Klinik für Herz- Thorax- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Ulm
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Andreas Liebold

Analyse von Entzündungsmarkern in degenerierten und insuffizienten Herzklappen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Vorgelegt von

Marina Sandra Stahl
aus Offenburg
2018

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Markus Hönicka

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Armin Imhof

Tag der Promotion: 11. Juli 2019

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I

Abkürzungsverzeichnis III

1 Einleitung 1

1.1 Die degenerative Aortenklappenerkrankung 1

1.2 Pathogenese der Aortenklappendegeneration 2

1.3 Lipidakkumulation, Inflammation, Kalzifikation, Ossifikation 3

1.4 Interstitielle Herzklappenzellen 4

1.5 Die bikuspide Aortenklappe 6

1.6 Vergleichende Betrachtung: Die Atherosklerose 7

1.7 Mögliche Mediatoren des Krankheitsprozesses der degenerativen Aortenklappenerkrankung 8

1.8 Ziele der vorliegenden Arbeit 12

2 Material und Methoden 13

2.1 Untersuchungsmaterial 13

2.2 Gewinnung der Proben 13

2.3 Aufrechterhalten von RNase-freien Versuchsbedingungen 15

2.4 Verarbeitung des Klappenmaterials und Homogenisierung 16

2.5 Aufreinigung der RNA 16

2.6 Beurteilung der RNA 17

2.7 Reverse Transkription 19

2.8 Der Aufbau eines TaqMan Assays (Hydrolysesonde) 20

2.9 Präamplifikation 22

2.10 Erläuterung qPCR 23

2.11 Ablauf qPCR 24

2.12 Kontrollen 25

2.13 Histologie 26
2.14 Datenanalyse 28
3 Ergebnisse 31
3.1 Patientenpopulation....31
3.2 Qualitätskontrolle der RNA....33
3.3 Expressionsanalyse 34
3.4 Korrelationsanalyse....41
3.5 Ergebnisse der Kontrollversuche 52
3.6 Färbung nach von Kossa 57
4 Diskussion....59
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse....59
4.2 Diskussion der Ergebnisse....59
4.3 Methodenkritik....72
4.4 Schlussfolgerung und Ausblick 79
5 Zusammenfassung....81
6 Literaturverzeichnis 83
Anhang....99
Danksagung 114
Lebenslauf....115

Abkürzungsverzeichnis

Δp_{max}	Maximaler Druckgradient
Δp_{mean}	Mittlerer Druckgradient
APC	Antigen presenting cell; Antigenpräsentierende Zellen
aVIC	Activated Valve Interstitial Cell; aktivierte interstitielle Herzklappenzelle
BAV	Bicuspid Aortic Valve; bikuspide Aortenklappe
CD	Cluster of Differentiation; Unterscheidungsgruppen
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C_T	Threshold cycle; Schwellenzyklus
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4; zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Et al.	Et alii
EZM	Extrazelluläre Matrix
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	Genomische DNA
HE	Hämatoxylin-Eosin Färbung
ICOS	Inducible T-Cell-Costimulator; induzierbarer T-Zell-Kostimulator
IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase
IFNG	Interferon gamma
IL	Interleukin
IQR	Interquartile Range; Interquartilabstand

KÖF	Klappenöffnungsfläche
MHCII	Major Histocompatibility Complex II; Haupthistokompatibilitätskomplex II
MIQE	Minimum Information for Publication of quantitative Real-Time PCR Experiments; Mindestmaß an Informationen für die Publikation von quantitativen Echtzeit-PCR-Experimenten
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure; Boten-Ribonukleinsäure
NTC	No template control; Negativkontrolle Matrize
obVIC	Osteblastic Valve Interstitial Cell; osteoblastenähnliche interstitielle Herzklappenzelle
oxLDL	Oxidized Low Density Lipoprotein; oxidiertes Lipoprotein niederer Dichte
PDC	Plasmozytoide dendritische Zellen
pVIC	Progenitor Valve Interstitital Cell; interstitielle Progenitorherzklappenzelle
qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion
qVIC	Quiescent Valve Interstitial Cell; ruhende interstitielle Herzklappenzelle
RIN	RNA Integrity Number; RNA-Integritätszahl
ROS	Reactive Oxygen Species; reaktive Sauerstoffspezies
RPL13A	Ribosomales Protein L13a
RPS18	Ribosomales Protein S18
RT	Reverse Transkription
SD	Standardabweichung
SPP1	Osteopontin
TGFB1	Transforming Growth Factor Beta 1; transformierender Wachstumsfaktor Beta 1
TH-Zelle	T-Helferzelle

TNC	Tenascin C
Tris-Base	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor, Endothelwachstumsfaktor
VIC	Valve Interstitial Cell; interstitielle Herzklappenzellen
v_{max}	Maximale Flussgeschwindigkeit
Vs.	Versus

1 Einleitung

1.1 Die degenerative Aortenklappenerkrankung

Die kalzifizierende degenerative Aortenklappenerkrankung ist in der westlichen Welt die Herzklappenerkrankung mit der höchsten Prävalenz und die häufigste Indikation für einen operativen Ersatz der Aortenklappe [42]. Man unterscheidet zwischen dem frühen Stadium, der Aortenklappensklerose, bei der es sich um eine rein morphologische Veränderung der Herzklappe handelt, und dem Spätstadium, der Aortenklappenstenose, während dem sich die Erkrankung auch hämodynamisch manifestiert und sich Symptome wie Synkopen, Dyspnoe und Angina Pectoris entwickeln [109]. Je dicker und unbeweglicher die Klappensegel sind, desto kleiner wird die Klappenöffnungsfläche (KÖF). Es kommt durch die erhöhte Druckbelastung zur linksventrikulären Hypertrophie, die zur Herzinsuffizienz führen kann. Die Aortenklappenstenose lässt sich in die Schweregrade leicht-, mittel- und hochgradig stenosiert unterteilen (Tabelle 1). Hierbei spielen die Parameter KÖF, maximale Flussgeschwindigkeit (v_{max}) und maximaler beziehungsweise durchschnittlicher Druckgradient über der Aortenklappe eine Rolle (Δp_{max} und Δp_{mean}) [74].

Tabelle 1: Schweregrade der Aortenklappenstenose laut Leitlinien der American Heart Association [74]

KÖF=Klappenöffnungfläche; v_{max}=maximale Flussgeschwindigkeit; Δp_{max}=maximaler Druckgradient über der Aortenklappe; Δp_{max}=4 v_{max}^2; Δp_{mean}=mittlerer Druckgradient über der Aortenklappe

Grad der Stenose	leicht	mittel	hoch
KÖF in cm²	> 1,5	1,5 – 1,0	< 1,0
v_{max} in m/s	2,6 - 2,9	3,0 - 4,0	> 4,0
Δp_{max} in mmHg	15 - 40	40 - 70	> 70
Δp_{mean} in mmHg	< 20	20 - 40	> 40

Im Zuge der stenotischen und degenerativen Veränderungen der Aortenklappe kann es zu einer Insuffizienz der Herzklappe kommen. Diese kann aber auch aufgrund von akuten Ereignissen wie beispielsweise einer Aortendissektion oder einer infektiösen Endokarditis auftreten. Der Schweregrad der Aortenklappeninsuffizienz kann über die Anatomie der Herzklappe, die

hämodynamischen Verhältnisse, den Schweregrad der linksventrikulären Dilatation, die Ejektionsfraktion und die Symptome des Patienten ermittelt werden [74].

Ungefähr ein Viertel der Menschen über 65 Jahren weist degenerative morphologische Veränderungen an der Aortenklappe auf [109]. 12% der Bevölkerung über 75 Jahren leiden an einer manifesten Aortenklappenstenose [78]. Mit dem demographischen Wandel nimmt somit die Prävalenz der Aortenklappendegeneration weiter zu. Bereits im Stadium der Aortenklappensklerose steigt das Risiko an einer kardiovaskulären Ursache zu versterben um 50% [80].

Aufgrund der hohen Prävalenz und Morbidität der Erkrankung ist es erstrebenswert ein System der Früherkennung zu etablieren. Dies wäre beispielsweise über spezifische Biomarker möglich, welche Signaltransduktionswege aufzeigen, über die die Krankheit moduliert werden könnte. Ein langfristiges Ziel wäre es, den operativen Eingriff hinauszuzögern oder sogar zu vermeiden und schon in der Initiationsphase der Erkrankung sekundärprophylaktisch medikamentös einzugreifen. Auf Basis des aktuellen Wissensstandes bleibt bei der Diagnosestellung einer Aortenklappenstenose lediglich der Ersatz durch eine mechanische oder biologische Aortenklappenprothese als therapeutische Option.

1.2 Pathogenese der Aortenklappendegeneration

Im Verlauf des Krankheitsprozesses kommt es zur Progredienz von subendothelialen Verdickungen [79], Fibrosierungen und Kalzifizierungen, welche zu einer zunehmenden Steifigkeit der Klappenanteile führen [119]. Lange Zeit wurden diese Vorgänge für den normalen und unabwendbaren Alterungsprozess des Klappengewebes gehalten [90, 104]. Im letzten Jahrzehnt wurde diese Sichtweise jedoch zunehmend hinterfragt und die verschiedenen Aspekte der Krankheitsentstehung, vor allem auch auf molekularer Ebene, genauer untersucht, um mögliche pharmakologische Angriffspunkte zu entdecken. Längst ist klar, dass die Aortenklappendegeneration ein vielschichtiges Krankheitsbild ist, bei dessen Pathogenese die Kalzifikation aber auch die inflammatorischen Prozesse und die Lipidakkumulation eine Rolle spielen.

Als Auslöser für die morphologische Veränderung der Aortenklappe ist wahrscheinlich, wie auch bei der Atherosklerose, eine Endotheldysfunktion anzunehmen. Diese kann durch hohen mechanischen oder oxidativen Stress ausgelöst werden [76]. In einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2011 unterscheiden New et alii (et al.) drei Phasen der Pathogenese: In der Initiationsphase kommt es zur verstärkten Ansammlung von Makrophagen, pro-osteogenen Faktoren und inflammatorischen Herden. Die zweite Phase (Ausbreitungsphase) ist gekennzeichnet durch das Fortschreiten der Entzündungsreaktion und die Bildung von Mikrokalzifikationen. Die Endphase zeigt eine Abnahme inflammatorischer Parameter und das Fortschreiten der Kalzifizierungen zu makroskopisch sichtbaren Herden [69].

1.3 Lipidakkumulation, Inflammation, Kalzifikation, Ossifikation

Wie bei der Atherosklerose, ist auch bei der Degeneration der Aortenklappe morphologisch zunächst eine Akkumulation von Lipiden zu beobachten [79]. Oxidiertes Lipoprotein niederer Dichte (oxLDL), das für viele Zellen zytotoxisch ist, wurde in senonisch veränderten Aortenklappen gemeinsam mit entzündlichen Infiltraten und Kalziumherden nachgewiesen [76]. Schon in frühen Stadien der Erkrankung sind in betroffenen Herzklappen inflammatorische Zellen, wie Makrophagen und T-Lymphozyten existent [79]. Auch regulatorische T-Zellen (T_{reg}) scheinen bei der Pathogenese der Aortenklappenstenose eine Rolle zu spielen. Sie sind in der Lage die Immunreaktion zu hemmen, zur Selbsttoleranz des Immunsystems beizutragen und damit vor der Entstehung von Autoimmunerkrankungen zu schützen [58]. So wiesen Shimoni et al. [105] eine Erhöhung der zirkulierenden regulatorischen T-Zellen bei Patienten mit Aortenklappenstenose nach. Behandelte man die Erkrankung in Form einer Intervention und eines Aortenklappenersatzes, sank der Spiegel dieser Zellen wieder ab.

Bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Pathogenese der Aortenklappenstenose sind, einhergehend mit Lipidablagerungen, Mikrokalzifizierungen zu detektieren [79]. Die Veröffentlichung von Pawade et al. „Calcification in Aortic Stenosis – The Skeleton Key“ [83] erklärt die Entstehung dieser morphologischen Veränderung folgendermaßen: Die Kalkzifikationsherde in Herzklappen bilden sich

möglicherweise über extrazelluläre Matrixvesikel [92], die durch zugrunde gegangene, aktivierte myofibroblastische interstitielle Herzklappenzellen (Valve Interstitial Cells, VICs) entstehen. New et al. entdeckten 2013 einen weiteren Typ von Matrixvesikeln, die sich von Makrophagen abschnüren. Diese Vesikel enthalten hohe Konzentrationen an Kalzium und anorganische Phosphationen und haben dadurch ein hohes Potential Mikrokalzifizierungen zu bilden [70]. Ist einmal ein derartiger Kristallisationskeim geschaffen, kann sich weiteres Kalzium ablagern und den Herd vergrößern. Die Kristalle können nun ihrerseits mit Makrophagen interagieren und diese zur Sekretion weiterer proinflammatorischer Zytokine stimulieren. Daraufhin werden erneut Endothelzellen aktiviert und Monozyten rekrutiert [68]. So entsteht ein Teufelskreis aus Inflammation und Kalzifikation, der nicht mehr zu durchbrechen ist [83].

1.4 Interstitielle Herzklappenzellen

Die menschliche Aortenklappe besteht aus drei verschiedenen Schichten: der Ventrikularisschicht, die zum linken Ventrikel hingewandt ist, der Spongiosa und der Fibrosa, die sich auf der aortalen Seite der Herzklappe befindet. Die extrazelluläre Matrix (EZM) der Klappe ist ein sehr plastisches Gewebe bestehend aus Kollagen, Elastin und Glykosaminoglykanen. Sie unterliegt einem ständigen Umbau, um die Integrität und Biegsamkeit der Herzklappe zu wahren [103], sich optimal an den Blutfluss anpassen zu können und auf diese Weise den vorherrschenden Druckverhältnissen standzuhalten. Hierbei spielen die interstitiellen Herzklappenzellen eine entscheidende Rolle, da sie die entsprechenden Umbauenzyme, wie Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und EZM-Moleküle, synthetisieren können [48, 49].

Die VICs werden nach Liu et al. [55] in fünf unterschiedliche Gruppen unterteilt: Zunächst gibt es embryonale Progenitorzellen, die den Prozess der Klappenbildung beim Embryo einleiten. Bei einem weiteren Phänotyp, den sogenannten pVICs, handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Progenitorzellen, die bei Erwachsenen sowohl im Knochenmark, als auch im peripheren Blut und der Herzklappe selbst vorkommen. Die qVICs sind ruhende interstitielle Zellen, welche im gesunden Gewebe die physiologische Klappenstruktur und -funktion aufrechterhalten. Aktivierte VICs (aVIC) finden sich in pathologisch verändertem

Gewebe, ähneln in ihrem Phänotyp Myofibroblasten und sind über die Hochregulation von Zytokinen und Matrixumbauenzymen, wie MMPs, für die Reparatur aber auch für das pathologische Remodeling der erkrankten Herzklappe verantwortlich. Porras et al. zeigten 2017, dass oxLDL in der Lage ist, die Differenzierung zu aVICs zu induzieren [91]. Die letzte Variante der Zellen, die obVICs, haben einen osteoblastenähnlichen Phänotyp und sind über die Sezernierung von Knochenmatrixproteinen zu Mineralisierungsprozessen, wie der Knorpelbildung und der Entstehung von reifem Lamellenknochen in der Lage [60, 61, 93]. Auch die erhöhte Dichte an reaktiven Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species, ROS) im Herzklappengewebe trägt dazu bei, dass die Zellen zu einem erhöhten Stoffwechsel animiert werden und die Differenzierung zu obVICs vorangetrieben wird [12].

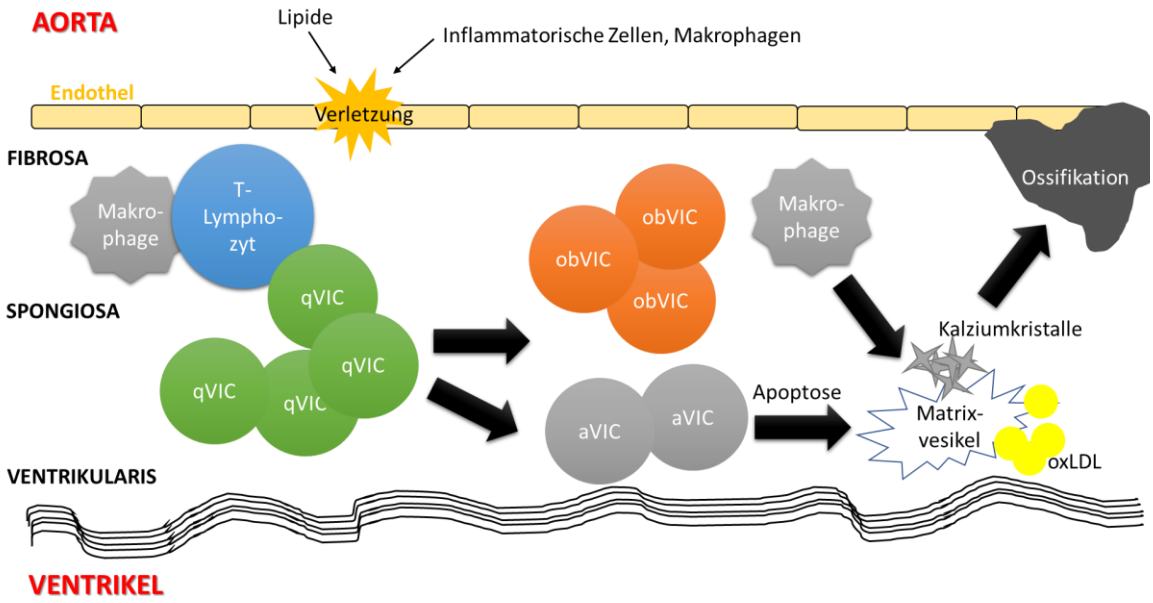


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Pathogenese der degenerativen Aortenklappenerkrankung
Über mechanischen Stress kann es zur Verletzung des Herzklappenendothels und daraufhin zur Einwanderung von Lipiden, inflammatorischen Zellen und Makrophagen kommen. Über die Bildung von oxLDL und inflammatorischen Zytokinen akkumulieren diese Zellen in der Fibrosa. QVICs werden aktiviert und können sich zu aVICs oder obVICs differenzieren. Aus apoptotischen aVICs und abgeschnürten Vesikeln der Makrophagen entstehen Matrixkristalle, die wie oxLDL als Kristallisationskeim für Kalzium dienen können. Hieraus entwickelt sich ossäres Gewebe.

VIC = interstitielle Herzklappenzellen (a=aktiviert, ob=osteoblastisch, q=ruhend); oxLDL=oxidiertes Lipoprotein niederer Dichte

Als Parameter des Knochenstoffwechsels wurden in betroffenem Klappengewebe neoangiogenetische und hämatopoetische Prozesse nachgewiesen [31]. Darüber

hinaus wurden auch Mediatoren, wie das knochenmorphogenetische Protein (Bone Morphogenetic Protein, BMP) und der transformierende Wachstumsfaktor Beta (Transforming Growth Factor Beta, TGFB) entdeckt, die beide mitverantwortlich für die Änderung des Phänotyps der VICs sind [61, 77, 114]. Erkrankte Herzklappen weisen einen erhöhten Spiegel von Endothelwachstumfaktor (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) auf, der wahrscheinlich in Zusammenhang mit der Neoangiogenese im eigentlich avaskulären Klappengewebe steht. Da die Herzklappe normalerweise über Diffusion mit Nährstoffen versorgt wird, ist die Bildung von Gefäßen möglicherweise eine Reaktion auf das verdickte und damit schwerer zugängliche Klappengewebe [79, 91].

1.5 Die bikuspide Aortenklappe

Das Auftreten einer bikuspiden Aortenklappe (Bicuspid Aortic Valve, BAV) ist der häufigste kongenitale Herzfehler und betrifft ein bis zwei Prozent der Allgemeinbevölkerung [40]. Diese Fehlbildung macht 30-50% der Fälle von operierten Aortenklappenstenosen bei Erwachsenen aus [94]. Aufgrund der Anomalie der Klappe kommt es zu anderen Strömungsverhältnissen und Bewegungen beim Öffnen und Schließen, als bei trikuspiden Aortenklappen. Über eine Nachbildung der verschiedenen Klappentypen wurde allerdings gezeigt, dass die Entstehung der Klappenerkrankung bei BAV nur in geringem Maß auf die mechanischen Gegebenheiten zurückzuführen ist. Die Veränderungen auf genetischer Ebene scheinen viel eher ursächlich für die Entwicklung der Stenose zu sein [120]. Morphologische Veränderungen, die zur Stenose oder Insuffizienz der Klappe führen, treten bereits ab der zweiten Lebensdekade und somit deutlich früher als bei trikuspiden Aortenklappen auf. Kalk kann ungefähr ab der vierten Dekade bei betroffenen Patienten nachgewiesen werden [7].

Bei mikroskopischer Betrachtung sind in Bezug auf bikuspide Aortenklappen einige Auffälligkeiten festzustellen: Die drei Schichten der Herzklappen sind nicht so klar abgrenzbar wie bei trikuspiden Aortenklappen. Kollagenanteile und Proteoglykane sind unorganisiert über alle Klappenschichten verteilt und schon in juvenilen BAV vermehrt vorhanden [39]. Auch in stenotischen trikuspiden Aortenklappen wurden vermehrt erhöhte Proteoglykanlevel gefunden [11]. Dies unterstreicht die Rolle dieser Matrixbestandteile für die Pathogenese und stellt eine mögliche Ursache für

den frühen Krankheitsbeginn bei Patienten mit bikuspider Aortenklappe dar. Darüber hinaus ist bei BAVs das Herzklappengewebe insgesamt verdickt und weist eine breite Elastinschicht im Zentrum auf. Die beschriebenen Veränderungen könnten mit einem erhöhten Zellstoffwechsel einhergehen und damit das Remodeling der erkrankten Herzklappe beschleunigen und folglich den Krankheitsprozess voranbringen [1].

Grundsätzlich scheint die Herzklappendegeneration in beiden Klappentypen analog zu verlaufen. Unterschiede in der Expression der immunmodulatorischen Signalwege im Zusammenhang mit IDO sind bislang nicht untersucht worden.

1.6 Vergleichende Betrachtung: Die Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine chronisch inflammatorische Erkrankung des Gefäßsystems. Durch atherosklerotische Veränderungen der Herzkranzgefäße kann als Folge die koronare Herzkrankheit entstehen. Sie macht als Hauptursache 45% aller Todesfälle in Europa aus [121]. Über Endothelverletzungen kommt es zur Bildung atherosklerotischer Plaques, die dann durch die Verengung von Gefäßen oder das Ablösen von Thromben verantwortlich für das Auftreten eines Schlaganfalls oder Myokardinfarkts sein können. Wie für die Aortenklappenstenose angenommen, spielt auch in der Pathogenese der Atherosklerose die Inflammation eine zentrale Rolle. So lassen sich in den lipidreichen Kernen der atherosklerotischen Plaques, die als „fatty streaks“ bezeichnet werden, zahlreiche Zellen des adaptiven Immunsystems wie Makrophagen [102] und T-Zellen finden [45]. Über die Produktion und Sekretion von Zytokinen, Proteasen und pro-thrombotischen Faktoren tragen diese zum Fortschreiten der Erkrankung bei. Ebenso sind regulatorische T-Zellen an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt, da diese eine protektive Rolle einnehmen, indem sie die inflammatorischen Prozesse kontrollieren und somit die Progression der Plaquebildung verlangsamen [2, 62].

Die Atherosklerose ist ein Krankheitsbild, welches sich in vielerlei Hinsicht dazu eignet, Vergleiche mit der Aortenklappenstenose zu ziehen. Zunächst begünstigen klassische Risikofaktoren wie Rauchen, arterielle Hypertonie, erhöhtes Plasmacholesterin, Diabetes mellitus und das männliche Geschlecht die

Entstehung beider Erkrankungen [56, 109]. In der Ätiologie der Krankheitsbilder kommt es initial zu einer Endothelverletzung mit daraus folgender Inflammationsreaktion, Lipideinlagerung, Kalzifizierung und Knochenbildung [56]. Das Auftreten einer Aortenklappensklerose ist zum einen ein Kriterium bei der Diagnostik der Atherosklerose und zum anderen ein Risikofaktor für die Entstehung einer Aortenklappenstenose [80, 87].

Dennoch gibt es auch einige Aspekte, die die beiden Krankheiten unterschieden. So spielen Lipide in Form von Lipidinsudation und Lipidakkumulation bei der Atherosklerose eine zentralere Rolle als bei der Aortenklappensklerose [31, 107]. Glatte Muskelzellen der Gefäße reagieren auf LDL über eine starke Inflammationsreaktion und sind in der Lage das Lipoprotein zu oxidieren, was in dieser Art und Weise bei ruhenden VICs nicht beobachtet wurde. Nur bereits oxidiertes LDL scheint hier in der Lage zu sein eine Inflammationsreaktion auszulösen [91, 96]. Möglicherweise ist dies ein Grund dafür, warum bereits in einigen groß angelegten Studien nachgewiesen wurde, dass Statine, die über das Absenken des Cholesterolspiegels im Blut eine zentrale Rolle in der Therapie der Atherosklerose spielen, kein Sistieren der Progression oder gar eine Regression der Veränderungen an der Aortenklappe bewirken können [16, 21, 95].

Anstatt der Proliferation glatter Muskelzellen und der Akkumulation lipidhaltiger Makrophagen wie bei der Atherosklerose, stehen bei der Aortenklappenerkrankung eher die Mineralisationsvorgänge im Vordergrund [111].

1.7 Mögliche Mediatoren des Krankheitsprozesses der degenerativen Aortenklappenerkrankung

1.7.1 Die Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO)

Das Enzym Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) wird von Makrophagen und dendritischen Zellen [25, 41] gebildet und katalysiert als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym den Abbau der Aminosäure Tryptophan zu Kynurenin. Tryptophan ist eine essenzielle Aminosäure und damit eine wichtige Vorstufe bei der Bildung des Neurotransmitters Serotonin. Sie spielt demnach auch im Hormonstoffwechsel eine wichtige Rolle [14]. IDO wird im Zuge eines Entzündungsprozesses beispielsweise von dem durch T-Helferzellen Typ 1 (TH1-

Zellen) produzierten Zytokin Interferon gamma (IFNG) induziert, was als dessen potentester Induktor gilt [8, 86]. IDO bewirkt über den Abbau von Tryptophan einen Zellzyklusarrest bei T-Zellen, was zu deren Untergang und somit auch zur Suppression der Immunreaktion führt [66]. Darüber hinaus induziert IDO auch die Bildung von T_{reg} aus nativen T-Zellen [24].

Bei den inflammatorischen Prozessen der Atherosklerose wird in hohem Maße IFNG freigesetzt [35]. Es wurde bereits nachgewiesen, dass besonders glatte Muskelzellen der Gefäße unter Stimulation mit IFNG IDO-Boten-RNA (messenger RNA, mRNA) exprimieren [98]. In der „Tampere Vascular Study" [73] wurde daraufhin gezeigt, dass die Regulation der lokalen Tryptophanspiegel durch Änderung der Expression des Enzyms (IDO) eine immunmodulatorische Rolle in atherosklerotisch veränderten Gewebe im Vergleich zu gesunden Blutgefäßen spielt. Yun et al. entdeckten 2016 außerdem, dass in humanen Aorten, die von Atherosklerose betroffen waren, regulatorische T-Zellen gemeinsam mit IDO-exprimierenden dendritischen Zellen auftreten. Hierbei gab es eine positive Korrelation zwischen der Anzahl an dendritischen Zellen und dem Schweregrad der Atherosklerose [126].

Die Indolamin-2,3-dioxygenase besitzt zwei Isoformen: IDO1 und IDO2. Beide Enzyme spielen eine unterschiedliche Rolle in der Immunmodulation und sollten daher getrennt voneinander beurteilt werden [57]. Diese Arbeit bezieht sich lediglich auf das Isoenzym IDO1 und seine Rolle für die Pathogenese der Aortenklappenstenose.

1.7.2 Regulatorische T-Zellen

FOXP3 und der CD28-CTLA4-ICOS-Molekülkomplex

In der „Tampere Vascular Study" [73] wurden verschiedene Hypothesen in Bezug auf die Aktivierung von IDO1 über regulatorische T-Zellen aufgestellt. Die Entwicklung dieser $CD4^+$ $CD25^+$ Zellen wird spezifisch über den Transkriptionsfraktor „Forkhead Box Protein P3" (FOXP3) eingeleitet, der auch als molekularer Marker der Zellen gilt [28]. Außerdem gibt es Hinweise auf eine positive Rückkopplungsschleife, die über die IDO1-abhängige Tryptophandegradation zur Rekrutierung weiterer regulatorischer T-Zellen führt [24].

Eine Möglichkeit der Zellinteraktion bezieht sich auf die Informationsübertragung über den Molekülkomplex des „Cluster of Differentiation 28“ (CD28), dem zytotoxischen T-Lymphozyten-assoziierten Protein 4 (CTLA4) und dem induzierbaren T-Zell-Kostimulator (ICOS) auf der Oberfläche der T_{reg} mit CD80/CD86 auf IDO-exprimierenden dendritischen Zellen [67]. Hierbei wurde bereits nachgewiesen, dass CD28 stimulierend auf T-Zellen wirkt. CTLA4 steigert dagegen den Tryptophankatabolismus über die Induktion von IDO [23] und inhibiert dadurch die T-Zell-Antwort [52]. ICOS hat keinen direkten Kontakt zu CD80/CD86 [125]. ICOS weist strukturelle Ähnlichkeiten zu CD28 auf und bindet an ICOS-Ligand (ICOSL) auf antigenpräsentierenden Zellen (APC). Vermutlich wird über das Molekül noch ein zusätzliches, von CD28 unabhängiges, Überlebenssignal an die T-Zellen vermittelt [115].

TGFB1 und Interleukin 10 (IL10)

Die Zytokine IL10 und TGFB1 werden unter anderem von regulatorischen T-Zellen sezerniert und sind für deren immunsuppressive und antiinflammatorische Wirkung verantwortlich. IL10 wirkt direkt auf T-Zellen und ist in der Lage den CD28-kostimulatorischen Stoffwechselweg herunter zu regulieren und so die Aktivierung von TH1-Zellen zu inhibieren [46]. Auf diese Weise können T_{reg}-Zellen die Bildung atherosklerotischer Läsionen verlangsamen. Für IL10, TGFB1 und FOXP3 wurde eine Kolokalisation in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen [38].

Der Wachstumsfaktor TGFB1 ist in kalzifizierten Aortenklappen existent. Möglicherweise triggert er hier die Apoptose der VICs und hat so Einfluss auf die strukturelle Veränderung und die Apoptose-assoziierte Mineralisierung der Klappe [44]. Außerdem ist TGFB1 ein wichtiger Aktivator der VICs, da er in der Lage ist, deren Differenzierung in Myofibroblasten zu induzieren und damit die Stoffwechselaktivität, das Remodeling des Klappengewebes und die kalzifizierenden Vorgänge über die obVICs zu steigern [60, 116]. TGFB1 kann außerdem über die Induktion von FOXP3 die Bildung regulatorischer T-Zellen induzieren [17]. Pallotta et al. fanden 2011 einen weiteren Effekt von TGFB1 auf das Enzym IDO1 heraus [81]: Die Behandlung von dendritischen Zellen mit TGFB1 führte zu einer langanhaltenden Wirkung auf die IDO1-Expression. Dadurch kommt es zu einer längerfristig anhaltenden immunsuppressiven Wirkung des Enzyms,

was ein weiterer Teil des kontrollierten Systems der Immunhomöostase ist und damit eine wichtige Rolle bei der Selbsttoleranz unseres Immunsystems spielen könnte.

1.7.3 CD4 und IFNG: Marker der TH1-Zellen

Die Atherosklerose ist primär durch den inflammatorischen TH1-Stoffwechselweg gekennzeichnet [30]. Aktivierte $CD4^+$ TH1-Zellen sind in der Lage IFNG zu sezernieren. Dieses Zytokin gilt als potenter Induktor des Enzyms IDO1 [124], welches möglicherweise dann in Form einer negativen Rückkopplungsschleife wiederum die Bildung von TH1-Zellen supprimiert [73].

1.7.4 CD80, CD86 und CD74: Marker antigenpräsentierender Zellen

Eine weitere, von Niinisalo et al. postulierte, Möglichkeit der Signalübertragung zur IDO1-Induktion betrifft die Interaktion von antigenpräsentierenden Zellen über das Molekül CD74 als Teil des Haupthistokompatibilitätskomplexes II (MHCII) mit dem T-Zell-Rezeptor auf TH1-Zellen. Eine Aktivierung von CD74 wirkt außerdem auf die Signalübertragung über den CD80/CD86-Molekülkomplex und kann so die IDO1-Aktivierung verstärken [73].

1.7.5 Die Rolle von Matrixenzymen und Glykoproteinen

Enzyme wie MMPs werden von Makrophagen und Lymphozyten, aber auch Fibroblasten und VICs, exprimiert [48, 49]. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei Umbauprozessen in verschiedenen Geweben und auch bei den Veränderungen, die sich infolge einer Inflammationsreaktion in erkrankten Aortenklappen abspielen [27, 48]. Es wurde bereits nachgewiesen, dass die MMPs 1, 2, 3, und 9 bei einer Aortenklappenstenose vermehrt exprimiert werden [22]. In einer Studie von Bossé et al. wurde MMP12 sogar als das am höchsten hochregulierte Gen bei der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung identifiziert [11].

Osteopontin (SPP1) ist ein Knochenmatrixprotein, das eine regulatorische Funktion beim Knochenremodeling zeigt. Es ist in der Lage kalzifizierende Prozesse zu inhibieren und wurde bereits in humanen verkalkten Aortenklappen in Zusammenhang mit der Akkumulation von Makrophagen nachgewiesen [75]. Eine erhöhte Expression des Osteopontingens wurde von Grau et al. schon im Stadium

der Aortenklappensklerose, unabhängig von dem Vorhandensein von Kalkablagerungen, nachgewiesen [33]. Eine mögliche Erklärung für die erhöhten Expressionslevel von Osteopontin im erkrankten Gewebe wäre, dass das Protein einen kompensatorischen Mechanismus darstellt, um die Mineralisierungsvorgänge zu stoppen [88].

Tenascin C (TNC) wurde ebenfalls in stenotischen humanen Aortenklappen entdeckt [100]. Es ist ein extrazelluläres Matrixglykoprotein und spielt eine Rolle bei physiologischen Mineralisierungsprozessen. TNC ist oft mit MMPs koexprimiert. Die Akkumulation von MMP2 und TNC ist mit einer Progression der Aortenklappenstenose assoziiert [43].

1.8 Ziele der vorliegenden Arbeit

Das Primärziel dieser Arbeit war der Nachweis eines Unterschiedes in der Genexpression von IDO1 in degenerierten, kalzifizierten Herzklappen im Vergleich zu insuffizienten, nicht kalzifizierten Herzklappen. Als Sekundärziel wurde außerdem untersucht, ob sich die Expression weiterer Zielgene des von Niinisalo et al. [73] beschriebenen Signaltransduktionsweges zwischen den beiden biologischen Gruppen unterscheidet. Es war darüber hinaus Ziel der Arbeit, zu zeigen, dass der makroskopisch sichtbare Unterschied zwischen den Herzklappengruppen schon auf der Ebene der Genexpression von MMPs, TNC und Osteopontin als Hinweis auf einen Gewebeumbau deutlich wird. Die genannten Marker sollten außerdem noch auf Expressionsunterschiede im Hinblick auf bikuspide und trikuspide Herzklappen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

Die durchgeführte Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Ulm unter dem Aktenzeichen 25/16 genehmigt. Das notwendige Material für die Expressionsanalysen über eine Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) wurde aus explantierten humanen Aortenklappen gewonnen, die zuvor in einem Operationssaal der Herz- Thorax- und Gefäßchirurgie der Universität Ulm entnommen worden waren. Patienten, die in die Analysen eingeschlossen wurden, gehörten drei unterschiedlichen Gruppen an: Zu Gruppe A zählten Patienten, die sich aufgrund einer erworbenen Aortenklappenstenose einem elektiven Aortenklappenersatz unterzogen hatten. Gruppe B1 beinhaltete ebenfalls elektive Operationen, die aufgrund einer erworbenen Aortenklappeninsuffizienz oder einem kombinierten Aortenklappenvitium durchgeführt worden waren. Die Insuffizienz stellte hierbei stets das führende Krankheitsbild dar. In die Gruppe B2 zählten Patienten, deren Aortenklappenersatz im Rahmen einer notfallmäßigen Behandlung einer Typ-A-Aortendissektion erfolgte.

Ausgeschlossen wurden Patienten unter 18 oder über 85 Jahren, Personen mit bekannten Infektionskrankheiten, wie Hepatitis C, HIV oder Endokarditis und Patienten, die nicht in der Lage waren, der Studienteilnahme zuzustimmen.

2.2 Gewinnung der Proben

Tabelle 2: Materialliste Probengewinnung

RNAlater®	MKBT6990V	Sigma-Aldrich
Gefrierschrank -80°C, Sanyo MDF 47-U7	MD7-U76V	Sanyo
RNase Zap™	R2020	Sigma-Aldrich
Reaktionsgefäße, Biopur® Safe-Lock	211-2160	Eppendorf

Bei Patienten, die den Gruppen A und B zugeordnet worden waren, handelte es sich um elektiv geplante Eingriffe. Zusammen mit der Aufklärung über die eigentliche Operation wurde den betreffenden Patienten eine Information über die wissenschaftliche Weiterverarbeitung des entnommenen Materials, sowie eine Einverständniserklärung ausgehändigt. Nur bei Vorliegen einer unterschriebenen

Erklärung wurden die jeweiligen Patienten in das Forschungsprojekt miteinbezogen. Bei Patienten der Gruppe B trat außerdem der Sonderfall auf, dass oft erst intraoperativ entschieden werden konnte, ob die insuffiziente Aortenklappe tatsächlich entfernt werden musste oder ob es möglich war, diese zu rekonstruieren. Trotz erfolgter Aufklärung über eine Materialentnahme, wurde ausschließlich bei medizinischer Indikation eine Explantation und eine Analyse des Aortenklappenmaterials vorgenommen.

Während der Operation wurden die explantierten Herzklappen in 5 ml-Röhrchen mit RNAlater® überführt, um die Degradation der RNA bis zur Analyse zu verhindern [34]. Bei Notfalleingriffen der Gruppe B2 erfolgte die nachträgliche Aufklärung und schriftliche Einverständniserklärung, sobald der Patient im postoperativen Verlauf ansprechbar und zu einer informierten Willensentscheidung in der Lage war. Sobald eine unterschriebene Einwilligung des Patienten vorlag, wurde die entnommene Aortenklappe vom Operationssaal ins Labor gebracht. Dort konnte diese registriert und gewogen werden. Die Einteilung der Herzklappen in die biologischen Gruppen „Verkalkt“ und „Insuffizient“ erfolgte anhand der Operationsindikation. Da es auch Patienten gab, die aufgrund eines kombinierten Aortenklappenvitiums operiert worden waren, wurden die explantierten Klappen bei Ankunft im Labor noch einmal visuell auf Kalk oder Verdickungen überprüft. Waren keine Auffälligkeiten sichtbar, wurde die Herzklappe als „Insuffizient“ klassifiziert. Der Zustand der Herzklappen wurde per Fotodokumentation festgehalten. Außerdem wurde in Einklang mit dem Operationsbericht unterschieden, ob es sich um eine funktionell bikuspide oder trikuspide Aortenklappe handelte. Die Probe wurde nach der Beurteilung wieder in RNAlater® überführt und dann bei 4°C für mindestens 24 Stunden gekühlt. Im Anschluss wurde sie bei -80°C in einem nukleasefreien Eppendorfgefäß in RNAlater® gelagert. Innerhalb von höchstenfalls sechs Wochen wurden die Proben dann wieder aufgetaut und weiterverarbeitet.

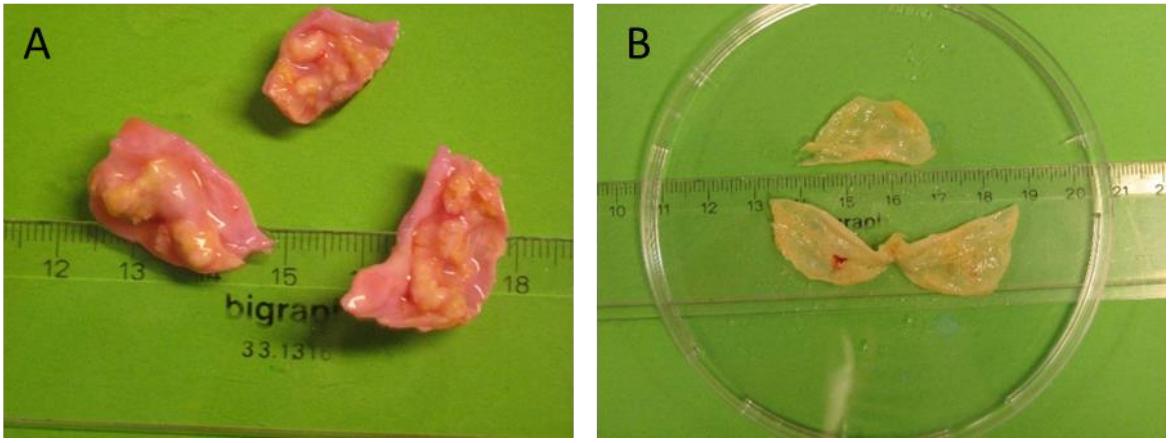


Abbildung 2: Beispielbilder der verwendeten Herzklappen für die Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017

(A) stark verkalkte Aortenklappenflügel einer stenotischen Herzklappe; (B) zarte Aortenklappenflügel einer insuffizienten Herzklappe

2.3 Aufrechterhalten von RNase-freien Versuchsbedingungen

Während der Arbeit mit der empfindlichen RNA wurde stets darauf geachtet, mögliche Kontaminationsquellen mit Nukleasen (Nukleinsäure-abbauende Enzyme) zu eliminieren. Oberflächen am Arbeitsplatz und Handschuhe wurden regelmäßig mit RNase Zap™ behandelt. Die verwendeten Gefäße und Pipetten, sowie das destillierte Wasser, welche für die Versuche benötigt wurden, waren nukleasefrei. Hierdurch sollte gewährleistet werden, dass die Integrität der gewonnenen RNA und somit später auch die der komplementären Desoxyribonukleinsäure (cDNA) so gut wie möglich gewahrt wird.

2.4 Verarbeitung des Klappenmaterials und Homogenisierung

Tabelle 3: Materialliste Homogenisierung

Rotor-Stator-Homogenisator (120 V, 60 Hz)	9001271	Qiagen
Rotor-Stator-Homogenisator Einwegsonden	990890	Qiagen
RNase Zap™	R2020	Sigma
UltraPure™ destilliertes Wasser, DNase/RNase-frei	10977-035	invitrogen™ by life technologies
TRI Reagent®	T9424	Sigma
Falcon™-Röhrchen	352052	Omnilab
Hochgeschwindigkeits-Kühlzentrifuge	Z32HK	Hermle Labortechnik
Reaktionsgefäße, Biopur® Safe-Lock	211-2160	Eppendorf
Filterspitzen verschieden Größen, nukleasefrei		Eppendorf
Chloroform	22711.290	VWR, Darmstadt

Die jeweilige Probe wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und mit einem Skalpell zerkleinert. Davon wurden jeweils 40 mg in drei nukleasefreie Reagenzröhrchen verteilt. Anhand eines bereits vorbereiteten Protokolls [15] wurde der Gewebeaufschluss mit einem Rotor-Stator-Homogenisator in Trizol (TRI Reagent®) durchgeführt. Nach Zentrifugation wurde die flüssige Phase abpipettiert und das Pellet verworfen. Nun wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und erneut zentrifugiert. Es entstand eine Auftrennung in drei Phasen. Die wässrige obere Phase enthielt die RNA, die mittlere Phase die DNA und in der untersten Phase befanden sich die Proteine.

2.5 Aufreinigung der RNA

Tabelle 4: Materialliste Aufreinigung RNA

Ethanol > 99,8% 2,5 l	32205	Sigma-Aldrich
Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit	7326830	Bio-Rad
Hochgeschwindigkeits-Kühlzentrifuge	Z32HK	Hermle Labortechnik
UltraPure™ destilliertes Wasser, DNase/RNase-frei	10977-035	invitrogen™ by life technologies

Die Extraktion der RNA aus der wässrigen Phase erfolgte über ein bearbeitetes Protokoll des „Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit“ [15]. Hierbei wurden für die Ausfällung der RNA aus der wässrigen Phase 600 µl 70% Ethanol verwendet. Zusammen mit dem Ethanol wurde das Material aus allen drei Homogenisaten auf eine Minisäule des Kits mit ausreichender Bindungskapazität überführt. Über verschiedene Waschschritte wurde die RNA von Kontaminationen,

wie genomischer DNA, befreit. Aus diesem Grund wurde auch ein DNase-I-Verdau durchgeführt, sodass in der Eluationslösung am Ende keine genomische DNA (gDNA), sondern nur noch RNA vorhanden sein sollte.

2.6 Beurteilung der RNA

2.6.1 Konzentrationsbestimmung und Reinheit der RNA

Tabelle 5: Materialliste NanoDrop

Aurum™ Total RNA Elution Solution	7326801	Bio Rad
UltraPure™ destilliertes Wasser, DNase/RNase-frei	10977-035	invitrogen™ by life technologies
NanoDrop 2000c Spektrophotometer	ND2000c	Peqlab Biotechnologie GmbH

Über das NanoDrop 2000c Spektrophotometer wurde die Konzentration und die Reinheit der RNA bestimmt. Dies erfolgte über die Messung der optischen Dichte bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Der Quotient der beiden Wellenlängen sollte ungefähr zwei betragen, um die Linearität von Absorption und RNA-Konzentration zu gewährleisten. Bei einem Verhältnis kleiner als zwei ist von einer Kontamination, zum Beispiel mit Phenol, das im TRI Reagent® enthalten ist, auszugehen. Die Konzentration der RNA wird unter Anwendung des Lambert-Beer'schen-Gesetzes über den Absorptionskoeffizienten bei 260 nm, den Extinktionskoeffizienten und die Länge des Weges, den die Strahlung zurücklegt, bestimmt [112]. Proben, deren RNA-Konzentration so gering war, dass für die weiterführenden Versuche weniger als 400 ng RNA zur Verfügung standen, mussten aus der Studie ausgeschlossen werden.

Um das Spektrophotometer zu reinigen, wurden vor dem Auftragen der Proben jeweils 2 µl nukleasefreies Wasser auf den Sensor gegeben und im Anschluss abgewischt. Eine Leerprobe bestand aus dem Eluationspuffer des „Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit", von der 1,2 µl auf die Messfläche aufgetragen wurden. Nach dem Abwischen des Puffers wurden nun ebenfalls 1,2 µl der RNA-Probe auf den Sensor gegeben und daraufhin die Konzentration bestimmt.

2.6.2 Qualitätskontrolle der RNA

Tabelle 6: Materialliste BioAnalyzer

Agilent 2100 BioAnalyzer G2938A	G2938A	Agilent Technologies
Agilent RNA 6000 Nano Kit	5067-1511	Agilent Technologies
RNA Nano Chips	5067-1511	Agilent Technologies
Eppendorf® Mastercycler Personal	Z316091	Sigma
Hochgeschwindigkeits-Kühlzentrifuge	Z32HK	Hermle Labortechnik
Thermomixer comfort		Eppendorf

Um die Qualität der extrahierten RNA beurteilen zu können, wurde mit Hilfe des Agilent 2100 BioAnalyzer über eine Kapillarelektrophorese die RNA-Integritätszahl (RNA Integrity Number, RIN) der RNA-Proben bestimmt. Der Agilent 2100 BioAnalyzer trennt die RNA in ihre Einzelbestandteile auf und bewertet sie anhand ihres Degradationsgrades. Die RIN wird auf Werte zwischen eins und zehn skaliert und kann so mit anderen Proben verglichen werden. Je größer die Zahl, desto weniger wurde die RNA degradiert. Ist die RIN bei zehn, kann die RNA als nahezu intakt bezeichnet werden [65].

Zunächst wurden 550 µl der RNA 6000 Nano Gel Matrix (Elektrophoresegel) in einen Spinfilter gegeben und bei 1500 x g und Raumtemperatur 10 Minuten zentrifugiert. 65 µl des filtrierten Gels wurden daraufhin in ein 0,5 ml RNase-freies Eppendorfgefäß pipettiert. Nun wurde das Farbstoff-Konzentrat, welches zur Detektion der Nukleinsäuren dient, mit dem Vortexer gemischt, anzentrifugiert und anschließend 1 µl davon zu dem filtrierten Gel gegeben. Dieses wurde nun bei Raumtemperatur und 13000 x g erneut 10 Minuten zentrifugiert. Je 4 µl der RNA-Proben wurden in 200 µl RNase-freie Eppendorfgefäße überführt und bei 70°C zwei Minuten auf dem Heizblock denaturiert. Danach wurden die Proben auf Eis gestellt. Nun wurde ein RNA-Nanochip in die Stellung C der Priming-Station eingelegt. 9 µl des Gel-Farbstoff-Mixes wurden in die mit dem schwarz umkreisten „G“ bezeichnete Kammer überführt. Hierbei war darauf zu achten, dass eventuell entstehende Luftblasen entfernt wurden. Nachdem der Kolben der Spritze auf 1 ml eingestellt worden war, konnte die Priming-Station geschlossen werden. Der Kolben wurde anschließend bis zum Einrasten heruntergedrückt und dann nach 30 Sekunden wieder vom Clip gelöst. Dadurch wurde der Kolben zurück nach oben gedrückt und die Priming-Station konnte nach weiteren 5 Sekunden wieder geöffnet werden. In

die anderen mit „G“ bezeichneten Kammern wurden nun ebenfalls 9 µl des Gel-Farbstoff-Mixes gegeben. Nun wurden in alle 12 Kammern des Chips, sowie in die Kammer mit dem Leiter-Symbol, 5 µl des Nanomarkers pipettiert. Daraufhin wurde in alle Kammern mit Nanomarker 1 µl der jeweiligen hitzedenaturierten RNA-Probe gegeben. In die Kammer mit dem Leitersymbol wurde 1 µl der RNA-Leiter hinzugegeben. Hierbei handelt es sich um RNA-Stränge verschiedener Länge, die der Größenkalibration dienen. Der Inhalt der Kammern des Nano-Chips wurde nun auf einem Rüttler bei 1400 Umdrehungen pro Minute 60 Sekunden lang gemischt und anschließend für die Messung in den BioAnalyzer eingesetzt.

2.7 Reverse Transkription

Im Versuchsschritt der Reversen Transkription (RT) wurde mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase die RNA zu cDNA, umgeschrieben. Diese wurde dann über die qPCR vervielfältig.

Tabelle 7: Materialliste Reverse Transkription

iScript™ cDNA Synthesis Kit	1708891	Bio-Rad
UltraPure™ destilliertes Wasser, DNase/RNase-frei	10977-035	invitrogen™ by life technologies
TE-Puffer		Eigene Herstellung
Mastercycler Gradient		Eppendorf
Labortiefkühlschrank Mediline Lgex 3410		Liebherr

Nachdem der 5X iScript Reaction Mix und die iScript Reverse Transkriptase aufgetaut, gemischt und kurz anzentrifugiert worden waren, wurde das folgende Gemisch pipettiert:

5X iScript Reaction Mix	4 µl
iScript Reverse Transkriptase	1 µl
Nuklease-freies Wasser	x µl
RNA-Matrize (400 ng)	x µl

Das Verhältnis von Nuklease-freiem Wasser und RNA-Matrize wurde je nach Konzentration der extrahierten RNA angepasst, sodass für jeden Ansatz insgesamt 400 ng RNA in die Reverse Transkription eingesetzt wurden. Für jede RNA-Probe wurde diese Mischung vier Mal erstellt: Drei Ansätze wurden als analytische

Replikate eingesetzt. Der vierte Versuchsansatz, die -RT-Kontrolle, enthielt anstatt des Enzyms Reverse Transkriptase lediglich TE-Puffer. Dies ist eine Pufferlösung zur Lagerung von DNA oder RNA, die zuvor mit Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Tris-Base); und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) hergestellt worden war. Über die -RT-Kontrolle kann die RNA auf Kontamination durch gDNA getestet werden. Fände sich in diesem Kontrollansatz eine messbare Amplifikation, wäre dies vereinbar mit dem Vorhandensein von gDNA, da durch die Abwesenheit der Reversen Transkriptase keine cDNA in der Probe synthetisiert worden sein kann. Einige der verwendeten Primer überbrücken eine Exon-Exon-Grenze. Sie sind laut der Artikelbeschreibung der Firma lifetechnologies™ nicht in der Lage, gDNA zu binden, da diese noch nicht gespleißt wurde und somit Introns zwischen den einzelnen Exons enthält. Bei diesen Primern wurde auf die -RT-Kontrolle verzichtet. Nachdem die Ansätze gut gemischt worden waren, wurden diese in den Mastercycler überführt (25°C 5 Minuten, 42°C 30 Minuten, 85°C 5 Minuten, Halten der Temperatur bei 4 °C). Danach wurden diese entweder auf Eis gestellt und dann weiterverarbeitet oder bei -20 °C eingefroren werden.

2.8 Der Aufbau eines TaqMan Assays (Hydrolysesonde)

Für die Präamplifikation und die qPCR wurden die von Lee et al. [54] im Jahr 1993 entwickelten Hydrolysesonden eingesetzt. Die Sonden bestehen aus einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff (FAM) am 5‘-Ende und einem nichtfluoreszierenden Quencherfarbstoff am 3‘-Ende. Im Verlauf der qPCR bindet die Sonde komplementär an einen Abschnitt der cDNA zwischen dem Vorwärts- und dem Rückwärtsprimer (Abbildung 3A). Durch die Nähe des Quencherfarbstoffs zum Reporterfarbstoff wird dessen Fluoreszenz durch einen Fluoreszenz-Energietransfer [29] zunächst unterdrückt. Die DNA-Polymerase trennt mit ihrer 5‘-3‘-Exonukleaseaktivität die hybridisierte Sonde vom cDNA-Strang ab. Dadurch wird die Sonde hydrolysiert und Reporter- und Quencherfarbstoff entfernen sich voneinander. Die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes steigt an und kann dann quantifiziert werden (Abbildung 3B) [5].

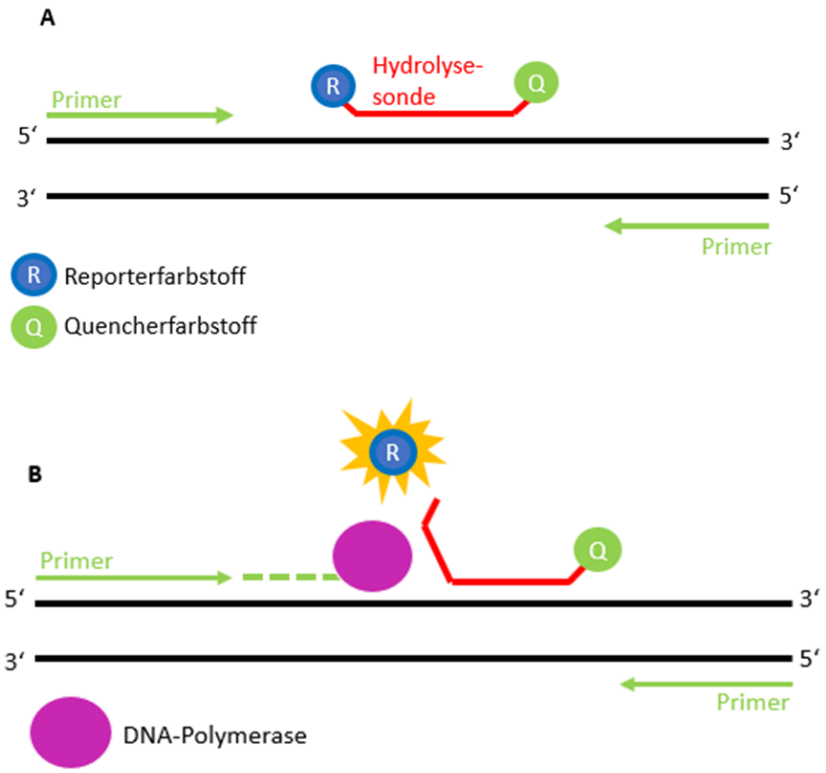


Abbildung 3: Funktionsweise der Hydrolysesonden

Die Sonde bindet an den zu replizierenden cDNA-Strang (schwarz) (A). Die DNA-Polymerase trennt Reporter- und Quencherfarbstoff voneinander. Die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes kann detektiert werden. (B)

Die bei den Versuchen verwendeten TaqMan Assays der Firma lifetechnologies™ durchlaufen verschiedene Stadien der Qualitätskontrolle. Zunächst werden die geeigneten Transkripte aus Gendatenbanken herausgesucht und danach auf Wiederholungen, Polymorphismen einzelner Nukleotide oder Diskrepanzen überprüft. Die Exon-Exon-Grenzen werden markiert, sodass diese möglichst von der Primersonde miteinbezogen werden können. Aus diesem Wissen heraus werden die Assays entworfen und danach noch einmal über ein spezielles Programm im Hinblick auf die Sekundärstruktur, die optimale Amplikonlänge und eventuell vorhandene Primer-Dimer-Bildung beurteilt [53]. In der vorliegenden Arbeit wurde auf die Messung der qPCR-Effizienzen verzichtet, da die Firma lifetechnologies™ für alle TaqMan-Genexpressions-Assays eine Amplifikationseffizienz von 100% garantiert. Dann lässt sich sagen, dass pro Amplifikationszyklus eine Verdopplung der zu amplifizierenden cDNA erreicht werden kann [4]. Wenn sich demzufolge der Schwellenzyklus (C_T)-Wert, der als Maß für die Amplifikation dient, von einer ersten Probe zu einer zweiten um eine

Einheit vergrößert, so bedeutet dies bei einer Reaktionseffizienz von 100%, dass nur die Hälfte der mRNA-Menge der ersten Probe in der der zweiten Probe vorhanden ist.

2.9 Präamplifikation

Tabelle 8: Materialliste Präamplifikation

TaqMan PreAmp MasterMix Kit	4384276	Applied Biosystems™
Verschiedene TaqMan-Genexpressions-Assays (detaillierte Liste siehe Anhang)	**Referenzgene:** RPL13A, RPS18, GAPDH **Regulatorische T-Zellen:** FOXP3, CD28, CTLA4, ICOS **Antigenpräsentierende Zellen:** CD80, CD86, CD74, IDO1 **TH_1-Zellen:** IFNG, CD4 **Matrixenzyme und -glykoproteine:** TNC, SPP1, MMP-1,-2,-3,-9	Applied Biosystems™
UltraPure™ destilliertes Wasser, DNase/RNase-frei	10977-035	invitrogen™ by life technologies

Eine Auflistung aller verwendeten Primerassays, sowie Details zu den Assays und deren Eintragsnummern in den Gendatenbanken „RefSeq“ und „GenBank“ finden sich im Anhang an diese Arbeit.

Mithilfe von zehn bis 14 Amplifikationszyklen, die der eigentlichen PCR vorausgehen, kann die Präamplifikation eine 1000 bis 16000-fache Vervielfältigung der Zielgene erreichen. Diese werden wiederum verdünnt und dann in die eigentliche qPCR-Reaktion eingesetzt. Auf diese Weise ist es möglich, auch mit einer sehr geringen Menge an verfügbarer cDNA aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Zunächst wurde eine Mischung aus den entsprechenden Primerassays hergestellt. Um die 20-fach konzentrierten Primer auf eine Konzentration von 0,2 zu verdünnen, wurden 2 µl jedes Assays pipettiert und mit TE-Puffer auf 200 µl aufgefüllt. Nun wurde der Präamplifikationsmix hergestellt. In diesem

Versuchsschritt wurden die vier Ansätze pro Aortenklappe aus der RT übernommen und das folgende Gemisch viermal pipettiert:

TaqMan Preamplification Master Mix 2X	10 µl
Pooled Assay Mix 0,2X	12,5 µl
cDNA aus RT	12,5 µl

Im Originalprotokoll werden 25 µl des Master Mixes pro Ansatz eingesetzt. Da bei diesen Versuchen lediglich 10 µl pipettiert wurden, betrug das Reaktionsvolumen nur 35 µl anstelle von 50 µl wie im Originalprotokoll des Herstellers. Das Gemisch wurde nun im Mastercycler amplifiziert. Hierzu wurden die Proben zunächst zehn Minuten auf 95°C erhitzt und dann in zehn Zyklen jeweils 15 Sekunden bei 95°C und vier Minuten bei 60°C inkubiert. Danach wurde die präamplifizierte cDNA sofort auf Eis überführt und es konnte die qPCR folgen.

2.10 Erläuterung qPCR

Die Echtzeit-PCR (qPCR) lässt einen quantitativen Nachweis vorhandener mRNA zu. Hierbei wurde auf die Methode der relativen Quantifizierung zurückgegriffen, bei der die verschiedenen Zielgene entweder auf ein sogenanntes Referenzgen, oder aber auf verschiedene Referenzgene zusammen normalisiert werden [85]. Auf diese Weise ist ein Experiment weniger fehleranfällig, da vorhandene Fehler und Störgrößen sich sowohl auf Zielgen als auch auf Referenzgen beziehen. Werden diese beiden dann ins Verhältnis gesetzt, wird die Unstimmigkeit herausgerechnet. Um die am besten geeigneten Referenzgene zu ermitteln, wurde mit Hilfe der ExpressionSuite Software v1.1 der M-Wert berechnet. Dieser Wert beschreibt die durchschnittliche Variation zweier Referenzgene im Vergleich zu allen anderen ausgewählten Referenzgenen. Je geringer der Wert ist, desto stabiler ist die Expression der Gene über die verschiedenen Versuche hinweg [113]. Als zu vergleichende Größe wird bei einer qPCR der C_T–Wert angegeben. Er stellt ein Maß für die Anzahl der Amplifikationszyklen dar, nach welchen eine Fluoreszenz über einem vorher definierten Schwellenwert detektiert wurde. Diejenigen Proben, bei denen in der qPCR Amplifikationen für die Referenzgene erst bei >35 C_T oder gar nicht auftraten, mussten aus der Studie ausgeschlossen werden.

Um die Details der Durchführung von qPCR-Experimenten reproduzierbar zu machen und deren Qualität beurteilen zu können, wurden von Bustin et al. 2009 diesbezüglich Leitlinien veröffentlicht [13]. In dieser Studie wurde darauf geachtet, alle Kontrollversuche bestmöglich durchzuführen und die Details zu den Experimenten gemäß der publizierten Prüfliste schriftlich festzuhalten.

2.11 Ablauf qPCR

Tabelle 9: Materialliste qPCR

TaqMan Gene Expression MasterMix 2X	4369016	Applied Biosystems™
TE-Puffer		Eigene Herstellung
Verschiedene TaqMan-Genexpressions-Assays (detaillierte Liste siehe Anhang)		Applied Biosystems™
UltraPure™ destilliertes Wasser, DNase/RNase-frei	10977-035	invitrogen™ by life technologies™
MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (0,1ml)	4346907	Applied biosystems® by lifetechnologies™
Selbsthaftende Abdeckfolien	4360954	Applied biosystems® by lifetechnologies™
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	437660	Applied Biosystems™

Zunächst wurden der MasterMix und die präamplifizierte cDNA gut gemischt und anzentrifugiert. Das Präamplifikationsprodukt wurde nun anstelle von 1:5, wie im Originalprotokoll von Applied Biosystems™ angegeben, im Verhältnis 1:6,71 mit TE-Pufferlösung verdünnt. Dazu wurden die 35 µl des Präamplifikates und 200 µl des Puffers verwendet. Nun konnte in jede Kammer der 96-Well-Platte das folgende Gemisch pipettiert werden:

TaqMan Gene Expression MasterMix 2X	10 µl
TaqMan Gene Expression Assay 20X	1 µl
Präamplifiziertes cDNA Produkt 1:671	5 µl
Nukleasefreies Wasser	4 µl

Auf einer Platte fanden die Proben von genau einer Aortenklappe Platz. Es wurden jeweils die drei Replikate aus RT und Präamplifikation, sowie eine Negativkontrolle (no template control, NTC), die mit Ausnahme der cDNA ebenso alle Reaktionskomponenten enthielt, pipettiert. Sollte es bei der NTC zu einer

Amplifikation kommen, wäre dies ein Hinweis auf eine Kontamination der 96-Well-Platte oder der Reagenzien. Auf diese Weise wurden alle 21 Referenz- und Zielgene behandelt und auf eine Platte pipettiert. Während des Pipettierens musste darauf geachtet werden, dass die einzelnen Kammern der Platte gut durch hinauf- und herunterpipettieren durchmischt wurden. Nachdem die Platte mit Abdeckfolie abgeklebt worden war, wurde diese eine Minute auf eine Rüttelplatte gestellt und anzentrifugiert. Anschließend wurde die qPCR gestartet: Zunächst erhitzte der StepOne Plus™-qPCR-Cycler die Proben auf 50°C für zwei Minuten, dann auf 95°C für weitere zehn Minuten. Anschließend erfolgten 40 Zyklen, in denen zunächst 15 Sekunden auf 95 °C erhitzt wurde und daraufhin noch eine Minute bei 60 °C inkubiert wurde.

2.12 Kontrollen

2.12.1 -RT-Kontrolle

Um die Konsequenz von positiven -RT-Kontrollen zu quantifizieren, wurde die Differenz (ΔC_T) zwischen den gemessenen C_T-Werten der jeweiligen Targets und der dazugehörigen -RT-Kontrolle gebildet. Der Expressionsunterschied in Prozent macht deutlich, welcher Anteil der gemessenen Amplifikation der cDNA auf eine Kontamination durch gDNA zurückzuführen ist.

2.12.2 Gleichförmigkeit der Präamplifikation

Um zu überprüfen, ob sich alle verwendeten Assays während der Präamplifikation gleich verhalten, wurde die Amplifikation bei einer Probe mit und ohne präamplifizierte cDNA verglichen, indem die $\Delta\Delta C_T$-Werte für jedes Zielgen bestimmt wurden. Zu Beginn wurde aus den Triplikaten der jeweilige Durchschnitts-C_T-Wert bestimmt. Die Auswertung erfolgte dann in drei Rechenschritten. Zunächst wurde der ΔC_T-Wert der cDNA berechnet, indem die Durchschnitts-C_T-Werte der Referenzgene von denen der Zielgene abgezogen wurden:

$$C_{T\,(cDNA)} = C_{T\,(Zielgen\ X)} - C_{T\,(Referenzgen)}.$$

Ebenso wurde mit den C_T-Werten aus der Präamplifikation verfahren:

$$\Delta C_{T\,(Präamp)} = C_{T\,(Zielgen\ X)} - C_{T\,(Referenzgen)}.$$

Im Anschluss wurde der $\Delta\Delta C_T$ von präamplifizierter und nicht präamplifizierter cDNA berechnet:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\ (Präamp)} - \Delta C_{T\ (cDNA)}.$$

Um die Gleichförmigkeit der Präamplifikationsreaktion zu gewährleisten, sollten die $\Delta\Delta C_T$Werte möglichst gegen Null gehen [6].

2.12.3 Dynamischer Bereich der Reversen Transkription

Um die Effizienz der RT zu beurteilen, wurden Verdünnungsreihen von Proben mit bekannten RNA-Mengen angefertigt. Es wurden für einige Ziel- und Referenzgene die C_TWerte für die unverdünnte Menge, sowie für die 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16-Verdünnung bestimmt und dann in Abhängigkeit von der Menge der RNA in einem Graphen aufgetragen. Referenzgene und Zielgene sollten sich in dem Bereich der verwendeten RNA-Menge linear verhalten. Auf diese Weise kann gewährleistet werden, dass für die entsprechende Menge an RNA keine RT-Inhibition vorliegt und diese für den verwendeten Reaktionsansatz adäquat ist.

2.13 Histologie

2.13.1 Präparation der histologischen Schnitte

Tabelle 10: Materialliste Histologie

Biopsie- und Einbettkassetten, Histosette® II, M486	720-0243	VWR
Formalinlösung, 10%, 120 ml	HT5014	Sigma-Aldrich Sakura
Tissue-Tek VIP 6 AI Vacuum Infiltration Processor (Einbettautomat)		Sakura
Microm EC350		Thermo Scientific
HM 450 Schlittenmikrotom	910020	Thermo Scientific
pfm Wasserbad 1000	041010	pfm medical
Färbeautomat Varistain 24-4		Shandon
Superfrost® Plus Objektträger 72 Stück	J1800AMNZ	Menzel-Gläser
Deckgläser 24 x 60 mm, rechteckig	631-1575	VWR
Universalwärmeschrank UNP200		Memmert

Die bei -80°C in RNAlater® eingefrorenen Aortenklappen wurden zunächst wieder aufgetaut und in drei bis vier Stücke geschnitten, die dann in Einbettkassetten über Nacht in 10% Formalin eingelegt wurden. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe des Einbettautomaten über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und in

Paraffin eigebettet. Daraufhin konnten im Ausgießgerät Wachsblöcke hergestellt werden, die dann mit Hilfe des Mikrotoms zu 5 µm dicken Schnitten verarbeitet wurden. Nachdem die Schnitte in ein Wasserbad überführt worden waren, um sich zu entfalten, konnten sie auf Objektträger aufgetragen werden. Diese wurden dann in einem Trockenschrank für 30 Minuten bei 70°C inkubiert. Es wurde pro Aortenklappe mindestens ein Objektträger mit Hilfe eines Färbeautomates in Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) eingefärbt und ein Objektträger mit der von Kossa-Färbung versilbert.

2.13.2 Versilberung nach von Kossa

Tabelle 11: Materialliste Versilberung nach von Kossa

Färbekit: Versilberung nach von Kossa (Krutsay) 250 ml	16764	Morphisto
Xylol (Isomerengemisch) ≥98.5%	28975.325	VWR
Ethanol > 99,8% 2,5 l	32205	Sigma-Aldrich
Destilliertes Wasser		
2-PROPANOL, ACS 1 l	RD59300	Riedel-de Haen
Entellan® Neu Schnelleindeckmittel	107961	Merck
Axioimager M1		Zeiss

Mit der Versilberung nach von Kossa wird kalziumhaltiges Gewebe nachgewiesen. So färbt sich mineralisierter Knorpel und Knochen schwarz an und Mineralisationsfronten sowie Osteoide kommen grau transparent bis schwarz granuliert zur Darstellung. Die ungefärbten Objektträger wurden nach Vorschrift des Färbekits gemäß den folgenden Schritten behandelt:

1.	2x Xylol	Je 10 Minuten
2..	Ethanol 96%	4 Minuten
3.	Ethanol 80%	4 Minuten
4.	Ethanol 70%	4 Minuten
5.	2x Wässern mit destilliertem Wasser	Je 30 Sekunden
6.	Silbernitrat 5%	1 Stunde
7.	3x Spülen mit destilliertem Wasser.	Je 30 Sekunden
8.	Natriumcarbonat-Formalin	2 Minuten
9.	Leitungswasser	10 Minuten
10.	Farmerscher Abschwächer	1 Sekunde

11.	Destilliertes Wasser	1 Sekunde
12.	Natriumthiosulfat 5%	2 Minuten
13.	Leitungswasser	10 Minuten
14.	Kernechtrot 0,1%	5 Minuten
15.	Destilliertes Wasser.	1 Minute
16.	2x Entwässern mit Ethanol 96%	Je 4 Minuten
17.	Isopropanol	4 Minuten
18.	2x Entwässern mit Xylol	Je 10 Minuten
19.	Eindeckmittel	4 Minuten

2.14 Datenanalyse

Die Fallzahlabschätzung der Arbeit orientierte sich primär an der zugrundeliegenden Veröffentlichung von Niinisalo et al. [73]. Hier wurden 30 Patienten mit atherosklerotischen Plaques untersucht und mit sechs Patienten ohne atherosklerotische Gefäßveränderungen verglichen. Daher sollten auch in der vorliegenden Studie mindestens 30 degenerierte Herzklappen untersucht werden. Um eine repräsentative Kontrollgruppe zu haben, sollten trotz der Seltenheit der insuffizienten Aortenklappen im Untersuchungszeitraum mindestens zehn und höchstens 30 dieser Kontrollen eingeschlossen werden. Die demographischen Daten der Patienten, sowie die Parameter KÖF, Druckgradient und Anzahl der Klappensegel wurden aus den Patientenakten des klinikinternen Verwaltungssystems entnommen. Da die qPCR in technischen Triplikaten durchgeführt wurde, wurden die Ausreißerwerte direkt von der StepOne Software™ v2.3 des qPCR-Cyclers identifiziert und von der Auswertung ausgeschlossen. Aus den übrigen Werten wurde jeweils der Mittelwert gebildet. Um die C_T-Werte der verkalkten Proben mit denen der insuffizienten Kontrollen vergleichen zu können, wurden die Ergebnisse aus der Analysesoftware StepOne Software™ v2.3 in die ExpressionSuite Software v1.1 exportiert. Diese legte für die verschiedenen Zielgene einheitliche Schwellenwerte fest, welche dann für die weiteren Berechnungen verwendet werden konnten. Die deskriptiven Daten wurden mit Hilfe von Microsoft Excel, Version 2016 unter Zuhilfenahme von Mittelwert und Standardabweichung (SD) sowie Median und Interquartilabstand (IQR) erstellt. Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm R, Version 3.1.3 durchgeführt. Die p-Werte galten als signifikant, sobald p unter dem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$

lag. Um die Daten auf eine Normalverteilung zu testen, wurde der Shapiro-Wilk-Test und die Darstellung über QQ-Plots angewendet. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Rangsummen-Test durchgeführt. Die Darstellung der Daten erfolgte über Boxplots, in denen Median und das erste und dritte Quartil visualisiert wurden. Die Box ist der Bereich, indem sich die mittleren 50% aller Werte befinden. In der Box befindet sich der Median als Strich. Die Begrenzungen entsprechen dem ersten und dem dritten Quartil. Die Antennen außerhalb der Box stellen alle Werte bis zum 1,5-fachen IQR dar. Mögliche Ausreißer werden über den Ausreißertest ermittelt und befinden sich außerhalb der Antennen.

Um die genaue Verteilung der Expressionslevel und möglicher Ausreißer besser interpretieren zu können, als dies mit Boxplots möglich ist, eignet sich die zusätzliche Darstellung der einzelnen Werte über Streudiagramme. Der relative Expressionsunterschied der beiden Gruppen nach Pfaffl et al. [85] unter Verwendung der ΔC_TWerte berechnet sich folgendermaßen:

(1) Verkalkte Klappen: $\Delta C_T = C_{T\ (Zielgen\ X)} - C_{T\ (Referenzgen)}$

(2) Insuffiziente Kontrollklappen: $\Delta C_{T(Kontrollen)} = C_{T\ (Zielgen\ X)} - C_{T\ (Referenzgen)}$

(3) Expressionsunterschied = $2^{-\Delta CT}$

Um die Expression einzelner Zielgene im Vergleich zwischen den beiden Gruppen zu bewerten, wurde die relative x-fache Veränderung berechnet. Es handelt sich hierbei um den Quotienten der Expression verkalkter und der Expression insuffizienter Klappen. Ist er positiv, kann man von einer gesteigerten Expression des Zielgens in der Gruppe der verkalkten Klappen gegenüber den insuffizienten Klappen sprechen. Ist er jedoch negativ, so ist die Expression bei den verkalkten Klappen im Vergleich verringert. Darüber hinaus wurde unter Zuhilfenahme des Korrelationskoeffizienten Kendall‘s Tau eine Analyse der Korrelationen verschiedener Parameter durchgeführt. Es wurden einerseits die Korrelationen der Expressionslevel der Zielgene erfasst, um zusammenhängende Stoffwechselwege erkennen zu können. Andererseits wurde analysiert, ob Korrelationen zwischen der Höhe der Expressionslevel und den Parametern Lagerungsdauer, Alter, Konzentration der RNA, KÖF, maximaler Druckgradient, A260/280 und RIN bestanden. Dies sollte sicherstellen, dass die Höhe der Expression der Zielgene

unabhängig von methodischen Einflüssen war. Über die Darstellung der einzelnen Expressionslevel jeweils zweier Parameter im Vergleich wurden außerdem noch Regressionsgeraden zur graphischen Veranschaulichung der Zusammenhänge erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenpopulation

Im Untersuchungszeitraum von Juli 2016 bis Mai 2017 wurden 69 Aortenklappen gesammelt und deren RNA extrahiert. Davon mussten insgesamt 21 Proben aus der Studie ausgeschlossen werden. Bei fünf Proben wurde zu wenig RNA aus dem Gewebe isoliert, sodass keine RT und demzufolge keine qPCR erfolgen konnte. Bei 14 Proben war nach der Durchführung der qPCR die Amplifikation der Referenzgene trotz Präamplifikation nicht ausreichend (größer als 35 Zyklen oder nicht messbar). Bei weiteren zwei Proben reichte das gewonnene Material nicht für die durchzuführenden Versuche aus. Insgesamt wurden somit noch 48 Aortenklappen in die Studie eingeschlossen. Hiervon gehörten 38 Aortenklappen der biologischen Gruppe „Verkalkt“ (Gruppe A) an. Als Kontrollgruppe dienten zehn insuffiziente Klappen (Gruppe B). Es konnten lediglich insuffiziente Herzklappen der Gruppe B1 (elektive Operationen) im Untersuchungszeitraum gesammelt werden. Im obengenannten Zeitraum gab es keine Patientenproben der Gruppe B2 (Notfalloperation), die den notwendigen Kriterien zum Einschluss in die Studie entsprachen.

Von den 38 Aortenklappen, die der biologischen Gruppe „Verkalkt“ zugeordnet worden waren, waren 16 bikuspid angelegt. In der Gruppe der insuffizienten Herzklappen (n=10) wurden lediglich trikuspide Herzklappen eingeschlossen. In beiden Gruppen war die Anzahl der Frauen kleiner, als die der Männer (Verkalkt: 12 von 38 weiblich; Insuffizient: 3 von 7 weiblich). Der Median des Patientenalters betrug für beide biologische Gruppen 68,0 Jahren (Tabelle 12).

Tabelle 12: Patientendaten verkalkt vs. insuffizient bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017

*KÖF=Klappenöffnungsfläche, Δp_{max}=maximaler Druckgradient über der Aortenklappe; keine Normalverteilung; IQR=Interquartilabstand; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001*

	Verkalkt	Insuffizient	p-Wert
Anzahl Geschlecht (m/w)	28/12	7/3	
Anzahl Trikuspid/Bikuspid	22/16	10/0	
Patientenalter Median (IQR)	68,0 (65,0 bis 73,8)	68,0 (64,3 bis 74,0)	0,83
KÖF in cm² Median (IQR)	0,80 (0,70 bis 0,90)	2,17 (2,13 bis 2,19)	0,0004***
Δp_{max} in mmHg Median (IQR)	74,00 (52,00 bis 90,00)	13,00 (10,95 bis 39,25)	0,0009***

Der maximale Druckgradient über der Aortenklappe, sowie deren Klappenöffnungsfläche dienen als Maß für die Funktionalität der Herzklappe. Der Unterschied zwischen den beiden biologischen Gruppen war für beide Parameter signifikant. In Bezug auf die KÖF lagen 75% der verkalkten Aortenklappen im Bereich unter 0,90 cm² und erreichten einen maximalen Druckgradienten von mehr als 52,00 mmHg. Damit waren diese Herzklappen als hochgradig stenosiert einzustufen. Die insuffizienten Herzklappen erreichten in 75% der Fälle eine KÖF von mindestens 2,13 cm² und wurden in Bezug auf diesen Parameter als nicht stenotisch klassifiziert. Der maximale Druckgradient lag für 50% der Patienten zwischen 10,95 mmHg und 39,25 mmHg. Laut Definition wäre dies als leichtgradig stenosiert zu bezeichnen. Bei zehn Patienten wurden in der Krankenakte keine Angaben zur Größe der Klappenöffnungsfläche gemacht. Ebenso wurden bei acht Patienten keine maximalen Druckgradienten dokumentiert, sodass diese Werte bei der Berechnung von Median und Interquartilabstand nicht berücksichtigt werden konnten.

Um zu untersuchen, ob die Bikuspidalität einer Aortenklappe Einfluss auf die immunmodulatorischen Signalwege hat, wurden die Patienten ergänzend noch in Bezug auf die Anzahl der Taschen ihrer Aortenklappen unterteilt (Tabelle 13). Signifikante Unterschiede gab es bei dem Patientenalter (p<0,0001), der KÖF (p<0,0001) und dem maximalen Druckgradienten (p<0,0001). Patienten mit trikuspider Aortenklappe sind in dieser Studie mit 69,5 Jahren (65,0 bis 74,0 Jahre) älter, als Patenten mit bikuspider Aortenklappe mit 66,0 Jahren (57,8 bis 72,5 Jahre). Die KÖF ist bei den trikuspiden Klappen mit einem Median von 0,90 cm²

(0,80 bis 1,20 cm²) höher als die der bikuspiden Klappen mit einem Median von 0,80 cm² (0,50 bis 0,80 cm²). Der maximale Druckgradient über der Aortenklappe unterscheidet sich zwischen bikuspiden und trikuspiden Herzklappen dahingehend, dass dieser bei den bikuspiden Herzklappen mit 80,00 mmHg (70,00 bis 102,00 mmHg) höher ist als bei den trikuspiden mit 52,00 mmHg (24,00 bis 74,00 mmHg).

Tabelle 13: Patientendaten bikuspid vs. trikuspid bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017

*KÖF=Klappenöffnungsfläche, Δp_{max}=maximaler Druckgradient über der Aortenklappe; keine Normalverteilung; IQR=Interquartilabstand; *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001*

	Trikuspid	**Bikuspid**	**p-Wert**
Anzahl Geschlecht (m/w)	24/8	9/7	
Alter Median (IQR)	69,5 (65,0 bis 74,0)	66,0 (57,8 bis 72,5)	<0,0001***
KÖF in cm² Median (IQR)	0,90 (0,80 bis 1,20	0,80 (0,50 bis 0,80)	<0,0001***
Δp_{max} in mmHg Median (IQR)	52,00 (24,00 bis 74,00)	80,00 (70,00 bis 102,00)	<0,0001***

3.2 Qualitätskontrolle der RNA

Die Verarbeitung der RNA beinhaltete verschiedene Schritte, die deren Qualität beurteilen sollten (Tabelle 14). Jede in die Studie eingeschlossene Aortenklappe wurde mindestens über eine Nacht (circa 12 Stunden) bei -80 °C eingefroren. Je nach zeitlicher Verfügbarkeit und je nach Vorhandensein des notwendigen Materials, wurden die Aortenklappen dann wieder aufgetaut und weiterverarbeitet. Einige Proben wurden bereits nach 12 Stunden wieder aufgetaut, andere blieben bis zu 45 Tage eingefroren. Nach 20,8 Tagen (SD:11,7) erfolgte für die verkalkten Aortenklappen und nach 25,8 Tagen (SD:10,8) für die insuffizienten Aortenklappen der nächste Arbeitsschritt. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden biologischen Gruppen trat nur im Hinblick auf die RNA-Konzentration auf. Diese betrug für die Gruppe „Verkalkt“ 53,80 ng/µl (43,33 bis 62,23 ng/µl) und für die Gruppe „Insuffizient“ 65,20 ng/µl (55,00 bis 84,73 ng/µl).

Tabelle 14: Qualität der extrahierten RNA verkalkt vs. insuffizient bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017

*A260/280=optische Dichte bei Verhältnis der Wellenlängen 260 nm und 280 nm; RIN=RNA Integrity Number; keine Normalverteilung außer bei Lagerungsdauer; MW=Mittelwert; SD=Standardabweichung; IQR=Interquartilabstand; *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001*

	Verkalkt	Insuffizient	p-Wert
Lagerungsdauer in Tagen MW±SD	20,8±11,7	25,8±10,8	0,25
RNA-Konzentration in ng/µl Median (IQR)	53,80 (43,33 bis 62,23)	65,20 (55,00 bis 84,73)	0,03*
A260/280 Median (IQR)	1,99 (1,96 bis 2,01)	2,00 (1,98 bis 2,03)	0,12
RIN Median (IQR)	8,80 (8,63 bis 8,98)	9,00 (8,75 bis 9,08)	0,07

Die Unterscheidung zwischen bikuspiden und trikuspiden Herzklappen zeigte einen signifikanten Unterschied für die Lagerungsdauer (p=0,02) und die RNA-Konzentration (p<0,0001).

Tabelle 15: Qualität der extrahierten RNA bikuspid vs. trikuspid bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017

*A260/280=optische Dichte bei Verhältnis der Wellenlängen 260 nm und 280 nm; RIN=RNA Integrity Number; keine Normalverteilung außer bei Lagerungsdauer; IQR=Interquartilabstand; *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001*

	Trikuspid	Bikuspid	p-Wert
Lagerungsdauer in Tagen Median (IQR)	20,5 (12,50 bis 30,25)	20,5 (15,75 bis 33,25)	0,02*
RNA-Konzentration in ng/µl Median (IQR)	52,90 (47,15 bis 62,40)	62,45 (50,48 bis 73,83)	<0,0001***
A260/280 Median (IQR)	2,00 (1,98 bis 2,01)	1,99 (1,97 bis 2,02)	0,5
RIN Median (IQR)	8,85 (8,70 bis 8,90)	8,90 (8,68 bis 8,93)	0,07

3.3 Expressionsanalyse

3.3.1 Vergleich von verkalkten und insuffizienten Aortenklappen

Um die Expressionslevel bestimmen zu können, mussten zunächst die am besten geeigneten Referenzgene ausgewählt werden. In dieser Studie wurden hierfür die Gene der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und des

Ribosomalen Proteins S18 (RPS18) eingesetzt. Deren errechneter M-Wert für die durchgeführten Analysen betrug 1,698.

Abbildung 4, 5 und 6 zeigen die Streudiagramme und Boxplots der Expressionslevel aller Zielgene. Bei der Betrachtung der Ausreißerwerte der einzelnen Marker stellte sich die Frage, ob es sich bei diesen immer um dieselben Herzklappen handelte, oder ob die Punkte jeweils zu unterschiedlichen Proben gehörten. Um dies zu überprüfen wurden die sieben Werte, welche die höchsten Expressionslevel für das Gen IDO1 besaßen, mit ausgefüllten grünen Punkten markiert. Die dazugehörigen Werte wurden auch bei den anderen Zielgenen auf diese Weise gekennzeichnet. Die Proben mit den höchsten Expressionsleveln waren zwar nicht in jedem Fall dieselben, es fiel allerdings auf, dass die Herzklappen mit hohen Expressionswerten des Zielgens IDO1 tendenziell auch bei den anderen Genen im oberen Bereich des Diagramms lagen. Folglich stammten die unterschiedlich hohen Ausreißerwerte bei den Expressionslevels der verschiedenen Zielgene in einigen Fällen von denselben Aortenklappen. Trotz des statistisch nicht signifikanten Unterschiedes zwischen den beiden biologischen Gruppen waren deutliche Varianzen in der Expression der Zielgene vorhanden. In der Gruppe der verkalkten Herzklappen sind im Vergleich zu den insuffizienten Kontrollen einige Messwerte im Bereich höherer Expressionslevel zu finden.

Es fällt auf, dass das Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ in Bezug auf den Expressionsunterschied lediglich bei den Zielgenen MMP1 mit $p=0,045$ und TNC mit $p=0,01$ unterschritten wurde (Abbildung 5 und 6). Die relative x-fache Veränderung der Expressionslevel von MMP1 bei den verkalkten Klappen im Vergleich zu den insuffizienten Klappen ist 5,89-fach und die von TNC 3,06-fach erhöht. Die p-Werte für die übrigen Zielgene bewegen sich zwischen 0,10 und 0,98 (Tabelle 16). Somit gibt es keine weiteren signifikanten Expressionsunterschiede bei allen übrigen Genen. In Abbildung 5F und 6F sind die Zielgene MMP1 und TNC vergleichend zwischen den beiden Gruppen „Verkalkt“ und „Insuffizient“ als Streudiagramme und Boxplots gegenübergestellt. Anhand dieser Darstellung wird sichtbar, dass es in der Gruppe der verkalkten Herzklappen bei MMP1 fünf Ausreißerwerte der Gruppe „Verkalktach oben gibt und bei TNC jeweils zwei Ausreißer in der Gruppe „Insuffizient“ und zwei in der Gruppe „Verkalkt“.

Tabelle 16: Expressionsanalyse von verkalkten und insuffizienten Herzklappen bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017

*CD=Cluster of Differentiation; CTLA4=zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; FOXP3=Forkhead-Box-Protein P3; ICOS=induzierbarer T-Zell-Kostimulator; IDO=Indolamin-2,3-dioxygenase; IFNG=Interferon gamma; IL=Interleukin; MMP=Matrixmetalloproteinase; SPP1=Osteopontin; TGFB=transformierender Wachstumsfaktor Beta; TNC=Tenascin C; Relative x-fache Veränderung=Median Expression verkalkte Klappen/Median Expression insuffiziente Klappen; IQR=Interquartilabstand; *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001*

Zielgen	Verkalkt Median (IQR)	Insuffizient Median (IQR)	Relative x-fache Veränderung	p-Wert
CD28	0,33 (0,17 bis1,1)	0,25 (0,16 bis 0,4)	1,3	0,15
CD4	2,81 (1,74 bis 5,54)	2,91 (2,36 bis 3,97)	0,97	0,98
CD74	44,53 (20,52 bis 109,33)	23,44 (17,61 bis 39,94)	1,9	0,13
CD80	0,39 (0,25 bis 1,53)	0,27 (0,2 bis 0,35)	1,43	0,1
CD86	8,84 (4,51 bis 57,06)	5,95 (4,84 bis 15,52)	1,49	0,37
CTLA4	0,08 (0,05 bis 0,24)	0,07 (0,04 bis 0,17)	1,05	0,54
FOXP3	0,01 (0 bis 0,02)	0,01 (0,01 bis 0,02)	0,72	0,51
ICOS	0,08 (0,03 bis 0,15)	0,03 (0,02 bis 0,07)	2,19	0,22
IDO1	0,66 (0,28 bis 1,79)	0,39 (0,15 bis 0,54)	1,7	0,32
IFNG	0,13 (0,05 bis 0,5)	0,1 (0,03 bis 0,18)	1,26	0,2
IL10	1,54 (0,92 bis 3,24)	2,53 (1,18 bis 5,62)	0,61	0,51
MMP1	0,05 (0,01 bis 0,14)	0,01 (0,01 bis 0,07)	5,89	0,04*
MMP2	69,07 (55,64 bis 191,93)	68,8 (43,82 bis 133,43)	1	0,76
MMP3	0,07 (0,03 bis 0,22)	0,11 (0,06 bis 0,24)	0,65	0,45
MMP9	0,02 (0,01 bis 0,06)	0,04 (0,01 bis 0,08)	0,45	0,57
SPP1	142,7 (60,33 bis 958,19)	103,51 (63,43 bis 340,73)	1,38	0,49
TGFB1	5,93 (3,93 bis 14,27)	8,03 (4,5 bis 11,37)	0,74	0,98
TNC	105,4 (42,05 bis 240,16)	34,39 (15,29 bis 45,03)	3,06	0,01*

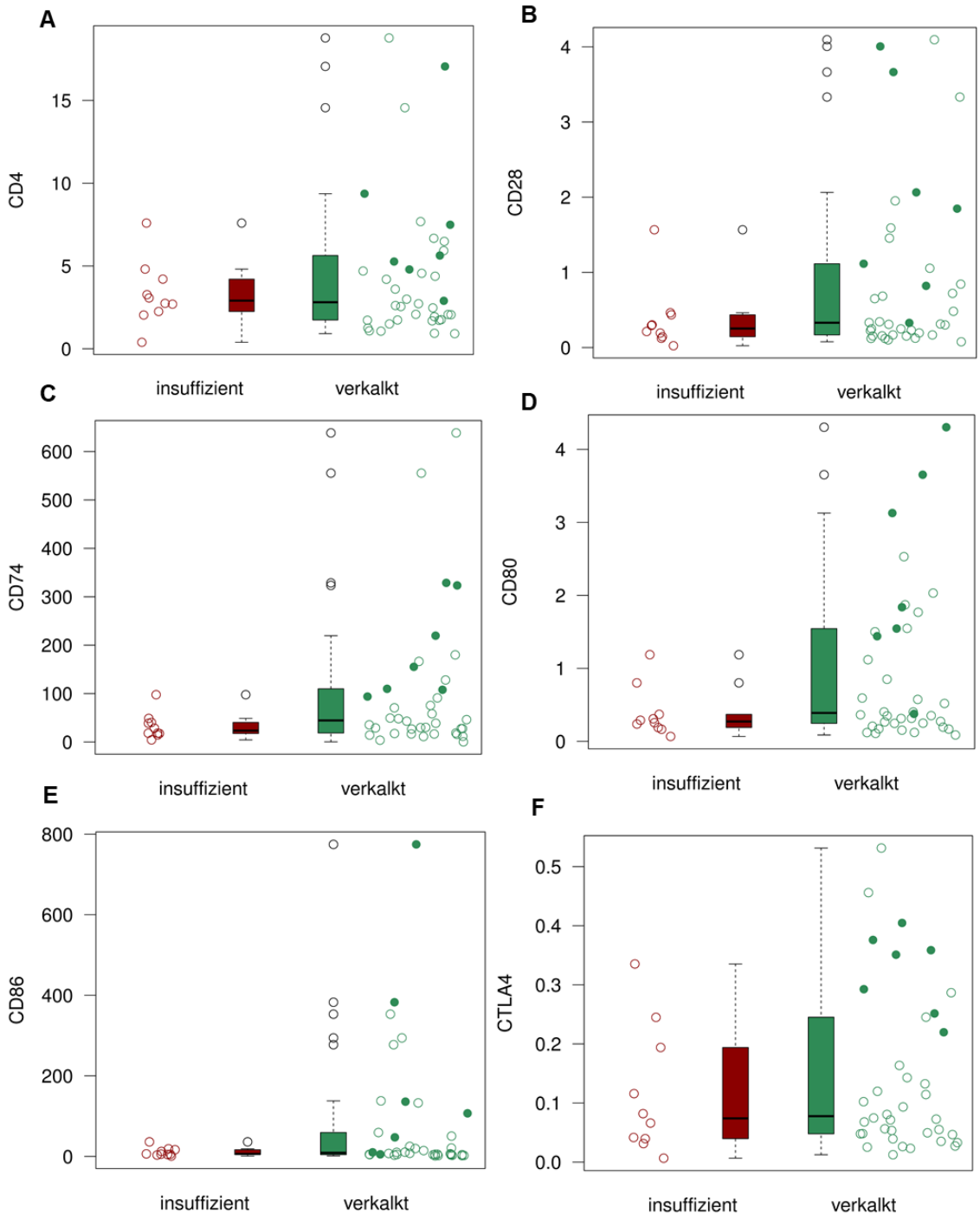


Abbildung 4: Streudiagramme und Boxplots der Zielgene der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017

*CD=Cluster of Differentiation; CTLA4=zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; IDO=Indolamin-2,3-dioxygenase; rot=insuffizient; grün=verkalkt; grün ausgefüllt=höchste Expressionslevel IDO1; schwarz=Ausreißer; X-Achse: biologische Gruppen; Y-Achse: Expressionslevel Zielgen FOXP3 (A), ICOS (B), IDO1(C), IFNG (D), IL10 (E), MMP1 (F); Streudiagramm und Boxplot der jeweiligen biologischen Gruppe liegen nebeneinander. Die Proben, die den höchsten Expressionslevels von IDO1 bei den anderen Zielgenen entsprechen, wurden in den jeweiligen Schaubildern auch als ausgefüllte grüne Kreise dargestellt. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001*

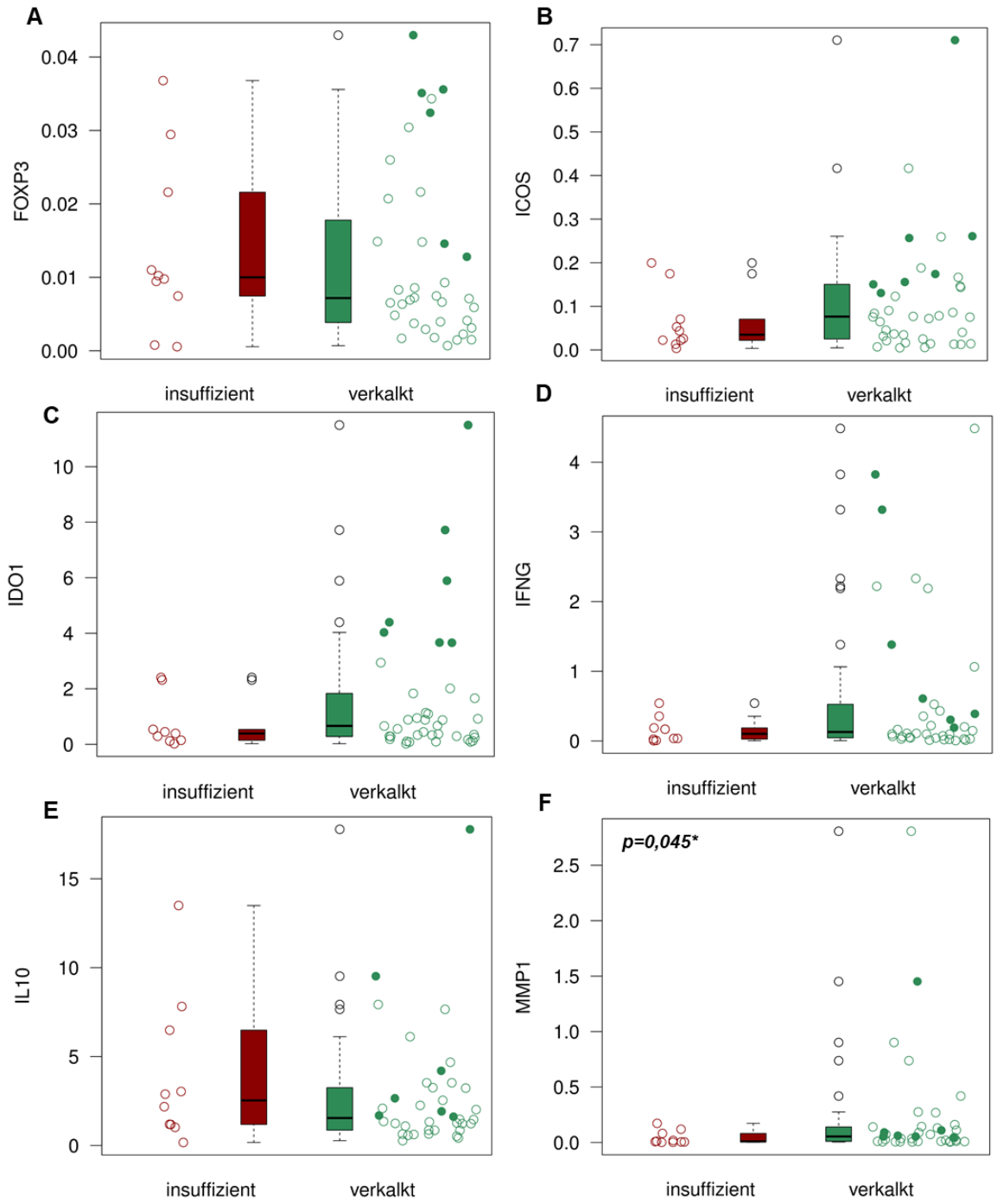


Abbildung 5: Streudiagramme und Boxplots der Zielgene der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017

*FOXP3=Forkhead-Box-Protein P3; ICOS=induzierbarer T-Zell-Kostimulator; IDO=Indoleamine-2,3-dioxygenase; IFNG=Interferon gamma; IL=Interleukin; MMP=Matrixmetalloproteinase; rot = insuffizient; grün=verkalkt; grün ausgefüllt=höchste Expressionslevel IDO1; schwarz=Ausreißer; X-Achse: biologische Gruppen; Y-Achse: Expressionslevel Zielgen FOXP3 (A), ICOS (B), IDO1(C), IFNG (D), IL10 (E), MMP1 (F); Streudiagramm und Boxplot der jeweiligen biologischen Gruppe liegen nebeneinander. Die Proben, die den höchsten Expressionslevels von IDO1 bei den anderen Zielgenen entsprechen, wurden in den jeweiligen Schaubildern auch als ausgefüllte grüne Kreise dargestellt. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001*

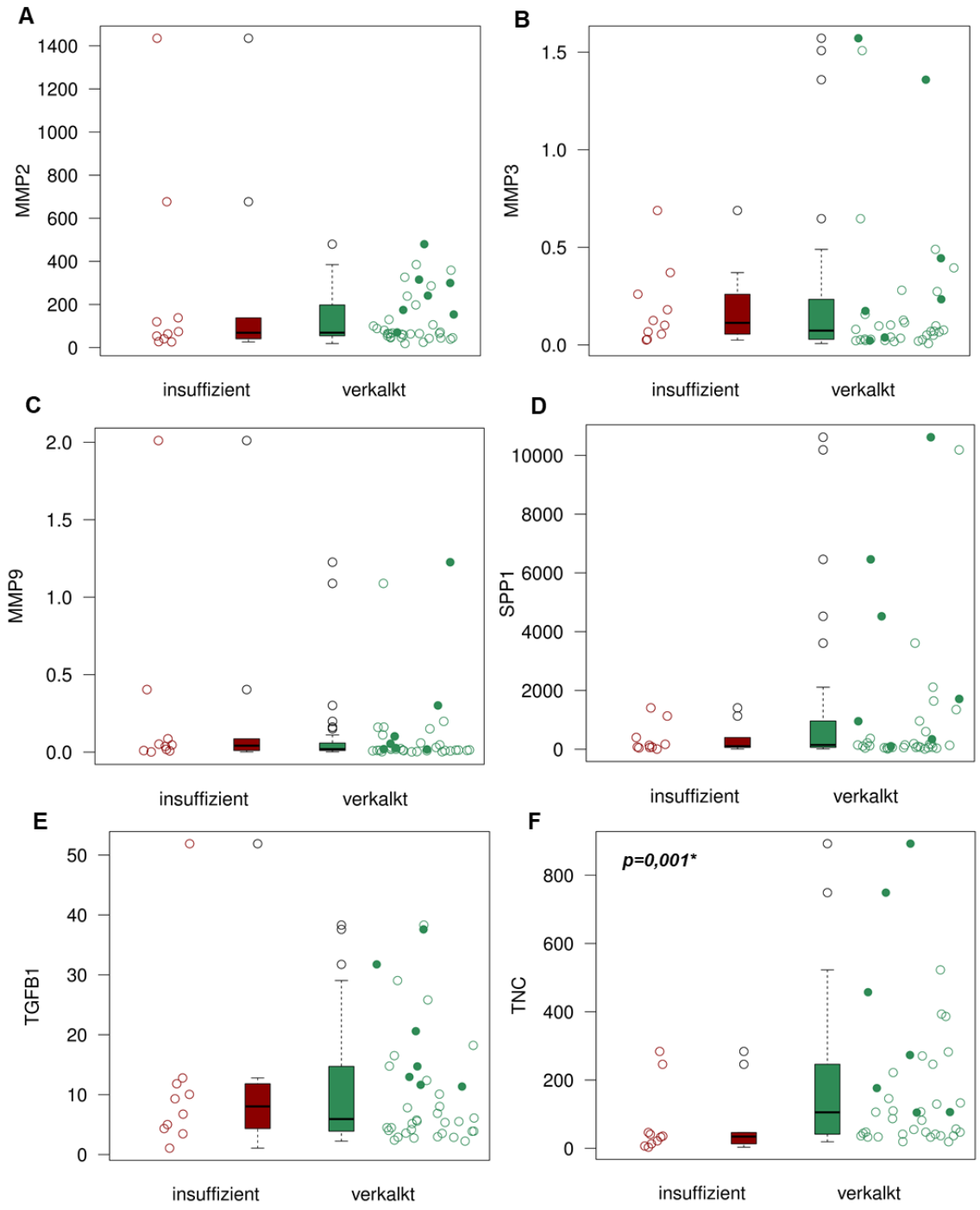


Abbildung 6: Streudiagramme und Boxplots der Zielgene der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017

*IDO=Indolamin-2,3-dioxygenase; MMP=Matrixmetalloproteinase; SPP1=Osteopontin; TGFB1=transformierender Wachstumsfaktor Beta 1; TNC=Tenascin C rot=insuffizient; grün=verkalkt; grün ausgefüllt=höchste Expressionslevel IDO1; schwarz=Ausreißer; X-Achse: biologische Gruppen; Y-Achse: Expressionslevel Zielgen FOXP3 (A), ICOS (B), IDO1(C), IFNG (D), IL10 (E), MMP1 (F); Streudiagramm und Boxplot der jeweiligen biologischen Gruppe liegen nebeneinander. Die Proben, die den höchsten Expressionslevels von IDO1 bei den anderen Zielgenen entsprechen, wurden in den jeweiligen Schaubildern auch als ausgefüllte grüne Kreise dargestellt. *p<0,05, **p<0,01 ***p<0,001*

3.3.2 Vergleich von bikuspiden und trikuspiden Aortenklappen

Die Expressionsanalyse der trikuspiden Aortenklappen im Vergleich zu den bikuspiden verdeutlichte, dass die p-Werte für den Gruppenunterschied in allen Fällen über dem Signifikanzniveau von α=0,05 lagen und die relative x-fache Veränderung der Expression der Gene somit als statistisch nicht signifikant zu bezeichnen ist (Tabelle 17).

Tabelle 17: Expressionsanalyse von bikuspiden und trikuspiden Herzklappen bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017

*CD=Cluster of Differentiation; CTLA4=zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; FOXP3=Forkhead-Box-Protein P3; ICOS=induzierbarer T-Zell-Kostimulator; IDO1=Indolamin-2,3-dioxygenase 1; IFNG=Interferon gamma; IL=Interleukin; MMP=Matrixmetalloproteinase; SPP1=Osteopontin; TGFB=transformierender Wachstumsfaktor Beta; TNC=Tenascin C; IQR=Interquartilabstand; Relative x-fache Veränderung=Median Expression bikuspide Klappen/Median Expression trikuspide Klappen; *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001*

Zielgen	Bikuspid Median (IQR)	Trikuspid Median (IQR)	Relative x-fache Veränderung	p-Wert
CD28	0,28 (0,16 bis 0,90)	0,31 (0,21 bis 0,98)	0,9	0,53
CD4	2,64 (2,89 bis 4,91)	3,03 (1,97 bis 5,02)	0,87	79
CD74	47,09 (24,87 bis 79,32)	32,75 (17,95 bis 114,37)	1,44	0,13
CD80	0,36 (0,20 bis 1,20)	0,36 (0,24 bis 1,33)	1,01	0,60
CD86	6,95 (3,95 bis 16,02)	9,06 (4,85 bis 52,60)	0,77	0,36
CTLA4	0,07 (0,05 bis 0,18)	0,09 (0,05 bis 0,23)	0,82	0,83
FOXP3	0,01 (0,01 bis 0,02)	0,01 (0,00 bis 0,02)	1,22	0,64
ICOS	0,08 (0,03 bis 0,12)	0,06 (0,02 bis 0,16)	1,24	0,98
IDO1	0,88 (0,23 bis 2,24	0,45 (0,29 bis 1,40)	1,96	0,69
IFNG	0,12 (0,05 bis 0,32)	0,14 (0,04 bis 0,56)	0,89	0,53
IL10	1,29 (0,65 bis 2,80)	1,97 (1,19 bis 5,04)	0,66	0,16
MMP1	0,05 (0,02 bis 0,13)	0,04 (0,01 bis 0,11)	1,22	0,46
MMP2	66,57 (57,85 bis 250,57)	72,11 (48,38 bis 147, 15)	0,92	0,83
MMP3	0,07 (0,02 bis 0,20)	0,09 (0,04 bis 0,24)	0,75	0,45
MMP9	0,02 (0,01 bis 0,07)	0,02 (0,01 bis 0,07)	1,23	0,95
SPP1	102,07 (57,96 bis 403,24)	154,07 (60,57 bis 1002,64)	0,62	0,43
TGFB1	6,48 (3,65 bis 12,51)	6,25 (4,13 bis 14,15)	1,04	0,63
TNC	95,8 (44,81 bis 137,87)	47,24 (33,31 bis 246,08)	2,03	0,51

3.4 Korrelationsanalyse

Um Zusammenhänge zwischen der Expression der einzelnen Zielgene zu erkennen, wurden alle Korrelationen für die Gene untereinander berechnet. Insgesamt handelte es sich pro Gruppe um 306 Werte, von denen bei Betrachtung aller 48 eingeschlossenen Aortenklappen, bei 85,6% (262 von 306) signifikant positive Korrelationen auftraten. Für die verkalkten Aortenklappen waren 86,9% (266 von 306) der Korrelationen unter den Zielgenen signifikant. Die insuffizienten Klappen zeichneten sich durch einen geringeren Anteil signifikanter Korrelationen von 21,2% (65 von 306) aus. Alle Korrelationen sind in den Tabellen 28 bis 33 im Anhang an diese Arbeit aufgeführt.

3.4.1 IDO1

Zunächst sollte das Verhältnis von IDO1 in Bezug auf die anderen Zielgene analysiert werden. Anhand der ebenfalls aufgeführten p-Werte in Tabelle 18 wurde verdeutlicht, dass die tau-Werte der einzelnen Gene alle bis auf MMP3 eine signifikante ($p<0,05$) bis hochsignifikante ($p<0,001$) Korrelation besitzen. Am niedrigsten korrelieren MMP2 (tau=0,22) und MMP1 (tau=0,23) mit IDO1. Die höchsten Korrelationen weisen ICOS (tau=0,59), CD80 und IFNG (tau jeweils 0,58) auf. IDO1 zeigt in Bezug auf die weiteren erhobenen Parameter eine signifikant negative Korrelation mit der KÖF (tau=-0,26). Die anderen zusätzlichen Parameter korrelieren nicht signifikant miteinander (Tabelle 18). In Abbildung 7 sind die Regressionsgeraden der Gene mit den höchsten Korrelationen dargestellt. Die Schaubilder zeigen die jeweiligen Expressionslevel der Zielgene gegen die Expressionslevel von IDO1 aufgezeichnet. Viele Wertepaare der 48 Proben sammeln sich als Wolke im linken unteren Rand der Schaubilder. Der Rest stellt sich mit einer starken Streuung um die jeweilige Gerade herum dar.

Tabelle 18: Korrelationsanalyse IDO1 gesamt (n=48) bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017

*CD=Cluster of Differentiation; CTLA4=zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; FOXP3=Forkhead-Box-Protein P3; ICOS=induzierbarer T-Zell-Kostimulator; IDO=Indolamin-2,3-dioxygenase; IFNG=Interferon gamma; IL=Interleukin; MMP=Matrixmetalloproteinase; SPP1=Osteopontin; TGFB=transformierender Wachstumsfaktor Beta; TNC=Tenascin C; KÖF=Klappenöffnungsfläche; Δp_{max}=maximaler Druckgradient; RNAKonz=RNA-Konzentration; A260/280=Verhältnis der optischen Dichte zwischen 260 nm und 280 nm; RIN=RNA Integrity; *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001*

Zielgen	Tau	p-Wert	Zielgen	Tau	p-Wert
CD4	0,35	0,0004***	**MMP3**	0,17	0,09
CD28	0,54	<0,0001***	**MMP9**	0,22	0,03*
CD74	0,44	<0,0001***	**TGFB1**	0,46	<0,0001***
CD80	0,58	<0,0001***	**TNC**	0,38	0,0002***
CD86	0,50	<0,0001***	**SPP1**	0,53	<0,0001***
CTLA4	0,54	<0,0001***	**KÖF**	-0,26	0,04*
FOXP3	0,38	0,0003***	**Δp_{max}**	0,06	0,59
ICOS	0,59	<0,0001***	**Alter**	0,12	0,26
IFNG	0,58	<0,0001***	**Lagerungsdauer**	-0,20	0,05
IL10	0,36	0,0003***	**RNAKonz**	-0,14	0,16
MMP1	0,23	0,02*	**A260/280**	-0,16	0,12
MMP2	0,39	0,0001***	**RIN**	-0,09	0,37

In einer weiteren Betrachtung wurden nun die Berechnung des Korrelationskoeffizienten und der Regressionsgeraden erneut durchgeführt (Tabelle 19). Dies geschah unter Berücksichtigung der jeweiligen biologischen Gruppe. In der Gruppe der verkalkten Herzklappen finden sich die höchsten Korrelationen von IDO1 mit ICOS (tau=0,62), und CTLA4 (tau=0,59). Die niedrigsten Korrelationen weisen die Matrixmetalloproteinasen MMP1 (tau=0,27), MMP9 (tau=0,28) und MMP3 (tau=0,29) auf. Die Korrelationskoeffizienten sind alle signifikant. Die wesentlich kleinere Gruppe der insuffizienten Klappen (n=10) unterschreitet lediglich bei den Zielgenen IFNG (tau=0,56), CD80 (tau=0,50), CD86 (tau=0,56) und SPP1 (tau=0,61) das Signifikanzniveau von α=0,05. Bei den außerhalb von den Zielgenen erhobenen Parametern korreliert nur die RNA-Konzentration in der Gruppe „Verkalkt“ signifikant negativ mit IDO1 (tau=-0,23). Alle anderen Zusammenhänge sind in beiden Gruppen nicht signifikant.

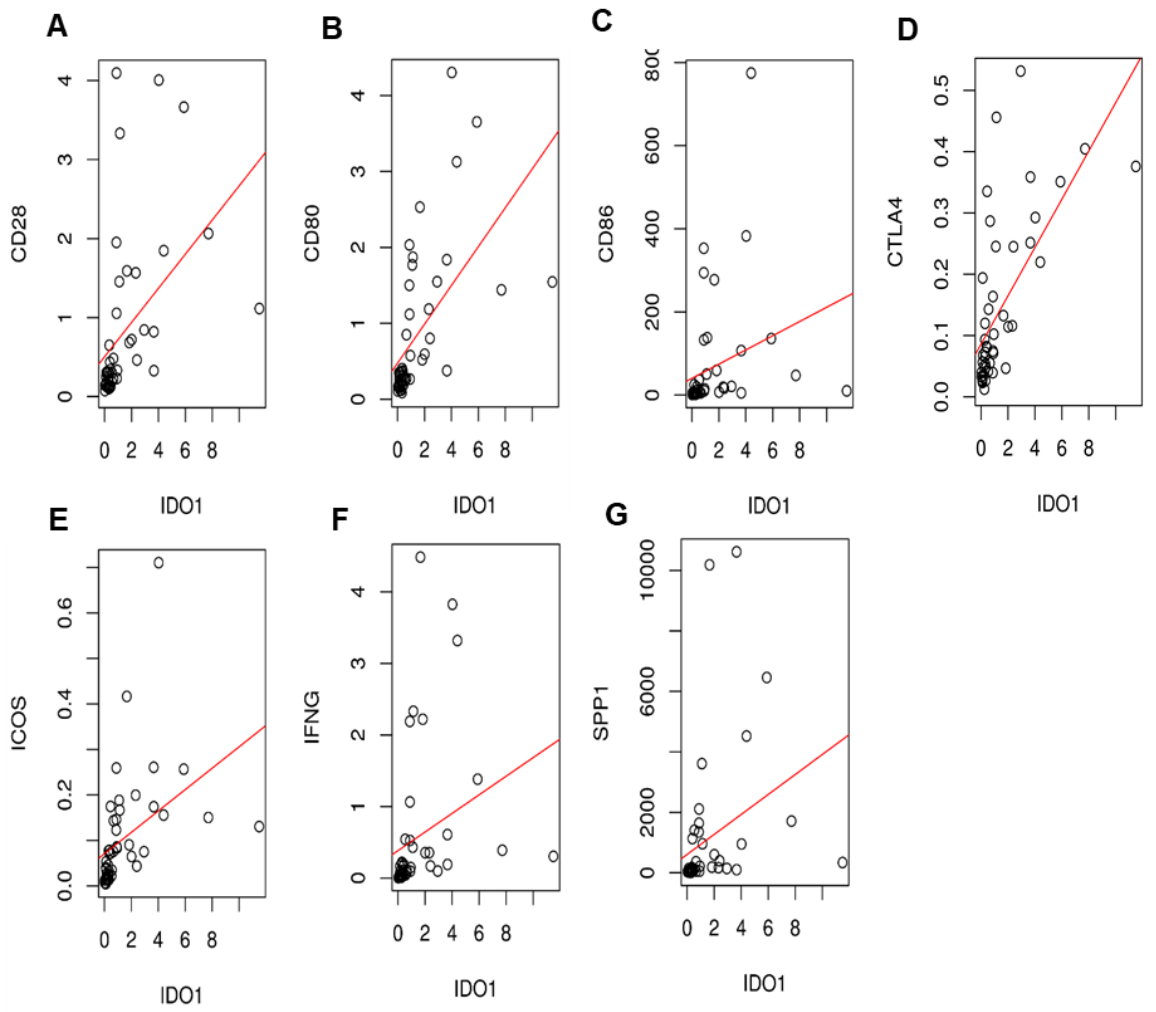


Abbildung 7: Regressionsgeraden der Zielgene mit den höchsten Korrelationskoeffizienten in Abhängigkeit von IDO1 für alle eingeschlossenen Patienten (n=48) der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017

CD=Cluster of Differentiation; CTLA4=zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; ICOS=induzierbarer T-Zell-Kostimulator; IDO=Indolamin-2,3-dioxygenase; IFNG=Interferon gamma; SPP1=Osteopontin); rot=Regressionsgerade; X-Achse: Expressionslevel IDO1; Y-Achse: Expressionslevel korrelierendes Gen; CD28(A), CD80(B), CD86(C), CTLA4(D), ICOS(E), IFNG(F), SPP1(G)

Tabelle 19: Korrelationsanalyse IDO1 verkalkt vs. insuffizient bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017

*CD = Cluster of Differentiation; CTLA4 = zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; FOXP3 = Forkhead-Box-Protein P3; ICOS = induzierbarer T-Zell-Kostimulator; IDO=Indolamin-2,3-dioxygenase; IFNG=Interferon gamma; IL=Interleukin; MMP=Matrixmetalloproteinase; SPP1=Osteopontin; TGFB=transformierender Wachstumsfaktor Beta; TNC=Tenascin C; KÖF=Klappenöffnungsfläche; Δp_{max}=maximaler Druckgradient; RNAKonz=RNA-Konzentration; A260/280=Verhältnis der optischen Dichte zwischen 260 nm und 280 nm; RIN = RNA Integrity; *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001*

IDO1 verkalkt

Zielgen	tau	p-Wert	Zielgen	tau	p-Wert
CD74	0,48	<0,0001***	**MMP3**	0,29	0,01*
CD28	0,55	<0,0001***	**MMP9**	0,28	0,01*
CD4	0,36	0,001**	**SPP1**	0,54	<0,0001***
CD80	0,58	<0,0001***	**TGFB1**	0,47	<0,0001***
CD86	0,51	<0,0001***	**TNC**	0,40	0,0004***
CTLA4	0,59	<0,0001***	**KÖF**	-0,22	0,09
FOXP3	0,50	<0,0001***	**Δp_{max}**	-0,02	0,89
ICOS	0,62	<0,0001***	**Alter**	0,07	0,55
IFNG	0,59	<0,0001***	**Lagerungsdauer**	-0,15	0,19
IL10	0,49	<0,0001***	**RNAKonz**	-0,23	0,04*
MMP1	0,27	0,02*	**A260/280**	-0,11	0,33
MMP2	0,39	0,0005***	**RIN**	-0,18	0,12

IDO1 insuffizient

Zielgen	tau	p-Wert	Zielgen	tau	p-Wert
CD74	0,00	1,00	**MMP3**	-0,28	0,30
CD28	0,28	0,30	**MMP9**	0,17	0,53
CD4	0,44	0,10	**SPP1**	0,61	0,02*
CD80	0,50	0,06	**TGFB1**	0,33	0,21
CD86	0,56	0,04*	**TNC**	0,17	0,53
CTLA4	0,39	0,14	**KÖF**	0,00	1,00
FOXP3	0,00	1,00	**Δp_{max}**	0,47	0,19
ICOS	0,39	0,14	**Alter**	0,46	0,09
IFNG	0,56	0,04*	**Lagerungsdauer**	-0,39	0,14
IL10	-0,17	0,53	**RNAKonz**	0,33	0,21
MMP1	0,06	0,83	**A260/280**	-0,24	0,39
MMP2	0,17	0,53	**RIN**	0,34	0,21

In Abbildung 8 sind die Regressionsgeraden der Zielgene mit den höchsten Korrelationskoeffizienten unter den verkalkten und insuffizienten Klappen (CD80, CD86, CTLA4, ICOS, IFNG, und SPP1) dargestellt. Für jede biologische Gruppe wurde eine eigene Gerade errechnet. Auffällig ist hierbei, dass die beiden Geraden für CTLA4 beinahe aufeinanderliegen. Diejenigen für CD80 und ICOS

unterscheiden sich nur gering in der Steigung, wobei diese bei der Gruppe der insuffizienten Klappen etwas höher ist. Alle anderen Regressionsgeraden unterscheiden sich deutlich. Bei allen dargestellten Genen gibt es einzelne Werte, die weit vom Verlauf der jeweiligen Gerade abweichen.

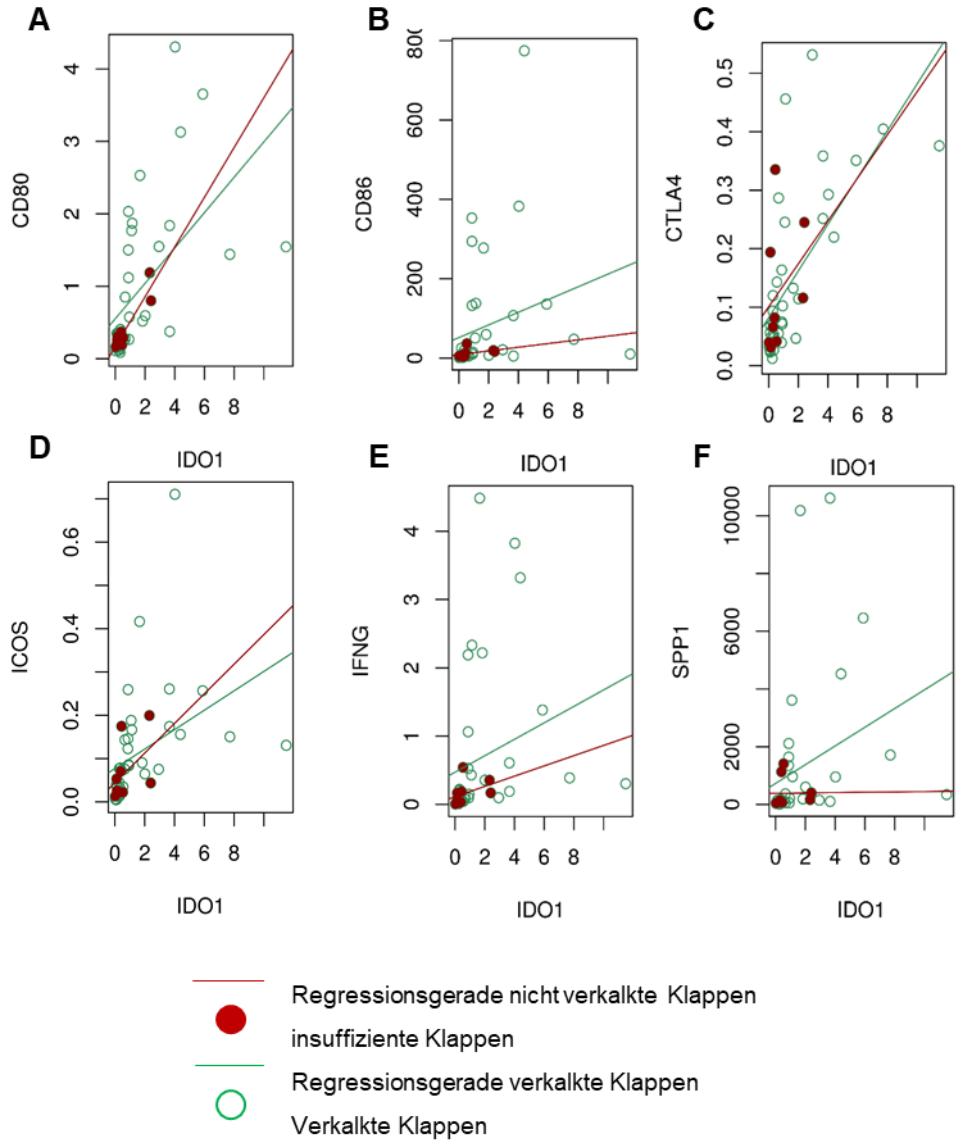


Abbildung 8: Regressionsgeraden der Zielgene mit den höchsten Korrelationskoeffizienten in Abhängigkeit von IDO1 differenziert in die biologischen Gruppen bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017

CD=Cluster of Differentiation; CTLA4=zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; IDO1=Indolamin-2,3-dioxygenase 1; ICOS=induzierbarer T-Zell-Kostimulator; IFNG=Interferon gamma; SPP1=Osteopontin; X-Achse: Expressionslevel IDO1; Y-Achse: Expressionslevel korrelierendes Gen; CD80 (A), CD86 (B), CTLA4 (C), ICOS (D), IFNG (E), SPP1 (F)

3.4.2 Marker regulatorischer T-Zellen.

Die erste Gruppe untersuchter Gene umfasst Oberflächenmoleküle, die von regulatorischen T-Zellen exprimiert werden. Dazu gehören CD4, CD28, CTLA4, FOXP3 und ICOS. Die antiinflammatorischen Zytokine IL10 und TGFB1 werden auch in diese Gruppe aufgenommen, da sie unter anderem von regulatorischen T-Zellen produziert werden können. In Tabelle 20 wurden die Korrelationswerte für die Gesamtgruppe vergleichend mit den biologischen Gruppen „Verkalkt“ und „Insuffizient“ dargestellt. Kendall‘s Tau ist sowohl bei Betrachtung aller 48 eingeschlossenen Proben insgesamt, als auch innerhalb der Gruppe „Verkalkt“ durchgehend unterhalb des Signifikanzniveaus von α=0,05. Die insuffizienten Klappen weisen nicht in allen Fällen signifikante Werte auf.

Tabelle 20: Korrelationsanalyse (Kendall‘s Tau) der Marker regulatorischer T-Zellen und antiinflammatorischer Zytokine bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017

*CD=Cluster of Differentiation; CTLA4=zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; FOXP3= Forkhead-Box-Protein P3; ICOS=induzierbarer T-Zell-Kostimulator; IL=Interleukin; TGFB=transformierender Wachstumsfaktor Beta; *p<0,05, **p<0,01 ***p<0,001*

	Gesamt	Verkalkt	Insuffizient
Zielgen	**CD4**	**CD4**	**CD4**
CD28	0,47***	0,50***	0,51*
CTLA4	0,38***	0,35**	0,60*
FOXP3	0,53***	0,51***	0,42
ICOS	0,57***	0,57***	0,69**
IL10	0,40***	0,41***	0,24
TGFB1	0,64***	0,62***	0,73**

	Gesamt	Verkalkt	Insuffizient
Zielgen	**FOXP3**	**FOXP3**	**FOXP3**
ICOS	0,44***	0,43***	0,56*
IL10	0,43***	0,40***	0,38
TGFB1	0,71***	0,77***	0,24

Zielgen	ICOS	ICOS	ICOS
IL10	0,46***	0,53***	0,38
TGFB1	0,52***	0,52***	0,51*

Zielgen	CD28	CD28	CD28
CTLA4	0,44***	0,45***	0,38
FOXP3	0,44***	0,49***	0,20
ICOS	0,55***	0,55***	0,56*
IL10	0,57***	0,67***	0,47
TGFB1	0,60***	0,64***	0,60*

Zielgen	IL10	IL10	IL10
TGFB1	0,49***	0,51***	0,42

Zielgen	CTLA4	CTLA4	CTLA4
FOXP3	0,46***	0,48***	0,29
ICOS	0,51***	0,49***	0,56*
IL10	0,45***	0,50***	0,29
TGFB1	0,46***	0,43***	0,51*

Die Expressionswerte für CD4 korrelieren für alle Klappen am meisten mit TGFB1 (tau=0,64), ICOS (tau=0,57) und FOXP3 (tau=0,53). TGFB1 korreliert auch bei den

verkalkten Klappen stark mit CD4 (tau=0,62). Mit einem signifikanten Tau-Wert von 0,73 ist die Korrelation allerdings in der Gruppe der insuffizienten Klappen am größten. Auch bei ICOS liegt eine signifikante Korrelation mit CD4 von tau=0,69 bei den insuffizienten Klappen vor. Weitere Signifikanzen der insuffizienten Klappen mit CD4 treten für CD28 (tau=0,51) und CTLA4 (tau=0,6) auf. CD28 weist für alle Klappen betrachtet hohe Korrelationen mit ICOS (tau=0,55), IL10 (tau=0,57) und TGFB1 (tau=0,60) auf. Bei den verkalkten Klappen sind die Tau-Werte für IL10 (tau=0,67) und TGFB1 (tau=0,64) mit CD28 noch höher. Weitere signifikante Werte treten für CD28 bei den insuffizienten Klappen mit ICOS (tau=0,56) und TGFB1 (tau=0,60) auf. CTLA4 weist für alle Herzklappen nur mit ICOS (tau=0,51) eine Korrelation auf, die größer als tau=0,5 ist. Für die verkalkten Klappen erreicht außerdem noch IL10 mit CTLA4 eine Korrelation von tau=0,5. Die insuffizienten Aortenklappen haben im Vergleich höhere Werte für Tau. Hier korreliert CTLA4 signifikant mit ICOS (tau=0,56) und TGFB1 (tau=0,51). Bei FOXP3 sind die Zusammenhänge bei allen Herzklappen für TGFB1 (tau=0,71) am größten. Die verkalkten Klappen haben allerdings für FOXP3 mit TGFB1 (tau=0,77) noch eine stärkere Korrelation. Bei Betrachtung der Gruppe „Insuffizient“ fällt auf, dass FOXP3 nur noch mit tau=0,24 nicht signifikant mit TGFB1 korreliert. Das Signifikanzniveau wird hier nur für FOXP3 und ICOS mit tau=0,56 unterschritten. Der Zusammenhang von ICOS mit TGFB1 besitzt einen errechneten Korrelationskoeffizienten von tau=0,52. Für die verkalkten Klappen beträgt die Korrelation ebenfalls 0,52 und auch die Gruppe „Insuffizient“ weist eine signifikante Korrelation von tau=0,51 für diese beiden Zielgene auf. IL10 und TGFB1 zeigen nur in Bezug auf die Gesamtheit der Herzklappen (tau=0,49) und die Gruppe „Verkalkt“ (tau=0,51) signifikante Werte.

3.4.3 Marker der APCs

Als Oberflächenmoleküle der antigenpräsentierenden Zellen wurden CD80, CD86 und CD74 auf Korrelationen untereinander analysiert (Tabelle 21).

Tabelle 21*:* Korrelationsanalyse (Kendall's Tau) der Marker antigenpräsentierender Zellen der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017
*CD=Cluster of Differentiation; *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001*

	Gesamt	**Verkalkt**	**Insuffizient**
Zielgen	**CD74**	**CD74**	**CD74**
CD80	0,58***	0,61***	0,24
CD86	0,39***	0,44***	0,02

Zielgen	**CD80**	**CD80**	**CD80**
CD86	0,65***	0,68***	0,51*

Die höchsten Korrelationen für die Herzklappen in ihrer Gesamtheit sind bei CD80 mit CD86 (tau=0,65) und CD80 mit CD74 (tau=0,58) zu finden. Bei den verkalkten Klappen zeigen sich noch stärkere Korrelationen, sodass CD80 mit einem Korrelationskoeffizienten von tau=0,68 mit CD86 und von tau=0,61 mit CD74 korreliert. Bei Betrachtung der Gruppe „Insuffizient" kommt es nur bei CD80 und CD86 zu einer signifikanten Korrelation (tau=0,51).

3.4.4 Marker der TH1-Zellen

In die Gruppe der Zielgene, die mit TH1-Zellen in Zusammenhang stehen, wird der Oberflächenmarker CD4, sowie das von TH1-Zellen produzierte Zytokin IFNG gezählt. Zwischen diesen beiden Genen ist Kendall's Tau für die Gesamtheit der Klappen (tau=0,45) und die verkalkten Klappen (tau=0,47) signifikant. Die Korrelation der Zielgene bei den insuffizienten Klappen ist dagegen nicht signifikant.

3.4.5 Matrixenzyme und -glykoproteine

Als Biomarker für den Zellstoffwechsel und die Remodelingprozesse der extrazellulären Matrix wurde ebenfalls nach der mRNA verschiedener Matrixenzyme und -glykoproteine gesucht. Hierzu gehörten die Matrixmetalloproteinasen 1,2,3 und 9 sowie TNC und SPP1 (Tabelle 22).

Tabelle 22: Korrelationsanalyse (Kendall's Tau) der Matrixenzyme und -glykoproteine bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017
*MMP=Matrixmetalloproteinase; SPP1=Osteopontin; TNC=Tenascin C; *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001*

	Gesamt	Verkalkt	Insuffizient
Zielgen	**MMP1**	**MMP1**	**MMP1**
MMP2	0,03	0,12	-0,38
MMP3	0,25*	0,36**	-0,02
MMP9	0,28**	0,34**	0,20
TNC	0,29**	0,29**	0,11
SPP1	0,37***	0,34**	0,56*

Zielgen	**MMP2**	**MMP2**	**MMP2**
MMP3	-0,06	0,06	-0,51*
MMP9	-0,03	0,05	-0,29
TNC	0,54***	0,60***	0,42
SPP1	0,29**	0,39***	-0,11

	Gesamt	Verkalkt	Insuffizient
Zielgen	**MMP3**	**MMP3**	**MMP3**
MMP9	0,25*	0,29**	0,07
TNC	0,01	0,13	-0,29
SPP1	0,25*	0,33**	-0,02

Zielgen	**MMP9**	**MMP9**	**MMP9**
TNC	0,07	0,10	0,11
SPP1	0,34***	0,34**	0,47

Zielgen	**TNC**	**TNC**	**TNC**
SPP1	0,32**	0,36**	0,29

Zwischen den verschiedenen MMPs sind die höchsten Korrelationen zwischen MMP1 und MMP3 (tau=0,36) und MMP1 und MMP9 (tau=0,34) bei der biologischen Gruppe „Verkalkt" zu finden. Auffällig ist hier die signifikant negative Korrelation (tau=-0,51) von MMP2 und MMP3 in der Gruppe „Insuffizient". Ansonsten gibt es keine weiteren Signifikanzen für die Korrelationen zwischen den einzelnen MMPs. Für TNC lassen sich relativ hohe Korrelationen mit MMP2 nachweisen. Hier beträgt Tau für alle Herzklappen 0,54 und für die Gruppe „Verkalkt" 0,60. Der p-Wert ist jeweils kleiner als 0,001. TNC korreliert mit keinem anderen Zielgen signifikant in der Gruppe der insuffizienten Herzklappen.

SPP1 korreliert mit allen MMPs in der Gesamtansicht und bei den verkalkten Herzklappen signifikant mit Tau-Werten zwischen 0,25 und 0,39. Bei den insuffizienten Klappen liegt die einzige signifikante Korrelation zwischen SPP1 und MMP1 mit tau=0,56.

3.4.6 Korrelationen anderer Parameter

Zusätzlich zu der Analyse der Korrelationen zwischen den einzelnen Zielgenen wurden weiterführend noch weitere Kenngrößen gemessen und auf mögliche Beziehungen untersucht. Dazu gehören als Determinanten für die Funktion der Aortenklappen die KÖF und Δp_{max}. Weitere Parameter waren das Alter des Patienten, die Lagerungsdauer der Probe in Kühlschrank und -80 °C Gefrierschrank

bis zur Weiterverarbeitung; sowie verschiedene Messwerte zur Beurteilung der RNA. Hierbei handelte es sich um die Konzentration der gewonnenen RNA, das Absorptionsverhältnis A260/A280 und die RIN-Werte der einzelnen Proben. Die Korrelationsanalyse wurde zwischen den in diesem Abschnitt aufgeführten Parametern und zwischen den Parametern und den Zielgenen durchgeführt. Da es jedoch nur vereinzelt zu signifikanten Korrelationen kam, sind in Tabelle 23 lediglich die Korrelationen von KÖF und RNA-Konzentration aufgeführt (Korrelationen aller anderen Parameter siehe Anhang Tabelle 28-33).

Bei der Betrachtung der Korrelationen der Zielgene mit der Klappenöffnungsfläche fällt auf, dass es sich bei der Klappengesamtheit und der Untergruppe „Verkalkt“ größtenteils um negative Zusammenhänge handelt. Die stärksten signifikant negativen Korrelationen gibt es für die KÖF bei der Klappengesamtheit mit TNC (tau=-0,40), MMP2 (tau=-0,30), CD80 und CD28 (jeweils tau=-0,27). Die Gruppe „Verkalkt“ weist die stärksten signifikant negativen Korrelationen bei MMP2 (tau=-0,37), CTLA4 (tau=-0,30) und TNC (tau=-0,27) auf. Bei den Herzklappen aus der Gruppe „Insuffizient“ wurde lediglich bei SPP1 (tau=0,80) ein signifikanter Wert erreicht. Auffällig ist bei der Gruppe „Insuffizient“, dass die Korrelationen mit Ausnahme von MMP1 (tau=-0,6) und TGFB1 (tau=-0,2) zwar nicht signifikant sind aber tendenziell nun positiv ausfallen. Ein weiterer hochsignifikanter Wert ist Kendall‘s Tau von KÖF und Δp_{max} (tau=-0,43) für alle Herzklappen.

Tabelle 23: Korrelationsanalyse KÖF und RNA-Konzentration der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017

*CD=Cluster of Differentiation; CTLA4=zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; FOXP3=Forkhead-Box-Protein P3; ICOS=induzierbarer T-Zell-Kostimulator; IDO=Indolamin-2,3-dioxygenase; IFNG=Interferon gamma; IL=Interleukin; MMP=Matrixmetalloproteinase; SPP1=Osteopontin; TGFB=transformierender Wachstumsfaktor Beta; TNC=Tenascin C; KÖF=Klappenöffnungsfläche; Δp_{max}=maximaler Druckgradient; RNAKonz=RNA-Konzentration; A260/280=Verhältnis der optischen Dichte zwischen 260 nm und 280 nm; RIN=RNA Integrity Number *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001*

	Gesamt	Verkalkt	Insuffizient	Gesamt	Verkalkt	Insuffizient
	KÖF	KÖF	KÖF	RNAKonz	RNAKonz	RNAKonz
CD4	-0,13	-0,17	0,20	-0,09	-0,14	0,24
CD28	-0,27*	-0,24	0,40	-0,24*	-0,23*	-0,07
CD74	-0,16	-0,07	0,00	-0,12	-0,12	0,07
CD80	-0,27*	-0,22	0,60	-0,25*	-0,26*	-0,07
CD86	-0,25*	-0,26*	0,40	-0,29**	-0,37***	-0,02
CTLA4	-0,24*	-0,30*	0,00	-0,05	-0,05	0,20
FOXP3	-0,05	-0,16	0,40	-0,03	-0,02	-0,16
ICOS	-0,22	-0,25	0,20	-0,22*	-0,24*	-0,07
IDO1	-0,26*	-0,22	0,00	-0,14	-0,23*	0,33
IFNG	-0,26*	-0,24	0,40	-0,24*	-0,30**	-0,02
IL10	-0,12	-0,22	0,20	-0,14	-0,15	-0,33
MMP1	-0,24*	-0,14	0,60	-0,13	-0,14	0,11
MMP2	-0,30*	-0,37**	-0,60	-0,01	-0,01	-0,02
MMP3	0,10	-0,03	0,60	-0,28**	-0,36**	-0,29
MMP9	0,13	0,07	0,40	0,02	0,00	0,02
SPP1	-0,20	-0,19	0,80*	-0,20*	-0,29*	0,11
TGFB1	-0,11	-0,11	-0,20	-0,07	-0,13	0,16
TNC	-0,40***	-0,27*	0,40	-0,11	-0,09	0,02
KÖF	-	-	-	0,10	0,11	-0,40
Δp_{max}	-0,43***	-0,28	-0,60	0,02	0,04	0,71*
Alter	-0,10	-0,16	0,40	-0,16	-0,25*	0,11
Lagerungsdauer	0,17	0,13	0,20	0,02	0,08	-0,42
RNAKonz	0,10	0,11	-0,40	-	-	-
A260/280	0,21	0,07	0,53	0,20	0,31**	-0,19
RIN	0,04	-0,02	0,22	0,28**	0,25*	0,35

Für die Korrelationen der RNA-Konzentration mit den Zielgenen liegen ebenfalls meist negative Werte vor. Die niedrigsten signifikant negativen Korrelationen sind hier für alle Klappen bei CD86 (tau=-0,29), MMP3 (tau=-0,28) und CD80 (tau=-0,25) zu finden. Bei der Gruppe „Verkalkt“ handelt es sich bei den niedrigsten signifikant negativen Zusammenhängen um CD86 (tau=-0,37), MMP3 (tau=-0,36) und IFNG (tau=-0,30). Die Gruppe „Insuffizient“ weißt keinerlei Signifikanzen auf. In Bezug auf die weiteren Parameter gibt es einen signifikanten Zusammenhang zwischen RNA-Konzentration und maximalem Druckgradienten (tau=0,71). Außerdem korreliert für

die Klappengesamtheit die RIN positiv mit der RNA-Konzentration (tau=0,28) und für die verkalkten Klappen sind signifikante Korrelationen zwischen A260/280 (tau=0,31) und RIN (tau=0,25) bezogen auf die RNA-Konzentration sichtbar.

3.5 Ergebnisse der Kontrollversuche

3.5.1 NTC und -RT

Mit der Durchführung einer NTC sollten mögliche Kontaminationen der jeweiligen Probe detektiert werden. Dafür wurde für jeden Reaktionsansatz eine NTC pipettiert. Insgesamt gab es somit 20 Kontrollen pro Platte. Bei insgesamt 12 der Ansätze aus der gesamten Versuchsreihe wurden Amplifikationen gemessen. Dies entspricht 1,1% aller NTCs. Zur Veranschaulichung bei welchen Zielgenen in welcher Anzahl unter den NTCs Amplifikationen messbar waren, dient Tabelle 24. Von den positiven NTCs befanden sich lediglich die zwei Ansätze von RPL13A und RPS18 auf derselben 96-Well-Platte einer Aortenklappe.

Tabelle 24: Positive Negativkontrolle der Matrizenstränge (NTC) bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017

$C_{T\ min}$=minimal erreichter Schwellenzyklus einer NTC für das entsprechende Zielgen; x von 48=Anzahl der positiven NTC unter den insgesamt durchgeführten NTCs für jedes Zielgen (n=jeweils 48); CD=Cluster of Differentiation; GAPDH=Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase; IL=Interleukin; RPL13A=Ribosomales Protein L13A; RPS18=Ribosomales Protein S18; SPP1=Osteopontin; TGFB=transformierender Wachstumsfaktor Beta; TNC=Tenascin C;

Zielgen	x von 48	$C_{T\ min}$
CD4	1	34,70
CD80	1	33,37
GAPDH	1	39,42
IL10	1	30,30
RPL13A	1	25,68
RPS18	1	34,91
SPP1	4	35,68
TNC	2	39,19

Wie bereits erwähnt wurde für jeden Primer, der keine Exon-Exon-Grenze überbrückt, einmal pro 96-Well-Platte eine -RT-Kontrolle durchgeführt. Bei den betreffenden Assays handelte es sich um CD28, FOXP3, GAPDH, IDO1, MMP9 RPL13A und RPS18. 22 der 48 Proben zeigten für das Zielgen RPL13A messbare Amplifikationen. Bei 6 von 48 Proben waren C_T-Werte für das Referenzgen GAPDH messbar. Ansonsten wurde bei jeweils einem von 48 Ansätzen eine Amplifikation für IDO1, MMP9 und RPS18 detektiert. Auffällig ist der hohe Anteil an genomischer

DNA bei MMP9 (4,04%). In allen anderen Proben betrug die Kontamination weniger als 1% (Tabelle 25).

Tabelle 25: Auswertung der Negativkontrollen der Reversen Transkription (-RT) bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017

GAPDH=Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; IDO=Indolamin-2,3-dioxygenase; MMP=Matrixmetalloproteinase; RPL13A=Ribosomales Protein L13a; RPS18=Ribosomales Protein S18; -RT=Negativkontrolle der Reversen Transkription; ∆=Unterschied in der Zyklusanzahl zwischen dem gemessene C_t-Wert in Probe und -RT-Kontrolle; %=Anteil der genomischen DNA an der Amplifikation

Zielgen	Patient	C_T	-RT	∆	%
GAPDH	1150	21,70	34,83	13,13	**0,01**
GAPDH	1152	21,41	36,75	15,34	**<0,01**
GAPDH	1187	21,86	39,15	17,29	**<0,01**
GAPDH	1205	23,09	37,78	14,70	**<0,01**
GAPDH	1227	21,71	39,09	17,38	**<0,01**
GAPDH	1230	22,58	38,52	15,94	**<0,01**
IDO1	1077	28,83	37,98	9,15	**0,18**
MMP9	1129	33,10	37,73	4,63	**4,04**
RPL13A	1072	14,84	26,38	11,55	**0,03**
RPL13A	1075	14,34	34,71	20,37	**<0,01**
RPL13A	1077	16,66	33,18	16,53	**<0,01**
RPL13A	1080	14,66	34,94	20,28	**<0,01**
RPL13A	1088	17,52	35,56	18,05	**<0,01**
RPL13A	1117	14,96	34,12	19,16	**<0,01**
RPL13A	1122	14,14	30,74	16,60	**<0,01**
RPL13A	1129	14,68	33,91	19,23	**<0,01**
RPL13A	1150	23,57	34,52	10,95	**0,05**
RPL13A	1225	17,04	37,54	20,50	**<0,01**
RPL13A	1230	15,49	35,45	19,97	**<0,01**
RPL13A	1235	14,26	35,20	20,94	**<0,01**
RPL13A	1239	14,75	38,81	24,06	**<0,01**
RPL13A	1248	16,96	32,83	15,87	**<0,01**
RPL13A	1249	14,61	34,27	19,66	**<0,01**
RPL13A	1258	15,39	39,31	23,93	**<0,01**
RPL13A	1259	14,59	33,07	18,48	**<0,01**
RPL13A	1264	14,53	32,22	17,68	**<0,01**
RPL13A	1265	14,32	36,90	22,57	**<0,01**
RPL13A	1273	15,40	35,33	19,94	**<0,01**
RPL13A	1274	14,47	39,01	24,54	**<0,01**
RPL13A	1279	16,04	38,72	22,68	**<0,01**
RPS18	1150	26,11	36,71	10,60	**0,06**

3.5.2 Gleichförmigkeit der Präamplifikation

Um die Gleichförmigkeit der Präamplifikation zu berechnen, wurde wie bereits beschrieben, die $\Delta\Delta C_T$-Methode angewendet. Dieser Versuch ist nur durchführbar, wenn auch ohne Präamplifikation C_T-Werte gemessen werden können. Da dies bei den in dieser Studie verwendeten Proben für fast alle eingeschlossenen Aortenklappen nicht der Fall war, konnte der Kontrollversuch nur anhand von einem Beispiel durchgeführt werden. Die einzelnen $\Delta\Delta C_T$-Werte sollten im Idealfall möglichst nahe null sein und sich im Bereich ±1,5 befinden. Der Mittelwert der für diesen Versuch gemessenen $\Delta\Delta C_T$-Werte betrug 0,52 ± 2,66. Es befinden sich zehn von 18 $\Delta\Delta C_T$-Werten außerhalb des Bereichs ±1,5 (Tabelle 26).

Tabelle 26: Gleichförmigkeit der Präamplifikation bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017

C_T=Schwellenzyklus; CD=Cluster of Differentiation; CTLA4=zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; FOXP3=Forkhead-Box-Protein P3; ICOS=induzierbarer T-Zell-Kostimulator; IDO1=Indolamin-2,3-dioxygenase 1; IFNG=Interferon gamma; IL=Interleukin; MMP=Matrixmetalloproteinase; SPP1=Osteopontin; TGFB=transformierender Wachstumsfaktor Beta; TNC=Tenascin C

Zielgen	$\Delta\Delta C_T$
CD4	-2,17
CD28	-0,18
CD74	-1,12
CD80	0,51
CD86	3,50
CTLA4	-2,06
FOXP3	6,73
ICOS	-0,93
IDO1	1,28
IFNG	3,30
IL10	-1,15
MMP1	3,84
MMP2	-3,48
MMP3	1,96
MMP9	-0,34
SPP1	2,65
TGFB1	-1,21
TNC	-1,70

3.5.3 Dynamischer Bereich der Reversen Transkription

Um eine Aussage über die Effizienz der RT treffen zu können, wurden Verdünnungsreihen angefertigt und überprüft, ob die Linearität der Expression je eines Zielgens und eines Referenzgenes im Bereich der verwendeten Menge an RNA gewährleistet werden kann. Abbildung 9 stellt diese Ergebnisse für die RNA zweier verschiedener Aortenklappen dar. Die Verdünnungsreihen wurden jeweils für das Zielgen SPP1 und das Referenzgen RPL13A angesetzt. Voraussetzung für das Gelingen des Versuches war, dass es sich um zwei Gene handelte, die ausreichend hoch exprimiert worden waren, um eine Amplifikation über die verschiedenen Verdünnungsschritte hinweg detektieren zu können. Dies traf nur für sehr wenige Gene bei bestimmten Aortenklappen zu. Für beide Primer die pro Versuch eingesetzt wurden, stellte die unverdünnte Probe einen Ausreißerwert dar, der nicht in die Ausgleichsgerade miteinbezogen werden konnte. In den bei dieser Arbeit durchgeführten qPCR-Versuchen wurden jeweils 400 ng RNA eingesetzt. Im Bereich dieser Menge verlaufen die Verdünnungsreihen in Beispiel A annähernd linear, sodass von einer hohen Effizienz der Versuche ausgegangen werden kann. Bei Beispiel B ist für SPP1 im verwendeten RNA-Bereich eine Abweichung von der Linearität festzustellen.

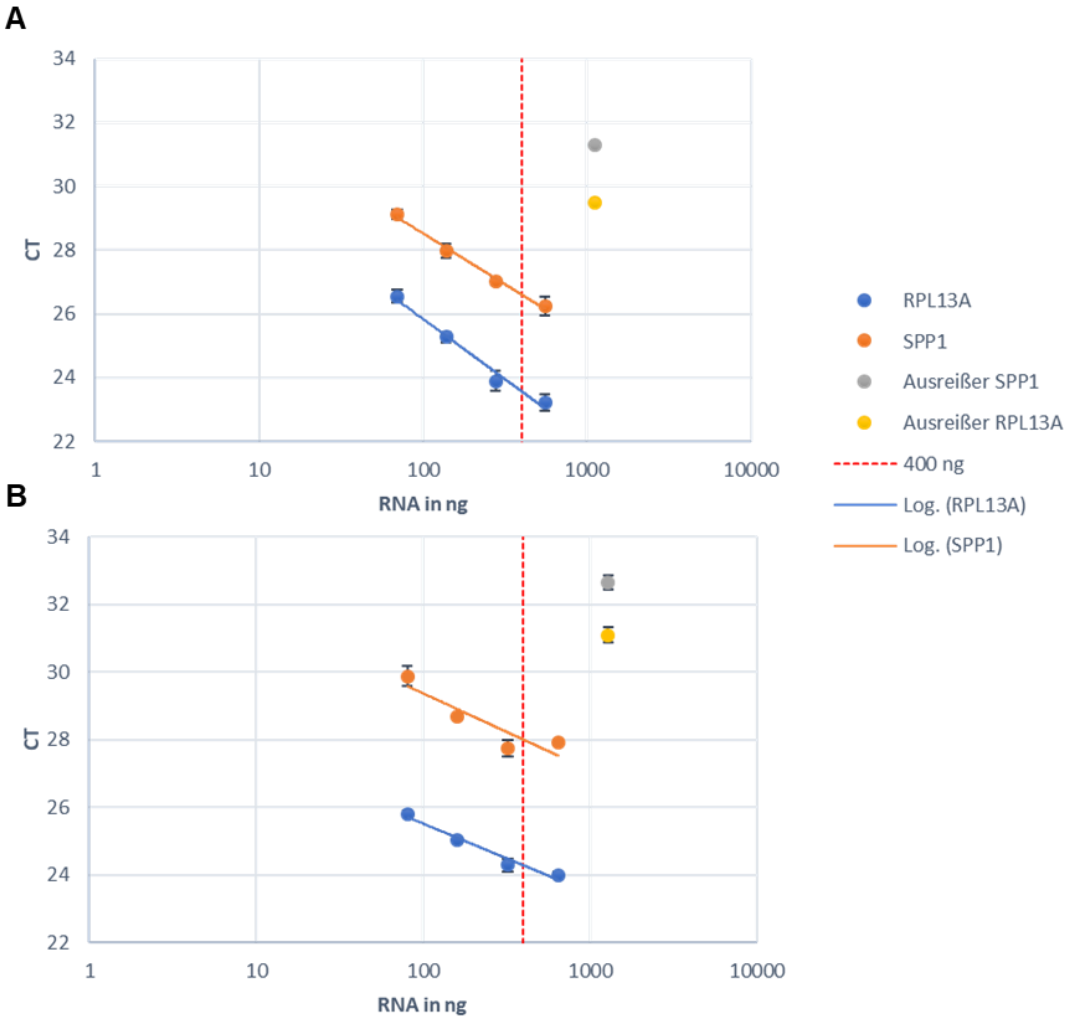


Abbildung 9: Verdünnungsreihen zur Beurteilung der Effizienz der Reversen Transkription (RT) der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017

C_T=Schwellenzyklus; RPL13A=Ribosomales Protein L13a; SPP1=Osteopontin; Log.=logarithmisch; (A) und (B) zeigen den Versuch für zwei verschiedene, verkalkte Aortenklappen für das Referenzgen RPL13A und das Zielgen SPP1 im Vergleich

3.6 Färbung nach von Kossa

Die Gruppe der insuffizienten Klappen wurde im Anschluss an die qPCR-Analysen mikroskopisch beurteilt. Um makroskopisch unsichtbare Kalzifizierungen unter dem Mikroskop zu identifizieren, wurden alle zehn insuffizienten Proben, sowie zum Vergleich Proben der Gruppe der verkalkten Aortenklappen mit der Versilberung nach von Kossa eingefärbt. Mineralisierte Knorpel und Knochenareale stellen sich in dieser Färbung in braun-schwarz und Mineralisationsfronten und Osteoide in grau transparent bis braun-schwarz granuliert dar.

In Abbildung 10 A und 10 B kommen zwei verschiedene insuffiziente Klappen zur Darstellung, die repräsentativ für alle Aortenklappen der Gruppe sind. Die großen schwarzen Pfeile zeigen hierbei auf feine schwarze Pünktchen, die über das ganze Gewebe verteilt auftraten und mit 20- und 40-facher Vergrößerung gut sichtbar sind. Veränderungen dieser Art waren bei den Proben der vorliegenden Arbeit nicht über die ganze Herzklappe verteilt, sondern ließen sich stellenweise mehr oder weniger ausgeprägt in allen Gewebeproben der Gruppe „Insuffizient“ nachweisen.

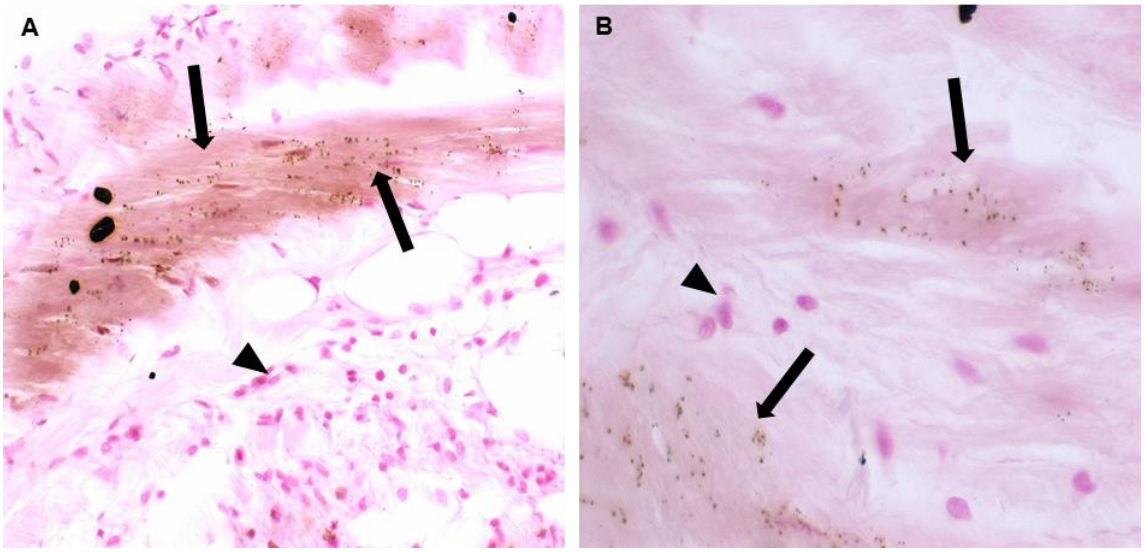


Abbildung 10: Von Kossa-Färbung zweier insuffizienter Aortenklappen bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017

Vergrößerung 20x (A), 40x (B); schwarze Pfeile: Zonen mit Kalziumablagerungen, als braun-schwarze Punkte darstellbar; Pfeilspitzen: Zellkerne, sichtbar durch Gegenfärbung mit Kernechtrot.

Abbildung 11 zeigt zum Vergleich das Bild einer verkalkten Herzklappe. Hier ist eine deutlich ausgeprägte schwarze Kalkschicht am Rande des Gewebes darstellbar.

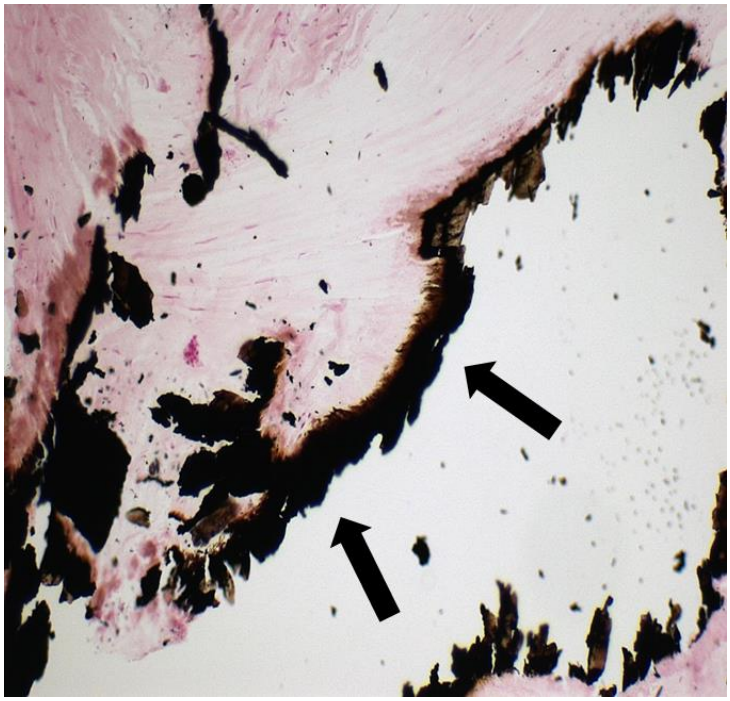


Abbildung 11: Von Kossa-Färbung einer verkalkten Aortenklappe bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017
Vergrößerung 20x; schwarze Pfeile: schwarz angefärbte Kalziumablagerungen

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit, welche die Entzündungsmarker in degenerierten und insuffizienten Herzklappen analysierte, wurde lediglich bei den Matrixumbauenzymen MMP1 und TNC ein signifikanter Unterschied zwischen den biologischen Gruppen nachgewiesen. Es fiel allerdings auf, dass es in der Gruppe der verkalkten Aortenklappen bei fast jedem Zielgen, insbesondere auch bei IDO1, Unterschiede in der Verteilung der Messwerte gab. Einige Werte fielen als deutlich erhöhte Ausreißer auf. Zwischen bikuspiden und trikuspiden Herzklappen war für kein Zielgen ein signifikanter Unterschied messbar. Die Korrelationsanalysen zwischen den Zielgenen ergaben in fast allen Fällen signifikant positive Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Genen. Am Ende der Versuchsreihe wurde eine von Kossa-Färbung durchgeführt, die in den insuffizienten Klappen kleinste Mineralisationsherde sichtbar machte. Trotz der fehlenden Signifikanzen für die Parameter im Gruppenunterschied, kann man aufgrund der teils großen Varianz der Expressionslevel bei den verkalkten Klappen die Schlussfolgerung ziehen, dass die IDO1-assoziierten Stoffwechselwege analog zur Atherosklerose auch bei der Aortenklappenstenose für eine Subgruppe der Patienten eine Rolle spielen. Dies sollte in zukünftigen Arbeiten noch über eine Erhöhung der Fallzahl und eine genaue mikroskopische Untersuchung des Kontrollgewebes verifiziert werden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Patientenpopulation

Die Geschlechterverteilung der eingeschlossenen Patienten mit verkalkten Herzklappen spiegelt wieder, dass es sich bei der degenerativen Aortenklappenerkrankung um eine Erkrankung handelt, die bei Männern häufiger auftritt, als bei Frauen [109]. Auch das Fehlen von bikuspiden Aortenklappen in der Gruppe der insuffizienten Herzklappen ist nicht überraschend, da diese im Regelfall erst durch die verkalkende Stenose diagnostiziert werden, die schon ab der zweiten Lebensdekade auftreten kann, und nicht aufgrund der Insuffizienz [7]. Die KÖF der

biologischen Gruppen lässt eine Einteilung der verkalkten Klappen als hochgradig stenosiert und der insuffizienten Klappen als nicht stenosiert zu. Der Δp_{max} relativiert dies, da dessen Median für die insuffizienten Klappen laut der Klassifikation der American Heart Association einer leichten Aortenklappenstenose entspricht [74]. Die Patienten, die der Gruppe „Insuffizient“ zugeordnet worden waren, litten entweder an einer reinen Aortenklappeninsuffizienz oder an einem kombinierten Aortenklappenvitium, bei dem die Insuffizienz aber die führende Komponente darstellte. Es konnten auf diese Weise zwar Einteilungskriterien für die beiden biologischen Gruppen geschaffen werden, allerdings stellte sich die Frage, ob die Trennschärfe durch das teilweise auftretende kombinierte Vitium in ausreichender Form gewährleistet ist.

4.2.2 Verkalkte im Vergleich zu insuffizienten Aortenklappen

Expressionsanalyse

Die vorliegende Studie basiert auf der „Tampere Vascular Study“ von Niinisalo et al., die atherosklerotisch verändertes Gewebe im Vergleich mit gesundem Kontrollgewebe im Hinblick auf verschiedener Entzündungsmarker untersuchten und für einige Gene signifikante Unterschiede feststellten [73]. Da die Initiationsphase einer Aortenklappenstenose der Entstehung von Atherosklerose ähnelt, untersuchte unsere Studie, ob vergleichbare Regulationsmechanismen über Veränderungen der Genexpression bestimmter inflammatorischer Marker auch bei der Aortenklappendegeneration nachgewiesen werden können.

Beim Vergleich der Expressionslevel von verkalkten und insuffizienten Aortenklappen wurde im Gegensatz zu der „Tampere Vascular Study“ nur für die Matrixenzyme MMP1 und TNC eine signifikant höhere Expression in erkrankten Aortenklappen nachgewiesen. Die einzige breit gefächerte Genanalyse von verkalkten im Vergleich zu gesunden Herzklappen wurde von Bossé et al im Jahr 2009 veröffentlicht. Es traten signifikante Unterschiede bei mehreren Matrixmetalloproteinasen (1,7,9 und 12) auf. Für TGFB1, IL10 und weitere inflammatorische Parameter gab es analog zu unserer Studie keinen signifikanten Unterschied [20]. Bis heute gibt es keine Studie, die erkrankte Aortenklappen im Hinblick auf IDO1 und die Stoffwechselwege, die in der „Tampere Vascular Study“

etabliert wurden, untersucht. Veränderungen im Bereich der Genexpression geschehen in einer frühen Phase der Erkrankung, in der auf makroskopischer Ebene noch keine Veränderungen sichtbar sind. Wahrscheinlich war die Altersgruppe der in der vorliegenden Studie eingeschlossenen Patienten ungeeignet, um frühe Veränderungen der Genexpression an den Klappen feststellen zu können. Bei jüngeren Patienten wäre die Wahrscheinlichkeit höher gewesen, unverändertes Gewebe zu erhalten, da die Prävalenz der Aortenklappensklerose mit dem Alter zunimmt [19]. Die insuffizienten Aortenklappen, die hier als Kontrolle verwendet worden waren, waren bei unserem Patientenkollektiv, dessen Median bei 68,0 Jahren liegt, bereits so verändert, dass das Genexpressionsmuster dem der verkalkten Proben stark ähnelte.

Die Rolle der Ausreißer

Bei der Betrachtung der Boxplots von verkalkten und insuffizienten Aortenklappen im Vergleich fiel auf, dass gerade bei der biologischen Gruppe „Verkalkt“ einige Ausreißerwerte zu finden waren. Da dies nur bei einer Untergruppe der Patienten dieser Gruppe auftrat, konnte hierfür keine statistische Auswertung durchgeführt werden. Verglich man diese Ausreißer für IDO1 mit den Ausreißern bei den anderen Zielgenen, so konnte festgestellt werden, dass es sich bei den Patienten mit den hohen Expressionswerten in einem Großteil der Fälle um dieselben handelte. Der IDO1-Stoffwechselweg schien demnach zumindest bei einem Teil der Studienpopulation eine Rolle zu spielen.

4.2.3 Bikuspide im Vergleich zu trikuspiden Aortenklappen

Patienten mit einer bikuspiden Aortenklappe erkranken im Durchschnitt zehn Jahre früher an einer Aortenklappenstenose, als Patienten mit einer trikuspid angelegten Herzklappe [7]. Dieser Altersunterschied wurde auch bei unserem Studienkollektiv in Form eines signifikanten Unterschiedes je nach Anzahl der Taschen der Aortenklappe sichtbar. Die im Median größere KÖF und der geringere Druckgradient bei den trikuspiden Herzklappen ließen auf eine weniger weit fortgeschrittene Erkrankung schließen. Die gewonnene RNA-Menge war bei den trikuspiden Aortenklappen geringer. Dies war nicht zu erwarten, wenn man davon ausging, dass die trikuspiden Herzklappen weniger verkalkt waren als die bikuspiden. Die Unabhängigkeit des Verkalkungsgrades von der Qualität der

extrahierten RNA zeigt sich durch die fehlende Korrelation der Qualitätsparameter A260/280 und RIN.

Eine Studie von Hamatani et al. zeigte, dass zwischen bikuspiden und trikuspiden stenotischen Aortenklappen kein Unterschied in Bezug auf den Schweregrad der Inflammation, die Kalziumablagerung und die Neovaskularisierung existiert. Die Bikuspidalität hatte einen Einfluss auf den Fibrosegrad der Herzklappe, der höher war als bei trikuspiden Herzklappen. Die stark ausgeprägte Fibrose als Reaktion auf eine chronische Inflammation bei bikuspiden Aortenklappen wäre ein möglicher Auslöser für die frühe Entstehung der Aortenklappenstenose.

Auch die Expression von Tenascin C ist bei bikuspiden Aortenklappen ausgeprägter, als bei trikuspiden [36]. In histologischen und immunhistologischen Analysen wurde bisher kein Unterschied in Bezug auf das inflammatorische Infiltrat zwischen bikuspider Aortenklappe und trikuspider Aortenklappe festgestellt [108]. Ebenso gibt es bislang keine Hinweise auf einen Stoffwechselweg bei bikuspiden Aortenklappen, der über regulatorische T-Zellen moduliert wird. Die Expression des T_{reg}-Markers FOXP3 war in der Studie von Folkersen et al. sowohl für bikuspide als auch für trikuspide Herzklappen gering. Hier wurden die Gewebeproben allerdings aus der Aorta entnommen und nicht aus den Herzklappen direkt [26]. In unserer Arbeit unterschied sich die Expression der Zielgene von bikuspiden und trikuspiden Klappen nicht signifikant. Es gab demnach keinen Hinweis auf Unterschiede in Bezug auf Inflammation oder Umbauprozesse, die abhängig von der Anzahl der Taschen der Aortenklappe waren.

Im Gegensatz dazu beschreiben Moreno et al., dass der Anteil an Makrophagen, T-Zellen und neoangiogenetischen Prozessen in Aortenklappen mit nur zwei Taschen signifikant größer ist. Dies ist in Einklang mit der Hypothese zu sehen, dass die Aortenklappenstenose bei bikuspiden Herzklappen einen aggressiveren Entzündungsprozess hervorruft, als bei trikuspiden Herzklappen. Der Krankheitsprozess kann dann aufgrund der forcierten Veränderungen im Vergleich zur trikuspiden Aortenklappe schneller voranschreiten [3, 63, 118].

4.2.4 Die Rolle der Indolamin-2,3-dioxygenase in Atherosklerose und degenerativer Aortenklappenerkrankung

In der Pathogenese der Atherosklerose spielt das Enzym IDO1 über die Suppression von T-Zellen als Reaktion des Immunsystems auf den inflammatorischen Vorgang eine Rolle. Als indirekter Effekt induzieren IDO1-exprimierende plasmazytoide dendritische Zellen die Bildung regulatorischer T-Zellen [126]. In der „Tampere Vascular Study“ wurde eine vermehrte Expression von IDO1 in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen [73]. Die IDO1-Aktivität im Blut korreliert außerdem positiv mit dem Grad der Atherosklerose und mit dem Auftreten verschiedener atherosklerotischer Risikofaktoren [72].

Metghalchi et al. zeigten im Gegensatz dazu, dass die Abwesenheit von IDO1 in Mäusen nicht wie erwartet das Auftreten einer systemischen Inflammationsreaktion bewirkt. Über die Hochregulation des antiinflammatorischen Zytokins IL10 ist die Immunhomöostase auch ohne IDO1-Expression gewährleistet [59]. Die direkten Zusammenhänge zwischen dem Vorhandensein des Enzyms und seiner Metaboliten und der Entstehung von Atherosklerose sind demnach bis jetzt nicht so eindeutig geklärt, wie zunächst angenommen.

Die Ähnlichkeiten bei der Entwicklung der Aortenklappenstenose und der Atherosklerose ließen eine Hochregulation der IDO1-Aktivität in verkalkten Herzklappen vermuten. Diese Hypothese konnte in der vorliegenden Studie nicht erhärtet werden. Es wurde statistisch kein Expressionsunterschied für IDO1 zwischen verkalkten und insuffizienten Herzklappen gemessen. Allerdings gab es eine hohe Streuung bei der Verteilung der Werte mit Proben, die Ausreißerwerte nach oben aufwiesen. Bis auf eine Ausnahme korrelieren alle anderen Zielgene signifikant positiv mit dem Enzym. Die Zielgene wurden auf Grundlage der hypothetischen Stoffwechselwege, die von Niinisalo et al. publiziert wurden, ausgewählt [73].

Der fehlende Expressionsunterschied ist möglicherweise auf die mangelnde Trennschärfe der beiden definierten biologischen Gruppen zurückzuführen. Allerdings lassen die positiven Korrelationen zwischen den Zielgenen auf ein Vorkommen ähnlicher IDO1-bezogener Vorgänge bei der

Aortenklappenerkrankung schließen. IDO1 zeigt außerdem eine negative Korrelation mit der KÖF bei der Betrachtung von allen verwendeten Aortenklappen. Je niedriger die KÖF und desto weiter fortgeschritten die Stenose ist, desto mehr IDO1 wird in den erkrankten Herzklappen exprimiert, was unsere Hypothese der Beteiligung des Enzyms an der Entstehung der Aortenklappenstenose untermauert.

4.2.5 Die Rolle von regulatorischen T-Zellen in Atherosklerose und degenerativer Aortenklappenerkrankung

Die derzeitige Studienlage schreibt regulatorischen T-Zellen einen atheroprotektiven Effekt zu. Bereits 2007 wurden diese Zellen in allen Stadien der atherosklerotischen Plaques nachgewiesen. Es stellte sich zudem auch heraus, dass die T_{regs} in fortgeschrittenen Läsionen häufiger auftraten, als in frühen Endotheldefekten. In gesunden Gefäßen wurden keine T_{regs} nachgewiesen. Allerdings war der Anteil der regulatorischen Zellen an der Gesamtzahl der T-Zellen im Vergleich zu anderen inflammatorischen Infiltraten, zum Beispiel bei Hautdefekten, gering [10]. Unterschiede in Bezug auf die Anzahl regulatorischer T-Zellen in atherosklerotischen Läsionen sind auch zwischen Niedrigrisiko- und Hochrisikopatienten mit stattgehabten Myokardinfarkten nachweisbar. Dies könnte darauf hinweisen, dass niedrige T_{reg}-Spiegel zu einem Ungleichgewicht immunmodulatorischer Vorgänge führen und damit für einen fulminanten Verlauf der Erkrankung prädisponieren [32].

In der „Tampere Vascular Study“ wurde die Hauptrolle der T_{regs} in der Depletion der inflammatorischen Reaktion über die Suppression von TH1-Zellen gesehen. Untersuchungen an Mäusen zeigten, dass ein Mangel an regulatorischen T-Zellen zu einer Steigerung des Schweregrades der Atherosklerose führt und dass der Fettstoffwechsel unter anderem über einen Anstieg des Cholesterinspiegels beeinflusst wird. Der Einfluss des T_{reg}-Mangels auf Immunzellen und inflammatorische Marker war jedoch nicht besonders ausgeprägt [50]. Dies lässt vermuten, dass regulatorische T-Zellen sowohl dazu in der Lage sind, in den Fettstoffwechsel als auch in das inflammatorische Geschehen einzugreifen. Welcher Effekt hierbei dominiert ist jedoch noch unklar. Analog zur Atherosklerose wurde die Rolle regulatorischer T-Zellen erstmals von Shimoni et al. für die Aortenklappenerkrankung untersucht. Sie untersuchten das periphere Blut von

Patienten mit und ohne Aortenklappenstenose auf zirkulierende regulatorische T-Zellen. Es wurde ein signifikant höherer Anteil $FOXP3^+$ T_{regs} bei erkrankten Patienten gemessen. Hierbei war nicht relevant, ob es sich um eine leicht-, mittel- oder hochgradige Stenose handelte. Nach einem operativen Aortenklappenersatz sank der Spiegel regulatorischer T-Zellen wieder, was die Hypothese unterstützt, dass es sich um einen sekundären Prozess als Reaktion auf die morphologischen und hämodynamischen Veränderungen an der Herzklappe handelt [105].

Bei den Patienten, die in diese Studie eingeschlossen worden waren, wurden als charakteristische Marker der regulatorischen T-Zellen CTLA4, FOXP3 und ICOS nachgewiesen. Auch für die von diesen Zellen produzierten antiinflammatorischen Zytokinen IL10 und TGFB1 wurden Amplifikationen detektiert. Ein signifikanter Expressionsunterschied der beiden Gruppen „Verkalkt“ und „Insuffizient“ lag nicht vor. Allerdings wurde auch wie oben schon erwähnt, bei Shimoni et al. kein Unterschied in Bezug auf die Anzahl der regulatorischen T-Zellen zwischen den verschiedenen Krankheitsstadien festgestellt. Durch die bereits eingetretenen mikroskopischen Veränderungen der Kontrollklappen in der vorliegenden Studie sind die Expressionsunterschiede wahrscheinlich gar nicht oder nur gering ausgeprägt. Die hohen Korrelationen, die in dieser Arbeit alle Parameter unter sich aufweisen, unterstützen die Hypothese von Niinisalo et al. eines CD28-CTLA4-ICOS-Stoffwechselweges, bei dem die genannten Oberflächenmoleküle von $FOXP3^+$ regulatorischen T-Zellen synergistisch als Komplex auf IDO-positive APCs wirken und dadurch die Produktion des Enzyms induzieren [73]. Durch die Korrelationsanalyse in dieser Arbeit wird verdeutlicht, dass die Parameter in Beziehung miteinander stehen und in ähnlicher Form wie bei der Atherosklerose voneinander abhängen. Auch die Parameter der regulatorischen T-Zellen zeigen bei Betrachtung der Expressionslevel im Einzelnen und der jeweiligen Ausreißerproben für einige Herzklappen besonders in der biologischen Gruppe „Verkalkt“ recht hohe Werte. Dies untermauert unsere Annahme, dass diese spezielle Gruppe der T-Zellen auch bei der Aortenklappenstenose in Form des von Niinisalo et al. beschriebenen Stoffwechselweges eine Rolle spielt [73].

4.2.6 Die Rolle von antigenpräsentierenden Zellen in Atherosklerose und degenerativer Aortenklappenerkrankung

Antigenpräsentierende Zellen interagieren bei der Atherosklerose mit $CD4^+$-T-Zellen, was zur Zellaktivierung, -proliferation und der Sekretion inflammatorischer Zytokine wie IFNG führt. Die Zytokine fördern die Aufnahme von oxLDL in Makrophagen und damit die Bildung von Schaumzellen, woraufhin die Atherosklerose aggraviert wird [51]. Plasmozytoide dendritische Zellen (PDC) sind eine Sonderform dendritischer Zellen, welche erstmals 1995 in atherosklerotischen Plaques beschrieben wurden [9]. Über die Freisetzung von Interferon alpha (IFNA) wird die Entzündungsreaktion forciert und es kann zur Plaqueruptur kommen [71]. Über die Expression von MHCII sind sie als antigenpräsentierende Zellen dazu in der Lage, $CD4^+$-T-Zellen zu rekrutieren und so eine proatherogene T-Zell-Immunität zu induzieren [97, 99]. Über einen Verlust des MHCII-assoziiertem CD74 konnte im Mausmodell eine Reduktion der Atherosklerose erreicht werden, was für eine mögliche Beteiligung der Antigenpräsentation an der Pathogenese der Atherosklerose spricht [110]. Allerdings konnten für die PDCs auch gegensätzliche Effekte beobachtet werden. Sie können beispielsweise über die Interaktion von CD80/CD86 mit regulatorischen T-Zellen eine IDO-induzierte T-Zell-Suppression induzieren und somit auch antiinflammatorisch wirksam sein [126]. Wahrscheinlich ist die Verschiebung des Gleichgewichts von pro- und antiatherogenen Effekten bei der Entstehung der Atherosklerose ein wichtiger Aspekt. In Bezug auf das Auftreten von PDCs bei der degenerativen Aortenklappenerkrankung gibt es noch keine Studien. Allerdings wurden dendritische Zellen in gesunden Aortenklappen von Mäusen entdeckt, die zur Antigenpräsentation in der Lage sind [18]. Vermutlich spielen sie analog zu der Entstehung der Atherosklerose auch bei der Aortenklappenstenose eine Rolle.

Die qPCR detektierte in der vorliegenden Studie Amplifikationen für alle drei Zielgene der antigenpräsentierenden Zellen. Auch CD74, was zum MHCII-Komplex gehört und ein Hinweis auf die Aktivierung von T-Zellen über Antigenpräsentation darstellt, wurde nachgewiesen. Hohe signifikant positive Korrelationen weisen auf die wechselseitige Beeinflussung der Marker hin und unterstützen die Hypothese, dass das adaptive Immunsystem auch bei der Aortenklappenerkrankung von

Bedeutung ist. Die Marker der antigenpräsentierenden Zellen und besonders auch IFNG, welches in den Streudiagrammen der Gruppe „Verkalkt“ besonders viele Ausreißer nach oben zeigt, zeichnen sich durch eine hohe Varianz der Expressionslevel aus. Auch in diesem Fall scheint eine Subgruppe an Patienten diese Zielgene besonders stark zu exprimieren, was die Hypothese der Beteiligung von APCs an den morphologischen Veränderungen der Artenklappen stärkt.

4.2.7 Die Rolle von TH1-Zellen in Atherosklerose und degenerativer Aortenklappenerkrankung

Die Beteiligung des Immunsystems an der Pathogenese der Atherosklerose wurde schon früh durch die Entdeckung von T-Zell-Infiltraten in Plaques atherosklerotisch veränderter Gefäßwände deutlich. Es handelte sich hauptsächlich um die naive $CD3^+4^+$-Subpopulation.[45]. Diese naiven T-Zellen können sich entweder weiter in entzündungsvermittelnde TH1-Zellen, oder in TH2-Zellen, welche die Bildung von B-Zellen und Antikörpern bewirken, differenzieren [64]. Bei der Atherosklerose scheint die Differenzierung in TH1-Zellen zu dominieren [30]. Diese sind in der Lage IFNG zu sezernieren. Das Zytokin zeigt ein komplexes Wirkprofil und kann beispielsweise IDO1 exprimieren [82, 124]. Insgesamt scheint aber seine pro-atherogene Wirkung zu dominieren [37]. Über die Induktion von IDO1 wird die Bildung von TH1-Zellen unterdrückt und IFNG kann so über eine negative Rückkopplungsschleife wirken [72].

Auch bei der degenerativen Aortenklappenerkrankung sind im Gegensatz zu gesundem Gewebe inflammatorische Infiltrate, die hauptsächlich aus T-Zellen und Makrophagen bestehen nachweisbar [79]. Diese Infiltrate sind nicht nur in der Nähe von Mineralisationsherden, sondern im gesamten Gewebe zu sehen. Dies weist darauf hin, dass die Inflammationsreaktion in dieser Situation den primären Prozess darstellt [117]. Wu et al. führten 2007 eine detaillierte Analyse der T-Zellen durch, die in verkalkten Aortenklappen auftraten und kamen zu dem Schluss, dass es sich nicht um eine unspezifisch gerichtete Immunantwort handelte, sondern um selektive Prozesse. Im Gegensatz zu der Rekrutierung von polyklonalen, hauptsächlich $CD4^+$-T-Zellen bei der Atherosklerose, handelte es sich hier um T-Zellklone der CD8-Linie, die auch bei autoimmunen Prozessen, malignen Erkrankungen oder viralen Infekten auftreten können [122]. Es wird erneut deutlich, dass es sich bei

Atherosklerose und Aortenklappendegeneration um zwei Entitäten handelt, die sich in einigen Aspekten stark unterschieden. Folglich lassen sich die Hypothesen zur T-Zell-Inaktivierung der „Tampere Vascular Study“ nicht nahtlos auf die Vorgänge in erkrankten Herzklappen übertragen. Dennoch ließ sich in unserer Studie der Oberflächenmarker CD4 und das Zytokin IFNG nachweisen, sodass davon auszugehen ist, dass auch TH1-Zellen in den inflammatorischen Infiltraten der Aortenklappen unserer Studie zu finden waren. Obwohl die Unterschiede zwischen den beiden biologischen Gruppen auch für die Marker der TH1-Zellen nicht signifikant sind, so erkennt man auch hier in den Streudiagrammen tendenziell Unterschiede. Die verkalkten Herzklappen wiesen einige Ausreißerwerte auf, die auch teilweise den Proben mit den höchsten Expressionswerten von IDO1 entsprachen.

4.2.8 Matrixenzyme und -glykoproteinen in der Pathogenese der Aortenklappenerkrankung

Ein wichtiges Merkmal der erkrankten Aortenklappe ist die Veränderung ihres Aufbaus durch das Remodeling der extrazellulären Matrix. Als strukturelles Korrelat der Umbauprozesse lassen sich vermehrt MMPs in dem betroffenen Gewebe nachweisen [11, 47, 106]. MMP9 wurde vor allem um kalzifizierte Areale der Aortenklappe herum nachgewiesen und lässt damit die Vermutung zu, dass dieses Enzym mit den Remodelingprozessen in direktem Zusammenhang steht [84]. Im Gegensatz dazu wurde MMP9 von Yeghiazaryan et al. auch in nicht-verkalktem Herzklappengewebe nachgewiesen. In degenerierten nicht-verkalkten Herzklappen im Vergleich mit verkalkten Herzklappen zeigte diese Studie sogar eine Herunterregulation des Enzyms MMP9. MMP2 war in den verkalkten Herzklappen gar nicht nachweisbar. Möglicherweise lässt sich dieser Unterschied in der Ausprägung der Expression dahingehend auslegen, dass das Remodeling der EZM in der frühen Phase der Pathogenese noch wesentlich ausgeprägter ist, als in der terminalen Phase [123]. MMP1 ist in der Lage eine intakte Kollagentripelhelix zu schneiden, wohingegen MMP2 und MMP9 bereits beschädigte EZM abbauen. MMP1 ist in stenotischen Aortenklappen assoziiert mit Leukozyteninfiltraten und der Expression des inflammatorischen Zytokins IL-1B. Somit liegt nahe, dass die Expression von MMP1 in direktem Zusammenhang mit entzündlichen Prozessen

bei der Aortenklappenstenose steht [49]. In unserer Arbeit wurde ein signifikanter Unterschied zwischen verkalkten und insuffizienten Klappen nur für die MMP1 nachgewiesen. Dies weist auf einen erhöhten Gewebeumbau der stark kalzifizierten Proben hin. Wie oben bereits erläutert, gibt es in der Literatur unterschiedliche Beobachtungen, was das Expressionsmuster der MMPs anbelangt. Bossé et al. identifizierte die MMP12 als das am höchsten hochregulierte Gen bei der Aortenklappenerkrankung [11]. Dieses Enzym war leider in unseren Versuchen nicht mit aufgenommen. Die Korrelationsanalyse der MMPs in unserer Studie zeigte einige Auffälligkeiten, da negative Korrelationen auftraten. Vielleicht ist dies darauf zurückzuführen, dass die für den Gewebabbau verantwortlichen Enzyme nicht gleichzeitig in Erscheinung treten, sondern je nach Stadium der Erkrankung hoch- oder herunterreguliert werden. Es wäre auch möglich, dass die Enzyme als Proteine noch im Gewebe vorhanden sind, aber nicht mehr exprimiert werden [101], sodass ein relativer Überschuss einer Matrixmetalloproteinase eine Steigerung der Genexpression eines anderen Enzyms bewirkt.

Das Matrixprotein TNC ist mit physiologischen Mineralisierungsprozessen assoziiert. In der vorliegenden Arbeit zeigt dieses Enzym neben MMP1 einen signifikanten Unterschied zwischen den biologischen Gruppen „Verkalkt“ und „Insuffizient“ und ist damit bei den Aortenklappen mit einer hochgradigen Stenose stärker exprimiert. Dies ist im Einklang mit der Veröffentlichung von Satta et al. zu sehen, in der nachgewiesen wurde, dass es einen Zusammenhang zwischen der TNC-Expression in erkrankten Herzklappen und dem Fortschreiten beziehungsweise dem Schweregrad der Stenose gibt [100]. Jian et al. veröffentlichten 2001 eine Studie, bei der MMP2 in erkrankten Herzklappen immer gemeinsam mit TNC auftrat. Sie stellten die Hypothese auf, dass TNC, was beispielsweise über Zytokine oder Kollagenschäden induziert wird, die Expression von MMP2 hochreguliert und über positive Rückmeldung von MMP2 weiter TNC akkumuliert. Dies führt zur Bildung von Kalkherden und der Ablagerung von Kalziumphosphaten [43]. Die hochsignifikante Korrelation von MMP2 und TNC in unserer Studie unterstützt die Hypothese, dass diese beiden Parameter des Matrixumbaus miteinander assoziiert sind. Für die Proben von insuffizienten Klappen gibt es hier eine hohe Korrelation, die für die Aktivität von Matrixumbauenzymen schon in frühen Stadien der Erkrankung spricht.

Auch Osteopontin korreliert mit der Präsenz von Kalzium im Herzklappengewebe. Allerdings wurde auch für das Frühstadium der Aortenklappensklerose, bereits eine erhöhte Expression von Osteopontin nachgewiesen und es zeigte sich, dass die Menge des Osteopontins mit Zunahme des Kalziums tendenziell wieder abnimmt [33]. Die hohe positive Korrelation von SPP1 mit den anderen Matrixumbauenzymen in der vorliegenden Arbeit könnte die Hypothese von Poggio et al. unterstützen, dass Osteopontin eine Inhibition der Mineralisierungsprozesse bewirkt [89]. Je höher die Expression der Matrixumbauenzyme ist, desto mehr verändert sich die Morphologie der Klappe und die zellinternen Stoffwechselprozesse und desto mehr Kalzium- und Phosphationen beginnen sich abzulagern. Reaktiv könnte eine Hochregulation von Osteopontin erfolgen.

4.2.9 Analyse der Korrelationen von KÖF und RNA-Konzentration

Die Korrelationsanalyse dieser Arbeit umfasste nicht nur die Zielgene, sondern darüber hinaus Zusammenhänge mit den demographischen Daten der Patienten, Qualitätsparametern der RNA und Funktionalitätskriterien der Aortenklappe. Da es insgesamt wenige signifikante Zusammenhänge gab, sollen nun lediglich die Korrelationsanalysen der KÖF und der RNA-Konzentration näher betrachtet werden.

Auffällig ist, dass die verkalkten Aortenklappen bei der Korrelation von KÖF und RNA-Konzentration einheitlich unter den signifikanten Zusammenhängen nur negative Korrelationen mit den Zielgenen zeigen. Die mögliche Erklärung hierfür wäre: Je größer die Klappenöffnungsfläche ist, desto geringer ist auch der Stenosegrad der Herzklappe. Wenn man insgesamt von einer stärkeren Expression der Zielgene bei Aortenklappen mit weiter fortgeschrittener Erkrankung ausgeht, so wäre der Zusammenhang dieser Parameter negativ. Bei Betrachtung der Gruppe „insuffizient“ relativiert sich dieser Erklärungsansatz wieder, da hier lediglich für drei Parameter negative Korrelationen vorliegen, die allerdings auch nicht signifikant sind. Das Fehlen signifikanter Zusammenhänge bei den insuffizienten Herzklappen lässt sich teilweise über die statistische Berechnung, die durch die geringe Gruppenstärke beeinflusst wird, erklären (vergleiche Abschnitt „Korrelationsanalyse“ im Kapitel 4.3.6). Die Tatsache, dass Osteopontin im Unterschied zu der negativen Korrelation in der Gruppe „verkalkt“ nun bei den

insuffizienten Herzklappen eine signifikant positive Korrelation zeigt, scheint nicht ins Bild zu passen. Da die Variabilität der KÖF der insuffizienten Klappen geringer ist als die der verkalkten Klappen und diese in Bezug auf die Funktionalität nicht stenotisch sind, ist hier möglicherweise noch von einem dritten Parameter auszugehen, der diesen Zusammenhang beeinflusst. Möglich wäre allerdings auch, dass es sich hierbei um eine Scheinkorrelation handelt. Der negative Zusammenhang zwischen der KÖF und dem maximalen Druckgradienten über der Aortenklappe ist ein Korrelat der physikalischen Vorgänge bei einer Aortenklappenstenose: Je geringer die Fläche ist, durch die der Blutstrom fließen kann, desto höher ist der Druck, der aufgebracht werden muss, um eine ausreichende Menge an Blut zu transportieren.

Die RNA-Konzentration korreliert ebenfalls mit einigen Zielgenen signifikant negativ in der Gruppe der verkalkten Herzklappen. Es könnte sich hierbei um eine Scheinkorrelation handeln. Diese ist wahrscheinlich dadurch entstanden, dass in der Gruppe der insuffizienten Klappen die RNA-Konzentration im Durchschnitt höher war, als in der Gruppe der verkalkten Herzklappen. Die Expression einiger Zielgene fiel insbesondere auch durch die Ausreißerwerte bei den verkalkten Klappen tendenziell höher aus als bei den insuffizienten Klappen. Hieraus resultiert der negative Zusammenhang zwischen RNA-Konzentration und Genexpression. Der signifikant positive Zusammenhang von maximalem Druckgradienten und RNA-Konzentration in der Gruppe „Insuffizient“ passt wiederum nicht zu dieser Erklärung. Bei den verkalkten Aortenklappen gibt es für diese Parameter keinen Zusammenhang. Da in der Gruppe der insuffizienten Aortenklappen keine stark verkalkten Herzklappen waren, sollte der RNA-Ertrag nicht von der Morphologie abhängen. Auch hier ist es möglich, dass eine Zufallskorrelation besteht. Der Reinheitsgrad und die Intaktheit der RNA korrelieren signifikant positiv mit der RNA-Konzentration. Es kann angenommen werden, dass bei optimalen Versuchsbedingungen und bei möglichst fehlerfreier Durchführung die höchste RNA-Menge gewonnen werden kann. Die bestmögliche Durchführung der Versuche spiegelt sich dann in einer hohen RIN und einem Absorptionsverhältnis nahe zwei wieder. Die Variabilität dieser beiden Parameter war allerdings nicht hoch und zu einem hohen Prozentsatz in einem sehr guten Bereich, sodass diese Zusammenhänge vernachlässigbar sind.

4.3 Methodenkritik

4.3.1 Patientenrekrutierung und Fallzahlabschätzung

Die Fallzahlabschätzung dieser Arbeit orientierte sich an der Veröffentlichung von Niinisalo et al. [73]. In dieser Studie und auch in unserer Arbeit lag die Problematik in der Schwierigkeit der Beschaffung von gesundem Kontrollgewebe. Aus diesem Grund konnten für die vorliegende Arbeit trotz des Untersuchungszeitraums von elf Monaten, lediglich zehn insuffiziente Kontrollklappen gesammelt werden. In einer vergleichbaren Studie von Bossé et al. wurden die Kontrollklappen aus Transplantatherzen gewonnen [11]. Am Universitätsklinikum Ulm werden keine Herztransplantationen durchgeführt, sodass diese Möglichkeit der Probengewinnung entfiel. Eine andere Studie gewann ihre Kontrollen aus Autopsieherzen von Patienten, die durch Verkehrsunfälle oder Hirnblutungen verstorben waren [31]. Für unsere Versuche konnten keine Herzklappen aus durchgeführten Notfalleingriffen (Gruppe B2) gesammelt werden, da die notwendige Konservierung in RNAlater® oft durch die Dringlichkeit der Operation nicht durchgeführt werden konnte. Es kam auch vor, dass Patienten nach dem Eingriff verstarben, sodass keine Aufklärung über die wissenschaftliche Verwendung des entnommenen Klappenmaterials mehr stattfinden konnte. Die zehn Kontrollen wurden aus elektiven operativen Eingriffen, die aufgrund der höhergradigen Aortenklappeninsuffizienz durchgeführt wurden, bezogen.

Da die operative Versorgung bikuspider Herzklappen fast ausschließlich aufgrund einer relevanten Aortenklappenstenose erfolgt, konnten keine Patienten rekrutiert werden, deren Herzklappen bikuspid und insuffizient waren. Dies schränkt die Aussagekraft des statistischen Vergleiches der bikuspiden und trikuspiden Klappen ein. Auch die Fallzahlabschätzung ist auf den Vergleich von verkalkten und insuffizienten Herzklappen ausgelegt, sodass die Bikuspidalität der Klappen aufgrund der geringen Fallzahl von 16 Patienten nur sekundär in den Fokus der Betrachtung rückt.

Die Einteilung der Aortenklappen in die biologischen Gruppen erfolgte anhand der Operationsindikation und dem makroskopischen Erscheinungsbild. Außerdem konnte über die Parameter KÖF und Δp_{max} zusätzlich der Stenosegrad der

Herzklappe beurteilt werden. Sie stehen in Einklang mit der Operationsindikation, sodass die insuffizienten Klappen als nicht stenotisch zu bezeichnen waren und die verkalkten Klappen eine mittel- bis hochgradige Stenose aufwiesen. Aus den Patientenakten konnten leider nicht immer alle Parameter zur Funktionalität der Herzklappe entnommen werden und in die Auswertung mit einfließen, da diese teilweise ärztlicherseits nicht erhoben worden waren.

Obwohl es Schwierigkeiten gab Patienten zu rekrutieren, deren Aortenklappe sich als morphologische unauffällig erwies, gingen wir davon aus, dass unsere Einschränkungskriterien ausreichend sensibel waren, um Unterschiede im Expressionsmuster zwischen gesunden und offensichtlich stark verkalkten Herzklappen zu finden.

4.3.2 Einteilung der biologischen Gruppen

Die Genexpressionsanalyse dieser Arbeit zeigte nur bei zwei Zielgenen signifikante Unterschiede zwischen den biologischen Gruppen. Da in vorangegangen Veröffentlichungen wie zum Beispiel von Bossé et al., Expressionsunterschiede zwischen gesunden und erkrankten Aortenklappen bereits nachgewiesen worden waren [11], ist anzunehmen, dass die Einteilung der Herzklappen anhand von Operationsindikation und Makroskopie für die Proben dieser Studie keine ausreichende Differenzierung der zu vergleichenden Gruppen ermöglichte. Zwar ist es möglich, die Herzklappen im Hinblick darauf zu unterscheiden, ob sie eher verkalkt oder eher insuffizient sind, aber die mikroskopischen Vorgänge sind auf diese Weise nicht zu beurteilen. Da der Fokus der Arbeit auf der Genexpression im untersuchten Gewebe gerichtet ist, ist zu erwarten, dass bereits mikrokopisch morphologische Veränderungen auch in noch scheinbar gesundem Klappengewebe in den Messergebnissen sichtbar werden. Im Anschluss an die Auswertung der Genexpressionsanalyse ist daher in der vorliegenden Arbeit noch eine von Kossa-Färbung durchgeführt worden, um zu überprüfen, ob mikroskopisch kleine Kalziumablagerungen in den vermeintlich blanden Aortenklappen sichtbar waren.

Künftige Studien sollten im Vorfeld zur besseren Differenzierung im Vorfeld eine Alizarinrotfärbung oder eine von Kossa-Färbung durchführen, um neben den

makroskopischen auch mikroskopische Veränderungen auszuschließen [43, 79]. Auch in der bereits mehrfach zitierten Studie von Bossé et al. wurden Herzklappen mit mikroskopischen Auffälligkeiten aus der Versuchsreihe ausgeschlossen [11]. In unserer Studie kamen bei der nachträglichen mikroskopischen Reevaluation der Kontrollen in allen zehn Proben kleinste Punkte mit möglichen Mineralisationsprozessen zur Darstellung. Um eindeutig zu verifizieren, dass diese Prozesse in gesunden Herzklappen nicht vorhanden sind, hätte man makroskopisch und mikroskopisch gesundes Kontrollgewebe, möglicherweise von juvenilen Herzklappen benötigt. Da in gesundem Gewebe keinerlei Mineralisationsvorgänge nach von Kossa anfärbbar sein sollten, ist in dieser Arbeit nicht von einer Einteilung der Herzklappen in verkalkt und nicht verkalkt auszugehen. Es handelt sich womöglich eher um zwei Gruppen, bei denen sich die stark verkalkten Proben in einem weiter fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung befinden, als die insuffizienten Herzklappen.

4.3.3 Präamplifikation, RT und qPCR

Da die Menge an extrahierter RNA nicht ausreichend war, um Amplifikationen in einem auswertbaren Bereich zu erzielen, wurde in dieser Studie das Verfahren der Präamplifikation angewendet. Das verwendete Protokoll unterschied sich von dem des Herstellers dadurch, dass an Stelle von 25 µl des Mastermixes lediglich 10 µl pro Probe eingesetzt worden waren. Somit betrug das Reaktionsvolumen nur 35 µl anstatt 50 µl. Es ist möglich, dass der Versuch durch den verdünnt eingesetzten Mastermix (0,57-fach anstatt 1-fach) an Effektivität verlor. Es ist ebenso vorstellbar, dass einzelne Assays unter den suboptimalen Bedingungen unterschiedlich reagierten als andere. Die Verdünnung des Präamplifikationsproduktes betrug im Ansatz der qPCR 1:6,7 anstelle von 1:5, wie es im Originalprotokoll angegeben ist. Da in die Präamplifikation die maximale Menge der cDNA eingesetzt wurden (250 ng), war möglicherweise zu wenig Enzym und zu wenige Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP) zur Verlängerung der Amplikons vorhanden. Dadurch ist die hier durchgeführte Präamplifikation nicht vergleichbar mit einem unter optimalen Bedingungen durchgeführten Versuch. Die Veränderung des Reaktionsvolumens gegenüber dem Originalprotokoll erstreckte sich über alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen, sodass die Messergebnisse

aller Proben untereinander vergleichbar blieben. Außerdem ist nicht zu vernachlässigen, dass das Durchführen der Präamplifikation einen zusätzlichen Schritt darstellt, in dem sich durch das Pipettieren kleinster Mengen Fehler einschleichen und die cDNA kontaminiert werden könnte.

Wie bereits erwähnt konnten bei einigen Klappen Amplifikationen für die ausgewählten Referenzgene nur bei C_T-Werten größer als 35 gemessen werden. Teilweise wurde gar keine Amplifikation detektiert. Da unser Labor mit dem verwendeten Gewebematerial bisher wenig Erfahrungen im Bereich der qPCR geamcht hatte, war eine solche Entwicklung der Daten im Voraus nicht abzusehen und die entsprechenden Aortenklappen mussten wie bereits erwähnt aus der Studie ausgeschlossen werden, da trotz vorangegangener Präamplifikation keine verwertbaren Daten daraus hervorgingen.

Auffällig war außerdem, dass unter den technischen Triplikaten oftmals Ausreißer zu finden waren, die aus der Auswertung ausgeschlossen werden mussten. Die Ursache hierfür war vermutlich, dass bereits die RT in Triplikaten pipettiert worden war und diese dann als getrennte Ansätze weiter in die Präamplifikation und die qPCR liefen. Die Abweichungen zwischen den einzelnen Replikaten spiegeln hier vermutlich die Varianz des gesamten Arbeitsablaufes wieder und potenzieren sich mit jedem weiteren Arbeitsschritt. Trotz Optimierung des Pipettierstils und Durchmischung der Ansätze nach jedem Schritt, trat bei einigen Proben eine Standardabweichung der Replikate größer als 0,5 auf. Anhand des Ausreißertests wurden dann entsprechende Proben aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Dennoch ist es weitaus aussagekräftiger die Replikate bereits bei der RT anzufertigen, wie es in dieser Studie gehandhabt wurde. Dadurch können auch Proben identifiziert werden, die in der RT nicht optimal in cDNA umgeschrieben werden konnten. Solche Proben hätten nicht identifiziert werden können, wenn die Replikate erst für die qPCR angefertigt worden wären.

4.3.4 Qualitätskontrolle der RNA

Um die Reinheit und Integrität der RNA nachzuweisen und deren Konzentration zu bestimmen, wurde das Verhältnis der optischen Dichte der RNA bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm errechnet und die RIN bestimmt.

Für die optische Dichte und die RIN konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden biologischen Gruppen nachgewiesen werden. Die gemessenen Werte befinden sich im oberen Referenzbereich für die jeweilige Methode. Der Grad der Kalzifikation scheint folglich auf die Qualität der RNA keinen Einfluss zu haben. Zwischen den RNA-Konzentrationen der biologischen Gruppen trat ein signifikanter Unterschied auf. Dies stimmt mit den Daten der Vorgängerstudie von Valadares et al., die das Protokoll der RNA-Extraktion etabliert hatte, überein. Die Autoren wiesen eine signifikant negative Korrelation zwischen RNA-Ertrag und Grad der Kalzifikation nach. Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass aus der Gruppe der verkalkten Herzklappen geringere Mengen an RNA extrahiert wurden als aus den Proben der Gruppe „Insuffizient“. Die Beobachtung lässt sich auf die Schwierigkeit zurückführen, homogenisierbares Material von stark verkalkten Herzklappen zu gewinnen [15].

NTC und -RT-Kontrollen

Nach Vorgabe der Leitlinien zum Mindestmaß an Informationen für die Publikation von quantitativen Echtzeit-PCR-Experimenten (MIQE) [13] wurden einerseits NTCs durchgeführt, um Kontaminationen der Proben auszuschließen. Andererseits wurden -RT-Kontrollen zur Bestimmung eines möglichen Anteils von genomischer DNA in den Ansätzen für die Primer-Assays, die nicht über eine Exon-Exon-Grenze verlaufen, durchgeführt. Die NTCs zeigten in 1,1% aller Fälle eine Amplifikation. Von einer Kontamination der Reagenzien ist in diesem Fall nicht auszugehen, da sich die positiven NTCs bis auf eine Ausnahme jeweils auf unterschiedlichen 96-Well-Platten befanden. Wahrscheinlich kam es beim Pipettieren in diesen wenigen Ausnahmen zu Unsauberkeiten, die die Amplifikationen in den entsprechenden Ansätzen erklären. Bei den -RT-Kontrollen sind die Anteile an genomischer DNA, die in wenigen Ansätzen anzunehmen sind, fast alle vernachlässigbar gering. Die meisten positiven -RT-Kontrollen traten für das Zielgen RPL13A auf, das aus der weiteren Auswertung aufgrund seiner inkonsistenten Expression im Vergleich zu den anderen Referenzgenen ausgeschlossen worden war. MMP9 weist einmalig unter allen positiven -RT-Kontrollen einen Anteil von 4,04% an genomischer DNA auf. Dies ist verhältnismäßig hoch, da alle anderen positiv ausgefallenen Kontrollen einen Anteil von unter 0,2% besitzen. Aufgrund des einmaligen Auftretens ist dies zu vernachlässigen. Da die -RT-Kontrollen auf jede Platte pipettiert wurden, ist nicht

von einem grundsätzlichen Problem der RNA-Isolierung auszugehen. Durch den DNase-I-Verdau sollte schließlich ein Großteil der genomischen DNA eliminiert werden.

Gleichförmigkeit der Präamplifikation

Bei dem Versuch zur Gleichförmigkeit der Präamplifikation fällt auf, dass sich zehn von 18 berechneten $\Delta\Delta C_t$-Werten nicht im gewünschten Bereich von ±1,5 befinden. Folgende Umstände könnten hierfür verantwortlich gewesen sein: Zum einen konnte der Versuch durch den Mangel an Proben mit ausreichend niedrigen C_t-Werten ohne Präamplifikation nur einmal durchgeführt werden. Unter diesen Umständen lassen sich nur schwer Rückschlüsse auf das Verhalten der Präamplifikation in Bezug auf die gesamte Studie ziehen, da keine verwertbaren statistischen Aussagen getroffen werden können. Zum anderen ist nicht ganz klar, wie sich die geringere Menge des pipettierten Mastermixes auf das Ergebnis der Präamplifikation ausgewirkt hat. Möglicherweise reagierten CD86, FOXP3 oder MMP1, deren $\Delta\Delta C_t$-Werte sich weit außerhalb des gewünschten Intervalls befinden, empfindlicher auf die geringere Menge an zugeführtem Enzym als die anderen Targets.

Dynamischer Bereich der Reversen Transkription

Bei der Beurteilung der Effizienz der Reversen Transkription wurden Verdünnungsreihen für jeweils zwei Zielgene und zwei Referenzgene durchgeführt, bei denen für die verwendete RNA-Menge von 400 ng mindestens bei einem der Versuche eine Linearität angenommen werden kann. Bei beiden Teilversuchen wurde jeweils die unverdünnte Probe als Ausreißer markiert. Eine Erklärung hierfür wäre, dass die Komponenten aus der RT inhibitorisch auf die qPCR wirkten. Da dies bekannt ist, wurde die cDNA für die qPCR-Versuche laut Protokoll verdünnt eingesetzt. Somit können diese Werte vernachlässigt werden.

4.3.5 Histologie

Die histologischen Analysen waren im Studienplan noch nicht berücksichtigt worden und wurden daher erst im Anschluss an die qPCR-Versuche durchgeführt. Sie sollten den Verdacht bestätigen, dass die makroskopisch nicht verkalkten Herzklappen auf mikroskopischer Ebene Verkalkungen aufweisen. Hätte man die

von Kossa-Färbung bereits im Vorfeld durchgeführt, hätten so mikroskopisch und makroskopisch nicht verkalkte Klappen als Kontrollen in die qPCR einfließen können. Aufgrund der Seltenheit derartiger Klappen hätte man allerdings dann in dem Zeitraum, der für das Sammeln der Herzklappen veranschlagt worden war, mit den gegebenen Voraussetzungen nicht genügend Kontrollen einschließen können.

4.3.6 Datenanalyse

Expressionsanalyse

Der Aufbau dieses Experiment ließ eine Analyse mit Hilfe der gängigen vergleichenden Quantifizierung über die $\Delta\Delta C_t$-Methode nach Pfaffl et al. nicht zu [85]. Dieses Verfahren setzt voraus, die Proben jeweils auf eine Kalibratorprobe zu normieren, welche für dieses Experiment nicht vorgesehen war. Aus diesem Grund konnten lediglich die ΔC_t-Werte aus den jeweiligen C_t-Werten von Referenzgen und Zielgen errechnet werden. Da die zusätzliche Normierung wegfiel, sind die Ergebnisse sensitiver für interindividuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Proben.

Korrelationsanalyse

In der vorliegenden Arbeit stellt die Korrelationsanalyse der verschiedenen Parameter einen großen Abschnitt dar. Wichtig ist sich hierbei bewusst zu machen, dass eine Korrelation keine Kausalität impliziert. Es ist möglich bei der Korrelationsanalyse eine Tendenz festzustellen, inwieweit gewisse Zusammenhänge bestehen könnten. Man sollte aber auf lange Sicht weitere Analysen durchführen, um die Korrelationen gegebenenfalls zu verifizieren. Eine Korrelation kann zwar einen echten inhaltlichen Zusammenhang darstellen, allerdings kann genauso gut ein beidseitiger Zusammenhang oder lediglich eine rein zufällig entstandene Scheinkorrelation bestehen. Auch ein indirekter Zusammenhang über eine unbekannte dritte Variable ist denkbar.

Insgesamt fällt für die Korrelationsanalyse der verschiedenen Zielgene auf, dass fast alle Werte für Kendall‘s Tau der Aortenklappen insgesamt und der biologischen Gruppe „Verkalkt“ signifikant bis hochsignifikant sind. Bei den amplifizierten Genen handelt es sich um eine Auswahl aus relevanten Genen der „Tampere Vascular Study“. Entsprechend der Veröffentlichung von Niinisalo et al. [73] weisen die

gefundenen Korrelationen auf analoge Pathomechanismen sowohl bei der Atherosklerose als auch bei der degenerativen Aortenklappenerkrankung hin. Es scheinen bei beiden Erkrankungen ähnliche Gene relevant zu sein, was die Vergleichbarkeit der Pathogenese möglich macht. In der Gruppe „Insuffizient“ sind insgesamt weit weniger signifikante Korrelationen zu finden. Einerseits kann dies daran liegen, dass in der Kontrollgruppe tatsächlich weniger Korrelationen auftreten. Andererseits kann dies auch auf die Berechnung des p-Werts von Kendall’s Tau zurückgeführt werden. Trotz gleichem Verhältnis tritt hier eher eine Signifikanz auf, wenn insgesamt mehr Werte in die Berechnung miteinfließen. Da die Größe der beiden biologischen Gruppen stark voneinander abweicht und die Kontrollgruppe wesentlich kleiner ist, wäre das eine Erklärung für den Unterschied in der Anzahl der Signifikanzen. Aus diesem Grund wurde bei der Interpretation der Korrelationen für diese kleine Gruppe die statistische Signifikanz in den Hintergrund gestellt.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Mit der Durchführung von qPCR-Analysen zum Nachweis von Expressionsunterschieden zwischen verkalkten und insuffizienten Klappen sollte eine Grundlage geschaffen werden, um die Pathogenese der Aortenklappendegeneration zu verstehen und gegebenenfalls mögliche Angriffspunkte für medikamentöse Therapien zu finden.

Die Expressionsunterschiede zwischen den beiden Gruppen waren für zwei Parameter des Klappenumbaus signifikant und die Inflammationsparameter waren im Gegensatz zu der Vergleichsstudie in Bezug auf die Atherosklerose nicht signifikant unterschiedlich. Dennoch wurden für die verkalkten Aortenklappen bei fast allen Zielgenen hohe Streuungen der Expressionslevel detektiert. Insbesondere bei IDO1 und den Stoffwechselwegen, die möglicherweise mit dem Enzym in Verbindung stehen, wurden in einigen Proben hohe Amplifikationen gemessen. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass in einer Subgruppe der Patienten die Hypothese der IDO1-assoziierten Inflammationsreaktion zuzutreffen scheint. Wahrscheinlich hätte eine bessere Trennschärfe der Gruppen deutlichere Ergebnisse erbracht. Dennoch zeigte diese Studie über die vielen signifikanten

Korrelationen zwischen den einzelnen Zielgene, dass auch bei der Aortenklappendegeneration die angenommenen entzündlichen Prozesse, die über regulatorische T-Zellen vermittelt werden, vermutlich eine Rolle spielen.

Der Nachweis einer Amplifikation ist zunächst nur beweisend dafür, dass bestimmte Gene in dem betreffenden Gewebe amplifiziert werden. Allein anhand der isolierten RNA kann jedoch noch keine Aussage darüber getroffen werden, ob die entsprechenden Proteine tatsächlich synthetisiert werden. Auch die Funktionalität der synthetisierten Proteine ist mit einer qPCR noch nicht nachgewiesen. So müssten, um die Ergebnisse aus einer qPCR zu verifizieren, die entsprechenden Proteine noch über einen Western Blot nachgewiesen werden und deren biologische Funktion beispielsweise anhand eines Zellmodels getestet werden.

Mithilfe der gewonnenen Erkenntnisse auf der Ebene der Genexpression könnten in Zukunft Stoffwechselwege identifiziert werden, die an der Entstehung der degenerativen Veränderungen der Aortenklappe beteiligt sind. Davon ausgehend könnten über die Erkenntnisse dieser Studie mögliche erste Ansatzpunkte für Forschungen hinsichtlich einer kurativen medikamentösen Therapie der degenerativen Aortenklappenerkrankung gefunden werden, um die Notwendigkeit des invasiven Vorgehens mittels eines operativen Aortenklappenersatzes zu verzögern oder sogar ganz zu vermeiden.

5 Zusammenfassung

Die erworbene Aortenklappendegeneration ist eine chronisch progrediente Erkrankung, für die es derzeit keine Früherkennungsmaßnahmen gibt. Auch ist es noch nicht möglich, den Verlauf zu verlangsamen oder gar ganz aufzuhalten. Bei der Diagnose einer Aortenklappenstenose besteht die einzige kurative Option in dem interventionellen oder operativen Ersatz der erkrankten Herzklappe. Die Kenntnis der zugrundeliegenden inflammatorischen Mechanismen könnte Ansatzpunkte für eine Therapie liefern. Die Initiationsphase der Aortenklappenerkrankung ähnelt der Entstehung von Atherosklerose. Die vorliegende Studie untersuchte daher, ob vergleichbare Regulationsmechanismen auch bei der Aortenklappendegeneration nachgewiesen werden können. Das Primärziel der Arbeit war der Nachweis eines Unterschiedes in der Genexpression von Indolamin-2,3-dioxygenase 1 (IDO 1). Dies ist ein Enzym, das über das Absenken der lokalen Tryptophanspiegel eine immunmodulatorische Wirkung zeigt. Als Sekundärziel sollte ein Unterschied in der Genexpression von weiteren Zielgenen, die bereits in Zusammenhang mit der Atherosklerose stehen, nachgewiesen werden. Es wurde auch untersucht, inwiefern sich die Bikuspidalität einer Aortenklappe auf die Genexpression auswirkt.

In die Studie wurden 48 Patienten im Zeitraum von Juli 2016 bis Mai 2017 eingeschlossen. Es handelte sich um 38 Patienten in der biologischen Gruppe „Verkalkt“ und zehn Patienten in der biologischen Gruppe „Insuffizient“. Nach Entnahme im Operationssaal wurde die Ribonukleinsäure (RNA) der Aortenklappen stabilisiert und bei -80 °C bis zur Verarbeitung gelagert. Das Klappenmaterial wurde nach dem Auftauen homogenisiert und die RNA extrahiert. Diese wurde einer Qualitätskontrolle unterzogen und auf Integrität und Reinheit geprüft. Über eine Reverse Transkription wurde komplementäre DNA (cDNA) hergestellt. Aufgrund der geringen Menge an extrahierter RNA wurde vor der quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) eine Präamplifikationsreaktion durchgeführt. Die entsprechenden Kontrollversuche im Rahmen der qPCR wurden laut den Leitlinien „Minimal Information for Publication of Quantitiative Real-Time PCR Experiments“ (MIQE) durchgeführt. Im Anschluss an die qPCR wurden die Proben noch über die von Kossa-Färbung, die Mineralisationsvorgänge sichtbar macht, angefärbt. Die

Datenanalyse erfolgte über die Berechnung des Expressionsunterschiedes ($2^{-\Delta Ct}$) und über eine Korrelationsanalyse (Kendall‘s Tau).

Die verkalkten Aortenklappen besaßen im Vergleich zu den insuffizienten Aortenklappen eine höhere Klappenöffnungsfläche und einen größeren maximalen Druckgradienten. Trikuspide Aortenklappen wiesen eine geringere Klappenöffnungsfläche und einen höheren maximalen Druckgradienten als bikuspide auf. Im Vergleich zu den insuffizienten Herzklappen waren bei den verkalkten Proben nur die Expressionslevel der Zielgene Matrixmetalloproteinase 1 (MMP1) und Tenascin C (TNC) signifikant erhöht. Es fiel auf, dass es bei Patienten mit verkalkten Aortenklappen bei den meisten Zielgenen, insbesondere auch bei IDO1, einige Ausreißerproben gab, deren Expressionslevel sehr hoch ausfielen. Zwischen bikuspiden und trikuspiden Aortenklappen gab es keine signifikanten Unterschiede. Die Korrelationsanalyse erbrachte signifikante Korrelationen fast aller Zielgene der verkalkten Proben. Die histologische Färbung nach von Kossa zeigte für alle insuffizienten Proben kleinste Mineralisationsherde.

Ein Hauptproblem dieser Arbeit lag an der Schwierigkeit, gesundes Kontrollgewebe zu sammeln, da sich bei den vermeintlich nicht verkalkten, insuffizienten Proben im Nachhinein mikroskopisch kleine Kalziumablagerungen zeigten Dennoch sind die verwendeten Aortenklappen durch Unterschiede im Grad der Kalzifizierung gekennzeichnet, worauf, auch in Einklang mit der bestehenden Literatur, die Expressionsunterschiede von MMP1 und TNC zurückzuführen sind. Ein Expressionsunterschied von IDO1 wurde im Unterschied zur Atherosklerose nicht nachgewiesen, was entweder auf das Kontrollgewebe zurückzuführen ist, oder darauf, dass die Rolle dieses Enzyms für die Aortenklappendegeneration weniger zentral ist. Allerdings weisen einige Ausreißerwerte, sowohl bei IDO1 als auch bei den anderen Parametern darauf hin, dass in einer Subgruppe der verkalkten Herzklappen die angenommenen Stoffwechselwege eine Rolle spielen. Die Bedeutung inflammatorischer Stoffwechselwege bei der Erkrankung der Aortenklappe wurde auch über die hochsignifikant positiven Korrelationen untermauert. Um die Hypothesen dieser Arbeit weiter zu stärken, sollte in zukünftigen Studien das Kontrollgewebe mikroskopisch definiert werden und die Probenanzahl erhöht werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Aggarwal A, Ferrari G, Joyce E, Daniels M J, Sainger R, Gorman J H, Gorman R, Sacks M S: Architectural trends in the human normal and bicuspid aortic valve leaflet and its relevance to valve disease. Ann Biomed Eng 42: 986–998 (2014)

2. Ait-Oufella H, Salomon B L, Potteaux S, Robertson A-K L, Gourdy P, Zoll J, Merval R, Esposito B, Cohen J L, Fisson S, Flavell R A, Hansson G K, Klatzmann D, Tedgui A, Mallat Z: Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. Nat Med 12: 178–180 (2006)

3. Akahori H, Tsujino T, Naito Y, Yoshida C, Lee-Kawabata M, Ohyanagi M, Mitsuno M, Miyamoto Y, Daimon T, Masuyama T: Intraleaflet haemorrhage as a mechanism of rapid progression of stenosis in bicuspid aortic valve. Int J Cardiol 167: 514–518 (2013)

4. Applied Biosystems: Amplification efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays - Assays tested extensively for qPCR efficiency. Appl Note TaqMan® Gene Expr Assays: 1–6 (2012) http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_040377.pdf (15.11.2017)

5. Applied Biosystems: Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Reagent Guide: 1–148 (2010) https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_046739.pdf (09.11.2017)

6. Applied Biosystems: TaqMan® PreAmp Master Mix Kit - Protocol (PN 4384557B) - Rev B. Biosystems: 1–22 (2010) https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_039316.pdf (08.11.2017)

7. Beppu S, Suzuki S, Matsuda H, Ohmori F, Nagata S, Miyatake K: Rapidity of progression of aortic stenosis in patients with congenital bicuspid aortic valves. Am J Cardiol 71: 322–327 (1993)

8. Bianchi M, Bertini R, Ghezzi P: Induction of indoleamine dioxygenase by interferon in mice: A study with different recombinant interferons and various cytokines. Biochem Biophys Res Commun 152: 237–242 (1988)

9. Bobryshev Y V, Lord R S A: Ultrastructural Recognition of Cells with Dendritic Cell Morphology in Human Aortic Intima. Contacting Interactions of Vascular Dendritic Cells in Athero-resistant and Athero-prone Areas of the Normal Aorta. Arch Histol Cytol 58: 307–322 (1995)

10. de Boer O J, van der Meer J J, Teeling P, van der Loos C M, van der Wal A C: Low Numbers of FOXP3 Positive Regulatory T Cells Are Present in all Developmental Stages of Human Atherosclerotic Lesions. PLoS One 2: e779 (2007)

11. Bossé Y, Miqdad A, Fournier D, Pépin A, Pibarot P, Mathieu P: Refining molecular pathways leading to calcific aortic valve stenosis by studying gene expression profile of normal and calcified stenotic human aortic valves. Circ Cardiovasc Genet 2: 489–498 (2009)

12. Branchetti E, Sainger R, Poggio P, Grau J B, Patterson-Fortin J, Bavaria J E, Chorny M, Lai E, Gorman R C, Levy R J, Ferrari G: Antioxidant Enzymes Reduce DNA Damage and Early Activation of Valvular Interstitial Cells in Aortic Valve Sclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 33: e66–e74 (2013)

13. Bustin S A, Benes V, Garson J A, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl M W, Shipley G L, Vandesompele J, Wittwer C T: The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative RealTime PCR Experiments. Clin Chem: 611–622 (2009)

14. Capuron L, Ravaud A, Neveu P J, Miller A H, Maes M, Dantzer R: Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy. Mol Psychiatry 7: 468–473 (2002)

15. Cecília Valadares A, Gorki H, Liebold A, Hoenicka M: Extraction of Total RNA from Calcified Human Heart Valves for Gene Expression Analysis. J Heart

Valve Dis 26: 185–192 (2017)

16. Chan K L, Teo K, Dumesnil J G, Ni A, Tam J: Effect of Lipid Lowering With Rosuvastatin on Progression of Aortic Stenosis: Results of the Aortic Stenosis Progression Observation: Measuring Effects of Rosuvastatin (ASTRONOMER) trial. Circulation 121: 306–314 (2010)

17. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K-J, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl S M: Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF-beta Induction of Transcription Factor Foxp3. J Exp Med 198: 1875–1886 (2003)

18. Choi J-H, Do Y, Cheong C, Koh H, Boscardin S B, Oh Y-S, Bozzacco L, Trumpfheller C, Park C G, Steinman R M: Identification of antigen-presenting dendritic cells in mouse aorta and cardiac valves. J Exp Med 206: 497–505 (2009)

19. Coffey S, Cox B, Williams M J A: The Prevalence, Incidence, Progression, and Risks of Aortic Valve Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. J Am Coll Cardiol 63: 2852–2861 (2014)

20. Coté N, Mahmut A, Bosse Y, Couture C, Pagé S, Trahan S, Boulanger M-C, Fournier D, Pibarot P, Mathieu P: Inflammation Is Associated with the Remodeling of Calcific Aortic Valve Disease. Inflammation 36: 573–581 (2013)

21. Cowell S J, Newby D E, Prescott R J, Bloomfield P, Reid J, Northridge D B, Boon N A: A Randomized Trial of Intensive Lipid-Lowering Therapy in Calcific Aortic Stenosis. N Engl J Med 352: 2389–2397 (2005)

22. Edep M E, Shirani J, Wolf P, Brown D L: Matrix Metalloproteinase Expression in Nonrheumatic Aortic Stenosis. Cardiovasc Pathol Cardiovasc Pathol 99: S. 281–286 (2000)

23. Fallarino F, Grohmann U, Hwang K W, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna M L, Fioretti M C, Alegre M-L, Puccetti P: Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. Nat Immunol 4: 1206–1212 (2003)

24. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath B C, Cavener D R, Vacca C, Orabona C, Bianchi R, Belladonna M L, Volpi C, Fioretti M C, Puccetti P: Tryptophan catabolism generates autoimmune-preventive regulatory T cells. Transpl Immunol 17: 58–60 (2006)

25. Fallarino F, Vacca C, Orabona C, Belladonna M L, Bianchi R, Marshall B, Keskin D B, Mellor A L, Fioretti M C, Grohmann U, Puccetti P: Functional expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by murine CD8α+ dendritic cells. Int Immunol 14: 65–68 (2002)

26. Folkersen L, Wågsäter D, Paloschi V, Jackson V, Petrini J, Kurtovic S, Maleki S, Eriksson M J, Caidahl K, Hamsten A, Michel J-B, Liska J, Gabrielsen A, Franco-Cereceda A, Eriksson P: Unraveling Divergent Gene Expression Profiles in Bicuspid and Tricuspid Aortic Valve Patients with Thoracic Aortic Dilatation: The ASAP Study. Mol Med 17: 1365–1373 (2011)

27. Fondard O, Detaint D, Iung B, Choqueux C, Adle-Biassette H, Jarraya M, Hvass U, Couetil J-P, Henin D, Michel J-B, Vahanian A, Jacob M-P: Extracellular matrix remodelling in human aortic valve disease: the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. Eur Heart J 26:1333–1341 (2005)

28. Fontenot J D, Gavin M A, Rudensky A Y: Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Nat Immunol 4: 330–336 (2003)

29. Förster T: Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. Ann Phys 437: 55–75 (1948)

30. Frostegård J, Ulfgren A-K, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson G K: Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. Atherosclerosis 145: 33–43 (1999)

31. Galli D, Manuguerra R, Manotti L, Goldoni M, Becchi G, Carubbi C, Vignali G, Cucurachi N, Gherli T, Nicolini F, Lorusso R, Vitale M, Corradi D:

Understanding the structural features of symptomatic calcific aortic valve stenosis : A broad-spectrum clinico-pathologic study in 236 consecutive surgical cases. Int J Cardiol 228: 364–374 (2017)

32. George J, Schwartzenberg S, Medvedovsky D, Jonas M, Charach G, Afek A, Shamiss A: Regulatory T cells and IL-10 levels are reduced in patients with vulnerable coronary plaques. Atherosclerosis 222: 519–523 (2012)

33. Grau J B, Poggio P, Sainger R, Vernick W J, Seefried W F, Branchetti E, Field B C, Bavaria J E, Acker M A, Ferrari G: Analysis of Osteopontin Levels for the Identification of Asymptomatic Patients With Calcific Aortic Valve Disease. Ann Thorac Surg 93: 79–86 (2012)

34. Grotzer M A, Patti R, Geoerger B, Eggert A, Chou T T, Phillips P C: Biological stability of RNA isolated from RNAlater-treated brain tumor and neuroblastoma xenografts. Med Pediatr Oncol 34: 438–442 (2000)

35. Gupta S, Pablo A M, Jiang X c, Wang N, Tall A R, Schindler C: IFN-gamma Potentiates Atherosclerosis in ApoE Knock-out mice. J Clin Invest 99: 2752–2761 (1997)

36. Hamatani Y, Ishibashi-Ueda H, Nagai T, Sugano Y, Kanzaki H, Yasuda S, Fujita T, Kobayashi J, Anzai T: Pathological Investigation of Congenital Bicuspid Aortic Valve Stenosis, Compared with Atherosclerotic Tricuspid Aortic Valve Stenosis and Congenital Bicuspid Aortic Valve Regurgitation. PLoS One 11: 1–11 (2016)

37. Harvey E, Ramji D: Interferon-γ and atherosclerosis: Pro- or anti-atherogenic?. Cardiovasc Res 67: 11–20 (2005)

38. Heller E A, Liu E, Tager A M, Yuan Q, Lin A Y, Ahluwalia N, Jones K, Koehn S L, Lok V M, Aikawa E, Moore K J, Luster A D, Gerszten R E: Chemokine CXCL10 Promotes Atherogenesis by Modulating the Local Balance of Effector and Regulatory T cells. Circulation 113: 2301–2312 (2006)

39. Hinton R B, Lincoln J, Deutsch G H, Osinska H, Manning P B, Benson D W, Yutzey K E: Extracellular Matrix Remodeling and Organization in Developing

and Diseased Aortic Valves. Circ Res 98: 1431–1438 (2006)

40. Hoffman J I: The global burden of congenital heart disease. Cardiovasc J Afr 24: 141–145 (2013)

41. Hwu P, Du M X, Lapointe R, Do M, Taylor M W, Young H A: Indoleamine 2,3-Dioxygenase Production by Human Dendritic Dells Results in the Inhibition of T Cell Proliferation. J Immunol 164: 3596–3599 (2000)

42. Iung B, Baron G, Butchart E G, Delahaye F, Gohlke-Bärwolf C, Levang O W, Tornos P, Vanoverschelde J-L, Vermeer F, Boersma E, Ravaud P, Vahanian A: A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. Eur Heart J 24: 1231–1243 (2003)

43. Jian B, Jones P L, Li Q, Mohler III E R, Schoen F J, Levy R J: Matrix Metalloproteinase-2 Is Associated with Tenascin-C in Calcific Aortic Stenosis. Am J Pathol: 321–327 (2001)

44. Jian B, Narula N, Li Q, Mohler E R, Levy R J: Progression of aortic valve stenosis: TGF-β1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. Ann Thorac Surg 75: 457–465 (2003)

45. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson G K: Regional Accumulations of T Cells, Macrophages, and Smooth Muscle Cells in the Human Atherosclerotic Plaque. Arteriosclerosis 6: 131–138 (1986)

46. Joss A, Akdis M, Faith A, Blaser K, Akdis C A: IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. Eur J Immunol 30: 1683–1690 (2000)

47. Kaden J J, Vocke D C, Fischer C S, Grobholz R, Brueckmann M, Vahl C F, Hagl S, Haase K K, Dempfle C-E, Borggrefe M: Expression and activity of matrix metalloproteinase-2 in calcific aortic stenosis. Z Kardiol 93: 124–130 (2004)

48. Kaden J J, Dempfle C-E, Grobholz R, Fischer C S, Vocke D C, Kvlvç R, Sarvkoç A, Piñol R, Hagl S, Lang S, Brueckmann M, Borggrefe M: Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis. Cardiovasc Pathol: 80–87 (2005)

49. Kaden J J, Dempfle C-E, Grobholz R, Tran H-T, Kiliç R, Sarikoç A, Brueckmann M, Vahl C, Hagl S, Haase K K, Borggrefe M: Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis. Atherosclerosis 170: 205–211 (2003)

50. Klingenberg R, Gerdes N, Badeau R M, Gisterå A, Strodthoff D, Ketelhuth D F J, Lundberg A M, Rudling M, Nilsson S K, Olivecrona G, Zoller S, Lohmann C, Lüscher T F, Jauhiainen M, Sparwasser T, Hansson G K: Depletion of FOXP3+ regulatory T cells promotes hypercholesterolemia and atherosclerosis. J Clin Invest 123: 1323–1334 (2013)

51. Koltsova E K, Garcia Z, Chodaczek G, Landau M, McArdle S, Scott S R, von Vietinghoff S, Galkina E, Miller Y I, Acton S T, Ley K: Dynamic T cell-APC interactions sustain chronic inflammation in atherosclerosis. J Clin Invest 122: 3114–3126 (2012)

52. Krummel M F, Allison J P: CD28 and CTLA-4 Have Opposing Effects on the Response of T cells to Stimulation. J Exp Med: 459–465 (1995)

53. Lazaruk K, Wang Y, Zhong J, Maltchenko S, Rabkin S, Hunkapiller K, Furtado M, Petrauskene O, Guegler K, Gilbert D, Spier E: The Design Process for a New Generation of Quantitative Gene Expression Analysis Tools: 1–11 • http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_040599.pdf (13.11.2017)

54. Lee L G, Connell C R, Bloch W: Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorgenic probes. Nucleic Acids Res 21: 3761–3766 (1993)

55. Liu A C, Joag V R, Gotlieb A I: The Emerging Role of Valve Interstitial Cell Phenotypes in Regulating Heart Valve Pathobiology. Am J Pathol 171: 1407–1418 (2007)

56. Mazzone A, Epistolato M C, Gianetti J, Castagnini M, Sassi C, Ceravolo R, Bevilacqua S, Glauber M, Biagini A, Tanganelli P: Biologic Features (Inflammation and Neoangiogenesis) and Atherosclerotic Risk Factors in Carotid Plaques and Calcified Aortic Valve Stenosis Two Different Sites of the Same Disease? Am J Clin Pathol 126: 494–502 (2006)

57. Meininger D, Zalameda L, Liu Y, Stepan L P, Borges L, McCarter J D, Sutherland C L: Purification and kinetic characterization of human indoleamine 2,3-dioxygenases 1 and 2 (IDO1 and IDO2) and discovery of selective IDO1 inhibitors. Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics 1814: 1947–1954 (2011)

58. Mellor A L, Munn D H: Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? Immunol Today 20: 469–473 (1999)

59. Metghalchi S, Ponnuswamy P, Simon T, Haddad Y, Laurans L, Clément M, Dalloz M, Romain M, Esposito B, Koropoulis V, Lamas B, Paul J-L, Cottin Y, Kotti S, Bruneval P, Callebert J, den Ruijter H, Launay J-M, Danchin N, Sokol H, Tedgui A, Taleb S, Mallat Z: Indoleamine 2,3-Dioxygenase Fine-Tunes Immune Homeostasis in Atherosclerosis and Colitis through Repression of Interleukin-10 Production. Cell Metab 22: 460–471 (2015)

60. Mohler E R, Chawla M K, Chang A W, Vyavahare N, Levy R J, Graham L, Gannon F H: Identification and characterization of Calcifying Valve Cells from Human and Canine Aortic Valves. J Heart Valve Dis 8: 254–260 (1999)

61. Mohler E R, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane M G, Kaplan F S: Bone Formation and Inflammation in Cardiac Valves. Circulation 103: 1522–1528 (2001)

62. Mor A, Planer D, Luboshits G, Afek A, Metzger S, Chajek-Shaul T, Keren G, George J: Role of naturally occurring CD4+ CD25+ regulatory T cells in experimental atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 27: 893–900 (2007)

63. Moreno P R, Astudillo L, Elmariah S, Purushothaman K R, Purushothaman

M, Lento P A, Sharma S K, Fuster V, Adams D H: Increased macrophage infiltration and neovascularization in congenital bicuspid aortic valve stenosis. J Thorac Cardiovasc Surg 142: 895–901 (2011)

64. Mosmann T R, Cherwinski H, Bond M W, Giedlin M A, Coffman R L: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol 136: 2348–2357 (1986)

65. Mueller O, Schroeder A, Lightfoot S: RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control: 1–8 (2004) https://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-1165EN.pdf (27.10.2017)

66. Munn D H, Shafizadeh E, Attwood J T, Bondarev I, Pashine A, Mellor A L: Inhibition of T Cell Proliferation by Macrophage Tryptophan Catabolism. J Exp Med 189: 1363–1372 (1999)

67. Munn D H, Sharma M D, Mellor A L: Ligation of B7-1/B7-2 by Human CD4+ T Cells Triggers Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity in Dendritic Cells. J Immunol Ref J Immunol 172: 4100–4110 (2004)

68. Nadra I, Mason J C, Philippidis P, Florey O, Smythe C D W, McCarthy G M, Landis R C, Haskard D O: Proinflammatory activation of macrophages by basic calcium phosphate crystals via protein kinase C and MAP kinase pathways: A vicious cycle of inflammation and arterial calcification? Circ Res 96: 1248–1256 (2005)

69. New S E P, Aikawa E: Molecular imaging insights into early inflammatory stages of arterial and aortic valve calcification. Circ Res 108: 1381–1391 (2011)

70. New S E P, Goettsch C, Aikawa M, Marchini J F, Shibasaki M, Yabusaki K, Libby P, Shanahan C M, Croce K, Aikawa E: Macrophage-Derived Matrix Vesicles: An Alternative Novel Mechanism for Microcalcification in Atherosclerotic Plaques. Circ Res 113: 72–77 (2013)

71. Niessner A, Sato K, Chaikof E L, Colmegna I, Goronzy J J, Weyand C M: Pathogen-sensing plasmacytoid dendritic cells stimulate cytotoxic T-cell function in the atherosclerotic plaque through interferon-alpha. Circulation 114: 2482–2489 (2006)

72. Niinisalo P, Raitala A, Pertovaara M, Oja S S, Lehtimäki T, Kähönen M, Reunanen A, Jula A, Moilanen L, Kesäniemi Y A, Nieminen M S, Hurme M: Indoleamine 2,3-dioxygenase activity associates with cardiovascular risk factors: The Health 2000 study. Scand J Clin Lab Invest 68: 767–770 (2008)

73. Niinisalo P, Oksala N, Levula M, Pelto-Huikko M, Järvinen O, Salenius J-P P, Kytömäki L, Soini J T, Kähönen M, Laaksonen R, Hurme M, Lehtimäki T, Jarvinen O, Kytomaki L, Kahonen M, Lehtimaki T: Activation of indoleamine 2,3-dioxygenase-induced tryptophan degradation in advanced atherosclerotic plaques: Tampere vascular study. Ann Med 42: 55–63 (2010)

74. Nishimura R A, Otto C M, Bonow R O, Carabello B A, Erwin J P, Guyton R A, O'Gara P T, Ruiz C E, Skubas N J, Sorajja P, Sundt T M, Thomas J D: 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease. J Thorac Cardiovasc Surg 148: e1–e132 (2014)

75. O'Brien K D, Kuusisto J, Reichenbach D D, Ferguson M, Giachelli C, Alpers C E, Otto C M: Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions. Circulation 92: 2163–2168 (1995)

76. Olsson M, Thyberg J, Nilsson J: Presence of oxidized low density lipoprotein in nonrheumatic stenotic aortic valves. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19: 1218–1222 (1999)

77. Osman L, Yacoub M H, Latif N, Amrani M, Chester A H: Role of Human Valve Interstitial Cells in Valve Calcification and Their Response to Atorvastatin. Circulation 547–552 (2006)

78. Osnabrugge R L J, Mylotte D, Head S J, Van Mieghem N M, Nkomo V T, LeReun C M, Bogers A J J C, Piazza N, Kappetein A P: Aortic Stenosis in the Elderly: Disease Prevalence and Number of Candidates for Transcatheter

Aortic Valve Replacement: A Meta-Analysis and Modeling Study. J Am Coll Cardiol 62: 1002–1012 (2013)

79. Otto C M, Kuusisto J, Reichenbach D D, Gown A M, O'Brien K D: Characterization of the early lesion of „degenerative" valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. Circulation 90: 844–853 (1994)

80. Otto C M, Lind B K, Kitzman D W, Gersh B J, Siscovick D S: Association of Aortic-Valve Sclerosis with Cardiovascular Mortality and Morbidity in the Elderly. N Engl J Med 341: 142–147 (1999)

81. Pallotta M T, Orabona C, Volpi C, Vacca C, Belladonna M L, Bianchi R, Servillo G, Brunacci C, Calvitti M, Bicciato S, Mazza E M C, Boon L, Grassi F, Fioretti M C, Fallarino F, Puccetti P, Grohmann U: Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. Nat Immunol 12: 870–878 (2011)

82. Pantoja L G, Miller R D, Ramirez J A, Molestina R E, Summersgill J T: Inhibition of Chlamydia pneumoniae replication in human aortic smooth muscle cells by gamma interferon-induced indoleamine 2, 3-dioxygenase activity. Infect Immun 68: 6478–6481 (2000)

83. Pawade T A, Newby D E, Dweck M R: Calcification in Aortic Stenosis: The Skeleton Key. J Am Coll Cardiol 66: 561–577 (2015)

84. Perrotta I, Sciangula A, Aquila S, Mazzulla S: Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Calcified Human Aortic Valves: A Histopathologic, Immunohistochemical, and Ultrastructural Study. Appl Immunohistochem Mol Morphol: 128–137 (2014)

85. Pfaffl M W: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29: 2002–2007 (2001)

86. Pfefferkorn E R, Rebhun S, Eckel M: Characterization of an Indoleamine 2,3-Dioxygenase Induced by Gamma-Interferon in Cultured Human Fibroblasts. J Interferon Res 6: 267–279 (1986)

87. Poggianti E, Venneri L, Chubuchny V, Jambrik Z, Baroncini L A, Picano E: Aortic Valve Sclerosis Is Associated With Systemic Endothelial Dysfunction. J Am Coll Cardiol 41: 136–141 (2003)

88. Poggio P, Branchetti E, Grau J B, Lai E K, Gorman R C, Gorman J H, Sacks M S, Bavaria J E, Ferrari G: Osteopontin-CD44v6 interaction mediates calcium deposition via phospho-akt in valve interstitial cells from patients with noncalcified aortic valve sclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 34: 2086–2094 (2014)

89. Poggio P, Grau J B, Field B C, Sainger R, Seefried W F, Rizzolio F, Ferrari G: Osteopontin Controls Endothelial Cell Migration In Vitro and in Excised Human Valvular Tissue from Patients with Calcific Aortic Stenosis and Controls. J Cell Physiol 226: 2139–2149 (2011)

90. Pomerance A: Pathology of the Heart with and without Cardiac Failure in the Aged. Brit Hear J 27: 697–710 (1965)

91. Porras A M, Westlund J A, Evans A D, Masters K S: Creation of disease-inspired biomaterial environments to mimic pathological events in early calcific aortic valve disease. Proc Natl Acad Sci USA 115: E363–E371 (2017)

92. Proudfoot D, Skepper J N, Hegyi L, Bennett M R, Shanahan C M, Weissberg P L: Apoptosis Regulates Human Vascular Calcification In Vitro. Circ Res 87: 1055–1062 (2000)

93. Rajamannan N M, Subramaniam M, Rickard D, Stock S R, Donovan J, Springett M, Orszulak T, Fullerton D A, Tajik A J, Bonow R O, Spelsberg T: Human Aortic Valve Calcification Is Associated With an Osteoblast Phenotype. Circulation 107: 2181–2184 (2003)

94. Roberts W C, Ko J M: Frequency by Decades of Unicuspid, Bicuspid, and Tricuspid Aortic Valves in Adults Having Isolated Aortic Valve Replacement for Aortic Stenosis, With or Without Associated Aortic Regurgitation. Circulation 111: 920–925 (2005)

95. Rossebø A B, Pedersen T R, Boman K, Brudi P, Chambers J B, Egstrup K,

Gerdts E, Gohlke-Bärwolf C, Holme I, Kesäniemi Y A, Malbecq W, Nienaber C A, Ray S, Skjærpe T, Wachtell K, Willenheimer R: Intensive Lipid Lowering with Simvastatin and Ezetimibe in Aortic Stenosis. N Engl J Med 359: 1343–1356 (2008)

96. Ryoo S, Kim D-U, Won M, Chung K-S, Jang Y-J, Oh G-T, Park S-K, Maeng P-J, Yoo H-S, Hoe K-L: Native LDL induces interleukin-8 expression via H2O2, p38 Kinase, and activator protein-1 in human aortic smooth muscle cells. Cardiovasc Res 62: 185–193 (2004)

97. Sage A P, Murphy D, Maffia P, Masters L M, Sabir S R, Baker L L, Cambrook H, Finigan A J, Ait-Oufella H, Grassia G, Harrison J E, Ludewig B, Reith W, Hansson G K, Reizis B, Hugues S, Mallat Z: MHC Class II-Restricted Antigen Presentation by Plasmacytoid Dendritic Cells Drives Proatherogenic T Cell Immunity. Circulation 130: 1363–1373 (2014)

98. Sakash J B, Byrne G I, Lichtman A, Libby P: Cytokines Induce Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression in Human Atheroma-Associated Cells: Implications for Persistent Chlamydophila pneumoniae Infection. Infect Immun 70: 3959–3961 (2002)

99. Sapoznikov A, Fischer J A A, Zaft T, Krauthgamer R, Dzionek A, Jung S: Organ-dependent in vivo priming of naive CD4+, but not CD8+, T cells by plasmacytoid dendritic cells. J Exp Med 204: 1923–1933 (2007)

100. Satta J, Melkko J, Pöllänen R, Tuukkanen J, Pääkkö P, Ohtonen P, Mennander A, Soini Y: Progression of Human Aortic Valve Stenosis Is Associated With Tenascin-C Expression. J Am Coll Cardiol 39: 96–101 (2002)

101. Satta J, Oiva J, Salo T, Eriksen H, Ohtonen P, Biancari F, Juvonen T S, Soini Y: Evidence for an altered balance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitors in calcific aortic stenosis. Ann Thorac Surg 76: 681–688 (2003)

102. Schaffner T, Taylor K, Bartucci E J, Fischer-Dzoga K, Beeson J H, Glagov S, Wissler R W: Arterial foam cells with distinctive immunomorphologic and histochemical features of macrophages. Am J Pathol 100: 57–80 (1980)

103. Schoen F J: Cardiac valves and valvular pathology: Update on function, disease, repair, and replacement. Cardiovascular Pathology 14: 189–194 (2005)

104. Sell S, Scully R E: Aging Changes in the Aortic and Mitral Valves. Histologic and Histochemical Studies, With Observations on the Pathogenesis of Calcific Aortic Stenosis and Calcification of the Mitral Annulus. Am J Pathol 46: 345–365 (1965)

105. Shimoni S, Bar I, Meledin V, Gandelman G, George J: Circulating regulatory T cells in patients with aortic valve stenosis : Association with disease progression and aortic valve intervention. Int J Cardiol 218: 181–187 (2016)

106. Soini Y, Satta J, Määttä M, Autio-Harmainen H: Expression of MMP2, MMP9, MT1-MMP, TIMP1, and TIMP2 mRNA in valvular lesions of the heart. J Pathol 194: 225–231 (2001)

107. Stary H C, Chandler A B, Glagov S, Guyton J R, Insull W, Rosenfeld M E, Schaffer S A, Schwartz C J, Wagner W D, Wissler R W: A Definition of Initial, Fatty Streak, and Intermediate Lesions of Atherosclerosis. A Report From the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Circulation 89: 2462–2478 (1994)

108. Šteiner I, Krbal L, Rozkoš T, Harrer J, Laco J: Calcific aortic valve stenosis: Immunohistochemical analysis of inflammatory infiltrate. Pathol - Res Pract 208: 231–234 (2012)

109. Stewart B F, Siscovick D, Lind B K, Gardin J M, Gottdiener J S, Smith V E, Kitzman D W, Otto C M: Clinical Factors Associated With Calcific Aortic Valve Disease. J Am Coll Cardiol 29: 630–634 (1997)

110. Sun J, Hartvigsen K, Chou M-Y, Zhang Y, Sukhova G K, Zhang J, Lopez-Ilasaca M, Diehl C J, Yakov N, Harats D, George J, Witztum J L, Libby P, Ploegh H, Shi G-P: Deficiency of Antigen-Presenting Cell Invariant Chain Reduces Atherosclerosis in Mice. Circulation 122: 808–820 (2010)

111. Teo K K, Corsi D J, Tam J W, Dumesnil J G, Chan K L: Lipid Lowering on

Progression of Mild to Moderate Aortic Stenosis: Meta-analysis of the Randomized Placebo-Controlled Clinical Trials on 2344 Patients. Can J Cardiol 27: 800–808 (2011)

112. Thermo Fisher Scientific: Nucleic Acid - Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers. 1–27 (2010)

113. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn I, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman R: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 3: 34.1-34.12 (2002)

114. Venardos N, Nadlonek N A, Zhan Q, Weyant M J, Reece T B, Meng X, Fullerton D A: Aortic valve calcification is mediated by a differential response of aortic valve interstitial cells to inflammation. J Surg Res 190: 1–8 (2014)

115. Vermeiren J, Ceuppens J L, Van Ghelue M, Witters P, Bullens D, Mages H W, Kroczek R A, Van Gool S W: Human T cell Activation by Costimulatory Signal-Deficient Allogeneic Cells Induces Inducible Costimulator-Expressing Anergic T Cells with Regulatory Cell Activity. J Immunol 172: 5371–5378 (2004)

116. Walker G A, Masters K S, Shah D N, Anseth K S, Leinwand L A: Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor-β: Implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease. Circ Res 95: 253–260 (2004)

117. Wallby L, Janerot-Sjöberg B, Steffensen T, Broqvist M: T lymphocyte infiltration in non-rheumatic aortic stenosis: a comparative descriptive study between tricuspid and bicuspid aortic valves. Heart 88: S. 348–351 (2002)

118. Wang R, Chen W, Ma Z, Li L, Chen X: M1/M2 macrophages and associated mechanisms in congenital bicuspid aortic valve stenosis. Exp Ther Med 7: 935–940 (2014)

119. Warren B A, Yong J L C: Calcification of the aortic valve: Its progression and grading. Pathology 29: 360–368 (1997)

120. Weinberg E J, Kaazempur Mofrad M R: A multiscale computational comparison of the bicuspid and tricuspid aortic valves in relation to calcific aortic stenosis. J Biomech 41: 3482–3487 (2008)

121. Wilkins E, Wilson L, Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Rayner M, Townsend N: European Cardiovascular Disease Statistics 2017 edition. (2017)

122. Wu H D, Maurer M S, Friedman R A, Marboe C C, Ruiz-Vazquez E M, Ramakrishnan R, Schwartz A, Tilson M D, Stewart A S, Winchester R: The Lymphocytic Infiltration in Calcific Aortic Stenosis Predominantly Consists of Clonally Expanded T cells. J Immunol 178: 5329–5339 (2007)

123. Yeghiazaryan K, Skowasch D, Bauriedel G, Schild H, Golubnitschaja O: Could activated tissue remodeling be considered as early marker for progressive valve degeneration? Comparative analysis of checkpoint and ECM remodeling gene expression in native degenerating aortic valves and after bioprosthetic replacement. Amino Acids 32: 109–114 (2007)

124. Yoshida R, Imanishit J, Okut T, Kishidat T, Hayaishi O: Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by interferon. Biochemistry 78: 129–132 (1981)

125. Yoshinaga S K, Whoriskey J S, Khare S D, Sarmiento U, Guo J, Horan T, Shih G, Zhang M, Coccia M A, Kohno T, Tafuri-Bladt A, Brankow D, Campbell P, Chang D, Chiu L, Dai T, Duncan G, Elliott G S, Hui A, McCabe S M, Scully S, Shahinian A, Shaklee C L, Van G, Mak T W, Senaldi G: T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. Nature 402: 827–832 (1999)

126. Yun T J, Lee J S, Machmach K, Shim D, Choi J, Wi Y J, Jang H S, Jung I-H, Kim K, Yoon W K, Miah M A, Li B, Chang J, Bego M G, Pham T N Q, Loschko J, Fritz J H, Krug A B, Lee S-P, Keler T, Guimond J V, Haddad E, Cohen E A, Sirois M G, El-Hamamsy I, Colonna M, Oh G T, Choi J-H, Cheong C: Indoleamine 2,3-Dioxygenase-Expressing Aortic Plasmacytoid Dendritic Cells Protect against Atherosclerosis by Induction of Regulatory T Cells. Cell Metab 23: 852–866 (2016)

Anhang

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Schweregrade der Aortenklappenstenose laut Leitlinien der American Heart Association [74] 1

Tabelle 2: Materialliste Probengewinnung 13

Tabelle 3: Materialliste Homogenisierung 16

Tabelle 4: Materialliste Aufreinigung RNA 16

Tabelle 5: Materialliste NanoDrop 17

Tabelle 6: Materialliste BioAnalyzer 18

Tabelle 7: Materialliste Reverse Transkription 19

Tabelle 8: Materialliste Präamplifikation 22

Tabelle 9: Materialliste qPCR 24

Tabelle 10: Materialliste Histologie 26

Tabelle 11: Materialliste Versilberung nach von Kossa 27

Tabelle 12: Patientendaten verkalkt vs. insuffizient bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017 32

Tabelle 13: Patientendaten bikuspid vs. trikuspid bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017 33

Tabelle 14: Qualität der extrahierten RNA verkalkt vs. insuffizient bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017 34

Tabelle 15: Qualität der extrahierten RNA bikuspid vs. trikuspid bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017 34

Tabelle 16: Expressionsanalyse von verkalkten und insuffizienten Herzklappen bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017 36

Tabelle 17: Expressionsanalyse von bikuspiden und trikuspiden Herzklappen bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017 40

Tabelle 18: Korrelationsanalyse IDO1 gesamt (n=48) bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017 42

Tabelle 19: Korrelationsanalyse IDO1 verkalkt vs. insuffizient bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017 44

Tabelle 20: Korrelationsanalyse (Kendall‘s Tau) der Marker regulatorischer T-Zellen und antiinflammatorischer Zytokine bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017 46

Tabelle 21: Korrelationsanalyse (Kendall’s Tau) der Marker antigenpräsentierender Zellen der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017 48

Tabelle 22: Korrelationsanalyse (Kendall’s Tau) der Matrixenzyme und -glykoproteine bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017 49

Tabelle 23: Korrelationsanalyse KÖF und RNA-Konzentration der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017 51

Tabelle 24: Positive Negativkontrolle der Matrizenstränge (NTC) bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017 52

Tabelle 25: Auswertung der Negativkontrollen der Reversen Transkription (-RT) bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017 53

Tabelle 26: Auflistung aller verwendeten TaqMan-Assays bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm Juli 2016 bis Mai 2017 103

Tabelle 27: Korrelationsanalyse - Darstellung der Werte für Kendall‘s Tau für alle Klappen (n=48) bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm Juli 2016 bis Mai 2017 109

Tabelle 28: Korrelationsanalyse - Darstellung der Werte für Kendall‘s Tau für die biologische Gruppe „Verkalkt“ (n=38) bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm Juli 2016 bis Mai 2017 110

Tabelle 29: Korrelationsanalyse - Darstellung der Werte für Kendall‘s Tau für die biologische Gruppe „Verkalkt“ (n=38) bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm Juli 2016 bis Mai 2017 111

Tabelle 30: Korrelationsanalyse - Darstellung der Werte für Kendall‘s Tau für die biologische Gruppe „Insuffizient“ (n=10) bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017 112

Tabelle 31: Korrelationsanalyse - Darstellung der Werte für Kendall‘s Tau für die biologische Gruppe „Insuffizient“ (n=10) bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm Juli 2016 bis Mai 2017 113

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Pathogenese der degenerativen Aortenklappenerkrankung 5

Abbildung 2: Beispielbilder der verwendeten Herzklappen für die Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017 15

Abbildung 3: Funktionsweise der Hydrolysesonden 21

Abbildung 4: Streudiagramme und Boxplots der Zielgene der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017 37

Abbildung 5: Streudiagramme und Boxplots der Zielgene der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017 38

Abbildung 6: Streudiagramme und Boxplots der Zielgene der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017 39

Abbildung 7: Regressionsgeraden der Zielgene mit den höchsten Korrelationskoeffizienten in Abhängigkeit von IDO1 für alle eingeschlossenen Patienten (n=48) der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017 43

Abbildung 8: Regressionsgeraden der Zielgene mit den höchsten Korrelationskoeffizienten in Abhängigkeit von IDO1 differenziert in die biologischen Gruppen bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017 45

Abbildung 9: Verdünnungsreihen zur Beurteilung der Effizienz der Reversen Transkription (RT) der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017 56

Abbildung 10: Von Kossa-Färbung zweier insuffizienter Aortenklappen bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017 57

Abbildung 11: Von Kossa-Färbung einer verkalkten Aortenklappe bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017 58

Übersicht Primerassays

Tabelle 26: Auflistung aller verwendeten TaqMan-Assays bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm Juli 2016 bis Mai 2017

Gen	CD4
Assay	TaqMan Gene Expression Assay
Katalognummer	4448892
Assay Kennung	Hs01058407_m1
Assay Design	Probe spans exons
Amplikonlänge	128
Färbung	FAM-MGB
Sequence Accession Number (RefSeq/GenBank)	NM_000616.4, NM_001195014.2, NM_001195015.2, NM_001195016.2, NM_001195017.2, XM_017020228.1, AK300052.1, AK303968.1, AK310677.1, AK312828.1, AK315898.1, AK316461.1, AK316462.1, BC025782.1, BT019791.1, BT019811.1, M12807.1

Gen	CD74
Assay	TaqMan Gene Expression Asssay
Katalognummer	4453320
Assay Kennung	Hs00269961_m1
Assay Design	Probe spans exons
Amplikonlänge	102
Färbung	FAM-MGB
Sequence Accession Number (RefSeq/GenBank)	NM_001025158.2, NM_001025159.2, NM_004355.3, XM_017010089.1, XM_017010090.1, AK292076.1, AK297889.1, AK308929.1, BC018726.1, BC024272.1, BF796148.1, BT019505.1, DC354760.1, K01144.1, X00497.1

Gen	CD80
Assay	TaqMan Gene Expression Assay
Katalognummer	4448892
Assay Kennung	Hs01045161_m1
Assay Design	Probe spans exons
Amplikonlänge	112
Färbung	FAM-MGB
Sequence Accession Number (RefSeq/GenBank)	NM_005191.3, XM_011513327.2, XM_017007520.1, AK292129.1, AY197777.1, BC042665.1, M27533.1

Gen	CD86
Assay	TaqMan Gene Expression Assay
Katalognummer	4448892

Assay Kennung	Hs01567026_m1
Assay Design	Probe spans exons
Amplikonlänge	104
Färbung	FAM-MGB
Sequence Accession Number (RefSeq/GenBank)	NM_001206924.1, NM_001206925.1, NM_006889.4, NM_175862.4, NM_176892.1, AK291497.1, AK294663.1, AK301237.1, AK313103.1, AK316203.1, BC040261.1, CR541844.1, L25259.1, U04343.1

Gen	CTLA4
Assay	TaqMan Gene Expression Assay
Katalognummer	4453320
Assay Kennung	Hs00175480_m1
Assay Design	Probe spans exons
Amplikonlänge	93
Färbung	FAM-MGB
Sequence Accession Number (RefSeq/GenBank)	NM_001037631.2, NM_005214.4, AF414120.1, AF486806.1, AK313732.1, AY209009.1, AY792514.1, BC069566.1, BC070162.1, BC074842.2, BC074893.2, CD639535.1, L15006.1

Gen	FOXP3
Assay	TaqMan Gene Expression Assay
Katalognummer	4448892
Assay Kennung	Hs01085831_g1
Assay Design	Probe spans exons
Amplikonlänge	116
Färbung	FAM-MGB
Sequence Accession Number (RefSeq/GenBank)	NM_001114377.1, NM_014009.3, XM_006724533.2, XM_011543916.2, XM_017029565.1, XM_017029566.1, XM_017029567.1, AF277993.1, AJ005891.1, AK292052.1, AK299988.1, BC113401.1, BC113403.1, BC143785.1, BC143786.1, DQ010327.1, EF534714.1, EU855812.1

Gen	GAPDH
Assay	TaqMan Gene Expression Assay
Katalognummer	4331182
Assay Kennung	Hs02786624_g1
Assay Design	within a single exon
Amplikonlänge	145
Färbung	FAM-MGB
Sequence Accession Number (RefSeq/GenBank)	NM_001256799.2, NM_001289745.1, NM_001289746.1, NM_002046.5, AB062273.1, AF261085.1, AK026525.1, AK308198.1, AY007133.1, AY633612.1, BC001601.1,

	BC004109.2, BC009081.1, BC013310.2, BC020308.1, BC023632.2, BC025925.1, BC026907.1, BC029340.1, BC029618.1, BC083511.1, BT006893.1, BU155402.1, CR407671.1, DQ403057.1, EU668321.1, J02642.1, M17851.1, M33197.1

Gen	ICOS
Assay	TaqMan Gene Expression Assay
Katalognummer	4448892
Assay Kennung	Hs00360000_m1
Assay Design	Probe spans exons
Amplikonlänge	135
Färbung	FAM-MGB
Sequence Accession Number (RefSeq/GenBank)	NM_012092.3, AB023135.1, AJ277832.1, AK314985.1, BC028006.1, BC028210.1

Gen	IDO1
Assay	TaqMan Gene Expression Assay
Katalognummer	4448892
Assay Kennung	Hs00986555_g1
Assay Design	Probe spans exons
Amplikonlänge	112
Färbung	FAM-MGB
Sequence Accession Number (RefSeq/GenBank)	NM_002164.5, AK313259.1, AY221100.1, BC027882.1, M34455.1, X17668.1

Gen	IFNG
Assay	TaqMan Gene Expression Assay
Katalognummer	4453320
Assay Kennung	Hs99999041_m1
Assay Design	Probe spans exons
Amplikonlänge	117
Färbung	FAM-MGB
Sequence Accession Number (RefSeq/GenBank)	NM_000619.2, AB451324.1, AB451453.1, AF506749.1, AM903379.1, AY044154.1, AY255837.1, AY255839.1, BC070256.1, EF173872.1, V00543.1, X01992.1, X13274.1, X62468.1, X62469.1, X62470.1, X62471.1, X62472.1, X62473.1, X62474.1, X87308.1

Gen	IL10
Assay	TaqMan Gene Expression Assay
Katalognummer	4453320
Assay Kennung	Hs00174086_m1

Assay Design	Probe spans exons
Amplikonlänge	119
Färbung	FAM-MGB
Sequence Accession Number (RefSeq/GenBank)	NM_000572.2, AF043333.1, AY029171.1, BC104252.1, BC104253.1, CR541993.1, M57627.1

Gen	MMP-1
Assay	TaqMan Gene Expression Assay
Katalognummer	4453320
Assay Kennung	Hs00233958_m1
Assay Design	Probe spans exons
Amplikonlänge	133
Färbung	FAM-MGB
Sequence Accession Number (RefSeq/GenBank)	NM_001145938.1, NM_002421.3, AK024818.1, AK098450.1, AK130687.1, AK223034.1, AK223035.1, AK223036.1, AK223056.1, AK223281.1, AK225495.1, AK297723.1, AK301340.1, BC013118.1, BC013875.2, BT006874.1, BT020147.1, M13509.1, X05231.1, X54925.1

Gen	MMP-2
Assay	TaqMan Gene Expression Assay
Katalognummer	4453320
Assay Kennung	Hs01548724_m1
Assay Design	Probe spans exons
Amplikonlänge	96
Färbung	FAM-MGB
Sequence Accession Number (RefSeq/GenBank)	NM_001127891.2, NM_001302508.1, NM_001302509.1, NM_001302510.1, NM_004530.5, AK301536.1, AK310314.1, AK312711.1, BC002576.2, J03210.1

Gen	MMP-3
Assay	TaqMan Gene Expression Assay
Katalognummer	4453320
Assay Kennung	Hs00968305_m1
Assay Design	Probe spans exons
Amplikonlänge	126
Färbung	FAM-MGB
Sequence Accession Number (RefSeq/GenBank)	NM_002422.4, AK223283.1, AK223291.1, AK313310.1, BC069676.1, BC069716.1, BC074815.2, BC074869.2, BC105954.1, BC107490.1, BC107491.1, J03209.1, X05232.1

Gen	MMP-9
Assay	TaqMan Gene Expression Assay
Katalognummer	4448892

Assay Kennung	Hs00957554_g1
Assay Design	Probe spans exons
Amplikonlänge	145
Färbung	FAM-MGB
Sequence Accession Number (RefSeq/GenBank)	NM_004994.2, AK298246.1, AK302530.1, AK303080.1, AK311648.1, AK313137.1, AK316145.1, BC006093.1, J05070.1

Gen	RPL13A
Assay	TaqMan Gene Expression Assay
Katalognummer	4331182
Assay Kennung	Hs04194366_g1
Assay Design	within single exon
Amplikonlänge	113
Färbung	FAM-MGB
Sequence Accession Number (RefSeq/GenBank)	NM_001270491, NM_012423, NR_073024, AB082924, AK056837, AK130605, AK291120, AK297859, BC000514, BC000847, BC004900, BC032107, BC062537, BC070223, BC071929

Gen	RPS18
Assay	TaqMan Gene Expression Assay
Katalognummer	4448892
Assay Kennung	Hs01584357_g1
Assay Design	Probe spans exons
Amplikonlänge	146
Färbung	FAM-MGB
Sequence Accession Number (RefSeq/GenBank)	BC106063

Gen	TGFB1
Assay	TaqMan Gene Expression Assay
Katalognummer	4453320
Assay Kennung	Hs99999918_m1
Assay Design	Probe spans exons
Amplikonlänge	125
Färbung	FAM-MGB
Sequence Accession Number (RefSeq/GenBank)	NM_000660.5, AK291907.1, AK307742.1, BC000125.1, BC001180.1, BC022242.1, BT007245.1, X02812.1

Gen	TNC
Assay	TaqMan Gene Expression Assay
Katalognummer	4448892
Assay Kennung	Hs01115656_m1
Assay Design	Probe spans exons

Amplikonlänge	109
Färbung	FAM-MGB
Sequence Accession Number (RefSeq/GenBank)	NM_002160.3, XM_005251972.3, XM_005251973.3, XM_005251974.3, XM_005251975.3, XM_006717096.3, XM_006717097.3, XM_006717098.3, XM_006717101.3, XM_011518625.2, XM_011518626.2, XM_011518628.2, XM_011518629.2, XM_017014678.1, XM_017014679.1, XM_017014680.1, XM_017014681.1, AB210038.1, BC151843.1, GU473235.1, M24630.1, M55618.1, X56160.1, X78565.1

Gen	SPP1
Assay	TaqMan Gene Expression Assay
Katalognummer	4453320
Assay Kennung	Hs00959010_m1
Assay Design	Probe spans exons
Amplikonlänge	84
Färbung	FAM-MGB
Sequence Accession Number (RefSeq/GenBank)	NM_000582.2, NM_001040058.1, NM_001040060.1, NM_001251829.1, NM_001251830.1, XM_017008564.1, AB209987.1, AF052124.1, AK057738.1, AK075463.1, AK290090.1, AK290104.1, AK295491.1, AK296035.1, AK315461.1, BC007016.1, BC017387.1, BC022844.1, BC093033.1, BX648003.1, DQ839491.1, DQ846870.1, DQ846871.1, J04765.1, JF412666.1, JF412667.1, KR062183.1, M83248.1, X13694.1

Tabelle 27: Korrelationsanalyse - Darstellung der Werte für Kendall's Tau für alle Klappen (n=48) bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm Juli 2016 bis Mai 2017

*CD=Cluster of Differentiation; CTLA4=zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; FOXP3=Forkhead-Box-Protein P3; ICOS= induzierbarer T-Zell-Kostimulator; IDO1=Indolamin-2,3-dioxygenase 1; IFNG=Interferon gamma; IL=Interleukin; MMP= Matrixmetalloproteinase; SPP1=Osteopontin; TGFB=transformierender Wachstumsfaktor Beta; TNC=Tenascin C; KÖF=Klappenöffnungsfläche; Δp_{max}=maximaler Druckgradient; RNAKonz=RNA-Konzentration; A260/280=Verhältnis der optischen Dichte zwischen 260 nm und 280 nm; RIN=RNA Integrity; Weiß = 0; 1>x>0 = grün mit steigender Intensität; 0>x>-1 = rot mit steigender Intensität; *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001*

	CD74	MMP1	IDO1	MMP2	FOXP3	IFNG	MMP3	TGFB1	CD28	MMP9	CTLA4	IL10	ICOS
CD74		0,19	0,44***	0,42***	0,60***	0,42***	0,10	0,70***	0,56***	0,30**	0,45***	0,35***	0,54***
MMP1	0,19		0,23*	0,03	0,06	0,27**	0,25*	0,11	0,24*	0,28**	0,16	0,07	0,33**
IDO1	0,44***	0,23*		0,39***	0,38***	0,58***	0,17	0,46***	0,54***	0,22*	0,54***	0,36***	0,59***
MMP2	0,42***	0,03	0,39***		0,42***	0,20*	-0,06	0,51***	0,52***	-0,03	0,37***	0,30**	0,24*
FOXP3	0,60***	0,06	0,38***	0,42***		0,29**	0,09	0,71***	0,44***	0,28**	0,46***	0,43***	0,44***
IFNG	0,42***	0,27**	0,58***	0,20*	0,29**		0,26**	0,42***	0,58***	0,30**	0,40***	0,52***	0,65***
MMP3	0,10	0,25*	0,17	-0,06	0,09	0,26**		0,12	0,15	0,25*	0,18	0,20*	0,25*
TGFB1	0,70***	0,11	0,46***	0,51***	0,71***	0,42***	0,12		0,60***	0,21*	0,46***	0,49***	0,52***
CD28	0,56***	0,24*	0,54***	0,52***	0,44***	0,58***	0,15	0,60***		0,15	0,44***	0,57***	0,55***
MMP9	0,30**	0,28**	0,22*	-0,03	0,28*	0,30**	0,25*	0,21*	0,15		0,30**	0,20*	0,40***
CTLA4	0,45***	0,16	0,54***	0,37***	0,46***	0,40***	0,18	0,46***	0,44***	0,30**		0,45***	0,51***
IL10	0,35***	0,07	0,36***	0,30**	0,43***	0,52***	0,20*	0,49***	0,57***	0,20*	0,45***		0,46***
ICOS	0,54***	0,33**	0,59***	0,24*	0,44***	0,65***	0,25*	0,52***	0,55***	0,40***	0,51***	0,46***	
CD4	0,57***	0,12	0,35***	0,33***	0,53***	0,45***	0,16	0,64***	0,47***	0,24*	0,38***	0,40***	0,57***
CD80	0,58***	0,28**	0,58***	0,45***	0,47***	0,58***	0,17	0,60***	0,80***	0,19	0,46***	0,51***	0,56***
TNC	0,46***	0,29**	0,38***	0,54***	0,38**	0,32**	0,01	0,47***	0,53***	0,07	0,35***	0,34***	0,35***
CD86	0,39***	0,28**	0,50***	0,22*	0,29***	0,70***	0,31**	0,40***	0,66***	0,18	0,37***	0,49***	0,52***
SPP1	0,48***	0,37***	0,53***	0,29**	0,33***	0,58***	0,25*	0,43***	0,60***	0,34***	0,37***	0,37***	0,49***
KÖF	-0,16	-0,24*	-0,26***	-0,30*	-0,05	-0,26*	0,10	-0,11	-0,27*	0,13	-0,24*	-0,12	-0,22
Δpmax	0,01	0,03	0,06	0,14	-0,04	-0,03	-0,24*	-0,07	0,07	-0,14	0,03	-0,05	-0,08
Alter	0,02	0,00	0,12	0,00	0,05	0,21*	0,05	0,03	0,13	0,02	0,11	0,13	0,08
Lagerungsdauer	-0,21*	-0,11	-0,20	-0,19	-0,05	-0,13	0,04	-0,17	-0,21*	-0,02	-0,11	-0,04	-0,19
RNAKonzentration	-0,12	-0,13	-0,14	-0,01	-0,03	-0,24*	-0,28**	-0,07	-0,24*	0,02	-0,05	-0,14	-0,22*
A260/280	-0,22*	-0,05	-0,16	-0,07	-0,03	-0,14	-0,15	-0,13	-0,11	-0,01	-0,12	-0,02	-0,15
RIN	-0,12	-0,18	-0,09	0,05	-0,03	-0,21*	-0,11	-0,06	-0,15	-0,04	-0,06	-0,14	-0,21*

Tabelle 28: Korrelationsanalyse - Darstellung der Werte für Kendall's Tau für die biologische Gruppe „Verkalkt" (n=38) bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm Juli 2016 bis Mai 2017

*CD=Cluster of Differentiation; CTLA4=zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; FOXP3=Forkhead-Box-Protein P3; ICOS= induzierbarer T-Zell-Kostimulator; IDO1=Indolamin-2,3-dioxygenase 1; IFNG=Interferon gamma; IL=Interleukin; MMP= Matrixmetalloproteinase; SPP1=Osteopontin; TGFB=transformierender Wachstumsfaktor Beta; TNC=Tenascin C; KÖF=Klappenöffnungsfläche; Δp_{max}=maximaler Druckgradient; RNAKonz=RNA-Konzentration; A260/280=Verhältnis der optischen Dichte zwischen 260 nm und 280 nm; RIN=RNA Integrity; Weiß = 0; 1>x>0 = grün mit steigender Intensität; 0>x>-1 = rot mit steigender Intensität; *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001*

	CD74	MMP1	IDO1	MMP2	FOXP3	IFNG	MMP3	TGFB1	CD28	MMP9	CTLA4	IL10	ICOS
CD74		0,21	0,48***	0,48***	0,70***	0,48***	0,17	0,74***	0,58***	0,32**	0,44***	0,43***	0,56***
MMP1	0,21		0,27*	0,12	0,15	0,29**	0,36**	0,17	0,24*	0,34**	0,21	0,22*	0,43***
IDO1	0,48***	0,27*		0,39***	0,50***	0,59***	0,29**	0,47***	0,55***	0,28*	0,59***	0,49***	0,62***
MMP2	0,48***	0,12	0,39***		0,55***	0,28*	0,06	0,55***	0,57***	0,05	0,48***	0,41***	0,29*
FOXP3	0,70***	0,15	0,50***	0,55***		0,34**	0,08	0,77***	0,49***	0,24*	0,48***	0,40***	0,43***
IFNG	0,48***	0,29**	0,59***	0,28*	0,34**		0,32**	0,46***	0,62***	0,31**	0,42***	0,64***	0,70***
MMP3	0,17	0,36**	0,29**	0,06	0,08	0,32**		0,15	0,23*	0,29*	0,20	0,17	0,33**
TGFB1	0,74***	0,17	0,47***	0,55***	0,77***	0,46***	0,15		0,64***	0,19	0,43***	0,51***	0,52***
CD28	0,58***	0,24*	0,55***	0,57***	0,49***	0,62***	0,23*	0,64***		0,16	0,45***	0,67***	0,55***
MMP9	0,32**	0,34**	0,28*	0,05*	0,24*	0,31**	0,29*	0,19	0,16		0,28*	0,27*	0,39***
CTLA4	0,44***	0,21	0,59***	0,48***	0,48***	0,42***	0,20	0,43***	0,45***	0,28*		0,50***	0,49***
IL10	0,43***	0,22*	0,49***	0,41***	0,40***	0,64***	0,17	0,51***	0,67***	0,27*	0,50***		0,53***
ICOS	0,56***	0,43***	0,62***	0,29***	0,43***	0,70***	0,33**	0,52***	0,55***	0,39***	0,49***	0,53***	
CD4	0,60***	0,17	0,36**	0,42**	0,51***	0,47***	0,16	0,62***	0,50***	0,17	0,35**	0,41***	0,57***
CD80	0,61***	0,30**	0,58***	0,52***	0,56***	0,60***	0,26*	0,65***	0,80***	0,23*	0,45***	0,60***	0,58***
TNC	0,43***	0,29**	0,40***	0,60**	0,47***	0,35**	0,13	0,48***	0,53***	0,10	0,39***	0,45***	0,37***
CD86	0,44***	0,30**	0,51***	0,32	0,31**	0,69***	0,36**	0,44***	0,71***	0,15	0,35**	0,58***	0,53***
SPP1	0,53***	0,34**	0,54***	0,39	0,39***	0,59***	0,33**	0,46***	0,63***	0,34**	0,39***	0,50***	0,56***
KÖF	-0,07	-0,14	-0,22	-0,37	-0,16	-0,24	-0,03	-0,11	-0,24	0,07	-0,30*	-0,22	-0,25
Δpmax	-0,06	-0,09	-0,02	0,20	0,04	-0,12	-0,27*	-0,06	0,06	-0,07	0,00	0,05	-0,15
Alter	0,03	-0,07	0,07	0,07	0,04	0,18	0,06	0,02	0,14	-0,07	0,08	0,20	0,05
Lagerungsdauer	-0,24*	-0,13	-0,15	-0,19	-0,15	-0,09	-0,04	-0,22	-0,26*	-0,04	-0,17	-0,15	-0,22
RNAKonzentration	-0,12	-0,14	-0,23*	-0,01	-0,02	-0,30**	-0,36**	-0,13	-0,23*	0,00	-0,05	-0,15	-0,24*
A260/280	-0,26*	-0,03	-0,11	-0,10	-0,12	-0,09	-0,22	-0,18	-0,12	-0,10	-0,15	-0,03	-0,16
RIN	-0,12	-0,24*	-0,18	-0,01	0,03	-0,29*	-0,09	-0,08	-0,19	-0,08	0,00	-0,14	-0,20

Tabelle 29: Korrelationsanalyse - Darstellung der Werte für Kendall's Tau für die biologische Gruppe „Verkalkt" (n=38) bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm Juli 2016 bis Mai 2017

*zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; FOXP3=Forkhead-Box-Protein P3; ICOS=induzierbarer T-Zell-Kostimulator; IDO1=Indolamin-2,3-dioxygenase 1; IFNG=Interferon gamma; IL=Interleukin; MMP= Matrixmetalloproteinase; SPP1=Osteopontin; TGFB=transformierender Wachstumsfaktor Beta; TNC=Tenascin C; KÖF=Klappenöffnungsfläche; Δpmax=maximaler Druckgradient; RNAKonz=RNA-Konzentration; A260/280=Verhältnis der optischen Dichte zwischen 260 nm und 280 nm; RIN=RNA Integrity; Weiß=0; 1>x>0 = grün mit steigender Intensität; 0>x>-1 = rot mit steigender Intensität; *p<0,05 ** p<0,01 ***p<0,001*

	CD4	CD80	TNC	CD86	SPP1	KÖF	Δpmax	Alter	Lagerungs-dauer	RNAKonz	A260/280	RIN
CD74	0,60***	0,61***	0,43***	0,44***	0,53***	-0,07	-0,06	0,03	-0,24*	-0,12	-0,26*	-0,12
MMP1	0,17	0,30**	0,29**	0,30**	0,34**	-0,14	-0,09	-0,07	-0,13	-0,14	-0,03	-0,24*
IDO1	0,36**	0,58***	0,40***	0,51***	0,54***	-0,22	-0,02	0,07	-0,15	-0,23*	-0,11	-0,18
MMP2	0,42***	0,52***	0,60***	0,32**	0,39***	-0,37**	0,20	0,07	-0,19	-0,01	-0,10	-0,01
FOXP3	0,51***	0,56***	0,47***	0,31**	0,39***	-0,16	0,04	0,04	-0,15	-0,02	-0,12	0,03
IFNG	0,47***	0,60***	0,35**	0,69***	0,59***	-0,24	-0,12	0,18	-0,09	-0,30**	-0,09	-0,29*
MMP3	0,16	0,26*	0,13	0,36**	0,33**	-0,03	-0,27*	0,06	-0,04	-0,36**	-0,22	-0,09
TGFB1	0,62***	0,65***	0,48***	0,44***	0,46***	-0,11	-0,06	0,02	-0,22	-0,13	-0,18	-0,08
CD28	0,50***	0,80***	0,53***	0,71***	0,63***	-0,24	0,06	0,14	-0,26*	-0,23*	-0,12	-0,19
MMP9	0,17	0,23*	0,10	0,15	0,34**	0,07	-0,07	-0,07	-0,04	0,00	-0,10	-0,08
CTLA4	0,35**	0,45***	0,39***	0,35**	0,39***	-0,30*	0,00	0,08	-0,17	-0,05	-0,15	0,00
IL10	0,41***	0,60***	0,45***	0,58***	0,50***	-0,22	0,05	0,20	-0,15	-0,15	-0,03	-0,14
ICOS	0,57***	0,58***	0,37***	0,53***	0,56***	-0,25	-0,15	0,05	-0,22	-0,24*	-0,16	-0,20
CD4		0,51***	0,35**	0,43***	0,35**	-0,17	-0,14	-0,02	-0,17	-0,14	-0,12	-0,11
CD80	0,51***		0,56***	0,68***	0,68***	-0,22	0,02	0,17	-0,18	-0,26*	-0,16	-0,12
TNC	0,35**	0,56***		0,35**	0,36**	-0,27*	0,14	0,09	-0,19	-0,09	-0,14	-0,05
CD86	0,43***	0,68***	0,35**		0,63***	-0,26*	0,00	0,19	-0,10	-0,37***	-0,08	-0,20
SPP1	0,35**	0,68***	0,36**	0,63***		-0,19	0,04	0,12	-0,11	-0,29*	-0,13	-0,21
KÖF	-0,17	-0,22	-0,27*	-0,26*	-0,19		-0,28	-0,16	0,13	0,11	0,07	-0,02
Δpmax	-0,14	0,02	0,14	0,00	0,04	-0,28		0,04	-0,15	0,04	-0,06	0,05
Alter	-0,02	0,17	0,09	0,19	0,12	-0,16	0,04		0,04	-0,25*	-0,07	-0,11
Lagerungsdauer	-0,17	-0,18	-0,19	-0,10	-0,11	0,13	-0,15	0,04		0,08	0,21	0,08
RNAKonzentration	-0,14	-0,26*	-0,09	-0,37***	-0,29*	0,11	0,04	-0,25*	0,08		0,31**	0,25*
A260/280	-0,12	-0,16	-0,14	-0,08	-0,13	0,07	-0,06	-0,07	0,21	0,31**		0,06
RIN	-0,11	-0,12	-0,05	-0,20	-0,21	-0,02	0,05	-0,11	0,08	0,25*	0,06	

Tabelle 30: Korrelationsanalyse - Darstellung der Werte für Kendall's Tau für die biologische Gruppe „Insuffizient" (n=10) bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm, Juli 2016 bis Mai 2017

*zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; FOXP3=Forkhead-Box-Protein P3; ICOS=induzierbarer T-Zell-Kostimulator; IDO1=Indolamin-2,3-dioxygenase 1; IFNG=Interferon gamma; IL=Interleukin; MMP=Matrixmetalloproteinase; SPP1=Osteopontin; TGFB=transformierender Wachstumsfaktor Beta; TNC=Tenascin C; KÖF=Klappenöffnungsfläche; Δp_{max}=maximaler Druckgradient; RNAKonz=RNA-Konzentration; A260/280=Verhältnis der optischen Dichte zwischen 260 nm und 280 nm; RIN=RNA Integrity; Weiß = 0; 1>x>0=grün mit steigender Intensität; 0>x>-1=rot mit steigender Intensität; *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001*

	CD74	MMP1	IDO1	MMP2	FOXP3	IFNG	MMP3	TGFB1	CD28	MMP9	CTLA4	IL10	ICOS
CD74		-0,02	0,00	0,11	0,42	0,11	-0,24	0,64*	0,33	0,33	0,42	0,24	0,42
MMP1	-0,02		0,06	-0,38	-0,24	0,07	-0,02	-0,11	0,11	0,20	0,02	-0,33	-0,16
IDO1	0,00	0,06		0,17	0,00	0,56*	-0,28	0,33	0,28	0,17	0,39	-0,17	0,39
MMP2	0,11	-0,38	0,17		-0,20	-0,16	-0,51*	0,38	0,42	-0,29	-0,02	0,07	-0,02
FOXP3	0,42	-0,24	0,00	-0,20		0,16	0,07	0,24	0,20	0,29	0,29	0,38	0,56*
IFNG	0,11	0,07	0,56*	-0,16	0,16		0,20	0,29	0,33	0,42	0,42	0,16	0,51*
MMP3	-0,24	-0,02	-0,28	-0,51*	0,07	0,20		-0,16	-0,20	0,07	0,07	0,33	0,07
TGFB1	0,64*	-0,11	0,33	0,38	0,24	0,29	-0,16		0,60*	0,16	0,51*	0,42	0,51*
CD28	0,33	0,11	0,28	0,42	0,20	0,33	-0,20	0,60*		0,20	0,38	0,47	0,56*
MMP9	0,33	0,20	0,17	-0,29	0,29	0,42	0,07	0,16	0,20		0,38	0,02	0,56*
CTLA4	0,42	0,02	0,39	-0,02	0,29	0,42	0,07	0,51*	0,38	0,38		0,29	0,56*
IL10	0,24	-0,33	-0,17	0,07	0,38	0,16	0,33	0,42	0,47	0,02	0,29		0,38
ICOS	0,42	-0,16	0,39	-0,02	0,56*	0,51*	0,07	0,51*	0,56*	0,56*	0,56*	0,38	
CD4	0,56*	-0,11	0,44	0,11	0,42	0,38	-0,16	0,73*	0,51*	0,42	0,60*	0,24	0,69*
CD80	0,24	0,20	0,50	0,24	0,20	0,51*	-0,11	0,51*	0,82**	0,29	0,29	0,29	0,56*
TNC	0,51*	0,11	0,17	0,42	0,02	0,24	-0,29	0,69*	0,73*	0,11	0,29	0,38	0,29
CD86	0,02	0,07	0,56*	-0,16	0,16	0,91**	0,20	0,29	0,33	0,33	0,33	0,24	0,42
SPP1	0,16	0,56*	0,61*	-0,11	-0,07	0,51*	-0,02	0,24	0,38	0,47	0,20	-0,16	0,29
KÖF	0,00	0,60	0,00	-0,60	0,40	0,40	0,60	-0,20	0,40	0,40	0,00	0,20	0,20
Δpmax	-0,14	-0,43	0,47	0,24	-0,14	-0,33	-0,43	-0,05	-0,43	-0,05	-0,05	-0,52	-0,05
Alter	-0,07	0,30	0,46	-0,20	0,02	0,39	-0,11	-0,02	0,11	0,43	0,16	-0,30	0,25
Lagerungsdauer	0,24	0,11	-0,39	-0,11	0,29	-0,20	0,33	0,16	0,29	0,11	0,29	0,56*	0,20
RNAKonzentration	0,07	0,11	0,33	-0,02	-0,16	-0,02	-0,29	0,16	-0,07	0,02	0,20	-0,33	-0,07
A260/280	0,05	0,14	-0,24	-0,05	0,14	-0,28	0,19	-0,05	0,09	0,14	0,00	-0,05	0,09
RIN	0,02	0,16	0,34	0,21	-0,30	0,26	-0,35	0,12	0,16	0,07	-0,16	-0,26	-0,16

Tabelle 31: Korrelationsanalyse - Darstellung der Werte für Kendall's Tau für die biologische Gruppe „Insuffizient" (n=10) bei der Aortenklappen-Vergleichsstudie des Universitätsklinikums Ulm Juli 2016 bis Mai 2017

*zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; FOXP3=Forkhead-Box-Protein P3; ICOS= induzierbarer T-Zell-Kostimulator; IDO1=Indolamin-2,3-dioxygenase 1; IFNG=Interferon gamma; IL=Interleukin; MMP=Matrixmetalloproteinase; SPP1=Osteopontin; TGFB=transformierender Wachstumsfaktor Beta; TNC=Tenascin C; KÖF=Klappenöffnungsfläche; Δp_{max}=maximaler Druckgradient; RNAKonz=RNA-Konzentration; A260/280=Verhältnis der optischen Dichte zwischen 260 nm und 280 nm; RIN=RNA Integrity; Weiß=0; 1>x>0 = grün mit steigender Intensität; 0>x>-1 = rot mit steigender Intensität; *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001*

	CD4	CD80	TNC	CD86	SPP1	KÖF	Δpmax	Alter	Lagerungs-dauer	RNAKonz	A2607280	RIN
CD74	0,56*	0,24	0,51*	0,02	0,16	0,00	-0,14	-0,07	0,24	0,07	0,05	0,02
MMP1	-0,11	0,20	0,11	0,07	0,56*	0,60	-0,43	0,30	0,11	0,11	0,14	0,16
IDO1	0,44	0,50	0,17	0,56*	0,61*	0,00	0,47	0,46	-0,39	0,33	-0,24	0,34
MMP2	0,11	0,24	0,42	-0,16	-0,11	-0,60	0,24	-0,20	-0,11	-0,02	-0,05	0,21
FOXP3	0,42	0,20	0,02	0,16	-0,07	0,40	-0,14	0,02	0,29	-0,16	0,14	-0,30
IFNG	0,38	0,51*	0,24	0,91**	0,51*	0,40	-0,33	0,39	-0,20	-0,02	-0,28	0,26
MMP3	-0,16	-0,11	-0,29	0,20	-0,02	0,60	-0,43	-0,11	0,33	-0,29	0,19	-0,35
TGFB1	0,73*	0,51*	0,69*	0,29	0,24	-0,20	-0,05	-0,02	0,16	0,16	-0,05	0,12
CD28	0,51*	0,82**	0,73*	0,33	0,38	0,40	-0,43	0,11	0,29	-0,07	0,09	0,16
MMP9	0,42	0,29	0,11	0,33	0,47	0,40	-0,05	0,43	0,11	0,02	0,14	0,07
CTLA4	0,60*	0,29	0,29	0,33	0,20	0,00	-0,05	0,16	0,29	0,20	0,00	-0,16
IL10	0,24	0,29	0,38	0,24	-0,16	0,20	-0,52	-0,30	0,56*	-0,33	-0,05	-0,26
ICOS	0,69*	0,56*	0,29	0,42	0,29	0,20	-0,05	0,25	0,20	-0,07	0,09	-0,16
CD4		0,42	0,60*	0,29	0,24	0,20	0,24	0,11	-0,02	0,24	0,00	0,16
CD80	0,42		0,56*	0,51*	0,56*	0,60	-0,52	0,30	0,11	-0,07	0,09	0,26
TNC	0,60*	0,56*		0,24	0,29	0,40	-0,33	-0,07	0,11	0,02	-0,05	0,35
CD86	0,29	0,51*	0,24		0,51*	0,40	-0,33	0,39	-0,11	-0,02	-0,38	0,26
SPP1	0,24	0,56*	0,29	0,51*		0,80*	-0,33	0,57*	-0,07	0,11	0,00	0,40
KÖF	0,20	0,60	0,40	0,40	0,80*		-0,60	0,40	0,20	-0,40	0,53	0,22
Δpmax	0,24	-0,52	-0,33	-0,33	-0,33	-0,60		0,05	-0,62*	0,71*	-0,45	0,15
Alter	0,11	0,30	-0,07	0,39	0,57*	0,40	0,05		-0,11	0,11	-0,05	0,12
Lagerungsdauer	-0,02	0,11	0,11	-0,11	-0,07	0,20	-0,62*	-0,11		-0,42	0,28	-0,54*
RNAKonzentration	0,24	-0,07	0,02	-0,02	0,11	-0,40	0,71*	0,11	-0,42		-0,19	0,35
A260/280	0,00	0,09	-0,05	-0,38	0,00	0,53	-0,45	-0,05	0,28	-0,19		-0,10
RIN	0,16	0,26	0,35	0,26	0,40	0,22	0,15	0,12	-0,54*	0,35	-0,10	

Danksagung

Diese Seite wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Lebenslauf

Diese Seite wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Diese Seite wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.