

Aus der Klinik für Thorax- und Herz-Gefäßchirurgie  
Universitätsklinikum des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Schäfers

Genexpression in der Aorta ascendens bei Patienten  
mit unicuspiden Aortenklappen

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES  
DOKTORS DER MEDIZIN

der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2014

vorgelegt von

Dominic Henn

geboren am 15.10.1989 in Idar-Oberstein

# Inhaltsverzeichnis

## 1. Zusammenfassung

1.1. Zusammenfassung	8
1.2. Summary	10

## 2. Einleitung

2.1. Ätiologie thorakaler Aortenaneurysmen	12
2.2. Epidemiologie der unicuspiden Aortenklappe	13
2.3. Morphologie der unicuspiden Aortenklappe	14
2.4. Dilatation der Aorta ascendens bei unicuspider Aortenklappe	18
2.4.1. Epidemiologie	18
2.4.2. Pathogenese	18
2.4.2.1. Fibrillin-1 und TGF- $\beta$	20
2.4.2.2. Matrixmetalloproteinasen	22
2.4.2.3. MYH11 und ACTA2	23
2.4.2.4. eNOS	24
2.4.2.5. GATA5	24
2.4.2.6. Kollagene	25
2.4.2.7. NOTCH1 und NOTCH3	26
2.5. Fragestellung	27

## 3. Material und Methoden

3.1. Probengewinnung	30
3.2. RNA-Isolierung	34
3.3. Bestimmung der RNA-Reinheit und –Konzentration	37
3.4. Bestimmung der RNA-Integrität	38
3.5. cDNA-Synthese	43
3.6. Realtime PCR	45
3.7. Statistische Analyse	50

## 4. Ergebnisse

4.1. Gene der eNOS- und NOTCH-Signalwege	52
4.1.1. GATA5	52
4.1.2. eNOS	56
4.1.3. NOTCH1	60
4.1.4. NOTCH3	63
4.2. Gene des TGF- $\beta$ -Signalweges	65
4.2.1. FBN1	65
4.2.2. TGFBR1	67
4.2.3. TGFBR2	70
4.3. Gene in Zusammenhang mit familiären oder sporadischen Aortenaneurysmen	
4.3.1. ACTA2	72
4.3.2. COL3A1	75
4.3.3. MMP19	78

## 5. Diskussion

5.1. Hintergrund	81
5.2. Gene der eNOS- und NOTCH-Signalwege	86
5.2.1. GATA5 und eNOS	86
5.2.2. NOTCH1 und NOTCH3	89
5.3. Gene des TGF- $\beta$ -Signalweges	93
5.3.1. FBN1	93
5.3.2. TGFBR1 und TGFBR2	94
5.4. Gene in Zusammenhang mit familiären oder sporadischen Aortenaneurysmen	98
5.4.1. ACTA2	98
5.4.2. COL3A1	100
5.4.3. MMP19	101
5.5. Fazit	104

**6. Literaturverzeichnis**

**7. Publikationen**

**8. Danksagung**

**9. Lebenslauf**

## Abkürzungsverzeichnis

### A

ACE-Hemmer	Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer
ACTA2	smooth muscle aortic alpha-actin
ANOVA	Varianzanalyse
AT1-Antagonist	Angiotensin II-Rezeptor-Typ 1-Antagonist
AV	aortoventrikulärer Übergang

### B

BAV	bicuspide Aortenklappe
-----	------------------------

### C

cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
COL3A1	Kollagen Typ 3, Alpha-1
Co-SMAD	common SMAD

### D

DNase	Desoxyribonuklease
-------	--------------------

### E

eNOS	endotheliale NO-Synthetase
EDS	Ehlers-Danlos-Syndrom

### F

FBN1	Fibrillin-1
FTAAD	familiäre thorakale Aortenaneurysmen und Dissektionen
FU	Fluoreszenzeinheiten

### H

HEY2	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 2
------	---

### K

KHK	Koronare Herzkrankheit
-----	------------------------

**L**

LLC large latent complex  
 IRNA large RNA

**M**

MAP-Kinase Mitogen-aktivierte Proteinkinase  
 MMP Matrixmetalloproteinase  
 mRNA messenger RNA  
 MRT Magnetresonanztomographie  
 MYH11 smooth muscle myosin heavy chain 11

**N**

NIC intrazelluläre NOTCH-Domäne

**O**

OD optische Dichte

**P**

PCR Polymerase-Kettenreaktion

**Q**

qPCR quantitative Polymerase-Kettenreaktion

**R**

RIN RNA integrity number  
 RNA Ribonukleinsäure  
 RNase Ribonuklease  
 RQ relative Quantität  
 rRNA ribosomale RNA  
 R-SMAD receptor regulated SMAD  
 RT-PCR Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion

**S**

SD Standardabweichung  
 SE Standardfehler des Mittelwertes  
 SKI V-SKI avian sarcoma viral oncogene homolog  
 SLC2A10 solute carrier family 2, member 10

SMAD	homolog of mothers against decapentaplegic in Drosophila
sRNA	small RNA
ST	sinotubulärer Übergang
<b>T</b>	
TAV	tricuspid Aortenklappe
TAV-D	tricuspid Aortenklappe mit Dilatation der Aorta ascendens
TAV-N	tricuspid Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens
TGF- $\beta$	transforming growth factor beta
TGFBR1	transforming growth factor beta-Rezeptor 1
TGFBR2	transforming growth factor beta-Rezeptor 2
TGIF2	transforming growth factor-beta-induced factor 2
<b>U</b>	
UAV	unicuspid Aortenklappe
UAV-D	unicuspid Aortenklappe mit Dilatation der Aorta ascendens
UAV-N	unicuspid Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens

## 1.1. Zusammenfassung

### Hintergrund:

Die unicuspidale Aortenklappe ist eine seltene kongenitale kardiale Anomalie, die zu Aneurysmen der Aorta ascendens prädisponiert. Es gibt Hinweise darauf, dass sich Genexpression und Proteingehalt in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen – die eine wesentlich häufigere Anomalie darstellen - im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen unterscheiden. Bisher liegen keine Studien zur Pathogenese der Aortenaneurysmen bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen vor.

### Fragestellung:

Ziel dieser Studie war es, die Expression von Genen des eNOS- (GATA5, eNOS), NOTCH- (NOTCH1, NOTCH3) und TGF- $\beta$ -Signalweges (FBN1, TGFBR1, TGFBR2) sowie von Genen, die mit thorakalen Aortenaneurysmen assoziiert sind (ACTA2, COL3A1, MMP19), zu untersuchen, um herauszufinden, ob es Unterschiede in ihrer Expression in der Aortenwand von Patienten mit unicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen gibt.

### Material und Methoden:

Es wurden intraoperativ Gewebeproben der Aorta ascendens bei 19 Patienten mit unicuspiden Aortenklappen und 33 Patienten mit tricuspiden Aortenklappen entnommen. Als Kontrollgruppe dienten Patienten mit tricuspiden Aortenklappen ohne Dilatation der Aorta ascendens. Es erfolgte zunächst die Isolation der RNA und anschließend die reverse Transkription in cDNA sowie die quantitative real-time PCR zur Bestimmung der Genexpression.

### Ergebnisse:

Die Genexpression von GATA5, eNOS, TGFBR1 und ACTA2 ist in der Aortenwand von Patienten mit unicuspiden Aortenklappen signifikant höher als bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen. Bei Patienten mit unicuspiden

Aortenklappen liegt eine positive Korrelation zwischen der Expression von GATA5 und eNOS vor. Weiterhin korreliert die Expression dieser beiden Gene negativ mit den Durchmessern der Aorta ascendens.

**Schlussfolgerung:**

Die Daten dieser Studie legen nahe, dass eine erhöhte GATA5-Expression in der Aortenwand von Patienten mit unicuspiden Aortenklappen durch Aktivierung der eNOS-Transkription die Pathogenese der Aortenaneurysmen dieser Patienten beeinflusst. Eine erhöhte TGFBR1- und ACTA2-Expression in der Aortenwand von Patienten mit unicuspiden Aortenklappen weist darauf hin, dass einer Dysregulation des TGF- $\beta$ -Signalweges ebenfalls eine zentrale Rolle in der Aortopathie dieser Patienten zukommt.

## **1.2. Summary**

### **Gene Expression in the Ascending Aorta in Patients with Unicuspid Aortic Valves**

#### **Background**

Unicuspid aortic valves are a rare congenital cardiac anomaly predisposing to the development of ascending aortic aneurysms. For patients with bicuspid aortic valves, which are more frequent, there is evidence suggesting gene expression and protein content in the ascending aortic wall to be different from patients with tricuspid aortic valves. So far no research has been conducted on the molecular pathogenesis of aortic aneurysms in patients with unicuspid aortic valves.

#### **Objective**

The purpose of this study was to examine the expression levels of genes that are part of the eNOS- (GATA5, eNOS), NOTCH- (NOTCH1, NOTCH3) and TGF- $\beta$ - (FBN1, TGFBR1, TGFBR2) signaling pathways, as well as of genes that are associated with thoracic aortic aneurysms (ACTA2, COL3A1, MMP19) to determine whether their expression is different in the aortic wall from patients with unicuspid compared to patients with tricuspid aortic valves.

#### **Material and Methods**

Tissue samples were intraoperatively collected from the ascending aortic wall of 19 patients with unicuspid aortic valves and 33 patients with tricuspid aortic valves. Patients with tricuspid aortic valves and normal ascending aortic diameter served as controls. After RNA isolation, reverse transcription into cDNA was performed, followed by quantitative real-time PCR to assess gene expression levels.

**Results:**

The gene expression of GATA5, eNOS, TGFBR1, and ACTA2 is significantly higher in the ascending aortic wall of patients with unicuspid aortic valves compared to patients with tricuspid aortic valves. In patients with unicuspid aortic valves the gene expression of GATA5 and eNOS correlates positively with each other and negatively with the diameters of the ascending aorta.

**Conclusion:**

The data of this study indicate that elevated GATA5 expression via upregulation of eNOS transcription is involved in the pathogenesis of ascending aortic aneurysms in patients with unicuspid aortic valves. Increased expression of TGFBR1 as well as ACTA2 in the aortic wall of patients with unicuspid aortic valves suggests that a dysregulated TGF- $\beta$  pathway also plays a critical role in the aortopathy seen in patients with unicuspid aortic valves.

## 2. Einleitung

### 2.1. Ätiologie thorakaler Aortenaneurysmen

Aneurysmen der thorakalen Aorta liegen in etwa 60 % im Bereich der Aortenwurzel und der Aorta ascendens vor. Der Aortenbogen und die Aorta descendens sind seltener betroffen [54]. Thorakale Aortenaneurysmen bleiben in den meisten Fällen bis zum Auftreten von Komplikationen asymptomatisch. Daher ist ihre genaue Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung nur schwer zu bestimmen [65]. In der Literatur wird eine Inzidenz von etwa 10 pro 100.000 Personenjahre angegeben [18].

Die Hauptkomplikationen von Aortenaneurysmen stellen die Dissektion und die Ruptur dar, die beide mit einer hohen Letalität assoziiert sind. Ab einem Aortendurchmesser von 6 cm steigt die Rate an Komplikationen massiv an. Die Wahrscheinlichkeit eine thorakale Aortendissektion zu erleiden, beträgt ab einem Aortendurchmesser von 6 cm etwa 6,9 % pro Jahr, die Letalität 11,8 % pro Jahr [20]. Das Risiko an einer akuten Typ A-Dissektion nach Stanford (Dissektion der Aorta ascendens mit oder ohne Beteiligung distaler Anteile) zu versterben, beträgt etwa 1 - 2 % pro Stunde nach Symptombeginn [69,72]. Trotz notfallmäßiger chirurgischer Therapie liegt die Krankenhausletalität der Typ A-Dissektion bei etwa 12 - 26% [44,49,59].

In ihrer Ätiologie und Pathophysiologie unterscheiden sich thorakale Aortenaneurysmen grundlegend von den häufigeren abdominellen Aortenaneurysmen [91]. Während abdominelle Aortenaneurysmen vor allem mit atherosklerotischen Risikofaktoren wie männlichem Geschlecht, Alter, Nikotinkonsum, arterieller Hypertonie und Hypercholesterinämie assoziiert sind [91], kommen Aneurysmen der thorakalen Aorta vor allem in Zusammenhang mit hereditären Bindegewebserkrankungen und kongenitalen Anomalien der Aortenklappe vor [13,88].

Unter den syndromalen Bindegewebserkrankungen ist das Marfan-Syndrom, das mit einer Prävalenz von etwa 1 : 5000 vorkommt [82], für den größten Teil der genetisch bedingten thorakalen Aortenaneurysmen verantwortlich [30]. Bei betroffenen Patienten liegt bis zum Alter von 20 Jahren in etwa 70 % der Fälle ein thorakales Aortenaneurysma vor [2]. Die häufigste angeborene kardiale Anomalie und die häufigste Aortenklappenanomalie ist die bicuspidale Aortenklappe, die mit einer Prävalenz von 1 - 2 % in der Allgemeinbevölkerung vorkommt [10]. Etwa 50 - 60 % der Patienten mit bicuspiden Aortenklappen entwickeln im Laufe ihres Lebens Aneurysmen der Aorta ascendens [35,93], deren Pathogenese noch nicht ausreichend entschlüsselt ist. Auf Grund ihrer wesentlich höheren Prävalenz sind angeborene Anomalien der Aortenklappe daher viel häufiger die Ursache von thorakalen Aortenaneurysmen als das Marfan-Syndrom [115].

Eine wesentlich seltenere angeborene Anomalie der Aortenklappe ist die unicuspidale Aortenklappe, deren klinische Bedeutung dennoch nicht unterschätzt werden sollte, da sie bereits im jungen Erwachsenenalter zu Aortendissektionen prädisponiert [68].

## **2.2. Epidemiologie der unicuspiden Aortenklappe**

Die unicuspidale Aortenklappe (unicuspid aortic valve, UAV) ist eine in der Allgemeinbevölkerung seltene kongenitale Anomalie der Aortenklappe. Ihre Prävalenz wird aber wahrscheinlich unterschätzt, da die Unterscheidung von der weitaus häufigeren bicuspiden Aortenklappe (bicuspid aortic valve, BAV) in der Echokardiographie schwierig sein kann [6]. In der Literatur wird für die unicuspidale Aortenklappe eine Prävalenz von 0,02 % bei Patienten in der Echokardiographie angegeben [92]. Obwohl bicuspidale Aortenklappen etwa 50-mal häufiger vorkommen [115], ist die unicuspidale Aortenklappe damit die zweithäufigste angeborene Anomalie der Aortenklappe, sodass sie im herzchirurgischen Operationssaal keine Seltenheit darstellt. In einer Studie an

Patienten, die wegen einer Aortenklappenstenose einen Aortenklappenersatz erhielten, lag in 5 % der Fälle eine unicuspidale Aortenklappe vor [105]. Allerdings wurden in diese Studie nur Patienten einbezogen, die älter als 20 Jahre waren. Bei Patienten, die jünger als 20 Jahre waren und in unserer Klinik an der Aortenklappe oder der Aorta ascendens operiert wurden, lag in mehr als der Hälfte der Fälle eine unicuspidale Aortenklappe vor [4].

Dass eine Abgrenzung zwischen bicuspiden und unicuspiden Aortenklappen eine klinische Relevanz hat, zeigten schon Larsen und Edwards 1984 in einer Autopsiestudie an 161 Patienten mit Aortendissektionen. Patienten mit unicuspiden Aortenklappen hatten im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen (tricuspid aortic valve, TAV) ein 18-fach erhöhtes Risiko, eine Aortendissektion zu entwickeln, wohingegen das Risiko bei bicuspidaler Aortenklappe 9-fach erhöht war [68].

### **2.3. Morphologie der unicuspiden Aortenklappe**

Es werden zwei morphologische Subtypen der unicuspiden Aortenklappe unterschieden. Beim häufigeren unikommissuralen Typ liegt eine normal entwickelte Kommissur auf Höhe der Koronarostien vor. Diese findet sich am häufigsten links posterior im Anulus der Aortenklappe (Abbildungen 1 und 2) [33,111]. Die beiden rudimentären Kommissuren, typischerweise zwischen rechts- und linkskoronarer Tasche sowie zwischen rechts- und akoronarer Tasche, sind kongenital fusioniert und von geringerer Höhe als die Koronarostien (Abbildung 3) [32].

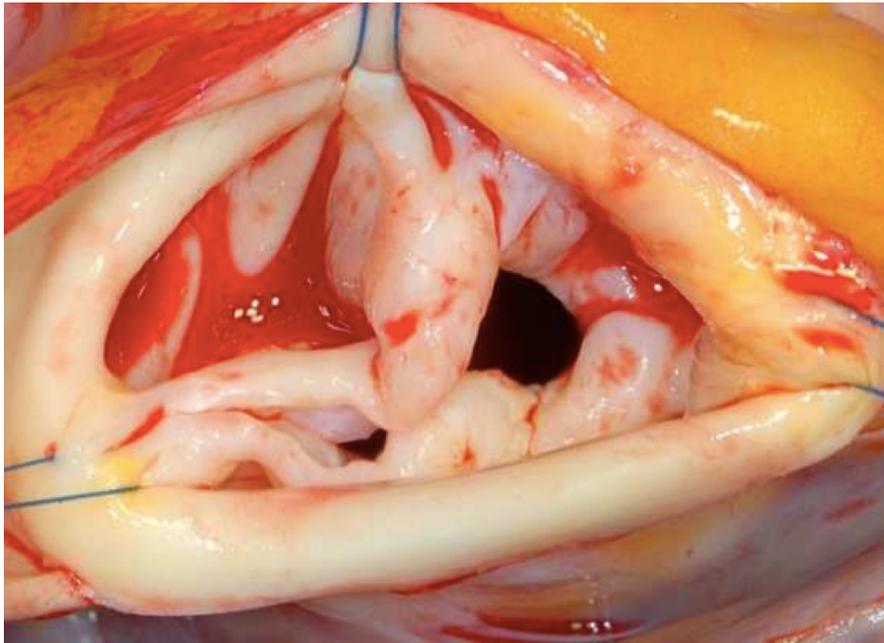


Abbildung 1: Unikommissurale unicuspide Aortenklappe im OP-Situs



Abbildung 2: Schema einer unikommissuralen unicuspiden Aortenklappe, ANT = anteriore Kommissur, LCO = linkes Koronarostium, RCO = rechtes Koronarostium [111].

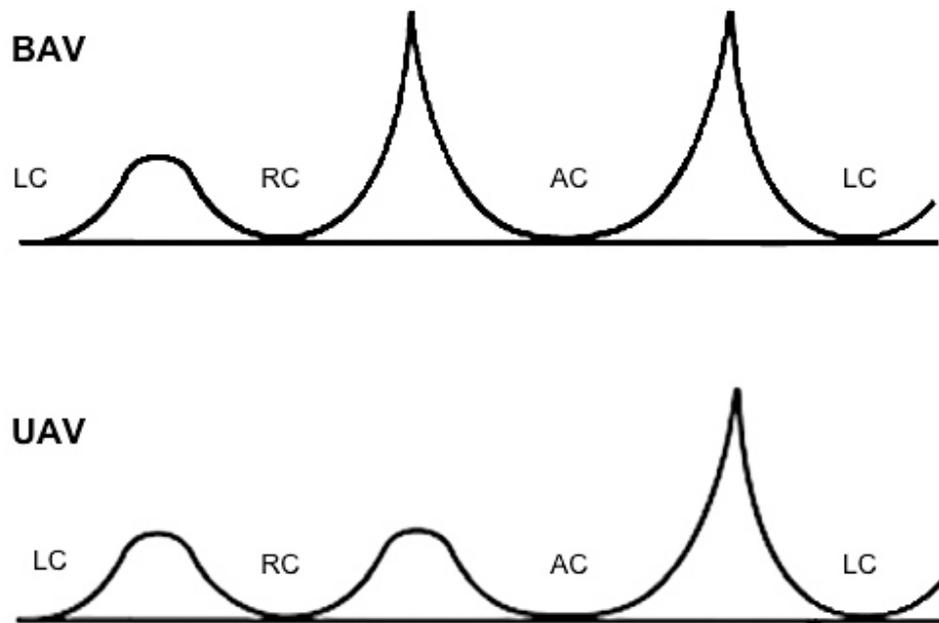


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Insertionslinien der Taschen einer bicuspiden Aortenklappe (BAV) und einer unicuspiden Aortenklappe (UAV), LC = linkskoronare Tasche; RC = rechtskoronare Tasche; AC = akoronare Tasche

Bei etwa 8 % aller unicuspiden Aortenklappen liegt keine voll entwickelte Kommissur vor. Diese selteneren akommissuralen unicuspiden Aortenklappen weisen drei rudimentäre Kommissuren unterhalb der Koronarostien und eine zentrale dreieckige Öffnung auf (Abbildung 4) [33,106].

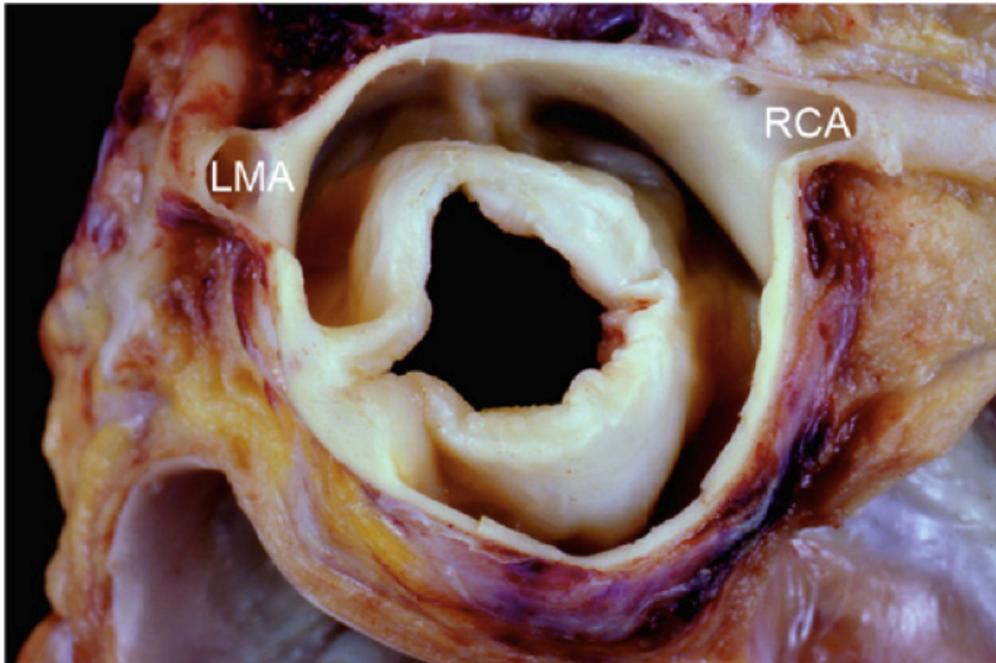


Abbildung 4: Postmortales Präparat einer akommissuralen unicuspiden Aortenklappe, LMA = linke Koronararterie, RCA = rechte Koronararterie [33].

Die häufigste hämodynamische Konsequenz bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen ist die Stenose. Von den in der Literatur beschriebenen Fällen erwachsener Patienten mit unicuspiden Aortenklappen weisen 85 % eine Stenose mit oder ohne begleitende Insuffizienz auf. Eine isolierte Aortenklappeninsuffizienz wird seltener beschrieben (7 %) [85]. Patienten mit unicuspiden Aortenklappen werden im Mittel in ihrer 3. Lebensdekade an der Aortenklappe operiert und damit etwa eine Dekade früher als Patienten mit bicuspiden Aortenklappen [85,108,117].

Wie auch bei bicuspiden Aortenklappen ist die Stenose bei unicuspiden Aortenklappen häufig mit einer Kalzifizierung assoziiert. Roberts et al. beschreiben in einer Studie an 499 stenosierten Aortenklappen signifikant höhere mittlere Gewichte der untersuchten unicuspiden Aortenklappen (4,36 g) im Vergleich zu bicuspiden (3,34 g) und tricuspiden Aortenklappen (2,04 g) [104].

## **2.4. Dilatation der Aorta ascendens bei unicuspiden Aortenklappen**

### **2.4.1. Epidemiologie**

Aneurysmen der thorakalen Aorta stellen eine häufige Komplikation bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen dar [14,89]. Auch bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen werden Aneurysmen der Aorta ascendens beobachtet, allerdings gibt es hierzu bislang wenig systematische Daten. Die in der Literatur angegebenen Prävalenzen für Aortenaneurysmen bei Vorliegen einer unicuspiden Aortenklappe liegen bei 36 – 61 % [4,11,92]. Diese Zahlen weisen darauf hin, dass die Prävalenz der Aortendilatation bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen ähnlich der von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen zu sein scheint, die bei 50 - 60% liegt [35,93]. Allerdings treten Aortendissektionen bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen im Mittel schon in der 4. Lebensdekade auf und damit eine Dekade früher als bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und sogar zwei Dekaden früher als bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen [68]. Es scheint also Unterschiede in der Pathophysiologie der Aortendilatation bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen zu geben, die diese zur früheren Entwicklung von Aortendissektionen prädisponieren.

### **2.4.2. Pathogenese**

Aneurysmen der thorakalen Aorta gehen in der Regel mit einer cystischen Medianekrose der Aortenwand einher [100]. In der aortalen Media kommt es zu einer Akkumulation basophiler Grundsubstanz in Form von sauren Mucopolysacchariden, begleitet von einem Verlust an glatten Muskelzellen und einer Fragmentation der elastischen Fasern [100]. Bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen ist das Ausmaß der cystischen Medianekrose unabhängig von der Funktion der Aortenklappe stärker ausgeprägt als bei Patienten mit

tricuspiden Aortenklappen [25,90]. Obwohl die bisherigen Daten ein möglicherweise aggressiveres Fortschreiten der Aortendilatation bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen nahe legen [68], weist die Aortenwand dieser Patienten ein ähnliches Ausmaß an cystischer Medianekrose auf wie die von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen [11].

Mit der Pathogenese der Aortenaneurysmen bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen hat sich eine Vielzahl an Studien befasst. In der Literatur haben sich zwei Hypothesen herausgebildet, die kontrovers diskutiert werden.

Einige Autoren sehen die Ursache der Aneurysmen in einem durch die Morphologie der bicuspiden Aortenklappe veränderten Blutfluss in der Aorta ascendens. Untersuchungen des systolischen Blutflusses in der Aorta mittels vierdimensionaler Magnetresonanztomographie zeigten ein helicales Flussprofil bei Vorliegen einer bicuspiden Aortenklappe im Gegensatz zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen. Ein helicales Flussmuster liegt auch dann vor, wenn die bicuspide Aortenklappe weder stenosiert ist, noch eine Aortendilatation besteht [53]. Auch bei Patienten mit unicuspiden oder den äußerst seltenen quadricuspiden Aortenklappen konnte ein helicales Flussprofil in der Aorta ascendens gezeigt werden [31]. Bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen hängt die Richtung des systolischen Flusses in der Aorta ascendens vom Fusionstyp der Aortenklappe ab. Eine Fusion der rechts- und linkskoronaren Tasche führt zu einem rechts-anterior gerichteten systolischen Jet, wohingegen der Fluss bei Patienten mit rechts- und akoronarer Fusion sowie bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen nach rechts-posterior oder posterior gerichtet ist [31]. Diese Änderungen des Flussprofils sowie lokal erhöhte Scherkräfte an der Konvexität der Aorta werden von einigen Autoren als mögliche mechanische Ursache regionaler Strukturunterschiede in der extrazellulären Matrix der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen angesehen [22].

Andere Autoren sehen die Ursache der Aortendilatation bei Patienten mit angeborenen Anomalien der Aortenklappen vielmehr in intrinsischen Veränderungen der Aortenwand auf molekularer Ebene. Diese Hypothese wird

durch die Beobachtung gestützt, dass die Entstehung von Aortenaneurysmen bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen auch durch den Ersatz der Aortenklappe nicht aufgehalten werden kann [107,128]. Ebenfalls für einen genetischen Hintergrund der Aortenaneurysmen spricht, dass auch in der Gefäßwand des Truncus pulmonalis, der mit der Aorta ascendens eine gemeinsame embryologische Herkunft hat, bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen Anzeichen der cystischen Medianekrose gefunden werden [25]. Gegen eine ausschließlich hämodynamische Ätiologie der Aortenaneurysmen spricht weiterhin, dass bei etwa 40 – 50 % der Patienten mit bicuspiden Aortenklappen keine Aneurysmen vorliegen [13].

Molekularbiologische Studien konnten zeigen, dass die Expressionsprofile bestimmter Proteine in der Aortenwand, die wesentlich an Aufbau und Regulation der extrazellulären Matrix beteiligt sind, Patienten mit bicuspiden Aortenklappen von Patienten mit tricuspiden Aortenklappen unterscheiden. Für Patienten mit unicuspiden Aortenklappen liegen bisher keine molekularbiologischen Studien vor, sodass es unklar ist, inwiefern sich diese in ihren Genexpressionsprofilen von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen unterscheiden.

#### **2.4.2.1. Fibrillin-1 und TGF- $\beta$**

Fibrillin-1 (FBN1) ist als wesentliches Strukturprotein der extrazellulären Matrix nicht nur Bestandteil von Mikrofibrillen und elastischen Fasern der aortalen Media, sondern auch an zellulären Signalkaskaden beteiligt [101]. Konstitutionelle Mutationen im FBN1-Gen liegen dem Marfan-Syndrom zu Grunde, das durch eine generalisierte Aortopathie gekennzeichnet ist [26,79]. Aneurysmen der Aorta ascendens stellen die Hauptkomplikation bei betroffenen Patienten dar [82]; es können jedoch ebenfalls die gesamte Aorta sowie periphere Gefäße von Aneurysmen betroffen sein [79]. Bei Patienten mit Marfan-Syndrom liegen bicuspide Aortenklappen in etwa 5 % der Fälle und damit mehr als doppelt so häufig wie in der Normalbevölkerung vor [89]. In einer kürzlich publizierten Studie wurden Mutationen im FBN1-Gen bei einzelnen Patienten mit bicuspiden Aortenklappen gefunden, bei denen ein

Marfan-Syndrom nach den klinisch-diagnostischen Gent-Kriterien nicht vorlag [98]. Dass Fibrillin-1 eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Aortenaneurysmen bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen spielen mag, zeigen auch Daten von Fedak et al., die sowohl in der Aorta ascendens als auch im Truncus pulmonalis von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen einen verminderten Gehalt an Fibrillin-1 nachweisen konnten [34].

In einem Mausmodell des Marfan-Syndroms konnten Neptune et al. zeigen, dass FBN1-Mutationen zu einer Dysregulation der Aktivität des transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) und damit zu einer erhöhten Apoptoserate führen [87]. Die Aktivität von TGF- $\beta$  ist von Fibrillin-1 abhängig, da TGF- $\beta$  in seiner inaktiven Form in einem Komplex (large latent complex, LLC) zusammen mit anderen Proteinen an Fibrillin-1 gebunden vorliegt. Kurze Fibrillin-1-Bruchstücke, die bei einer Mutation im FBN1-Gen vermehrt vorkommen, blockieren die Bindungsstellen des large latent complex an den Fibrillin-1-Mikrofibrillen und führen damit zu mehr freiem TGF- $\beta$  [15].

Eine erhöhte Aktivität des TGF- $\beta$ -Signalweges spielt möglicherweise eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von thorakalen Aortenaneurysmen. Wie auch Patienten mit Marfan-Syndrom entwickeln Patienten mit Shprintzen-Goldberg-Syndrom, das durch Mutationen des Gens verursacht wird, das für den TGF- $\beta$ -Repressor SKI codiert, gehäuft Aneurysmen der Aorta ascendens [28]. Bei Patienten mit Mutationen in den Genen für TGF- $\beta$ -Rezeptor-1 oder -2 (TGFB1 und 2), die an einem Loey-Dietz-Syndrom leiden, kann es zusätzlich zu generalisierten arteriellen Aneurysmen und arterieller Tortuositas kommen [76]. Interessanterweise wurde auch bei Patienten mit Loey-Dietz-Syndrom ein gehäuftes Auftreten von bicuspiden Aortenklappen beschrieben [76]. Mutationen in TGFB1 und 2 konnten bei Patienten mit sporadischen bicuspiden Aortenklappen allerdings bisher nicht nachgewiesen werden [5].

Ob TGF- $\beta$  an der Entwicklung von Aortenaneurysmen bei Patienten mit angeborenen Aortenklappenanomalien beteiligt ist, ist bislang nicht ausreichend geklärt. Neuere Studien geben Hinweise auf eine erhöhte Expression von TGF-

$\beta$  in dilatierten Aorten von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen [39,45].

Auf welche Weise Änderungen der Aktivität des TGF- $\beta$ -Signalweges auf molekularer Ebene die Entstehung von Aortenaneurysmen begünstigen, ist noch nicht ausreichend geklärt.

#### **2.4.2.2. Matrixmetalloproteinasen**

Es gibt Hinweise dafür, dass eine erhöhte TGF- $\beta$ -Aktivität Enzyme aus der Gruppe der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) hochreguliert [60]. MMPs sind am Umbau der extrazellulären Matrix beteiligt und bauen Strukturproteine wie Kollagen und Elastin ab [131].

Eine Vielzahl von Studien brachte hervor, dass eine erhöhte Aktivität von MMPs eine essentielle Rolle in der Pathogenese sowohl von abdominellen als auch von thorakalen Aortenaneurysmen spielt [21,71]. Das Profil der vermehrt exprimierten MMPs in der dilatierten Aortenwand scheint Patienten mit unterschiedlichen Morphologien der Aortenklappe voneinander zu unterscheiden. So wurde ein erhöhter Gehalt an MMP2 in Aneurysmen von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen nachgewiesen [34,71]. Für MMP14 und MMP19 konnte eine erhöhte Genexpression in der dilatierten Aorta sowohl bei Patienten mit bicuspiden als auch bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen gezeigt werden [55]. Die Genexpression von MMP19 korrelierte mit dem maximalen Aortendurchmesser allerdings ausschließlich bei Vorliegen einer tricuspiden Aortenklappe [55].

Diese exemplarischen Daten weisen darauf hin, dass sich die Prozesse, die bei diesen beiden Patientengruppen zur Aortendilatation führen, auf molekularer Ebene unterscheiden. Bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen gibt es bisher keine Studien zur Rolle von MMPs in der Pathogenese der Aortenaneurysmen. Es bleibt daher unklar, inwieweit das Profil der exprimierten MMPs die frühzeitige Entstehung von Aortenaneurysmen dieser Patienten beeinflusst.

### 2.4.2.3. MYH11 und ACTA2

Dass der TGF- $\beta$ -Signalweg eine zentrale Stellung in der Pathogenese von thorakalen Aortenaneurysmen einzunehmen scheint, zeigt auch die Assoziation von TGF- $\beta$  zu familiären thorakalen Aortenaneurysmen und Dissektionen (familial thoracic aortic aneurysms and dissections, FTAAD). Mutationen im MYH11-Gen (smooth muscle myosin heavy chain 11), das für die schwere Kette des Myosins der glatten Muskulatur codiert, führen bei betroffenen Patienten zu Dissektionen, auch ohne vorangegangene Aortendilatation [96].

Die häufigste Ursache für nicht-syndromale familiäre thorakale Aortenaneurysmen sind allerdings Mutationen im ACTA2-Gen (smooth muscle aortic alpha-actin), das für das  $\alpha$ -Aktin der glatten Gefäßmuskulatur codiert [103]. Renard et al. wiesen eine erhöhte Aktivität des TGF- $\beta$  Signalweges in Aortengewebe von Patienten mit MYH11-Mutationen und auch bei einem Patienten mit ACTA2-Mutation nach [103]. Sie stellten damit einen Zusammenhang von familiären Aortenaneurysmen zu TGF- $\beta$  her. Wie Mutationen in MYH11 oder ACTA2 die Aktivität von TGF- $\beta$  beeinflussen und ob Störungen des TGF- $\beta$ -Signalweges zur Entstehung der Aortenaneurysmen dieser Patienten beitragen, ist bisher unklar.

Ebenso ungeklärt ist, warum das Vorliegen einer ACTA2-Mutation bei einigen Patienten mit dem Vorliegen einer bicuspiden Aortenklappe assoziiert ist [47]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde eine erhöhte ACTA2-Genexpression in der dilatierten Aorta bei Patienten mit stenotischen bicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen nachgewiesen [39]. Ein Unterschied bestand allerdings nur an der Konvexität der Aorta ascendens. Diese Daten legen nahe, dass lokale Änderungen in der Struktur der Myofibrillen der glatten Gefäßmuskelzellen möglicherweise auch die Entwicklung von Aortenaneurysmen bei Patienten mit Aortenklappenanomalien beeinflussen.

#### **2.4.2.4. eNOS**

In den letzten Jahren wurden weitere Proteine identifiziert, deren veränderte Aktivität in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen einen Einfluss auf die Entstehung von Aortenaneurysmen bei diesen Patienten nahe legt.

Bei Mäusen führte ein Knockout des Gens, das für die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) codiert, zur Entwicklung einer bicuspiden Aortenklappe bei mehr als 40 % der Tiere [70]. Ein Doppel-Knockout der Gene, die für eNOS und das Apolipoprotein E kodieren, führte bei Mäusen, die eine cholesterinreiche Diät erhielten, zu gehäuftem Auftreten von abdominellen Aortenaneurysmen und Aortendissektionen [63].

Aicher et al. zeigten, dass der Gehalt an eNOS in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen signifikant niedriger ist als bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen. Die eNOS-Protein-Expression in der Aortenwand zeigte eine negative Korrelation zum maximalen Aortendurchmesser und zum sinotubulären Durchmesser bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen [3]. Diese Daten deuten darauf hin, dass eNOS in der Embryogenese der Aortenklappe eine wesentliche Rolle einnimmt und möglicherweise auch die Pathogenese von Aortenaneurysmen beeinflusst.

#### **2.4.2.5. GATA5**

Auch für GATA5, einen Aktivator der eNOS-Transkription [66], wurde eine Assoziation zur bicuspiden Aortenklappe festgestellt. GATA5 ist in der Embryogenese maßgeblich an der Entwicklung der Endokardkissen und des kardialen Ausflusstraktes beteiligt [67]. Ein Knockout von GATA5 im Mausmodell führte bei 25 % der Tiere zur Entwicklung einer bicuspiden Aortenklappe [66].

Bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen wurden vier nicht-synonyme seltene genetische Varianten in der transkriptionalen Aktivationsdomäne von GATA5 beschrieben [95], was darauf hinweist, dass GATA5 möglicherweise

auch beim Menschen die Entwicklung von kongenitalen Aortenklappenanomalien beeinflusst. Welche Stellung GATA5 in der Pathogenese von angeborenen Anomalien der Aortenklappe genau einnimmt, ist bislang nicht ausreichend untersucht. Ebenso unklar ist, inwiefern ein Einfluss von GATA5 auf die Transkription von eNOS in der Embryogenese eine Rolle spielt.

#### **2.4.2.6. Kollagene**

Es wird diskutiert, inwieweit strukturelle Veränderungen der Kollagene der Aortenwand die Grundlage der Aortenaneurysmen bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen sein könnten. In Aneurysmen von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen wurde eine reduzierte Kollagen-Quervernetzung nachgewiesen [121]. Dies weist darauf hin, dass bicuspide Aortenklappen mit einem Defekt in der posttranslationalen Kollagenmodifikation in der Aortenwand assoziiert sein könnten.

Aortenaneurysmen treten auch frühzeitig bei Patienten auf, die am vaskulären Typ des Ehlers-Danlos-Syndroms (EDS Typ 4) leiden, dem eine Mutation im COL3A1-Gen zu Grunde liegt. Dieses Gen codiert für die pro- $\alpha$ 1(III)-Kette des Kollagens Typ III. Strukturelle Defekte in dieser Kollagenkette prädisponieren zu arteriellen Aneurysmen und Dissektionen sowie zu Rupturen von inneren Organen [24].

In der dilatierten Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen wurde eine im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen niedrigere Expression von COL1A1 und COL3A1 beschrieben [121]. Patienten mit bicuspiden Aortenklappen scheinen sich demnach in der Struktur der Kollagene ihrer Aortenwand von Patienten mit tricuspiden Aortenklappen zu unterscheiden. Wie dies in Zusammenhang mit der Entstehung von Aortenaneurysmen bei diesen Patienten steht, ist bisher nicht ausreichend untersucht. Fraglich ist auch, ob die Aortenwand von Patienten mit unicuspiden Aortenklappen ebenfalls Änderungen in der Kollagen-Expression aufweist.

#### **2.4.2.7. NOTCH1 und NOTCH3**

In wenigen Familien, in denen das isolierte Vorliegen einer bicuspiden Aortenklappe autosomal-dominant vererbt wird, konnte ein genetischer Hintergrund aufgedeckt werden. Mutationen im NOTCH1-Gen wurden hierfür als ursächlich identifiziert [42]. Missense-Mutationen in NOTCH1 wurden auch bei einigen Patienten mit sporadischen bicuspiden Aortenklappen nachgewiesen [80,83]. Die evolutionär hoch konservierte Familie der NOTCH Transmembranrezeptoren (NOTCH1 - 4) werden durch die Bindungen eines Liganden der Jagged oder Delta-like Familie aktiviert, worauf es nach zweifacher Proteolyse zur Freisetzung der intrazellulären NOTCH-Domäne (NOTCH intracellular domain, NIC) kommt. Diese aktiviert im Zellkern die Transkription der NOTCH-Zielgene, darunter die transkriptionellen Repressoren der Hey- und Hes-Familien, welche die frühe Herzentwicklung entscheidend bestimmen [94]. Eines der Hey-Zielgene, das bei defektem NOTCH1 hochreguliert wird, ist der Transkriptionsfaktor Runx2, der die valvuläre Kalzifizierung fördert [42]. Von einigen Autoren wird dieser als Ursache der frühen Verkalkung der bicuspiden Aortenklappen diskutiert [42].

Kürzlich konnte für NOTCH3 eine Assoziation zu thorakalen Aortenaneurysmen hergestellt werden. Folkersen et al. zeigten in einer Microarray-Expressionsstudie an Aortengewebe von Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen, dass NOTCH3 unabhängig von der Klappenmorphologie bei Vorliegen einer Aortendilatation hochreguliert ist [38]. Es liegt nahe, dass der NOTCH-Signalweg in der Entstehung angeborener Aortenklappenanomalien und der mit ihnen assoziierten thorakalen Aortenaneurysmen beteiligt ist, wenn auch die genauen molekularbiologischen Vorgänge noch nicht entschlüsselt sind.

## 2.5. Fragestellung

Obwohl es in der Literatur viele Hinweise auf einen genetischen Hintergrund gibt, ist die Ursache der thorakalen Aortenaneurysmen bei Patienten mit angeborenen Anomalien der Aortenklappe bislang nicht geklärt. Besonders wenige Erkenntnisse existieren über die Genese von Aortenaneurysmen bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen, da bisher keine Studien zu Gen- oder Proteinexpression bei diesen Patienten vorliegen. Es ist daher unbekannt, ob sich die Pathogenese der Aneurysmen bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen von derjenigen bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen unterscheidet. Klarheit über eventuelle molekulare Unterschiede in der Genese der Aortendilatation könnte klinisch hilfreiche Aufschlüsse über die frühe Entwicklung von Aortendissektionen bei diesen Patienten geben und sogar Ansatzpunkte für präventive Medikationen liefern.

Ziel dieser Studie war es, Genexpressionsprofile in der Aorta ascendens von Patienten mit unicuspiden und tricuspiden Aortenklappen zu ermitteln, um aus eventuellen Unterschieden der lokalen Genaktivitäten Hinweise auf die bislang unerforschte Ursache der Aortenaneurysmen bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen geben zu können.

Der Fokus wurde auf Mitglieder der eNOS- sowie NOTCH-Signalwege gerichtet, da es für beide bekannt ist, dass sie in der Pathogenese der bicuspiden Aortenklappe eine Rolle spielen [42,70]. Folgende Fragen waren zu beantworten:

1. Ist die Genexpression von eNOS in der Aorta ascendens von Patienten mit unicuspiden Aortenklappen analog dem bereits beschriebenen verminderten eNOS-Proteingehalt bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen niedriger als bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen?

2. Haben Patienten mit unicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen eine niedrigere GATA5-Expression in ihrer Aortenwand und verhält diese sich analog zur Expression des GATA5-Zielgens eNOS?
3. Haben Patienten mit unicuspiden Aortenklappen eine niedrigere NOTCH1-Expression in ihrer Aortenwand als Patienten mit tricuspiden Aortenklappen?
4. Ist die Expression von NOTCH3 bei Vorliegen einer Aortendilatation erhöht und bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen höher als bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen?

Weiterhin wurden Gene des TGF- $\beta$ -Signalweges untersucht, deren konstitutionelle Mutationen zum Marfan- oder zum Loeys-Dietz-Syndrom führen. Es sollten folgende Fragen beantwortet werden:

5. Ist die Genexpression von Fibrillin-1 in der Aortenwand von Patienten mit unicuspiden Aortenklappen - analog dem bereits beschriebenen verminderten Proteingehalt bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen - niedriger als bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen?
6. Ist die Expression der TGF- $\beta$ -Rezeptor-Gene (TGFB1, TGFB2), die beim Loeys-Dietz-Syndrom mutiert sind, in der Aortenwand von Patienten mit unicuspiden Aortenklappen niedriger als bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen?

Ferner wurde die Expression von Genen untersucht, deren Produkte die Struktur und Stabilität der Aortenwand bestimmen und für die in der Literatur Zusammenhänge zu familiären und sporadischen thorakalen Aortenaneurysmen beschrieben wurden. Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

7. Ist die Expression von ACTA2, dessen Mutationen familiäre thorakale Aortenaneurysmen verursachen, in der Aortenwand von Patienten mit unicuspiden Aortenklappen analog zu Patienten mit bicuspiden Aortenklappen erhöht?
8. Ist die Genexpression von COL3A1, das beim vaskulären Ehlers-Danlos-Syndrom mutiert ist, in der Aortenwand von Patienten mit unicuspiden Aortenklappen niedriger als bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen?
9. Ist die Expression von MMP19 bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen ähnlich wie bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen bei Vorliegen einer Aortendilatation erhöht und korreliert diese mit dem maximalen Aortendurchmesser?
10. Schließlich sollte der Frage nachgegangen werden, welchen Einfluss das Vorliegen einer Dilatation der Aorta ascendens auf die Expression der einzelnen Gene bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen hat.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Probengewinnung

Es wurden Gewebeproben von Patienten untersucht, die eine Aortenklappenrekonstruktion oder einen Aortenklappenersatz mit oder ohne Ersatz der Aorta ascendens erhielten. Ein schriftliches Einverständnis zur Probenentnahme wurde von allen Patienten eingeholt, und für die Studie lag ein positives Votum der Ethik-Kommission bei der Ärztekammer des Saarlandes vor (Kenn-Nr. 205/10).

Präoperativ wurde bei allen Patienten eine transösophageale Echokardiographie durchgeführt und die Durchmesser der Aorta auf der Höhe des aortoventrikulären Übergangs (AV), des Sinus Valsalva, des sinotubulären Übergangs (ST) sowie der tubulären Aorta ascendens gemessen (Abbildung 5).

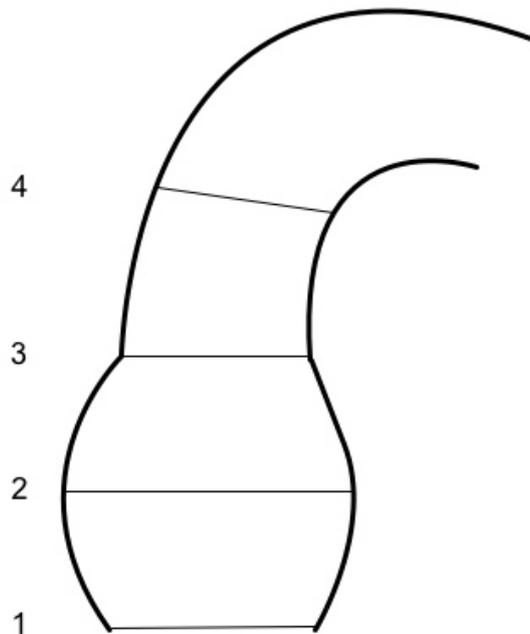


Abbildung 5: Präoperativ erhobene Durchmesser der Aorta ascendens: 1 = aortoventrikulärer Übergang (AV), 2 = Sinus Valsalva, 3 = sinotubulärer Übergang (ST), 4 = tubuläre Aorta ascendens

Die Aorta wurde als dilatiert angesehen, wenn entweder ein Sinus-Durchmesser oder ein tubulärer Aortendurchmesser von  $\geq 40$  mm vorlag. Die Proben wurden intraoperativ an der Konvexität der Aorta ascendens 5 mm oberhalb des sinotubulären Übergangs entnommen, anschließend unmittelbar in flüssigem Stickstoff konserviert und dann bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Verarbeitung eingefroren. Insgesamt wurden Proben von 52 Patienten gesammelt. Die Patienten wurden nach der Morphologie der Aortenklappe und nach dem Vorhandensein einer Dilatation der Aorta ascendens in vier Gruppen aufgeteilt:

UAV-N: unicuspidale Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens

UAV-D: unicuspidale Aortenklappe mit Dilatation der Aorta ascendens

TAV-N: tricuspidale Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens

TAV-D: tricuspidale Aortenklappe mit Dilatation der Aorta ascendens

Eine weitere Einteilung der Patienten erfolgte nach dem vorliegenden Dilatationsmuster der Aorta ascendens. Patienten mit einem tubulären Aortendurchmesser, der größer war als der Durchmesser des Sinus Valsalva, wurden der Gruppe D1 zugeordnet. Die Gruppe D2 bestand aus Patienten, deren Sinus-Durchmesser größer war als der Durchmesser der tubulären Aorta ascendens (Tabelle 1).

	UAV-D (n = 12)	UAV-N (n = 7)	TAV-D (n = 11)	TAV-N (n = 22)	<i>p</i>
Alter (Jahre)					
M	44,0	28,9	56,6	65,8	<0,001
SD	± 10,0	± 12,5	± 13,9	± 13,7	
Geschlecht (m/w)	11/1	5/2	8/3	10/12	<0,001
Dilatationstyp (D1/D2)	11/1	-	6/5	-	0,01
maximaler Aortendurchmesser (mm)					
M	47,4	28,0	47,7	29,0	<0,001
SD	± 5,2	± 5,4	± 9,7	± 4,0	
Spannweite	40-57	20-38	30-60	21-37	-

Tabelle 1: Alter, Geschlecht, Dilatationstyp und maximaler Aortendurchmesser der vier untersuchten Patientengruppen. M = Mittelwert, SD = Standardabweichung

Die klinischen Daten der Patienten, die in die Studie einbezogen wurden, sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Das Gewebe von Patienten mit tricuspiden Aortenklappen ohne Dilatation der Aorta ascendens wurde als Kontrollgewebe benutzt.

	unicuspid (n = 19)	tricuspid (n = 33)	<i>p</i>
Alter	38,4 ± 13,0	62,8 ± 14,2	<0,001
Geschlecht (m/w)	16/3	18/15	0,06
Aortenklappen-Pathologie			
Stenose	0	4 (12,1 %)	0,39
Insuffizienz	9 (47,4 %)	23 (69,7 %)	0,08
Kombiniertes Vitium	10 (52,6 %)	6 (18,2 %)	0,01
Begleiterkrankungen			
Hypertonie	3 (15,8 %)	21 (63,6 %)	<0,001
Diabetes mellitus	0	5 (15,2 %)	0,07
Hyperlipidämie	0	10 (30,3 %)	0,01
KHK	1 (5,3 %)	6 (18,2 %)	0,12
Nikotinkonsum	3 (15,8 %)	4 (12,1 %)	0,76
Medikation			
β-Blocker	6 (31,6 %)	17 (53,1 %)	0,10
ACE-Hemmer	6 (31,6 %)	16 (48,5 %)	0,19
AT1-Rezeptor-Antagonist	1 (5,3 %)	7 (21,2 %)	0,11
Diuretikum	2 (10,5 %)	10 (30,3 %)	0,09
Insulin	0	2 (6,1 %)	0,26
Kalziumkanal-Blocker	1 (5,3 %)	6 (18,2 %)	0,17
Statin	0	12 (36,4 %)	<0,001
Aldosteron-Antagonist	1 (5,3 %)	7 (21,2 %)	0,11

Tabelle 2: Klinische Daten der Patienten, KHK = Koronare Herzkrankheit, ACE-Hemmer = Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer, AT1-Rezeptor-Antagonist = Angiotensin II-Rezeptor-Typ 1- Antagonist

## 3.2. RNA-Isolierung

### Benötigte Reagenzien:

mirVana PARIS Kit #1556 (Ambion)

- Cell Disruption Buffer
- 2X Denaturation Solution
- Acid-Phenol:Chloroform
- miRNA Wash Solution 1
- Wash Solution 2/3
- Elution Solution

RNase-Free DNase Set #79254 (Qiagen)

- DNase I, RNase-Free
- Buffer RDD
- RNase-Free Water

Ethanol 100 %

β-Mercaptoethanol

Nuklease-freies Wasser

### Benötigte Geräte:

BP 310 S Waage (Sartorius)

Ultraturrax T8 (IKA)

Ultraschallprozessor UP100H (Hielscher)

MS2 Minishaker (IKA)

Centrifuge 5415 R (Eppendorf)

Thermomixer Comfort (Eppendorf)

Zur Isolierung der RNA aus den Gewebeproben wurde das mirVana PARIS Kit der Firma Ambion eingesetzt. Der DNase-Verdau wurde mit dem RNase-Free DNase Set der Firma Qiagen durchgeführt.

Vor Beginn der RNA-Isolierung wurden folgende Reagenzien vorbereitet: Zur 2X Denaturation Solution wurden 375 µl β-Mercaptoethanol hinzugefügt und

diese anschließend im Wasserbad auf 37°C erhitzt. Zur miRNA Wash Solution 1 wurden 21 ml reines Ethanol und zur Wash Solution 2/3 40 ml reines Ethanol hinzugefügt. 550 µl RNase-freies Wasser wurden mit einer Kanüle in das Gefäß der DNase I injiziert, um die lyophilisierte DNase unter vorsichtigem Schwenken des Gefäßes in Lösung zu bringen. Das Volumen wurde anschließend zu je 20 µl auf 1,7 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei -20 °C aufbewahrt.

Nach der Vorbereitung der Reagenzien wurden 625 µl Cell Disruption Buffer in ein steriles 13 ml Röhrchen pipettiert und dieses gewogen (BP 310S Waage, Sartorius). Die Gewebeprobe wurde unmittelbar nach Entnahme aus dem Eisschrank (-80°C) mit dem Cell Disruption Buffer versetzt. Anschließend wurde das Röhrchen erneut gewogen; von diesem Gewicht wurde das Gewicht des Röhrchens ohne Probe subtrahiert, um das Probengewicht zu ermitteln. Das Gewicht der untersuchten Gewebeproben lag zwischen 20 mg und 100 mg.

Anschließend wurden 625 µl Denaturation Solution zu der Gewebeprobe und dem Cell Disruption Buffer hinzugefügt und die Probe zunächst für 30 s mit einem Ultra-Turrax T8 (IKA) und dann für weitere 3 s mit einem Ultraschallprozessor UP100H (Hielscher) homogenisiert. Die Mischung wurde dann für 30 min auf Eis inkubiert und das Volumen auf zwei 1,7 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und gemessen (ca. 625 µl). Das 1,25 fache dieser Menge an Acid-Phenol-Chloroform wurde hinzugefügt. Die Lösungen wurden dann mit dem MS2 Minishaker (IKA) gemischt und für 20 min bei 4°C und 13.000 g zentrifugiert (Zentrifuge 5415 R, Eppendorf). Der dadurch erhaltene klare Überstand, der die RNA enthielt, wurde in ein neues 1,7 ml Reaktionsgefäß pipettiert und die restliche Flüssigkeit verworfen. Das Volumen wurde gemessen und anschließend ein Drittel des gemessenen Volumens an reinem Ethanol zugesetzt. 700 µl des Volumens wurden dann auf einen Filter eines Ambion Reaktionsgefäßes pipettiert und dieses wurde für 30 s bei 4°C und 9000 g zentrifugiert. Das maximale Volumen, das auf einen solchen Filter gegeben werden kann, beträgt 700 µl; daher wurde dieser Schritt so oft ausgeführt, bis das gesamte Volumen auf dem Filter zentrifugiert worden war. Nach jeder Zentrifugierung wurde der erhaltene Durchschlag zur Gewinnung

der sRNA (small RNA) in ein neues 1,7 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Dieses Volumen wurde gemessen und zwei Drittel der Menge an reinem Ethanol zugesetzt. Erneut wurden 700 µl der Mischung auf einen Filter eines neuen Ambion Reaktionsgefäßes pipettiert. Dieses wurde für 30 s bei 4°C und 9000 g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde ebenfalls so oft durchgeführt, bis das gesamte Volumen aufgebraucht war. Der Durchschlag wurde nach diesen Zentrifugierungsschritten jeweils verworfen.

Es wurden schließlich mehrere Waschschriffe der Filter durchgeführt, um große RNA Moleküle (large RNA = messenger RNA + ribosomale RNA) und sRNA aus den Filtern zu lösen. Zunächst wurden 350 µl miRNA Wash Solution 1 auf jeden Filter pipettiert und dieser im zugehörigen Ambion-Reaktionsgefäß für 30 s bei 4°C und 9000 g zentrifugiert. Der Durchschlag wurde verworfen.

Um eine eventuelle Kontamination mit DNA zu vermeiden, wurde ein DNase-Verdau mit dem RNase-Free DNase Set (Qiagen) durchgeführt. Hierfür wurden je 80 µl einer Mischung bestehend aus 70 µl RDD Puffer und 10 µl DNase I-Lösung auf jeden Filter pipettiert und anschließend für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

100 µl Elution Solution wurden in ein 1,7 ml Reaktionsgefäß pipettiert und in einem Thermomixer Comfort (Eppendorf) auf 96°C erhitzt. Nach der Inkubation wurden erneut 350 µl Wash Solution 1 auf jeden Filter pipettiert und diese in den zugehörigen Ambion Reaktionsgefäßen für 30 s bei 4°C und 9000 g zentrifugiert. Der erhaltene Durchschlag wurde verworfen. 500 µl Wash Solution 2/3 wurde auf jeden Filter gegeben und diese anschließend in den Ambion-Reaktionsgefäßen erneut für 30 s bei 4°C und 9000 g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde ebenfalls einmal wiederholt und der Durchschlag jedes Mal verworfen. Die Filter wurden dann in den Reaktionsgefäßen für 1 min bei 4°C und 9000 g zentrifugiert und danach in neue Ambion-Reaktionsgefäße positioniert. Je 40 µl der erhitzten Elution Solution wurde auf die Filter pipettiert und diese in den Reaktionsgefäßen für 1 min bei 4°C und 9000 g zentrifugiert. Die large RNA sowie die sRNA befand sich in den erhaltenen Durchschlägen

der jeweiligen Reaktionsgefäße.

### **3.3. Bestimmung der RNA-Reinheit und -Konzentration**

#### **Benötigte Geräte:**

Infinite NanoQuant Plate (Tecan)

Infinite 200 PRO NanoQuant Reader (Tecan)

Die RNA-Reinheit und -Konzentration wurde photometrisch mit einer Infinite NanoQuant Plate und einem Infinite 200 PRO NanoQuant Reader sowie der i-control-Microplate Reader Software der Firma Tecan durchgeführt. Die maximale photometrische Absorption der RNA liegt bei 260 nm, die von Proteinen bei 280 nm. Die Bildung des Quotienten  $OD_{260}$  zu  $OD_{280}$ , der idealerweise zwischen 1,8 und 2,1 liegen soll, zeigt an, ob eine Kontamination mit Proteinen vorliegt. In diese Studie wurden ausschließlich Proben mit einem Quotienten zwischen 1,8 und 2,1 einbezogen.

Zum Eichen der Infinite NanoQuant Plate wurden je 2  $\mu$ l Elution Solution auf die zu benutzenden Felder pipettiert. Nach dem Entfernen der Elution Solution von den Feldern der Platte wurden je 2  $\mu$ l der zu messenden RNA Proben auf die Felder aufgetragen. Die RNA wurde nach der Konzentrationsbestimmung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.4. Bestimmung der RNA-Integrität

#### Benötigte Reagenzien:

RNA 6000 Nano Kit # 5067-1511 (Agilent)

- RNA 6000 Nano Marker
- RNA 6000 Nano Gel Matrix
- RNA Nano Dye Concentrate
- RNA 6000 Ladder
- Safe-Lock tubes, DNase/RNase-frei (Eppendorf)
- Spin Filter

RNaseZAP # AM9780 (Ambion)

Nuklease-freies Wasser

#### Benötigte Geräte und Materialien:

2100 Bioanalyzer (Agilent)

Chip Priming Station (Agilent)

16-Pin Bajonett Elektroden-Einsatz (Agilent)

Centrifuge 5415 R (Eppendorf)

Thermomixer Comfort (Eppendorf)

MS2 Minishaker (IKA)

MS3 basic S36 Chip Vortexer (IKA)

RNA 6000 Nano Chips (Agilent)

Electrode Cleaner Chips (Agilent)

2100 Expert Software (Agilent)

Eine zusätzliche RNA-Qualitätskontrolle wurde mit dem 2100 Bioanalyzer und dem RNA 6000 Nano Kit der Firma Agilent durchgeführt. Der 2100 Bioanalyzer erlaubt die gleichzeitige Analyse von 12 Proben auf einem RNA Nano Chip mittels Kapillarelektrophorese. Die RNA wird mit einem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff markiert und von dem System detektiert. Der RNA 6000 Ladder wird auf jedem Chip als Referenz analysiert und enthält RNA-Fragmente von bekannter Größe und Konzentration. Ein Marker-Fragment wird mit jeder Probe analysiert und dient als interner Standard. Die Daten werden

mit der 2100 Expert Software (Agilent) in Gel-ähnliche Bilder und Elektropherogramme für jede Probe übersetzt (Abbildung 3 und 4). Die Software ordnet jeder Probe eine RNA integrity number (RIN) zu, die mit einem standardisierten Algorithmus ermittelt wird [112]. Die RIN kann Zahlenwerte von 0 bis 10 annehmen, wobei ein Wert von 10 höchste RNA-Integrität repräsentiert.

Je 2 µl der RNA Proben wurden in 1,7 ml Reaktionsgefäße pipettiert, diese bei 70°C für 2 min erhitzt und anschließend sofort auf Eis gekühlt. 2 µl des Agilent RNA 6000 Ladder wurden ebenfalls für 2 min bei 70°C hitzedenaturiert und anschließend auf Eis gekühlt.

550 µl RNA 6000 Gelmatrix wurden in einen Spin Filter pipettiert und für 10 min bei Raumtemperatur und 1500 g zentrifugiert. Pro Chip werden 65 µl filtrierte Gel benötigt. 65 µl des filtierten Gels wurden in ein RNase freies microfuge tube (Agilent) pipettiert. Anschließend wurde das RNA 6000 dye Konzentrat für 30 min von 4°C auf Raumtemperatur aufgewärmt und dann für 10 s mit einem MS2 Minishaker (IKA) gemischt. 1 µl des Konzentrats wurden den 65 µl Gel zugesetzt. Die Mischung wurde erneut mit dem MS2 Minishaker gemischt und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur und 13000 g zentrifugiert (Centrifuge 5415R, Eppendorf).

Vor jedem Lauf wurden die Elektroden des Agilent 2100 Bioanalyzers gereinigt. Hierfür wurde einer der Electrode Cleaner Chips mit 350 µl RNaseZAP (Ambion) gefüllt und 1 min im Bioanalyzer bei geschlossenem Deckel belassen. Eines der Wells des zweiten Electrode Cleaner Chips wurde dann mit 350 µl RNase-freiem Wasser gefüllt und der Chip in den Bioanalyzer gelegt. Der Deckel des Bioanalyzers wurde für 10 s geschlossen und anschließend für weitere 10 s offen gelassen.

Anschließend wurde der RNA 6000 Nano Chip in die dafür vorgesehene Chip Priming Station gelegt. 9 µl des Gel-Dye-Mix wurden in das Well des Chips, das mit einem schwarz hinterlegten G markiert ist, pipettiert. Die Chip Priming

Station wurde geschlossen und der Druckbolzen bis zum Einrasten nach unten gedrückt. Nach exakt 30 s wurde der Druckbolzen gelöst und nach 5 s langsam auf die 1 ml Position zurückgezogen. Nach dem Öffnen der Chip Priming Station wurden jeweils 9 µl des Gel-Mix in die beiden übrigen mit G markierten Wells pipettiert. Anschließend wurden jeweils 5 µl des RNA 6000 Nano Markers in alle 12 Proben-Wells und in das mit einem Leiter-Symbol markierte Well pipettiert. In dieses Well wurde daraufhin ebenfalls 1 µl des Agilent RNA 6000 Ladder pipettiert. Von jeder RNA-Probe wurde 1 µl in eines der 12 Proben-Wells pipettiert. Der Chip wurde dann in den IKA MS3 Chip Vortexer positioniert und für 1 min bei 2400 rpm gemischt. Abschließend wurde der Chip in den Agilent 6000 Bioanalyzer gelegt und der Lauf in der Agilent 2100 Expert Software gestartet.

Ein Elektropherogramm und eine Gel-Darstellung für eine analysierte RNA-Probe sind in Abbildung 6 und 7 dargestellt. Das Elektropherogramm hat drei Peaks, wobei der erste Peak durch den Marker, der zweite durch die 18 S ribosomale RNA (rRNA) und der dritte durch die 28 S ribosomale RNA repräsentiert wird.

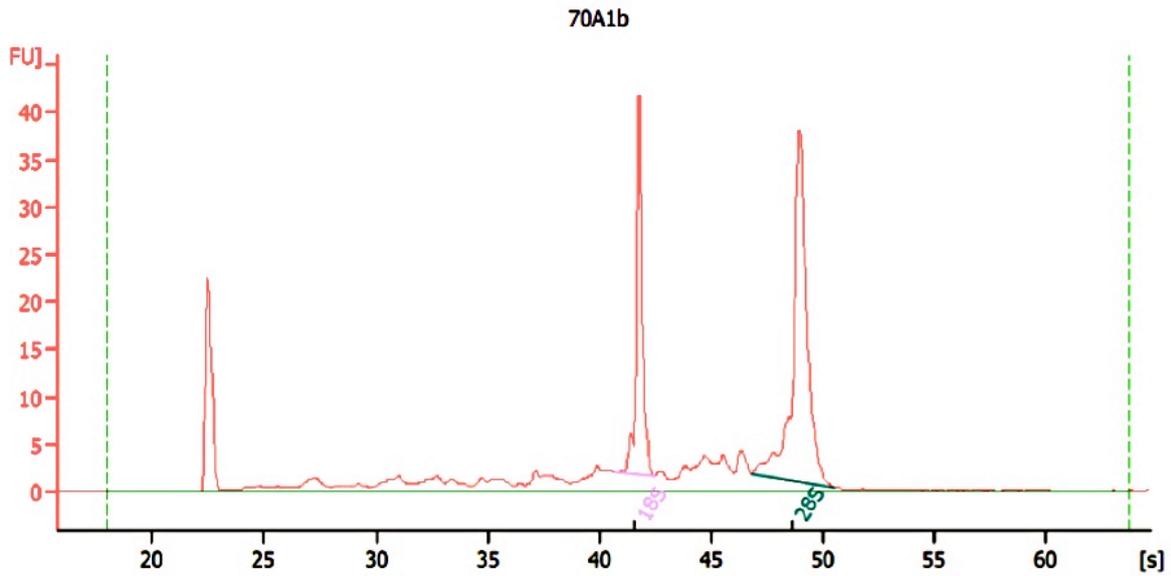


Abbildung 6: Beispiel eines Elektropherogramms der 2100 Expert Software (Agilent) für eine RNA-Probe (TAV-D). Der erste Peak repräsentiert den Marker, der zweite die 18 S und der dritte die 28 S ribosomale RNA. Die x-Achse repräsentiert die Zeit in Sekunden (s), die y-Achse repräsentiert die Stärke der Fluoreszenz in Fluoreszenzeinheiten (FU). RNA Integrity Number (RIN) = 8,6; RNA Konzentration = 85 ng/μl

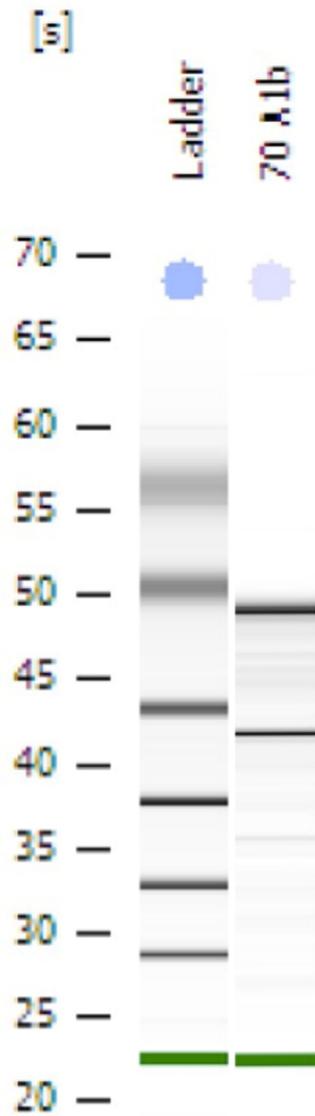


Abbildung 7: Gel-Darstellung der 2100 Expert Software (Agilent): RNA Ladder (linke Spalte) und RNA-Probe (TAV-D, rechte Spalte). Die beiden schwarzen Banden in der rechten Spalte repräsentieren die 28 S rRNA (obere Bande) und die 18 S rRNA. Die grünen Banden entsprechen dem Marker.

### 3.5. cDNA-Synthese

#### Benötigte Reagenzien:

High Capacity cDNase Reverse Transcription Kit # 4368814 (Applied Biosystems)

- 10 x RT Buffer
- 10 RT Random Primers
- 25 x dNTP Mix 100 mM
- RNase Inhibitor
- Multiscribe RT

Nuklease-freies Wasser

#### Benötigte Geräte:

MS2 Minishaker (IKA)

GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)

Die cDNA-Synthese (RT-PCR) wurde mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit der Firma Applied Biosystems an einem separaten Arbeitsplatz durchgeführt. Von jeder Probe wurde die gesamte RNA-Menge in cDNA umgeschrieben. Alle Reagenzien wurden während der Arbeitsschritte im Eisblock aufbewahrt und jedes Reagenz wurde einzeln vor der Anwendung auf Eis aufgetaut.

Zunächst wurde ein Mastermix erstellt, wobei der hier beschriebene Ansatz für die RT-PCR von einer Probe gilt. Das Reaktionsvolumen pro Ansatz betrug 20  $\mu$ l. Es wurden 3,2  $\mu$ l Nuklease-freies Wasser, 2  $\mu$ l 10x RT Buffer, 2  $\mu$ l 10 RT Random Primers und 0,8  $\mu$ l 25x dNTP Mix 100 mM in ein 1,7  $\mu$ l Reaktionsgefäß pipettiert und sorgfältig gemischt. Zuletzt wurden dem Mastermix 1  $\mu$ l RNase Inhibitor und 1  $\mu$ l Multiscribe RT hinzugefügt. Der Mastermix wurde mit einem MS2 Minishaker (IKA) gemischt. Anschließend wurden 10  $\mu$ l Mastermix und 10  $\mu$ l der RNA-Probe in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Falls weniger als 10  $\mu$ l RNA Volumen vorhanden waren, wurde das fehlende Volumen durch

Nuklease-freies Wasser ergänzt. Bei jeder RT-PCR wurde ein Leeransatz durchgeführt, wobei hier die Menge an RNA durch Nuklease-freies Wasser ersetzt wurde. Das Pipettierschema des Mastermix ist in Tabelle 3 wiedergegeben.

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen</b>
Nuklease-freies Wasser	3,2 µl
10 x RT Buffer	2 µl
10 RT Random Primers	2 µl
25 x dNTP Mix 100mM	0,8 µl
RNAse Inhibitor	1 µl
Multiscribe RT	1 µl

Tabelle 3: Pipettierschema des Mastermix der cDNA-Synthese (einfacher Ansatz)

Als Thermocycler kam ein GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) zum Einsatz. Der PCR-Zyklus begann mit einer Temperatur von 25°C für 10 Minuten, gefolgt von 37°C für 120 Minuten und 85°C für 5 Minuten, schließlich wurden die Proben auf 4°C gekühlt.

### 3.6. Real-time PCR

**Benötigte Reagenzien:**

Taqman Gene Expression Master Mix # 94404 (Applied Biosystems)

96-well Custom TaqMan Array Plates (Applied Biosystems)

Nuklease-freies Wasser

**Benötigte Geräte und Materialien:**

MS 2 Minishaker (IKA)

Centrifuge 5415 R (Eppendorf)

Centrifuge 5430 (Eppendorf)

MicroAmp Adhesive Film (Applied Biosystems)

MicroAmp Adhesive Film Applicator (Applied Biosystems)

StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems)

StepOnePlus Software Version 2.1 (Applied Biosystems)

Die Real-time PCR (quantitative PCR, qPCR) wurde mit 96-well TaqMan Custom Plates und TaqMan Gene Expression Assays für die Gene FBN1, NOS3, MMP19, TGFBR1, TGFBR2, ACTA2, NOTCH1, NOTCH3, GATA5 und COL3A1 durchgeführt. Als Referenzgene wurden EIF2B1 (eukaryotic transcription initiation factor 2B, subunit 1), ELF1 (ets-related transcription factor 1) und HMBS (Hydroxymethylbilan-Synthase) eingesetzt, die in eigenen Voruntersuchungen als geeignete Referenzgene etabliert worden waren. Die Expression dieser Gene in der Aorta ascendens wurde weder von der Morphologie der Aortenklappe noch von der Dilatation der Aorta ascendens beeinflusst [51]. Dies macht sie zu geeigneten Housekeeping-Genen für qPCR-Studien, welche die Genexpression in der Aorta ascendens bei Patienten mit unterschiedlichen Morphologien der Aortenklappe vergleichen. Die Assay ID-Nummern der untersuchten Gene sind in Tabelle 4 wiedergegeben.

<b>Gen</b>	<b>TaqMan Assay ID</b>
FBN1	Hs00171191_m1
NOS3	Hs01574659_m1
MMP19	Hs00275699_m1
TGFBR1	Hs00610320_m1
TGFBR2	Hs00234253_m1
ACTA2	Hs00909449_m1
NOTCH1	Hs01062014_m1
NOTCH3	Hs01128541_m1
GATA5	Hs00388359_m1
COL3A1	Hs00943809_m1
ELF1	Hs00152844_m1
EIF2B1	Hs00426752_m1
HMBS	Hs00609297_m1

Tabelle 4: Untersuchte Gene und deren TaqMan Assay-IDs

Die Genexpression in den Patientengruppen UAV-N, UAV-D und TAV-D wurde nach der  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode relativ zur Expression in der TAV-N Gruppe bestimmt (relative Quantität, RQ), die als Kontrollgruppe fungierte [74]. Die 10 untersuchten Gene wurden auf zwei verschiedene Platten-Layouts aufgeteilt, wobei die drei Housekeeping-Gene Teil beider Layouts waren. Auf den Platten mit Layout 1 wurden FBN1, NOS3, MMP19, TGFBR1 und TGFBR2 analysiert. Auf den Platten mit Layout 2 wurden ACTA2, NOTCH1, NOTCH3, GATA5 und COL3A1 analysiert. Layout 1 und Layout 2 sind in Abbildung 5 und 6 dargestellt. Auf jeder Platte wurde eine TAV-N Probe analysiert, die das Kontrollgewebe darstellte.

Pro Reaktion können 1 - 100 ng cDNA eingesetzt werden, wobei die Menge an cDNA für alle Reaktionen gleich bleiben muss. In dieser Studie wurden 20 ng cDNA pro Well eingesetzt. Das Reaktionsvolumen von 10 µl pro Well setzte sich zusammen aus 5 µl einer Mischung aus der benötigten Menge an cDNA und Nuklease-freiem Wasser und 5 µl TaqMan Gene Expression Master Mix.

Pro 96-Well Platte wurden vier Proben untersucht. Jede Probe wurde als Triplikat analysiert. Von dem Referenzgen HMBS wurde für jede Probe nur eine zweifache Bestimmung durchgeführt, da die Positionen H1, H4, H7 und H10 auf den Platten für Leeransätze verwendet wurden (Abbildung 8 und 9). Für jede der vier Proben standen damit 23 Wells der 96-Well Platten zur Verfügung. Ein Mastermix wurde für jede Probe erstellt. Die benötigte Menge an Mastermix wurde für 27 Wells berechnet, um sicher zu stellen, dass ausreichend Volumen vorhanden war. Bei einem Volumen von 10 µl pro Well betrug das Volumen des Mastermix für eine Probe 270 µl. Diese setzten sich zusammen aus 135 µl einer Mischung aus cDNA und Nuklease-freiem Wasser sowie 135 µl TaqMan Gene Expression Master Mix.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	216 UAVD A1b U ACTA2 Hs0090 Ct. Undetermine	216 UAVD A1b U ACTA2 Hs0090 Ct. Undetermine	216 UAVD A1b U ACTA2 Hs0090 Ct. Undetermine	187 UAVD A1a U ACTA2 Hs0090 Ct. Undetermine	187 UAVD A1a U ACTA2 Hs0090 Ct. Undetermine	187 UAVD A1a U ACTA2 Hs0090 Ct. Undetermine	184 UAVN A1a U ACTA2 Hs0090 Ct. Undetermine	184 UAVN A1a U ACTA2 Hs0090 Ct. Undetermine	184 UAVN A1a U ACTA2 Hs0090 Ct. Undetermine	182 TAV N A1a U ACTA2 Hs0090 Ct. Undetermine	182 TAV N A1a U ACTA2 Hs0090 Ct. Undetermine	182 TAV N A1a U ACTA2 Hs0090 Ct. Undetermine
B	216 UAVD A1b U NOTCH1 Hs010 Ct. Undetermine	216 UAVD A1b U NOTCH1 Hs010 Ct. Undetermine	216 UAVD A1b U NOTCH1 Hs010 Ct. Undetermine	187 UAVD A1a U NOTCH1 Hs010 Ct. Undetermine	187 UAVD A1a U NOTCH1 Hs010 Ct. Undetermine	187 UAVD A1a U NOTCH1 Hs010 Ct. Undetermine	184 UAVN A1a U NOTCH1 Hs010 Ct. Undetermine	184 UAVN A1a U NOTCH1 Hs010 Ct. Undetermine	184 UAVN A1a U NOTCH1 Hs010 Ct. Undetermine	182 TAV N A1a U NOTCH1 Hs010 Ct. Undetermine	182 TAV N A1a U NOTCH1 Hs010 Ct. Undetermine	182 TAV N A1a U NOTCH1 Hs010 Ct. Undetermine
C	216 UAVD A1b U NOTCH3 Hs011 Ct. Undetermine	216 UAVD A1b U NOTCH3 Hs011 Ct. Undetermine	216 UAVD A1b U NOTCH3 Hs011 Ct. Undetermine	187 UAVD A1a U NOTCH3 Hs011 Ct. Undetermine	187 UAVD A1a U NOTCH3 Hs011 Ct. Undetermine	187 UAVD A1a U NOTCH3 Hs011 Ct. Undetermine	184 UAVN A1a U NOTCH3 Hs011 Ct. Undetermine	184 UAVN A1a U NOTCH3 Hs011 Ct. Undetermine	184 UAVN A1a U NOTCH3 Hs011 Ct. Undetermine	182 TAV N A1a U NOTCH3 Hs011 Ct. Undetermine	182 TAV N A1a U NOTCH3 Hs011 Ct. Undetermine	182 TAV N A1a U NOTCH3 Hs011 Ct. Undetermine
D	216 UAVD A1b U GATA5 Hs0038 Ct. Undetermine	216 UAVD A1b U GATA5 Hs0038 Ct. Undetermine	216 UAVD A1b U GATA5 Hs0038 Ct. Undetermine	187 UAVD A1a U GATA5 Hs0038 Ct. Undetermine	187 UAVD A1a U GATA5 Hs0038 Ct. Undetermine	187 UAVD A1a U GATA5 Hs0038 Ct. Undetermine	184 UAVN A1a U GATA5 Hs0038 Ct. Undetermine	184 UAVN A1a U GATA5 Hs0038 Ct. Undetermine	184 UAVN A1a U GATA5 Hs0038 Ct. Undetermine	182 TAV N A1a U GATA5 Hs0038 Ct. Undetermine	182 TAV N A1a U GATA5 Hs0038 Ct. Undetermine	182 TAV N A1a U GATA5 Hs0038 Ct. Undetermine
E	216 UAVD A1b U COL3A1 Hs009 Ct. Undetermine	216 UAVD A1b U COL3A1 Hs009 Ct. Undetermine	216 UAVD A1b U COL3A1 Hs009 Ct. Undetermine	187 UAVD A1a U COL3A1 Hs009 Ct. Undetermine	187 UAVD A1a U COL3A1 Hs009 Ct. Undetermine	187 UAVD A1a U COL3A1 Hs009 Ct. Undetermine	184 UAVN A1a U COL3A1 Hs009 Ct. Undetermine	184 UAVN A1a U COL3A1 Hs009 Ct. Undetermine	184 UAVN A1a U COL3A1 Hs009 Ct. Undetermine	182 TAV N A1a U COL3A1 Hs009 Ct. Undetermine	182 TAV N A1a U COL3A1 Hs009 Ct. Undetermine	182 TAV N A1a U COL3A1 Hs009 Ct. Undetermine
F	216 UAVD A1b U ELF1 Hs00152 Ct. Undetermine	216 UAVD A1b U ELF1 Hs00152 Ct. Undetermine	216 UAVD A1b U ELF1 Hs00152 Ct. Undetermine	187 UAVD A1a U ELF1 Hs00152 Ct. Undetermine	187 UAVD A1a U ELF1 Hs00152 Ct. Undetermine	187 UAVD A1a U ELF1 Hs00152 Ct. Undetermine	184 UAVN A1a U ELF1 Hs00152 Ct. Undetermine	184 UAVN A1a U ELF1 Hs00152 Ct. Undetermine	184 UAVN A1a U ELF1 Hs00152 Ct. Undetermine	182 TAV N A1a U ELF1 Hs00152 Ct. Undetermine	182 TAV N A1a U ELF1 Hs00152 Ct. Undetermine	182 TAV N A1a U ELF1 Hs00152 Ct. Undetermine
G	216 UAVD A1b U EIF2B1 Hs0042 Ct. Undetermine	216 UAVD A1b U EIF2B1 Hs0042 Ct. Undetermine	216 UAVD A1b U EIF2B1 Hs0042 Ct. Undetermine	187 UAVD A1a U EIF2B1 Hs0042 Ct. Undetermine	187 UAVD A1a U EIF2B1 Hs0042 Ct. Undetermine	187 UAVD A1a U EIF2B1 Hs0042 Ct. Undetermine	184 UAVN A1a U EIF2B1 Hs0042 Ct. Undetermine	184 UAVN A1a U EIF2B1 Hs0042 Ct. Undetermine	184 UAVN A1a U EIF2B1 Hs0042 Ct. Undetermine	182 TAV N A1a U EIF2B1 Hs0042 Ct. Undetermine	182 TAV N A1a U EIF2B1 Hs0042 Ct. Undetermine	182 TAV N A1a U EIF2B1 Hs0042 Ct. Undetermine
H	216 UAVD A1b U HMBS Hs0060 Ct. Undetermine	216 UAVD A1b U HMBS Hs0060 Ct. Undetermine	216 UAVD A1b U HMBS Hs0060 Ct. Undetermine	RT Ko 187 UAVD ... U HMBS Hs0060 Ct. Undetermine	187 UAVD A1a U HMBS Hs0060 Ct. Undetermine	187 UAVD A1a U HMBS Hs0060 Ct. Undetermine	RT Ko 184 UAVN ... U HMBS Hs0060 Ct. Undetermine	184 UAVN A1a U HMBS Hs0060 Ct. Undetermine	184 UAVN A1a U HMBS Hs0060 Ct. Undetermine	RT Ko 182 TAVN ... U HMBS Hs0060 Ct. Undetermine	182 TAV N A1a U HMBS Hs0060 Ct. Undetermine	182 TAV N A1a U HMBS Hs0060 Ct. Undetermine

Abbildung 9: Beispiel eines Platten-Layouts 2 mit den Genen ACTA2, NOTCH1, NOTCH3, GATA5, COL3A1, ELF1, EIF2B1 und HMBS

Während des Pipettierens wurden alle Reagenzien und die cDNA-Proben auf Eis gekühlt und der TaqMan Gene Expression Master Mix vor Licht geschützt. Zunächst wurde das benötigte Volumen der cDNA-Probe berechnet. Dieses Volumen wurde dann von 135 µl subtrahiert, um die erforderliche Menge an Nuklease-freiem Wasser zu erhalten. Das Nuklease-freie Wasser wurde in ein 1,7 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wurden 135 µl TaqMan Gene Expression Master Mix und zuletzt die berechnete Menge an cDNA-Probenvolumen hinzugefügt.

Die 1,7 ml Reaktionsgefäße wurden kurz mit dem MS 2 Minishaker gemischt und dann für 1 min bei Raumtemperatur und 1000 g zentrifugiert (Zentrifuge 5415 R, Eppendorf). Die 96-Well TaqMan Custom Platten wurden für 1 min bei Raumtemperatur und 1000 g zentrifugiert (Zentrifuge 5430, Eppendorf). Die Schutzfolie wurde behutsam für eine Reihe der Wells entfernt und je 10 µl des

Mastermix der zugehörigen Probe in die Wells pipettiert. Entsprechend wurde für die gesamte Platte fortgefahren. Dabei wurden die Positionen H1, H4, H7 und H10 ausgelassen, da diese für die Leeransätze vorgesehen waren.

Pro Platte wurde ein Leeransatz (Leeransatz 1) zum Ausschluss eventueller Verunreinigungen beim Pipettieren der Platten angefertigt. Hierfür wurden 5 µl TaqMan Gene Expression Master Mix und 5 µl Nuklease-freies Wasser in ein 1,7 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Für die drei weiteren Leeransätze (Leeransätze 2 - 4) wurden jeweils 2 µl des Leeransatzes, der bei der cDNA-Synthese der jeweiligen Probe angefertigt wurde, mit 3 µl Nuklease-freiem Wasser und 5 µl TaqMan Gene Expression Master Mix in einem 1,7 ml Reaktionsgefäß vermischt. Diese Leeransätze dienten dem Ausschluss von Verunreinigungen mit RNA während der cDNA-Synthese der Proben. Es wurden 10 µl von Leeransatz 1 in das Well H1 pipettiert und jeweils 10 µl der Leeransätze 2 - 4 in die zugehörigen Wells H4, H7 und H10 pipettiert.

Die Platte wurde schließlich mit einem MicroAmp Optical Adhesive Film (Applied Biosystems) bedeckt, der mit einem MicroAmp Adhesive Film Applicator (Applied Biosystems) versiegelt wurde. Anschließend wurde die Platte erneut für 1 min bei Raumtemperatur und 1000 g zentrifugiert (Zentrifuge 5430, Eppendorf). Die Platte wurde in das StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems) gestellt, und der Lauf wurde mit Hilfe der StepOnePlus Software Version 2.1 (Applied Biosystems) gestartet.

### **3.7. Statistische Analyse**

Die Daten wurden mit der Software SPSS Statistics 19 (IBM) analysiert. Der Zusammenhang zwischen der Expression der einzelnen Gene und den Durchmessern der Aorta ascendens (AV-, Sinus-, ST- tubuläre Aorta ascendens, maximaler Aortendurchmesser) wurde mit der Pearson-Produkt-Moment-Korrelation bestimmt [9].

Der Vergleich der Genexpression zwischen Patienten mit unicuspiden und tricuspiden Aortenklappen unabhängig von der Dilatation der Aorta ascendens erfolgte mit dem Student's t-Test bzw. dem Welsh-Test im Falle inhomogener Varianzen [9]. Diese beiden Tests wurden ebenfalls für den Vergleich der beiden Dilatationsmuster (D1 und D2) eingesetzt.

Unterschiede in der Genexpression zwischen den vier Patientengruppen UAV-D, UAV-N, TAV-D und TAV-N wurden mittels einfaktorieller ANOVA (analysis of variance, Varianzanalyse) analysiert. Als Post-hoc-Tests wurden der Scheffé- bzw. der Games-Howell-Test im Falle inhomogener Varianzen verwendet [9].

Um die Effekte der Aortenklappen-Morphologie sowie der Dilatation der Aorta ascendens auf die Genexpression zu analysieren, wurde eine zweifaktorielle ANOVA mit den Zwischensubjektfaktoren Aortenklappen-Morphologie und Aortendilatation berechnet. P-Werte  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant erachtet [9].

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Gene der eNOS- und NOTCH-Signalwege

#### 4.1.1. GATA5

Die Genexpression von GATA5 korrelierte negativ mit den Durchmessern der Aorta ascendens, d.h. Patienten mit kleineren Aortendurchmessern hatten eine höhere GATA5-Expression. Unabhängig von der Klappenmorphologie lagen signifikante Korrelationen zwischen GATA5-Expression und aortoventrikulärem ( $r = -0,36$ ;  $p < 0,05$ ), Sinus- ( $r = -0,45$ ;  $p < 0,05$ ), sinotubulärem ( $r = -0,56$ ;  $p < 0,01$ ), tubulärem ( $r = -0,46$ ;  $p < 0,05$ ) sowie dem maximalen Aortendurchmesser vor ( $r = -0,44$ ;  $p < 0,05$ ) (Abbildung 10).

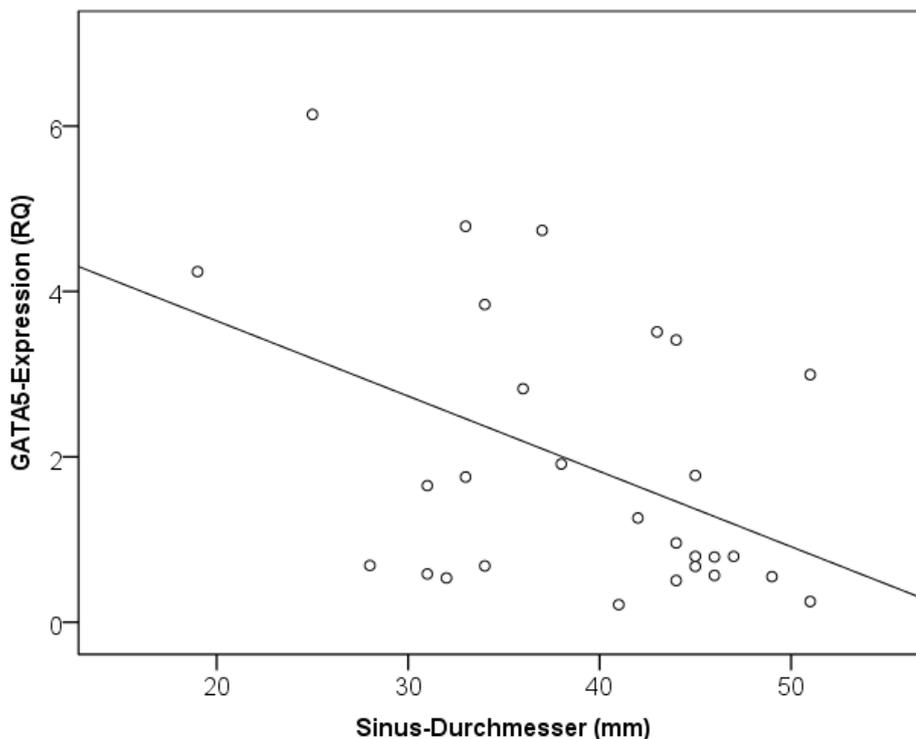


Abbildung 10: Korrelation der GATA5-Expression mit dem Sinus-Durchmesser,  $r = -0,45$ ,  $p < 0,05$ , RQ = relative Quantität der qPCR

Patienten mit unicuspiden Aortenklappen zeigten unabhängig vom Vorliegen einer Dilatation der Aorta ascendens eine signifikant höhere GATA5-Expression in der Aortenwand (M = 2,14; SE = 0,40) als Patienten mit tricuspiden Aortenklappen (M = 1,12; SE = 0,14;  $p < 0,05$ ) (Abbildung 11).

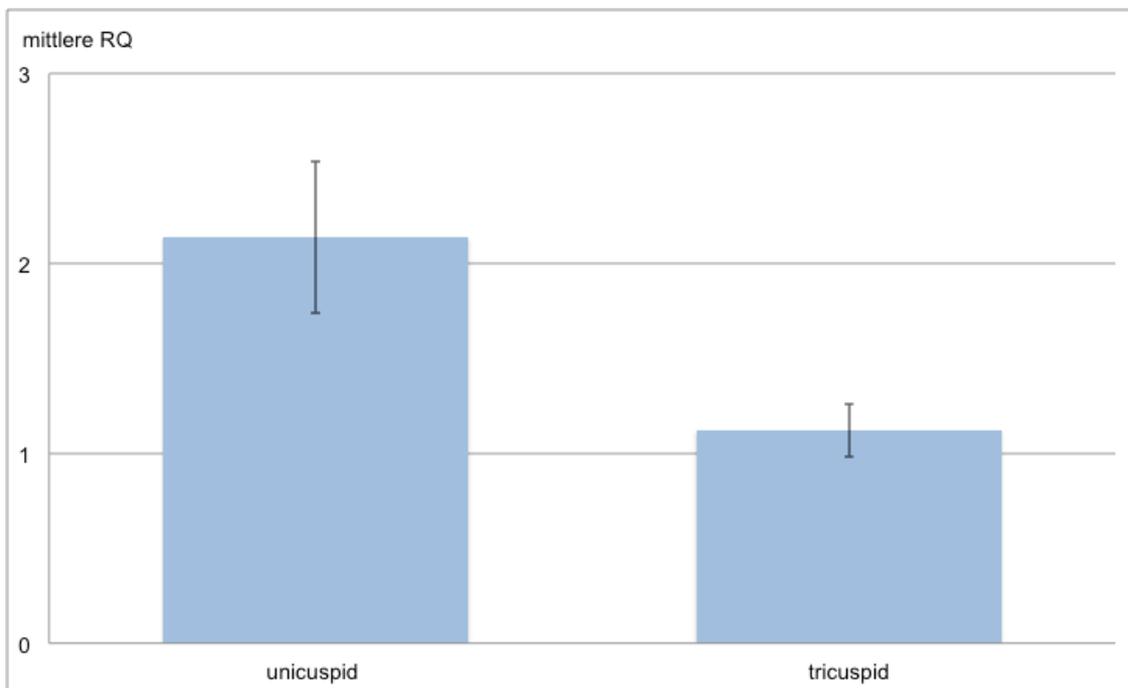


Abbildung 11: GATA5-Genexpression bei Patienten mit unicuspiden und tricuspiden Aortenklappen (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Die einfaktorielle ANOVA ergab signifikante Unterschiede in der GATA5-Expression zwischen den vier Patientengruppen (UAV-D, UAV-N, TAV-D, TAV-N) ( $p < 0,05$ ). Bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen war die GATA5-Expression bei Vorliegen einer dilatierten Aorta (UAV-D:  $M = 1,78$ ;  $SE = 0,43$ ) im Vergleich zu Patienten mit normal weiter Aorta (UAV-N:  $M = 2,75$ ;  $SE = 0,77$ ) niedriger. Im Gegensatz dazu zeigten Patienten mit tricuspiden Aortenklappen eine höhere GATA5-Expression wenn ihre Aorta dilatiert war (TAV-D:  $M = 1,38$ ;  $SE = 0,45$  vs. TAV-N:  $M = 1$ ;  $SE = 0$ ) (Abbildung 12). In den post-hoc Vergleichen konnten allerdings – vermutlich auf Grund der geringen Fallzahl – keine signifikanten Unterschiede zwischen den Einzelgruppen festgestellt werden.

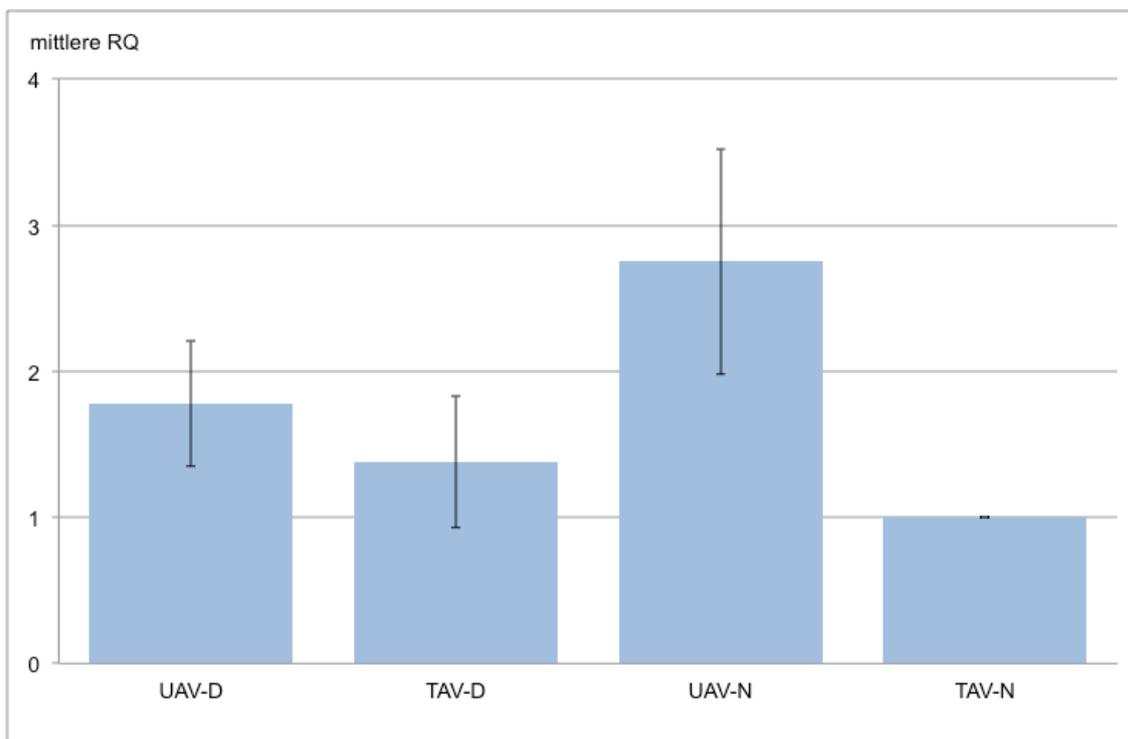


Abbildung 12: GATA5-Genexpression in den Patienten-Gruppen UAV-D = unicuspiden Aortenklappe mit Dilatation der Aorta ascendens, TAV-D = tricuspiden Aortenklappe mit Dilatation der Aorta ascendens, UAV-N = unicuspiden Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens, TAV-N = tricuspiden Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Die zweifaktorielle ANOVA mit den Zwischensubjektfaktoren Aortenklappen-Morphologie und Aortendilatation zeigte, dass die Aortenklappen-Morphologie einen stärkeren Einfluss auf die GATA5-Expression hat ( $\eta^2 = 0,16$ ;  $p < 0,01$ ) als die Aortendilatation ( $\eta^2 = 0,01$ ;  $p = 0,43$ ).

Es bestand kein signifikanter Unterschied in der GATA5-Expression zwischen Patienten mit unterschiedlichen Dilatationsmustern der Aorta ascendens (D1:  $M = 1,56$ ;  $SE = 0,37$ ; D2:  $M = 1,71$ ;  $SE = 0,61$ ;  $p = 0,85$ ).

### 4.1.2. eNOS

Die Genexpression von eNOS korrelierte ebenfalls negativ mit den Durchmessern der Aorta ascendens. Signifikante Korrelationen lagen zwischen der eNOS-Expression und dem Sinus-Durchmesser ( $r = -0,40$ ;  $p < 0,05$ ) (Abbildung 13) sowie dem sinotubulären Durchmesser ( $r = -0,39$ ;  $p < 0,05$ ) vor. Aortoventrikulärer Durchmesser ( $r = -0,08$ ;  $p = 0,66$ ), tubulärer Aortendurchmesser ( $r = -0,19$ ;  $p = 0,32$ ) und maximaler Aortendurchmesser ( $r = -0,27$ ;  $p = 0,15$ ) korrelierten nicht signifikant und nur sehr schwach mit der Expression von eNOS.

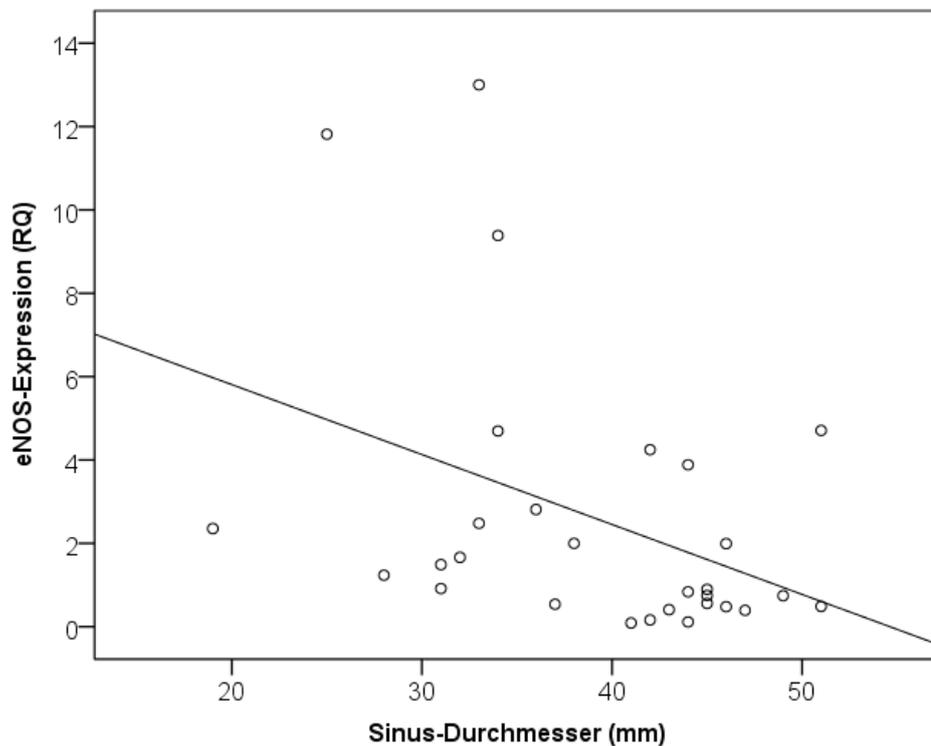


Abbildung 13: Negative Korrelation der eNOS-Expression mit dem Sinus-Durchmesser,  $r = -0,40$ , RQ = relative Quantität der qPCR

Ähnlich wie die Expression von GATA5 war auch die eNOS-Expression unabhängig vom Vorliegen einer Aortendilatation in der Aortenwand bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen signifikant höher als bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen ( $M = 3,40$ ;  $SE = 0,88$  vs.  $M = 1,00$ ;  $SE = 0,13$ ;  $p < 0,05$ ) (Abbildung 14).

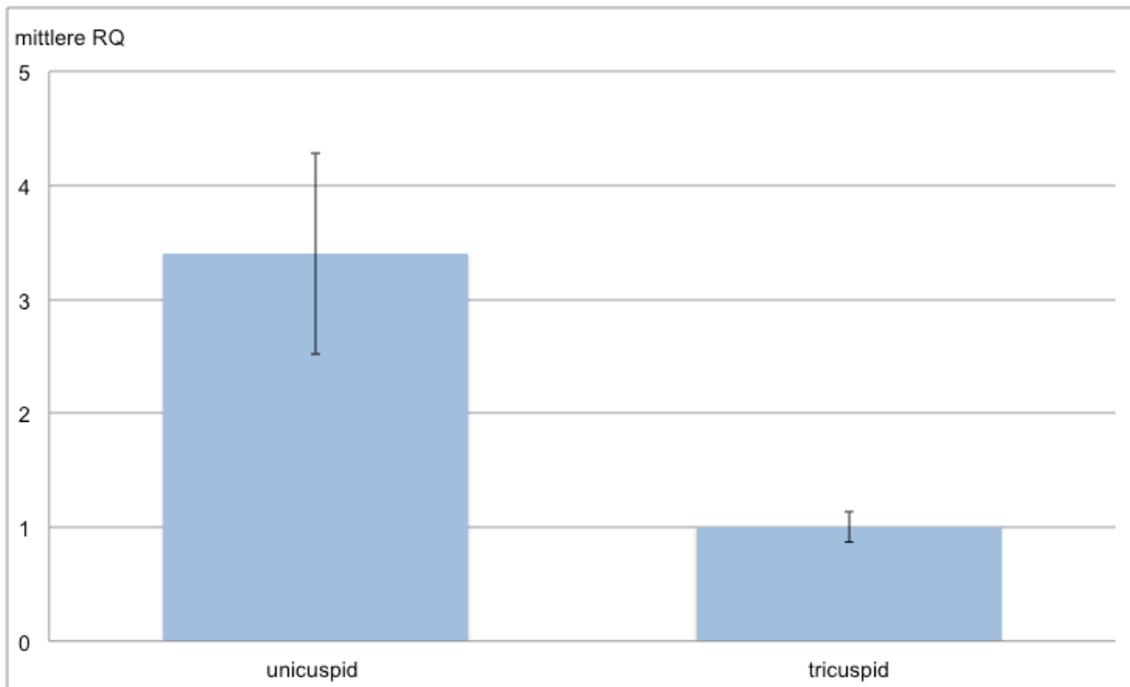


Abbildung 14: eNOS-Genexpression bei Patienten mit unicuspiden und tricuspiden Aortenklappen (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Die vier Patientengruppen (UAV-D, UAV-N, TAV-D, TAV-N) unterschieden sich in der einfaktoriellen ANOVA signifikant in ihrer eNOS-Expression ( $p < 0,01$ ). Die eNOS-Expression war bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen mit dilatierten Aorten (UAV-D:  $M = 2,94$ ;  $SE = 1,02$ ) im Vergleich zu Patienten mit undilatierten Aorten (UAV-N:  $M = 4,19$ ;  $SE = 1,69$ ) erniedrigt. Zwischen den Patientengruppen mit tricuspiden Aortenklappen gab es keinen Unterschied in der eNOS-Expression (TAV-D:  $M = 1,01$ ;  $SE = 0,4$ ; TAV-N:  $M = 1$ ;  $SE = 0$ ) (Abbildung 15). In den Post-hoc-Vergleichen konnten allerdings, vermutlich auf Grund der geringen Patientenzahl, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

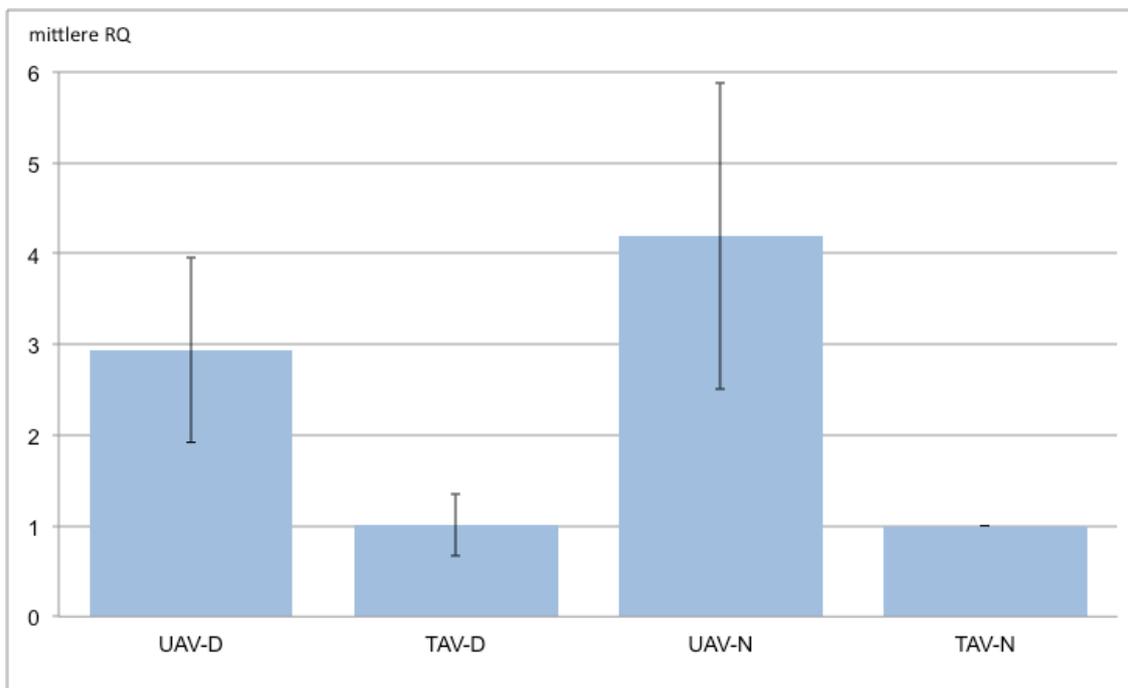


Abbildung 15: eNOS-Genexpression in den Patienten-Gruppen UAV-D = unicuspiden Aortenklappe mit Dilatation der Aorta ascendens, TAV-D = tricuspiden Aortenklappe mit Dilatation der Aorta ascendens, UAV-N = unicuspiden Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens, TAV-N = tricuspiden Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der zweifaktoriellen ANOVA mit den Zwischensubjekt Faktoren Aortenklappen-Morphologie und Aortendilatation hatte die Aortenklappen-Morphologie einen stärkeren Einfluss auf die eNOS-Expression ( $\eta^2 = 0,21$ ;  $p < 0,01$ ) als die Aortendilatation ( $\eta^2 = 0,02$ ;  $p = 0,39$ ).

Unabhängig von der Morphologie der Aortenklappe lag eine positive Korrelation zwischen den Genexpressionen von GATA5 und eNOS vor ( $r = 0,61$   $p < 0,001$ ) (Abbildung 16).

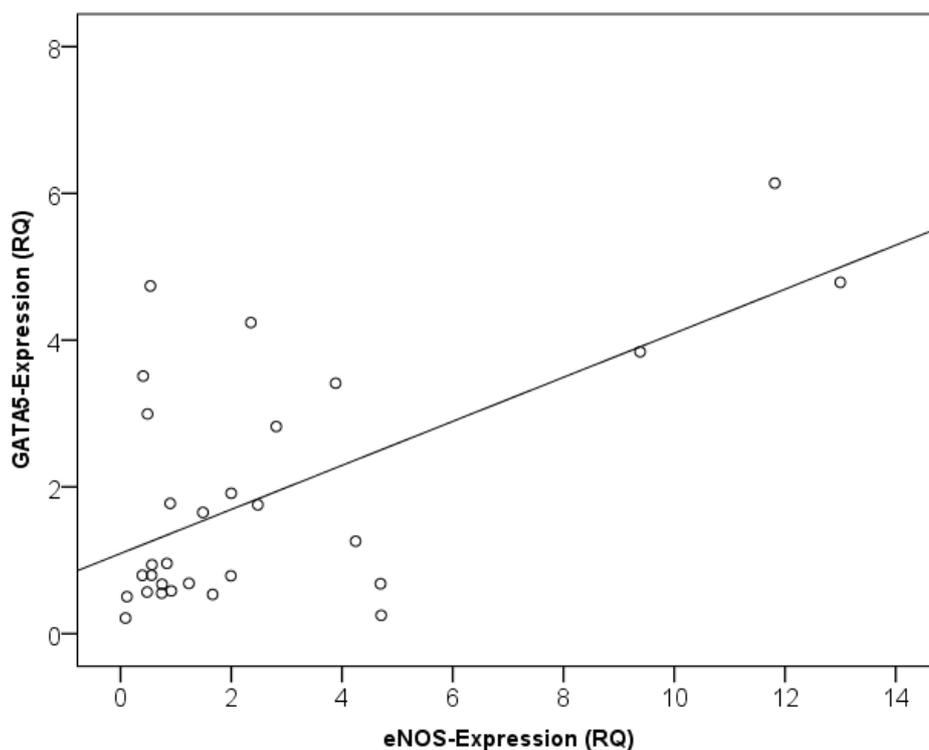


Abbildung 16: Korrelation zwischen der Genexpression von eNOS und GATA5,  $r = 0,61$ ,  $p < 0,001$ , RQ = relative Quantität der qPCR

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Expression von eNOS zwischen Patienten mit Dilatation in der tubulären Aorta ascendens (D1:  $M = 2,36$ ;  $SE = 0,76$ ) im Vergleich zu Patienten mit Dilatation im Sinus Valsalva (D2:  $M = 1,04$ ;  $SE = 0,57$ ) ( $p = 0,34$ ).

### 4.1.3. NOTCH1

Die Genexpression von NOTCH1 korrelierte bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und Aortendilatation positiv mit dem Durchmesser der Aorta ascendens. Signifikante Korrelationen lagen zwischen der NOTCH1-Expression und dem Durchmesser auf Höhe der tubulären Aorta ascendens ( $r = 0,61$ ;  $p < 0,05$ ) sowie dem maximalen Aortendurchmesser vor ( $r = 0,71$ ;  $p < 0,05$ ) (Abbildung 17). Der Sinus- ( $r = 0,4$ ;  $p = 0,23$ ) sowie der sinotubuläre Durchmesser der Aorta ( $r = 0,54$ ;  $p = 0,09$ ) korrelierten ebenfalls, allerdings nicht signifikant, mit der Expression von NOTCH1.

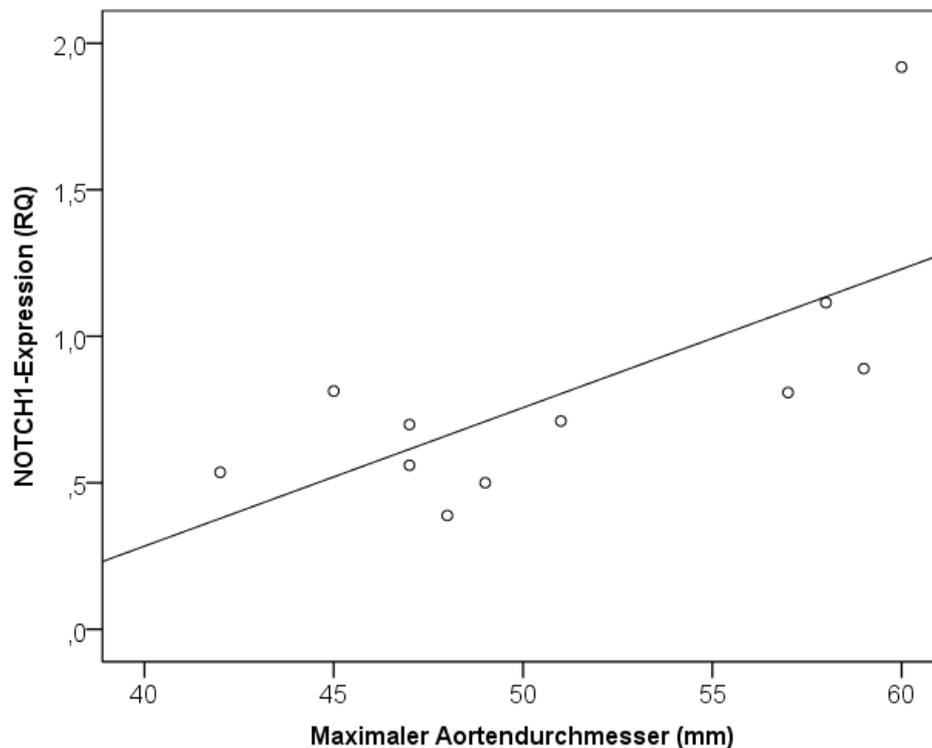


Abbildung 17: Positive Korrelation der NOTCH1-Expression bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und Aortendilatation mit dem maximalen Aortendurchmesser,  $r = 0,71$ ,  $p < 0,05$ , RQ = relative Quantität der qPCR

Unabhängig von der Aortendilatation gab es zwischen Patienten mit unicuspiden (M = 1,07; SE = 0,14) und tricuspiden Aortenklappen (M = 0,94; SE = 0,05) keine signifikanten Unterschiede in der NOTCH1-Expression ( $p = 0,37$ ) (Abbildung 18).

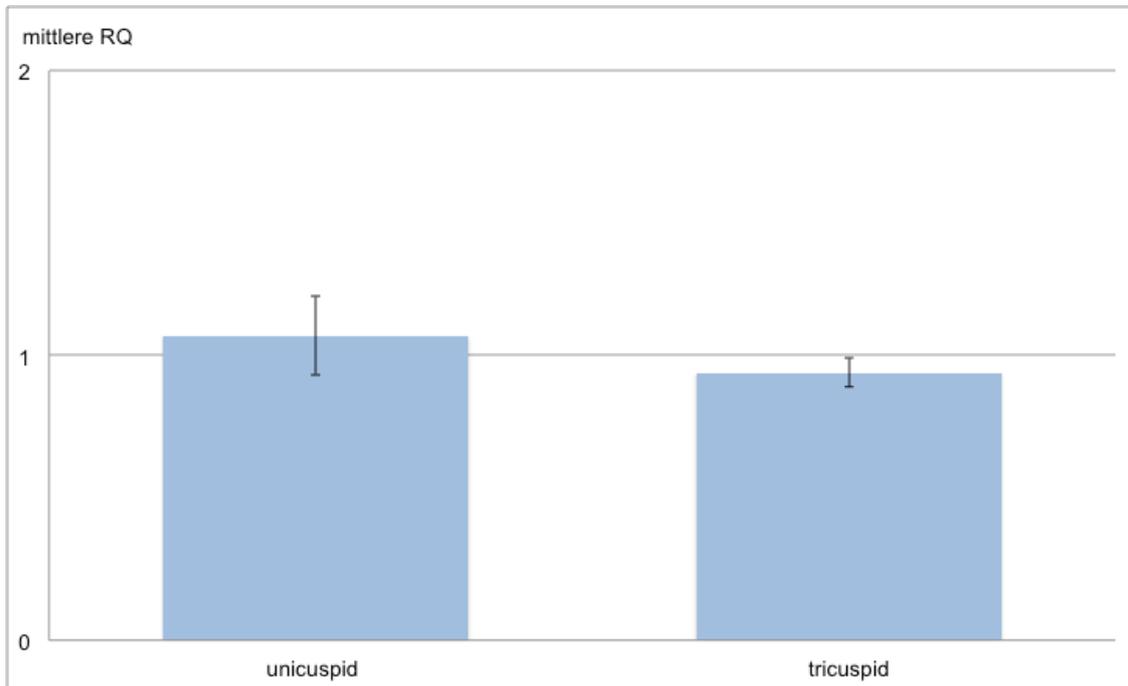


Abbildung 18: NOTCH1-Genexpression bei Patienten mit unicuspiden und tricuspiden Aortenklappen (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der einfaktoriellen ANOVA lagen keine signifikanten Unterschiede in der NOTCH1-Expression zwischen den vier Patientengruppen vor (UAV-D: M = 1,08; SE = 0,21; TAV-D: M = 0,81; SE = 0,13; UAV-N: M = 1,06; SE = 0,13; TAV-N: M = 1; SE = 0; p = 0,46) (Abbildung 19).

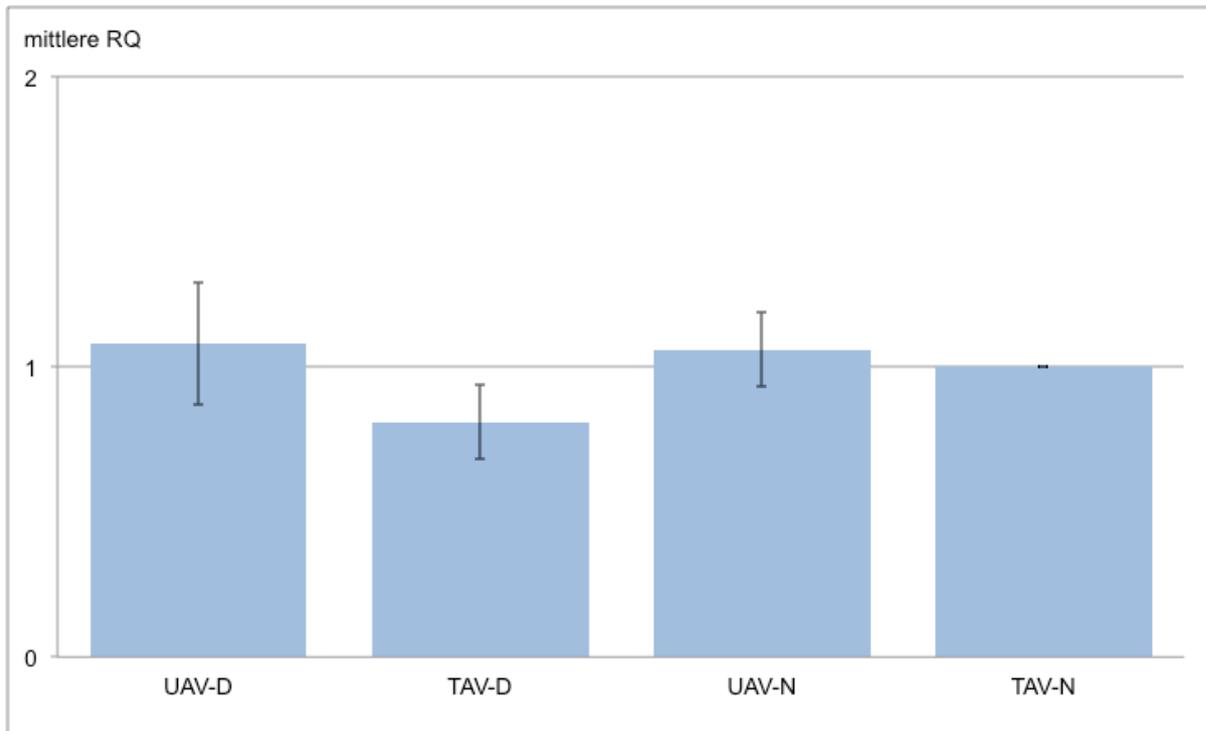


Abbildung 19: NOTCH1-Genexpression in den Patienten-Gruppen UAV-D = unicuspid Aortenklappe mit Dilatation der Aorta ascendens, TAV-D = tricuspid Aortenklappe mit Dilatation der Aorta ascendens, UAV-N = unicuspid Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens, TAV-N = tricuspid Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Die zweifaktoriellen ANOVA ergab geringe Effekte der Faktoren Aortenklappen-Morphologie ( $\eta^2 = 0,01$ , p = 0,53) und Dilatation ( $\eta^2 = 0,03$ , p = 0,22) auf die NOTCH1-Expression.

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede in der NOTCH1-Expression zwischen Patienten, deren tubuläre Aortendurchmesser größer waren als ihre Sinus-Durchmesser (D1: M = 1,04; SE = 0,17) im Vergleich zu Patienten mit Dilatation vorwiegend im Sinus Valsalva (D2: M = 0,70; SE = 0,09) ( $p = 0,25$ ).

#### 4.1.4. NOTCH3

Die NOTCH3-Genexpression zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit unicuspiden (M = 1,13; SE = 0,18) und tricuspiden Aortenklappen (M = 1,21; SE = 0,12) unabhängig von der Dilatation der Aorta ascendens ( $p = 0,73$ ) (Abbildung 20).

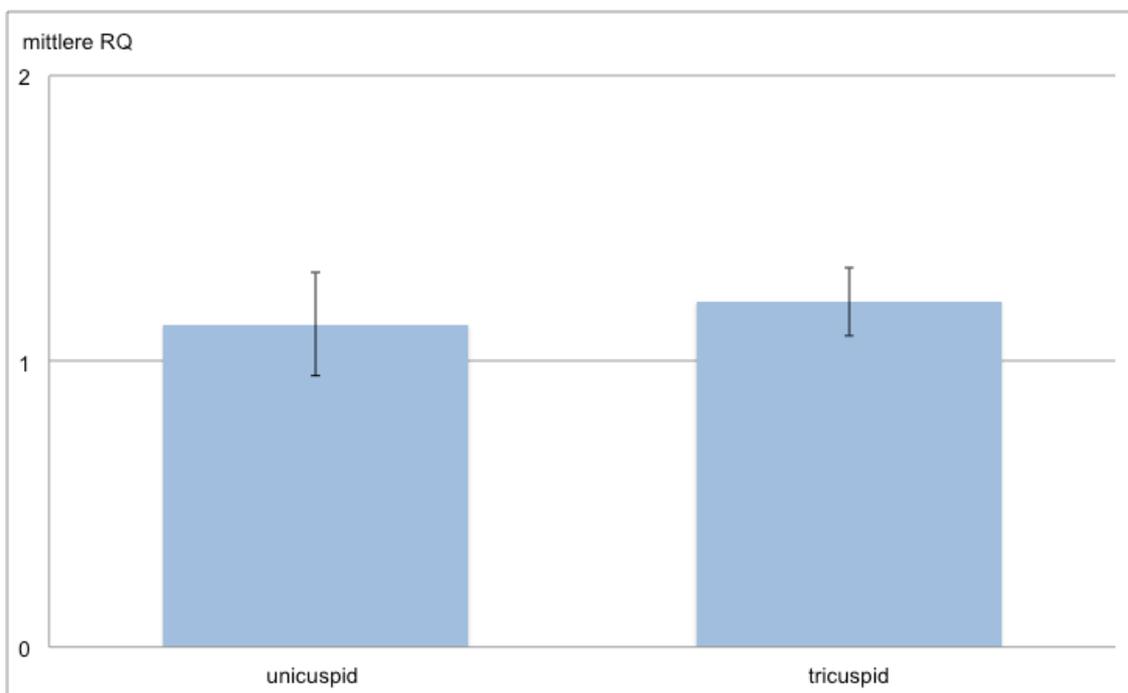


Abbildung 20: NOTCH3-Genexpression bei Patienten mit unicuspiden und tricuspiden Aortenklappen (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Die einfaktorielle ANOVA ergab, vermutlich auf Grund der geringen Fallzahl, keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Gruppen (UAV-D: M = 1,27; SE = 0,27; TAV-D: M = 1,6; SE = 0,31; UAV-N: M = 0,90; SE = 0,15; TAV-N: M = 1; SE = 0; p = 0,09) (Abbildung 21).

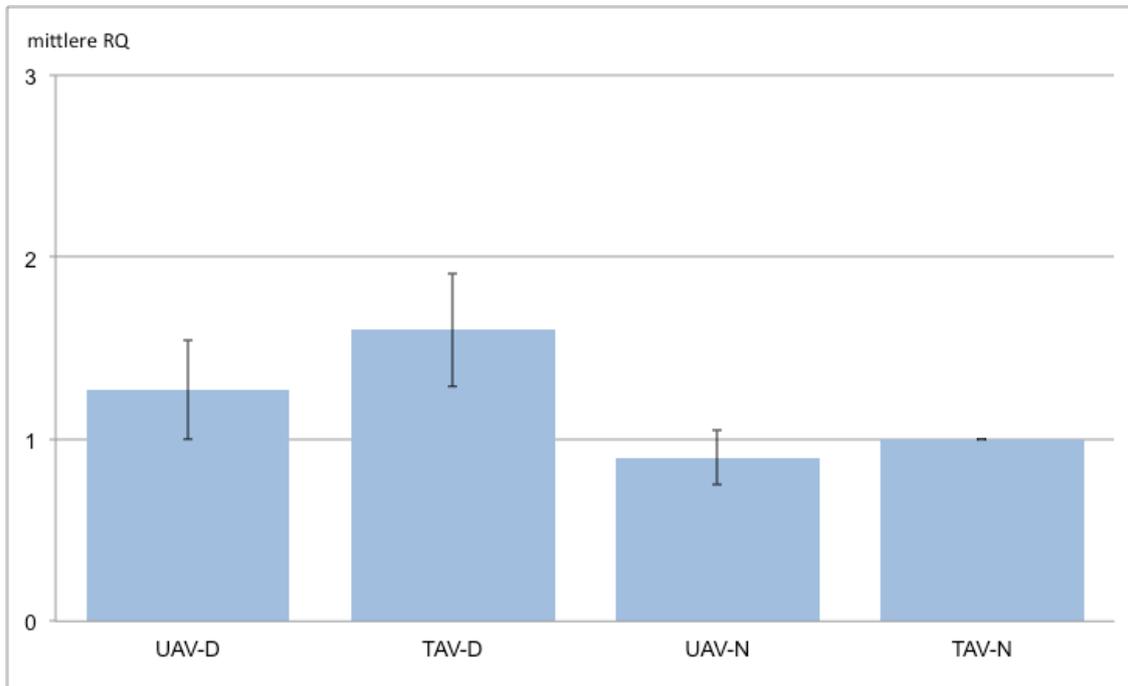


Abbildung 21: NOTCH3-Genexpression in den Patienten-Gruppen UAV-D = unicuspidale Aortenklappe mit Dilatation der Aorta ascendens, TAV-D = tricuspidale Aortenklappe mit Dilatation der Aorta ascendens, UAV-N = unicuspidale Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens, TAV-N = tricuspidale Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der zweifaktoriellen ANOVA konnte ein mittelstarker Effekt des Faktors Aortendilatation auf die NOTCH3-Expression festgestellt werden ( $\eta^2 = 0,11$ ;  $p < 0,05$ ). Der Faktor Aortenklappen-Morphologie hatte nur einen kleinen Effekt auf die NOTCH3-Expression ( $\eta^2 = 0,02$ ;  $p = 0,30$ ).

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede in der NOTCH3-Expression zwischen Patienten mit unterschiedlichen Dilatationsmustern der Aorta ascendens (D1: M = 1,46; SE = 0,26; D2: M = 1,33; SE = 0,31; p = 0,78).

## 4.2. Gene des TGF- $\beta$ -Signalweges

### 4.2.1. FBN1

Unabhängig vom Vorliegen einer Aortendilatation lagen keine signifikanten Unterschiede in der FBN1-Expression zwischen Patienten mit unicuspiden Aortenklappen (M = 1,21; SE = 0,15) und Patienten mit tricuspiden Aortenklappen (M = 1,06; SE = 0,06) vor (Abbildung 22).

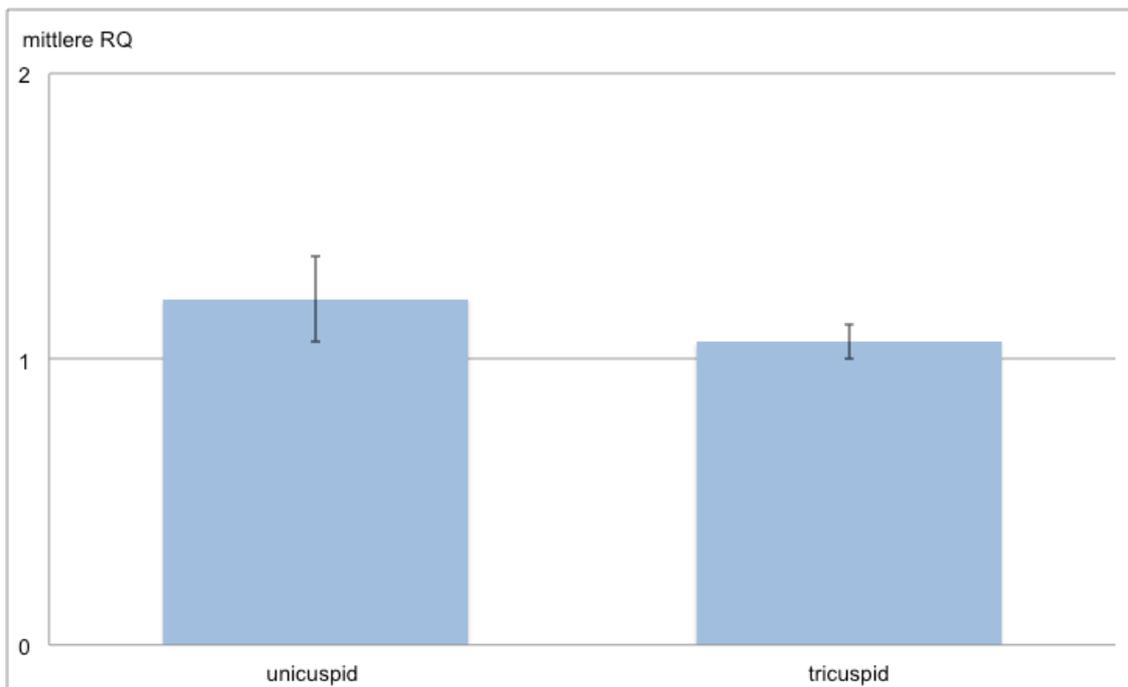


Abbildung 22: FBN1-Genexpression bei Patienten mit unicuspiden und tricuspiden Aortenklappen (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der einfaktoriellen ANOVA (Abbildung 23) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der FBN1-Expression zwischen den vier Patientengruppen (UAV-D: M = 1,15; SE = 0,14; TAV-D: M = 1,18; SE = 0,18; UAV-N: M = 1,32; SE = 0,35; TAV-N: M = 1; SE = 0; p = 0,43).

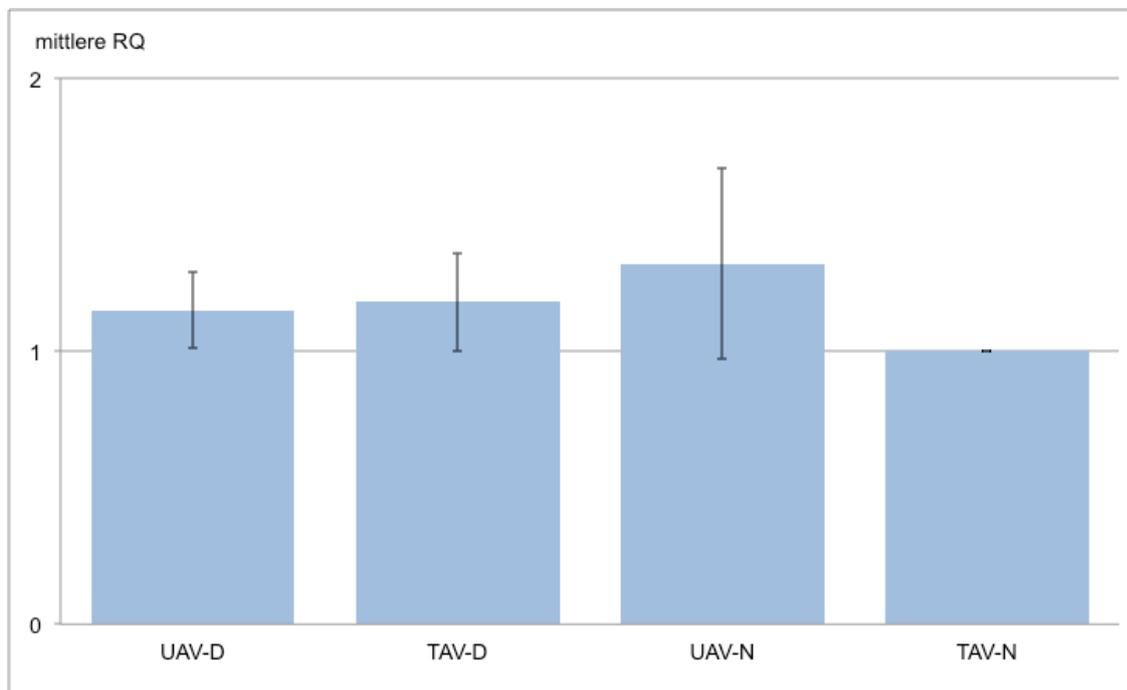


Abbildung 23: FBN1-Genexpression in den Patienten-Gruppen UAV-D = unicuspid Aortenklappe mit Dilatation der Aorta ascendens, TAV-D = tricuspid Aortenklappe mit Dilatation der Aorta ascendens, UAV-N = unicuspid Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens, TAV-N = tricuspid Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens (mittlere RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Die zweifaktorielle ANOVA ergab einen kleinen Effekt des Faktors Morphologie auf die FBN1-Expression ( $\eta^2 = 0,02$ ; p = 0,33). Der Faktor Dilatation hatte keinen Einfluss auf die Expression von FBN1 ( $\eta^2 = 0$ ; p = 0,95).

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit Dilatation in der tubulären Aorta ascendens im Vergleich zu Patienten mit Dilatation im Sinus (D1: M = 1,08; SE = 0,01; D2: M = 1,42; SE = 0,30;  $p = 0,17$ ).

#### 4.2.2. TGFBR1

Die Genexpression von TGFBR1 in der Aortenwand war unabhängig vom Vorliegen einer Aortendilatation bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen signifikant höher (M = 1,89; SE = 0,10) als bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen (M = 0,93; SE = 0,04) ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 24).

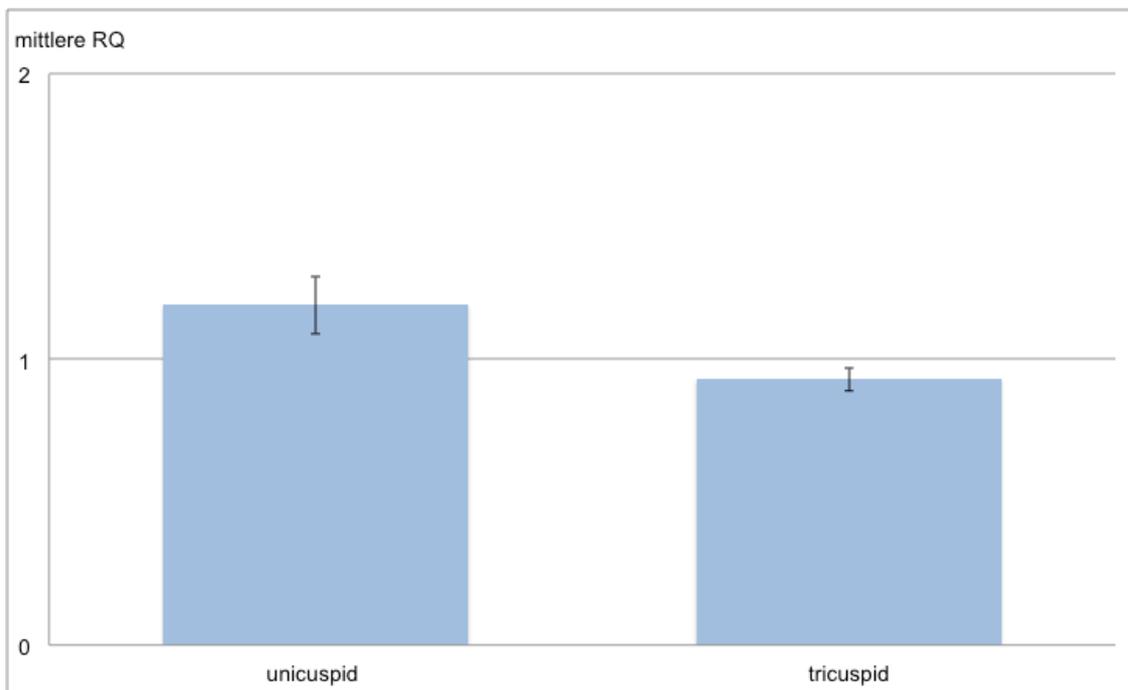


Abbildung 24: TGFBR1-Genexpression bei Patienten mit unicuspiden und tricuspiden Aortenklappen (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der einfaktoriellen ANOVA lagen signifikante Unterschiede in der TGFBR1-Genexpression zwischen den vier Patienten-Gruppen (UAV-D, UAV-N, TAV-D, TAV-N) vor ( $p < 0,01$ ). Sowohl bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen als auch bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen gab es einen Trend zu geringerer TGFBR1-Expression bei Vorliegen einer Aortendilatation (UAV-D:  $M = 1,04$ ;  $SE = 0,13$ ; TAV-D:  $M = 0,78$ ;  $SE = 0,12$ ; UAV-N:  $M = 1,44$ ;  $SE = 0,12$ ; TAV-N:  $M = 1$ ;  $SE = 0$ ). Die Post-hoc Tests ergaben eine signifikant höhere Genexpression in der Gruppe UAV-N im Vergleich zu den Gruppen TAV-N ( $p < 0,05$ ) sowie TAV-D ( $p < 0,01$ ) (Abbildung 25).

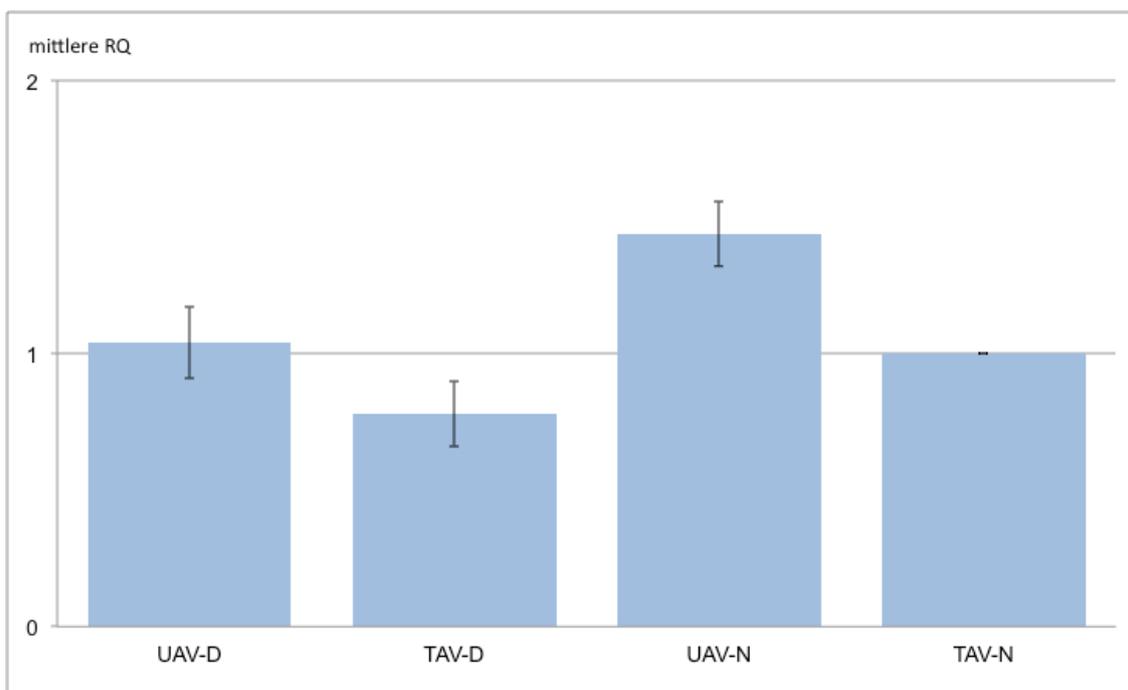


Abbildung 25: TGFBR1-Genexpression in den Patienten-Gruppen UAV-D = unicuspiden Aortenklappe mit Dilatation der Aorta ascendens, TAV-D = tricuspiden Aortenklappe mit Dilatation der Aorta ascendens, UAV-N = unicuspiden Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens, TAV-N = tricuspiden Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Die zweifaktorielle ANOVA zeigte starke Effekte der Faktoren Klappenmorphologie und Aortendilatation auf die TGFBR-1-Expression, wobei der Einfluss der Klappenmorphologie geringfügig stärker war ( $\eta^2 = 0,24$ ;  $p < 0,01$ ) als derjenige der Dilatation ( $\eta^2 = 0,20$ ;  $p < 0,01$ ).

Unter den Patienten mit dilatierter Aorta ascendens hatten Patienten, deren tubuläre Aortendurchmesser größer waren als ihre Sinus-Durchmesser (D1:  $M = 1,02$ ;  $SE = 0,11$ ), eine signifikant höhere TGFBR1-Expression als Patienten mit Dilatation vorwiegend im Bereich des Sinus Valsalva (D2:  $M = 0,63$ ;  $SE = 0,10$ ) ( $p < 0,05$ ).

### 4.2.3. TGFBR2

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Expression von TGFBR2 zwischen Patienten mit unicuspiden Aortenklappen (M = 1,12; SE = 0,14) und Patienten mit tricuspiden Aortenklappen (M = 0,90; SE = 0,04) ( $p = 0,18$ ) (Abbildung 26).

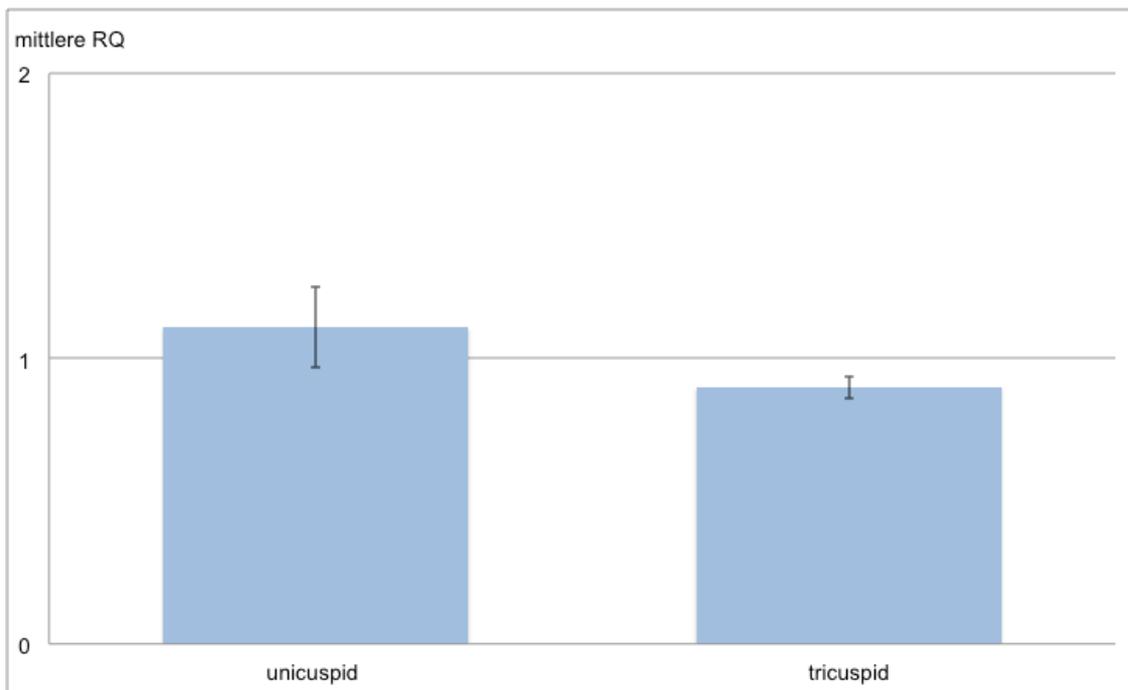


Abbildung 26: TGFBR2-Genexpression bei Patienten mit unicuspiden und tricuspiden Aortenklappen (mittlere RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Auch in der einfaktoriellen ANOVA lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Patienten-Gruppen vor (UAV-D: M = 1,10; SE = 0,20; TAV-D: M = 0,71; SE = 0,11; UAV-N: M = 1,12; SE = 0,20; TAV-N: M = 1; SE = 0; p = 0,11) (Abbildung 27).

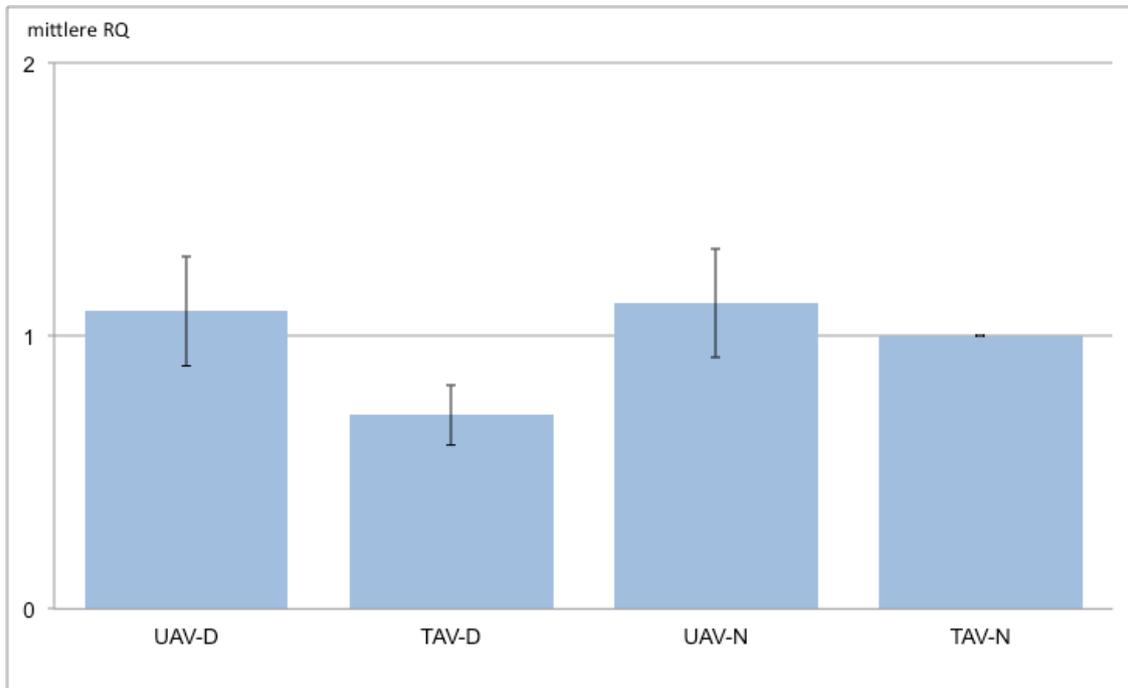


Abbildung 27: TGFBR2-Genexpression in den Patienten-Gruppen UAV-D = unicuspid Aortenklappe mit Dilatation der Aorta ascendens, TAV-D = tricuspid Aortenklappe mit Dilatation der Aorta ascendens, UAV-N = unicuspid Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens, TAV-N = tricuspid Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Die zweifaktorielle ANOVA ergab einen mittelstarken Effekt des Faktors Aortenklappen-Morphologie auf die TGFBR2-Expression ( $\eta^2 = 0,08$ ;  $p < 0,05$ ). Der Faktor Dilatation hatte nur einen kleinen Effekt auf die TGFBR2-Expression ( $\eta^2 = 0,03$ ;  $p = 0,23$ ).

Es gab keine signifikanten Unterschiede in der TGFBR2-Expression zwischen Patienten mit unterschiedlichen Dilatationsmustern der Aorta ascendens (D1: M = 0,88; SE = 0,08; D2: M = 1,02; SE = 0,42;  $p = 0,74$ ).

### 4.3. Gene in Zusammenhang mit familiären oder sporadischen Aortenaneurysmen

#### 4.3.1. ACTA2

Patienten mit unicuspiden Aortenklappen wiesen unabhängig von der Dilatation der Aorta ascendens eine signifikant höhere ACTA2-Genexpression in ihrer Aortenwand auf (M = 1,57; SE = 0,32) als Patienten mit tricuspiden Aortenklappen (M = 0,94; SE = 0,05) ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 28).

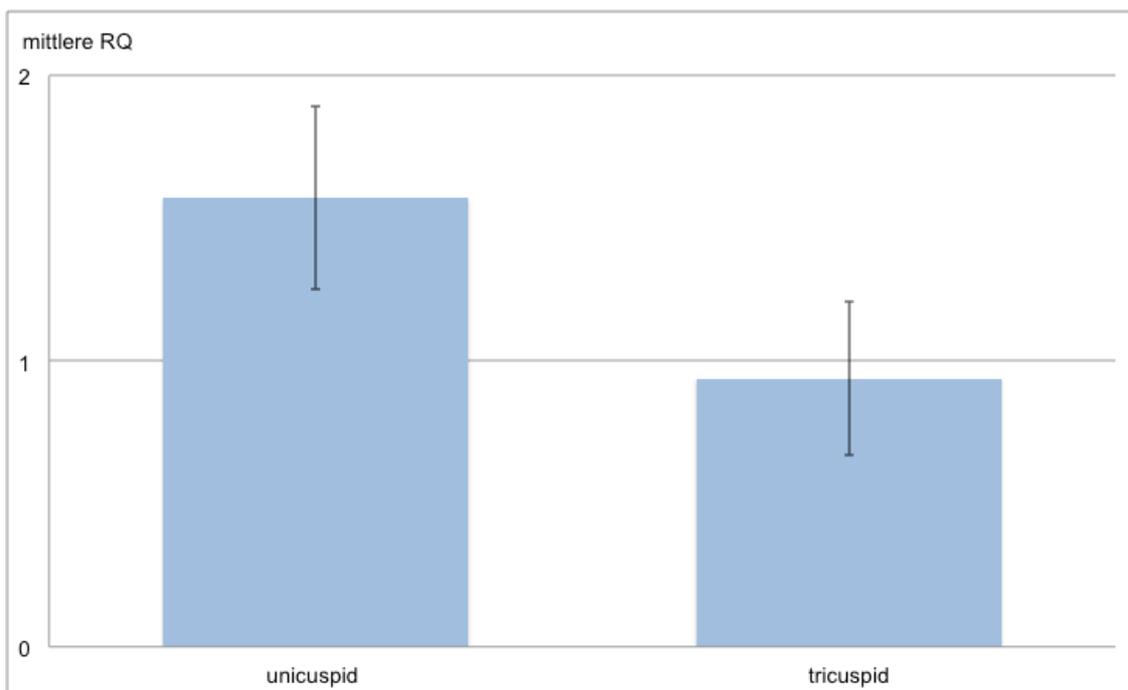


Abbildung 28: ACTA2-Genexpression bei Patienten mit unicuspiden und tricuspiden Aortenklappen (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Die vier Patientengruppen (UAV-D, UAV-N, TAV-D, TAV-N) unterschieden sich signifikant in ihrer ACTA2-Expression in der einfaktoriellen ANOVA ( $p < 0,05$ ). Die Post-hoc Vergleiche ergaben allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den Einzelgruppen. Bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen gab es einen Trend zu höherer ACTA2-Expression bei Vorliegen einer Aortendilatation (UAV-D:  $M = 1,89$ ;  $SE = 0,46$ ; UAV-N:  $M = 1$ ;  $SE = 0,33$ ). Bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen gab es keine Unterschiede in der ACTA2-Expression zwischen den Einzelgruppen (TAV-D:  $M = 0,82$ ;  $SE = 0,13$ ; TAV-N:  $M = 1$ ;  $SE = 0$ ) (Abbildung 29).

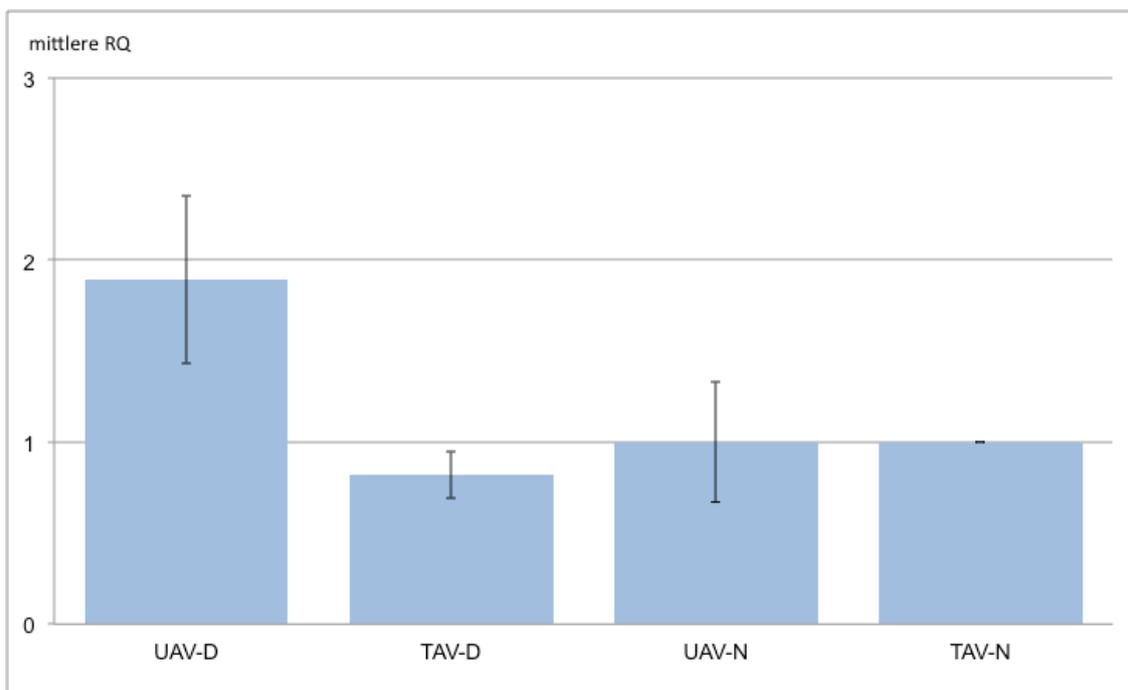


Abbildung 29: ACTA2-Genexpression in den Patienten-Gruppen UAV-D = unicuspiden Aortenklappe mit Dilatation der Aorta ascendens, TAV-D = tricuspiden Aortenklappe mit Dilatation der Aorta ascendens, UAV-N = unicuspiden Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens, TAV-N = tricuspiden Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der zweifaktoriellen ANOVA lag ein mittelstarker Effekt des Faktors Aortenklappen-Morphologie auf die ACTA2-Expression vor ( $\eta^2 = 0,09$ ;  $p < 0,05$ ); der Faktor Aortendilatation hatte einen kleinen Effekt auf die Genexpression von ACTA2 ( $\eta^2 = 0,04$ ;  $p = 0,17$ );

Es lagen keine signifikanten Unterschiede in der ACTA2-Expression zwischen Patienten mit Dilatation der tubulären Aorta (D1:  $M = 1,57$ ;  $SE = 0,34$ ) im Vergleich zu Patienten mit Dilatation der Aortenwurzel vor (D2:  $M = 0,84$ ;  $SE = 0,22$ ) ( $p = 0,24$ ).

### 4.3.2. COL3A1

Es lagen keine signifikanten Unterschiede in der COL3A1-Genexpression zwischen Patienten mit unicuspiden Aortenklappen (M = 1,39; SE = 0,16) und Patienten mit tricuspiden Aortenklappen (M = 1,17, SE = 0,09) ( $p = 0,20$ ) vor (Abbildung 30).

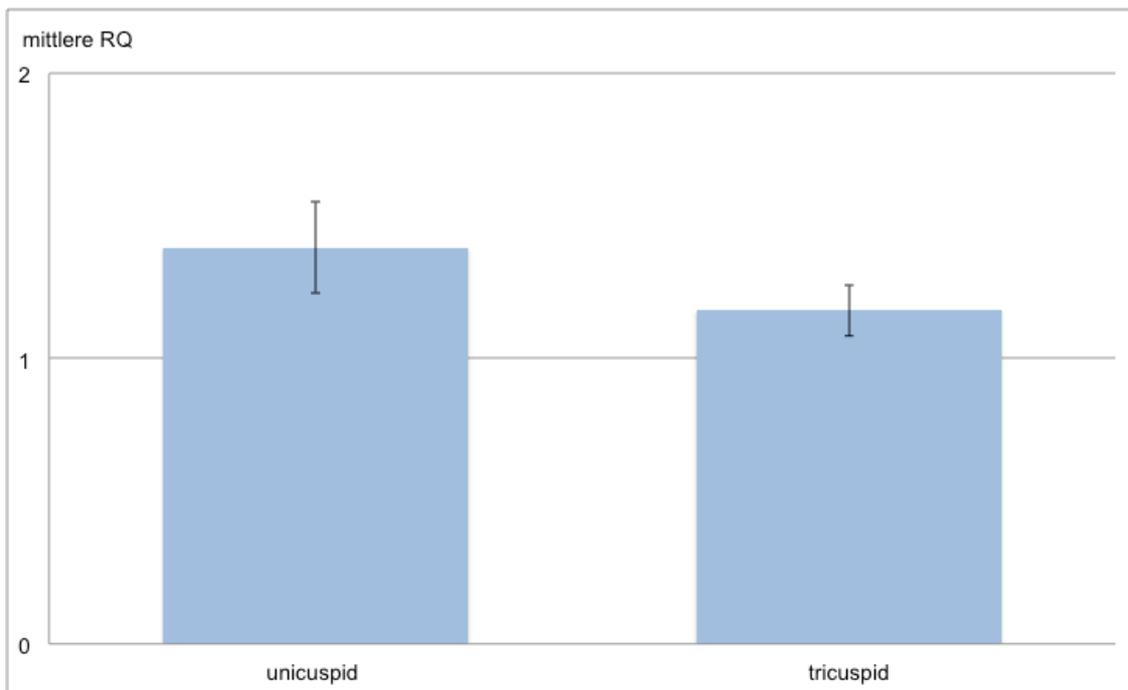


Abbildung 30: COL3A1-Genexpression bei Patienten mit unicuspiden und tricuspiden Aortenklappen (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Die einfaktorielle ANOVA ergab signifikante Unterschiede in der COL3A1-Expression zwischen den vier Patienten-Gruppen (UAV-D: M = 1,31; SE = 0,20; TAV-D: M = 1,51; SE = 0,24; UAV-N: M = 1,53; SE = 0,25; TAV-N: M = 1; SE = 0) ( $p < 0,05$ ). Die Post-hoc Tests ergaben allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Einzelgruppen. Unter den Patienten ohne Aortendilatation bestand ein Trend zu höherer COL3A1-Expression bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen. Bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta gab es einen Trend zu höherer COL3A1-Expression im Vergleich zu Patienten mit normal weiter Aorta (Abbildung 31).

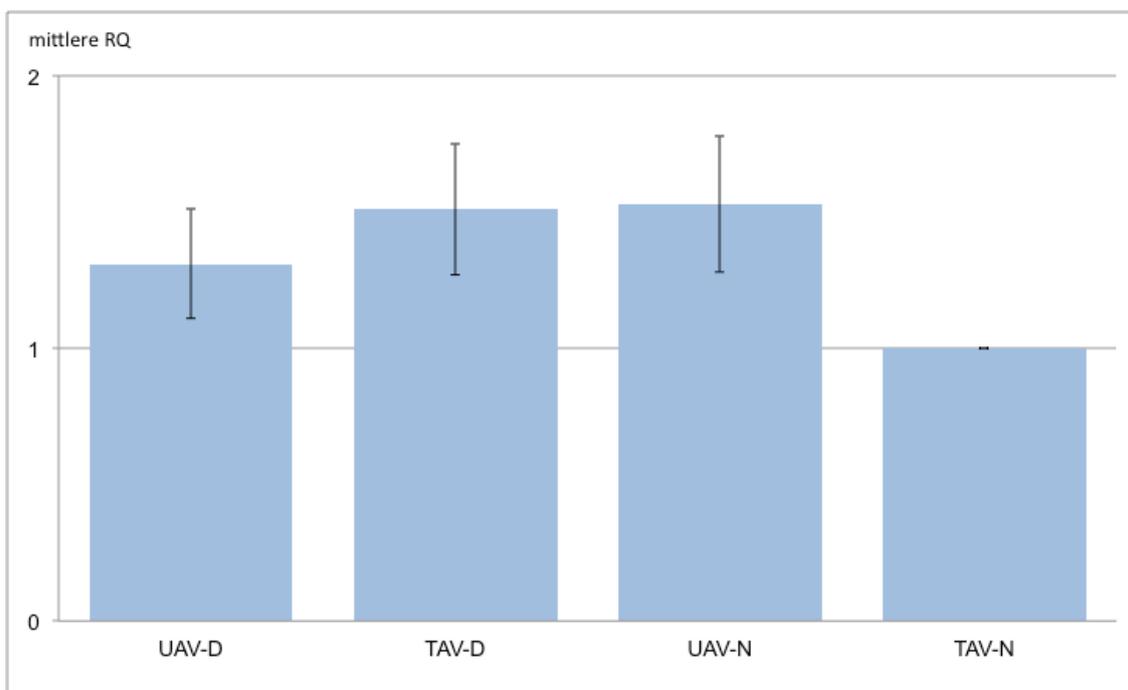


Abbildung 31: COL3A1-Genexpression in den Patienten-Gruppen UAV-D = unicuspiden Aortenklappe mit Dilatation der Aorta ascendens, TAV-D = tricuspiden Aortenklappe mit Dilatation der Aorta ascendens, UAV-N = unicuspiden Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens, TAV-N = tricuspiden Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Die zweifaktorielle ANOVA ergab geringe Effekte der Faktoren Aortenklappen-Morphologie ( $\eta^2 = 0,02$ ;  $p = 0,32$ ) und Aortendilatation ( $\eta^2 = 0,02$ ;  $p = 0,38$ ) auf die Expression von COL3A1.

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Expression von COL3A1 zwischen Patienten deren Sinus-Durchmesser größer waren als ihre tubulären Aortendurchmesser (D2:  $M = 1,61$ ;  $SE = 0,34$ ) im Vergleich zu Patienten mit Dilatation im Bereich der tubulären Aorta ascendens (D1:  $M = 1,34$ ;  $SE = 0,17$ ) ( $p = 0,45$ ).

### 4.3.3. MMP19

Unabhängig von der Dilatation der Aorta ascendens war die Expression von MMP19 bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen ( $M = 1,01$ ;  $SE = 0,08$ ) und Patienten mit tricuspiden Aortenklappen ( $M = 1,04$ ;  $SE = 0,03$ ) ähnlich ( $p = 0,72$ ) (Abbildung 32)

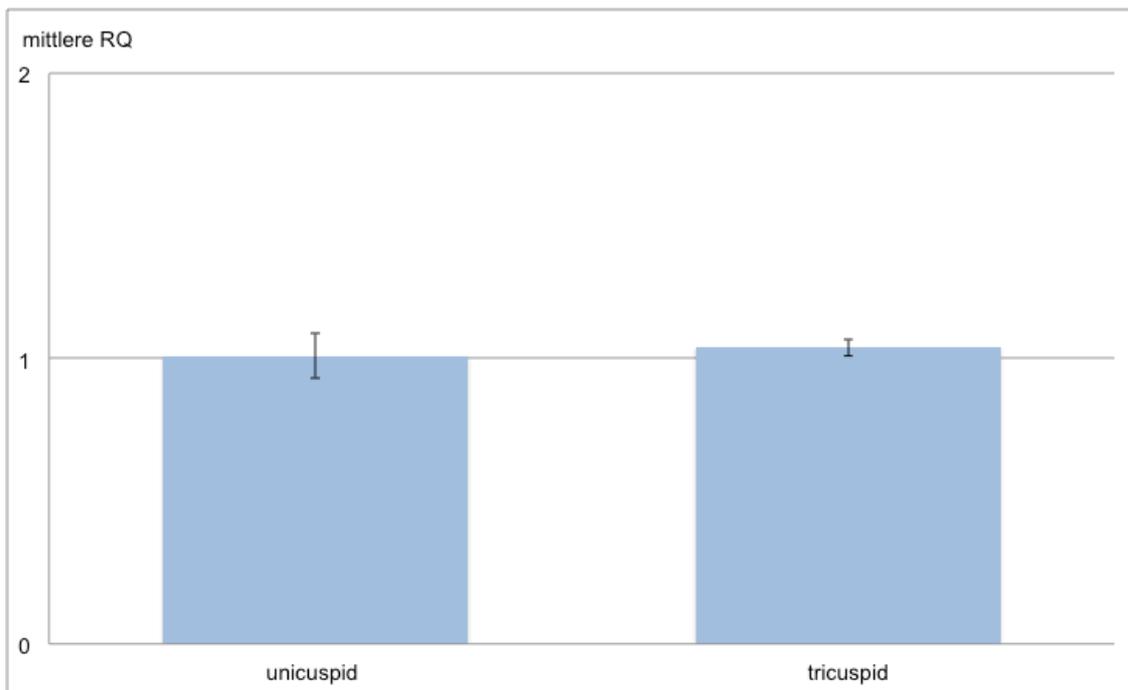


Abbildung 32: MMP19-Genexpression bei Patienten mit unicuspiden und tricuspiden Aortenklappen (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Auch die vier Patientengruppen unterschieden sich in der einfaktoriellen ANOVA nicht signifikant in ihrer MMP19-Expression (UAV-D: M = 0,97; SE = 0,10; UAV-N: M = 1,07; SE = 0,15; TAV-D: M = 1,12; SE = 0,10; TAV-N: M = 1; SE = 0; p = 0,51) (Abbildung 33).

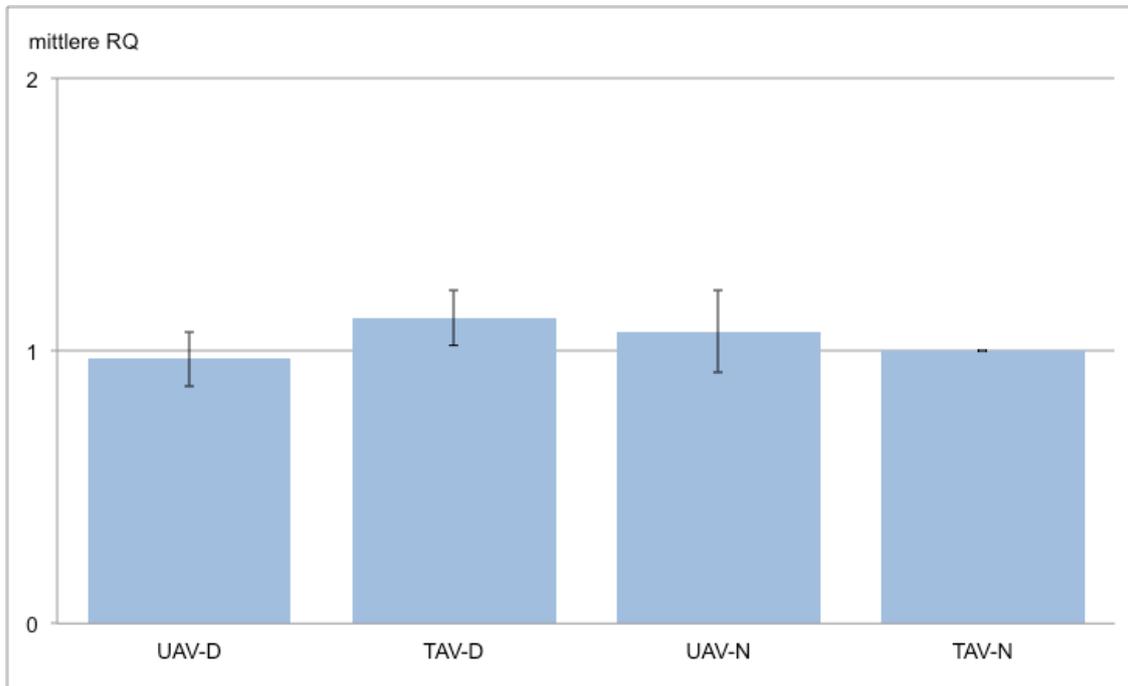


Abbildung 33: MMP19-Genexpression in den Patienten-Gruppen UAV-D = unicuspid Aortenklappe mit Dilatation der Aorta ascendens, TAV-D = tricuspid Aortenklappe mit Dilatation der Aorta ascendens, UAV-N = unicuspid Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens, TAV-N = tricuspid Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der zweifaktoriellen ANOVA hatte der Faktor Aortenklappen-Morphologie lediglich einen kleinen Effekt auf die Expression von MMP19 ( $\eta^2 = 0,01$ ; p = 0,63). Der Faktor Aortendilatation hatte keinen Effekt auf die MMP19-Expression ( $\eta^2 = 0$ ; p = 0,88).

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede in der MMP19-Expression zwischen Patienten mit unterschiedlichen Dilatationsmustern der Aorta ascendens (D1: M = 1,00 ; SE = 0,09 vs. D2: M = 1,16; SE = 0,10; p = 0,33).

## 5. Diskussion

### 5.1. Hintergrund

Angeborene Anomalien der Aortenklappe wie die bicuspide und unicuspide Aortenklappe sind nicht nur wegen der frühzeitig auftretenden Klappenvitien von hoher klinischer Relevanz, sondern auch weil sie in jungem Alter zur Entwicklung von Aneurysmen der Aorta ascendens prädisponieren. Klarheit über die molekularen Vorgänge, die dazu führen, dass die Aorta ascendens dieser Patienten in etwa 60 % der Fälle dilatiert [4,11,13], ist von großem klinischen Interesse. Würde eine dafür ursächliche abweichende Proteinexpression in der Aortenwand bei Patienten mit Aortenklappenanomalien identifiziert, so könnte sie Ansatzpunkte für präventive Medikationen liefern, um den Progress der Aortendilatation aufzuhalten und damit das Risiko einer Aortendissektion zu senken.

Ein solcher Zusammenhang konnte beim Marfan-Syndrom für den Angiotensin II-Rezeptor-Typ 1-Antagonisten (AT1-Antagonisten) Losartan gezeigt werden. Aus einem Mausmodell des Marfan-Syndroms ist bekannt, dass Mäuse, die heterozygot für eine FBN1-Mutation sind, unter einer Therapie mit Losartan signifikant niedrigere Erweiterungsraten ihrer Aorta zeigen als solche, die mit Placebo behandelt wurden [48]. Die kürzlich publizierte randomisierte kontrollierte COMPARE (Cozaar in Marfan Patients Reduces Aortic Enlargement) Studie verglich das Fortschreiten der Aortendilatation bei 233 Patienten mit Marfan-Syndrom, die entweder Losartan oder keine medikamentöse Therapie erhielten [46]. Die Erweiterungsrate der Aortenwurzel war nach drei Jahren in der Losartan-Gruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ohne Medikation. Weiterhin zeigten Patienten, die bereits einen Aortenwurzeleratz erhalten hatten und mit Losartan therapiert wurden, eine signifikant geringere Zunahme des Aortenbogen-Durchmessers als Patienten der Kontrollgruppe [46].

Die molekulare Basis, auf der Losartan das Wachstum der Aorta ascendens bei Patienten mit Marfan-Syndrom reduziert, ist bislang nicht ausreichend geklärt, wobei ein Zusammenhang zum TGF- $\beta$ -Signalweg angenommen wird. Cohn et al. konnten zeigen, dass Losartan als AT1-Rezeptor-Antagonist die Aktivität von Thrombospondin-1 reduziert, welches durch Angiotensin II hochreguliert wird [19]. Thrombospondin-1 wiederum ist ein potenter Aktivator von TGF- $\beta$  [132], dem eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von syndromalen thorakalen Aortenaneurysmen zuzukommen scheint [76,87].

Über den Einfluss des TGF- $\beta$ -Signalweges auf die Pathogenese von Aortenaneurysmen in Assoziation mit angeborenen Aortenklappenanomalien ist bisher nur wenig bekannt. Bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen gibt es eindeutige Hinweise auf einen genetisch determinierten Hintergrund der Aortendilatation; diese stammen allerdings größtenteils aus Studien, welche die Expression einzelner Proteine der extrazellulären Matrix in der Aortenwand untersucht haben [34,71]. Es ist bislang nicht gelungen, aus den Einzelbeobachtungen an Aorten von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen ein schlüssiges pathogenetisches Konzept zu erstellen. Neben dem TGF- $\beta$ -Signalweg scheinen vor allem die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) sowie der NOTCH-Signalweg von Bedeutung zu sein. Im Folgenden soll kurz auf die bereits in der Literatur beschriebenen Interaktionen zwischen diesen Signalwegen eingegangen werden. Abbildung 34 stellt einen eigenen Versuch dar, diese schematisch zu skizzieren.

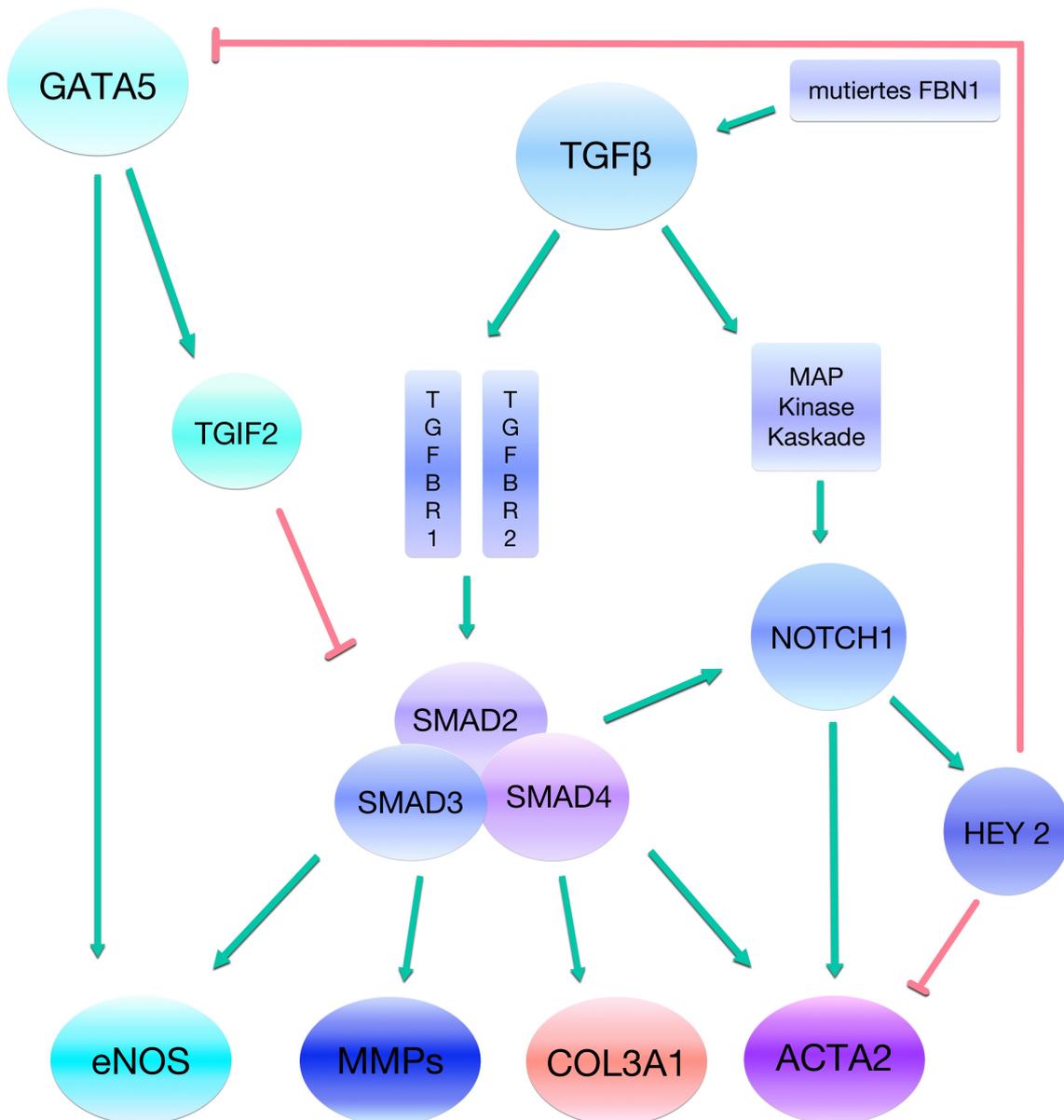


Abbildung 34: Entwurf eines Schemas für Interaktionen zwischen Signalwegen, die in der Pathogenese der Aortenaneurysmen bei Patienten mit Aortenklappenanomalien eine Rolle spielen mögen. Grüne Pfeile symbolisieren fördernde Einflüsse, rote Pfeile symbolisieren hemmende Einflüsse. ACTA2 = smooth muscle aortic alpha-actin, COL3A1 = Kollagen Typ 3, Alpha-1, eNOS = endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, FBN1 = Fibrillin-1, HEY2 = hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 2, MAP-Kinase = Mitogen-aktivierte Proteinkinase, MMPs = Matrixmetalloproteinasen, TGF = transforming growth factor beta, TGFBR1 = transforming growth factor beta Rezeptor 1, TGRBR2 = transforming growth factor beta Rezeptor 2, TGIF2 = transforming growth factor-beta-induced factor 2

Die bei mutiertem FBN1 vorliegenden Fibrillin-1-Bruchstücke führen dazu, dass TGF- $\beta$  vermehrt in seiner freien Form vorliegt [15]. Die Bindung von TGF- $\beta$  an seine Rezeptoren (TGFBR1 und TGFBR2) führt zur Bildung von Rezeptor-Liganden-Komplexen. TGFBR1 leitet das extrazelluläre Signal an die intrazellulären Effektor-Proteine der SMAD-Familie weiter. Die R-SMADs (receptor regulated SMADs, SMAD2, SMAD3) dimerisieren nach Phosphorylierung durch TGFBR1 und binden an das Co-SMAD (common SMAD, Smad4). Das so entstandene Heterotrimer aktiviert im Zellkern die Transkription der TGF- $\beta$ -Zielgene [62,124]. Zu den Genen, deren Transkription durch die SMAD-Proteine gefördert wird, zählen unter anderem eNOS [109], MMPs [99], COL3A1 [120], Jagged-1 [64] und ACTA2 [99].

Neben diesem sogenannten kanonischen Signalweg aktiviert TGF- $\beta$  weitere intrazelluläre Signalkaskaden, darunter auch die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade (MAP-Kinase-Kaskade) [124], die durch die Induktion des NOTCH-Liganden Jagged-1 [129,130] den NOTCH-Signalweg aktiviert. Der NOTCH-Signalweg führt zu vermehrter Transkription von ACTA2 sowie des transkriptionellen Repressors HEY2 (hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 2) [118], der wiederum die Transkription von ACTA2 hemmt [118]. Studien an Zellkulturen haben gezeigt, dass HEY2 mit den Proteinen der GATA-Familie interagieren und damit auch deren transkriptionelle Aktivität hemmen kann [57].

An Tiermodellen wurde gezeigt, dass GATA5 die Transkription von eNOS aktiviert [66] und den transkriptionellen Repressor TGIF2 (transforming growth factor-beta-induced factor 2) induziert, der den TGF- $\beta$ -Signalweg durch Interaktion mit den SMAD-Proteinen antagonisiert [81].

Noch nicht vollständig geklärt ist, inwieweit diese komplexen molekularen Zusammenhänge zwischen den beschriebenen Proteinen auch in der menschlichen Aortenwand vorliegen. Ebenfalls unklar ist, welchen Einfluss Aktivitätsänderungen der einzelnen Faktoren bei Patienten mit Aortenklappenanomalien auf die Entstehung von Aneurysmen ausüben.

Bisher gab es keine Studien, welche die Gen- oder Proteinexpression in der Aortenwand von Patienten mit unicuspiden Aortenklappen untersucht haben, wovon ausgehend eine pathogenetische Differenzierung zur wesentlich häufigeren bicuspiden Morphologie möglich wäre. Aus epidemiologischen Studien ist bekannt, dass Patienten mit unicuspiden Aortenklappen eine Aortendissektion etwa eine Dekade früher erleiden als Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und dass das Risiko, diese Komplikation zu entwickeln, bei Vorliegen einer unicuspiden Aortenklappe im Vergleich zur bicuspiden Aortenklappe etwa doppelt so hoch ist [68]. Es liegt daher nahe, dass diese seltene Morphologie der Aortenklappe als eigene Entität betrachtet werden sollte.

In der hier vorgelegten Studie wurde zum einen die Expression von Genen der eNOS- und NOTCH-Signalwege in der Aortenwand von Patienten mit unicuspiden Aortenklappen untersucht, für die klare Hinweise vorliegen, dass sie in der Pathogenese der bicuspiden Aortenklappe eine Rolle spielen. Zum anderen wurde die Expression von Genen des TGF $\beta$ -Signalweges (FBN1, TGFBR1 und 2) analysiert, sowie von Genen die in Zusammenhang mit familiären (ACTA2, COL3A1) oder sporadischen thorakalen Aortenaneurysmen (MMP19) stehen.

## 5.2. Gene der eNOS und NOTCH-Signalwege

### 5.2.1. GATA5 und eNOS

Die Erkenntnis, dass eNOS an der Pathogenese der bicuspiden Aortenklappe beteiligt ist, stammt aus Beobachtungen an Knockout-Mäusen. Ein eNOS-Knockout in Mäusen erhöhte die Rate an bicuspiden Aortenklappen [70]. In ApoE-Knockout-Mäusen, die eine atherogene Ernährung erhielten, führte ein zusätzliches Knockout von eNOS zu abdominellen Aortenaneurysmen und Dissektionen [63]. Auch bei Menschen mit bicuspiden Aortenklappen konnte ein Zusammenhang zwischen dem eNOS-Proteingehalt in der Aortenwand und der Dilatation der Aorta ascendens nachgewiesen werden [3]. Diese Daten lassen eine gemeinsame genetische Basis von congenitalen Aortenklappenanomalien und vaskulärer Aortenerkrankung vermuten.

Da eNOS einen Einfluss auf die Pathogenese der bicuspiden Aortenklappe einzunehmen scheint, liegt es nahe, dass Studien an weiteren Proteinen des eNOS-Signalweges Aufschluss über die Ursache der Aortendilatation bei Anomalien der Aortenklappe geben könnten. Laforest et al. zeigten in einem Mausmodell, dass GATA5 die eNOS-Aktivität durch Bindung an den eNOS-Promotor hochreguliert. Die GATA-Familie stellt eine Gruppe evolutionär hochkonservierter Transkriptionsfaktoren dar, von denen GATA5 die Entwicklung der Endokardkissen und des kardialen Ausflusstraktes reguliert [66]. Ein GATA5-Knockout reduzierte die eNOS-Expression im linken Ventrikel und Ausflusstrakt von Mäuse-Embryonen und führte bei diesen Tieren zu einer erhöhten Rate an bicuspiden Aortenklappen [66]. Diese Daten machen GATA5 zu einem interessanten Protein für molekularbiologische Studien, die den Zusammenhang von Aortendilatation und Aortenklappenanomalien bei Menschen untersuchen. Erste Hinweise auf eine mögliche Bedeutung von GATA5 in der Pathogenese von bicuspiden Aortenklappen bei Menschen gibt eine Studie von Padang et al., die vier nicht-synonyme seltene genetische Varianten in der transkriptionellen Aktivationsdomäne von GATA5 bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen beschreibt [95]. In der hier vorgelegten Studie

wurde die Genexpression von GATA5 und eNOS in der Aorta ascendens von Patienten mit unicuspiden und tricuspiden Aortenklappen mit oder ohne begleitende Aortendilatation untersucht.

Patienten mit unicuspiden Aortenklappen zeigten unabhängig vom Vorliegen einer Aortendilatation eine signifikant höhere GATA5- und eNOS- Expression in ihrer Aortenwand als Patienten mit tricuspiden Aortenklappen. Außerdem lag eine positive Korrelation zwischen der Genexpression von GATA5 und eNOS vor. Diese Ergebnisse legen nahe, dass GATA5 auch bei Menschen als Aktivator der eNOS-Transkription fungiert. Es ist wahrscheinlich, dass die erhöhte eNOS-Expression in der Aortenwand bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen damit Folge einer erhöhten GATA5-Expression ist. Eine erhöhte GATA5- und eNOS-Aktivität in der Aortenwand dieser Patienten mag demnach eine Rolle in der Pathogenese der frühzeitigen Entwicklung von Aortenaneurysmen bei Vorliegen einer unicuspiden Aortenklappe spielen.

Wie es zu einer erhöhten Expression von GATA5 in der Aortenwand bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen kommt, ist bislang vollkommen unklar. Das Vorliegen von konstitutionellen GATA5-Mutationen wurde in einer kleinen Kohorte von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen ausgeschlossen [37] und ist bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen noch nicht untersucht worden. Auch weitere Mitglieder der GATA-Familie könnten in der Pathogenese der unicuspiden Aortenklappe eine Rolle spielen. Für GATA4 und GATA6 konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass sie mit GATA5 in der Entwicklung des kardialen Ausflusstraktes interagieren [67]. Dass GATA4 und GATA6 auch für die Embryogenese des Ausflusstraktes bei Menschen essentiell sind, belegen Studien, die Mutationen in beiden Genen bei Patienten mit angeborenen Herzfehlern wie der Fallot'schen Tetralogie oder einem Truncus arteriosus nachgewiesen haben [61,123,127]. Für GATA4 und GATA6 liegen noch keine Studien an Patienten mit angeborenen Aortenklappenanomalien vor. Die Resultate der bisherigen Forschung machen im Einklang mit den hier vorgelegten Daten zu GATA5 allerdings wahrscheinlich, dass eine dysregulierte Aktivität der GATA-Transkriptionsfaktoren entscheidend an der Pathogenese

von Aortenklappenanomalien und der mit ihnen assoziierten Aortendilatation beteiligt ist.

Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu den hier beschriebenen Patienten mit unicuspiden Aortenklappen einen Trend zu niedrigerer GATA5- und eNOS-Genexpression in der Aortenwand besteht [52]. Vermutlich auf Grund der geringen Patientenzahlen dieser Studie wurden die Unterschiede nicht statistisch signifikant; dennoch geben sie einen Hinweis darauf, dass es Unterschiede in der Pathogenese der Aortenaneurysmen zwischen den beiden Patientengruppen geben mag.

Die Genexpression von eNOS ist in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen signifikant höher als bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen [52]. Aicher et al. hingegen beschrieben eine im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen niedrigere eNOS-Protein-Expression in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen [3]. Die Ursache für diese Unterschiede zwischen eNOS-Gen- und Protein-Expression bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen sind bisher noch nicht ausreichend erforscht. Die Expression von eNOS wird neben GATA5 auch durch eine Vielzahl weiterer Proteine wie z.B. TGF- $\beta$ , sowie durch posttranskriptionelle Regulationen gesteuert [113]. Ferner ist seit längerem bekannt, dass physikalische Stimuli wie erhöhte Scherkräfte die eNOS-Expression ebenfalls beeinflussen [102]. Die erhöhten Scherkräfte an der Konvexität der Aorta ascendens bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen mögen die Ursache eines lokal unterschiedlichen eNOS-Proteingehaltes in der Aortenwand dieser Patienten sein [7,84]. Es bleibt zum gegenwärtigen Zeitpunkt unklar, welchen Einfluss ein Zusammenwirken von physikalischen Faktoren und Aktivitätsänderungen von Transkriptionsfaktoren wie GATA5 auf den eNOS-Proteingehalt in der Aortenwand von Patienten mit Aortenklappenanomalien hat und ob es damit Ursache für abweichende Ergebnisse der vorliegenden Protein- und mRNA-Studien sein könnte.

Von unserer Arbeitsgruppe wurde eine negative Korrelation zwischen der Expression von GATA5 sowie eNOS und den Durchmessern der Aorta ascendens unabhängig von der vorliegenden Morphologie der Aortenklappe (UAV, BAV, TAV) beschrieben [52]. Die GATA5- und eNOS-Expression war bei Patienten mit unicuspiden und bicuspiden Aortenklappen mit dilatierter Aorta im Vergleich zu Patienten ohne Aortendilatation niedriger. Hingegen war die GATA5-Expression bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen höher, wenn die Aorta dilatiert war. In der eNOS-Expression gab es keinen Unterschied zwischen Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und dilatierten oder undilatierten Aorten [52]. Aicher et al. beschrieben eine negative Korrelation der eNOS-Protein-Expression zu den Durchmessern der Aorta ascendens bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen, wohingegen bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen keine Korrelation vorlag. Die Daten der beiden Studien legen folglich nahe, dass bei Patienten mit unicuspiden und bicuspiden Aortenklappen größere Aortendurchmesser mit einem geringeren GATA5- und eNOS-Gehalt in der Aortenwand assoziiert sind. Eine niedrigere GATA5- und eNOS-Aktivität in den dilatierten Aorten dieser Patientengruppen mögen in Zusammenhang mit deren frühzeitiger Aneurysma-Entwicklung stehen.

### **5.2.2. NOTCH1 und NOTCH3**

Welche Rolle die Familie der NOTCH-Transmembran-Rezeptoren in der Pathogenese von sporadischen congenitalen Aortenklappenanomalien und thorakalen Aortenaneurysmen spielt, ist bisher nicht ausreichend geklärt.

Ein autosomal-dominant vererbtes Vorkommen von bicuspiden Aortenklappen konnte bisher nur in zwei Familien nachgewiesen werden und zwei verschiedene Mutationen in NOTCH1 bei diesen Patienten identifiziert werden [42]. Diese beiden Mutationen stellen jedoch vermutlich isolierte Phänomene in den beschriebenen Familien dar und geben wenig Aufschluss über eine mögliche Beteiligung von NOTCH1 in der Pathogenese der sporadisch vorkommenden bicuspiden Aortenklappen, die 1 - 2 % der

Allgemeinbevölkerung betreffen [10]. Nachdem ein Zusammenhang von NOTCH1-Mutationen zur bicuspiden Aortenklappe identifiziert worden war, beschrieben weitere Autoren NOTCH1-Missense-Mutationen in etwa 4 % der Fälle von sporadischen bicuspiden Aortenklappen [80,83]. Bisher bleibt allerdings unklar, welche Bedeutung diese Mutationen in der Pathogenese der bicuspiden Aortenklappen haben, und inwiefern NOTCH1-Varianten damit die Rolle von Suszeptibilitätsfaktoren für bicuspide Aortenklappen zukommen könnte.

Dass NOTCH-Rezeptoren auch an der Entstehung von thorakalen Aortenaneurysmen beteiligt sein könnten, beschrieben Folkersen et al., die eine erhöhte Expression von NOTCH3 in dilatierten Aorten von Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen nachweisen konnten [38]. Hans et al. lieferten erstmalig eine Hypothese, die einen kausalen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Aktivität des NOTCH-Signalweges und einem vermehrten Auftreten von Aortenaneurysmen plausibel macht [50]. Sowohl bei ApoE-Knockout-Mäusen als auch bei Menschen konnten die Autoren mittels Immunhistochemie eine erhöhte Expression der intrazellulären NOTCH1-Domäne in abdominellen Aortenaneurysmen im Vergleich zu Kontrollen nachweisen. Mit Angiotensin-II behandelte ApoE-Knockout-Mäuse haben eine erhöhte Rate an abdominellen Aortenaneurysmen, die interessanterweise durch ein gleichzeitiges Vorliegen einer NOTCH1-Haploinsuffizienz reduziert wurde [50]. Diese Daten lassen darauf schließen, dass eine NOTCH1-Defizienz einen protektiven Effekt auf das Auftreten von Aortenaneurysmen hat.

Die Autoren konnten weiterhin zeigen, dass die Expression von Cytokinen und proinflammatorischen Mediatoren, sowie die Infiltration der Aorta mit Makrophagen bei NOTCH1-haploinsuffizienten Mäusen vermindert ist, was vermutlich auf eine reduzierte Makrophagen-Migration und Proliferation zurückzuführen ist [50]. Damit liegt es nahe, dass eine erhöhte NOTCH1-Aktivität einen fördernden Einfluss auf die Entzündungsprozesse ausübt, welche die Pathogenese von abdominellen Aortenaneurysmen charakterisieren [97].

Es bleibt fraglich, inwiefern NOTCH1 an der Pathogenese von thorakalen Aortenaneurysmen beteiligt ist, die im Gegensatz zu abdominellen Aortenaneurysmen weniger mit einer chronischen Entzündung assoziiert sind [1]. Ebenfalls unklar ist, ob es einen Zusammenhang zwischen den mit bicuspiden Aortenklappen assoziierten Mutationen in NOTCH1 und thorakalen Aortenaneurysmen gibt. Wäre dies der Fall, so könnte die Hypothese von Hans et al., nach der NOTCH1 durch Hochregulation von pro-inflammatorischen Mediatoren die Entstehung von Aortenaneurysmen fördert, nur dann auf Patienten mit bicuspiden Aortenklappen übertragen werden, wenn es sich bei den beschriebenen Mutationen um Gain-of-Function-Mutationen handeln würde, also solchen, welche die Aktivität eines Gens erhöhen. Hierzu liegen allerdings bisher keine experimentellen Daten vor.

Da es bisher keine Daten über den Einfluss von NOTCH-Proteinen in der Pathogenese von Aortenaneurysmen bei unicuspiden Aortenklappen gibt, wurde die Genexpression von NOTCH1 und NOTCH3 in der Aortenwand von Patienten mit unicuspiden Aortenklappen in der hier vorgelegten Studie untersucht.

Zwischen Patienten mit unicuspiden und tricuspiden Aortenklappen lagen keine signifikanten Unterschiede in der NOTCH1- und NOTCH3-Genexpression in der Aortenwand vor. Diese Daten geben damit keine Hinweise auf eine veränderte NOTCH-Expression bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen. Damit erscheinen NOTCH1 und NOTCH3 als Determinanten der frühzeitigen thorakalen Aortendilatation dieser Patienten wenig wahrscheinlich.

Vermutlich auf Grund der geringen Patientenzahl der hier vorgelegten Studie bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede ( $p = 0,09$ ) in der NOTCH3-Expression zwischen den Einzelgruppen (UAV-N, UAV-D, TAV-N, TAV-D). In der zweifaktoriellen ANOVA hatte der Faktor Aortendilatation allerdings einen mittelstarken Effekt auf die NOTCH3-Expression. Dies spricht für einen Einfluss von NOTCH3 auf die Pathogenese thorakaler Aortenaneurysmen unabhängig von der vorliegenden Morphologie der

Aortenklappe und ist damit in Einklang mit den Daten von Folkersen et al. [38]. Auch für NOTCH3 konnten pro-inflammatorische Effekte gezeigt werden [27], sodass es wahrscheinlich ist, dass Entzündungsprozesse, die durch Hochregulation von NOTCH3 gefördert werden, auch in der Pathogenese von thorakalen Aortenaneurysmen eine Rolle spielen. Wie es zu einer erhöhten NOTCH3-Expression in der dilatierten Aorta kommt und inwiefern diese vielleicht einen Sekundäreffekt darstellt, der durch allgemeine Risikofaktoren für Aneurysmen wie arterieller Hypertonie [72] beeinflusst wird, bleibt bislang unklar.

Es bestanden keine Unterschiede in der Expression von NOTCH1 in der Aortenwand zwischen Patienten mit dilatierten und nicht dilatierten Aorten. Positive Korrelationen zwischen den Durchmessern der Aorta ascendens und der NOTCH1-Expression lagen lediglich bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und Aortendilatation (TAV-D) vor, allerdings war die NOTCH1-Expression in dieser Patientengruppe geringer als in der Referenzgruppe (TAV-N). Ob dieser isolierten Beobachtung eine Bedeutung zukommt, ist unklar. Anders als für NOTCH3 gibt es auf Grund der hier vorgelegten Daten keinen Anhalt dafür, dass die lokale NOTCH1-Expression in der Aortenwand die Entwicklung von thorakalen Aortenaneurysmen begünstigt. NOTCH1 scheint vielmehr neben seiner zentralen Rolle als Regulator der kardialen Embryogenese in der Entstehung von abdominellen Aortenaneurysmen von Bedeutung zu sein.

## 5.3. Gene des TGF- $\beta$ -Signalweges

### 5.3.1. FBN1

Bicuspide Aortenklappen kommen bei Patienten mit Marfan- und Loays-Dietz-Syndrom häufiger vor als in der Normalbevölkerung [75,89,115]. Nistri et al. konnten bei Patienten mit Marfan-Syndrom in 4,7 % eine bicuspide Aortenklappe nachweisen [89]. Diese Beobachtung legt nahe, dass es einen genetisch bedingten Zusammenhang zwischen hereditären Bindegewebserkrankungen und angeborenen Aortenklappenanomalien gibt. In einer kürzlich publizierten Studie wurden FBN1-Mutationen bei zwei von acht untersuchten Patienten mit bicuspiden Aortenklappen nachgewiesen, bei denen nach den klinisch-diagnostischen Gent-Kriterien phänotypisch kein Marfan-Syndrom vorlag [98]. Auch immunhistochemische Daten zeigen, dass der Proteingehalt von Fibrillin-1 sowohl in der Aortenwand als auch in der Gefäßwand des Truncus pulmonalis von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen reduziert ist [34]. Diese Daten stellen eine fundamentale Parallele zwischen angeborenen Aortenklappenanomalien und dem Marfan-Syndrom her und machen Fibrillin-1 zu einer plausiblen Determinanten der Aortopathie bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen. Es muss in zukünftigen Studien an größeren Populationen von Patienten mit bicuspiden sowie unicuspiden Aortenklappen geklärt werden, ob die beschriebenen FBN1-Mutationen ähnlich wie Mutationen in NOTCH1 lediglich ein seltenes Phänomen darstellen, oder gar neue Therapierationale für den präventiven Ersatz der Aorta ascendens bei Patienten mit Aortenklappenanomalien liefern könnten.

Patienten mit unicuspiden Aortenklappen zeigten in der hier vorgelegten Studie keine signifikanten Unterschiede in der FBN1-Genexpression im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen. Aus der in der Real-time PCR auf mRNA-Ebene ermittelten Genexpression lässt sich allerdings nicht direkt auf den FBN1-Proteingehalt der Aorta ascendens schließen. Immunhistochemische

Daten von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen legen einen reduzierten FBN1-Proteingehalt in der Aortenwand nahe [34]. Es ist daher vorstellbar, dass posttranskriptionelle Regulationen die FBN1-Proteinmenge in der Aortenwand bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen reduzieren. Sollte der FBN1-Proteingehalt in der Aortenwand von Patienten mit unicuspiden Aortenklappen ebenfalls nicht reduziert sein, so wäre dies ein Hinweis dafür, dass es Unterschiede in der molekularen Pathogenese zwischen unicuspiden und bicuspiden Aortenklappen gibt. Die Folgerung liegt nahe, dass es sich bei der unicuspiden Aortenklappe weniger um eine Extremvariante der bicuspiden Aortenklappe als um ein eigenständiges Krankheitsbild handelt, dem andere pathogenetische Vorgänge zu Grunde liegen.

### **5.3.2. TGFBR1 und TGFBR2**

In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, dass eine erhöhte Aktivität von TGF- $\beta$  eine Rolle in der Pathogenese von syndromalen thorakalen Aortenaneurysmen einnimmt. Eine Dysregulation des TGF- $\beta$ -Signalweges konnte als zentrale Komponente in der Pathogenese des Marfan-Syndroms nachgewiesen werden [87]. Auch das Loeys-Dietz-Syndrom (meist Mutationen in TGFBR1 oder TGFBR2 [73]), sowie weitere seltene Syndrome, die zu Aortenaneurysmen prädisponieren wie das Shprintzen-Goldberg-Syndrom (Mutationen in SKI, V-SKI avian sarcoma viral oncogene homolog [28]) und das Arterielle Tortuositäts-Syndrom (Mutationen in SLC2A10, solute carrier family 2, member 10 [125]) sind ebenfalls mit Alterationen der TGF- $\beta$ -Aktivität assoziiert [28,125]. Auf welchem Weg eine erhöhte TGF- $\beta$ -Aktivität in der Aortenwand die Entwicklung von thorakalen Aortenaneurysmen begünstigt, ist bisher nicht entschlüsselt worden.

Weiterhin ist unklar, welchen Einfluss eine Änderung der Aktivität von TGF- $\beta$  auf die Aktivität seiner Rezeptoren hat und umgekehrt. Fragen werden diesbezüglich vor allem in der Pathogenese des Loeys-Dietz-Syndromes aufgeworfen, das in den meisten Fällen durch Mutationen in den TGF- $\beta$ -

Rezeptoren (TGFBR1 oder 2) verursacht wird [73]. Seltener liegen dem Syndrom Mutationen in Smad3, einem Signal-Protein der TGF- $\beta$ -Kaskade oder in TGFB2, dem Gen das für die TGF- $\beta$ 2-Isoform codiert, zu Grunde [73,119].

Die Annahme liegt nahe, dass Mutationen in den TGF- $\beta$ -Rezeptor-Genen zu einer niedrigeren Aktivität des nachgeschalteten Signalweges führen. Paradoxerweise gehen diese Mutationen allerdings mit einer Hochregulation der TGF- $\beta$ 1-Isoform in der Aortenwand von Loeys-Dietz-Patienten einher [73,119]. Dieses Phänomen wird von den Erstbeschreibern des Syndroms für die Entwicklung der Aortenaneurysmen verantwortlich gemacht. Es wird spekuliert, dass es sich bei dem hohen Gehalt an TGF- $\beta$ 1 um eine kompensatorische Hochregulation des Liganden im Falle eines mutierten TGF- $\beta$ -Rezeptor-Gens handelt, das zu einer Art Überstimulation des Signalweges führen mag [41,43].

In der hier vorgelegten Studie gab es sowohl bei Patienten mit unicuspiden als auch bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen einen Trend zu geringerer TGFBR1-Expression, wenn die Aorta dilatiert war. Der Unterschied war bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen stärker ausgeprägt als bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen. Vermutlich auf Grund der geringen Patientenzahlen waren die Unterschiede nicht statistisch signifikant. Die Expression von TGFBR2 war bei Patienten mit dilatierter und nicht dilatierter Aorta vergleichbar hoch. In der zweifaktoriellen ANOVA hatte der Faktor Dilatation einen starken Effekt auf die TGFBR1-Expression und nur einen geringen Effekt auf die TGFBR2-Expression.

Die Ergebnisse für TGFBR1 stehen im Einklang mit der Hypothese, dass eine verminderte Expression der TGF- $\beta$ -Rezeptoren Ausdruck einer erhöhten Expression von TGF- $\beta$  und damit einer Prädisposition für Aortendilatationen ist. Die TGF- $\beta$ -Rezeptor 2-Isoform scheint in der Pathogenese von nicht-syndromalen thorakalen Aortenaneurysmen weniger von Bedeutung zu sein.

Die Genexpression von TGFBR1 war bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen in der hier vorgelegten Studie signifikant höher als bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen. Der Faktor Aortenklappen-Morphologie hatte in der zweifaktoriellen ANOVA einen starken Effekt auf die TGFBR1-Expression und einen mittelstarken Effekt auf die TGFBR2-Expression.

In Embryonen von *Xenopus laevis* (afrikanischer Krallenfrosch) wurde nachgewiesen, dass GATA5 den transkriptionellen Repressor TGIF2 induziert [116]. Dieser Zusammenhang ist allerdings bei Menschen noch nicht untersucht worden. TGIF2 vermag via Interaktion mit den SMAD-Proteinen die Aktivität des TGF- $\beta$ -Signalweges zu hemmen (Abbildung 31) [81]. Ließe sich die Hypothese einer gegensätzlichen Aktivität von TGF- $\beta$  und seinen Rezeptoren auch hier anwenden, so wäre es denkbar, dass die erhöhte GATA5-Aktivität in der Aortenwand von Patienten mit unicuspiden Aortenklappen zu einer Hemmung des TGF- $\beta$ -Signalweges und damit zu einer kompensatorischen Hochregulation von TGFBR1 führt.

Forte et al. beschrieben bei Patienten mit stenotischen bicuspiden Aortenklappen und einem Aortendurchmesser von  $\leq 4$  cm eine niedrigere TGFBR1-Expression als bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen, wohingegen die Expression von TGF- $\beta$  erhöht war [39]. Die Autoren machen allerdings nur wenige Angaben zu den Diametern der Aorta ascendens bei den untersuchten Patientengruppen und definieren keinerlei Grenzwerte, ab denen die Aorta als dilatiert betrachtet wurde. Diese Daten stützen dennoch die Hypothese, dass sich die Expression von TGF- $\beta$  und seinen Rezeptoren gegensätzlich verhält. Es scheint plausibel, dass dieser Zusammenhang bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit unicuspiden Aortenklappen genau umgekehrt vorliegt. Eine mögliche Erklärung für die erhöhte TGF- $\beta$ -Expression in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen könnte vielleicht in Zusammenhang mit der im Vergleich zu Patienten mit unicuspiden Aortenklappen niedrigeren GATA5- und damit vermutlich auch TGIF2-Expression stehen [52].

Damit wird die Hypothese untermauert, dass es Unterschiede in der Pathogenese der Aortenaneurysmen zwischen Patienten mit unicuspiden und bicuspiden Aortenklappen gibt. Es muss in zukünftigen Studien an Patienten mit unicuspiden Aortenklappen geklärt werden, ob bei ihnen die erhöhte TGFBR1-Expression wirklich mit einer reduzierten Expression von TGF- $\beta$  einher geht.

Patienten, deren tubulärer Aortendurchmesser größer war als ihr Sinus-Durchmesser (D1) hatten in der hier vorgelegten Studie eine signifikant höhere TGFBR1-Expression als Patienten mit Dilatation vorwiegend im Sinus Valsalva (D2).

Es ist bekannt, dass die beiden häufigsten Fusionstypen der bicuspiden Aortenklappe mit unterschiedlichen Phänotypen von Aortenaneurysmen assoziiert sind. Bei einer Fusion der rechts- und linkskoronaren Tasche wird vor allem eine Dilatation der Aortenwurzel beobachtet, während Patienten mit rechts-akoronarer Fusion typischerweise eine Dilatation der tubulären Aorta ascendens aufweisen [23,110]. Beobachtungen aus Tiermodellen weisen darauf hin, dass die Fusionstypen der bicuspiden Aortenklappe eigene biologische Entitäten mit unterschiedlicher embryologischer Herkunft darstellen [36]. Daher wird spekuliert, dass die beiden Aneurysma-Phänotypen auf einer genetischen Heterogenität der Fusionstypen der bicuspiden Aortenklappe beruhen [23].

Die hier vorgelegten Daten geben erstmals einen Hinweis darauf, dass es auch bei Patienten mit unicuspiden und tricuspiden Aortenklappen unterschiedliche molekular charakterisierte Phänotypen von Aortenaneurysmen geben mag. Zurzeit fehlen jedoch noch Daten aus morphologischen Studien an Aortenaneurysmen bei unicuspiden und tricuspiden Aortenklappen, um diese Hypothese zu überprüfen.

## 5.4. Gene in Zusammenhang mit familiären oder sporadischen Aortenaneurysmen

### 5.4.1. ACTA2

Als Ursache für familiäre nicht-syndromale thorakale Aortenaneurysmen (FTAAD, familial thoracic aortic aneurysms and dissections) konnten Mutationen in Genen identifiziert werden, die für Proteine der Myofibrillen der glatten Muskelzellen codieren. Am häufigsten handelt es sich hierbei um Mutationen in ACTA2, dem Gen, das für das  $\alpha$ -Aktin der glatten Gefäßmuskulatur codiert [103]. Interessanterweise wurde bei einem Patienten mit einer ACTA2-Mutation eine erhöhte Aktivität von TGF- $\beta$  in der Aortenwand beschrieben [103], was die Hypothese stärkt, dass eine Überexpression von TGF- $\beta$  die Entstehung thorakaler Aortenaneurysmen fördert. Von einigen Autoren wird angenommen, dass eine intakte Architektur der intrazellulären Myofibrillen für die korrekte Assoziation von extrazellulärem TGF- $\beta$  mit Fibrillin-1-Mikrofibrillen erforderlich ist [103]. Mutationen in ACTA2 könnten daher zu einer inkorrekten Struktur der intrazellulären Myofibrillen und damit zu mehr ungebundenem TGF- $\beta$  führen [103].

Aus einem Mausmodell ist bekannt, dass ein Knockout des TGF- $\beta$ -Signalproteins SMAD4 zu einem Verlust von Aktinfilamenten in den glatten Gefäßmuskelzellen führt und die Expression von  $\alpha$ -Aktin reduziert [78]. Auch beim Menschen wird die Transkription des  $\alpha$ -Aktin-Gens durch den TGF- $\beta$ -Signalweg reguliert [29]. Eine Störung der gegenseitigen Regulation von  $\alpha$ -Aktin und TGF- $\beta$  mag daher ein wichtiger Faktor in der Pathogenese von thorakalen Aortenaneurysmen sein.

Patienten mit unicuspiden Aortenklappen hatten in der hier vorgelegten Studie eine signifikant höhere ACTA2-Genexpression in der Konvexität ihrer Aorta als Patienten mit tricuspiden Aortenklappen, unabhängig von der Weite der Aorta ascendens. Eine lokal unterschiedliche Genexpression in der Gefäßwand der

Aorta ascendens wird von einigen Autoren auf die höheren Scherkräfte an der Konvexität der Aorta ascendens bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen zurückgeführt [84]. Bei Patienten mit stenotischen bicuspiden Aortenklappen und einem Aortendurchmesser von  $\leq 4$  cm konnten Forte et al. ebenfalls eine erhöhte Genexpression von ACTA2 in der Konvexität der Aorta ascendens im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen nachweisen. In der Konkavität der Aorta war die ACTA2-Expression hingegen zwischen beiden Gruppen vergleichbar [39]. Ein helicales Flussprofil in der Aorta ascendens wurde kürzlich in einer MRT-Studie auch bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen gezeigt [31]. Es erscheint daher plausibel, dass der in Richtung der Konvexität der Aorta gerichtete systolische Jet bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen lokale Änderungen in der Genexpression bestimmter Strukturproteine wie  $\alpha$ -Aktin hervorrufen könnte. Gegen die Hypothese, dass eine erhöhte Expression von ACTA2 durch vermehrte Scherkräfte bedingt ist, sprechen allerdings Daten von murinen glatten Gefäßmuskelzellen, die unter erhöhten Scherkräften kultiviert wurden. Diese zeigten eine Reduktion der Genexpression von ACTA2 [122].

Ein weiteres Argument, das für eine genetisch determinierte Ursache der erhöhten ACTA2-Expression in der Aortenwand bei Patienten mit Aortenklappenanomalien spricht, ist der Nachweis eines erhöhten Gehaltes an  $\alpha$ -Aktin in der Aortenwand bei Patienten mit einer MYH11-Mutation [103]. Patienten mit Mutationen in MYH11 (Gen für die schwere Kette des Myosins der glatten Muskulatur) leiden ebenfalls an familiären thorakalen Aortenaneurysmen, und für diese Patienten ist bisher keine Assoziation zu Aortenklappenanomalien und damit Änderungen in der Hämodynamik des aortalen Blutflusses beschrieben worden [133].

Obwohl es eine Parallele in der erhöhten ACTA2-Expression in der Aortenwand zwischen Patienten mit bicuspiden und unicuspiden Aortenklappen zu geben scheint, bleibt deren Bedeutung für die frühzeitige Entwicklung von Aortenaneurysmen bei diesen Patienten bisher unklar. Zu klären bleibt auch, inwiefern die unterschiedliche ACTA2-Expression in der Aortenwand von

Patienten mit Aortenklappenanomalien durch TGF- $\beta$  sowie hämodynamische Faktoren beeinflusst wird.

#### **5.4.2. COL3A1**

Die Struktur und der Gehalt verschiedener Kollagen-Typen in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen ist bereits untersucht worden. Der absolute Kollagen-Proteingehalt in der Aortenwand scheint bei Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen vergleichbar hoch zu sein, allerdings wurde bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen ein reduzierter Gehalt an reifem Kollagen nachgewiesen [121]. Passend dazu war die Gen- und Proteinexpression der Lysylhydroxylase (PLOD1) in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta niedriger als bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen [121]. Die Hydroxylierung von Lysin-Resten durch die Lysylhydroxylase ist ein wesentlicher Bestandteil der posttranslationalen Modifikation von Kollagenen und essentiell für die Quervernetzung der Kollagenfibrillen [121]. Diese Daten weisen auf eine Störung in der posttranslationalen Kollagen-Modifikation bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen hin, die zu einer fehlerhaften Anordnung der Kollagenfibrillen und damit einer verminderten Stabilität der dilatierten Aorta dieser Patienten führen mag.

Unabhängig von der Dilatation der Aorta lagen keine signifikanten Unterschiede in der COL3A1-Expression zwischen Patienten mit unicuspiden und tricuspiden Aortenklappen vor. Unter den Patienten ohne Aortendilatation bestand ein Trend zu höherer COL3A1-Expression bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen; der Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant. Bei Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen ohne Aortendilatation konnten Wågsäter et al. ebenfalls eine vergleichbar hohe Genexpression in den Gruppen nachweisen [121].

Bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen gab es in der hier vorliegenden Studie einen Trend zu höherer COL3A1-Expression, wenn eine Dilatation der Aorta ascendens vorlag. Wågsäter et al. beschreiben eine signifikant erhöhte COL3A1-Expression bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und dilatierter Aorta [121]. Die erhöhte Expression von COL3A1 mag auf einen erhöhten Kollagen-Umsatz in der dilatierten Aorta ascendens von Patienten mit tricuspiden Aortenklappen zurückzuführen sein [121]. Dieser Befund mag Ausdruck einer Degeneration der Aortenwand dieser Patienten sein, die mit fibrotischen Veränderungen einher geht [121].

Die beschriebenen Unterschiede in der COL3A1-Expression zwischen den einzelnen Patientengruppen mögen zum einen durch mechanische Faktoren bedingt sein. An Fibroblasten-Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von COL3A1 durch mechanische Dehnung, der die Zellen ausgesetzt wurden, reduziert wurde [16]. Zum anderen mag die COL3A1-Expression in der Aortenwand von der Aktivität des TGF- $\beta$ -Signalweges beeinflusst werden, da COL3A1 eines der TGF- $\beta$ -Zielgene darstellt [58,120] (Abbildung 31).

Zukünftige Studien müssen untersuchen, ob es Unterschiede im COL3A1-Proteingehalt in der Aortenwand von Patienten mit unicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit bicuspiden Aortenklappen gibt, und ob eine Störung der posttranslationalen Kollagen-Modifikation einen Einfluss auf die Pathogenese von Aortenaneurysmen bei diesen Patienten hat.

### **5.4.3. MMP19**

Seit längerem ist bekannt, dass ein proteolytischer Abbau der extrazellulären Matrix der Aortenwand durch Enzyme aus der Familie der Matrixmetalloproteinasen (MMP) an der Pathogenese von abdominellen Aortenaneurysmen beteiligt ist [21,40].

Matrixmetalloproteinasen sind für molekularbiologische Studien zur Entwicklung präventiver Medikationen besonders interessant, da sowohl für Doxycyclin als auch für Statine gezeigt werden konnte, dass sie die Aktivität dieser Enzyme hemmen [77,126]. Obwohl die zur Zeit vorliegenden klinischen Studien einen therapeutischen Benefit für beide Medikamente bei Patienten mit Aortenaneurysmen zeigen [56,86], mangelt es bislang an Evidenz aus größeren randomisierten Studien, um eine allgemeine Therapieempfehlung mit diesen Medikamenten zu rechtfertigen.

Es konnte gezeigt werden, dass Matrixmetalloproteinasen auch in thorakalen Aortenaneurysmen sowohl bei Patienten mit Marfan-Syndrom [17,114] als auch bei Patienten mit bicuspiden und normalen tricuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit normal weiter Aorta vermehrt exprimiert werden [8,34,71]. Dabei scheint ein erhöhter Gehalt an MMP2 vor allem in Aneurysmen bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen vorzukommen [8,34,71]. Jackson et al. untersuchten die Expression aller 23 bekannten MMPs und konnten eine erhöhte Expression von MMP14 und 19 in dilatierten Aorten sowohl bei Patienten mit bicuspiden als auch bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen nachweisen. Die Expression von MMP19 korrelierte bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen mit dem maximalen Aortendurchmesser [55].

Die Expression von MMP19 war in der hier vorgelegten Studie bei Patienten mit unicuspiden und tricuspiden Aortenklappen vergleichbar hoch. Es lagen keine signifikanten Unterschiede in der MMP19-Expression zwischen Patienten mit dilatierten Aorten im Vergleich zu Patienten ohne Aortendilatation vor. Damit können die hier vorliegenden Ergebnisse die Daten von Jackson et al., die eine erhöhte Genexpression von MMP19 in dilatierten Aorten von Patienten mit tricuspiden Aortenklappen nachweisen, nicht bestätigen [55].

Korrelationen zwischen den Diametern der Aorta ascendens und der Genexpression von MMP19 lagen weder bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen noch bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen vor. Auch in diesem Punkt werden die Ergebnisse von Jackson et al. nicht bestätigt [55].

Die Daten von Patienten mit unicuspiden und tricuspiden Aortenklappen geben damit keinen Hinweis darauf, dass MMP19 die Entwicklung von Aortenaneurysmen bei diesen Patienten beeinflusst. Es sind weitere Studien erforderlich, um den Einfluss von MMP19 auf die Aortendilatation bei Vorliegen einer tricuspiden Aortenklappe eindeutig zu klären und den Stellenwert anderer Matrixmetalloproteinasen in der Pathogenese der Aortenaneurysmen bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen zu bestimmen.

## 5.5. Fazit

Die hier vorgelegte Studie untersuchte erstmalig die Genexpression in der Aortenwand von Patienten mit unicuspiden Aortenklappen. Die Ergebnisse liefern mehrere eindeutige Hinweise darauf, dass das frühzeitige Auftreten von Aortenaneurysmen bei diesen Patienten nicht ausschließlich durch hämodynamische Faktoren erklärt werden kann.

Der Transkriptionsfaktor GATA5, dessen Expression signifikant mit der Expression von eNOS korreliert, scheint eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Aortenaneurysmen bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen einzunehmen. Die Expression von GATA5 und eNOS ist in der Aortenwand von Patienten mit unicuspiden Aortenklappen signifikant höher als bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und zeigt eine negative Korrelation zu den Durchmessern der Aorta ascendens.

Es liegt nahe, dass eine Dysregulation des TGF- $\beta$ -Signalweges ähnlich wie bei syndromalen thorakalen Aortenaneurysmen auch bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen vorliegt. Die Genexpression von TGFBR1 ist bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen signifikant höher als bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen. Die erhöhte Aktivität von GATA5 in der Aorta von Patienten mit unicuspiden Aortenklappen mag durch Induktion des TGF- $\beta$ -Repressors TGIF2 hiermit in Zusammenhang stehen. Patienten mit einer Dilatation der tubulären Aorta ascendens haben eine höhere TGFBR1-Expression als Patienten mit einer Dilatation der Aortenwurzel, was auf unterschiedliche Phänotypen von Aortenaneurysmen auch bei Patienten mit unicuspiden und tricuspiden Aortenklappen hinweist.

Patienten mit unicuspiden Aortenklappen zeigen eine signifikant höhere ACTA2-Expression in ihrer Aorta als Patienten mit tricuspiden Aortenklappen. Es bleibt bislang unklar, ob hierfür eine Dysregulation des TGF- $\beta$ -Signalweges oder lokal erhöhte Scherkräfte an der Konvexität der Aorta ascendens ursächlich sind.

Auf Grund der vorliegenden Daten ist davon auszugehen, dass auch bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen, wie bereits bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen beschrieben wurde, intrinsische Veränderungen der Proteine der Aortenwand zur Entwicklung von Aortenaneurysmen und Dissektionen prädisponieren. Ferner liefert die vorliegende Studie Anhaltspunkte dafür, dass die beiden häufigsten angeborenen Anomalien der Aortenklappe nicht nur klinisch, sondern auch pathogenetisch unterschiedliche biologische Entitäten mit jeweils eigenen Genexpressionsmustern darstellen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Absi TS, Sundt TM, Tung WS, Moon M, Lee JK, Damiano RR, Thompson RW. Altered patterns of gene expression distinguishing ascending aortic aneurysms from abdominal aortic aneurysms: complementary DNA expression profiling in the molecular characterization of aortic disease. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;126:344–357.
2. Aburawi EH, O'Sullivan J. Relation of aortic root dilatation and age in Marfan's syndrome. *Eur Heart J.* 2007;28:376–379.
3. Aicher D, Urbich C, Zeiher A, Dimmeler S, Schäfers H-J. Endothelial nitric oxide synthase in bicuspid aortic valve disease. *Ann Thorac Surg.* 2007;83:1290–1294.
4. Aicher D, Bewarder M, Kindermann M, Abdul-Khaliq H, Schäfers H-J. Aortic valve function after bicuspidization of the unicuspid aortic valve. *Ann Thorac Surg.* 2013;95:1545–1550.
5. Arrington CB, Sower CT, Chuckwuk N, Stevens J, Leppert MF, Yetman AT, Bowles NE. Absence of TGFBR1 and TGFBR2 mutations in patients with bicuspid aortic valve and aortic dilation. *Am J Cardiol.* 2008;102:629–631.
6. Ayad RF, Grayburn PA, Ko JM, Filardo G, Roberts WC. Accuracy of two-dimensional echocardiography in determining aortic valve structure in patients >50 years of age having aortic valve replacement for aortic stenosis. *Am J Cardiol.* 2011;108:1589–1599.
7. Bauer M, Siniawski H, Pasic M, Schaumann B, Hetzer R. Different hemodynamic stress of the ascending aorta wall in patients with bicuspid and tricuspid aortic valve. *J Card Surg.* 2006;21:218–220.
8. Boyum J, Fellingner EK, Schmoker JD, Trombley L, McPartland K, Ittleman FP, Howard AB. Matrix metalloproteinase activity in thoracic aortic aneurysms associated with bicuspid and tricuspid aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;127:686–691.
9. Bortz, J, Schuster, C (2010) Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler. 7., vollständig überarbeitete und aktualisierte Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
10. Braverman AC, Güven H, Beardslee MA, Makan M, Kates AM, Moon MR. The bicuspid aortic valve. *Curr Probl Cardiol.* 2005;30:470–522.
11. Butany J, Vaideeswar P, Dixit V, Lad V, Vegas A, David TE. Ascending aortic aneurysms in unicommissural aortic valve disease. *Cardiovasc*

Pathol. 2009;18:11–18.

12. Castellano JM, Kovacic JC, Sanz J, Fuster V. Are we ignoring the dilated thoracic aorta? *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1254:164–174.
13. Cecconi M, Nistri S, Quarti A, Manfrin M, Colonna PL, Molini E, Perna GP. Aortic dilatation in patients with bicuspid aortic valve. *J Cardiovasc Med.* 2005;7:11–20.
14. Cecconi M, Manfrin M, Moraca A, Zanolli R, Colonna PL, Bettuzzi MG, Moretti S, Gabrielli D, Perna GP. Aortic dimensions in patients with bicuspid aortic valve without significant valve dysfunction. *Am J Cardiol.* 2005;95:292–294.
15. Chaudhry SS, Cain SA, Morgan A, Dallas SL, Shuttleworth CA, Kielty CM. Fibrillin-1 regulates the bioavailability of TGFbeta1. *J Cell Biol.* 2007;176:355–367.
16. Chen YJ, Jeng JH, Chang HH, Huang MY, Tsai FF, Yao CC. Differential regulation of collagen, lysyl oxidase and MMP-2 in human periodontal ligament cells by low- and high-level mechanical stretching. *J Periodont Res.* 2013;48:466–474.
17. Chung AW, Au Yeung K, Sandor GG, Judge DP, Dietz HC, van Breemen C. Loss of elastic fiber integrity and reduction of vascular smooth muscle contraction resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrome. *Circ Res.* 2007;101:512–522.
18. Clouse WD, Hallett JW, Schaff HV, Gayari MM, Ilstrup DM, Melton LJ. Improved prognosis of thoracic aortic aneurysms: a population-based study. *JAMA.* 1998;280:1926–1929.
19. Cohn RD, van Erp C, Habashi JP, Soleimani AA, Klein EC, Lisi MT, Gamradt M, ap Rhys CM, Holm TM, Loeys BL, Ramirez F, Judge DP, Ward CW, Dietz HC. Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. *Nat Med.* 2007;13:204–210.
20. Davies RR, Goldstein LJ, Coady MA, Tittle SL, Rizzo JA, Kopf GS, Elefteriades JA. Yearly rupture or dissection rates for thoracic aortic aneurysms: simple prediction based on size. *Ann Thorac Surg.* 2002;73:17–27
21. Davis V, Persidskaia R, Baca-Regen L, Itoh Y, Nagase H, Persidsky Y, Ghorpade A, Baxter BT. Matrix metalloproteinase-2 production and its binding to the matrix are increased in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1625–1633.

22. Della Corte A, Quarto C, Bancone C, Castaldo C, Di Meglio F, Nurzynska D, De Santo LS, De Feo M, Scardone M, Montagnani S, Cotrufo M. Spatiotemporal patterns of smooth muscle cell changes in ascending aortic dilatation with bicuspid and tricuspid aortic valve stenosis: focus on cell-matrix signaling. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008;135:8–18
23. Della Corte A, Bancone C, Dialetto G, Covino FE, Manduca S, D'Oria V, Petrone G, De Feo M, Nappi G. Towards an individualized approach to bicuspid aortopathy: different valve types have unique determinants of aortic dilatation. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2014;45:118–124.
24. De Paepe A, Malfait F. The Ehlers-Danlos syndrome, a disorder with many faces. *Clin Genet.* 2012;82:1–11.
25. de Sa M, Moshkovitz Y, Butany J, David TE. Histologic abnormalities of the ascending aorta and pulmonary trunk in patients with bicuspid aortic valve disease: clinical relevance to the Ross procedure. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;118:588–594.
26. Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE, Maslen CL, Sakai LY, Corson GM, Puffenberger EG, Hamosh A, Nanthakumar EJ, Curristin SM. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature.* 1991;352:337–339.
27. Djurdjaj S, Chatziantoniou C, Raffetseder U, Guerrot D, Dussaule J-C, Boor P, Kerroch M, Hanssen L, Brandt S, Dittrich A, Ostendorf T, Floege J, Zhu C, Lindenmeyer M, Cohen CD, Mertens PR. Notch-3 receptor activation drives inflammation and fibrosis following tubulointerstitial kidney injury. *J Pathol.* 2012;228:286–299.
28. Doyle AJ, Doyle JJ, Bessling SL, Maragh S, Lindsay ME, Schepers D, Gillis E, Mortier G, Homfray T, Sauls K, Norris RA, Huso ND, Leahy D, Mohr DW, Caulfield MJ, Scott AF, Destrée A, Hennekam RC, Arn PH, Curry CJ, Van Laer L, McCallion AS, Loeys BL, Dietz HC. Mutations in the TGF- $\beta$  repressor SKI cause Shprintzen-Goldberg syndrome with aortic aneurysm. *Nat Genet.* 2012;44:1249–1254.
29. Driesen RB, Nagaraju CK, Abi-Char J, Coenen T, Lijnen PJ, Fagard RH, Sipido KR, Petrov VV. Reversible and irreversible differentiation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 2013;
30. Elefteriades JA. Thoracic aortic aneurysm: reading the enemy's playbook. *Yale J Biol Med.* 2008;81:175–186.
31. Entezari P, Schnell S, Mahadevia R, Malaisrie C, McCarthy P, Mendelson M, Collins J, Carr JC, Markl M, Barker AJ. From unicuspid to quadricuspid: Influence of aortic valve morphology on aortic three-dimensional hemodynamics. *J Magn Reson Imaging.* 2013; doi:10.1002/jmri.24498

32. Falcone MW, Roberts WC, Morrow AG, Perloff JK. Congenital aortic stenosis resulting from a unicommissural valve. Clinical and anatomic features in twenty-one adult patients. *Circulation* 1971;44:272–280.
33. Fealey ME, Edwards WD, Miller DV, Maleszewski JJ. Unicommissural aortic valves: gross, histological, and immunohistochemical analysis of 52 cases (1978-2008). *Cardiovasc Pathol*. 2012;21:324–333.
34. Fedak PW, de Sa MP, Verma S, Nili N, Kazemian P, Butany J, Strauss BH, Weisel RD, David TE. Vascular matrix remodeling in patients with bicuspid aortic valve malformations: implications for aortic dilatation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;126:797–806.
35. Ferencik M, Pape LA. Changes in size of ascending aorta and aortic valve function with time in patients with congenitally bicuspid aortic valves. *Am J Cardiol*. 2003;92:43–46.
36. Fernández B, Durán AC, Fernández-Gallego T, Fernández MC, Such M, Arqué JM, Sans-Coma V. Bicuspid aortic valves with different spatial orientations of the leaflets are distinct etiological entities. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:2312–2318.
37. Foffa I, Ait Ali L, Panesi P, Mariani M, Festa P, Botto N, Vecoli C, Andreassi MG. Sequencing of NOTCH1, GATA5, TGFBR1 and TGFBR2 genes in familial cases of bicuspid aortic valve. *BMC Med Genet*. 2013;14:44.
38. Folkersen L, Wågsäter D, Paloschi V, Jackson V, Petrini J, Kurtovic S, Maleki S, Eriksson MJ, 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*. 2011;17:1365–1373.
39. Forte A, Corte Della A, Grossi M, Bancone C, Provenzano R, Finicelli M, De Feo M, De Santo LS, Nappi G, Cotrufo M, Galderisi U, Cipollaro M. Early cell changes and TGF $\beta$  pathway alterations in the aortopathy associated with bicuspid aortic valve stenosis. *Clin Sci*. 2013;124:97–108.
40. Freestone T, Turner RJ, Coady A, Higman DJ, Greenhalgh RM, Powell JT. Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:1145–1151.
41. Gallo EM, Loch DC, Habashi JP, Calderon JF, Chen Y, Bedja D, van Erp C, Gerber EE, Parker SJ, Sauls K, Judge DP, Cooke SK, Lindsay ME, Rouf R, Myers L, ap Rhys CM, Kent KC, Norris RA, Huso DL, Dietz HC. Angiotensin II-dependent TGF- $\beta$  signaling contributes to Loeys-Dietz syndrome vascular pathogenesis. *J Clin Invest*. 2014;124:448–460.

42. Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, Grossfeld PD, Srivastava D. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature*. 2005;437:270–274.
43. Gillis E, Van Laer L, Loeys BL. Genetics of thoracic aortic aneurysm: at the crossroad of transforming growth factor- $\beta$  signaling and vascular smooth muscle cell contractility. *Circ Res*. 2013;113:327–340.
44. Godon P, Bonnefoy E, Desjeux G, Touboul P. Early risk factors in acute type A aortic dissection: is there a predictor of preoperative mortality? *J Cardiovasc Surg*. 2001;42:647–650.
45. Gomez D, Haj Zen AI, Borges LF, Philippe M, Gutierrez PS, Jondeau G, Michel JB, Vranckx R. Syndromic and non-syndromic aneurysms of the human ascending aorta share activation of the Smad2 pathway. *J Pathol*. 2009;218:131–142.
46. Groenink M, Hartog den AW, Franken R, Radonic T, de Waard V, Timmermans J, Scholte AJ, van den Berg MP, Spijkerboer AM, Marquering HA, Zwinderman AH, Mulder BJM. Losartan reduces aortic dilatation rate in adults with Marfan syndrome: a randomized controlled trial. *Eur Heart J*. 2013;34:3491–3500.
47. Guo D-C, Pannu H, Tran-Fadulu V, Papke CL, Yu RK, Avidan N, Bourgeois S, Estrera AL, Safi HJ, Sparks E, Amor D, Ades L, McConnell V, Willoughby CE, Abuelo D, Willing M, Lewis RA, Kim DH, Scherer S, Tung PP, Ahn C, Buja LM, Raman CS, Shete SS, Milewicz DM. Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections. *Nat Genet*. 2007;39:1488–1493.
48. Habashi JP, Judge DP, Holm TM, Cohn RD, Loeys BL, Cooper TK, Myers L, Klein EC, Liu G, Calvi C, Podowski M, Neptune ER, Halushka MK, Bedja D, Gabrielson K, Rifkin DB, Carta L, Ramirez F, Huso DL, Dietz HC. Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science*. 2006;312:117–121.
49. Hagan PG, Nienaber CA, Isselbacher EM, Bruckman D, Karavite DJ, Russman PL, Evangelista A, Fattori R, Suzuki T, Oh JK, Moore AG, Malouf JF, Pape LA, Gaca C, Sechtem U, Lenferink S, Deutsch HJ, Diedrichs H, Marcos y Robles J, Llovet A, Gilon D, Das SK, Armstrong WF, Deeb GM, Eagle KA. The International Registry of Acute Aortic Dissection (IRAD): new insights into an old disease. *JAMA*. 2000;283:897–903.
50. Hans CP, Koenig SN, Huang N, Cheng J, Beceiro S, Guggilam A, Kuivaniemi H, Partida-Sánchez S, Garg V. Inhibition of Notch1 signaling reduces abdominal aortic aneurysm in mice by attenuating macrophage-mediated inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:3012–3023.

51. Henn D, Bandner-Risch D, Perttunen H, Schmied W, Porras C, Ceballos F, Rodriguez-Losada N, Schäfers H-J. Identification of reference genes for quantitative RT-PCR in ascending aortic aneurysms. *PLoS ONE*. 2013;8:e54132.
52. Henn D, Perttunen H, Gauer S, Schmied W, Porras C, Such M, Schäfers H-J. GATA5 and Endothelial nitric oxide synthase expression in the ascending aorta is related to aortic size and valve morphology. *Ann Thorac Surg*. 2014;97:2019-2026.
53. Hope MD, Hope TA, Meadows AK, Ordovas KG, Urbania TH, Alley MT, Higgins CB. Bicuspid aortic valve: four-dimensional MR evaluation of ascending aortic systolic flow patterns. *Radiology*. 2010;255:53–61.
54. Isselbacher EM. Thoracic and abdominal aortic aneurysms. *Circulation*. 2005;111:816–828.
55. Jackson V, Olsson T, Kurtovic S, Folkersen L, Paloschi V, Wågsäter D, Franco-Cereceda A, Eriksson P. Matrix metalloproteinase 14 and 19 expression is associated with thoracic aortic aneurysms. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2012;144:459–466.
56. Jovin IS, Duggal M, Ebisu K, Paek H, Oprea AD, Tranquilli M, Rizzo J, Memet R, Feldman M, Dziura J, Brandt CA, Elefteriades JA. Comparison of the effect on long-term outcomes in patients with thoracic aortic aneurysms of taking versus not taking a statin drug. *Am J Cardiol*. 2012;109:1050–1054.
57. Kathiriya IS, King IN, Murakami M, Nakagawa M, Astle JM, Gardner KA, Gerard RD, Olson EN, Srivastava D, Nakagawa O. Hairy-related transcription factors inhibit GATA-dependent cardiac gene expression through a signal-responsive mechanism. *J Biol Chem*. 2004;279:54937–54943.
58. Katzel EB, Wolenski M, Loiselle AE, Basile P, Flick LM, Langstein HN, Hilton MJ, Awad HA, Hammert WC, O'Keefe RJ. Impact of Smad3 loss of function on scarring and adhesion formation during tendon healing. *J Orthop Res*. 2011;29:684–693.
59. Kawahito K, Adachi H, Yamaguchi A, Ino T. Preoperative risk factors for hospital mortality in acute type A aortic dissection. *Ann Thorac Surg*. 2001;71:1239–1243.
60. Kim E-S, Kim M-S, Moon A. TGF-beta-induced upregulation of MMP-2 and MMP-9 depends on p38 MAPK, but not ERK signaling in MCF10A human breast epithelial cells. *Int J Oncol*. 2004;25:1375–1382.
61. Kodo K, Nishizawa T, Furutani M, Arai S, Yamamura E, Joo K, Takahashi T, Matsuoka R, Yamagishi H. GATA6 mutations cause human cardiac

- outflow tract defects by disrupting semaphorin-plexin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:13933–13938.
62. Kubiczкова L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. TGF- $\beta$  - an excellent servant but a bad master. *J Transl Med*. 2012;10:183.
  63. Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, Scherrer-Crosbie M, Aretz TH, Hajjar R, Picard MH, Huang PL. Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation*. 2001;104:448–454.
  64. Kurpinski K, Lam H, Chu J, Wang A, Kim A, Tsay E, Agrawal S, Schaffer DV, Li S. Transforming growth factor-beta and notch signaling mediate stem cell differentiation into smooth muscle cells. *Stem Cells*. 2010;28:734–742.
  65. Kuzmik GA, Sang AX, Elefteriades JA. Natural history of thoracic aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 2012;56:565–571.
  66. Laforest B, Andelfinger G, Nemer M. Loss of Gata5 in mice leads to bicuspid aortic valve. *J Clin Invest*. 2011;121:2876–2887.
  67. Laforest B, Nemer M. GATA5 interacts with GATA4 and GATA6 in outflow tract development. *Developmental Biology*. 2011;358:368–378.
  68. Larson EW, Edwards WD. Risk factors for aortic dissection: a necropsy study of 161 cases. *Am J Cardiol*. 1984;53:849–855.
  69. Lavall D, Schäfers H-J, Böhm M, Laufs U. Aneurysms of the ascending aorta. *Dtsch Arztebl Int*. 2012;109:227–233.
  70. Lee TC, Zhao YD, Courtman DW, Stewart DJ. Abnormal aortic valve development in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2000;101:2345–2348.
  71. LeMaire SA, Wang X, Wilks JA, Carter SA, Wen S, Won T, Leonardelli D, Anand G, Conklin LD, Wang XL, Thompson RW, Coselli JS. Matrix metalloproteinases in ascending aortic aneurysms: bicuspid versus trileaflet aortic valves. *J Surg Res*. 2005;123:40–48.
  72. LeMaire SA, Russell L. Epidemiology of thoracic aortic dissection. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8:103–113.
  73. Lindsay ME, Schepers D, Bolar NA, Doyle JJ, Gallo E, Fert-Bober J, Kempers MJE, Fishman EK, Chen Y, Myers L, Bjeda D, Oswald G, Elias AF, Levy HP, Anderlid B-M, Yang MH, Bongers EMHF, Timmermans J, Braverman AC, Canham N, Mortier GR, Brunner HG, Byers PH, Van Eyk J, Van Laer L, Dietz HC, Loeys BL. Loss-of-function mutations in TGFB2 cause a syndromic presentation of thoracic aortic aneurysm. *Nat Genet*.

2012;44:922–927.

74. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25:402–408.
75. Loeys BL, Chen J, Neptune ER, Judge DP, Podowski M, Holm T, Meyers J, Leitch CC, Katsanis N, Sharifi N, Xu FL, Myers LA, Spevak PJ, Cameron DE, De Backer J, Hellemans J, Chen Y, Davis EC, Webb CL, Kress W, Coucke P, Rifkin DB, De Paepe AM, Dietz HC. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet*. 2005;37:275–281.
76. Loeys BL, Schwarze U, Holm T, Callewaert BL, Thomas GH, Pannu H, De Backer JF, Oswald GL, Symoens S, Manouvrier S, Roberts AE, Faravelli F, Greco MA, Pyeritz RE, Milewicz DM, Coucke PJ, Cameron DE, Braverman AC, Byers PH, De Paepe AM, Dietz HC. Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. *N Engl J Med*. 2006;355:788–798.
77. Luan Z, Chase AJ, Newby AC. Statins inhibit secretion of metalloproteinases-1, -2, -3, and -9 from vascular smooth muscle cells and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:769–775.
78. Mao X, DeBenedittis P, Sun Y, Chen J, Yuan K, Jiao K, Chen Y. Vascular smooth muscle cell Smad4 gene is important for mouse vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:2171–2177.
79. Mariucci EM, Lovato L, Rosati M, Palena LM, Bonvicini M, Fattori R. Dilation of peripheral vessels in Marfan syndrome: importance of thoracoabdominal MR angiography. *Int J Cardiol*. 2013;167:2928–2931.
80. McKellar SH, Tester DJ, Yagubyan M, Majumdar R, Ackerman MJ, Sundt TM. Novel NOTCH1 mutations in patients with bicuspid aortic valve disease and thoracic aortic aneurysms. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007;134:290–296.
81. Melhuish TA, Gallo CM, Wotton D. TGIF2 interacts with histone deacetylase 1 and represses transcription. *J Biol Chem*. 2001;276:32109–32114.
82. Milewicz DM, Dietz HC, Miller DC. Treatment of aortic disease in patients with Marfan syndrome. *Circulation*. 2005;111:e150–7.
83. Mohamed SA, Aherrahrou Z, Liptau H, Erasmi AW, Hagemann C, Wrobel S, Borzym K, Schunkert H, Sievers HH, Erdmann J. Novel missense mutations (p.T596M and p.P1797H) in NOTCH1 in patients with bicuspid aortic valve. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;345:1460–1465.

84. Mohamed SA, Radtke A, Saraei R, Bullerdiek J, Sorani H, Nimzyk R, Karluss A, Sievers HH, Belge G. Locally different endothelial nitric oxide synthase protein levels in ascending aortic aneurysms of bicuspid and tricuspid aortic valve. *Cardiol Res Pract.* 2012;165957.
85. Mookadam F, Thota VR, Garcia-Lopez AM, Emani UR, Alharthi MS, Zamorano J, Khandheria BK. Unicuspid aortic valve in adults: a systematic review. *J Heart Valve Dis.* 2010;19:79–85.
86. Mosorin M, Juvonen J, Biancari F, Satta J, Surcel HM, Leinonen M, Saikku P, Juvonen T. Use of doxycycline to decrease the growth rate of abdominal aortic aneurysms: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *J Vasc Surg.* 2001;34:606–610.
87. Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE, Myers L, Bunton TE, Gayraud B, Ramirez F, Sakai LY, Dietz HC. Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet.* 2003;33:407–411.
88. Nistri S, Sorbo MD, Marin M, Palisi M, Scognamiglio R, Thiene G. Aortic root dilatation in young men with normally functioning bicuspid aortic valves. *Heart.* 1999;82:19–22.
89. Nistri S, Porciani MC, Attanasio M, Abbate R, Gensini GF, Pepe G. Association of Marfan syndrome and bicuspid aortic valve: frequency and outcome. *Int J Cardiol.* 2012;155:324–325.
90. Niwa K, Perloff JK, Bhuta SM, Laks H, Drinkwater DC, Child JS, Miner PD. Structural abnormalities of great arterial walls in congenital heart disease: light and electron microscopic analyses. *Circulation.* 2001;103:393–400.
91. Nordon IM, Hinchliffe RJ, Loftus IM, Thompson MM. Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol.* 2011;8:92–102.
92. Novaro GM, Mishra M, Griffin BP. Incidence and echocardiographic features of congenital unicuspid aortic valve in an adult population. *J Heart Valve Dis.* 2003;12:674–678.
93. Pachulski RT, Weinberg AL, Chan KL. Aortic aneurysm in patients with functionally normal or minimally stenotic bicuspid aortic valve. *Am J Cardiol.* 1991;67:781–782.
94. Padang R, Bagnall RD, Semsarian C. Genetic basis of familial valvular heart disease. *Circ Cardiovasc Genet.* 2012;5:569–580.
95. Padang RR, Bagnall RDR, Richmond DRD, Bannon PGP, Semsarian CC. Rare non-synonymous variations in the transcriptional activation domains

- of GATA5 in bicuspid aortic valve disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;53:277–281.
96. Pannu H, Tran-Fadulu V, Papke CL, Scherer S, Liu Y, Presley C, Guo D, Estrera AL, Safi HJ, Brasier AR, Vick GW, Marian AJ, Raman CS, Buja LM, Milewicz DM. MYH11 mutations result in a distinct vascular pathology driven by insulin-like growth factor 1 and angiotensin II. *Hum Mol Genet.* 2007;16:2453–2462.
  97. Parry DJ, Al-Barjas HS, Chappell L, Rashid ST, Ariëns RAS, Scott DJA. Markers of inflammation in men with small abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg.* 2010;52:145–151.
  98. Pepe G, Nistri S, Giusti B, Sticchi E, Attanasio M, Porciani C, Abbate R, Bonow RO, Yacoub M, Gensini GF. Identification of fibrillin 1 gene mutations in patients with bicuspid aortic valve (BAV) without Marfan syndrome. *BMC Med Genet.* 2014;15:23.
  99. Phanish MK, Wahab NA, Colville-Nash P, Hendry BM, Dockrell MEC. The differential role of Smad2 and Smad3 in the regulation of pro-fibrotic TGFbeta1 responses in human proximal-tubule epithelial cells. *Biochem J.* 2006;393:601–607.
  100. Pomerance A, Yacoub MH, Gula G. The surgical pathology of thoracic aortic aneurysms. *Histopathology.* 1977;1:257–276.
  101. Ramirez F, Dietz HC. Extracellular microfibrils in vertebrate development and disease processes. *J Biol Chem.* 2009;284:14677–14681.
  102. Ranjan V, Xiao Z, Diamond SL. Constitutive NOS expression in cultured endothelial cells is elevated by fluid shear stress. *Am J Physiol.* 1995;269:H550–5.
  103. Renard M, Callewaert B, Baetens M, Campens L, Macdermot K, Fryns J-P, Bonduelle M, Dietz HC, Gaspar IM, Cavaco D, Stattin E-L, Schrandt-Stumpel C, Coucke P, Loeys B, De Paepe A, De Backer J. Novel MYH11 and ACTA2 mutations reveal a role for enhanced TGFβ signaling in FTAAD. *Int J Cardiol.* 2013;165:314–321.
  104. Roberts WC, Ko JM. Weights of operatively-excised stenotic unicuspid, bicuspid, and tricuspid aortic valves and their relation to age, sex, body mass index, and presence or absence of concomitant coronary artery bypass grafting. *Am J Cardiol.* 2003;92:1057–1065.
  105. Roberts WC, Ko JM. 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.* 2005;111:920–925.

106. Roberts WC, Ko JM. Clinical and morphologic features of the congenitally unicuspid aocommissural stenotic and regurgitant aortic valve. *Cardiology*. 2007;108:79–81.
107. Russo CF, Mazzetti S, Garatti A, Ribera E, Milazzo A, Bruschi G, Lanfranconi M, Colombo T, Vitali E. Aortic complications after bicuspid aortic valve replacement: long-term results. *Ann Thorac Surg*. 2002;74:1773–1776
108. Santini F, Gatti G, Prioli A, Mazzucco A, Santini F, Gatti G, Prioli A, Mazzucco A. Pulmonary autograft replacement of the bicuspid aortic valve: a successful surgical option for young adults. *Int J Cardiol*. 1999;71:115–120.
109. Saura M, Zaragoza C, Cao W, Bao C, Rodríguez-Puyol M, Rodríguez-Puyol D, Lowenstein CJ. Smad2 mediates transforming growth factor-beta induction of endothelial nitric oxide synthase expression. *Circ Res*. 2002;91:806–813.
110. Schaefer BM, Lewin MB, Stout KK, Gill E, Prueitt A, Byers PH, Otto CM. The bicuspid aortic valve: an integrated phenotypic classification of leaflet morphology and aortic root shape. *Heart*. 2008;94:1634–1638.
111. Schäfers HJ, Aicher D, Riodionycheva S, Lindinger A, Rädle-Hurst T, Langer F, Abdul-Khaliq H. Bicuspidization of the unicuspid aortic valve: a new reconstructive approach. *Ann Thorac Surg*. 2008;85:2012–2018.
112. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*. 2006;7:3.
113. Searles CD. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol, Cell Physiol*. 2006;291:C803–16.
114. Segura AM, Luna RE, Horiba K, Stetler-Stevenson WG, McAllister HA, Willerson JT, Ferrans VJ. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases and their inhibitors in thoracic aortic aneurysms and aortic valves of patients with Marfan's syndrome. *Circulation*. 1998;98:II331–337
115. Siu SC, Silversides CK. Bicuspid aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55:2789–2800.
116. Spagnoli FM, Brivanlou AH. The Gata5 target, TGIF2, defines the pancreatic region by modulating BMP signals within the endoderm. *Development*. 2008;135:451–461.

117. Subramanian R, Olson LJ, Edwards WD. Surgical pathology of pure aortic stenosis: a study of 374 cases. *Mayo Clin Proc.* 1984;59:683–690.
118. Tang Y, Urs S, Liaw L. Hairy-related transcription factors inhibit Notch-induced smooth muscle alpha-actin expression by interfering with Notch intracellular domain/CBF-1 complex interaction with the CBF-1-binding site. *Circ Res.* 2008;102:661–668.
119. van de Laar IM, Oldenburg RA, Pals G, Roos-Hesselink JW, de Graaf BM, Verhagen JM, Hoedemaekers YM, Willemsen R, Severijnen LA, Venselaar H, Vriend G, Pattynama PM, Collée M, Majoor-Krakauer D, Poldermans D, Frohn-Mulder IM, Micha D, Timmermans J, Hilhorst-Hofstee Y, Bierma-Zeinstra SM, Willems PJ, Kros JM, Oei EH, Oostra BA, Wessels MW, Bertoli-Avella AM. Mutations in SMAD3 cause a syndromic form of aortic aneurysms and dissections with early-onset osteoarthritis. *Nat Genet.* 2011;43:121–126.
120. Verrecchia F, Chu ML, Mauviel A. Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *J Biol Chem.* 2001;276:17058–17062.
121. Wågsäter D, Paloschi V, Hanemaaijer R, Hultenby K, Bank RA, Franco-Cereceda A, Lindeman JHN, Eriksson P. Impaired Collagen Biosynthesis and Cross-linking in Aorta of Patients With Bicuspid Aortic Valve. *J Am Heart Assoc.* 2013;2:e000034.
122. Wang H, Yan S, Chai H, Riha GM, Li M, Yao Q, Chen C. Shear stress induces endothelial transdifferentiation from mouse smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;346:860–865.
123. Wang J, Luo X-J, Xin Y-F, Liu Y, Liu Z-M, Wang Q, Li R-G, Fang W-Y, Wang X-Z, Yang Y-Q. Novel GATA6 mutations associated with congenital ventricular septal defect or tetralogy of fallot. *DNA Cell Biol.* 2012;31:1610–1617.
124. Weiss A, Attisano L. The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2013;2:47–63.
125. Willaert A, Khatri S, Callewaert BL, Coucke PJ, Crosby SD, Lee JGH, Davis EC, Shiva S, Tsang M, De Paepe A, Urban Z. GLUT10 is required for the development of the cardiovascular system and the notochord and connects mitochondrial function to TGFβ signaling. *Hum Mol Genet.* 2012;21:1248–1259.
126. Xiong W, Knispel RA, Dietz HC, Ramirez F, Baxter BT. Doxycycline delays aneurysm rupture in a mouse model of Marfan syndrome. *J Vasc Surg.* 2008;47:166–72

127. Yang Y-Q, Gharibeh L, Li R-G, Xin Y-F, Wang J, Liu Z-M, Qiu X-B, Xu Y-J, Xu L, Qu X-K, Liu X, Fang W-Y, Huang R-T, Xue S, Nemer G. GATA4 loss-of-function mutations underlie familial tetralogy of fallot. *Hum Mutat.* 2013;34:1662–1671.
128. Yasuda H, Nakatani S, Stugaard M, Tsujita-Kuroda Y, Bando K, Kobayashi J, Yamagishi M, Kitakaze M, Kitamura S, Miyatake K. Failure to prevent progressive dilation of ascending aorta by aortic valve replacement in patients with bicuspid aortic valve: comparison with tricuspid aortic valve. *Circulation.* 2003;108 Suppl 1:II291–294.
129. Zavadil J, Bitzer M, Liang D, Yang YC, Massimi A, Kneitz S, Piek E, Böttinger EP. Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:6686–6691.
130. Zavadil J, Cermak L, Soto-Nieves N, Böttinger EP. Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *EMBO J.* 2004;23:1155–1165.
131. Zhang X, Shen YH, LeMaire SA. Thoracic aortic dissection: are matrix metalloproteinases involved? *Vascular.* 2009;17:147–157.
132. Zhou Y, Poczatek MH, Berecek KH, Murphy-Ullrich JE. Thrombospondin 1 mediates angiotensin II induction of TGF-beta activation by cardiac and renal cells under both high and low glucose conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;339:633–641.
133. Zhu L, Vranckx R, Khau Van Kien P, Lalande A, Boisset N, Mathieu F, Wegman M, Glancy L, Gasc J-M, Brunotte F, Bruneval P, Wolf J-E, Michel J-B, Jeunemaitre X. Mutations in myosin heavy chain 11 cause a syndrome associating thoracic aortic aneurysm/aortic dissection and patent ductus arteriosus. *Nat Genet.* 2006;38:343–349.

## 7. Publikationen

1. Henn D, Bandner-Risch D, Perttunen H, Schmied W, Porras C, Ceballos F, Rodriguez-Losada N, Schäfers H-J. Identification of reference genes for quantitative RT-PCR in ascending aortic aneurysms. PLoS ONE. 2013;8:e54132.
2. Henn D, Perttunen H, Gauer S, Schmied W, Porras C, Such M, Schäfers H-J. GATA5 and Endothelial nitric oxide synthase expression in the ascending aorta is related to aortic size and valve morphology. Ann Thorac Surg. 2014;97:2019-2026

## 8. Danksagung

Ganz besonders möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. H-J. Schäfers, für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die exzellente Betreuung danken. Sein kompetenter Rat und seine unermüdliche Unterstützung des gesamten Forschungsprojektes haben das Gelingen dieser Arbeit erst ermöglicht.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Herrn Dipl. Psych. Wolfram Schmied für seine Unterstützung bei der Auswertung der Daten, sein großes Engagement sowie seine kritischen Anregungen.

Frau Doris Bandner-Risch danke ich herzlich für ihre Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Frau Dr. Noela Rodriguez-Losada gilt mein herzlicher Dank für die Einweisung in die Laborarbeit an der Universität Malaga sowie für die anregenden Diskussionen und die gute Zusammenarbeit während des Forschungsprojektes.

Bei meiner Mitdoktorandin Hilja Perttunen möchte ich mich ganz herzlich für die exzellente Zusammenarbeit im Labor bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern für die Unterstützung meines Medizinstudiums danken und dafür, dass sie mir während der Anfertigung dieser Arbeit zur Seite gestanden haben.

## 9. Lebenslauf

15.10.1989	geboren in Idar-Oberstein
2000-2008	Gymnasium Birkenfeld
SS 05-WS 07/08	Philosophie-Frühstudium, Universität Trier
2007	Preisträger beim Klavierwettbewerb „Madeleine de Valmalète“, Paris
2008	Abitur
WS 08/09-SS 13	Medizinstudium an der Universität des Saarlandes
2010	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 2010	Doktorarbeit an der Klinik für Thorax- und Herz-Gefäßchirurgie der Universität des Saarlandes (Prof. Dr. H.-J. Schäfers)
2011	Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes
02/2011	Laboraufenthalt am Institut für kardiologische Forschung der Universität Malaga, Spanien
03-04/2011	Famulatur in der Klinik für Plastische- und Handchirurgie an der Universität Freiburg
08/2011	Famulatur in der Klinik für Herz-Thorax-Chirurgie an der Universität Göteborg, Schweden
09/2011	Famulatur in der Klinik für Thorax- und Herz-Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes
03/2012	Famulatur am Dept. of Cardiothoracic Surgery des Dubai Hospital, Dubai, VAE
08-09/2012	Famulatur am Dept. of Plastic and Reconstructive Surgery des MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA (Dr. Charles E. Butler)

- 09-10/2012 Famulatur am Texas Heart Institute at St. Luke's Episcopal Hospital, Houston, TX, USA (Dr. J. Michael Duncan)
- 03-04/2013 Research elective am Dept. of Plastic and Reconstructive Surgery, Stanford University, CA, USA (Dr. Gordon K. Lee) (DAAD-Promos-Stipendium)
- WS 2013-SS 2014 Medizinstudium an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau
- 08-10/2013 PJ-Tertial Innere Medizin an der Universtätsklinik für Kardiologie, Inselspital Bern
- 10-12/2013 PJ-Tertial am Dept. of Medicine, Division of Cardiovascular Medicine, Division of Medical Oncology and Hematology, Louisville University Hospital, Louisville, KY, USA
- 01-03/2014 PJ-Tertial Chirurgie an den Kliniken für Thorax- und Herz-Gefäßchirurgie sowie für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes
- 04-07/2014 PJ-Tertial Plastische Chirurgie (Wahlfach) an der Klinik für Plastische- und Handchirurgie, Universitätsklinik Freiburg