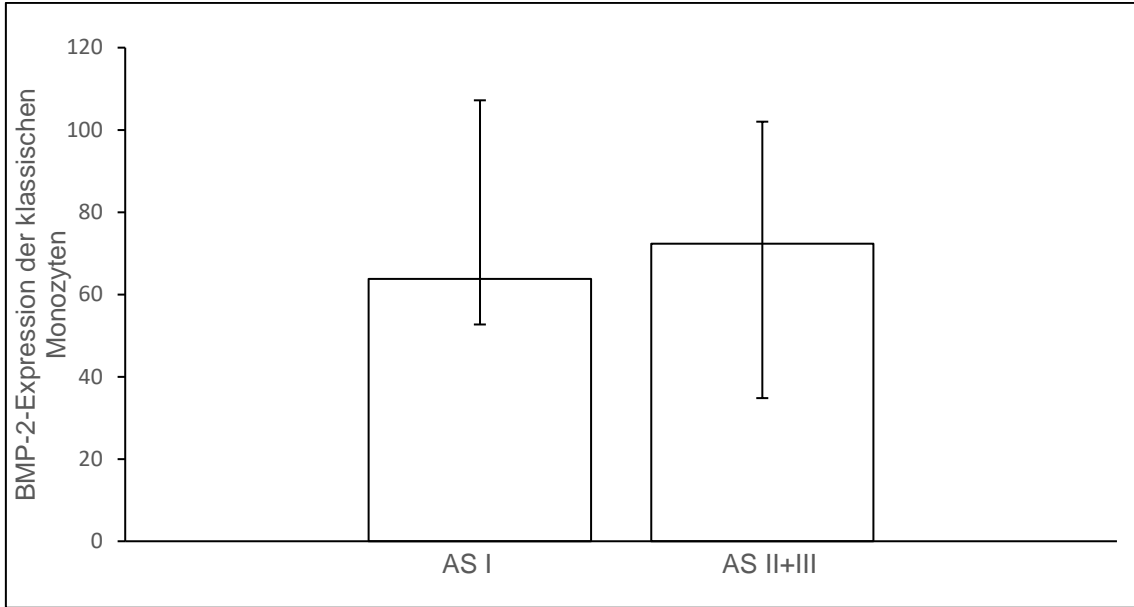


Abbildung 11 BMP-2-Expression der klassischen Monozyten im Median und IQR im Vergleich, $p=0,537$

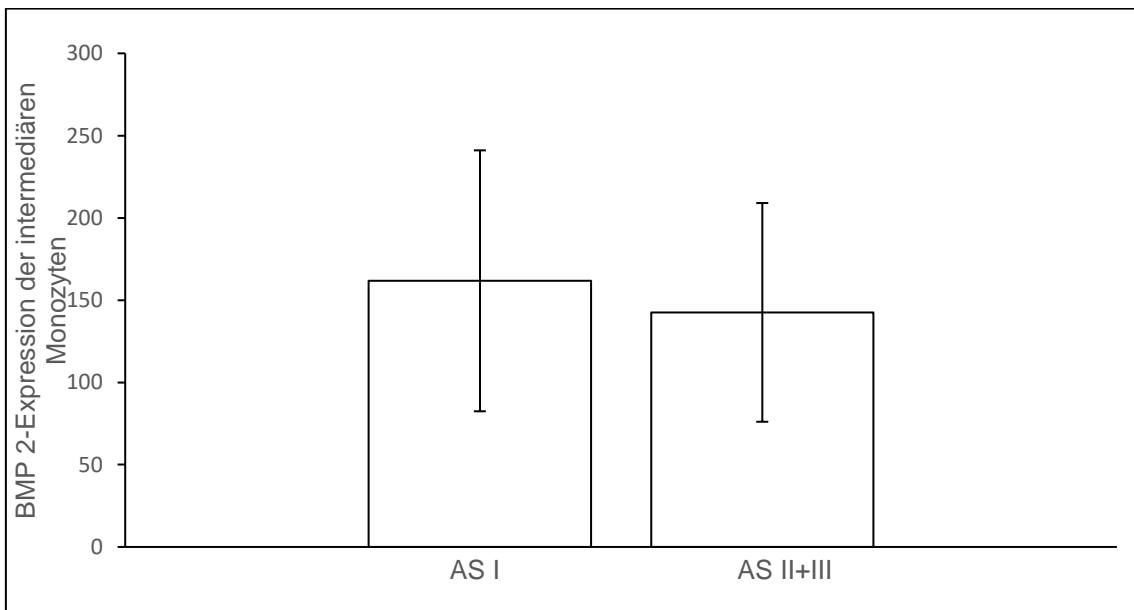


Abbildung 12 BMP-2-Expression der intermediären Monozyten mit Mittelwert und Standardabweichung, $p=0,43$

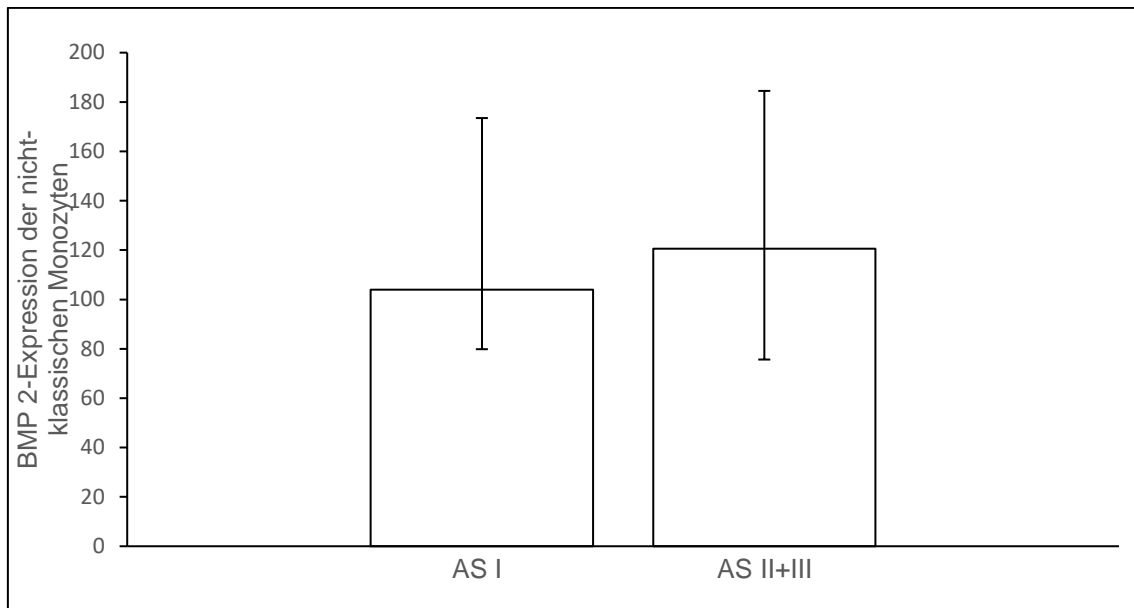


Abbildung 13 BMP-2-Expression der nicht-klassischen Monozyten im Median und IQR im Vergleich, $p=0,816$

3.2.2.2. Thrombozyten

Die mit BMP-2 markierten Thrombozyten sind nicht Normalverteilt und werden deshalb mittels Medians und IQR angegeben. Diese zeigen in der Auswertung ein Median von 40,9 [27,75 - 48,6] (AS I) und 47,05 [37,05 - 59,05] (AS II+AS III). Der p-Wert beläuft sich hierbei auf 0,052. Die Werte zeigen somit eine deutliche statistische Divergenz zwischen höhergradigen- und niedriggradigen Stenosen.

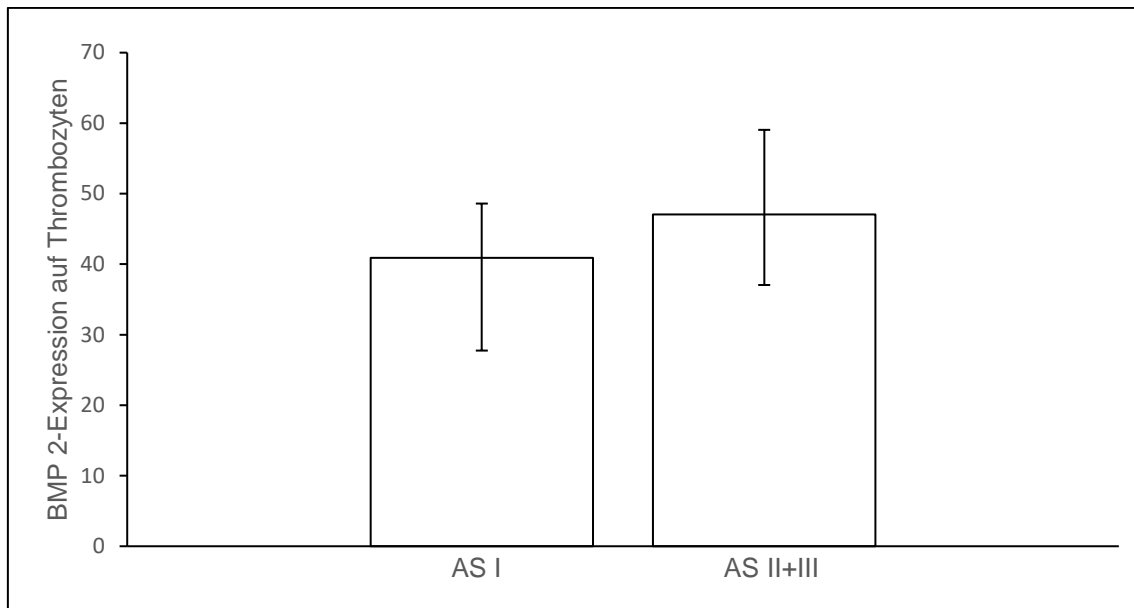


Abbildung 14 BMP-2-Expression der Thrombozyten im Median und IQR im Vergleich, $p=0,052$

3.2.3. BMP-4

3.2.3.1. klassische, intermediäre, nicht-klassische Monozyten

In der monozytären Auswertung von BMP-4 zeigt sich wegen fehlender Normalverteilung ein Median in den klassischen Monozyten von 129 [102,1 - 142,5] bei AS I wohingegen sich ein Median von 125,5 [81,65 - 180] bei AS II + III präsentiert ($p=0,9$). In den intermediären Monozyten ist eine Normalverteilung vorhanden. Hier liegen die Mittelwerte bei $271,90 \pm 78,66$ (AS I) zu $230,10 \pm 98$ (AS II + AS III, $p=0,162$). Die nicht-klassischen hingegen sind nicht normalverteilt und zeigen sich mit einem Median von 263 [244,5 - 304] (AS I) zu 264 [226 - 304,5] (AS II + AS III, $p=0,45$). Zusammenfassend sind tendenziell die BMP-4-Konzentrationen in niedriggradigen Stenosen eher erhöht. Statistische Signifikanzen ergeben sich hierbei nicht.

Ergebnisse

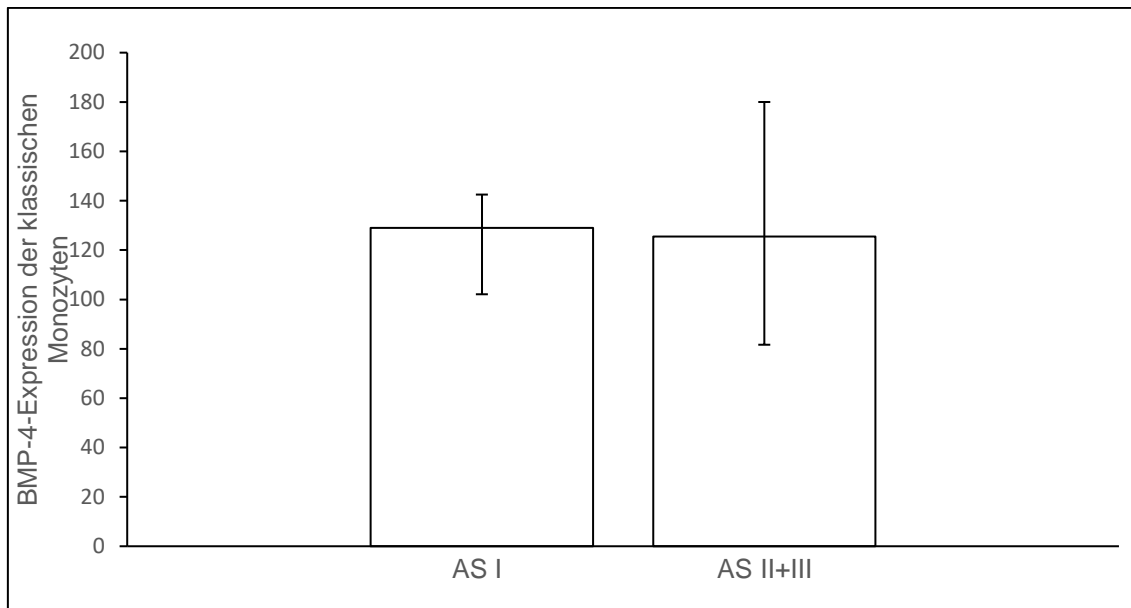


Abbildung 15 BMP-4-Expression der klassischen Monozyten im Median und IQR im Vergleich, $p=0,9$

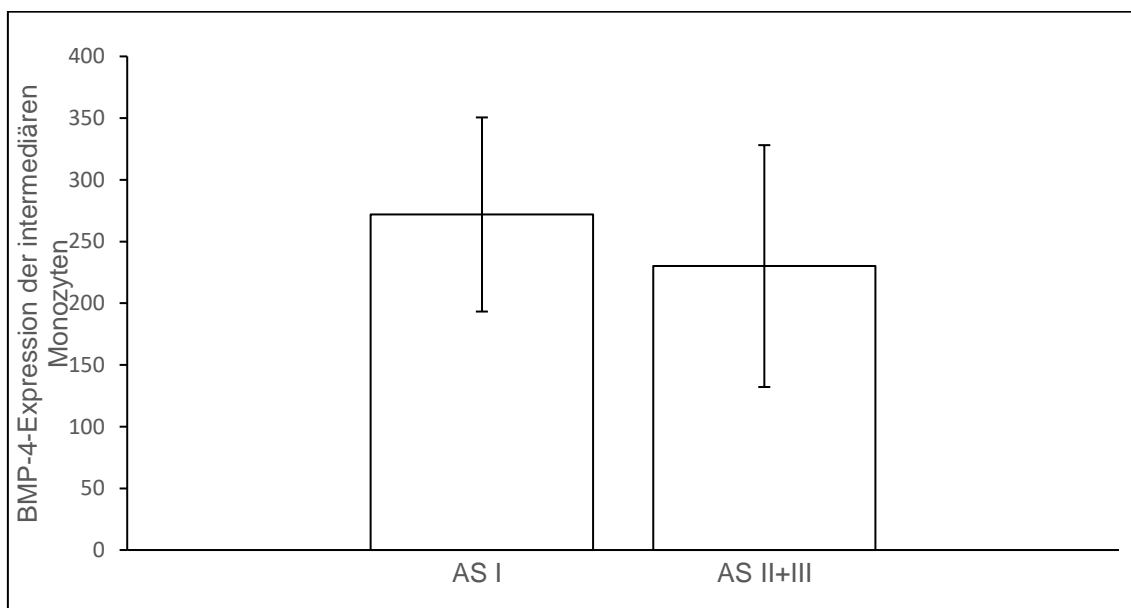


Abbildung 16 BMP-4-Expression der intermediären Monozyten mit Mittelwert und Standardabweichung im Vergleich, $p=0,162$

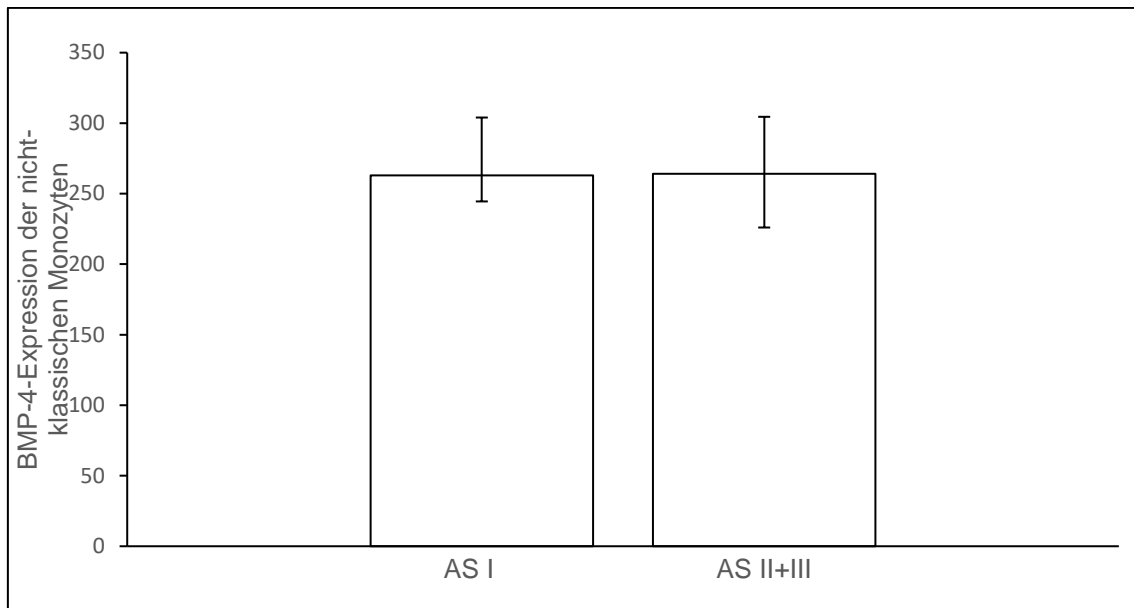


Abbildung 17 BMP-4-Expression der nicht-klassischen Monozyten im Median und IQR im Vergleich, $p=0,45$

3.2.3.2. Thrombozyten

Die Werte der thrombozytären Konzentrationen von BMP-4 sind nicht normalverteilt und liegen bei einem Median 45 [24,4 - 77,55] bei den niedriggradigen Stenosen und bei 35,9 [24,95 - 47,75] bei höhergradigen Stenosen ($p=0,65$). Die niedriggradigen Stenosen sind in den BMP-4-Messungen somit leicht führend und weiter gestreut.

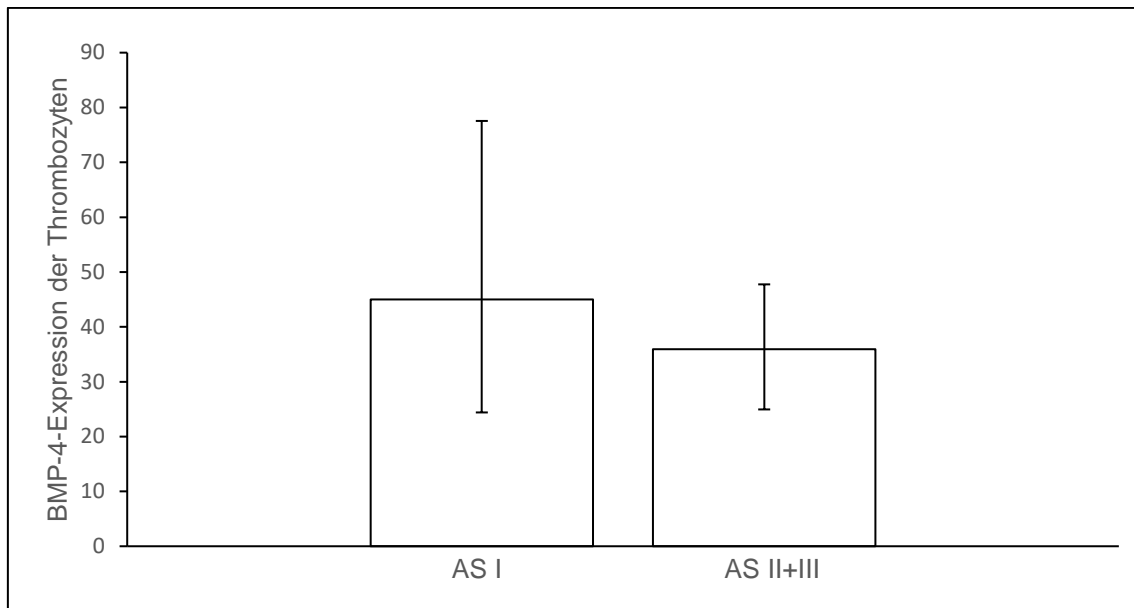


Abbildung 18 BMP-4-Expression der Thrombozyten im Median und IQR im Vergleich, $p=0,65$

3.2.4. BMP-7

3.2.4.1. klassische, nicht-klassische, intermediäre Monozyten

Sowohl in den klassischen- als auch in den intermediären Monozyten liegt hier keine Normalverteilung vor. Die Werte sind daher als Median und IQR angegeben. Die nicht-klassischen Monozyten sind normalverteilt und werden in Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

In den mit BMP-7 Antikörpern markierten klassischen Monozyten pendelt sich der Median bei 6,51 [4,89 - 10,85] (AS I) und 3,76 [2,28 - 6,3] (AS II + AS III, $p=0,052$) ein. Die intermediären Monozyten liegen bei 14,9 [11,25 - 19,7] (AS I) und 9,51 [6,15 - 13,7] (AS II + AS III) mit einem p von 0,077. Die nicht-klassischen monozytären Messungen liegen im Mittel bei $19,94 \pm 7,59$ (AS I) und $19,14 \pm 6,67$ (AS II + III, $p=0,744$). Die BMP-7-haltigen Monozyten zeigen einen deutlichen Trend. Die AS I ist im direkten Vergleich in allen drei Zellpopulationen mit höheren Antikörpermessungen konnotiert.

Ergebnisse

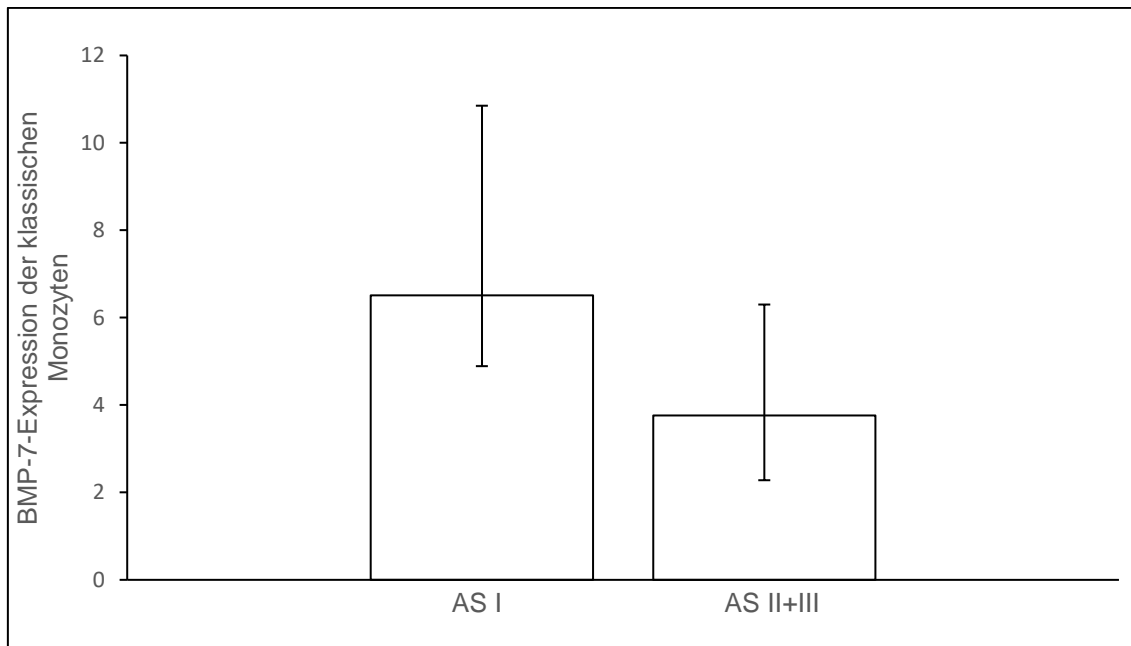


Abbildung 19 BMP-7-Expression der klassischen Monozyten im Median und IQR im Vergleich, $p=0,052$

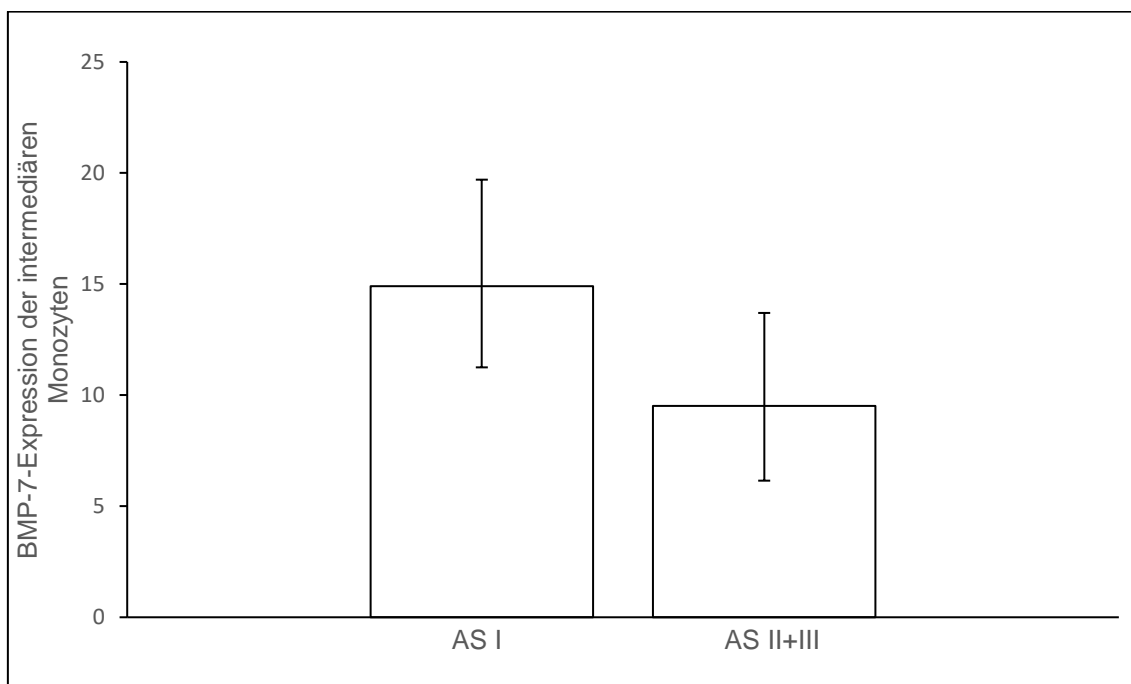


Abbildung 20 BMP-7-Expression der intermediären Monozyten im Median und IQR im Vergleich, $p=0,077$

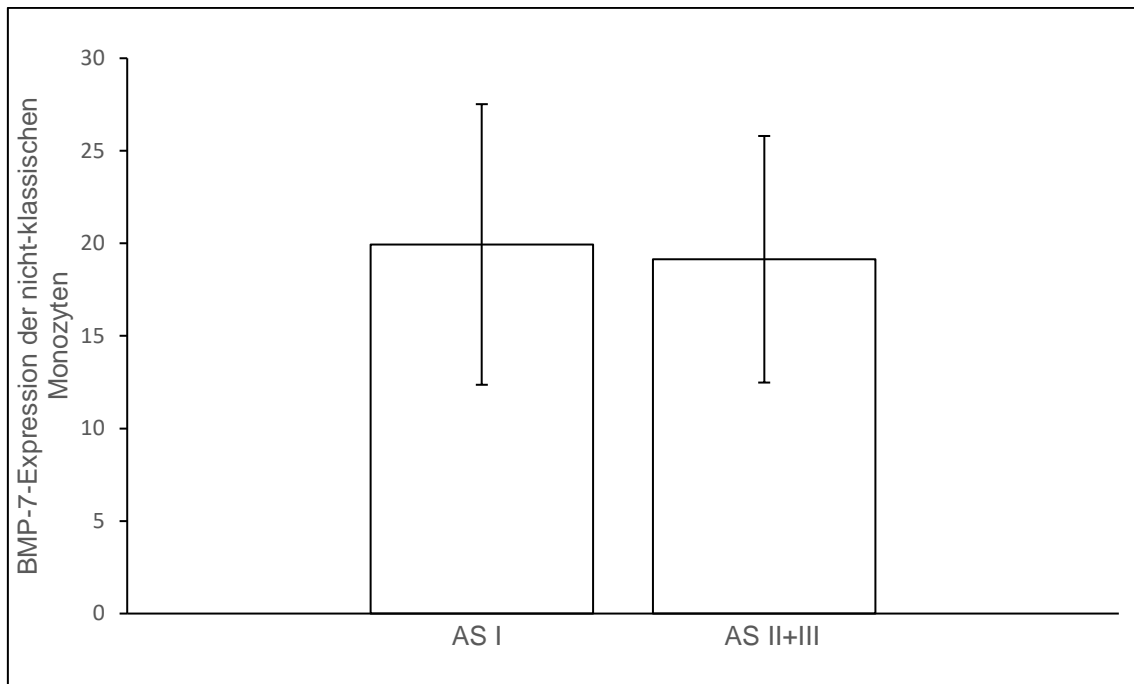


Abbildung 21 BMP-7-Expression der nicht-klassischen Monozyten mit Mittelwert und Standardabweichung im Vergleich, $p=0,744$

3.2.4.2. Thrombozyten

Die thrombozytären Messungen von BMP-7 sind nicht normalverteilt und liegen mit dem Median bei 11,9 [9,3 - 16,25] bei AS I und 12,85 [8,97 - 19,55] bei AS II+III mit $p= 0,922$. Der monozytäre Trend setzt sich in den thrombozytären Auswertungen somit nicht fort.

Ergebnisse

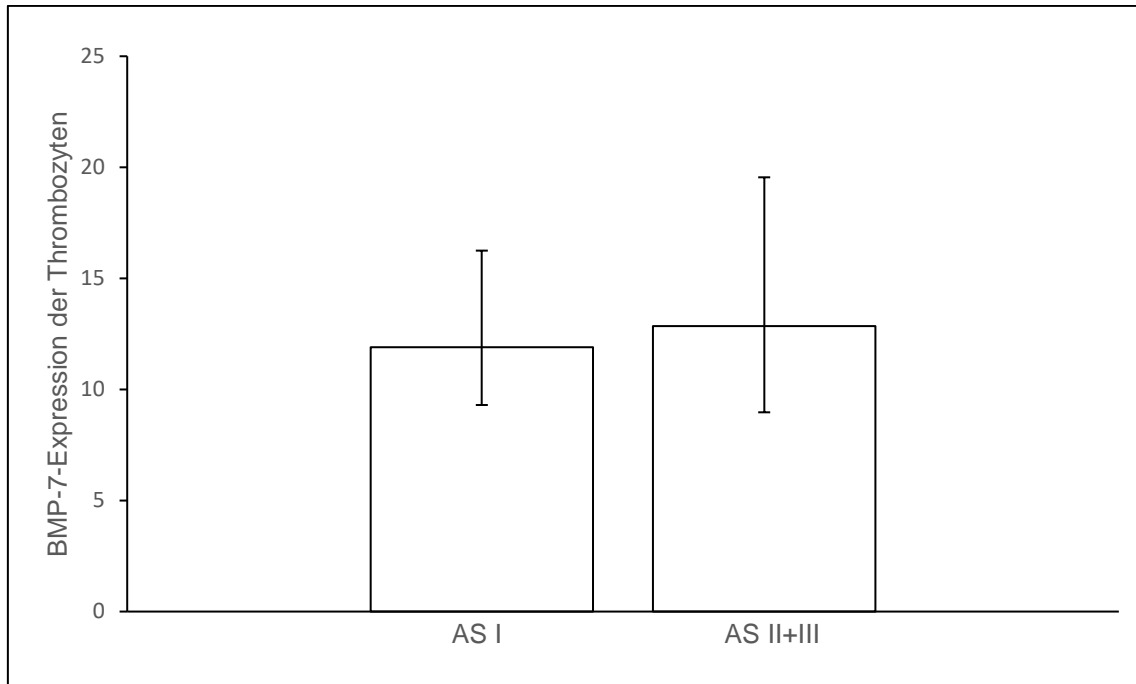


Abbildung 22 BMP-7-Expression der Thrombozyten im Median und IQR im Vergleich, $p=0,922$

4. Diskussion

Die AS teilt gemeinsame Risikofaktoren und einige pathophysiologische Eigenschaften mit der Atherosklerose. Im Gegensatz zur Atherosklerose ist die genaue Pathogenese der AS dennoch weitestgehend unklar und bedarf dahingehend weiterer Untersuchungen. Durch die Einengung des Ausflusstraktes, der konsekutiven transvalvulären Druckerhöhung und der damit einhergehenden verstärkten Scherkräfte findet eine weitere Aktivierung von Entzündungsmediatoren statt. Hierbei sind verschiedene Zytokine, insbesondere die TGF- β -Superfamilie, von größerer Signifikanz. Der TGF- β -SMAD-Signalweg aktiviert eine Reihe proinflammatorischer- und profibrotischer Faktoren im Zellkern und treibt die Stenose mutmaßlich weiter voran [14, 80, 136].

4.1. Betrachtung der Patientenkohorte

In Tabelle 12 sind relevante Vordiagnosen, der in die Studie eingeschlossenen Patienten, aufgelistet. Hierbei sind insbesondere Vorhofflimmern, koronare Herzkrankheiten und kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Diabetes Mellitus, arterielle Hypertonie sowie Hypercholesterinämie erfragt worden. Diese zeigen in der statistischen Auswertung jedoch keine signifikanten Unterschiede beider Gruppen. Lediglich eine Altersdifferenz beider Gruppen ist trotz fehlender statistischer Signifikanz auffällig. Erwartungsgemäß sind Patienten mit Aortenklappenstenosen Grad I im tendenziell jüngeren Alter mit 77 Jahren, wohingegen die Vergleichskohorte im Mittel älter mit 83 Jahren ist. Eine Erklärung ist durch das progrediente Fortschreiten der Aortenklappenstenose bei zunehmendem Alter gegeben, wobei die hier fehlende Signifikanz mutmaßlich durch ein Selektionsbias der stationären AS I- Patienten zu erklären ist und das mittlere Alter der nicht-stationären AS I- Patienten in deutlich jüngeren Alter zu finden ist.

Während in den niedriggradigen Stenosen mehr weibliche als männliche Probanden Teil dieser Studie sind, ist die Geschlechterverteilung bei höhergradigen Stenosen weitestgehend ähnlich. Auch wenn sich keine signifikanten Abweichungen zeigen, ist dennoch bei der kleinen Patientenkohorte ein Unterschied hinsichtlich der Geschlechts- und Altersverteilung merklich. In der Klappenöffnungsfläche

und des dort vorhandenen Druckes zeigt sich, wie zu erwarten, ein deutlich signifikanter Unterschied (Tabelle 9)

Die laborchemischen Untersuchungen und die Medikation hingegen weisen kaum Differenzen auf (Tabelle 10). Lediglich die Creatininkinase zeigt einen relevanten, jedoch nicht signifikanten Unterschied. Hierbei kann ein kürzlich aufgetretenes ACS bei einem Patienten aus der AS I-Gruppe als potenzielle Ursache der Abweichung gesehen werden.

Interessanterweise ist in der Statineinnahme, als einziger Prämedikationsparameter, eine statistisch signifikante Differenz festzustellen (Tabelle 11). Patienten mit AS I nehmen fast alle Statine zur Anpassung des Risikoprofils ein, wohingegen dies nur bei Hälfte der Patienten mit höhergradigen Stenosen der Fall ist. Cowell et al. sowie Rossebø et al. zeigten in groß angelegten Studien, dass im Gegensatz zur Atherosklerose Statine keine signifikante Verbesserung der Prognose oder Verzögerung des Stenoseprozesses mit sich zogen [19, 112]. Eine Erklärung für die hier festgestellte Differenz könnte in der fehlerhaften Führung des Medikationsplanes der AS II + III-Gruppe oder in einer höheren Compliance der tendenziell jüngeren Patientenkohorte in AS I zu finden sein.

4.2. Klinische Bedeutung der TGF- β 1-Messung

Ein Zusammenhang zwischen der Atherosklerose, der koronaren Herzkrankheit und TGF- β 1 als aufrechterhaltender Faktor der Atherosklerose wurde in früheren Studien gezeigt [12]. Jian et al. wiesen erstmals erhöhte TGF- β 1-Expressionen in kalzifizierten Aortenklappen in immunhistochemischen Untersuchungen nach und stellten den Zusammenhang zwischen dem Protein und der AS dar [62]. Der genaue Ursprung des Peptidnachweises jedoch verblieb einige Zeit unklar.

Neuere Studien bringen eine Thrombozyten- und TGF- β 1-assoziierte Ursache hervor. TGF- β 1 ist in Blutplättchen in hundertfachen Mengen vorhanden [2], wird bei erhöhten Scherkräften aus diesen ausgeschüttet [1], adhärirt an endotheliale Klappenzellen und setzt lokal TGF- β 1 frei [135]. Ahamed et al. stellten deshalb die Hypothese der lokalen plättchenassoziierten TGF- β 1-Expression und Initiierung der AS auf [135].

Insgesamt erbrachten Untersuchungen hinsichtlich des Proteins bezüglich Aortenstenosen jedoch divergente Ergebnisse. Einerseits wird durch TGF- β 1 eine osteoblastische Differenzierung von VIC angeregt und so die Kalzifikation vorangetrieben, andererseits zeigen andere Studien eine stärkere Wirkung auf die Kollagenproduktion und Fibroseneigung der VICs ohne pro-osteoblastische Differenzierungsneigung [15, 16, 62]. Lichtenberg et al. diskutierten, aufgrund zellkulturell nachgewiesener Aktivierung von SMAD 3 und gleichzeitiger Inhibition von SMAD 1/5/8 in AS, eine phasendependente Wirkweise des Peptids in dieser Erkrankung [61]. Diese Hypothese wäre vereinbar mit der oben diskutierten Theorie von Ahamed et al.

Meine Studienergebnisse können die These der differentiellen Expressierung des TGF- β bei den unterschiedlichen Aortenklappenstenosengraden belegen. In den klassischen Monozyten liegt ein statistisch signifikanter Unterschied mit erhöhten TGF- β -Werten bei niedriggradigen Aortenstenosen vor ($p=0,04$). Dieser Trend setzt sich trotz fehlender Signifikanz in den übrigen Monozyten fort. Vor allem bei den intermediären Monozyten zeigt sich eine deutliche Differenz ($p=0,08$). In den thrombozytären Untersuchungen hingegen kann dies trotz aller Hinweise in der Fachliteratur nicht belegt werden.

Als wichtiger limitierender Faktor sind die diversen und weitreichenden Funktionen von TGF- β 1 zu benennen. Patientenmerkmale, die einen modifizierenden Einfluss auf den Serumpeptidspiegel besitzen, wie beispielsweise das maligne Erkrankungen, sind in meiner Studie nicht erfasst worden und erschweren deshalb die Bewertung [114].

Sowohl die nicht erhobenen unterschiedlichen alterierenden Faktoren als auch das Querschnittstudiendesign sind kritisch anzumerken. Ein Baseline Level des Peptids aus einer Kontrollgruppe bei Patienten ohne AS könnte helfen, mögliche Messfehler, insbesondere bei den sensiblen plättchenderivierten TGF- β 1-Konzentrationen zu erkennen und auszuschließen [83].

Trotz limitierender Faktoren zeigt meine Studie dennoch eine deutliche Differenz zwischen den Stenosegraden und der TGF- β -Expression an Monozyten. Die Erhöhung der Messwerte in den frühen Stadien der Erkrankung legt die durch

Studien bereits belegte phasendependente Wirkung des Peptids in Aortenstenosen nahe. So könnten möglicherweise durch TGF- β 1 ausgelöste entzündliche Prozesse vor allem in Anfangsstadien ein wichtiger treibender Faktor der AS sein. Im klinischen Setting könnte die Messung von TGF- β 1 eine Risikostratifizierung der AS ermöglichen. Im weiteren Sinn könnte sogar durch Inhibition des Proteins ein Fortschreiten der Erkrankung verlangsamt- oder verhindert werden. Vorher müsste jedoch die genaue Pathophysiologie der Erkrankung in seiner Komplexität erfasst- und verstanden werden. Hierzu sind Studien mit einer größeren Kohorte, wiederholten Messungen und unabhängig von anderen Erkrankungen isolierte Betrachtung der Wirkung von TGF- β 1 notwendig.

4.3. Klinische Bedeutung der BMP-2-Messung

Das Bone morphogenetic Protein 2 ist eines der wichtigsten und meistuntersuchten Proteine der TGF- β Superfamilie. Wichtige Funktionen übernimmt das Protein, neben der osteoinduzierenden Aufgabe, außerdem in der Embryogenese, insbesondere während der Valvulogenese [2, 55].

Die Expression des Proteins in atherosklerotischen Läsionen als wichtiger osteoblastischer Differenzierungsfaktor kann als wichtiger Schritt zur Entschlüsselung der Pathogenese der Atherosklerose gesehen werden [6].

Der immunhistochemische Nachweis von BMP-2 in kalzifizierten Aortenklappen erbrachte den ersten Hinweis der Funktion des Proteins bei der Aortenklappenstenose [68]. Darüber hinaus bewiesen Mohler et al. vermehrt Kalziumablagerungen an Aortenklappen unter Gabe von BMP-2 im zellkulturellen Modell [87] als Folge von BMP-2 induzierter VIC-Simulation [149]. VICs setzen im Anschluss eine Kaskade mit RUNX (Runt-related transcription factor 2) und Osteopontin-zwei osteoblastische ossifizierende Faktoren in Gang.

BMP-2 wird vor allem durch unter anderem Toll-like receptor 2 (TLR2) sowie Toll-like receptor 4 (TRL4) aktiviert und intensiviert somit die osteogenen Einflüsse des Liganden. Diese Rezeptoren werden durch an den Herzklappen akkumulierenden oxidized low density lipoproteins (oxLDLs) stimuliert und leiten die initiale Fibrose der AS ein [126]. Durch Agonisten von TLR2 und TLR4 steigt die BMP-

2-Exprimierung in den VIC der Aortenklappe im Vergleich zu denen der Pulmonalklappe, was eine klappenspezifische Funktion dieser nahelegt [148].

Die Peptidmessungen meiner Studie liegen in den intermediären Monozyten bei AS I im Vergleich zu AS II + III im erhöhten Wertebereich, während sich dies bei den nicht-klassischen- und klassischen Monozyten umkehrt und tendenziell erhöhte Werte bei höhergradigen Stenosen zeigt.

Insgesamt scheint BMP-2 zwar eine essenzielle Rolle in der AS zu spielen, jedoch ist eine erhöhte Aktivität des Proteins allein nicht suffizient die AS zu induzieren. Vielmehr scheint ein gesamtes pro-osteogenes Milieu an der Aortenklappe notwendig zu sein [39]. Neuere Studien führen beispielsweise ein Disäquilibrium zwischen BMP-2 und DCBLD2 (Neuropilin-like protein) als Voraussetzung für die Auswirkung von BMP-2 bei der AS an [67]. Dieses Peptid könnte somit eines vieler Faktoren sein, die die singuläre Bewertung von BMP-2 beim Kontext der Aortenklappenstenose erschweren.

Ein besonderes Augenmerk liegt auf der thrombozytären Auswertung der BMP-2-Konzentration. Diese präsentieren sich, auch wenn statistisch erneut nicht signifikant ($p=0,052$), im Median 40,9 [27,75 - 48,6] (AS I) und 47,05 [37,05 - 59,05] (AS II + III) deutlich unterschiedlich. Eine Korrelation zwischen BMP-2 und Thrombozyten ist, trotz histologischen Nachweises, in der Literatur bisher kaum diskutiert [122]. Das oben erläuterte TGF- β 1-, ein eng Verwandtes Peptid mit BMP-2, wird durch Thrombozyten bei erhöhten Scherkräften, wie sie bei der Atherosklerose und der AS der Fall sind, vermehrt ausgeschüttet [141]. Die von uns erhobenen Ergebnisse sind mit dem Hintergrund des thrombozytären BMP-Nachweises, trotz fehlender Signifikanz, ein weiterer möglicher Hinweis auf die Pathogenese der AS und könnte in Zukunft noch Gegenstand der Forschung sein.

Eine schlussendliche Aussage von BMP-2 und der AS lässt sich somit aufgrund unzureichender Studienlage und fehlender signifikanter Ergebnisse aus meiner Studie nicht herleiten.

4.4. Klinische Bedeutung der BMP-4-Messung

Bone morphogenetic Protein-4 gilt als wichtiger osteogener Faktor bei der Embryogenese und der Knochenreparatur [28]. Überdies wird BMP-4 durch koronare Endothelzellen bei der Atherosklerose als proinflammatorisches Genprodukt vermehrt ausgeschüttet und treibt diese weiter voran [64, 124].

Der erhöhte Nachweis des Zytokins ist nicht nur bei pathologischen Veränderungen von Koronararterien vorhanden, sondern ebenso bei stenosierenden Aortenklappen. Sucosky et al. bewiesen erhöhte BMP-4-Expressionen an valvulären Endothelzellen, wohingegen das ventrikuläre Endothel diesen Umstand nicht erbrachte [127]. Als Ursache hierfür vermuteten die Untersucher die mechanosensitive Eigenschaft des Proteins, im Zusammenspiel mit der anatomischen Lage der valvulären Endothelzellen der damit einhergehenden physiologisch erhöhten Scherkräfte an der Herzklappe.

Zellkulturelle Untersuchungen konsolidierten diese Annahme weiterhin, da die Kombination von 15%iger Klappendehnung und Scherkraftstimulation mit einer Frequenz von 1 Hz eine verstärkte Kalzifikation der Aortenklappe zu Folge hatte [3, 102]. Poststimulativ zeigten sich osteogene Marker wie SMA (α -smooth muscle actin), FN (Fibronectin), OPN (Osteopontin), AP (alkalische Phosphatase) und RUNX2 an den VIC hochreguliert.

In der von mir durchgeführten Studie liegen die Messergebnisse der AS I von BMP-4, sowohl in den intermediären-, als auch klassischen Subpopulationen sowie thrombozytären Messauswertungen über den Ergebnissen von AS II + III. Die nicht-klassischen Monozyten hingegen zeigen eine gering erhöhte Peptidkonzentration in höhergradigen AS (264 vs. 263). Eine statistische Signifikanz ist zwischen beiden Gruppen nicht nachweisbar.

Klassische Monozyten machen 80-95% aller zirkulierenden Monozyten aus und sind gemeinsam mit BMP-4 in der Lage in Kombination mit hohen Scherkräften ROS zu produzieren und so ein proinflammatorisches Milieu zu kreieren [124, 143, 156]. Neben des inflammatorischen Milieus tragen, wie oben erörtert, Oszillationen und physiologische mechanische Beanspruchungen zur Kalzifikation

durch Induktion osteogener Faktoren durch BMP-4 bei. Analog dieser Hypothese sollte bei weiterem Fortschreiten der Stenose und nunmehr weiter erhöhten Scherkräften die BMP-4-Exprimierung bei hochgradigen Aortenstenosen von niedriggradigen differieren. Zwar zeigten die hier gezeigten Ergebnisse Unterschiede beider Gruppen, jedoch lagen die beiden Messergebnisse nah beieinander, wiesen keine statistische Signifikanz auf und konnten somit diese Theorie nicht beweisen.

In der Fachliteratur wird ein Zusammenhang zwischen Thrombozyten deriviertem BMP-4 und vaskulärer Inflammation in der Atherosklerose diskutiert [60]. Die Autoren stellten eine erhöhte platelet-leukocyte-aggregation in den initialen Stadien nach endothelialeem Schaden fest und schlussfolgerten eine vor allem anfängliche Funktion von Thrombozyten-assoziiertem BMP-4. Diese Hypothese wäre in der AS, aufgrund der ähnlichen anfänglichen Pathogenese, denkbar und mit den thrombozytären und monozytären Ergebnissen vereinbar.

Meine Ergebnisse konnten zwar keine signifikante Differenz der untersuchten Patientenkohorten feststellen, jedoch ist BMP-4 in seinen osteogenen Aufgaben, insbesondere bei der Aortenstenose von besonderer Relevanz. Aufgrund seiner mechanosensitivität könnte es am Beginn der pathophysiologischen Kaskade stehen und sollte in Zukunft weiterhin anhand experimenteller Studien dahingehend untersucht werden.

4.5. Klinische Bedeutung der BMP-7-Messung

Das letzte in dieser Arbeit zu diskutierende Zytokin, ist das bone morphogenetic protein-7. Das Protein besitzt, trotz familiärer Zugehörigkeit aufgrund struktureller Similaritäten, sich deutlich unterscheidende Eigenschaften von anderen Proteinen der TGF- β -Superfamilie.

BMP-7 gilt in der Literatur als „Gegenspieler“ von TGF- β 1. Beispielsweise ist das Protein bei der chronischen Niereninsuffizienz für die Regeneration von TGF- β 1 induzierten mesenchymalen und fibrösen Veränderungen der epithelialen Tubuluszellen verantwortlich [154].

Zudem zeigt sich die konträre Funktion im kardiovaskulären System. Die Behandlung mit BMP-7 hatte eine signifikante Erhöhung der antiinflammatorischen M2-Makrophagen, sowie eine messbare Senkung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, TNF- α und MCP-1 zufolge und folglich weniger Plaqueformationen in der Atherosklerose als Konsequenz [110, 121].

Meine Ergebnisse erbringen zwar keine statistisch signifikanten Unterschiede im MFI zwischen den beiden untersuchten Kohorten, dennoch sind deutliche Unterschiede ersichtlich. Die BMP-7-Expression intermediärer Monozyten pendelt sich im Vergleich bei höheren Werten mit einer hohen statistischen Differenz ($p=0,052$) in niedriggradigen Stenosen ein. In den übrigen monozytären und thrombozytären Auswertungen zeigen, trotz durchweg fehlender statistischer Signifikanz, ebenfalls erhöhte Expressionsmuster von BMP-7 bei AS I. Diese fehlenden statistischen Signifikanzen können jedoch teilweise durch die hier vorhandene vergleichsweise kleine Patientenkohorte erklärt werden.

Jin et al. untersuchten, inwiefern sich die Postinfarktregeneration nach exogener Einnahme von BMP-7, im Vergleich zur Einnahme von Kochsalzlösung unterschied. Das postischämische Fibroseareal war unter Einnahme von BMP-7 im kardialen Remodelling deutlich geringer zu bemessen [63]. Diesen Umstand unterstrichen weiterführende Untersuchung mittels PCR sowie Western-Blot und legten erneut die antagonisierende Funktion von BMP-7 gegenüber TGF- β 1 auf molekularer Ebene dar. Andere Untersuchungen erbrachten vergleichbare Ergebnisse bei vorhofflimmernassoziierter myokardialer Fibrose [13].

Merino et al. zeigten mit ihrer Studie, dass BMP-7 nicht nur antifibrotisch auf das Herz wirkt, sondern auch die Spätfolgen der höhergradigen AS revidieren kann. Die Einnahme des Peptids verhinderte im Tiermodell nicht nur die Fortschreitung der Fibrose, sondern zeigte einen substanziellen Rückgang der linksventrikulären Hypertrophie nach Aortenklappenersatz [85]. Die Autoren machten hier ein Disäquilibrium zwischen TGF- β 1 und BMP-7 verantwortlich, da bei vollständiger Defizienz von BMP-7 sich unter anderem eine deutlich erhöhte kardiale Hypertrophie zeigte. BMP-7 bietet somit nicht nur prophylaktische

Therapieoptionen, sondern auch einen therapeutischen Ansatz bei fortgeschrittenen Aortenklappenstenosen.

Einige proteinspezifischen Einschränkungen sind hier dennoch zu benennen. Obwohl BMP-7 in der Literatur bei kardiovaskulären Erkrankungen viel erforscht ist, ist die spezielle Funktion des Zytokins bei der Aortenstenose bisher kaum erörtert. Patienten mit niedriggradigen Stenosen tendieren, auch wenn durch die hier vorliegenden Daten nicht eindeutig belegbar, generell zu weniger schweren kardialen Begleiterkrankungen wie KHK oder vergangenen Myokardinfarkten und damit ein geringeres kardiales inflammatorisches Milieu. Diese fehlenden Begleiterkrankungen könnten führende Ursache für die von uns festgestellte Differenz sein. Ein Zusammenhang zwischen Aortenstenosen und BMP-7 ist aus den Ergebnissen in erster Linie nicht ersichtlich.

Nichtdestotrotz zeigen meine Studienergebnisse eine deutliche Differenz zwischen den untersuchten Gruppen und fundieren die in der Fachliteratur vermutete Funktion des Proteins in der Aortenklappenstenose. Das Protein könnte perspektivisch als prognostischer Marker, prophylaktischer- oder gar therapeutischer Ansatz in der Aortenklappenstenose dienen. Es sind weitere experimentelle Studien zur Klärung der pathophysiologischen Aspekte vonnöten. So könnten beispielsweise Messungen vor- und nach einem Klappenersatz die Dynamik des Peptids und dessen Effekte auf die Aortenklappe weiter verdeutlichen. Ebenso könnten histologische Untersuchungen an explantiertem Klappengewebe einen Zusammenhang zwischen BMP-7 und der AS herstellen.

4.6. Limitationen

An dem von mir verwendeten Studiendesign ist die Querschnittsanalyse mit fehlendem Follow-up zu bemängeln, denn Proteine der TGF- β -Superfamilie sind durch akute inflammatorische Geschehen, Tagesschwankungen oder andere Phänomene, wie der Blutentnahmetechnik, modifizierbar. Überdies sind zytokin-spiegelbeeinflussende Begleiterkrankungen wie Karzinome nicht erfasst worden. Eine Ausweitung der anamnestischen Parameter sowie eine wiederholte Durchführung der Testung in Kombination mit erneuter Echokardiographie zur

Diskussion

Evaluation der Stenosendynamik im Sinne eines longitudinalen Studienaufbaus hätten zur besseren klinischen Einordnung der Ergebnisse beitragen und mögliche Fehlerquellen eliminieren können. Zudem ist die Patientenkohorte mit $n=43$ verhältnismäßig klein und könnte die statistischen Signifikanzen der Ergebnisse verzerren.

5.0. Zusammenfassung

Die Aortenklappenstenose ist eine chronische, stetig progrediente Erkrankung des Herzens mit Kalzifikation und Einengung des kardialen Ausflusstraktes im Endstadium. Während die anfängliche leichte Stenose oft aufgrund fehlender Symptomatik unentdeckt bleibt, ist die schwere Stenose hingegen das häufigste behandlungsbedürftige Vitium bei Patienten fortgeschrittenen Alters. Da die endgültige Pathogenese noch nicht ausreichend untersucht ist, sind sinnvolle therapeutische Optionen bis zum heutigen Tage limitiert und ausschließlich im operativen Klappenersatz zu finden. Versuche einer medikamentösen Therapie mit Statinen zur Serumlipidsenkung sind nach anfänglichem Enthusiasmus in groß angelegten Studien der letzten Jahre widerlegt worden, da diese, im Gegensatz zur Atherosklerose, hier keine Vorteile erbrachten.

Zwar teilt die AS Risikofaktoren und einige gemeinsame pathophysiologische Aspekte mit denen der Atherosklerose, dennoch scheint es Differenzen in der Pathogenese beider Erkrankungen zu geben. Durch erhöhte Scherkräfte und damit einhergehender endothelialer Dysfunktion, wird eine inflammatorische Kaskade mit Makrophagen- und Lymphozyteninfiltration sowie Lipidakkumulation der valvulären Endothelzellen losgetreten. Proteine der TGF- β -Superfamilie, insbesondere TGF- β 1, BMP-2 oder BMP-4 durch ihre inflammatorischen und osteoinduzierenden Funktionen- ebenso wie BMP-7 mit seinen antiinflammatorischen und antifibrotischen Aufgaben, sind hierbei von besonderem Interesse.

In dieser Studie wurde durchflusszytometrisch untersucht, ob Differenzen der Expression und Expressionsmuster oben genannter Proteine unter Monozyten und Thrombozyten in den unterschiedlichen Schweregraden der Aortenklappenstenose nachzuweisen sind. Während diverse Differenzen zwar aufzuzeigen waren, lagen lediglich die Ergebnisse von monozytären TGF- β 1 in einem statistisch signifikanten Bereich. Diese waren bei niedriggradigen Stenosen im direkten Vergleich zu hochgradigen Stenosen höher angesiedelt.

Zusammenfassung

Die hohe Expression von TGF- β 1 bei niedriggradigen Stenosen unterstreicht die inflammatorische Aufgabe des Peptids durch Monozyten in der Aortenklappenstenose.

Meine Ergebnisse verdeutlichen die Wichtigkeit der TGF- β -Superfamilie in der Genese der Aortenklappenstenose. Die Untersuchungen zeigen Differenzen der Proteinexpressionen bei AS unterschiedlicher Schweregrade. Zur weiteren klinischen Einordnung und Bestätigung der Resultate ist eine erneute Untersuchung der TGF- β -Superfamilie mit follow-up zur Beurteilung des natürlichen Krankheitsverlaufs notwendig. So könnte durch mehrmalige echokardiographische Evaluation in Kombination mit multipler Peptidmessungen eine Korrelation dieser beiden Parameter hergestellt werden. Hier kann man im weiteren Sinne die prognostische Wertigkeit der TGF- β s beurteilen. Besonders monozytäres TGF- β 1 und BMP-7 sowie thrombozytäres BMP-2 sind hierbei von besonderem Interesse. Darüber hinaus könnten immunhistochemische- oder durchflusszytometrische Untersuchungen an explantiertem Klappengewebe ein Verhältnis von monozytärer und klappengeweblicher TGF- β -Expression erbringen. Hierdurch würden nicht nur quantitative Expressionen der einzelnen Proteine in unterschiedlichen Schweregraden evaluiert-, sondern vielmehr die Einflüsse der einzelnen Proteine auf das Klappengewebe gezeigt werden.

Zusammenfassend besitzen einige TGF- β -Proteine aufgrund vorangegangener Studien und der hier vorliegenden Studienergebnisse das Potenzial als prognostischer Marker für die Entstehung der AS zu dienen. Hierdurch könnte es möglich sein, das Risiko für einen Progress der Erkrankung vorherzusagen und entsprechende Maßnahmen zu ergreifen, um Spätfolgen zu verhindern. Dies müsste allerdings nach erfolgter Bestätigung oben genannter pathophysiologischer Aspekte in groß angelegten klinischen Studien erfolgen.

6.0. Literaturverzeichnis

- [1] Ahamed J, Burg N, Yoshinaga K, et al. (2008) In vitro and in vivo evidence for shear-induced activation of latent transforming growth factor-beta1. *Blood* 112:3650–3660.
- [2] Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, et al. (1983) Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *The Journal of biological chemistry* 258:7155–7160.
- [3] Balachandran K, Sucosky P, Jo H, Yoganathan AP (2010) Elevated cyclic stretch induces aortic valve calcification in a bone morphogenetic protein-dependent manner. *The American journal of pathology* 177:49–57.
- [4] Baumgartner H, Hung J, Bermejo J, et al. (2017) Recommendations on the echocardiographic assessment of aortic valve stenosis: a focused update from the European Association of Cardiovascular Imaging and the American Society of Echocardiography. *European heart journal cardiovascular Imaging* 18:254–275.
- [5] Belge K-U, Dayyani F, Horelt A, et al. (2002) The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 168:3536–3542.
- [6] Boström K, Watson KE, Horn S, et al. (1993) Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.* 91:1800–1809.
- [7] Buckley S, Shi W, Driscoll B, et al. (2004) BMP4 signaling induces senescence and modulates the oncogenic phenotype of A549 lung adenocarcinoma cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 286:L81-6.
- [8] Buijs JT, Henriquez NV, van Overveld PGM, et al. (2007) Bone morphogenetic protein 7 in the development and treatment of bone metastases from breast cancer. *Cancer research* 67:8742–8751.
- [9] Buijs JT, Rentsch CA, van der Horst G, et al. (2007) BMP7, a putative regulator of epithelial homeostasis in the human prostate, is a potent inhibitor of

- prostate cancer bone metastasis in vivo. *The American journal of pathology* 171:1047–1057.
- [10] Castoldi G, Di Gioia CRT, Pieruzzi F, et al. (2003) ANG II increases TIMP-1 expression in rat aortic smooth muscle cells in vivo. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 284:H635-43.
- [11] Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, et al. (1990) Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:9843–9847.
- [12] Chen P-Y, Qin L, Li G, et al. (2019) Endothelial TGF- β signalling drives vascular inflammation and atherosclerosis. *Nat Metab* 1:912–926.
- [13] Chen X, Xu J, Jiang B, Liu D (2016) Bone Morphogenetic Protein-7 Antagonizes Myocardial Fibrosis Induced by Atrial Fibrillation by Restraining Transforming Growth Factor- β (TGF- β)/Smads Signaling. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 22:3457–3468.
- [14] Chen Y, Blom IE, Sa S, et al. (2002) CTGF expression in mesangial cells: involvement of SMADs, MAP kinase, and PKC. *Kidney international* 62:1149–1159.
- [15] Clark-Greuel JN, Connolly JM, Sorichillo E, et al. (2007) Transforming growth factor-beta1 mechanisms in aortic valve calcification: increased alkaline phosphatase and related events. *The Annals of thoracic surgery* 83:946–953.
- [16] Cloyd KL, El-Hamamsy I, Boonrungsiman S, et al. (2012) Characterization of porcine aortic valvular interstitial cell 'calcified' nodules. *PLoS ONE* 7:e48154.
- [17] Cook SD, Wolfe MW, Salkeld SL, Rueger DC (1995) Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 77:734–750.
- [18] Coté N, Mahmut A, Bosse Y, et al. (2013) Inflammation is associated with the remodeling of calcific aortic valve disease. *Inflammation* 36:573–581.

- [19] Cowell SJ, Newby DE, Prescott RJ, et al. (2005) A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis. *The New England journal of medicine* 352:2389–2397.
- [20] Cros J, Cagnard N, Woollard K, et al. (2010) Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33:375–386.
- [21] Currie PJ, Seward JB, Reeder GS, et al. (1985) Continuous-wave Doppler echocardiographic assessment of severity of calcific aortic stenosis: a simultaneous Doppler-catheter correlative study in 100 adult patients. *Circulation* 71:1162–1169.
- [22] Cutroneo KR, White SL, Phan SH, Ehrlich HP (2007) Therapies for bleomycin induced lung fibrosis through regulation of TGF-beta1 induced collagen gene expression. *Journal of cellular physiology* 211:585–589.
- [23] Datto MB, Li Y, Panus JF, et al. (1995) Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:5545–5549.
- [24] Deng H, Ravikumar TS, Yang W-L (2009) Overexpression of bone morphogenetic protein 4 enhances the invasiveness of Smad4-deficient human colorectal cancer cells. *Cancer letters* 281:220–231.
- [25] Denton NF, Eghleilib M, Al-Sharifi S, et al. (2019) Bone morphogenetic protein 2 is a depot-specific regulator of human adipogenesis. *International journal of obesity (2005)* 43:2458–2468.
- [26] Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE (2009) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 29:313–326.
- [27] Dijke P ten, Goumans M-J, Pardali E (2008) Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis* 11:79–89.
- [28] Ducy P, Karsenty G (2000) The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney international* 57:2207–2214.

- [29] Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ (1995) A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes & development* 9:2795–2807.
- [30] Eckhardt BL, Cao Y, Redfern AD, et al. (2020) Activation of Canonical BMP4-SMAD7 Signaling Suppresses Breast Cancer Metastasis. *Cancer research* 80:1304–1315.
- [31] Ehanire T, Ren L, Bond J, et al. (2015) Angiotensin II stimulates canonical TGF- β signaling pathway through angiotensin type 1 receptor to induce granulation tissue contraction. *J Mol Med* 93:289–302.
- [32] Ferrari G, Cook BD, Terushkin V, et al. (2009) Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis. *Journal of cellular physiology* 219:449–458.
- [33] Fielitz J, Hein S, Mitrovic V, et al. (2001) Activation of the cardiac renin-angiotensin system and increased myocardial collagen expression in human aortic valve disease. *Journal of the American College of Cardiology* 37:1443–1449.
- [34] Fondard O, Detaint D, lung B, et al. (2005) Extracellular matrix remodelling in human aortic valve disease: the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. *European heart journal* 26:1333–1341.
- [35] Franc NC, Dimarcq J-L, Lagueux M, et al. (1996) Croquemort, A Novel Drosophila Hemocyte/Macrophage Receptor that Recognizes Apoptotic Cells. *Immunity* 4:431–443.
- [36] Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, et al. (2001) Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 83-A Suppl 1:S151-8.
- [37] Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, et al. (2000) Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis* 148:75–85.
- [38] Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, et al. (1998) Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of

- intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 98:1164–1171.
- [39] Gomez-Stallons MV, Wirrig-Schwendeman EE, Hassel KR, et al. (2016) Bone Morphogenetic Protein Signaling Is Required for Aortic Valve Calcification. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 36:1398–1405.
- [40] Gould SE, Day M, Jones SS, Dorai H (2002) BMP-7 regulates chemokine, cytokine, and hemodynamic gene expression in proximal tubule cells. *Kidney international* 61:51–60.
- [41] Goumans M-J, an Zwijsen, Dijke P ten, Bailly S (2018) Bone Morphogenetic Proteins in Vascular Homeostasis and Disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 10.
- [42] Govender S, Csimma C, Genant HK, et al. (2002) Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 84:2123–2134.
- [43] Guilliams M, Ginhoux F, Jakubzick C, et al. (2014) Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nature reviews. Immunology* 14:571–578.
- [44] Han G, Lu S-L, Li AG, et al. (2005) Distinct mechanisms of TGF-beta1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis during skin carcinogenesis. *J. Clin. Invest.* 115:1714–1723.
- [45] He M-X, He Y-W (2012) Suppressing autoimmunity by TGF-β: not just through T(reg) cells. *Cellular & molecular immunology* 9:371–372.
- [46] Herold G (2022) *Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung : 2022 : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung, mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis.* Gerd Herold, Köln.
- [47] Hogan BLM (1996) Bone morphogenetic proteins in development. *Current Opinion in Genetics & Development* 6:432–438.
- [48] Honda Y, Knutsen R, Strong DD, et al. (1997) Osteogenic protein-1 stimulates mRNA levels of BMP-6 and decreases mRNA levels of BMP-2 and -4 in human osteosarcoma cells. *Calcified tissue international* 60:297–301.

- [49] Horbelt D, Denkis A, Knaus P (2012) A portrait of Transforming Growth Factor β superfamily signalling: Background matters. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44:469–474.
- [50] Horiguchi M, Ota M, Rifkin DB (2012) Matrix control of transforming growth factor- β function. *Journal of biochemistry* 152:321–329.
- [51] Horn F, Armbruster M, Dospil A (2009) *Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium*, 4., aktualisierte und erw. Aufl. Thieme, Stuttgart.
- [52] Hristov M, Weber C (2011) Differential role of monocyte subsets in atherosclerosis. *Thrombosis and haemostasis* 106:757–762.
- [53] Huse M, Muir TW, Xu L, et al. (2001) The TGF β receptor activation process: an inhibitor- to substrate-binding switch. *Molecular cell* 8:671–682.
- [54] Ide H, Yoshida T, Matsumoto N, et al. (1997) Growth regulation of human prostate cancer cells by bone morphogenetic protein-2. *Cancer research* 57:5022–5027.
- [55] Inai K, Norris RA, Hoffman S, et al. (2008) BMP-2 induces cell migration and periostin expression during atrioventricular valvulogenesis. *Developmental Biology* 315:383–396.
- [56] Ishihara K, Zile MR, Nagatsu M, et al. (1992) Coronary blood flow after the regression of pressure-overload left ventricular hypertrophy. *Circulation research* 71:1472–1481.
- [57] Isoda K, Matsuki T, Kondo H, et al. (2010) Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist induces aortic valve disease in BALB/c mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30:708–715.
- [58] Iung B (2003) A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *European heart journal* 24:1231–1243.
- [59] Jacob MP (2003) Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 57:195–202.

- [60] Jank M, Niessen N von, Olivier CB, et al. (2021) Platelet Bone Morphogenetic Protein-4 Mediates Vascular Inflammation and Neointima Formation after Arterial Injury. *Cells* 10.
- [61] Jenke A, Kistner J, Saradar S, et al. (2020) Transforming growth factor- β 1 promotes fibrosis but attenuates calcification of valvular tissue applied as a three-dimensional calcific aortic valve disease model. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 319:H1123-H1141.
- [62] Jian B, Narula N, Li Q, et al. (2003) Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. *The Annals of thoracic surgery* 75:457-65; discussion 465-6.
- [63] Jin Y, Cheng X, Lu J, Li X (2018) Exogenous BMP-7 Facilitates the Recovery of Cardiac Function after Acute Myocardial Infarction through Counteracting TGF- β 1 Signaling Pathway. *The Tohoku journal of experimental medicine* 244:1–6.
- [64] Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J (2006) Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circulation research* 99:1044–1059.
- [65] Jones CM, Dale L, Hogan BL, et al. (1996) Bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) acts during gastrula stages to cause ventralization of *Xenopus* embryos. *Development (Cambridge, England)* 122:1545–1554.
- [66] Jones CM, Lyons KM, Hogan BL (1991) Involvement of Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4) and Vgr-1 in morphogenesis and neurogenesis in the mouse. *Development (Cambridge, England)* 111:531–542.
- [67] Jung J-J, Ahmad AA, Rajendran S, et al. (2022) Differential BMP Signaling Mediates the Interplay Between Genetics and Leaflet Numbers in Aortic Valve Calcification. *JACC. Basic to translational science* 7:333–345.
- [68] Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R, et al. (2004) Expression of bone sialoprotein and bone morphogenetic protein-2 in calcific aortic stenosis. *The Journal of heart valve disease* 13:560–566.
- [69] Kaden JJ, Dempfle C-E, Grobholz R, et al. (2005) Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis.

- Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology 14:80–87.
- [70] Kang H (2017) Role of MicroRNAs in TGF- β Signaling Pathway-Mediated Pulmonary Fibrosis. *International journal of molecular sciences* 18.
- [71] Keohane EM, Otto CN, Walenga JM (2020) Rodak's hematology. Clinical principles and applications, Sixth edition. Elsevier, St. Louis, Missouri.
- [72] Kim IY, Lee D-H, Lee DK, et al. (2004) Restoration of bone morphogenetic protein receptor type II expression leads to a decreased rate of tumor growth in bladder transitional cell carcinoma cell line TSU-Pr1. *Cancer research* 64:7355–7360.
- [73] Kirkbride KC, Townsend TA, Bruinsma MW, et al. (2008) Bone morphogenetic proteins signal through the transforming growth factor-beta type III receptor. *Journal of Biological Chemistry* 283:7628–7637.
- [74] Kleeff J, Maruyama H, Ishiwata T, et al. (1999) Bone morphogenetic protein 2 exerts diverse effects on cell growth in vitro and is expressed in human pancreatic cancer in vivo. *Gastroenterology* 116:1202–1216.
- [75] Lan HY (2011) Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation. *International Journal of Biological Sciences* 7:1056–1067.
- [76] Lee Y-C, Cheng C-J, Bilen MA, et al. (2011) BMP4 promotes prostate tumor growth in bone through osteogenesis. *Cancer research* 71:5194–5203.
- [77] Li MO, Wan YY, Sanjabi S, et al. (2006) Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annual review of immunology* 24:99–146.
- [78] Lindblom D, Lindblom U, Qvist J, Lundström H (1990) Long-Term relative survival rates after heart valve replacement. *Journal of the American College of Cardiology* 15:566–573.
- [79] Lombardo Y, Scopelliti A, Cammareri P, et al. (2011) Bone morphogenetic protein 4 induces differentiation of colorectal cancer stem cells and increases their response to chemotherapy in mice. *Gastroenterology* 140:297–309.
- [80] Lúdvíksson BR, Gunnlaugsdóttir B (2003) Transforming growth factor-beta as a regulator of site-specific T-cell inflammatory response. *Scand J Immunol* 58:129–138.

- [81] Luyten FP, Cunningham NS, Ma S, et al. (1989) Purification and Partial Amino Acid Sequence of Osteogenin, a Protein Initiating Bone Differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 264:13377–13380.
- [82] Maéno M, Ong RC, Suzuki A, et al. (1994) A truncated bone morphogenetic protein 4 receptor alters the fate of ventral mesoderm to dorsal mesoderm: roles of animal pole tissue in the development of ventral mesoderm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:10260–10264.
- [83] Mancini D, Monteagudo J, Suárez-Fariñas M, et al. (2018) New methodologies to accurately assess circulating active transforming growth factor- β 1 levels: implications for evaluating heart failure and the impact of left ventricular assist devices. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 192:15–29.
- [84] McKinnon KM (2018) Flow Cytometry: An Overview. *Current protocols in immunology* 120:5.1.1-5.1.11.
- [85] Merino D, Villar AV, García R, et al. (2016) BMP-7 attenuates left ventricular remodelling under pressure overload and facilitates reverse remodelling and functional recovery. *Cardiovascular research* 110:331–345.
- [86] Misharin AV, Cuda CM, Saber R, et al. (2014) Nonclassical Ly6C(-) monocytes drive the development of inflammatory arthritis in mice. *Cell reports* 9:591–604.
- [87] Mohler ER, Chawla MK, Chang AW, et al. (1999) Identification and characterization of calcifying valve cells from human and canine aortic valves. *The Journal of heart valve disease* 8:254–260.
- [88] Mönckeberg JG (1904) Der normale histologische Bau und die Sklerose der Aortenklappen. *Virchows Arch. path Anat.* 176:472–514.
- [89] Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH (2001) Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *Journal of cell science* 114:4359–4369.
- [90] Mueller TD, Nickel J (2012) Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. *FEBS letters* 586:1846–1859.

- [91] Mukherjee R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, et al. (2015) Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Scientific reports* 5:13886.
- [92] Nickel J, Sebald W, Groppe JC, Mueller TD (2009) Intricacies of BMP receptor assembly. *Cytokine & growth factor reviews* 20:367–377.
- [93] Nishanian TG, Kim J-S, Foxworth A, Waldman T (2004) Suppression of tumorigenesis and activation of Wnt signaling by bone morphogenetic protein 4 in human cancer cells. *Cancer biology & therapy* 3:667–675.
- [94] Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN, et al. (2006) Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *The Lancet* 368:1005–1011.
- [95] O'Brien KD, Kuusisto J, Reichenbach DD, et al. (1995) Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions. *Circulation* 92:2163–2168.
- [96] O'Brien KD, Shavelle DM, Caulfield MT, et al. (2002) Association of angiotensin-converting enzyme with low-density lipoprotein in aortic valvular lesions and in human plasma. *Circulation* 106:2224–2230.
- [97] Otto CM (2008) Calcific aortic stenosis--time to look more closely at the valve. *N Engl J Med* 359:1395–1398.
- [98] Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, et al. (1994) Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation* 90:844–853.
- [99] Padgett RW, Wozney JM, Gelbart WM (1993) Human BMP sequences can confer normal dorsal-ventral patterning in the *Drosophila* embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:2905–2909.
- [100] Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW (1989) Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74:2527–2534.
- [101] Phillips SJ (2004) Selecting the best heart valve for your patient: mechanical or tissue. *The American heart hospital journal* 2:149–152.
- [102] Poggio P, Sainger R, Branchetti E, et al. (2013) Noggin attenuates the osteogenic activation of human valve interstitial cells in aortic valve sclerosis. *Cardiovascular research* 98:402–410.

- [103] Prud'homme GJ, Piccirillo CA (2000) The inhibitory effects of transforming growth factor-beta-1 (TGF-beta1) in autoimmune diseases. *Journal of autoimmunity* 14:23–42.
- [104] Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, et al. (2003) Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation* 107:2181–2184.
- [105] Ramchand J, Patel SK, Kearney LG, et al. (2020) Plasma ACE2 Activity Predicts Mortality in Aortic Stenosis and Is Associated With Severe Myocardial Fibrosis. *JACC. Cardiovascular imaging* 13:655–664.
- [106] Reddi A (1994) Bone and cartilage differentiation. *Current Opinion in Genetics & Development* 4:737–744.
- [107] Reddi AH (1998) Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins. *Clinical orthopaedics and related research*:S66-72.
- [108] Reibman J, Meixler S, Lee TC, et al. (1991) Transforming growth factor beta 1, a potent chemoattractant for human neutrophils, bypasses classic signal-transduction pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:6805–6809.
- [109] Reinhaller M, Johansson JB, Braune S, et al. (2019) Shear-induced platelet adherence and activation in an in-vitro dynamic multiwell-plate system. *Clinical hemorheology and microcirculation* 71:183–191.
- [110] Rocher C, Singla R, Singal PK, et al. (2012) Bone morphogenetic protein 7 polarizes THP-1 cells into M2 macrophages. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 90:947–951.
- [111] Ross S, Hill CS (2008) How the Smads regulate transcription. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40:383–408.
- [112] Rossebø AB, Pedersen TR, Boman K, et al. (2008) Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis. *N Engl J Med* 359:1343–1356.
- [113] Sabbineni H, Verma A, Somanath PR (2018) Isoform-specific effects of transforming growth factor β on endothelial-to-mesenchymal transition. *Journal of cellular physiology* 233:8418–8428.

- [114] Sacco R, Leuci D, Tortorella C, et al. (2000) Transforming growth factor beta1 and soluble Fas serum levels in hepatocellular carcinoma. *Cytokine* 12:811–814.
- [115] Sampath TK, Rashka KE, Doctor JS, et al. (1993) Drosophila transforming growth factor beta superfamily proteins induce endochondral bone formation in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:6004–6008.
- [116] Schimandle JH, Boden SD, Hutton WC (1995) Experimental spinal fusion with recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Spine* 20:1326–1337.
- [117] Selzer A (1987) Changing aspects of the natural history of valvular aortic stenosis. *The New England journal of medicine* 317:91–98.
- [118] Sengle G, Ono RN, Sasaki T, Sakai LY (2011) Prodomains of transforming growth factor beta (TGFbeta) superfamily members specify different functions: extracellular matrix interactions and growth factor bioavailability. *The Journal of biological chemistry* 286:5087–5099.
- [119] Seya K, Yu Z, Kanemaru K, et al. (2011) Contribution of bone morphogenetic protein-2 to aortic valve calcification in aged rat. *Journal of pharmacological sciences* 115:8–14.
- [120] Shioi A, Katagi M, Okuno Y, et al. (2002) Induction of bone-type alkaline phosphatase in human vascular smooth muscle cells: roles of tumor necrosis factor-alpha and oncostatin M derived from macrophages. *Circulation research* 91:9–16.
- [121] Singla DK, Singla R, Wang J (2016) BMP-7 Treatment Increases M2 Macrophage Differentiation and Reduces Inflammation and Plaque Formation in Apo E^{-/-} Mice. *PLoS ONE* 11:e0147897.
- [122] Sipe JB, Zhang J, Waits C, et al. (2004) Localization of bone morphogenetic proteins (BMPs)-2, -4, and -6 within megakaryocytes and platelets. *Bone* 35:1316–1322.
- [123] Sorescu GP, Song H, Tressel SL, et al. (2004) Bone morphogenetic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress induces

- monocyte adhesion by stimulating reactive oxygen species production from a nox1-based NADPH oxidase. *Circulation research* 95:773–779.
- [124] Sorescu GP, Sykes M, Weiss D, et al. (2003) Bone morphogenetic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress stimulates an inflammatory response. *Journal of Biological Chemistry* 278:31128–31135.
- [125] Stott DK, Marpole DG, Bristow JD, et al. (1970) The role of left atrial transport in aortic and mitral stenosis. *Circulation* 41:1031–1041.
- [126] Su X, Ao L, Shi Y, et al. (2011) Oxidized low density lipoprotein induces bone morphogenetic protein-2 in coronary artery endothelial cells via Toll-like receptors 2 and 4. *The Journal of biological chemistry* 286:12213–12220.
- [127] Sucosky P, Balachandran K, Elhammali A, et al. (2009) Altered shear stress stimulates upregulation of endothelial VCAM-1 and ICAM-1 in a BMP-4- and TGF-beta1-dependent pathway. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29:254–260.
- [128] Sun B, Huo R, Sheng Y, et al. (2013) Bone morphogenetic protein-4 mediates cardiac hypertrophy, apoptosis, and fibrosis in experimentally pathological cardiac hypertrophy. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 61:352–360.
- [129] Sun L, Rajamannan NM, Sucosky P (2013) Defining the role of fluid shear stress in the expression of early signaling markers for calcific aortic valve disease. *PLoS ONE* 8:e84433.
- [130] Truksa J, Peng H, Lee P, Beutler E (2006) Bone morphogenetic proteins 2, 4, and 9 stimulate murine hepcidin 1 expression independently of Hfe, transferrin receptor 2 (Tfr2), and IL-6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:10289–10293.
- [131] Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S (2011) Oxidative stress and heart failure. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 301:H2181-90.
- [132] Urist MR (1965) Bone: formation by autoinduction. *Science (New York, N.Y.)* 150:893–899.

- [133] Vahanian A, Beyersdorf F, Praz F, et al. (2022) 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *European heart journal* 43:561–632.
- [134] van Furth R, Cohn ZA (1968) The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *The Journal of experimental medicine* 128:415–435.
- [135] Varshney R, Murphy B, Woolington S, et al. (2019) Inactivation of platelet-derived TGF- β 1 attenuates aortic stenosis progression in a robust murine model. *Blood Advances* 3:777–788.
- [136] Verrecchia F, Chu ML, Mauviel A (2001) Identification of novel TGF-beta/Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *Journal of Biological Chemistry* 276:17058–17062.
- [137] Villar AV, Cobo M, Llano M, et al. (2009) Plasma levels of transforming growth factor-beta1 reflect left ventricular remodeling in aortic stenosis. *PLoS ONE* 4:e8476.
- [138] Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, et al. (1987) Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84:5788–5792.
- [139] Waltenberger J, Lundin L, Oberg K, et al. (1993) Involvement of transforming growth factor-beta in the formation of fibrotic lesions in carcinoid heart disease. *The American journal of pathology* 142:71–78.
- [140] Wang EA, Rosen V, Cordes P, et al. (1988) Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:9484–9488.
- [141] Wang W, Vootukuri S, Meyer A, et al. (2014) Association between shear stress and platelet-derived transforming growth factor- β 1 release and activation in animal models of aortic valve stenosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 34:1924–1932.
- [142] Weiskirchen R, Meurer SK (2013) BMP-7 counteracting TGF-beta1 activities in organ fibrosis. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 18:1407–1434.

- [143] Wong KL, Tai JJ-Y, Wong W-C, et al. (2011) Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 118:e16-31.
- [144] Wozney JM, Rosen V (1998) Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clinical orthopaedics and related research*:26–37.
- [145] Xu Y, Wan J, Jiang D, Wu X (2009) BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells. *Journal of nephrology* 22:403–410.
- [146] Yadgir S, Johnson CO, Aboyans V, et al. (2020) Global, Regional, and National Burden of Calcific Aortic Valve and Degenerative Mitral Valve Diseases, 1990-2017. *Circulation* 141:1670–1680.
- [147] Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, et al. (1993) Expression of transforming growth factor beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:1814–1818.
- [148] Yang X, Fullerton DA, Su X, et al. (2009) 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. *Journal of the American College of Cardiology* 53:491–500.
- [149] Yang X, Meng X, Su X, et al. (2009) Bone morphogenetic protein 2 induces Runx2 and osteopontin expression in human aortic valve interstitial cells: role of Smad1 and extracellular signal-regulated kinase 1/2. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 138:1008–1015.
- [150] Yao Y, Bennett BJ, Wang X, et al. (2010) Inhibition of bone morphogenetic proteins protects against atherosclerosis and vascular calcification. *Circulation research* 107:485–494.
- [151] Yu P-J, Skolnick A, Ferrari G, et al. (2009) Correlation between plasma osteopontin levels and aortic valve calcification: potential insights into the pathogenesis of aortic valve calcification and stenosis. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 138:196–199.

- [152] Yunoki K, Naruko T, Komatsu R, et al. (2009) Enhanced expression of haemoglobin scavenger receptor in accumulated macrophages of culprit lesions in acute coronary syndromes. *European heart journal* 30:1844–1852.
- [153] Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, et al. (2011) SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 118:e50–61.
- [154] Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, et al. (2003) BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nature medicine* 9:964–968.
- [155] Zhan Q, Song R, Zeng Q, et al. (2015) Activation of TLR3 induces osteogenic responses in human aortic valve interstitial cells through the NF-κB and ERK1/2 pathways. *International Journal of Biological Sciences* 11:482–493.
- [156] Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, et al. (2010) Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116:e74–80.
- [157] Zimmerman LB, Jesús-Escobar JM de, Harland RM (1996) The Spemann Organizer Signal noggin Binds and Inactivates Bone Morphogenetic Protein 4. *Cell* 86:599–606.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Dissertation wurde in der medizinischen Universitätsklinik Tübingen unter Betreuung von Herrn Professor Dr. Gawaz durchgeführt. Die Konzeption und Betreuung dieser Studie erfolgten durch Frau PD Dr. Karin Müller.

Die Patientenrekrutierung, Erhebung der Basisdaten, sowie die Messungen im Labor erfolgten durch mich nach Einarbeitung durch Frau L. Laptev und weiteren Doktoranden der Arbeitsgruppe.

Die statistische Auswertung erfolgte durch Frau PD Dr. Karin Müller.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, der 27.04.2023